

# Aislamiento y caracterización química de alcaloides del tipo Amaryllidaceae. Producción de galantamina por cultivos "in vitro" de *Narcissus confusus*

Salvador Bergoñón Fuster

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

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

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION QUIMICA  
DE ALCALOIDES DEL TIPO AMARYLLIDACEAE.  
PRODUCCION DE GALANTAMINA POR CULTIVOS  
*IN VITRO* DE *NARCISSUS CONFUSUS***

SALVADOR BERGOÑON FUSTER



Unidad de Fisiología Vegetal  
Departamento de Productos Naturales, Biología Vegetal y Edafología  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Barcelona

Junio, 1994

Memoria presentada por D. SALVADOR BERGOÑON FUSTER, para optar al grado de Doctor en Farmacia por la Universidad de Barcelona.

*Directores*

Dr. CARLES CODINA i MAHRER  
Profesor Titular de la Universidad de Barcelona

Dr. ENRIC MELE i GRAU  
Investigador del Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries de Cabrils  
(Barcelona)

*Programa de Doctorado*

PRODUCTOS NATURALES DE ORIGEN VEGETAL

*Bienio*

1990-92

*Tutor*

Dra. M<sup>a</sup> TERESA PIÑOL SERRA

El presente trabajo ha sido posible gracias a la concesión de una beca de Formació d'Investigadors concedida por la Direcció General d'Universitats de la Generalitat de Catalunya, y se ha realizado en el marco de los proyectos de investigación que a continuación se relacionan:

Proyecto: "Obtenció i producció d'alcaloides farmacològicament actius a partir de cultius *in vitro*."  
Organismo: CIRIT-CICYT (QFN91-4205)  
Programa: Química Fina  
Período: 1991-94

Proyecto: "Obtenció d'alcaloides farmacològicament actius i la seva producció a partir de cultius *in vitro*."  
Organismo: CIRIT (AR91-283)  
Programa: Ajuts a projectes d'Iniciació a la Recerca  
Período: 1992

Proyecto: "Estudio estructural y farmacológico de alcaloides de la familia Amaryllidaceae."  
Organismo: Dirección General de Investigación Científica y Técnica  
Programa: Acciones Integradas hispano-francesas  
Período: 1992 (prorrogada en 1993)

Hasta la fecha, el presente trabajo ha permitido la realización de las siguientes publicaciones:

Bergoñón S Codina C Bastida J Viladomat F & Melé E (1992) The shake-liquid culture as an alternative way to the multiplication of Narcissus plants. Acta Horticulturae. 325: 447

<sup>1</sup>Codina C Bastida J Viladomat F Fernández JM Bergoñón S Rubiralta M & Quirion JC (1993) Alkaloids from Narcissus muñozii-garmendia. Phytochemistry. 32: 1354

Bastida J Bergoñón S Viladomat F & Codina C (1994) Alkaloids from Narcissus primigenius. Planta Med. 60: 95

Weniger B Italiano L Beck JP Anton R Bastida J Bergoñón S & Codina C (1994) Cytotoxic activity of Amaryllidaceae alkaloids. Planta Med. (en prensa)

Actualmente está en preparación un trabajo sobre el estudio fitoquímico de la especie *Narcissus nevadensis*, y otro sobre la producción de alcaloides en cultivos organogénicos de *Narcissus confusus*.

<sup>1</sup> Si bien la especie objeto de estudio de esta publicación no forma parte de la presente tesis, la caracterización de uno de sus alcaloides, la **6-O-metil-licorenina**, ha sido posible gracias al trabajo de elucidación estructural realizado con el mismo compuesto obtenido previamente de *Narcissus nevadensis*.

## AGRADECIMIENTOS

No quisiera comenzar esta Tesis sin antes expresar mi más sincero agradecimiento a diversas personas y entidades sin cuyo apoyo, el trabajo realizado hubiera sido, cuanto menos más difícil de llevarlo a cabo:

- al Comissionat d'Universitats i Recerca y más concretamente a la Direcció General de Recerca por haberme concedido una Beca predoctoral y cuantas Bolsas de Viaje para el extranjero he solicitado, gracias a todo lo cual he podido realizar cuanto figura en esta Tesis y otras investigaciones paralelas, no incluídas en este trabajo; igualmente agradezco a la CIRIT la financiación con que ha sido apoyada esta investigación por medio de algunos de los proyectos mencionados anteriormente y más concretamente el "Ajut d'Iniciació a la Recerca" concedido a mi persona,
- al Dr. Carlos Codina por haberme aceptado en el Laboratorio donde he realizado gran parte del trabajo de la Tesis, e, igualmente al IRTA de Cabrils, y, a sus responsables, el Dr. J.J. Bonet (director del Centro) y el Dr. Arús (director del Departamento de Genética Vegetal), por haber permitido mi presencia así como el uso que hice de las instalaciones y equipo de este Centro,
- a los Dres. Carlos Codina (Facultat de Farmàcia) y Enric Melé (IRTA-Cabrils), mis directores, por la responsabilidad que han adquirido conmigo y por los sabios consejos, fruto de la experiencia de muchos años en la investigación,
- al Dr. Jaime Bastida por su asesoramiento en cuanto a los temas relacionados con la elucidación estructural de algunos de los alcaloides aislados en la parte fitoquímica de la Tesis, así como por el apoyo mostrado en las dificultades que como en todo trabajo, los tuvo también la presente Tesis,
- a los Dres. Henri Philippe Husson y Jean-Charles Quirion por haberme aceptado en el Laboratorio bajo su dirección en el "Institut de Chimie des Substances Naturelles" del CNRS de Gif-Sur-Yvette donde pude adquirir mayor experiencia sobre todos los temas tratados en mi investigación,
- igualmente, del mismo CNRS, agradezco las interesantes sugerencias de Mme Kan (investigadora del mismo Instituto), la colaboración y el compañerismo de mis compañeros de allí, especialmente a José y a Jean-François,
- también al Dr. Comella de la Universitat de Lleida por el entusiasmo con que me introdujo en un tema nuevo, pero muy interesante para mí, como es el mundo del cerebro y las patologías asociadas a él, y más concretamente la enfermedad de Alzheimer y demencias relacionadas,
- a Nieves, y su jefe Spencer Brown, por haberme iniciado en otro tema de gran futuro que espero desarrollar como es la citometría de flujo en sus aplicaciones agronómicas y a la selección de líneas altamente productivas en alcaloides,

- a la Dra. Tran Than Vanh, por sus interesantes pero desinteresadas sugerencias sobre las grandes posibilidades del cultivo *in vitro* vegetal; espero hacer lo posible para aplicarlas a mi tema concreto de investigación vegetal,
- al "Institut de Chimie des Substances Naturelles", en general, y a su director Mr. Poitier por haberme permitido realizar la estancia y con ello ponerme en contacto con un mundo científico de primera fila, del que tenemos mucho que aprender,
- a los Dres. Robert Anton y Bernard Weniger por haberme aceptado en su Laboratorio de Farmacognosia de la Universidad de Strasbourg. A Bernard y a su esposa, especialmente, por la gran hospitalidad con que me acogieron y por haberme hecho más agradable la estancia,
- al Dr. Beck, por su asesoramiento en la interpretación de los ensayos biológicos,
- a Lilianne por demostrarme que para hacer algo en Ciencia no es preciso ser Doctor, y por hacerme participe de sus conocimientos en el campo de los ensayos con drogas bioactivas; a ella va dedicada parte de esta Tesis,
- a Ali, por el espíritu abierto con que me acogió, por el trato cordial, el intercambio desinteresado de ideas, por haber sido un gran amigo mientras estuve en Strasbourg y por acordarse de mí de tanto en tanto después de mi partida,
- a los Dres. Herminio Nava de la Universidad de Oviedo, y Javier Fernández Casas del Real Jardín Botánico de Madrid, por realizar la identificación de las especies vegetales objeto de estudio en esta memoria, algo que es fundamental en cualquier investigación de productos naturales con este origen,
- a toda la gente del IRTA-Cabrils, pero especialmente a Elena, por demostrarme lo mismo que Lilianne en Strasbourg además de haberme apoyado en los difíciles momentos del comienzo de esta Tesis, y que, en general, en todo período de cambio, aparecen. A ella va dedicada la parte de cultivos vegetales de esta Tesis (espero que le guste),
- al Dr. J. Guarro de la Facultat de Medicina de Reus, por su "asesoramiento micológico",
- a María, del aula de Informática, por descubrirme algunos de los recursos, que aunque yo desconocía, parece que cuenta esta Universidad,
- a Laura, mi hermana, por serlo (hermana) y por su "fraternal" apoyo en todo momento,
- a Mar, por representar una bocanada de aire fresco en el Laboratorio, así como por contar con su amistad (de la que me precio),
- a mis compañeros de Laboratorio, actuales y del pasado, presentes y ausentes, pero especialmente a Miquel, por hacerme participe, de sus conocimientos en cromatografía líquida; a Teresa Capell, por su sincera amistad, a Narcís, por ser un buen compañero en los momentos agradables y los desagradables. A él, le dedico la

parte de Fitoquímica de esta Tesis. A José Luis, por descubrirme un Nuevo Mundo, no sólo geográfico sino también científico. Y, finalmente, a Montse por ser mi colega de trabajo y sin embargo la mejor amiga que he encontrado en estos años,

A todos ellos, gracias y espero que si llegan a ver esta Tesis, no se borren de estos Agradecimientos.

*Salvador Bergoñón Juster*



*Cuando contemplo una de mis viejas películas, sufro. Porque aquello que he podido hacer es muy inferior a aquello que yo hubiera querido hacer.*

Luis Buñuel (1900-1983), director de cine español

*Contra toda opinión, no son los pintores sino los espectadores quienes hacen los cuadros.*

Marcel Duchamp (1887-1968), pintor francés

*Los primeros cuarenta años de vida nos dan el texto; los treinta siguientes, el comentario.*

Arthur Schopenhauer (1788-1860), filósofo alemán

## INDICE

<b>INDICE DE ABREVIATURAS</b> .....	i
<b>OBJETIVOS Y PLANIFICACION DEL TRABAJO</b> .....	iii

<b>PRIMERA PARTE: CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA COMPOSICION ALCALOIDICA EN EL GENERO <i>NARCISSUS</i> L.</b> .....	1
--	---

<b>1. INTRODUCCION</b> .....	3
------------------------------	---

<b>1.1. CONSIDERACIONES BOTANICAS DEL GENERO <i>NARCISSUS</i> L.</b> .....	5
--	---

<b>1.1.1. Sección <i>Pseudonarcissus</i> DC.</b> .....	5
--	---

<b>1.1.1.1. <i>Narcissus primigenius</i> (Fdez. Suárez ex Lainz) Fdez. Casas &amp; Lainz</b> .....	6
--	---

<b>1.1.1.2. <i>Narcissus nevadensis</i> Pugsley</b> .....	8
---	---

<b>1.1.1.3. <i>Narcissus confusus</i> Pugsley</b> .....	9
---	---

<b>1.2. CONSIDERACIONES QUÍMICAS DEL GÉNERO <i>NARCISSUS</i> L.</b> .....	11
---	----

<b>1.2.1. Compuestos tóxicos y de uso farmacéutico</b> .....	11
--	----

<b>1.2.2. Otros compuestos</b> .....	12
--------------------------------------	----

<b>1.3. LOS ALCALOIDES DE LAS AMARILIDÁCEAS</b> .....	14
---	----

<b>1.3.1. Consideraciones químicas</b> .....	14
--	----

<b>1.3.1.1. Biosíntesis</b> .....	14
-----------------------------------	----

<b>1.3.1.1.1. Acoplamiento fenólico <i>p-o'</i></b> .....	16
---	----

<b>1.3.1.1.2. Acoplamiento fenólico <i>o-p'</i></b> .....	17
---	----

<b>1.3.1.1.3. Acoplamiento fenólico <i>p-p'</i></b> .....	19
---	----

<b>1.3.2. Consideraciones biológicas</b> .....	20
--	----

<b>2. MATERIAL Y METODOS</b> .....	27
------------------------------------	----

<b>2.1. PROCEDENCIA DEL MATERIAL VEGETAL</b> .....	29
--	----

<b>2.2. EXTRACCION DE LOS ALCALOIDES</b> .....	30
--	----

<b>2.2.1. Fraccionamiento de <i>Narcissus primigenius</i></b> .....	30
---	----

<b>2.2.2. Fraccionamiento de <i>Narcissus nevadensis</i></b> .....	32
--	----

<b>2.3. SEPARACION DE LOS ALCALOIDES</b> .....	34
--	----

<b>2.3.1. Aislamiento de los alcaloides de <i>N. primigenius</i></b> .....	34
--	----

<b>2.3.1.1. Extracto A</b> .....	34
----------------------------------	----

<b>2.3.1.2. Extracto C</b> .....	36
----------------------------------	----

<b>2.3.1.3. Extracto D</b> .....	38
----------------------------------	----

<b>2.3.2. Aislamiento de los alcaloides de <i>N. nevadensis</i></b> .....	40
---	----

<b>2.3.2.1. Extracto C</b> .....	40
----------------------------------	----

2.4. IDENTIFICACION DE LOS ALCALOIDES . . . . .	43
2.5. CALCULOS MOLECULARES SOBRE LOS ALCALOIDES AISLADOS . . . . .	44
<b>3. RESULTADOS . . . . .</b>	<b>45</b>
<b>3.1. ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE LOS ALCALOIDES DE   <i>NARCISSUS PRIMIGENIUS</i> . . . . .</b>	<b>47</b>
3.1.1. Homolicorina . . . . .	48
3.1.2. 8-O-demetilhomolicorina . . . . .	54
3.1.3. Hemantamina . . . . .	58
3.1.4. 8-O-demetilmartidina . . . . .	68
3.1.5. Trisferidina . . . . .	78
<b>3.2. ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE LOS ALCALOIDES DE   <i>NARCISSUS NEVADENSIS</i> . . . . .</b>	<b>81</b>
3.2.1. Licorenina . . . . .	81
3.2.2. 6-O-metil-licorenina . . . . .	86
3.2.3. Licorina . . . . .	93
3.2.4. 2-epilicorina . . . . .	101
3.2.5. Galantina . . . . .	105
3.2.6. Narcisidina . . . . .	113
3.2.7. Sternbergina . . . . .	120
3.2.8. Observaciones finales . . . . .	125
<b>4. CONCLUSIONES . . . . .</b>	<b>127</b>
<b>5. BIBLIOGRAFIA . . . . .</b>	<b>131</b>

**SEGUNDA PARTE: ENSAYOS DE ALGUNOS ALCALOIDES DE LA FAMILIA  
AMARYLLIDACEAE SOBRE CEPAS TUMORALES . . . . . 143**

<b>1. INTRODUCCION . . . . .</b>	<b>145</b>
<b>1.1. BUSQUEDA Y SELECCION DE PRINCIPIOS ACTIVOS   ANTITUMORALES DE ORIGEN VEGETAL . . . . .</b>	<b>147</b>
<b>1.2. ETNOFARMACOLOGIA DE LAS AMARYLLIDACEAE . . . . .</b>	<b>150</b>
<b>1.3. ACCIONES FARMACOLOGICAS EN LAS AMARILLIDACEAS . . . . .</b>	<b>160</b>
1.3.1. Alcaloides . . . . .	160
1.3.2. Lectinas . . . . .	163
1.3.2.1. Lectinas de Amaryllidaceae . . . . .	164
<b>2. MATERIAL Y METODOS . . . . .</b>	<b>167</b>
<b>2.1. ALCALOIDES UTILIZADOS . . . . .</b>	<b>169</b>
<b>2.2. LINEAS CELULARES UTILIZADAS . . . . .</b>	<b>171</b>
<b>2.2.1. Ensayos de citotoxicidad . . . . .</b>	<b>171</b>
2.2.1.1. Fundamento . . . . .	171
2.2.1.2. Metodología . . . . .	171
2.2.1.3. Tratamiento informático . . . . .	172
<b>3. RESULTADOS . . . . .</b>	<b>173</b>

<b>3.1. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTITUMORAL Y TOXICIDAD</b> . . . . .	175
<b>3.2. OBSERVACIONES COMPLEMENTARIAS</b> . . . . .	183
<b>3.3. POSIBLES RELACIONES ENTRE LA ESTRUCTURA Y LA ACTIVIDAD DE LOS COMPUESTOS ENSAYADOS.</b> . . . . .	184
3.3.1. Alcaloides del tipo licorina . . . . .	184
3.3.2. Alcaloides del tipo $\alpha$ -crinano . . . . .	184
3.3.3. Alcaloides del tipo tazetina . . . . .	185
<b><u>4. CONCLUSIONES</u></b> . . . . .	187
<b><u>5. BIBLIOGRAFIA</u></b> . . . . .	191

**TERCERA PARTE: PRODUCCION DE GALANTAMINA EN CULTIVOS *IN VITRO* DE *NARCISSUS CONFUSUS*.** . . . . . 201

<b><u>1. INTRODUCCION</u></b> . . . . .	203
<b>1.1. GALANTAMINA COMO AGENTE TERAPEUTICO DE INTERES</b> . . . . .	205
<b>1.2. PERSPECTIVAS DE APLICACION DE LA GALANTAMINA EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER</b> . . . . .	206
1.2.1. Posibles etiologías de la enfermedad . . . . .	206
1.2.2. Estrategias actuales para el tratamiento. . . . .	207
1.2.2.1. Drogas colinérgicas . . . . .	207
1.2.3. Terapias con futuro para la enfermedad de Alzheimer . . . . .	210
1.2.4. La Etnofarmacología como fuente de productos alternativos en la terapia de la enfermedad de Alzheimer . . . . .	213
1.2.5. Propiedades farmacológicas de la galantamina. Comparación con los fármacos clásicos en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. . . . .	217
1.2.6. Relaciones estructura-actividad cuantitativas de galantamina. Derivados prometedores . . . . .	218
<b>1.3. PRODUCCION DE ALCALOIDES POR BIOTECNOLOGIA VEGETAL</b> . . . . .	220
1.3.1. Cultivos celulares . . . . .	222
1.3.2. Cultivos de órganos . . . . .	222
1.3.3. Problemática específica de las monocotiledóneas bulbosas . . . . .	223
1.3.3.1. Técnicas de micropropagación de bulbosas y cormosas . . . . .	224
1.3.3.1.1. Explantes que se han utilizado hasta el momento . . . . .	225
1.3.3.1.2. Origen de los brotes adventicios. . . . .	226
1.3.3.1.3. Desarrollo de los brotes cultivados <i>in vitro</i> . . . . .	226
1.3.3.1.4. Tasas de la propagación <i>in vitro</i> . . . . .	226
1.3.3.2. Perspectivas del sistema "liquid-shake culture" como modelo experimental para la producción de sustancias de interés en <i>Narcissus L.</i> . . . . .	227
<b><u>2. MATERIAL Y METODOS</u></b> . . . . .	229
<b>2.1. MATERIAL VEGETAL</b> . . . . .	232
<b>2.2. OBTENCION DE TEJIDO DE CALLO</b> . . . . .	233

<b>2.3. OBTENCION DE UN STOCK DE MATERIAL VEGETAL</b> . . . . .	235
<b>2.3.1. Desinfección del material (ensayo previo con <i>Narcissus confusus</i>-   <i>Narcissus "Salomé")</i></b> . . . . .	235
<b>2.3.2. Multiplicación rápida del material</b> . . . . .	242
2.3.2.1. Cultivo de "twin-scales" . . . . .	242
2.3.2.2. Cultivo de brotes y obtención de agregados meristemáticos . . . . .	245
2.3.2.3. Introducción de los agregados al cultivo en medio líquido y obtención de material para ensayos . . . . .	246
<b>2.4. ANALISIS DE LOS ALCALOIDES POR HPLC</b> . . . . .	250
2.4.1. Condiciones analíticas . . . . .	250
<b>2.5. EFECTO DE LA ADICION DE ACIDO T-CINAMICO SOBRE LA PRODUCCION DE ALCALOIDES EN CULTIVOS DE AGREGADOS DE <i>NARCISSUS CONFUSUS</i></b> . . . . .	256
<b><u>3. RESULTADOS Y DISCUSION</u></b> . . . . .	263
3.1. Crecimiento de los cultivos . . . . .	265
3.2. Producción de alcaloides . . . . .	266
3.2.1. Par galantamina/ <i>N</i> -formilgalantamina . . . . .	268
3.2.2. Par hemantamina/tazetina . . . . .	271
<b><u>4. CONCLUSIONES</u></b> . . . . .	277
<b><u>5. BIBLIOGRAFIA</u></b> . . . . .	281

## INDICE ALFABETICO DE ABREVIATURAS

$\alpha$ D	poder rotatorio
2,4-D	2,4-diclorofenoxiacético
AIA	ácido indolacético
ANA	ácido naftalenacético
BA	benciladenina
brd	doblete ancho
brs	singulete ancho
cb	cultivo de brotes
cc	cultivo de callo
CC	cromatografía en columna
CD <sub>3</sub> OD	metanol deuterado
CDCl <sub>3</sub>	cloroformo deuterado
ce	cultivo de estigmas
COSY	correlaciones homonucleares ( <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H)
cr	cultivo de raíces
d	doblete
DMSO	dimetilsulfóxido
DS	desviación estándar
EA	enfermedad de Alzheimer
ED <sub>50</sub>	dosis eficaz 50
EM	espectrometría de masas
FCN	factor de crecimiento neuronal
HepG2	línea celular de hepatoma humano
HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia
ic	índice de crecimiento
IR	infrarrojo
LD <sub>50</sub>	dosis letal 50
LMTK	línea celular de fibroblasto murínico
Molt4	línea celular de linfoma humano infantil
MS	Murashige y Skoog
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NCI	National Cancer Institute
PF	punto de fusión
PTLC	cromatografía en capa fina preparativa
RIA	Radio Inmunoensayo
RMN	resonancia magnética nuclear
rt	raíces transformadas
s	singulete
sc	suspensión celular
t	triplete
td	triple doblete
TLC	cromatografía en capa fina
UV	ultravioleta
XCOR	correlación heteronuclear <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C

## **PRESENTACION Y OBJETIVOS**

La presente Memoria está estructurada en tres partes bien diferenciadas, como son: a) aislamiento y elucidación estructural de alcaloides de Amarilidáceas; b) determinación de la actividad farmacológica de estos compuestos, y c) producción de uno de ellos, **galantamina**, de probada actividad en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, por cultivos *in vitro*. Esta estructuración, susceptible de ser valorada de manera muy heterogénea, responde a un planteamiento que tiene las justificaciones que a continuación se comentan.

Cuando hace aproximadamente cinco años me incorporé al laboratorio donde se ha realizado el presente trabajo, las líneas de investigación que se desarrollaban abarcaban diversos campos relacionados con los productos naturales, principalmente con aquéllos de interés farmacéutico. Esta actividad investigadora iba desde la más puramente biológica, de interés en Fisiología Vegetal, hasta la de carácter fitoquímico, de interés en diferentes sectores, pero principalmente el farmacéutico, incluyendo la producción de metabolitos secundarios por Biotecnología Vegetal.

Mi primera actividad investigadora se centró en el campo de los productos naturales, desarrollando un trabajo puramente fitoquímico, dirigido al aislamiento y elucidación estructural de alcaloides en plantas de la familia Amaryllidaceae, el cual constituyó mi Tesis de Licenciatura. Una vez concluido, se me presentó la oportunidad de seguir trabajando en el mismo tema y de realizar una investigación más completa, abarcando otros puntos de vista. Así, surgió la idea de iniciar un trabajo, complementario al del estudio fitoquímico, y con un cierto componente de investigación aplicada, que tuviese como finalidad la producción de algún compuesto de interés por un método alternativo a la síntesis orgánica.

Se contaba con información bibliográfica muy interesante sobre la actividad farmacológica de algunos alcaloides de esta familia, y se tenía conocimiento de la utilidad, poco extendida en Occidente, de los alcaloides del tipo **galantamina** en la enfermedad de Alzheimer y otras demencias relacionadas. Se contaba también con datos relativos al contenido de **galantamina**, y de otros alcaloides relacionados de esta familia en plantas previamente estudiadas por el equipo investigador, o por otros grupos. En base a estos antecedentes, se llegó a la determinación de desarrollar un trabajo de investigación original que se centrara, no tan sólo en la obtención e identificación de nuevos productos naturales de origen vegetal sino también en la valoración de sus posibles actividades farmacológicas, y, especialmente, en el desarrollo de un sistema experimental de producción de uno de los alcaloides de este tipo de mayor potencial terapéutico, la **galantamina**, mediante el establecimiento de cultivos *in vitro* de una especie productora.

La parte correspondiente a la valoración de la actividad farmacológica de los alcaloides del tipo Amaryllidaceae respondía a la necesidad de verificar si la labor fitoquímica que se venía realizando tenía o no una posible aplicación terapéutica. Esta parte se ha llevado a cabo en el Laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté de Pharmacie de l'Université Louis Pasteur de Estrasburgo (Francia), donde tienen establecidos diversos ensayos antitumorales y/o citotóxicos, y con el que existe una colaboración científica estable. El trabajo se desarrolló durante una estancia de dos meses en dicho centro, y se realizó con la asistencia técnica y el asesoramiento de los especialistas en este tema.



Si bien la parte relativa al aislamiento y elucidación estructural no presentaba *a priori* problemas insolubles, dada la trayectoria del grupo investigador, así como tampoco la relativa a la valoración farmacológica de los alcaloides, como ya se ha comentado, en lo que hace referencia al establecimiento de un método biotecnológico para la producción de estos metabolitos secundarios, el tema era completamente novedoso, por el hecho de tratarse de plantas bulbosas. Respecto a este tipo de plantas, existe una importante falta de información bibliográfica, sobre el tema, pues la mayoría de trabajos sobre cultivos *in vitro* se realizan con plantas dicotiledóneas, y los relativamente escasos trabajos basados en monocotiledóneas, hacen referencia mayoritariamente a Gramíneas, y a plantas ornamentales. Así, si el número de trabajos existentes sobre el cultivo *in vitro* de bulbosas es reducido, los que versan sobre la producción de metabolitos secundarios de interés son prácticamente inexistentes, no llegando al millar el número de publicaciones en toda la historia de este tipo de cultivos. Es por todo esto, que la parte de la producción biotecnológica de estos alcaloides ha presentado un mayor grado de dificultad en su desarrollo.

Con el presente trabajo se ha pretendido sentar las bases para el establecimiento de un sistema experimental de producción de **galantamina** y alcaloides relacionados, alternativo a la síntesis orgánica, como consecuencia de su elevado coste y bajo rendimiento. Las investigaciones ahora iniciadas tendrán su continuidad en la optimización de la producción de estos compuestos. La necesidad de mejorar al máximo dicha producción se revalorizará si, paralelamente, se confirman los buenos resultados obtenidos hasta la fecha en los ensayos clínicos de la **galantamina** como terapia alternativa para la enfermedad de Alzheimer.

Los objetivos previstos, por tanto, se concretan en los siguientes puntos:

1. Aislamiento y elucidación estructural de alcaloides de diferentes plantas de la familia Amaryllidaceae.

Este objetivo se contempla en la primera parte de la Tesis y supone el estudio fitoquímico del contenido alcaloídico de *Narcissus primigenius* y *N. nevadensis*, especies pertenecientes a la familia Amaryllidaceae, siendo la primera vez que se estudian desde este punto de vista.

2. Evaluación farmacológica de la actividad antitumoral de alcaloides del tipo Amaryllidaceae.

La finalidad de esta segunda parte es la de contribuir a un mejor conocimiento de las acciones farmacológicas que presentan este tipo de alcaloides, habiéndose ensayado no tan sólo alcaloides aislados en las dos especies objeto de estudio en la primera parte, sino también otros previamente obtenidos por el grupo investigador en otras especies de *Narcissus*. El estudio se ha realizado completamente al azar, dado que de las plantas de las que se habían aislado estos alcaloides no existen antecedentes conocidos de un uso etnofarmacológico en el tratamiento del cáncer.

### 3. Producción de galantamina por cultivos *in vitro* de *Narcissus confusus*.

Conocido el valor potencial de la **galantamina** en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, esta tercera parte tiene como objetivo la puesta a punto de un sistema experimental de producción de este alcaloide mediante el uso de cultivos *in vitro* de *Narcissus confusus*, especie que en estudios previos había mostrado contener una elevada proporción de este alcaloide.

Con la presentación de la presente memoria se ha pretendido integrar en un mismo trabajo una serie de conocimientos y experiencias orientadas a la producción de sustancias de interés farmacéutico, que podrían englobarse bajo la denominación de "sustancias de Química Fina", dada la necesidad de conseguir su producción por vías alternativas a las clásicas de síntesis orgánica. El trabajo aquí desarrollado no es más que una realización, a pequeña escala, de lo que es la investigación y desarrollo de nuevos medicamentos, es decir, búsqueda de nuevas sustancias, comprobación de su eficacia sobre determinadas patologías, para, finalmente, plantear su producción por diversas estrategias, siendo la aquí escogida, la basada en el cultivo *in vitro* vegetal.

**PRIMERA PARTE.**

**CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA COMPOSICION  
ALCALOIDICA EN EL GENERO *NARCISSUS* L.**

## 1.1. CONSIDERACIONES BOTANICAS DEL GENERO *NARCISSUS* L.

El género *Narcissus* L. pertenece a la familia Amaryllidaceae, la cual está incluida dentro de la subclase Monocotyledoneae, orden Asparagales (Dahlgren, 1980). Esta familia está constituida por plantas perennes o bianuales, con bulbos subterráneos gruesos, raramente con rizoma, salvo en los géneros *Scadoxus* y *Clivia* (Dahlgren et al., 1985). Las hojas son todas basales, lineares y envainadoras en la base. Las flores son solitarias o agrupadas en umbelas, incluidas en una vaina membranosa o espata cuando están en botón, la cual se rompe en uno o dos segmentos papiráceos al florecer. Las flores tienen simetría radial, perianto de piezas petaloideas más o menos soldadas en la base, a veces con una corona en la garganta, y presentan seis estambres. El ovario es ínfero, trilocular y con un estilo, y el fruto es en cápsula, o raramente en baya (Polunin, 1981).

El género *Narcissus* L. se originó muy probablemente a partir de un ancestro de  $n = 6$ , el cual, a consecuencia de una translocación recíproca, habría dado lugar a los números básicos de 5 y 7 (Fernandes, 1975). El número básico secundario de 11 se habría originado por cruzamiento de una planta  $n = 5$  con el ancestro  $n = 6$ , seguido de duplicación cromosómica. Los números básicos 5 y 11 caracterizan al subgénero *Hermione* (Haw.) Spach, mientras que el 7 caracteriza al subgénero *Narcissus* L. Según Fernandes, la evolución de este género ha tenido lugar por los procesos que se dan generalmente en los vegetales, como son la mutación de genes, reordenamientos cromosómicos, duplicaciones cromosómicas, aneuploidías y poliploidías, e hibridización de especies.

Los dos subgéneros que constituyen el género *Narcissus* presentan distribuciones geográficas diferentes. Así, el subgénero *Hermione* habita en las regiones costeras del Mediterráneo y del Atlántico, en la Península Ibérica y en Marruecos, mientras que el subgénero *Narcissus* crece sobre todo en regiones montañosas de la Península Ibérica, en Marruecos, y también en los Pirineos y en los Alpes.

El subgénero *Hermione* (Haw.) Spach consta de tres secciones: *Serotini* Parl., *Hermione* (que incluye dos subsecciones: *Angustifolii* A. Fernandes y *Hermione*) y *Aurelia* (J. Gay) Bak. Dentro de este subgénero la especie de mayor interés medicinal es *Narcissus tazetta*.

Por su parte, el subgénero *Narcissus*, en el que se incluyen las especies objeto de estudio en esta memoria, es de mayor complejidad taxonómica. Presenta ocho secciones: *Apodanthi* A. Fernandes, *Jonquilla* DC. (que tiene dos subsecciones: la *Jonquilla* y la *Juncifolii* A. Fernandes.), *Tapeinanthus* Traub., *Ganymedes* (Haw.) Schult., *Bulbocodium* DC., *Pseudonarcissus* DC., *Narcissus* L y la sección *x Queltia* (Salisb.) Spreng. formada por híbridos de otras secciones.

### 1.1.1. Sección *Pseudonarcissus* DC.

Las tres especies de *Narcissus* objeto de esta tesis, *N. primigenius*, *N. nevadensis* y *N. confusus*, se incluyen en la sección *Pseudonarcissus* DC. Esta sección engloba muchos de los narcisos útiles para el cultivo, algunos de los cuales son conocidos desde hace tres o cuatro siglos. Este conocimiento tan antiguo ha originado diversos problemas a la hora de separarlos

en especies y subespecies, ya que algunos se han descrito a partir de plantas cultivadas, desconociéndose su auténtico origen silvestre. No hay, pues, una generalizada concordancia. Así, Haworth reconoce sólo una especie en esta sección, mientras que Pugsley reconoce veintiocho, con muchas variedades pero no subespecies. Su monografía sobre esta sección es la más detallada, y aunque algunas ideas han cambiado en los últimos cincuenta años, sigue siendo muy interesante su lectura (Pugsley, 1933). Fernandes incluye diecinueve de las especies de Pugsley bajo *Pseudonarcissus*, dejando sólo tres de esta sección (Fernandes, 1951), pero en sus claves de 1968 recupera dieciséis de éstas al rango de especie, con numerosas variedades pero otra vez sin subespecies (Fernandes, 1968). Webb, en la *Flora Europaea* se quedó a medio camino y propuso reducir el número de especies a seis u ocho, si *N. obvallaris* y *N. lagoi* se retienen, con *N. pseudonarcissus* dividida en siete subespecies (Webb, 1980). Este autor también expresa la opinión de que *N. nevadensis* y *N. moschatus* pertenecen a un rango específico. Este tratamiento no ha encontrado gran aceptación, y de acuerdo con las claves de Fernandes se puede mantener el nombre de las especies bien conocidas, mientras que otros desaparecerían.

Los *Pseudonarcissi* incluyen todos los narcisos-trompeta, aunque ninguno de ellos mide más de la definición de trompeta como la entienden los exhibidores de narcisos, los cuales consideran una corona como, al menos, tan larga como los pétalos. Las flores son normalmente solitarias, siendo las únicas excepciones, *N. longispathus* y *N. nevadensis*. Aparte del parámetro de la longitud de la corona, el otro hecho que distingue los *Pseudonarcissi* de otras plantas del género es la inserción de las anteras. Estas son siempre uniseriadas, en lámina simple y de igual longitud, mientras que en otras secciones son biseriadas, estando dispuestas en dos niveles o láminas. También las anteras de *Pseudonarcissi* son únicas al tener dispuestos filamentos a corta distancia del extremo, comparados con los de otras secciones que están situadas en el centro. Las anteras son siempre más cortas que los estilos.

Las especies de esta sección son exclusivamente europeas, no encontrándose en las islas del Mediterráneo (Blanchard, 1990). Son abundantes en España y Portugal, y también en la mitad Sur de Francia. Algunas llegan al norte de Gran Bretaña y al Este de Europa en dirección a Checoslovaquia y Rumania, donde comienza a ser dificultoso determinar si son genuinamente nativas. Hay un gran rango de altitudes, desde el nivel del mar hasta al menos los 1900 m, y se han encontrado en una gran diversidad de hábitats. Las que crecen a gran altitud, lo hacen más bien en valles que en montañas y tienden a crecer sobre suelo alcalino, aunque se dan algunas excepciones. Cultivadas son muy tolerantes a diferentes terrenos, y además florecen antes.

#### 1.1.1.1. *Narcissus primigenius* (Fdez. Suárez ex Laínz) Fdez. Casas & Laínz

La primera referencia a este taxón es un estudio de la cornisa cantábrica, en el que se distinguen dos poblaciones de *N. pseudonarcissus* bien diferenciadas (Díaz y Fernández, 1980). Unas serían las "plantas altas", que se asignarían probablemente a la var. *montinus* (Jordan) Pugsley, y las otras serían las "plantas bajas", clasificadas con más reservas dentro de la var. *humilis* Pugsley, por no responder en su totalidad a la descripción de esta variedad. Los mismos autores distinguen otras poblaciones dentro del grupo de las "plantas bajas", de tal manera que tres de las siete clasificadas con esta terminología, dada la longitud de sus pedúnculos florales, tamaño de planta y morfología floral, responderían mejor al tipo *N. nobilis*. Estas últimas son las que después se denominarían *N. nobilis* subsp. *nobilis* var. *primigenius* Fdez. Suárez (Sañudo,

1984), observándose que el número de cromosomas es de  $2n = 14 + 0,1B$ . Posteriormente, se confirma que *N. nobilis* y *N. primigenius* son dos taxones completamente diferentes, al observarse que un *N. nobilis* diploide no coincide con la morfología de *N. primigenius*. Se nombra a la planta definitivamente como *Narcissus primigenius* (Fdez. Suárez ex Lainz) Fdez. Casas & Lainz (Fdez. Casas, 1986).

Este narciso correspondería en sus características al descrito en 1980 por Díaz y Fernández, en el punto en que se describe la supuesta var. *humilis* Pugsley de los *N. pseudonarcissus* norteños, esto es:

- escapo de 10 a 30 cm de longitud,
- espata de 30 a 45 mm de largo,
- hojas de 7,5 a 20 cm de largo, por 3 a 8 mm de ancho,
- pedúnculo floral de 2 a 8 mm,
- perianto de 32 a 55 mm de largo,
- corona de 12 a 25 mm de diámetro en su extremo superior.

*N. primigenius* parece reproducirse predominantemente por vía sexual, pues suele crecer aislado o en corros muy reducidos, presentando una variabilidad individual elevada (Fdez. Casas, 1984). Una prueba de su reproducción sexual es la existencia de al menos un híbrido de este taxón, que sería *N. x femineri* Fdez. Casas, como consecuencia del cruce con *N. gr. bulbocodium* L. (Fdez. Casas, 1986).

El hábitat, por lo general, son turberas o pastizales húmedos, de 1000 a 1600 m de altitud. En la tabla 1 se relacionan las diferentes localidades en que se cita *N. primigenius*, extraídas de diversas fuentes bibliográficas (Sañudo, 1984; Fdez. Casas, 1984; Nieto Feliner, 1985; Fdez. Casas y Rivas Ponce, 1988).

**Tabla 1.** Localidades en que se cita *N. primigenius*

Lugar	Hábitat	Recolector	Fecha
Pto. de Pajares, cerca de Valgrande, 1400 m., lím. entre León y Asturias	brezal casi seco	Lainz (COI, Herb LAINZ)	29/4/60
Rodiezmo (Villamanín) cerca de Busdongo, 1300 m, León	pradera húmeda	Lainz & Rodríguez Suárez (COI)	29/4/58
Pto. de Señales, 30TUN1170, 1450-1500 m., León	no se cita	Sañudo y Fdez. Piqueras	no se cita
Pto. de Tarna, 30TUN17, 1300 m., Puebla de Lillo, León	ericetis nudis	Fdez. Casas, Marín, Nava y Sañudo	12/5/84
Pto. de Señales, 30TUN17, León	pradera	Pérez Carro y Fdez. Areces (LEB 11029)	27/4/80

Tabla 1. Localidades en que se cita *N. primigenius* (continuac.)

Lugar	Hábitat	Recolector	Fecha
Pto. de Señales, 30TUN17, León	brezal acidófilo	Pérez Carro y Fdez. Areces (LEB 11024)	27/4/80
Monte Teleno, 29TQ619, León	césped húmedo	Llamas (LEB 11918)	21/6/77
La Guiana (PH 9702), 1600 m., Montes Aquilianos, León	claros de brezal sobre cuarcitas	Lansac y Nieto Feliner; N° 5746N	11/5/82
La Guiana (PH 9602), 1650 m., Montes Aquilianos, León	claros de brezal	Castroviejo, Fdez. Alonso, Galán, Nieto Feliner y Valdés-Bermejo; N° 10456N	26/5/84
El Morredero, 1800 m., (Q60396), León	nardetas	Lansac y Nieto Feliner; N° 5126N	10/5/82
El Morredero, 1800 m., (Q60396), León	nardetas	Nieto Feliner; N° 9586N	9/7/83
Pto. de Tarna, Lillo, 30TUN16, León	prado subhúmedo	Fdez. Casas 10476, Nava y Susanna	1/5/87
Pto. de Tarna, 30TUN17, Asturias	prado subhúmedo	Fdez. Casas 10468, Nava y Susanna	1/5/87

### 1.1.1.2. *Narcissus nevadensis* Pugsley

Conocido sólo en una pequeña área a una altura entre 1400 y 1800 m en las bases de Sierra Nevada, *N. nevadensis* puede crecer también en condiciones de cultivo (Blanchard, 1990). Fue descubierta por Lofthouse en 1931, aunque no colectó bulbos. Se caracteriza por poder presentar más de una flor sobre un escapo, y a veces más de cuatro. Estas flores, con largos pedicelos, pueden tener más de 5 cm de diámetro, y son tanto horizontales como orientadas hacia arriba. Los pétalos son blanquecinos o muy pálidamente amarillos, y la corona es una hoja muy oscura de color amarillo limón, que tiene aproximadamente la misma longitud que los pétalos, y está muy ligeramente expandida al margen. Las hojas son anchas, más largas que el escapo, y erectas al principio, tendiendo a colgar cuando la flor se desarrolla.

Crece fácilmente en campo abierto, si bien prefiere suelos permanentemente húmedos, casi encharcados de aguas nacientes, como bordes de arroyos, o praderas y juncales, habitando entre *Scirpus holoschoenus* L. Florece bien y produce abundantes semillas en cápsulas anchas. La floración tiene lugar en mayo para las silvestres, y a primeros de abril para las cultivadas (Blanchard, 1990). Las principales características son:

- escapo de 28 cm de longitud,
- espata de 50 mm de largo,
- hojas de 29 cm de largo por 11 mm de ancho,
- flores en grupo de 1 a 4 y con 50 mm de diámetro,
- pedicelo de 20 mm de largo,
- perianto de 32 a 55 mm de largo,
- pétalos blanquecinos de 17 mm de largo por 10 mm de ancho,
- corona amarilla, expandida a 13 mm de diámetro en el margen.
- anteras uniseriadas incluidas en la corona con polen amarillo pálido,
- estilo con anteras sobrepasándolo e incluidas en la corona.

Esta especie presenta una localización muy restringida, hasta el punto de que solamente se conoce una única cita (Fdez. Casas, 1983) (tabla 2).

**Tabla 2.** Localidades en que se cita *N. nevadensis*

Lugar	Hábitat	Recolector	Fecha
Monachil, Canal de Huenes, Sierra Nevada, 30SV G5404, 1400 m., Granada	juncal húmedo	Fdez. Casas 1095 & García Guardia	18/4/76
Monachil, Canal de Huenes, Sierra Nevada, 30SV G5404, 1400 m., Granada	juncal húmedo	Fdez. Casas 6678 & Sañudo	24/4/82

### 1.1.1.3. *Narcissus confusus* Pugsley

*N. confusus* se asemeja a *N. hispanicus*, más particularmente a la variedad *spurius*, pero difiere en la anchura, verdor de sus hojas, y en sus flores, más pequeñas y de pedicelo más corto, con corona menos lobulada y con estilo relativamente más largo. También es similar a *N. obvallaris*, el cual es conocido por su porte más pequeño, pedicelo menos erecto, segmentos del perianto más anchos, y corona también más ancha y lobulada.

Esta especie es probablemente la que domina en la España Central. Clusius la llama *Pseudo-Narcissus major hispanicus* y cita su existencia en las plazas de Castilla la Vieja en 1576 (Clusius, 1576), y en la subsiguiente *Historia* la compara con el narciso común, describiéndola como de bulbo más pequeño, hojas más verdes y largas, de tallo más largo y de flores un poco más pequeñas, con el perianto y corona de un color amarillo uniforme o de color dorado. Pugsley, en su monografía, considera probable que éste narciso, o bien *N. hispanicus*, sea el origen de los narcisos dobles de los jardines ingleses (Pugsley, 1933).



Las principales características son:

- escapo algo menor que las hojas,
- hojas de 30 a 35 cm de largo, por más de 14 mm de ancho,
- flor de 40 a 45 mm de diámetro (excluyendo ovario),
- pedicelo de 10 mm de largo,
- tubo del perianto de 15 a 18 mm de largo,
- pétalos amarillo-dorados y próximamente concolorosos,
- corona amarilla, no muy dilatada, generalmente algo lobulada con un margen crenado-dentado,
- filamentos insertados 3-4 mm en la base del tubo del perianto,
- estilo relativamente más largo que el de *N. hispanicus*.

En la tabla 3, se relacionan las diferentes localidades en que se cita *N. confusus*, extraídas de diferentes fuentes bibliográficas (Pugsley, 1933; Fdez. Casas, 1983).

Tabla 3. Localidades en que se cita *N. confusus*

Lugar	Hábitat	Recolector	Fecha
Sierra de Majareina, Cáceres	no se cita	Lacaita, Nos. 25966 y 25967	1923
Sierra de Cañamero, Cáceres	roquedos cuarcitosos	Pérez-Chiscano (Sala 12328)	21/7/78
Santa María de la Alameda, 30 TUK 9996, 1400 m., Madrid	prado húmedo	García-Villaraco & Susanna 786	7/3/81
Santa María de la Alameda 30 TUK 9996, 1400 m., Madrid	prado húmedo	García-Villaraco & Susanna 790	29/3/81
Linares de Riofrío, Salamanca	no se cita	Casaseca (Sala 2403)	11/4/70
La Honfría, Linares de Riofrío, Salamanca	no se cita	Díez (Sala 5380)	28/3/71
El Maíllo, Salamanca	no se cita	Rico (Sala 9361)	4/4/76
Valle de Alagón, Salamanca	no se cita	Díez (M6 CIO)	4/71
Candelario, Béjar, 30TTK67, 1200 m., Salamanca	prado subhúmedo	Fdez. Casas 8639	26/3/83

## 1.2. CONSIDERACIONES QUIMICAS DEL GENERO *NARCISSUS* L.

El metabolismo nitrogenado y glucídico en narcisos fue inicialmente estudiado en el cultivar "Paper White", tras la plantación en un soporte arenoso, con o sin nitrógeno, y en condiciones de oscuridad (Nightingale y Robbins, 1928). Así, se observa que los nitratos se reducen a nitritos y amonio en las raíces, con un incremento en las cantidades de todas las formas de nitrógeno en el bulbo, mientras que los carbohidratos de reserva se fragmentan tanto en las raíces como en el tejido de reserva. Los brotes tienen un alto contenido en formas simples de nitrógeno y carbohidratos, mientras que el tejido de reserva contiene más proteína y almidón.

Por su parte, Vickery y colaboradores describieron la composición de *N. poeticus* crecido en cultivo hidropónico (con nitrógeno-amonio o nitrógeno-nitrato) y en condiciones de luz y de oscuridad (Vickery et al., 1946). Según estos autores, un bulbo plantado contiene aproximadamente 6,0 g de almidón, 1,3 g de carbohidratos totales solubles, 0,2 g de nitrógeno total, y 0,1 g de nitrógeno proteico. Tras 28 días de crecimiento, la acumulación de nitrógeno y carbohidratos solubles y el descenso en almidón fueron mayores en las plantas crecidas con nitratos que no con sales de amonio, siendo por tanto más efectivo el tratamiento con éstas últimas. A su vez, los ácidos orgánicos predominantes fueron málico, cítrico, oxálico y succínico, pero los niveles fueron inusualmente bajos, y gran parte de esta fracción no fue identificada.

### 1.2.1. Compuestos tóxicos y de uso farmacéutico

Las plantas del género *Narcissus* son conocidas como plantas tóxicas (Jaspersen-Schib, 1970), habiéndose descrito efectos narcóticos, eméticos y purgativos, y pudiendo también provocar náuseas y muerte en mamíferos (Henry, 1949). También se consideran como irritantes (Long, 1924), y causantes de dermatitis por contacto (Walsh, 1910; Overton, 1926; Beijersbergen et al., 1987; Hausen y Oestmann, 1988). Gude y colaboradores revisaron los casos de alergias causadas por narcisos y otras bulbosas, y comprobaron que eran provocadas por el ácido chelidónico y por los alcaloides, argumentando que eran favorecidas por micro-traumas provocados por las agujas de oxalato cálcico (Ramstadt, 1953; Lüders, 1977), y concluyendo que la mayoría de lesiones eran provocadas por un agente irritante, de naturaleza alergénica, y probablemente relacionado con los alcaloides (Figura 1) (Gude et al., 1988).

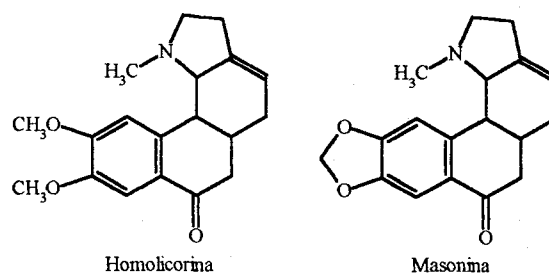
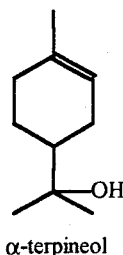


Figura 1. Alcaloides alergénicos de *Narcissus pseudonarcissus* L.

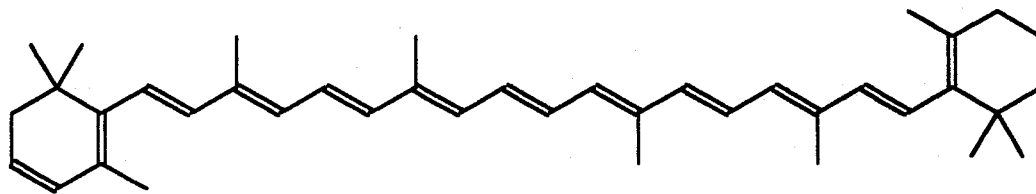
Las Amarilidáceas, incluyendo el género *Narcissus*, constituyen una fuente importante de alcaloides, algunos de los cuales muestran interesantes actividades biológicas (ver apartado 1.3.2). Estos alcaloides se originan como consecuencia de una sobreproducción del aminoácido tirosina, componente base en la biosíntesis de estos compuestos, la cual se cree que tiene lugar en los bulbos, dado que presentan una mayor proporción de alcaloides que el resto de la planta (Döpke, 1963). Estos compuestos son bases moderadamente débiles, teniendo un rango de pKa que va de 6 a 9. Cada uno contiene un sólo átomo de nitrógeno, que es secundario o terciario, mientras que el número de átomos de carbono oscila de dieciséis a veinte, dependiendo sobre todo del número de grupos metoxilo, ya que todos poseen una estructura del tipo  $C_6C_7N-C_1C_6$

### 1.2.2. Otros compuestos

Desde los tiempos de los romanos, los narcisos han sido cultivados para la extracción de los aceites esenciales (Baytop y Mathew, 1984). Así, las esencias de *N. poeticus*, *N. jonquilla* y *N. tazetta* se usan actualmente en perfumería (Lexikon der Duftbausteine, 1985). Loo y Richard han identificado ciento noventa y dos compuestos en estas especies, de los cuales las cetonas de mayor peso molecular no eran las responsables del aroma característico, sino los ésteres, éteres y fenoles (Loo y Richard, 1988). Sorprendentemente, no se encontró *p*-cresil-éter, lo cual es curioso teniendo en cuenta que es el compuesto responsable de la fragancia artificial a "narciso". En cambio,  $\alpha$ -terpineol, presente también en estos productos de perfumería, se encontró en cantidades razonables.



Los carotenoides fueron estudiados y revisados por Booth, encontrándose que las coronas son las fuentes más ricas de caroteno, con unas elevadas tasas de acumulación (Booth, 1957 y 1963). Así, en el caso de *Narcissus poeticus*, las coronas de color rojo pueden acumular hasta el 16,5% en peso seco de  $\beta$ -caroteno. Las trompetas amarillas también contienen carotenoides pero sólo en pequeñas cantidades, si bien superiores a las de aquellas hojas en las cuales el contenido en carotenoides es mínimo. En algunos casos, los niveles de carotenoides son tan elevados que han permitido visualizar cristales de  $\beta$ -caroteno por microscopía (Frey-Wyssling, 1967; Kuhn, 1970). Por otra parte, en el cultivar "Grand Soleil d'Or" se ha observado que las bajas temperaturas causan un incremento en la acumulación de  $\beta$ -caroteno (Smith y Parker, 1966).



$\beta$ -caroteno

Otro grupo de sustancias de interés que se han encontrado recientemente en diferentes especies de *Narcissus* son las lectinas manosa-específicas, las cuales muestran propiedades similares a las de otras Amarilidáceas y Liliáceas (Van Damme et al., 1988; 1991). Los patrones de isolectinas de 26 especies y cultivares han mostrado que la composición en isolectinas es específica de cada tejido, y que se regula durante el desarrollo (Van Damme y Peumans, 1990). Dada su importancia desde el punto de vista farmacológico, su presencia se discute más ampliamente en el apartado 1.2.2.1 de la segunda parte.

### 1.3. LOS ALCALOIDES DE LAS AMARILIDACEAS

Los alcaloides de las Amarilidáceas constituyen el grupo de compuestos del metabolismo secundario objeto de estudio en la presente memoria. El interés por ellos no es nuevo, sino que se inició en el siglo pasado con el aislamiento de **licorina** de *Narcissus pseudonarcissus* (Gerrad, 1877). Desde entonces el número de alcaloides aislados ha ido aumentando hasta alcanzar alrededor de 350 en la actualidad. Estos compuestos tienen una característica y es la exclusividad dentro de la familia Amaryllidaceae, y más concretamente en la subfamilia Amaryllidoideae, y salvo las excepciones de **mesembrenol**, aislado en *Crinum oliganthum* (Döpke et al., 1981), **asmina** en *Hymenocallis arenicola* (Döpke et al., 1980), o **mesembrenona** y **6-epimesembranol** en *Narcissus pallidulus* (Bastida et al., 1989; Bergoñón, 1994), no se conoce la existencia de otros tipos de alcaloides en esta familia de plantas.

#### 1.3.1. Consideraciones químicas

Los alcaloides de las Amarilidáceas provienen de los aminoácidos **fenilalanina** y **tirosina**. Químicamente, poseen estructuras variadas que son consecuencia de diferentes tipos de acoplamiento fenólico-oxidativo. Por regla general, son compuestos monoméricos, aunque se han citado algunos dímeros (Ghosal et al., 1985a; Boit y Mehlis, 1961; Kobayashi et al., 1980; Codina et al., 1990). La numeración química de este grupo de alcaloides ha variado, siendo habitual prescindir de la numeración correspondiente al sistema heterocíclico y acudir más a una numeración en función de la ruta de biosíntesis, como la establecida por Ghosal (Ghosal et al., 1985a). Si bien estos alcaloides pueden ser agrupados en función del tipo de acoplamiento fenólico-oxidativo, también es frecuente de agruparlos en función del sistema heterocíclico (Tabla 4).

Tabla 4. Grupos estructurales en que pueden clasificarse los alcaloides del tipo Amaryllidaceae

Grupo estructural	Esqueleto tipo	Tipo de acoplamiento
N-bencil-N-fenetilamina	<b>norbelladina</b>	sin acopl.
pirrolofenantridina	<b>licorina</b>	orto-para'
2-benzopirano[3,4-g]indol	<b>licorenina</b>	orto-para'
5,10b-etanofenantridina	<b>hemantamina</b>	para-para'
2-benzopirano[3,4-c]indol	<b>pretazetina</b>	para-para'
5,11-metanomorfantridina	<b>montanina</b>	para-para'
dibenzofurano	<b>galantamina</b>	para-orto'

##### 1.3.1.1. Biosíntesis

Los alcaloides del tipo Amaryllidaceae parecen tener un precursor común, la **norbelladina**, la cual contiene una fenetilamina y una unidad C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>. Por un acoplamiento

fenólico oxidativo, simple o múltiple, la **norbelladina** dará lugar a los alcaloides del tipo **galantamina** (acoplamiento *para-orto'*), tipo **hemantamina** (acoplamiento *para-para'*) o tipo **licorina** (acoplamiento *orto-para'*), los cuales serán precursores de la mayor parte de los alcaloides de esta familia (Barton et al. 1963; Battersby et al., 1961, 1964).

En experimentos con *Narcissus pseudonarcissus* (Battersby et al., 1964), *Galanthus elwesii* (Barton et al., 1963) y *Nerine bowdenii* (Fales, 1963; Mann et al., 1963), se mostró que **norbelladina** marcada, y algunas aminas análogas, se incorporaban específicamente a **galantamina**. La **norbelladina**, así como la **O-metilnorbelladina**, son precursores específicos de **galantina**, **hemantamina**, **licorina**, **norpluviina**, **crinamina**, y **belladina**. La abundancia de **O-metilnorbelladina** y **N,O-dimetilnorbelladina** en los narcisos se estableció por experimentos con marcaje (Mothes et al., 1985).

En el proceso de biosíntesis el aminoácido **tirosina** se incorpora vía **tiramina** sólo hacia la parte fenetilamina de la **norbelladina** (figura 2). Esto implicará entonces que el C-2 de la **tirosina** corresponderá posteriormente al carbono  $\alpha$  respecto al nitrógeno en la unidad  $C_6-C_2$  de la **galantamina**, al C-5 de la **licorina**, o al C-12 de la **hemantamina**. Así, el C-3 de este aminoácido corresponde al C-11 de la **hemantamina** y **hemantidina**, al correspondiente carbono hidroxilado en la **pretazetina**, y al C-4 de la **licorina**. Los resultados de estos estudios mostraron también que la unidad  $C_6-C_1$  que lleva al anillo A de estos alcaloides no deriva de **tirosina** (Mothes et al., 1985).

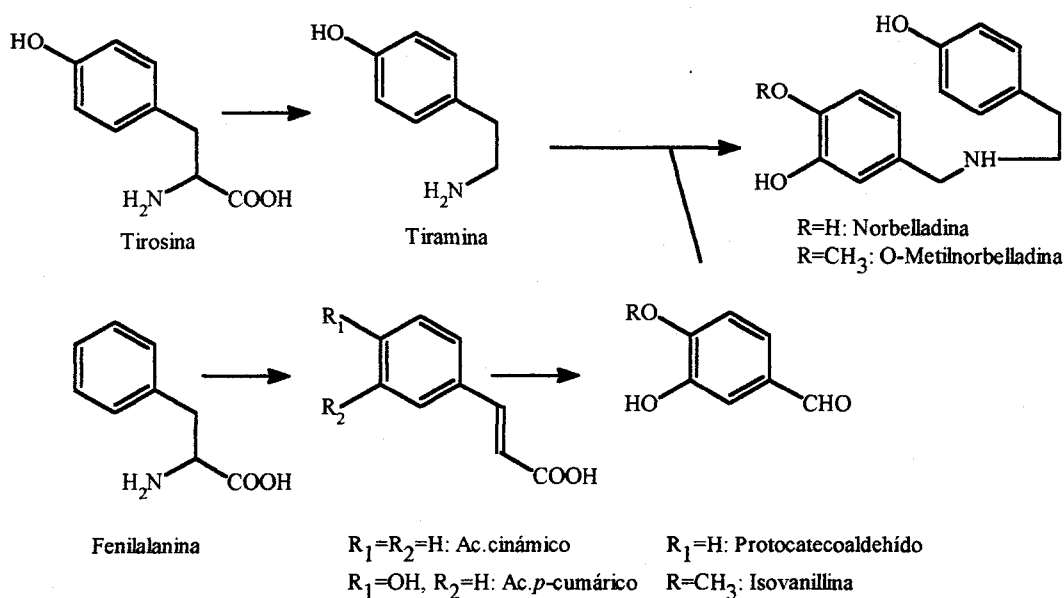


Figura 2. Formación de **norbelladina** y **O-metilnorbelladina** a partir de los aminoácidos precursores

Por su parte, la **fenilalanina** marcada en C-3 puede incorporarse al anillo A, pero no a los anillos C y D, y el carbono bencílico de **licorina**, **hemantamina** y **belladina** retendría el marcaje. La incorporación de fenilalanina procederá por la vía del ácido cinámico y de los

derivados hidroxilados del ácido *p*-cumárico y *cafeico*, con la subsiguiente eliminación de dos carbonos a fin de generar un precursor C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>, como el **protocatecoaldehído** o la **isovanillina** (Figura 2). Los ácidos cinámicos son biosintetizados a partir de **fenilalanina** por actuación del enzima PAL (fenilalanina amonio liasa), cuya presencia se ha comprobado en estas plantas. Estos ácidos cinámicos y los derivados del benzaldehído son incorporados específicamente hacia **licorina**, **belladina** y **hemantamina**. La formación bioquímica de la unidad C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> incluirá, pues, la pérdida del átomo de hidrógeno en C-3 del ácido cinámico, lo cual se ha comprobado en experimentos biosintéticos de **hemantamina** y **odulina** (Fuganti et al., 1974b).

Los pasos posteriores son propios para cada grupo de estos alcaloides, los cuales, como ya se ha indicado, se originan en función del tipo de acoplamiento fenólico. Así, el acoplamiento *p-o'* da lugar a los alcaloides del tipo **galantamina**, el acoplamiento *o-p'* a los del tipo **licorina**, y el *p-p'* a los del tipo **hemantamina**.

### 1.3.1.1.1. Acoplamiento fenol-oxidativo *p-o'*

A partir de experimentos con *Narcissus* cv. "King Alfred", utilizando diferentes derivados marcados de la **norbelladina**, se ha establecido la secuencia biosintética de la **galantamina**, en la cual una dienona y **narwedina** son probables intermediarios (figura 3). Se ha observado que la **norbelladina** se metila primero en el nitrógeno que en el oxígeno, y, así, el alcaloide **N,p'-O-dimetilnorbelladina** triplemente marcado se incorpora posteriormente a **galantamina** sin perder el marcaje (Barton et al., 1963). La formación del puente de oxígeno es similar a la del alcaloide **tebaína** en las Papaveráceas.

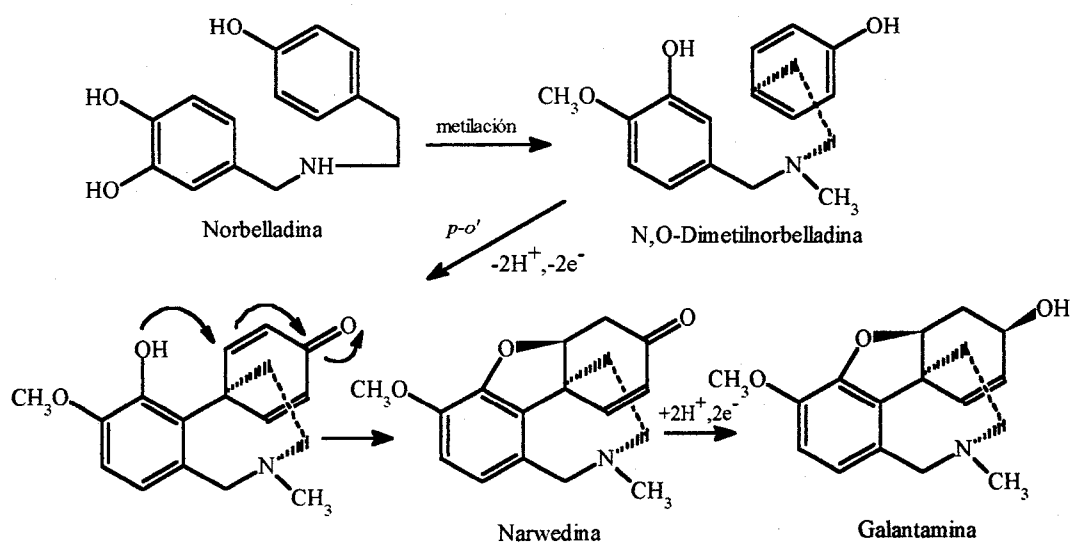


Figura 3. Alcaloides con acoplamiento fenólico *para-orto'*

1.3.1.1.2. Acoplamiento fenol-oxidativo *o-p'*

La ruta biosintética de la **licorina** comienza con la **O-metilnorbelladina**, la cual lleva a **norpluviina**, que es el primer alcaloide pirrolofenantridínico de este acoplamiento fenólico (Battersby et al., 1964; Kirby y Tiwari, 1966). Este compuesto se ha encontrado como precursor de la **galantina** (Kirby y Tiwari., 1966), **narcissidina** y **licorina**, pero la **licorina** no puede revertir a **norpluviina** (figura 4). En los narcisos cv. "Twink" la conversión de la **O-metilnorbelladina** tritida en 3' y 5' hacia **licorina** incluye la retención en C-2 de **licorina** de la mitad del tritio originalmente presente en el precursor. Esto es el resultado neto de dos procesos estereoespecíficos: primeramente protonación en el metileno en C-2 de la **norpluviina**, que lleva el marcaje de tritio en la configuración  $\beta$ , y posteriormente hidroxilación del próximo intermediario, **caranina**, con una inversión completa (Mothes y col., 1985). De las experiencias con *Zephyranthes candida* se deduce que probablemente lo mismo deberá ocurrir en la conversión del derivado 2 $\beta$ -tritido de **caranina** hacia **licorina** 2-tritida (Wildman y Heiner, 1967).

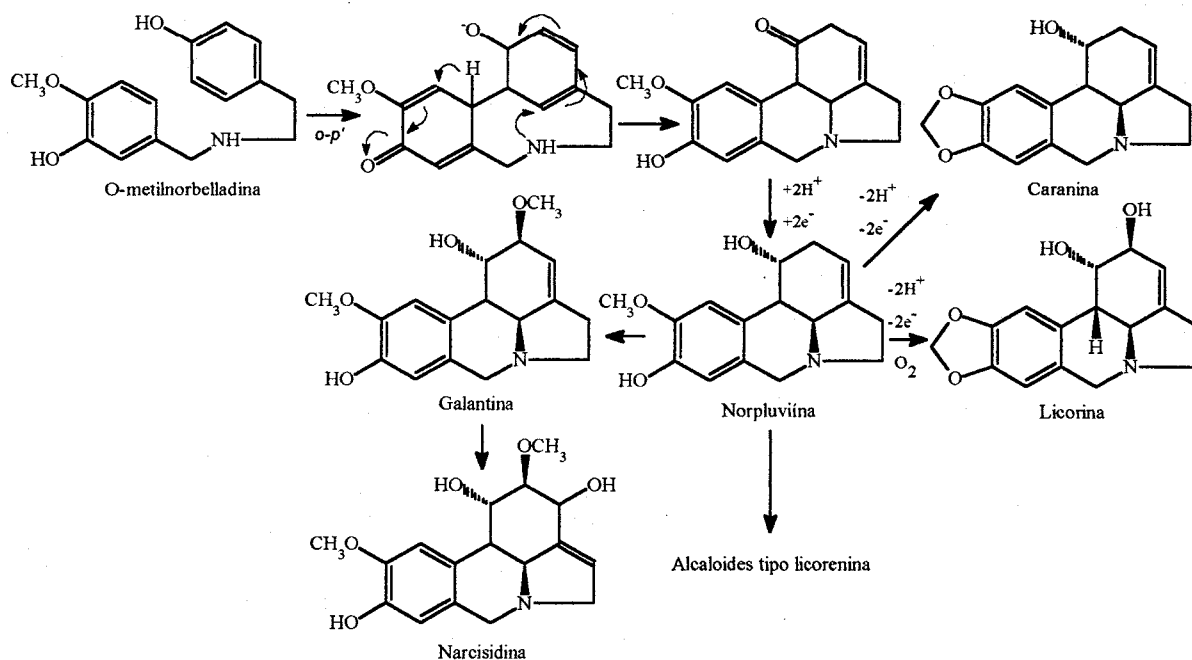


Figura 4. Alcaloides con acoplamiento fenólico *orto-para'*. Derivados de **licorina**

La conversión de **O-metilnorbelladina** a **licorina** en *Clivia miniata* tiene lugar también con **norpluviina** y **caranina** como intermediarios, sin el derivado 2-oxo, pero con pérdida casi completa del tritio originalmente presente en *orto* del grupo hidroxifenólico del fragmento  $C_6C_2$  de la **O-metilnorbelladina** doblemente tritida en 3' y 5'. Esto muestra una diferente estereoquímica en el proceso de hidroxilación. En experimentos con **norpluviina** y **caranina** estereoespecíficamente marcada se mostró que la hidroxilación en C-2 tiene lugar con salto del hidrógeno en  $\beta$  pero sin inversión. La protonación del intermediario de la **O-metilnorbelladina** ditritada a **norpluviina** y **caranina** se da en la cara  $\alpha$  de la molécula (Mothes et al., 1985).



La conversión biológica de **norpluviina** a **narcisidina** incluye la pérdida del átomo de hidrógeno de la posición alílica  $\beta$  respecto al nitrógeno del esqueleto licorano. Después de la incorporación de la **O-metilnorbelladina** ditritiada no hay pérdida de tritio en C-4 de **galantina** (Kirby y Tiwari, 1966), contrastando con la biosíntesis de **narcisidina**, en la que se pierde la mitad del tritio de las correspondientes posiciones  $\beta$  del nitrógeno, sugiriendo así que la conversión de la **O-metilnorbelladina** ditritiada a **narcisidina** es un proceso estereoespecífico. **Galantina** es el intermediario último antes de **narcisidina**. Se evidencia entonces que en la biosíntesis de este alcaloide la pérdida de hidrógeno del metileno  $\beta$  respecto al nitrógeno tiene lugar con estereoquímica opuesta (Fuganti et al., 1974a).

Algunos alcaloides hemiacetálicos y lactónicos del tipo **licorina** se originan por la rotura del correspondiente enlace  $C_6-N$  de **norpluviina** (figura 5). Así, **norbelladina** se incorpora a **homolicorina**, y **O-metilnorbelladina** se incorpora a **clivonina** (un derivado de la **hipeastrina** aislado en *Clivia miniata*), y a **odulina** (derivado de **licorenina** en los narcisos cv. "King Alfred"). Finalmente, se ha observado que **licorina** se incorpora a **hipeastrina** en *Hippeastrum vittatum*. La conversión biológica de **norpluviina** a **licorenina** incluye la pérdida del hidrógeno pro-7R del precursor, el cual es el que se introduce en la protonación durante la incorporación del 3,4-dihidroxibenzaldehído en la unidad aromática  $C_6-C_1$  de **norpluviina**. Este resultado confirma la estereoespecificidad de la protonación y la hidroxilación (Fuganti y Mazza, 1973).

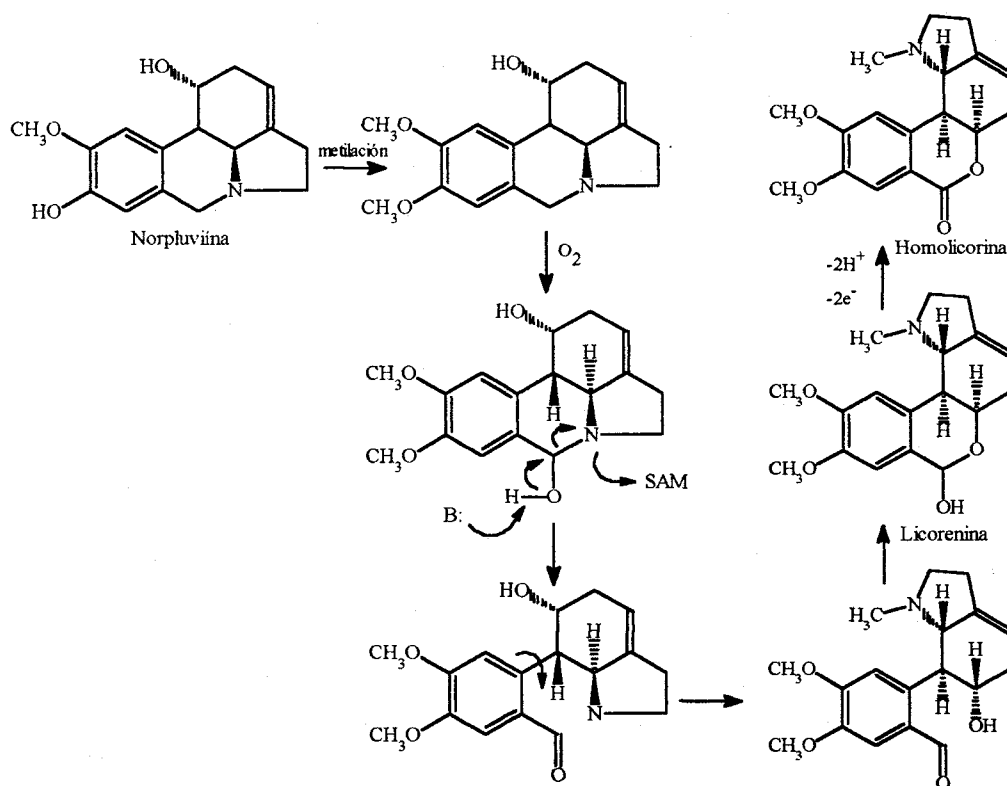


Figura 5. Alcaloides con acoplamiento fenólico *orto-para*'. Derivados de **licorenina**

1.3.1.1.3. Acoplamiento fenol-oxidativo *p-p'*

Para el estudio de la biosíntesis del alcaloide **hemantamina** se ha investigado si la **norbelladina** se metila para dar **O-metilnorbelladina**, y posteriormente **hemantamina** por un acoplamiento fenólico-oxidativo *para-para'* (Battersby et al., 1961). Así, se ha caracterizado una metiltransferasa en *Nerine bowdenii* que metila específicamente la **norbelladina** a **O-metilnorbelladina** (Fales, 1963; Mann et al., 1963). Posteriormente, aparecen **noroxomaritidina**, **normaritidina**, **oxocrinina** y **crinina** como intermediarios (figura 6). La hidroxilación del carbono saturado en la biosíntesis de **hemantamina** tiene lugar estereoespecíficamente con pérdida del hidrógeno pro-2R y con retención en la configuración (Mothes et al., 1985).

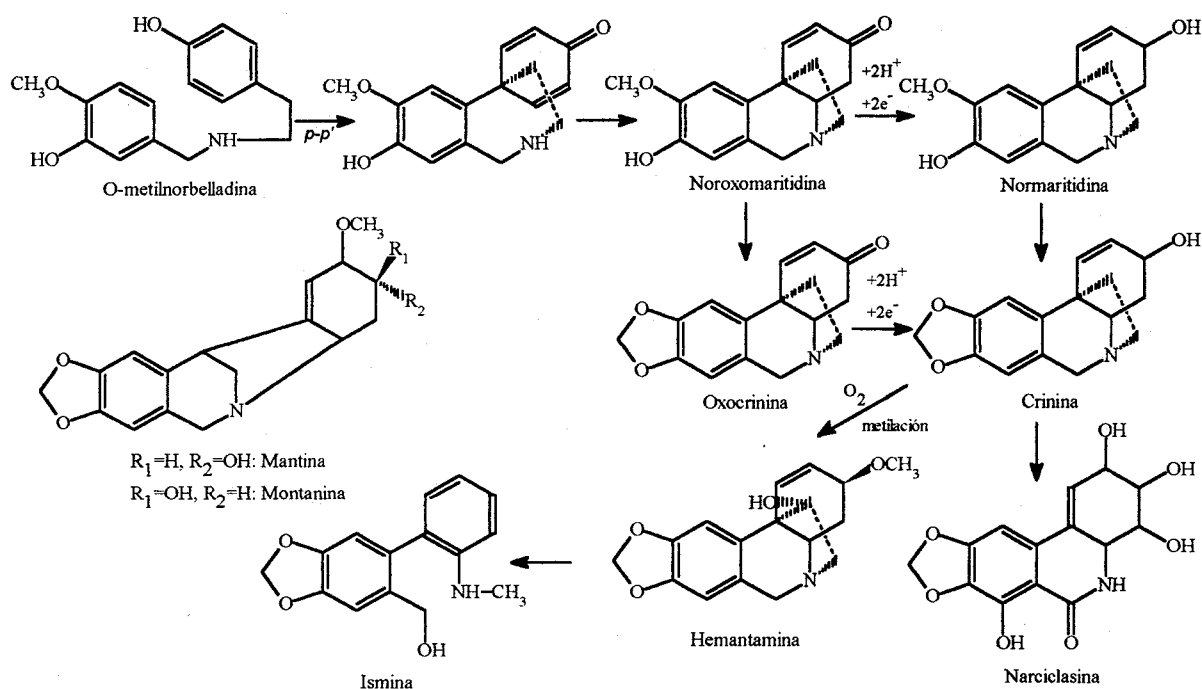


Figura 6. Alcaloides con acoplamiento fenólico *para-para'*. Derivados del crinano

La conversión química de los derivados 11-hidroxilados del núcleo del crinano hacia los derivados tipo **montanina** apoya la teoría de que estos alcaloides 5,11-metanomorfantridínicos, producidos por muchas especies de *Haemanthus*, derivan biosintéticamente de **O-metilnorbelladina** por un acoplamiento *para-para'*, seguido de reordenamiento de un intermediario similar a **hemantamina**. Así, en *Haemanthus coccineus* se ha podido establecer la participación de **O-metilnorbelladina** en la biosíntesis de **mantina** y **montanina** (Figura 6). Durante la conversión, un hidrógeno pro-2S de este intermediario se pierde, lo cual sugiere que si se incluye un intermediario análogo a la **hemantamina** tiene que producirse un proceso estereoquímico en la hidroxilación en C-11 del esqueleto del crinano, diferente al observado en estas plantas (Mothes et al., 1985).

Muchas Amarilidáceas contienen la lactama **narciclasina**, además de **hemantamina**, **norpluviína** y **licorina**. La **narciclasina** deriva de **hemantamina** por eliminación de dos carbonos (figura 6). Teóricamente, los alcaloides tipo **hemantamina** y tipo **licorina** son posibles intermediarios. Experimentos de marcaje con **O-metilnorbelladina** plurimarcada prueban que **narciclasina** se biosintetiza por un acoplamiento *para-para'* conforme a la vía del tipo **hemantamina** (Fuganti y Mazza, 1971, 1972; Feinstein y Wildman, 1976). Además, **noroxomaritidina**, **normaritidina**, **oxocrinina**, y **crinina** pueden incorporarse específicamente no sólo a **narciclasina** sino también a **hemantamina**, lo cual sugiere la vía propuesta (Mothes et al., 1985).

La **ismina** es otro alcaloide de las Amarilidáceas, en cuya formación es eliminada una unidad  $C_2$  (figura 6). Hipotéticamente, **oxocrinina** y **noroxomaritidina** son precursores de este alcaloide en *Sprekelia formosissima*, lo cual sugiere que la **ismina** representa un producto natural de degradación de la serie **hemantamina** a **pretazetina**. Durante la biosíntesis de **ismina**, se pierde el hidrógeno pro-6R de **noroxomaritidina**, al igual que en la conversión de **hemantamina** a **hemantidina** (Fuganti, 1973).

En la biosíntesis de **pretazetina** a partir de **hemantamina** se ha observado la eliminación del hidrógeno pro-6R, y posterior hidroxilación de esta posición para obtener la **hemantidina**, la cual se metilaría en el nitrógeno (figura 7). A continuación se produce una rotación de  $90^\circ$  sobre el enlace C-10a a C-10b, y se da el reordenamiento necesario para la formación del hemiacetal, con lo cual se completa la **pretazetina** (Wildman y Bailey, 1969).

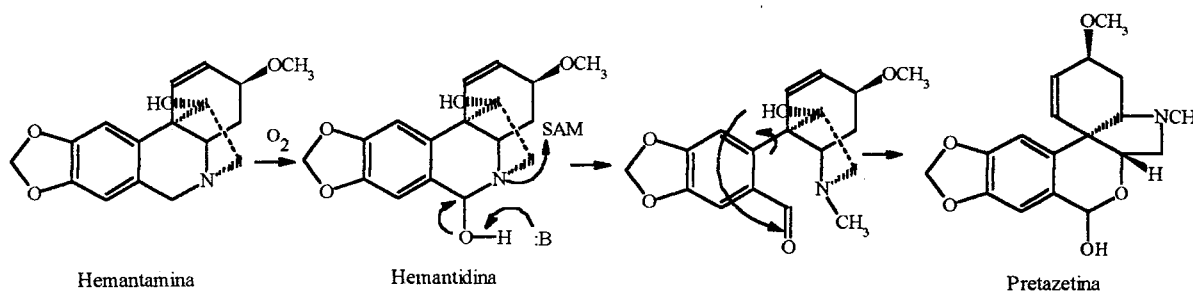


Figura 7. Alcaloides con acoplamiento fenólico *para-para'*. Biosíntesis de pretazetina

### 1.3.2. Consideraciones biológicas

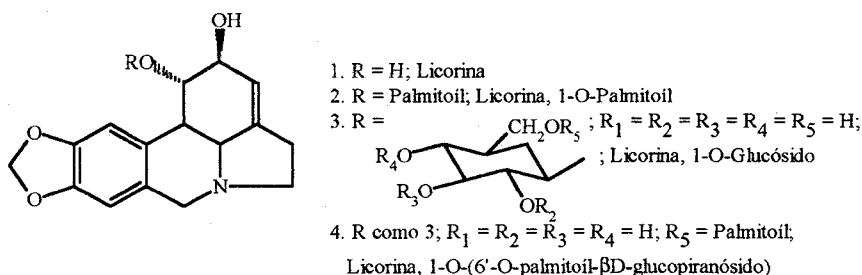
A modo de revisión, en la tabla 5 se relacionan aquellos alcaloides para los que se ha determinado su acción tanto a nivel de la planta que los produce, como a nivel de relación con otras plantas. Mención aparte constituyen las acciones farmacológicas a nivel humano, las cuales se describen en la segunda parte de esta memoria.

**Tabla 5.** Acciones a nivel del vegetal productor

Alcaloide	Acción	Referencia
<b>Licorina</b>	- Inhibición de la germinación de semillas y crecimiento de las plántulas en especies productoras y no productoras.	Ghosal et al., 1986b
<b>Licorina, fosfolípidos</b>	- Vía de detoxificación de <b>licorina</b> para la planta productora.	Ghosal et al., 1985c
<b>Licorina, fosfolípidos</b>	- Favorece la deposición de azúcares acilados en plantas productoras.	Ghosal et al., 1987
<b>Licorina, 1-O-Glucósido</b>	- Potente promotor del crecimiento de la raíz. - Estimula la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas en especies productoras y no productoras. - Acumulación en órganos de reserva.	Ghosal et al., 1985a Ghosal et al., 1986b Ghosal et al., 1989a
<b>Licorina, 1-O-palmitoil</b>	- Favorece el crecimiento de raíces aéreas.	Ghosal et al., 1985c
<b>Licorina, 1-O-(6'-O-palmitoil-β-D-glucopiranosido)</b>	- Estimula la formación de raíces adventicias y el crecimiento lineal.	Ghosal et al., 1985c
<b>Narciclasina</b>	- Igual que <b>licorina</b> .	Ghosal et al., 1985c
<b>Narciclasina, 1-O-Glu<sup>1</sup></b>	- Igual que <b>licorina, 1-O-glucósido</b> .	Ghosal et al., 1985c
<b>Pancratistatina</b>	- Igual que <b>licorina</b> .	Ghosal et al., 1985c
<b>Pancratistatina, 1-O-Glu<sup>1</sup></b>	- Igual que <b>licorina, 1-O-glucósido</b> .	Ghosal et al., 1985c
<b>Pancratistatina, 7-deoxi-</b>	- Igual que <b>licorina</b> .	Ghosal et al., 1985c
<b>Pancratistatina, 7-deoxi-1-O-Glu<sup>1</sup></b>	- Igual que <b>licorina, 1-O-glucósido</b> .	Ghosal et al., 1985c
<b>Pseudolicorina</b>	- Igual que <b>licorina</b> .	Ghosal et al., 1985c
<b>Pseudolicorina, 1-O-Glu<sup>1</sup></b>	- Igual que <b>licorina, 1-O-glucósido</b> .	Ghosal et al., 1985c
<b>Pseudolicorina, Metil-</b>	- Igual que <b>licorina</b> .	Ghosal et al., 1985c
<b>Pseudolicorina, Metil-, 1-O-Glu<sup>1</sup></b>	- Igual que <b>licorina, 1-O-glucósido</b> .	Ghosal et al., 1985c
<b>Rillistina</b>	- Translocación de iones divalentes de la rizosfera a la parte aérea.	Ghosal y Razdan, 1984

<sup>1</sup> Glucósido (en derivados de alcaloides)

Como puede observarse, los alcaloides de las Amarilidáceas, al igual que la mayoría de los alcaloides, muestran un efecto inhibitor del crecimiento. No así, en cambio, los glucosilocalcoides, que parecen activarlo de forma bastante clara. Sin embargo, este efecto no se observa solamente a nivel de la planta que los produce, sino que estos alcaloides inhiben el crecimiento de otras plantas superiores, de algas, e incluso de levaduras (tablas 6 y 7). Así, **licorina**, por ejemplo, es un potente inhibidor del crecimiento en toda clase de organismos eucariotas. De hecho, este compuesto inhibe la biosíntesis del ácido ascórbico en la patata, habiéndose estudiado las relaciones estructura-actividad en dicho proceso (Arrigoni et al., 1975; 1976; Evidente et al., 1983). La **licorina** es tan particularmente tóxica, incluso para la planta productora, que ésta debe conjugarla con fosfolípidos para anular este efecto.



Es de especial interés la relación huésped-patógeno en el caso de *Pancreaticum biflorum* y la hierba parásita *Imperata cylindrica*. Biosintéticamente, **licorina** es un precursor de **ungeremina**, existiendo la hipótesis de que la acción inhibitor del crecimiento por parte de **licorina** no se debe a ésta sino a **ungeremina**. Esto tiene su reflejo a nivel vegetal en la relación entre estas dos plantas, en el sentido de que en condiciones de stress no se da la conversión normal de **licorina** a **ungeremina**, el cual es citotóxico para el patógeno, sino que se sintetiza **pancrasidina**, con un efecto contrario, es decir, estimula el crecimiento de la hierba parásita, e incluso de bacterias, tales como *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (figura 8).

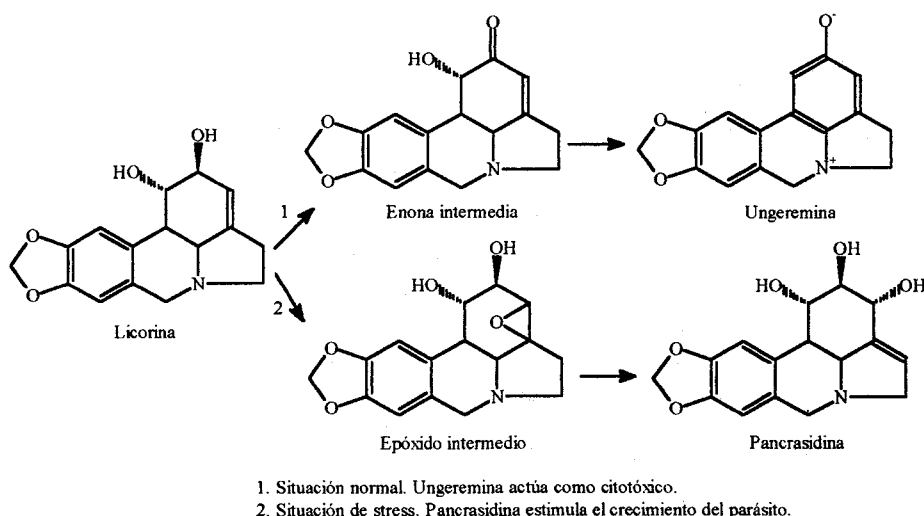


Figura 8. Metabolitos de licorina

Tabla 6. Acciones sobre otros vegetales

Alcaloide	Acción	Referencia
<b>Licoricidina</b>	- Inhibe el crecimiento en coleoptilo de <i>Avena</i> , la germinación en <i>Oryza</i> , y también la división celular en cultivos de tejidos de <i>Nicotiana</i> .	Okamoto et al., 1968
<b>Licoricidinol</b>	- Igual que <b>licoricidina</b> . - Suprime la producción de etileno inducida por IAA en segmentos de hipocotilo etiolados de <i>Vigna radiata</i> . - Inhibición de la síntesis proteica en hipocotilos de <i>Vigna radiata</i> , pero no la de RNA. Inhibe la síntesis proteica en eucariotas.	Kang et al., 1984 Imaseki y Kang, 1984
<b>Licorina</b>	- Inhibe la biosíntesis del ácido ascórbico en patata.	Arrigoni et al., 1975
<b>Licorina, 1-O-β-D-glucósido</b>	- Tóxica a hierbas parásitas ( <i>Imperata cylindrica</i> ).	Ghosal et al., 1985c
<b>Licorina, 1-O-(6'-O-palmitoil-β-D-glucopiranosido)</b>	- Igual que <b>licorina, 1-O-β-D-glucósido</b> .	Ghosal et al., 1985c
<b>Pancrasidina</b>	- Promotor del crecimiento en huésped y hierba parásita.	Ghosal et al., 1989b
<b>Ungeremina</b>	- Tóxica a hierbas parásitas ( <i>Imperata cylindrica</i> ).	Ghosal et al., 1989b

Tabla 7. Acciones sobre hongos

Alcaloide	Acción	Referencia
<b>Licorina</b>	- Hallada en la rizosfera y de presencia presumible, aunque no detectada, en el suelo alrededor de las partes subterráneas de <i>Sternbergia lutea</i> , <i>lutea</i> , en contacto con la cepa ITM 311 de <i>Pseudomonas sp.</i> - Inhibe el crecimiento de <i>Phytophthora capsici</i> . - Inhibe el crecimiento de <i>Phymatotrichum omnivorum</i> .	Lavermicocca et al., 1989 Amico y Stefanizzi, 1980 Greathouse y Rigler, 1941
<b>Pseudolicorina</b>	- Inhibidora del crecimiento de <i>P. omnivorum</i> .	Greathouse y Rigler, 1941

En la tabla 8 se relacionan algunos alcaloides del tipo Amaryllidaceae que ejercen diversas acciones sobre insectos. Sin embargo, en estas interacciones planta-insecto, a veces no intervienen solamente los alcaloides. Así, por ejemplo, en el caso de la interacción entre *Lycoris radiata* y la mariposa amarilla *Eurema hecabe* Mandarinina, se han aislado flavonoides que tienen una actividad similar a la de los alcaloides de la figura 9, como el (-)-3'-hidroxi-4'-metoxi-7-hidroxi-8-metilflavano.

Tabla 8. Acciones sobre insectos

Alcaloide	Acción	Referencia
<b>Galantamina, hemicarbonato</b>	- Insecticida frente a la mariposa amarilla <i>Eurema hecabe</i> Mandarinina.	Numata et al., 1983
<b>Licorenina, 6-O-metil</b>	- Repelente frente a la mariposa amarilla	Numata et al., 1983
<b>Licoricidinol</b>	- Insecticida de potente acción frente a la mariposa amarilla.	Numata et al., 1983
<b>Licorina</b>	- Repelente frente a la langosta del desierto	Singh and Pant, 1980 Singh, 1983

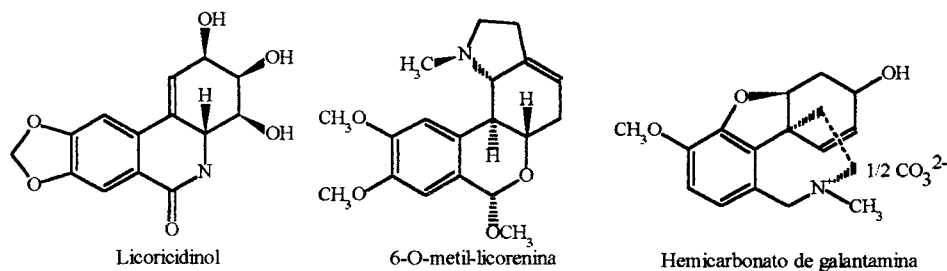


Figura 9. Respuesta metabólica a la mariposa amarilla en *Lycoris radiata*

Finalmente, es interesante indicar los efectos tóxicos de algunos de los alcaloides de las Amarilidáceas sobre algunos mamíferos y el hombre (tabla 9). Estos suelen ser causados por una ingestión de bulbos de *Narcissus jonquilla*, lo cual suele ocurrir en excursionistas que confunden esta planta con cebollas silvestres. Similar toxicidad se ha observado en el caso del ganado vacuno que padece espontáneamente en prados en los que crece *N. pseudonarcissus*. En el caso de *N. tazetta* ha llegado a afectar al ser humano, produciéndose algunas muertes. Igualmente es conocida la toxicidad debida a **tazetina** y producida por "sobredosis" de la Amarilidácea alucinógena *Pancratium trianthum* en ciertas etnias de Botswana. Sin embargo, si bien presentan una cierta toxicidad, muchos de estos alcaloides tienen una utilidad terapéutica a nivel humano,

que se comenta en la segunda parte de esta memoria. También se han citado casos de efectos alérgicos debido a un contacto con estas plantas (tabla 9). Se trata de afecciones profesionales propias de los floristas y cultivadores de estas plantas, que pueden ser evitadas simplemente manipulando las plantas con guantes.

**Tabla 9.** Acciones sobre mamíferos

Alcaloide	Acción	Referencia
<b>Galantamina</b>	- Tóxica.	Vigneau et al., 1984
<b>Homolicorina</b>	- Elicitor en dermatitis por contacto.	Gude et al., 1988
<b>Licoramina</b>	- Tóxica.	Vigneau et al., 1984
<b>Masonina</b>	- Alergeno en dermatitis por contacto.	Gude et al., 1988
<b>Tazetina</b>	-Tóxica.	Emboden, 1972





## **2. MATERIAL Y METODOS**



## 2.1. PROCEDENCIA DEL MATERIAL VEGETAL

Las dos especies estudiadas desde el punto de vista de su composición alcaloídica son *Narcissus primigenius* y *Narcissus nevadensis*, pertenecientes ambas a la familia Amaryllidaceae. La especie *Narcissus primigenius* (Fdez. Suárez ex Lainz) Fdez. Casas & Lainz se recolectó en Mayo de 1989 en el Puerto de las Señales, localizado en la provincia de León, mientras que *Narcissus nevadensis* Pugsley fue recolectada en Abril de 1990, en las proximidades de Sierra Nevada, Granada. La recolección tuvo lugar en pleno período de floración, por lo que pudieron ser clasificadas y autenticadas, depositándose varios ejemplares en el Jardí Botànic de Barcelona (n<sup>os</sup> 890174 y 900188 para *N. primigenius* y *N. nevadensis* respectivamente)

Para el aislamiento y caracterización de los alcaloides de ambas especies se partió de planta entera, es decir, parte aérea y bulbo, y, como se ha indicado, en el momento de la floración pues es entonces cuando la parte aérea ha alcanzado el máximo desarrollo y suele contener una mayor concentración de alcaloides. El bulbo, aunque no está en su momento de máximo desarrollo, el cual tiene lugar en otoño, una vez la planta ha completado los ciclos vegetativo y reproductivo, se utiliza igualmente dado que acumula alcaloides en una elevada proporción. El proceso de extracción se ha realizado a partir de material fresco, a fin de evitar posibles alteraciones de los alcaloides.

## 2.2. EXTRACCION DE LOS ALCALOIDES

El método seguido para la extracción y fraccionamiento de los alcaloides se basa en el establecido previamente para este tipo de compuestos (Codina et al., 1993). Básicamente consta de una primera parte, que es la despigmentación o eliminación de los pigmentos más lipófilos del extracto metanólico y acidificado de la planta (carotenos y clorofilas), utilizando para ello un disolvente de polaridad similar, como por ejemplo butanol, éter etílico o éter de petróleo. La segunda parte del proceso es el fraccionamiento propiamente dicho, en el cual se requiere trabajar a diferentes pH a fin de tener los alcaloides, que por definición son sustancias básicas, en forma neutra o salina, y poder recuperarlos con el disolvente más adecuado a su polaridad. El objetivo último de obtener diversos extractos enriquecidos en un tipo determinado de alcaloides es el evitar que puedan recuperarse otras sustancias orgánicas que no sean de interés. Esta segunda parte puede resultar simple o bastante complicada, en función de la cantidad de material de partida, siendo necesario en algunos casos obtener hasta 4 extractos:

- extracto etéreo salino, que puede contener alcaloides fenólicos del tipo **narciclasina** y similares (Piozzi et al., 1968).
- extracto clorofórmico salino, que está constituido por alcaloides cuyas sales son solubles en cloroformo que pueden ser lactónicos, o carentes de funciones polares tales como hidroxilos o aminas (Lyle et al., 1960).
- extracto clorofórmico neutro, formado por alcaloides fenólicos cuyas sales no son solubles en éter etílico, y, por tanto, pueden recuperarse en forma neutra en cloroformo.
- extracto neutro cloroformo-etanólico, formado por alcaloides fenólicos neutros poco solubles en cloroformo o éter etílico.

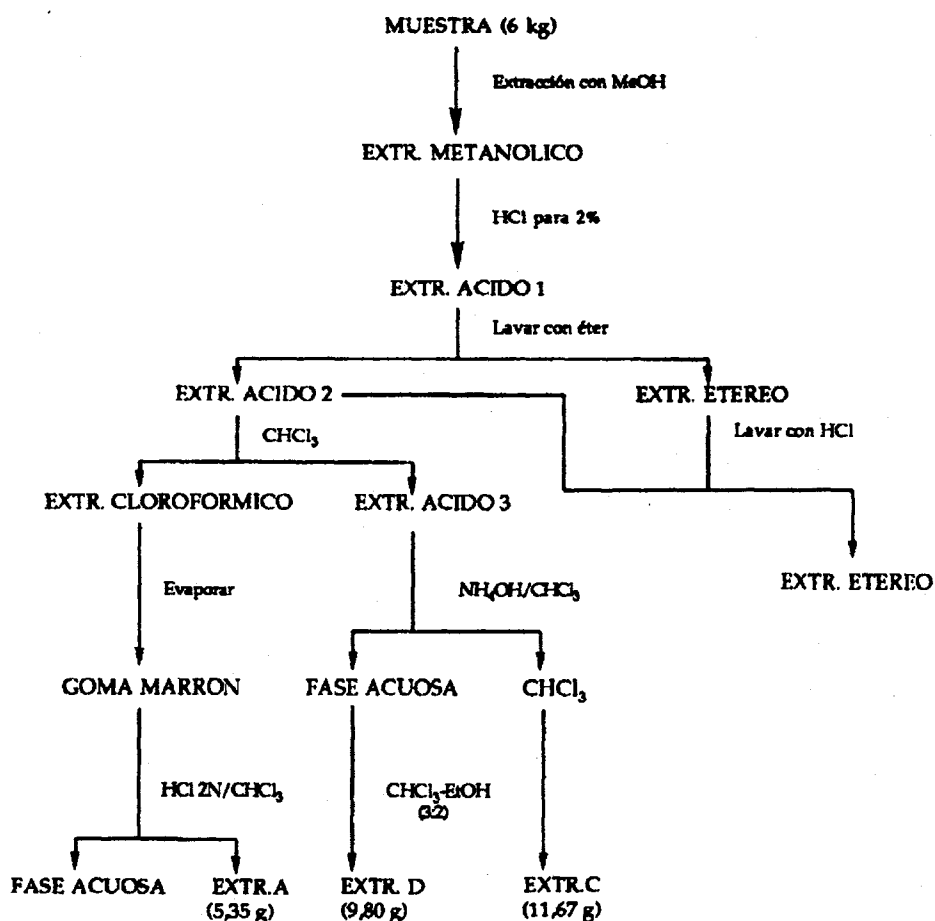
### 2.2.1. Fraccionamiento de *Narcissus primigenius*

La cantidad de muestra recolectada fue de 5900 g, expresado en peso fresco. El material vegetal, una vez triturado y empaquetado en cartuchos de papel de filtro, se extrajo con metanol en un Soxhlet, por un periodo de unas 10 horas. Este primer extracto bruto así obtenido se concentró a 50°C y presión reducida, lo que permitió obtener una pasta verde espesa, que se disolvió en cantidad suficiente de HCl para obtener una solución al 2 % en clorhídrico, que denominamos "extracto ácido 1".

Este extracto se despigmentó exhaustivamente con éter etílico en sucesivas etapas. Los extractos etéreos reunidos y concentrados se lavaron con una solución al 2 % de HCl, que se unió al "extracto ácido 1". Seguidamente se efectuó una cromatografía en capa fina bidimensional, utilizando como primer eluyente la mezcla CHCl<sub>3</sub>-EtOH (9:1) y posteriormente AcOEt-EtOH-H<sub>2</sub>O (10:2:1), para comprobar la posible presencia de **narciclasina** u otro alcaloide similar, los cuales requieren este tipo excepcional de extracción respecto al resto de alcaloides del tipo Amaryllidaceae (Piozzi et al., 1968). Para detectar estos alcaloides se requiere no tan sólo observar la fluorescencia al UV, sino que, además, al no reaccionar con el yodo del reactivo de

Dragendorff, se precisa utilizar una solución reveladora de  $\text{FeCl}_3$  al 5 %, la cual produce coloración violeta por combinación del ión  $\text{Fe}^{+3}$  con los abundantes hidroxilos fenólicos de estas moléculas, la cual no se observó en nuestro caso, razón por la que se constató la ausencia de estos alcaloides en esta planta.

Tras la despigmentación se procedió al fraccionamiento del extracto ácido carente ya de las sustancias más lipófilas, el "extracto ácido 2", en 4 extractos, A, B, C y D (esquema 1) según el procedimiento que a continuación se representa:



Esquema 1. Proceso extractivo seguido con *Narcissus primigenius*

El extracto A está constituido por aquellos alcaloides cuyas sales son solubles en  $\text{CHCl}_3$  (Lyle et al., 1960), siendo, por tanto, alcaloides lactónicos o carentes de funciones polares, tales como hidroxilos o aminas. Para obtenerlo se extrajo el "extracto ácido 2" con  $\text{CHCl}_3$  hasta que la fase orgánica dió reacción negativa con el reactivo de Dragendorff. Se reunieron las fases clorofórmicas, se lavaron con solución al 5% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y se llevaron a sequedad a  $40^\circ\text{C}$  y pre-

sión reducida. Se obtuvo así una goma marrón que tras secarse en estufa a 50°C proporcionó 5,35 g del extracto A.

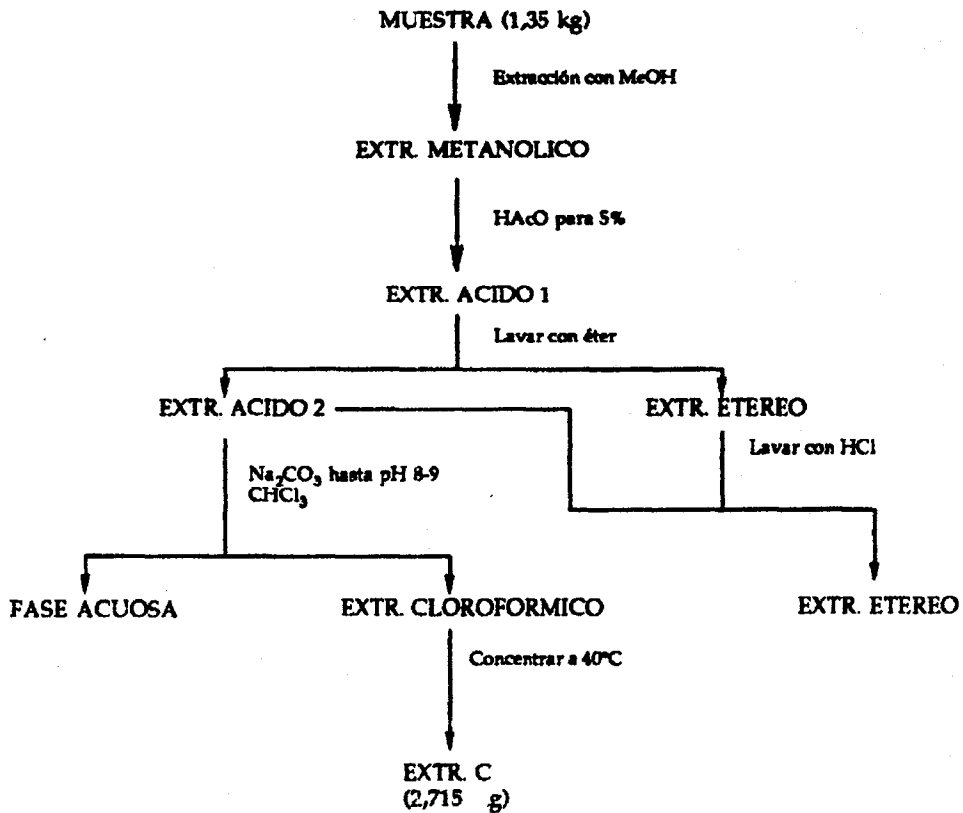
El "extracto ácido 3" se neutralizó primero y se llevó a pH alcalino después, utilizando  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 25 %, comprobándose oportunamente el cambio de pH con papel indicador. Un pH de 8 a 9 es el óptimo para realizar los pasos extractivos siguientes con el máximo rendimiento. A continuación se lava con  $\text{CHCl}_3$  para obtener los extractos B y C. Una vez reunidos, los extractos clorofórmicos se concentraron a 40°C y presión reducida hasta un volumen de unos 100 ml. Este volumen se dejó 48 horas en cámara frigorífica a una temperatura de unos 4°C con el objeto de obtener el posible extracto B, correspondiente a los alcaloides fenólicos poco solubles en  $\text{CHCl}_3$ , que aparecerían en forma de precipitado, cosa que no ocurrió en esta ocasión. Así, pues, el líquido extractivo se evaporó a sequedad, obteniéndose 11,67 g de extracto C, en forma de residuo gomoso.

El "extracto ácido 3", una vez alcalinizado y lavado con  $\text{CHCl}_3$ , se extrajo posteriormente con una mezcla algo más polar,  $\text{CHCl}_3\text{-EtOH}$ , en la proporción 3:2. Una vez reunidas las fases orgánicas se obtuvieron 9,80 g de otro residuo gomoso, que constituyó el extracto D.

### 2.2.2. Fraccionamiento de *Narcissus nevadensis*

El proceso de extracción de *Narcissus nevadensis*, representado en el esquema 2, no ha sido tan complejo, ya que la cantidad de muestra de partida fue bastante limitada (1350 g), y, por consiguiente, el volumen de impurezas fue más reducido.

El material vegetal se extrajo exhaustivamente con metanol en un aparato Soxhlet durante 9-10 horas, obteniéndose un primer extracto bruto que se llevó a sequedad a 50°C y presión reducida. Se obtuvo así una pasta verde espesa, que se disolvió en cantidad suficiente de ácido acético, para obtener una solución al 5% en acético, constituyendo el "extracto ácido 1", el cual se despigmentó posteriormente con éter etílico. Los extractos etéreos se reunieron, concentraron y lavaron con una solución al 5% de ácido acético, y se unieron al extracto ácido anterior, constituyendo el "extracto ácido 2". A continuación, con la fracción etérea se realizó una cromatografía en capa fina en las mismas condiciones que las descritas para *N. primigenius*, para determinar la posible presencia de alcaloides fenólicos de tipo **narciclasina**, comprobándose también en este caso la ausencia de los mismos.



Esquema 2. Proceso extractivo seguido con *Narcissus nevadensis*

El "extracto ácido 2", carente de las sustancias más lipófilas, pero conteniendo alcaloides en forma salina, fue alcalinizado hasta pH 8-9, utilizando para ello una solución saturada de carbonato sódico, que se iba añadiendo poco a poco sobre el extracto ácido bajo agitación magnética, comprobándose oportunamente el cambio de pH con papel indicador. Tras esta alcalinización, el "extracto alcalino" se lavó repetidas veces con cloroformo para obtener el extracto alcaloídico final. Una vez reunidos los extractos cloroformicos se concentraron a 40°C y presión reducida hasta casi sequedad, completándose el proceso de desecación en estufa a 50°C durante una noche. El peso final del residuo gomoso marrón obtenido fue de 2715 mg de extracto C.



## 2.3. SEPARACION DE LOS ALCALOIDES

### 2.3.1. Aislamiento de los alcaloides de *N. primigenius*

Una vez obtenidos los extractos alcaloidicos A, C y D, se procedió a su análisis por TLC en cromatofolios de Silicagel Merck 60F<sub>254</sub> de 20 x 20 cm y 0.2 mm de espesor, utilizando diferentes líquidos de desarrollo y revelando con el reactivo de Dragendorff. En la tabla 9 figuran las manchas previsiblemente alcaloídicas, la coloración que con el reactivo de revelado, así como el hRf (Rf x 100) de cada una.

Tabla 9. Ensayos preliminares por TLC con coloración y valores de hRf

Alcaloide	Coloración	Líquidos de desarrollo <sup>1</sup>			
		I	II	III	IV
a1	naranja	11	--	40	51
a2	amarillo	11	--	30	29
c1	naranja	--	31	30	29
c2	amarillo	--	23	17	19
c3	violeta	--	74	79	--
c4	rojo ladrillo	--	68	72	--
c5	naranja claro	--	2	6	--
d1	naranja	15	24	31	--
d2	ocre	1	1	5	--
d3	violeta	--	73	82	--
d4	rojo púrpura	--	28	32	--
d5	naranja claro	--	12	18	--

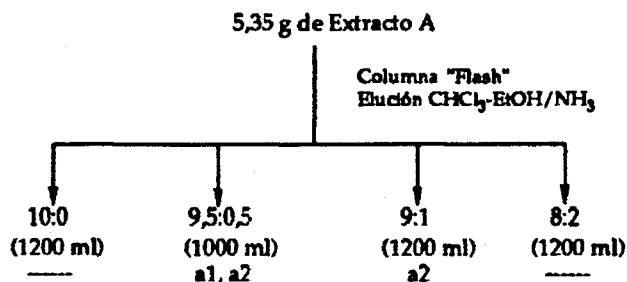
<sup>1</sup> I: CHCl<sub>3</sub>-EtOH (9.5:0.5). II: CHCl<sub>3</sub>-EtOH (9.5:0.5) saturado con NH<sub>3</sub>. III: CHCl<sub>3</sub>-EtOH (9:1). IV: CHCl<sub>3</sub>-EtOH (9:1) saturado con NH<sub>3</sub>.

#### 2.3.1.1. Extracto A

La buena capacidad separadora de las mezclas cloroformo-etanólicas se comprobó ensayando otros líquidos de desarrollo, tales como mezclas acetato de etilo-metanol-amoniaco, acetato de etilo-hexano-metanol, o acetato de etilo-metanol, siempre en distintas proporciones. Se verificó que entre éstas, la única que conseguía separar los tres alcaloides de este extracto era la mezcla acetato de etilo-metanol-amoniaco (8,5:1,5 y atmósfera de amoniaco), pero aún así, la mezcla CHCl<sub>3</sub>-EtOH (9:1) con atmósfera amoniaca ofrecía mejor resolución, razón por la que fue esta última la seleccionada para separar los tres alcaloides.

Se preparó una columna usando sílice SDS cromagel de 40-60 µm (230-400 mesh) para realizar una cromatografía "flash" del extracto, según la metodología descrita para esta técnica

(Clark Still et al., 1978). Una vez cargada la muestra, se inició la elución con  $\text{CHCl}_3$  y 4 ml de solución amoniacal al 25 % por litro de disolvente, y se fue aumentando progresivamente la polaridad, recogiendo fracciones de 100 ml (esquema 3).



Esquema 1. Fraccionamiento del extracto A

El perfil de elución se controló reduciendo el volumen de las fracciones en rotavapor a  $40^\circ\text{C}$  y presión reducida hasta unos 5 ml, para luego aplicar en cromatofolios de Silicagel 60F<sub>254</sub> y desarrollar con  $\text{CHCl}_3$ -EtOH (9:1) en atmósfera saturada de  $\text{NH}_3$ . En la tabla 10 se muestra el perfil de elución.

Tabla 10. Perfil de elución del extracto A

Fracciones	Manchas alcaloídicas (hRf, coloración e intensidad <sup>1</sup> )	Peso (mg)
14-15	51, naranja, intenso	nr
17-18	51, naranja, intenso 29, amarillo, medio	nr
19-28	29, amarillo, medio	nr

<sup>1</sup> alta, media o baja (valores empíricos).

nr = no registrado. Eluyente:  $\text{CHCl}_3$ -EtOH (9:1)  $\text{NH}_3$ .

Finalmente pudieron obtenerse dos alcaloides:

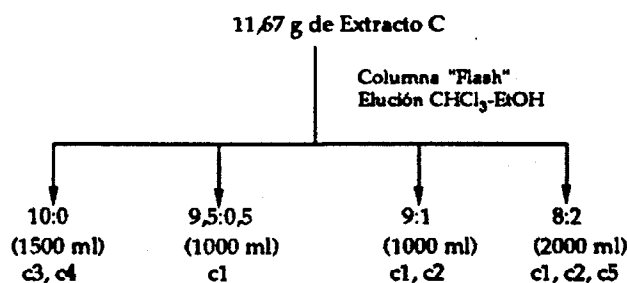
- El alcaloide a1 (hRf 51), mayoritario en este extracto, se consiguió cristalizar en  $\text{CHCl}_3$ -EtOH, y se recrystalizó en  $\text{CHCl}_3$ , proporcionando 1,5 g de agujas blancas, que se identificaron como **homolicorina**.

- El alcaloide a2 (hRf 29) se pudo identificar como **8-O-demetilhomolicorina**. Se cristalizó en  $\text{CHCl}_3$ , aunque se recrystalizó en MeOH, obteniéndose 1,22 g de finas agujas.

### 2.3.1.2. Extracto C

Para el estudio del extracto C se ensayaron líquidos de desarrollo basados en las mezclas binarias de  $\text{CHCl}_3$ -EtOH, y también en atmósfera saturada de  $\text{NH}_3$ . La mezcla que consiguió una mejor separación fue la de  $\text{CHCl}_3$ -EtOH (9:1), dando un incremento del hRf de 13 entre las dos principales manchas, razón por la que se consideró el más efectivo para una separación por CC "flash". Además de estas dos manchas, se podía observar una zona de color anaranjado claro a un hRf superior a 70, y otra mucho más tenue a hRf inferiores a 17. Estas manchas aparecían diminutas, por lo que debían corresponder a alcaloides minoritarios del extracto C.

Teniendo en cuenta estos hechos, se preparó la columna siguiendo el procedimiento "flash" convencional y se rellenó con Silicagel de 40-60  $\mu\text{m}$ . La elución se inició con  $\text{CHCl}_3$  puro, y se fue aumentando gradualmente la polaridad hasta llegar a un máximo de  $\text{CHCl}_3$ -EtOH (8:2) (esquema 4). Se recogieron fracciones de 100 ml, y el perfil de elución se controló reduciendo el volumen de dichas fracciones a unos 5 ml y desarrollando en TLC con la mezcla  $\text{CHCl}_3$ -EtOH (9:1) (tabla 11).



Esquema 4. Fraccionamiento del extracto C

Tabla 11. Perfil de elución del extracto C

Fracciones	Manchas alcaloídicas (hRf, coloración e intensidad <sup>1</sup> )	Peso (mg)
10-15	79, violeta, intensa y difusa <sup>2</sup> 72, rojo ladrillo, intensa y difusa <sup>2</sup>	80
16-21	79, violeta, media <sup>1</sup> 72, rojo ladrillo, media <sup>1</sup> 30, naranja, intensa	nr
22-35	30, naranja, intensa	nr
36-49	30, naranja, intensa 17, amarilla, intensa	nr
50-55	30, naranja, media 17, amarilla, intensa 6, naranja, débil	462

<sup>1</sup> alta, media o baja (valores empíricos).

<sup>2</sup> tras varios días de exposición al aire.

nr = no registrado. Eluyente: CHCl<sub>3</sub>-EtOH (9:1).

Los alcaloides que se pudieron aislar de las respectivas fracciones fueron los siguientes:

- El alcaloide c1, identificado como **8-O-demetilhomolicorina** y presente también está presente en el extracto A. Se obtuvo 1 g de finas agujas incoloras tras recrystalizar en MeOH.
- El alcaloide c2 se pudo aislar por PTLC, utilizando cromatoplasas Merck de Silicagel 60F<sub>254</sub> de un espesor de 1 mm, y usando como líquido de desarrollo el mismo eluyente con que se había realizado la CC "flash". Tras recrystalizar en acetona, se obtuvieron 34 mg de cristales plumosos incoloros, que fueron identificados como **hemantamina**.
- De la zona alcaloídica con valores más elevados de hRf, se concentraron las fracciones a unos 5 ml, y se procedió a ensayar en TLC, detectándose 3 manchas no bien definidas en cuanto a límites pero sí en cuanto a color. Una mancha naranja con un valor de hRf de 71 apareció tras revelar. Unos días después se apreciaron dos manchas más. Una de ellas, de color violeta, apareció a un hRf de 79 (alcaloide c3) y la otra, de color rojo-ladrillo, apareció a un hRf de 72 (alcaloide c4). Se procedió a realizar una PTLC de los 80 mg de estas fracciones con la misma mezcla de disolventes y se aislaron 12,7 mg de **triferidina** (alcaloide c4) que tras posterior purificación quedaron en 7,7 mg. El otro producto (alcaloide c3) fue imposible de cristalizar y no se pudo determinar su estructura.

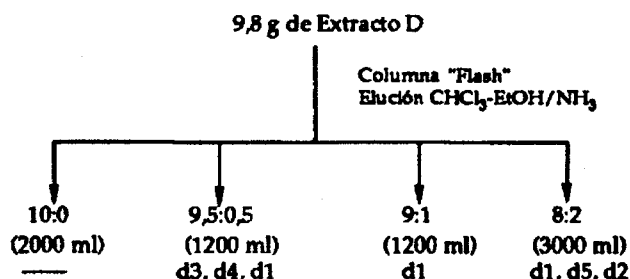
- En la zona de valores inferiores de hRf apareció una mancha naranja muy tenue tras revelar con el reactivo de Dragendorff. Se realizó una PTLC de los 462 mg del residuo seco de las últimas fracciones y se pudo separar, aunque sin llegar a cristalizar, el alcaloide c5 (hRf 6). Se procedió a su repurificación sobre cromatoplasas Merck de Silicagel 60F<sub>254</sub> de 0,25 mm de espesor, pero el producto fue imposible de cristalizar.

### 2.3.1.3. Extracto D

Siguiendo el procedimiento empleado en los extractos anteriores, se ensayaron los líquidos de desarrollo compuestos por mezclas binarias de CHCl<sub>3</sub>-EtOH, acompañadas o no de atmósfera amoniacal, y se constató como más idónea para separar los alcaloides de este extracto la mezcla de CHCl<sub>3</sub>-EtOH (9,5:0,5) en atmósfera de NH<sub>3</sub>.

Aparte de las manchas de los alcaloides d1 y d2, con valores de hRf de 24 y 1, respectivamente, aparecieron otras manchas interesantes. Así, a hRf superiores a 24 se observaron dos manchas, una de ellas más definida, de color rojo púrpura, correspondiente al alcaloide d4, y otra a hRf de 73, y color violeta tras unos días de exposición al aire, correspondiente al compuesto d3. Desafortunadamente, estos dos productos no pudieron ser aislados. Al igual que en el extracto C, la zona de hRf inferior a 24, de color anaranjado claro, correspondiente al alcaloide d5, tampoco pudo ser aislada, algo previsible, al ser una mancha de muy poca intensidad.

Así, pues, y comprobando la eficacia de la mezcla de CHCl<sub>3</sub>-EtOH (9,5:0,5) con NH<sub>3</sub> para separar los alcaloides mayoritarios del extracto D (d1 y d2), se procedió a montar una columna "flash" del mismo modo que en los anteriores extractos. Se comenzó eluyendo con CHCl<sub>3</sub> con 4 ml de NH<sub>3</sub> (25 %) por litro de disolvente, para ir luego incrementando la polaridad por adición de EtOH. En el esquema 5 se muestra el fraccionamiento de estos alcaloides.



Esquema 5. Fraccionamiento del extracto D

Las fracciones que se recogieron fueron de 100 ml, y se siguió su perfil de elución por concentración en rotavapor hasta unos 5 ml, y posterior cromatografía de una parte alícuota (5  $\mu$ l) de cada una de ellas. Los resultados obtenidos figuran en la tabla 12.

- El alcaloide d1 (hRf 24) cristalizó fácilmente, dada la gran cantidad en que se encontraba presente en el extracto D. Se consiguió su recrystalización en MeOH, obteniendo 1,8 g de finas agujas incoloras de **8-O-demetilhomolicorina**. El hecho de que este alcaloide apareciera en todos los extractos puede ser debido tanto a la presencia del grupo lactónico, que le llevaría a aparecer en el extracto A, como del grupo hidroxifenólico libre, que le conferiría la posibilidad, como así ocurrió, de aislarse en otros extractos, incluso en mayor proporción que en el extracto A.
- El alcaloide d2 (hRf de 1) fue algo más difícil de cristalizar, pero finalmente se consiguió en acetona. Tras sucesivas recrystalizaciones en el mismo disolvente se obtuvieron 131 mg de un polvo cristalino color azafrán, que posteriormente se identificó como **8-O-demetilmaritidina**.
- En el caso de los alcaloides d3 (hRf 73), d4 (hRf 28) y d5 (hRf 12), ocurrió algo similar a lo sucedido en el extracto C, es decir, se pudo constatar su presencia pero no se pudieron aislar en cantidad suficiente para conseguir su identificación. En cualquier caso, y en base a los datos de hRf y el color de las manchas, se puede afirmar que los alcaloides d3, d4 y d5 no son los mismos que los c3, c4 y c5.

Tabla 12. Perfil de elución del extracto D

Fracciones	Manchas alcaloídicas (hRf, coloración e intensidad <sup>1</sup> )	Peso (mg)
23-26	73 (violeta, medio) <sup>2</sup> 28 (rojo púrpura, intenso) <sup>1</sup>	nr
27-30	73 (violeta, medio) <sup>2</sup> 28 (rojo púrpura, intenso) <sup>1</sup> 24 (naranja, medio)	nr
31-37	28 (rojo púrpura, débil) <sup>1</sup> 24 (naranja, intenso)	nr
38-50	24 (naranja, intenso)	nr
51-57	24 (naranja, medio) 12 (naranja, débil)	nr
58-68	12 (naranja, débil)	nr
69-74	1 (ocre, intenso)	nr

<sup>1</sup> alta, media o baja (valores empíricos).<sup>2</sup> tras varios días de exposición al aire.nr = no registrado. Eluyente : CHCl<sub>3</sub>-EtOH (9,5:0,5) NH<sub>3</sub>

### 2.3.2. Aislamiento de los alcaloides de *Narcissus nevadensis*

Una vez obtenido el extracto alcaloídico, se procedió a ensayar por CCF con diferentes líquidos de desarrollo en cromatofolios de Silicagel Merck 60F<sub>254</sub> de 20 x 20 cm y 0.2 mm de espesor. En la tabla 13 figuran las manchas previsiblemente alcaloídicas, ya que dieron positivo con el reactivo de Dragendorff, la coloración que han dado al revelar con este reactivo, así como el hRf (Rf x 100) de cada una de ellas.

Tabla 13. Ensayos preliminares por TLC con coloración y valores de hRf

Alcaloide	Coloración	Líquidos de desarrollo <sup>1</sup>							
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	gris oscuro <sup>2</sup>	22	31	35	53	38	79	46	68
2	naranja	18	62	33	82	37	89	41	85
3	naranja	10	46	21	67	23	82	31	73
4	gris claro <sup>2</sup>	2	18	10	57	12	80	22	70
5	negro <sup>2</sup>	1	10	5	30	7	67	12	58
6	varias manchas según eluyente	1	5	3	<sup>3</sup>	5	<sup>4</sup>	7	<sup>5</sup>

<sup>1</sup> I: CHCl<sub>3</sub>-EtOH (9.75:0.25). II: CHCl<sub>3</sub>-EtOH (9.75:0.25) NH<sub>3</sub> saturado. III: CHCl<sub>3</sub>-EtOH (9.5:0.5). IV: CHCl<sub>3</sub>-EtOH (9.5:0.5) NH<sub>3</sub> saturado. V: CHCl<sub>3</sub>-EtOH (9.25:0.75). VI: CHCl<sub>3</sub>-EtOH (9.25:0.75) NH<sub>3</sub> saturado. VII: CHCl<sub>3</sub>-EtOH (9:1). VIII: CHCl<sub>3</sub>-EtOH (9:1) NH<sub>3</sub> saturado.

<sup>2</sup> Color que aparece varios días después del revelado.

<sup>3</sup> Zona de 0 a 22 de hRf.

<sup>4</sup> Zona de 0 a 60 de hRf.

<sup>5</sup> Zona de 0 a 53 de hRf.

Después de ensayar con diferentes líquidos de desarrollo, tales como mezclas acetato de etilo-etanol-amoniaco, acetato de etilo-hexano-etanol, o acetato de etilo-etanol, y en distintas proporciones, se comprobó la buena capacidad separadora de las mezclas cloroformo-etanólicas, siendo la de cloroformo-etanol (9.5:0.5) en atmósfera saturada de amoniaco, la que conseguía una mejor separación de los alcaloides (tabla 13).

#### 2.3.2.1. Extracto C

Una vez seleccionada la mezcla separadora, se montó una columna de 25 mm de diámetro con sílice SDS cromagel de 40-60 µm (230-400 mesh) para realizar una cromatografía "flash" del extracto. Una vez empaquetada la columna y cargada la muestra, se inició la elución con cloroformo con 4 ml de solución amoniacal al 25 % por cada litro de disolvente, y se fue aumentando paulatinamente la polaridad con metanol hasta un máximo de metanol del 20 % v/v respecto al cloroformo. Se colectaron 101 fracciones de 50 ml cada una, y dos últimas de 0.5 l hasta que la reacción con el reactivo de Dragendorff resultó negativa. El perfil de elución se

controló reduciendo el volumen de las fracciones en rotavapor a 50°C y presión reducida. De cada una de ellas se aplicaron unos 10 µl en cromatofolios de Silicagel 60F<sub>254</sub>, desarrollándose con la mezcla elegida inicialmente, es decir, cloroformo-etanol (9.5:0.5) en atmósfera saturada de amoníaco. El perfil de elución definitivo, una vez reunidas las fracciones con la misma composición cualitativa de alcaloides, fue el que figura en la tabla 14.

Tabla 14. Perfil de elución del extracto C

Fracciones	Manchas alcaloídicas (hRf, coloración e intensidad <sup>1</sup> )	Peso (mg)
13-16	65 (negro, media) 33 (negro, media)	87
17-38	65 (negro, baja) 55 (naranja oscuro, baja) 44 (naranja oscuro, alta) 14 (gris anaranjado, media)	837
39-65	44 (naranja oscuro, media) 14 (gris anaranjado, alta) 4 (gris anaranjado, baja)	519
66-83	14 (naranja grisáceo, alta) 4 (gris anaranjado, alta) 3 (anaranjado oscuro, media) 2 (gris oscuro, media) 1 (negro, media)	337
84-87	2 (gris oscuro, media) 1 (negro, alta)	12
88-98	1 (negro, alta)	17
99-103	1 (o menos, gris, media)	317

<sup>1</sup> alta, media o baja (valores empíricos).

Los alcaloides que se han podido aislar de las respectivas fracciones han sido los siguientes:

- Fracciones 39-65. Se realizó una cromatografía en columna convencional con Sílice SDS Cromagel con diámetro inferior a 40 µm. Se utilizó la mezcla elegida inicialmente (cloroformo-etanol 9.5:0.5 y amoníaco) pero, a pesar de recoger 57 fracciones de volúmenes pequeños (20 ml), la separación de los tres productos resultó infructuosa. No obstante, reuniendo las fracciones 7 a 24 se consiguió una mayor purificación de la fracción inicial, obteniéndose 257 mg de la suma de los tres alcaloides. Tras purificación por PTLC con cromatoplasas Merck de Silicagel 60F<sub>254</sub> de 1 mm de espesor, y utilizando



la misma mezcla eluyente, se consiguieron separar y cristalizar 88 mg del alcaloide **6-O-Metil-licorenina** (hRf 44), así como 6 mg del alcaloide **galantina** (hRf 14). También se detectó la presencia del alcaloide con hRf de 4, pero no fue posible su total purificación en esta fase.

- Fracciones 66-83. Al igual que en el caso anterior, se realizó una CC con las mismas condiciones de fases móvil y estacionaria, pudiéndose separar dos alcaloides. Se recogieron 34 fracciones de 20 ml cada una. El primero de los alcaloides se aisló con gran pureza en la fracciones 6 a 11 y se identificó como **licorenina** (hRf 4), de la que cristalizaron 40 mg. Posteriormente se recogieron 74 mg de las fracciones 12 a 23, de los que se pudieron purificar por PTLC 12 mg de **sternbergina** (hRf 3).
- Fracciones 84-87. Dada la pequeña cantidad, sólo fue posible utilizar la técnica de PTLC, la cual resultó especialmente útil para aislar y cristalizar 9 mg de **licorina** (hRf 2).
- Fracciones 88-98. A partir de las aguas madres fue posible cristalizar acículas de **narcisidina** (hRf 1) que fueron recristalizadas en acetona (18 mg).
- Fracciones 99-103. De forma similar al caso anterior, se cristalizaron 2 mg del nuevo alcaloide **2-epilicorina** (hRf 0).

## 2.4. IDENTIFICACION DE LOS ALCALOIDES

Para determinar la estructura de los alcaloides aislados ha sido necesario aplicar las siguientes técnicas:

- Espectroscopía de Infrarrojo (IR): se han registrado en un espectrofotómetro Perkin-Elmer, modelo 1430, en pastilla de KBr (Departament de Farmacologia i Química Terapèutica, Divisió de Ciències de la Salut, Universitat de Barcelona), y en un aparato Bomem, modelo DA3 con transformada de Fourier, de resolución de  $0,02 \text{ cm}^{-1}$  y posibilidad de trabajar en vacío (Serveis d'Espectroscòpia, Universitat de Barcelona).
- Espectroscopía de RMN de protón ( $^1\text{H}$ -RMN) de 200 MHz y de carbono 13 ( $^{13}\text{C}$ -RMN) de 50,6 MHz: registrados en un espectrofotómetro Varian XL-200 utilizando tetrametil-silano como referencia interna y expresando los desplazamientos químicos en partes por millón (Servei de Ressonància Magnètica Nuclear de la Generalitat de Catalunya, Facultat de Químiques de la Universitat de Barcelona, y Servei d'Espectroscòpia de la Facultat de Farmàcia de la misma Universidad). También se realizaron algunos análisis en un espectrofotómetro Bruker-200 en las mismas condiciones de trabajo (Institute de Chimie des Substances Naturelles de Gif-Sur-Yvette, Francia).
- Correlación homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY): realizada utilizando la secuencia estándar (Bax et al., 1981a), con 32 acumulaciones durante 256 valores, una amplitud de espectro de 1600 Hz, un tiempo entre dos acumulaciones consecutivas de 2 segundos, y un tiempo de adquisición de 0,16 segundos. Para que resalte mejor la definición de los picos y la densidad, la medición se realizó con datos "pseudoecho" y pliegue triangular respectivamente (Bax et al., 1981b).
- Espectro de masas (EM): realizado en un espectrofotómetro Hewlett Packard 59865A, con una energía de ionización de 70 eV (Departament de Química Orgànica, Facultat de Químiques, Universitat de Barcelona).
- Punto de fusión (PF): realizado en tubos capilares abiertos en un aparato Büchi, y no corregidos (Departament de Farmacologia i Química Terapèutica, Divisió de Ciències de la Salut, Universitat de Barcelona).

## 2.5. CALCULOS MOLECULARES SOBRE LOS ALCALOIDES AISLADOS

Se han realizado algunos cálculos moleculares sobre determinados alcaloides aislados, a fin de verificar asignaciones en los espectros realizados. Para ello se ha utilizado el programa informático Alchemy II versión 2.00 (Tripos Associates, Inc, St. Louis). De este programa se han usado funciones como la de minimización de energía y las que realizan medidas de los ángulos de enlace y torsión en las moléculas.

En el caso concreto de la función de minimización de energía, el programa utiliza un algoritmo gradiente-conjugado que reposiciona los átomos de la molécula seleccionada hasta encontrar el valor mínimo de la función Energía. Esta función depende de factores tales como la longitud de los enlaces, los ángulos de enlace, los ángulos de torsión, las interacciones de fuera del plano de la molécula y las de Van der Waals. El programa minimizador se detiene después de que las sucesivas iteraciones tienen una diferencia de energía menor que un valor de ruido de fondo que se puede escoger al configurar el programa o bien si llega a un límite de iteraciones, que también puede ser configurado antes de iniciar la minimización.

Tras este proceso, el programa puede dar la información de la Energía de la molécula estudiada con el mismo algoritmo y además nos permite el cálculo de parámetros como longitudes de enlace, ángulos de enlace y ángulos de torsión en átomos seleccionados de la molécula. La función Energía depende de estos parámetros y, por tanto, se puede seguir cual es la tendencia de la molécula a partir de una conformación metaestable determinada. Para obtener los datos de longitud de enlace, el programa requiere que se seleccionen dos átomos contiguos que nos interesen, tres, si se desea conocer el valor de un ángulo de enlace determinado y cuatro si se pretende saber un ángulo de torsión.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSION**

### **3. RESULTADOS Y DISCUSION**

### 3.1. ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE LOS ALCALOIDES DE *NARCISSUS PRIMIGENIUS*

Como ya se ha mencionado en el apartado de Material y Métodos, se han aislado 5 alcaloides de *Narcissus primigenius* (figura 10) de los cuales 4, **homolicorina (1)**, **8-O-demetilhomolicorina (2)**, **hemantamina (3)** y **8-O-demetilmaritidina (4)**, han sido completamente elucidados, mientras que la **triferidina (5)** lo ha sido sólo presumiblemente, aunque con bastantes visos de certeza en base a los resultados obtenidos en otra especie (Sellés, 1993). Todos los alcaloides aislados de esta planta ya han sido detectados previamente en otras especies de la familia Amaryllidaceae, a pesar de lo cual se debe precisar que el aislamiento de **8-O-demetilmaritidina** representa el tercero en una especie de esta familia y el primero en *Narcissus*, y el de **triferidina** constituye el segundo en el género *Narcissus*, y parece indicar una cierta tendencia a la presencia de alcaloides fenantridínicos en amarilidáceas con similares características genotípicas (pertenecientes a la sección *Pseudonarcissus* DC.) y geográficas, como son las especies *Narcissus bicolor* (Viladomat et al., 1990) y *Narcissus asturiensis* (Sellés, 1993).

En la exposición de los resultados correspondientes al estudio fitoquímico se presenta una descripción de cada uno de los alcaloides aislados, en base a las técnicas espectroscópicas empleadas para su completa elucidación. En algunos casos, la confirmación de las asignaciones se ha basado en los cálculos de las conformaciones más estables para estos alcaloides, obtenidos con el programa informático Alchemy II (Tripos Associates, Inc.), el cual permite verificar datos como los ángulos de enlace y torsión necesarios para comprobar la veracidad de ciertas asignaciones.

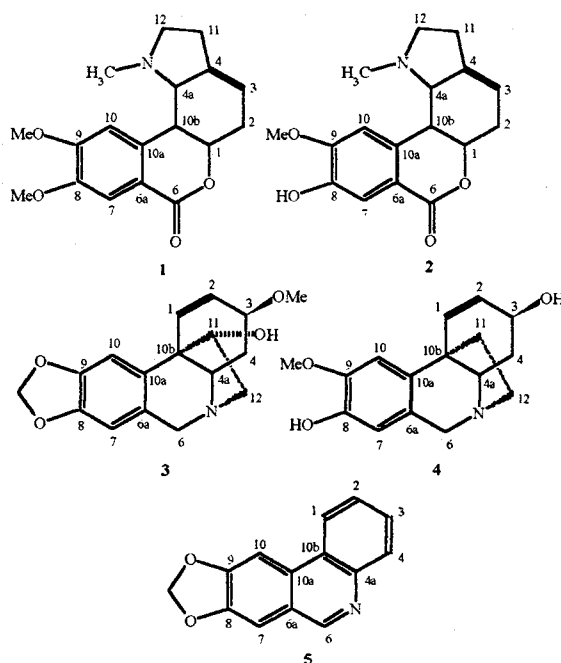


Figura 10. Alcaloides aislados de *Narcissus primigenius*

### 3.1.1. Homolicorina

La elucidación estructural de esta alcaloide se ha realizado en base a la aplicación de técnicas espectroscópicas de Resonancia Magnética Nuclear. La utilización de otras técnicas como la espectroscopia de IR y MS, o las físicas (pf,  $[\alpha]_D$ , ae y Masa exacta) ha tenido un valor confirmatorio.

Así, en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de **homolicorina** (figura 11 y tabla 14) se observa una serie de señales características, que luego se pueden ver repetidas en otros alcaloides del mismo origen biosintético: 2 singuletes en zona aromática, a  $\delta$  7,56 y 6,98 ppm, que corresponden a los protones aromáticos H-7 y H-10, respectivamente, y otros 2 singuletes, a  $\delta$  3,96 y 2,00 ppm, el primero de los cuales integra seis protones y se corresponde a los dos grupos metoxilo del anillo aromático, mientras que el segundo, más apantallado, integra 3 protones que debe al grupo N-metilo. El protón H-7 aparece a campos más bajos que el H-10 debido al efecto de desapantallamiento inducido por el carbonilo lactónico en *peri*. La posición relativa en *para* entre los dos protones aromáticos se justifica por la ausencia de acoplamiento entre ellos.

Otras señales más complejas son las que aparecen en la zona alifática:

- el protón H-1, como un doble doblete de dobletes, debido a su triple acoplamiento con los dos protones H-2 y con el protón metínico H-10b. H-1 presenta la evidencia de estar en posición  $\alpha$  por comparación del desplazamiento químico y de la multiplicidad, con compuestos análogos (Hawksworth et al., 1965). La magnitud del acoplamiento H-1/H-10b justifica la unión *cis* entre los anillos B y C, siendo la conformación de mínima energía para esta molécula la que aparece en la figura 12 con una conformación de semisilla esperada para el anillo C,
- los protones H-2, dentro de una señal ancha a  $\delta$  2,49-2,67 ppm, que es un multiplete y que engloba a su vez a los protones H-11 y H-10b,
- el protón olefínico H-3, dentro de una señal ancha a  $\delta$  5,50 ppm,
- el protón metínico H-4a, como un doble doblete a  $\delta$  de 2,68 ppm, a causa de su acoplamiento con H-10b, junto con un acoplamiento alílico transoide con H-3. La constante de acoplamiento entre H-4a y H-10b, con un valor de 9,6 Hz, sólo puede deberse a una relación *trans*-diaxial entre los dos protones,
- los protones H-12 $\alpha$  y H-12 $\beta$  aparecen como doble doblete de dobletes y doble doblete, respectivamente. El protón  $\alpha$  está más desapantallado debido a la orientación *cis* respecto al par electrónico no compartido del N (Moyenehan et al., 1962). La inversión conformacional de éste está restringida ya que si el grupo N-metilo está en posición  $\alpha$  tiene lugar un impedimento estérico con el H-10 (figura 12).

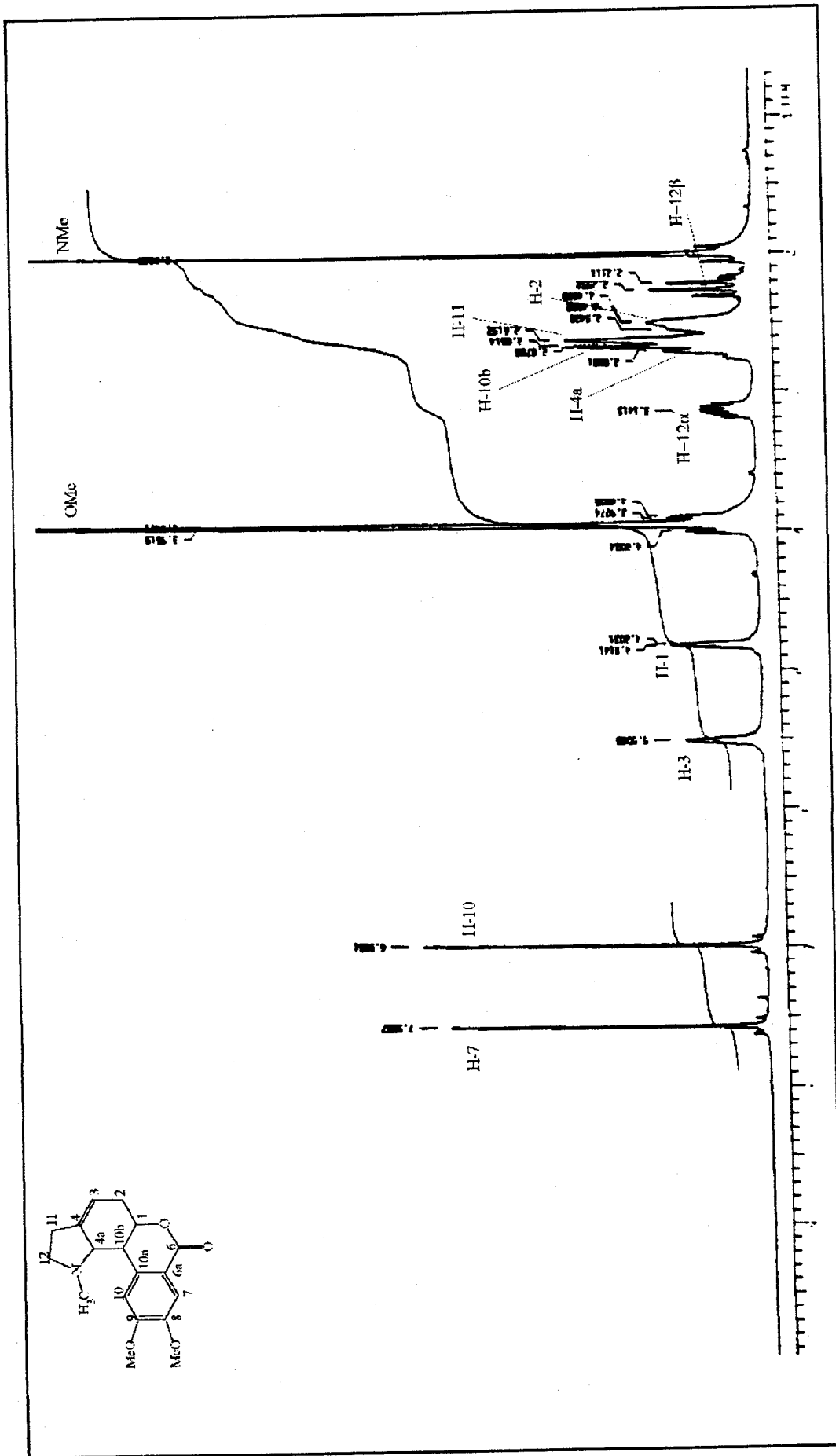


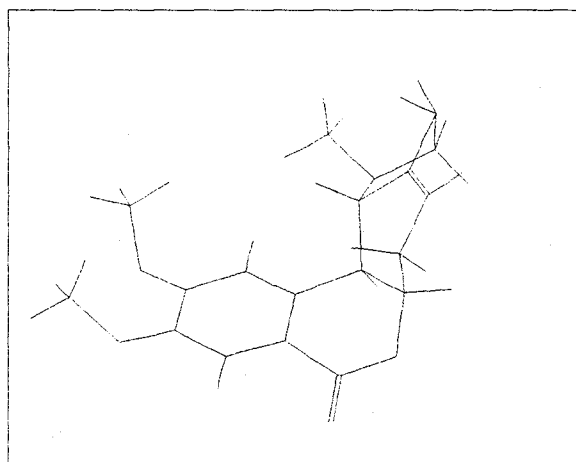
Figura 11. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN de homollicorina (registrado en CDCl<sub>3</sub>)



**Tabla 14.** Datos del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de homolicorina  
(registrado en  $\text{CDCl}_3$  a 200 MHz)

H	$\delta$ (ppm)	multiplicidad	J (Hz)
1	4,81	ddd	1,2endo = 4,2 1,2exo = 1,9 1,10b = 1,8
2	2,49	m	
3	5,50	m ( $W_{1/2} = 7$ )	
4a	2,68	dd	4a,10b = 9,6 4a,3 = 2,0
7	7,56	s	
10	6,98	s	
10b	2,64	dd	10b,4a = 9,6 10b,1 = 1,8
11	2,61-2,67	m	
12 $\alpha$	3,14	ddd	12 $\alpha$ ,12 $\beta$ = 9,2 12 $\alpha$ ,11 $\beta$ = 5,3 12 $\alpha$ ,11 $\alpha$ = 4,1
12 $\beta$	2,23	dd	12 $\beta$ ,11 $\alpha$ = 18,0 12 $\beta$ ,12 $\alpha$ = 9,2
N-Me	2,00	s	
O-Me	3,96	s	

El modelo molecular de mínima energía (figura 12), no sólo evidencia la relación en *cis* entre los anillos B y C, sino que permite obtener los ángulos de torsión entre H-1 y H-10b ( $41,8^\circ$ ) y entre H-4a y H-10b ( $132,5^\circ$ ), que están en relación directa con las constantes de acoplamiento observadas.



Alchemy II  
TRIPOS Associates  
St. Louis, Mo.

**Figura 12.** Conformación más estable de homolicorina

En cuanto al espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de **homolicorina** (figura 13, tabla 15) presenta, paralela-mente al espectro de  $^1\text{H}$ -RMN, unas señales características que proporcionan información valiosa sobre la estructura del compuesto. La señal más típica es la correspondiente al carbonilo lactónico, que en este caso aparece a  $\delta$  165,9 ppm, pudiendo tener un claro valor de diagnóstico para este tipo de alcaloides, dado que hasta la fecha no se conocen alcaloides lactónicos con un esqueleto base diferente al de **homolicorina** presentes en esta familia de plantas. Otras señales típicas, aunque de menor relevancia, serían las atribuidas al grupo N-metilo a  $\delta$  43,4 ppm, y las de los metoxilos aromáticos y del metileno en C-12 (distinguibles entre ellas por medio de la experiencia DEPT).

**Tabla 15.** Datos del espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de **homolicorina** (registrado en  $\text{CDCl}_3$  a 50,6 MHz)

C	$\delta$ (ppm)	multiplicidad
1	77,6	d
2	30,8	t
3	115,1	d
4	140,8	s
4a	66,2	d
6	165,9	s
6a	116,7	s
7	111,6	d
8	148,8	s
9	153,0	s
10	110,8	d
10a	137,6	s
10b	43,8	d
11	27,6	t
12	56,2	t
MeOAr	56,1	q
MeOAr	55,3	q
MeN	43,4	q

Además, se presentan las siguientes siete señales correspondientes a carbonos de la parte no aromática:

- el carbono olefínico C-3, como doblete a  $\delta$  115,1 ppm, mientras que el C-4, perteneciente al mismo sistema olefínico y, además, cuaternario, lo hace a 140,8 ppm,
- un doblete a  $\delta$  77,6 ppm, atribuible al carbono en  $\alpha$  respecto a la lactona,
- el carbono metínico C-4a, que está en posición  $\alpha$  respecto al nitrógeno, como doblete a 66,2 ppm,
- el carbono metínico en C-10b, en  $\alpha$  respecto al anillo aromático a 43,8 ppm,

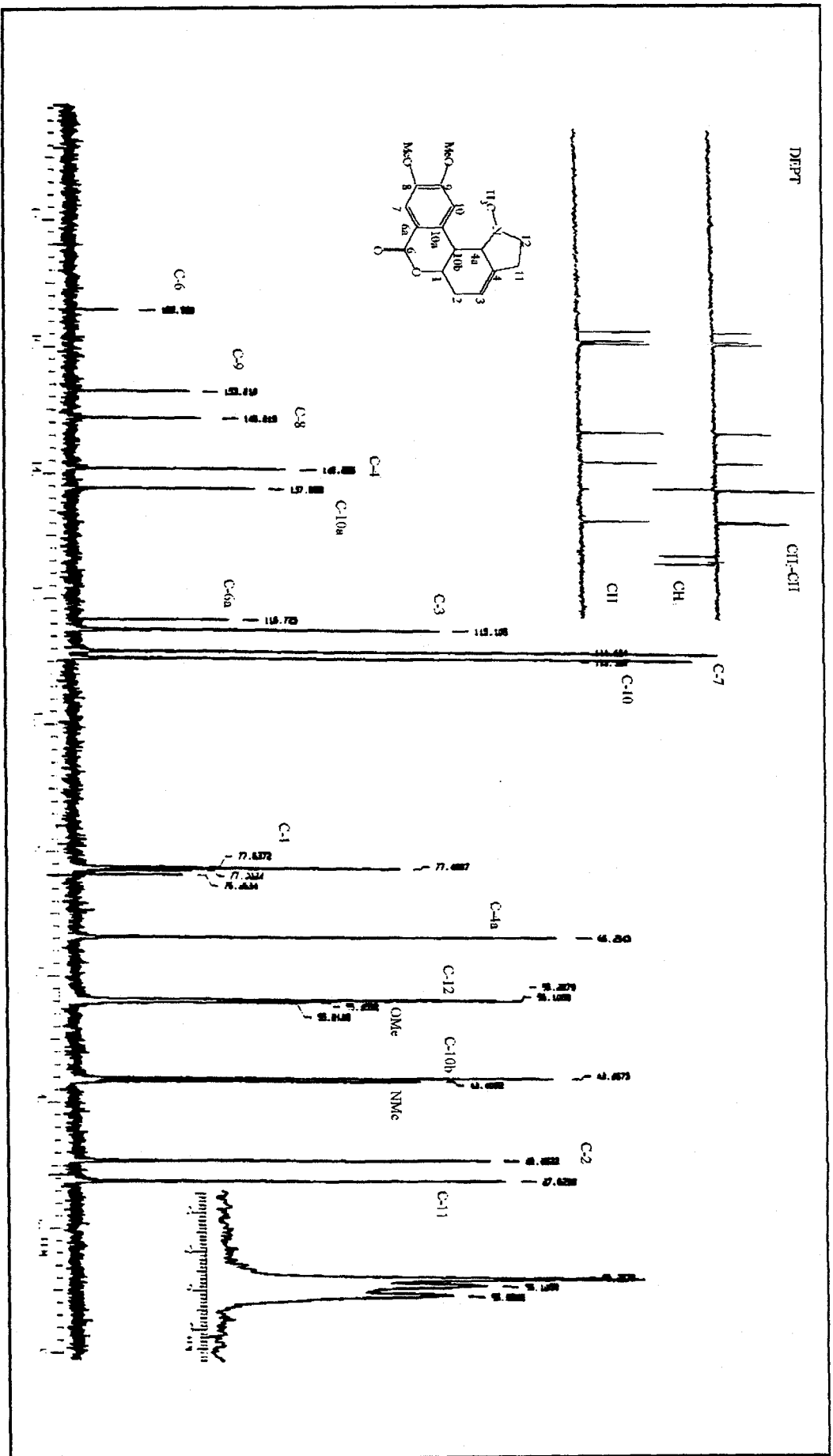


Figura 13. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de homolitorina (registrado en  $\text{CDCl}_3$ )

- el carbono metilénico C-2 a  $\delta$  30,8 ppm, mientras que el también metilénico C-11 lo hace a  $\delta$  27,6 ppm.

Finalmente, en la zona más desapantallada aparecerían las señales que corresponden a los carbonos del anillo aromático, cuatro de ellos cuaternarios y dos terciarios, los dos carbonos olefinicos, y el ya referido carbonilo lactónico. La asignación de las señales se ha basado en el estudio realizado por Jeffs y colaboradores sobre **homolicorina** y otros derivados con el mismo esqueleto base (Jeffs et al., 1985).

Como se ha indicado, la realización del espectro de MS o IR ha servido en algunos casos, y éste es uno de ellos, para verificar los datos deducidos por la interpretación de los espectros de RMN. Así, el modelo de fragmentaciones de **homolicorina** y de otros alcaloides lactónicos de Amarilidáceas ya había sido ampliamente estudiado en el pasado (Ibuka et al., 1966; Schnoes et al., 1968), y presenta una serie de fragmentos claramente diagnósticos. Este modelo se expone aquí, ya que sirve como base para la explicación de los espectros de MS de otros alcaloides con el mismo tipo de esqueleto aislados en esta especie, y en la que se describirá posteriormente (**homolicorina** y **8-O-demetilhomolicorina** en *Narcissus primigenius* y **licorenina** y **6-O-metillicorenina** en *Narcissus nevadensis*).

El espectro de MS de **homolicorina** (figuras 14 y 15) muestra una notoria baja abundancia para el ión molecular a  $m/z = 315$ . Esta molécula presenta un tipo de fragmentación dominante, consistente en la rotura de enlaces débiles en el anillo C y obtención de dos fragmentos, uno que representa al anillo pirrolidina (con sus substituyentes), y otro que contiene la mitad lactona.

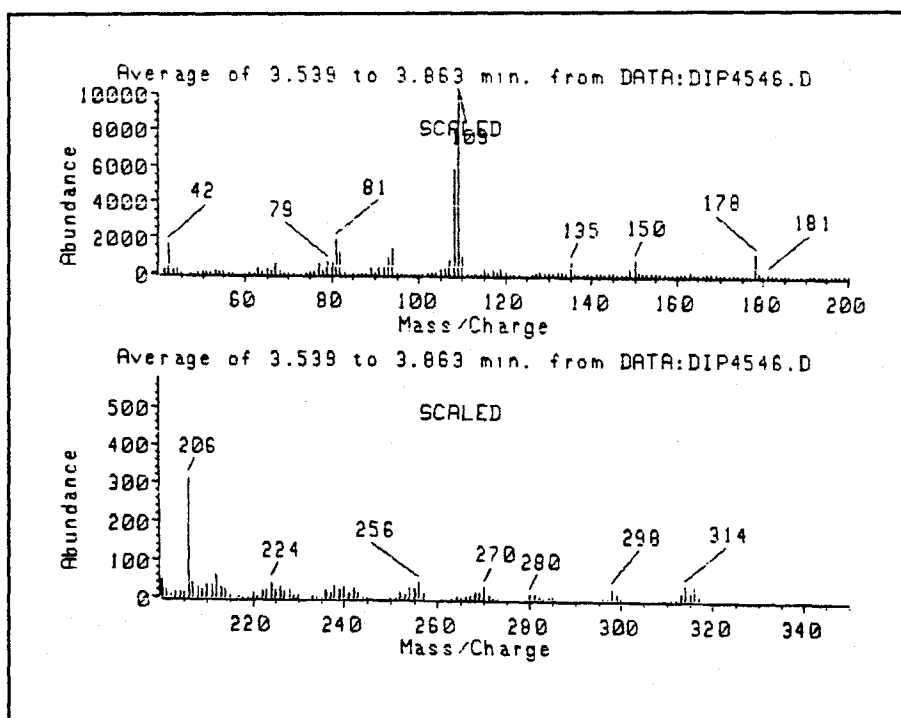


Figura 14. Espectro de MS de **homolicorina**

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

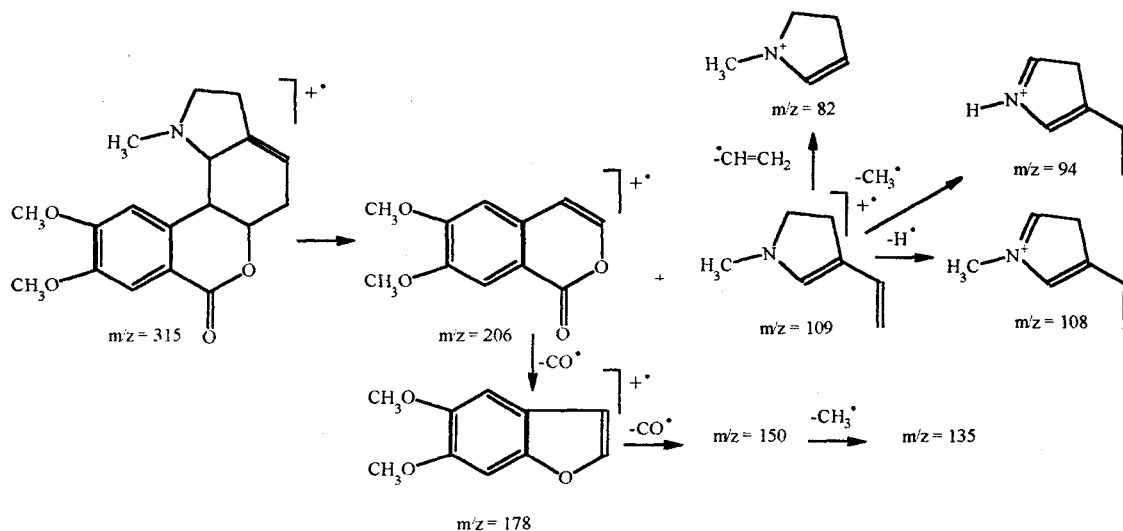


Figura 15. Fragmentaciones más usuales en **homolicorina**

**Homolicorina (1)** - agujas blancas. AE encontrado: C, 67,85; H, 6,71; N, 4,50.  $C_{18}H_{21}NO_4$  requiere: C, 68,57; H, 6,66; N, 4,44%. Pf: 169-171°.  $[\alpha]_D +86^\circ$  (EtOH; c 0,56). IR  $\nu_{\max}$   $cm^{-1}$  (KBr): 2820, 1700, 1600, 1260-1245, 1080. MS  $m/z$  (int. rel.): 315 (<1), 206 (3), 178 (11), 150 (8), 135 (6), 109 (100), 108 (59), 94 (14), 82 (1). Los datos espectroscópicos de  $^1H$  y  $^{13}C$ -RMN se muestran en las tablas 14 y 15.

### 3.1.2. 8-O-Demetilhomolicorina

La elucidación estructural de este alcaloide no ha resultado demasiado difícil por presentar todos sus datos espectrales una gran similitud con el alcaloide **homolicorina**, descrito en el apartado anterior.

La realización del espectro de  $^1H$ -RMN (figura 16, tabla 16) ha permitido evidenciar que el alcaloide es idéntico al anterior, excepto por la ausencia de un metoxilo aromático. Este hecho se refleja en la figura 16, en la cual puede apreciarse que la integración de los metoxilos aromáticos es 3, como la del grupo N-metilo, y también se puede comparar con la figura 11, y con el espectro de  $^1H$ -RMN de **homolicorina**.

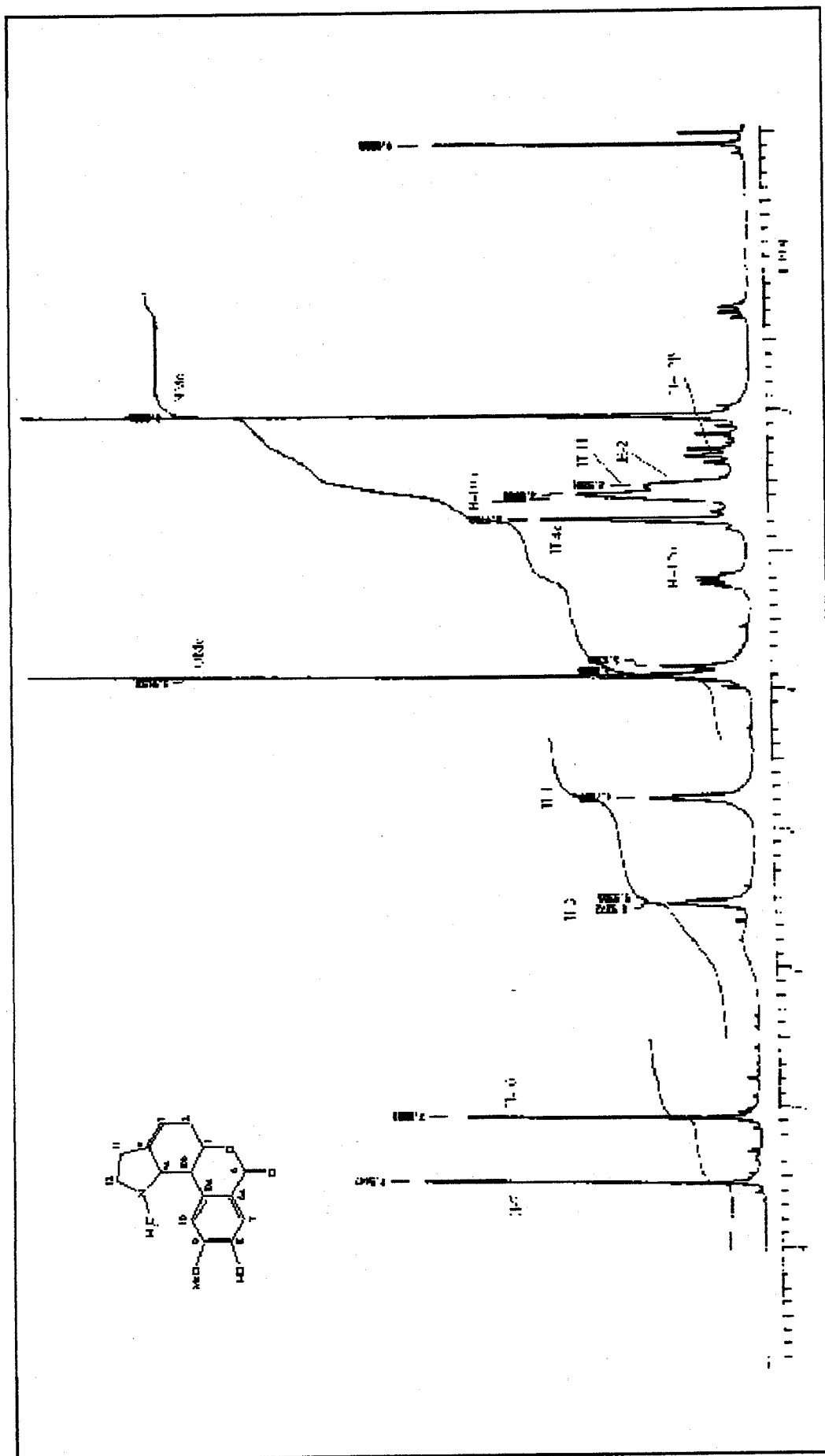


Figura 16. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN de 8-O-demetilhomoligoricina realizado en CDCl<sub>3</sub>

Los protones más importantes para distinguir si es **8-O-demetilhomolicorina** o **9-O-demetilhomolicorina** son los H-7 y H-10. Estos protones se asignan fácilmente en virtud del desapantallamiento del H-7 por el grupo carbonilo lactónico. Se puede afirmar que es el isómero en **8** y no en **9**, debido a que los desplazamientos observados son los mismos que los observados por Jeffs y colaboradores en 1985, y diferentes a los encontrados para **9-O-demetilhomolicorina** (Bastida et al., 1987b). Una segunda evidencia viene dada por el dato físico del punto de fusión, 138-140°C, coincidente por el descrito por Jeffs y colaboradores de 1985 para la **8-O-demetilhomolicorina** (Jeffs et al., 1985), y claramente diferente del observado para el isómero en **9**, de 270-272°C (Bastida et al., 1987b). Debe hacerse notar que a pesar de que en el trabajo de Jeffs y colaboradores se nombra al compuesto como **9-O-demetilhomolicorina** (Jeffs et al., 1985) de acuerdo con el sistema de numeración biosintética propuesta por Ghosal y adoptado en la presente memoria, el nombre correcto es el de **8-O-demetilhomolicorina** (Ghosal et al., 1985a).

Tabla 16. Datos del espectro de <sup>1</sup>H-RMN de **8-O-demetilhomolicorina** (registrado en CDCl<sub>3</sub> a 200 MHz)

H	δ (ppm)	multiplicidad	J (Hz)
1	4,78	ddd	1,2endo = 4,2 1,2exo = 1,7
2	2,52	m	
3	5,53	m (W <sup>1/2</sup> = 7)	
4a	2,77	bd	4a,10b = 10,0
7	7,54	s	
10	7,08	s	
10b	2,58	dd	10b,4a = 10,0
11	2,49-2,64	m	
12α	3,20	ddd	12α,12β = 9,2 12α,11β = 7,0 12α,11α = 3,5
12β	2,31	dd	12β,11α = 18,3 12β,12α = 9,2
N-Me	2,03	s	
O-Me	3,91	s	

El espectro de <sup>13</sup>C-RMN corrobora la estructura propuesta. Dada la similitud con **homolicorina**, únicamente se expone una tabla comparativa (tabla 17) que refleja la pérdida de un metoxilo aromático, así como un desapantallamiento de unos 2 ppm en el carbono C-8, como consecuencia de un cambio de metoxilación (**homolicorina**) a hidroxilación (**8-O-demetil-homolicorina**) y un desapantallamiento de la posición vecina C-7 al cambiar la funcionalización en la posición 8.

Tabla 17. Datos comparativos de los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN de **homolicorina (1)** y **8-O-demetilhomolicorina (2)** (registrados en  $\text{CDCl}_3$  a 50,6 MHz)

C	1	2	multiplicidad
1	77,6	77,6	d
2	30,8	30,9	t
3	115,1	116,3	d
4	140,8	140,0	s
4a	66,2	66,5	d
6	165,9	165,9	s
6a	116,7	117,1	s
7	111,6	115,8	d
8	148,8	146,3	s
9	153,0	151,9	s
10	110,8	110,7	d
10a	137,6	136,2	s
10b	43,8	43,3	d
11	27,6	27,5	t
12	56,2	56,1	t
MeOAr	56,1	55,9	q
MeOAr	55,3	-----	q
MeN	43,4	42,9	q

El estudio de las fragmentaciones en el espectro de masas de los alcaloides del tipo **homolicorina** (Ibuka et al., 1966; Schnoes et al., 1968) es aplicable en **8-O-demetilhomolicorina** (figura 17). Así, el pico molecular, a  $m/z$  de 301, es de baja intensidad, hecho característico en los alcaloides del tipo de la **homolicorina**. En cuanto al modelo de fragmentación, es del todo similar al de **homolicorina**: un proceso del tipo retro-Diels-Alder justifica el pico base a  $m/z = 109$ , y la principal diferencia radica en el peso del fragmento complementario, en función de las sustituciones que pueda presentar el alcaloide. El resto de señales se explican según el mismo modelo que el de las fragmentaciones de **homolicorina** (figura 15).

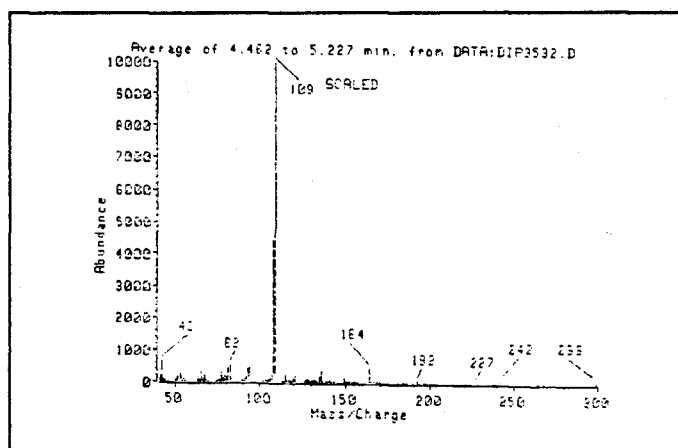


Figura 17. Espectro de MS de **8-O-Demetilhomolicorina**



**8-O-Demetilhomolicorina (2)** - finas agujas incoloras; AE encontrado: C, 67,52; H, 6,31; N, 4,60.  $C_{18}H_{23}NO_4 \cdot 1H_2O$  requiere: C, 67,77; H, 6,31; N, 4,65%. Pf: 138-140°.  $[\alpha]_D^{25} +89,6^\circ$  ( $CHCl_3$ ; c 0,41). IR  $\nu_{max} cm^{-1}$  (KBr): 3500-2700, 1690, 1260, 1075. MS  $m/z$  (int. rel.): 301 (<1), 192 (<1), 164 (4), 136 (3), 121 (2), 109 (100), 108 (44), 94 (5), 82 (5). Los datos espectroscópicos de  $^1H$  y  $^{13}C$ -RMN se muestran en las tablas 16 y 17.

### 3.1.3. Hemantamina

El tercer alcaloide aislado de *Narcissus primigenius* ha sido identificado como **hemantamina** en base a su espectro de  $^1H$ -RMN y al experimento de correlación homonuclear de protón. Adicionalmente se han realizado los espectros de  $^{13}C$ -RMN, IR y MS que confirmaron la estructura propuesta. Este alcaloide, aislado previamente en numerosas especies de Amarilidáceas (Fernández, 1993), se corresponde con una estructura del tipo  $\alpha$ -crinano, es decir, con el puente etilideno C-11/C-12 orientado hacia la cara  $\alpha$ . La estructura que se ha encontrado como energéticamente más estable, después de minimizar la energía de la estructura es la que se representa en la figura 18.

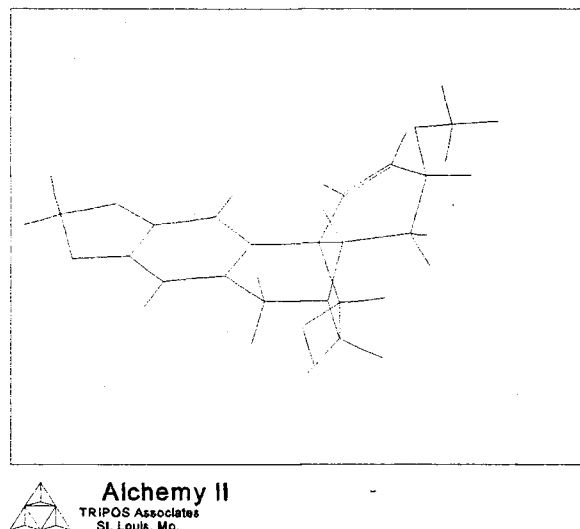


Figura 18. Conformación más estable de hemantamina

En el espectro de  $^1H$ -RMN de **hemantamina** (figura 19, tabla 18) se observan como señales más características:

- cuatro singuletes a  $\delta$  6,82, 6,47, 5,88 y 3,36 ppm, que corresponden respectivamente a los protones aromáticos H-10, H-7, los dos protones del grupo metilendioxo, y el metoxilo no aromático en la posición 3, señales que concuerdan con las descritas en la bibliografía (Pabuçcuoglu et al, 1989; Bastida et al, 1987b),

- la olefina de las posiciones 1-2, que constituye un sistema ABX con H-3, distinguiéndose H-1, a  $\delta$  6,42 ppm, el cual acopla únicamente con H-2, mientras que de éste último con  $\delta$  6,32 ppm, se aprecia además un acoplamiento con el vecino H-3 dando como señal un doble doblete,
- el protón H-3, que acopla a su vez con los dos hidrógenos de la posición 4, y podría acoplar también con H-1 por estar en una posición alílica del tipo transoide. Sin embargo, la posición  $\alpha$  del protón H-3 no permite un acoplamiento detectable con H-1, lo cual no sucede en el caso de **siculinina**, en que hay un acoplamiento de 2,1 Hz entre H-1 y H-3 (Pabuççuoglu et al., 1989), o en el de **crinamina**, que muestra un acoplamiento de 2,0 Hz entre esos dos protones (Ghosal et al., 1986a). En estos dos alcaloides el acoplamiento entre H-1 y H-3 se debe a la orientación hacia la cara  $\beta$  del protón de la posición 3.
- Los protones en 4 muestran la señal más compleja, pues primeramente acoplan entre sí con una constante geminal de gran intensidad, y también acoplan con el protón en 4a y el de la posición 3.
- Un doble doblete a  $\delta$  3,42 ppm, correspondiente al protón 4a, que acopla con los protones en 4 $\alpha$  y 4 $\beta$ . Otras señales con la misma multiplicidad, dobles dobletes, se aprecian a  $\delta$  4,0, 3,35 y 3,24 ppm, y corresponden respectivamente, al protón H-11 y a los dos protones no equivalentes en 12. El hecho de que los dos protones de la posición 12 no sean equivalentes es la causa de que H-11 aparezca como un doble doblete y no como un triplete.
- Los protones metilénicos en 6 muestran un gran acoplamiento geminal (Haugwitz et al., 1965). El mayor desapantallamiento de H-6 $\alpha$  está relacionado con su disposición en *cis* respecto al par de electrones no enlazante del nitrógeno (Moyenehan et al., 1962).

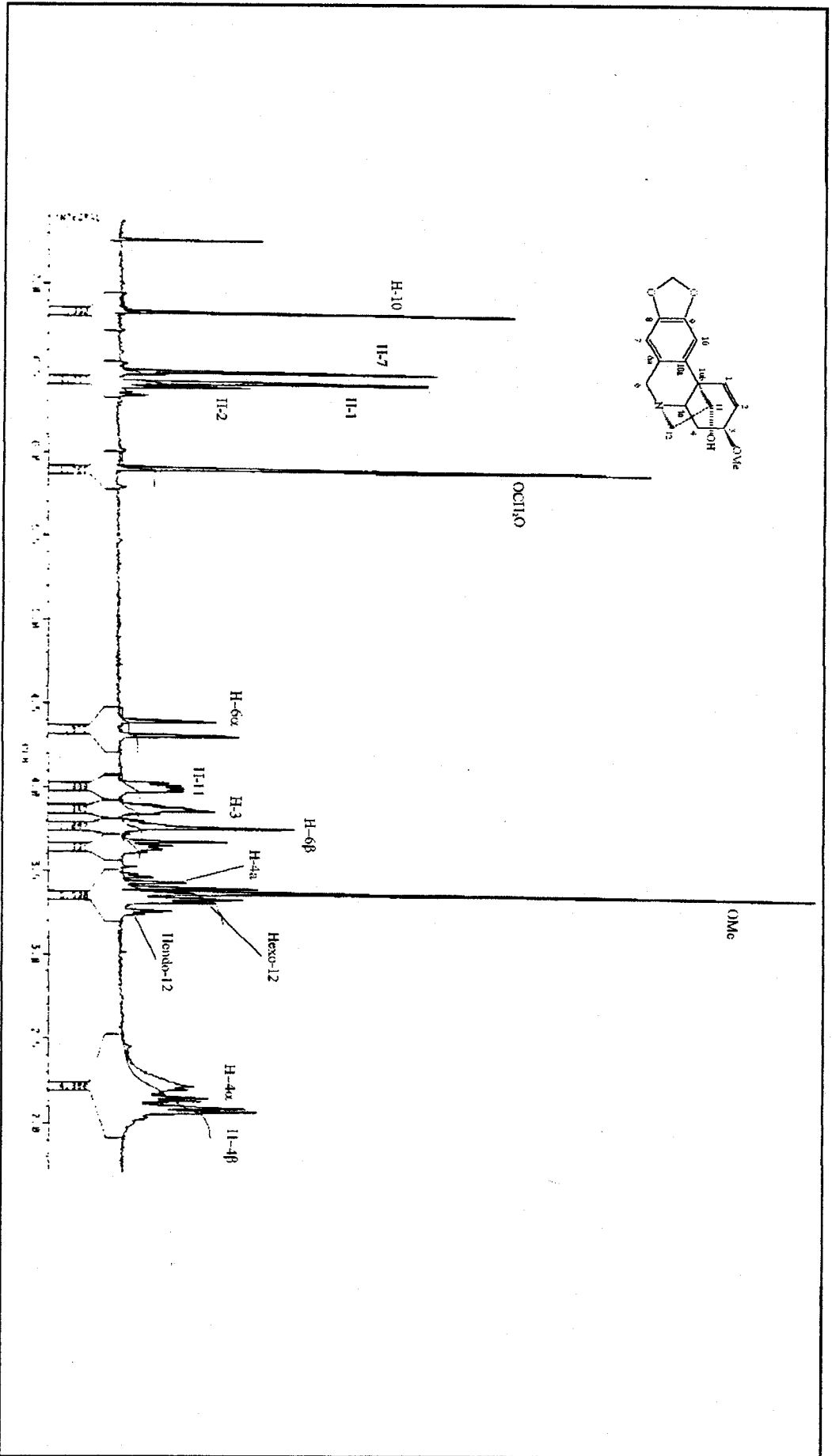


Figura 19. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN de hemantamina (registrado en CDCl<sub>3</sub>)

**Tabla 18.** Datos del espectro de <sup>1</sup>H-RMN de **hemantamina**  
(registrado en CDCl<sub>3</sub> a 200 MHz)

H	δ (ppm)	multiplicidad	J (Hz)
1	6,42	d	1,2 = 10,0
2	6,32	dd	2,1 = 10,0 2,3 = 5,5
3	3,87	m	3,2 = 5,5 3,4 $\alpha$ = 4,0 3,4 $\beta$ = 3,7
4 $\alpha$	2,2	ddd	4 $\alpha$ ,4 $\beta$ = 13,8 4 $\alpha$ ,4a = 13,2 4 $\alpha$ ,3 = 3,7
4 $\beta$	2,08	ddd	4 $\beta$ ,4 $\alpha$ = 13,8 4 $\beta$ ,4a = 6,7 4 $\beta$ ,3 = 4,0
4a	3,42	dd	4a,4 $\alpha$ = 13,2 4a,4 $\beta$ = 6,7
6 $\alpha$	4,35	d	6 $\alpha$ ,6 $\beta$ = 16,6
6 $\beta$	3,77	d	6 $\beta$ ,6 $\alpha$ = 16,6
7	6,47	s	
10	6,82	s	
11	4,00	dd	11,12 $exo$ = 6,3 11,12 $endo$ = 3,4
12 $exo$	3,35	dd	12 $exo$ ,12 $endo$ = 14,0 12 $exo$ ,11 = 6,3
12 $endo$	3,24	dd	12 $endo$ ,12 $exo$ = 14,0 12 $endo$ ,11 = 3,4
OCH <sub>2</sub> O	5,88	s	
O-Me	3,36	s	

Estos acoplamientos se justifican por medio de un experimento de correlación homonuclear (COSY) en el que se observa que el singulete del metoxilo no aromático se solapa con las señales de correlación de su zona del espectro ( $\delta$  3,3-3,6) (figura 20). Se observa también que hay correlación de H-3 con el protón H-2 y los dos H-4, y se pueden distinguir los H-12 en base a su correlación con H-11.

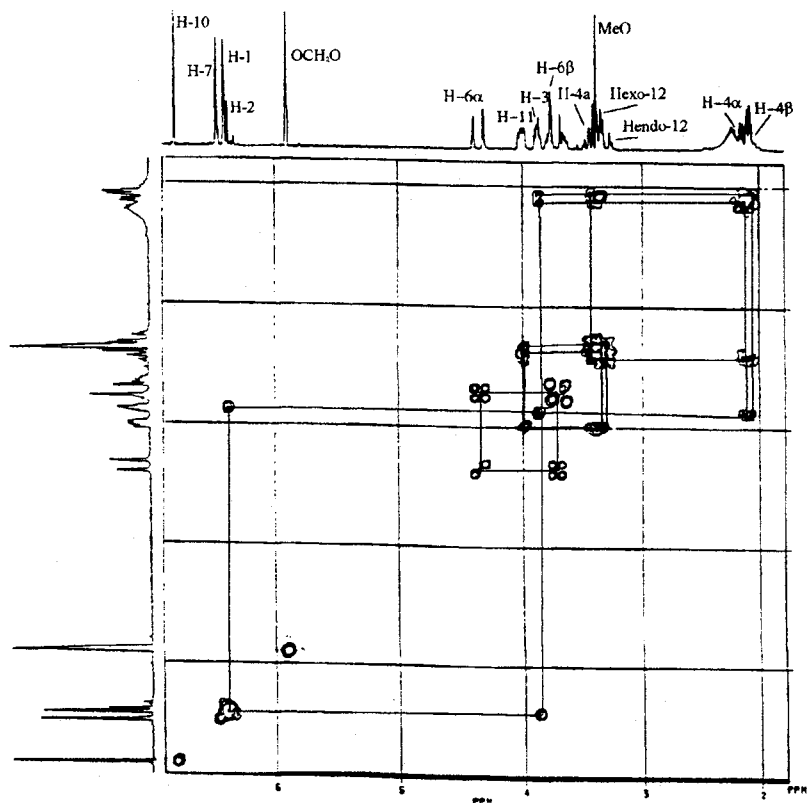


Figura 20. Experimento COSY de **hemantamina** realizado en  $\text{CDCl}_3$ .

Por otra parte, la conformación más estable de la molécula, puede confirmarse experimentalmente por medio de la técnica 2D-NOE, que permite verificar la configuración relativa para H-3 y H-11, así como la disposición del puente etilideno C-11/C-12, en la cual radica la diferencia entre las series de la **hemantamina** y la **crinina**. Así, H-6 $\alpha$ , con  $\delta$  4,35 ppm, muestra efecto NOE con H-12endo, cuyo  $\delta$  es de 3,24 ppm. H-12exo está a campos más bajos debido a su disposición en *cis* respecto al par de electrones libres del nitrógeno (Moyenehan et al., 1962). A su vez, H-6 $\beta$  ( $\delta$  = 3,77 ppm) se cierra hacia H-4a, lo que confirma la disposición en *trans* de los anillos B y C. Además, la existencia de efecto NOE entre H-11, con  $\delta$  4,00 ppm, y H-4 $\alpha$ , con  $\delta$  3,42 ppm, en posición pseudoaxial, implica una disposición en *syn* del hidroxilo en C-11 con respecto al anillo aromático, y la conformación en semisilla del anillo C (como ya se apreciaba en la figura 18).

En el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de **hemantamina** (figura 21, tabla 19) se pueden apreciar las siguientes señales:

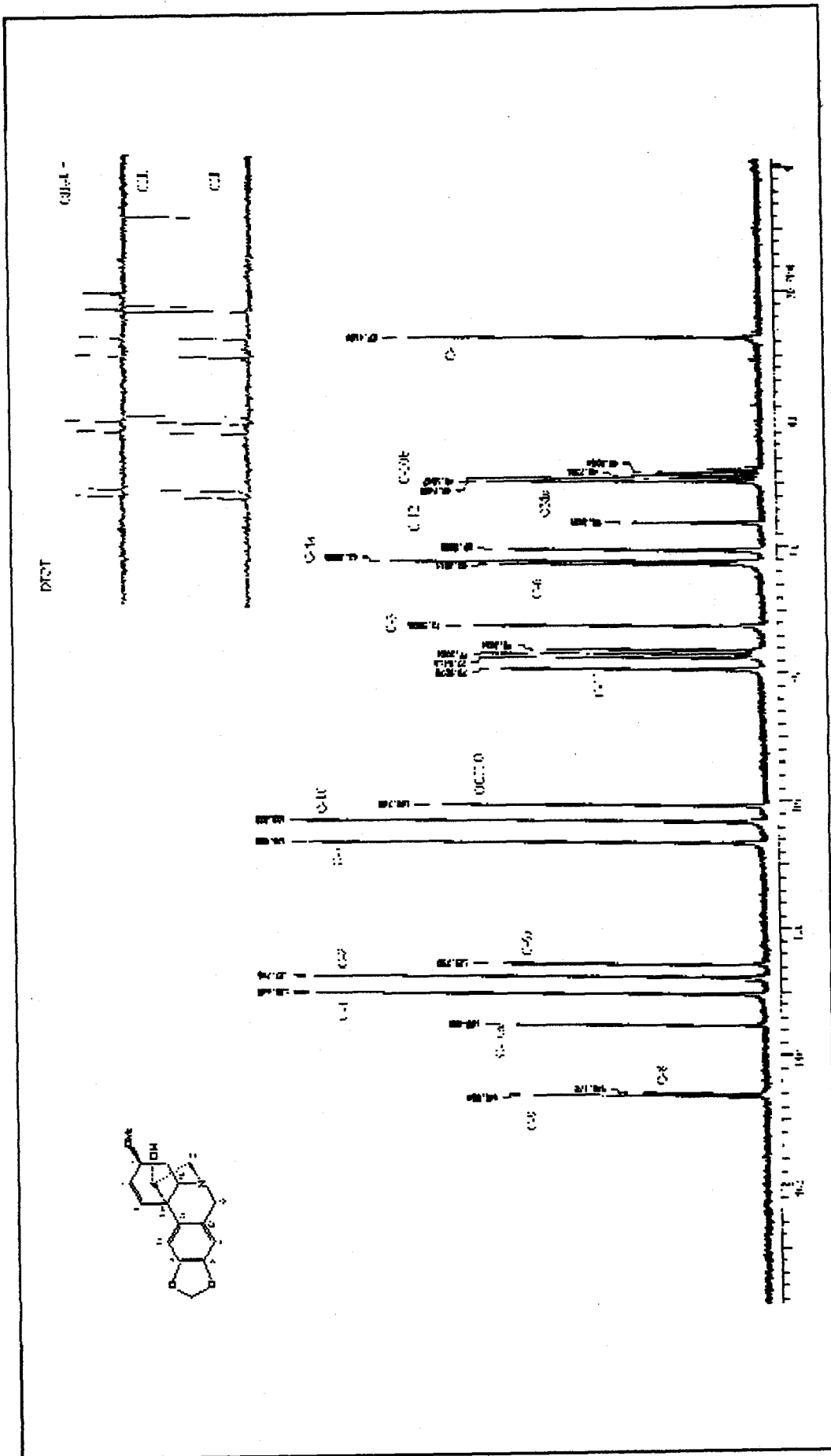


Figura 21. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de hemantamina (registrado en  $\text{CDCl}_3$ )

- una zona característica, correspondiente a la olefina formada por los carbonos C-1/C-2, que se puede observar en la zona aromática a  $\delta$  130,4 y 127,7 ppm, respectivamente. Se ha podido constatar, por comparación con otros alcaloides del mismo esqueleto, que los valores de desplazamiento de estos carbonos dependen de la estereoquímica del carbono C-3, así como del tipo de sustituyente en este último carbono. Así, **crinamina**, con el metoxilo en C-3 en posición ecuatorial, tiene un desplazamiento de 135,8 ppm para el C-1, lo que representa un desapantallamiento de 7,8 ppm respecto de **hemantamina**, la cual es igual a **crinamina** salvo en la estereoquímica en C-3 (Frahm et al., 1985).
- El carbono de la posición alílica C-3 aparece a  $\delta$  72,5 ppm. Como se verá posteriormente, al comparar con **8-O-demetilmaritidina**, este carbono se ve afectado en su desplazamiento por una sustitución por hidroxilo o metoxilo, y si ésta es en posición ecuatorial o axial. Un ejemplo sería el caso de **crinamina**, en la cual la posición ecuatorial del metoxilo en este carbono permite un  $\delta$  de 76 ppm, lo que lleva a un desapantallamiento en 3,5 ppm respecto a **hemantamina** (Frahm et al., 1985). En cuanto a la influencia de la hidroxilación/metoxilación en este carbono, se puede constatar que en **vitatina**, análogo de **hemantamina** pero hidroxilado en 3, hay un desplazamiento en este carbono de 64 ppm, lo que representa un apantallamiento de 8,5 ppm respecto al correspondiente carbono de **hemantamina** (Frahm et al., 1985). Así, pues, en base a estos datos, se puede concluir que existe un metoxilo en posición axial unido al C-3.
- El C-4 tiene un valor de  $\delta$  de 27,4 ppm, y por comparación con la **8-O-demetilmaritidina**, se observa que está afectado de forma opuesta a como sucede al C-3 respecto del cambio hidroxilación/metoxilación. También está influenciado por la posición axial o ecuatorial del sustituyente en C-3, y se puede hacer la analogía con **crinamina**, en el sentido de que el metoxilo en ecuatorial en este último alcaloide lleva a un apantallamiento en el vecino respecto a **hemantamina**.
- El carbono terciario C-4a, que forma parte de la unión entre los anillos B y C, tiene un valor  $\delta$  de 62,3 ppm, que es un valor normal para un alcaloide como la **hemantamina**, con una unión en *trans* entre dichos anillos, y con un sustituyente axial en 3. El carbono cuaternario C-10b se observa a 49,7 ppm debido a su proximidad al carbono 11 con un hidroxilo.
- Los carbonos 11 y 12 aparecen a 79,5 y 60,5 ppm, respectivamente, valores debidos a la gran influencia del hidroxilo en 11, que produce un intenso desapantallamiento.
- El resto de señales del anillo aromático, grupo metilendioxo y metoxilo no aromático, son señales típicas, considerándose innecesario su comentario.

Tabla 19. Datos del espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de hemantamina  
(registrado en  $\text{CDCl}_3$  a 50,6 MHz)

C	$\delta$ (ppm)	multiplicidad
1	130,4	d
2	127,7	d
3	72,5	d
4	27,4	t
4a	62,3	d
6	62,8	t
6a	125,7	s
7	106,9	d
8	146,1	s
9	146,5	s
10	103,2	d
10a	135,3	s
10b	49,7	s
11	79,5	d
12	60,5	t
$\text{OCH}_2\text{O}$	100,7	t
MeO	56,2	q

En cuanto al espectro de masas de **hemantamina**, es algo más complicado que el de los dos alcaloides descritos anteriormente (figura 22). El modelo de fragmentación ha sido estudiado sobre todo por Duffield (Duffield et al., 1965), pero los mejores trabajos son los publicados por Longevialle y colaboradores (Longevialle et al., 1973a y b).

Un primer hecho destacable es la presencia del hidroxilo en C-11 afecta bastante a los procesos de fragmentación de la molécula (figuras 23, 24 y 25).

**Hemantamina** presenta un pico molecular de poca intensidad a  $m/z$  301, así como tres modos fundamentales de fragmentación: pérdida de  $\text{CH}_3\text{OH}$ , pérdida de  $\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$  y pérdida de  $\text{CHO}$ . En general, para los alcaloides del tipo crinano ( $\alpha$  o  $\beta$  indistintamente) la pérdida de metanol (figura 23) está más favorecida en las moléculas en las que el puente y el sustituyente en C-3 están en *cis*. El fragmento de  $m/z = 269$  se forma entonces, pero mucho más fácilmente que cuando no se cumple esta condición. Los picos más importantes derivados de este tipo de pérdida son los de  $m/z = 269$ , el cual deriva de un proceso tipo retro Diels-Alder para su formación,  $m/z = 240$  que se produce por pérdida de un radical tipo formaldehído,  $m/z = 211$ , que procede del anterior por fragmentación de una unidad metilénimina,  $m/z = 210$  y  $m/z = 209$ , que deriva por pérdida sucesiva de dos radicales hidrógeno y, finalmente, el que es el pico base a  $m/z = 181$ , derivado de la pérdida de una molécula de formaldehído. Otra posibilidad para el ión  $m/z = 269$  incluye la pérdida de su cadena cetónica como consecuencia de una reordenación de McLafferty con uno de los hidrógenos del esqueleto llevando al ión de  $m/z = 225$  que puede experimentar una subsiguiente eliminación de hidrógeno.



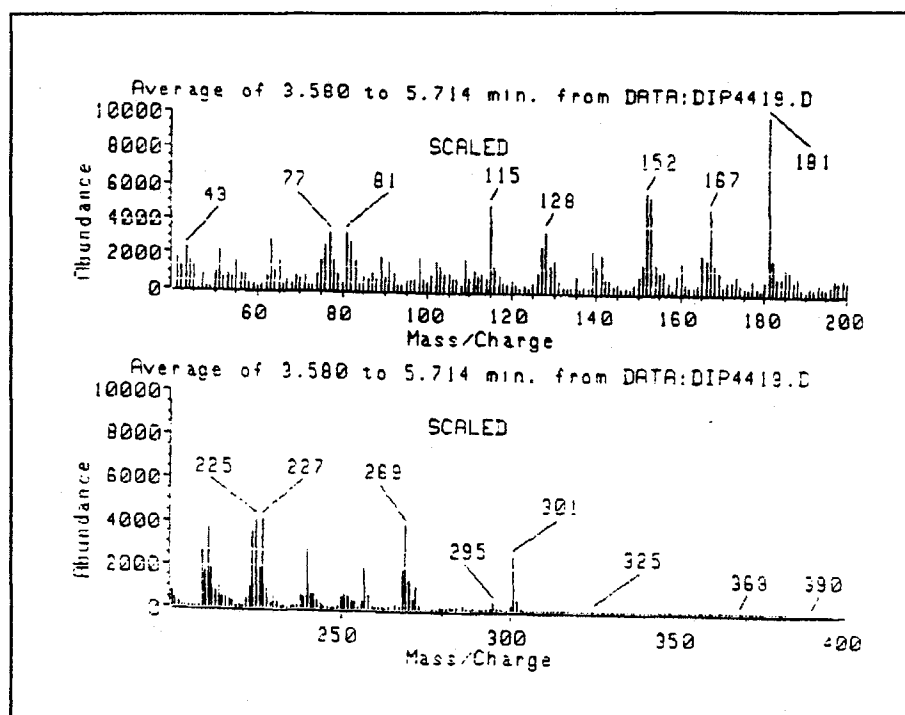


Figura 22. Espectro de Masas de **hemantamina**

Los procesos que llevan a la pérdida de  $C_2H_5N$  (M-43) y  $C_2H_6N$  (M-44) son también importantes. En **hemantamina** el fragmento M-44 es más importante que el M-43, al corresponder a la pérdida de un hidrógeno radical del proceso precedente. La relativa significancia de esta pérdida natural de hidrógeno deriva de la facilidad con la cual los elementos derivados de metanol son eliminados, en nuestro caso, la pérdida de metanol está relativamente favorecida por lo cual, la pérdida de  $C_2H_5$  ó  $C_2H_6N$  dominará enteramente el patrón de la fragmentación. El modelo propuesto por Longevialle y colaboradores, consiste en la apertura del anillo D por rotura del enlace C-11/C-12, seguido de reordenamiento del hidrógeno 11-hidroxílico, que se pierde (Longevialle et al., 1973b). El grupo aldehídico así formado puede entonces inducir rotura del enlace C-6/C-6a, generando un ión oxonio en conjugación con el anillo aromático. Una rotura homolítica del enlace C-4a/C-5 elimina la mitad nitrogenada  $CH_2=NCH_3$ , con generación del radical  $m/z = 258$ . De esta manera, el ión oxonio induce la pérdida de un hidrógeno radical llevando al fragmento  $m/z = 257$  seguido de pérdida de metanol o de un radical metoxilo, lo que daría los fragmentos de  $m/z = 225$  y  $m/z = 227$ .

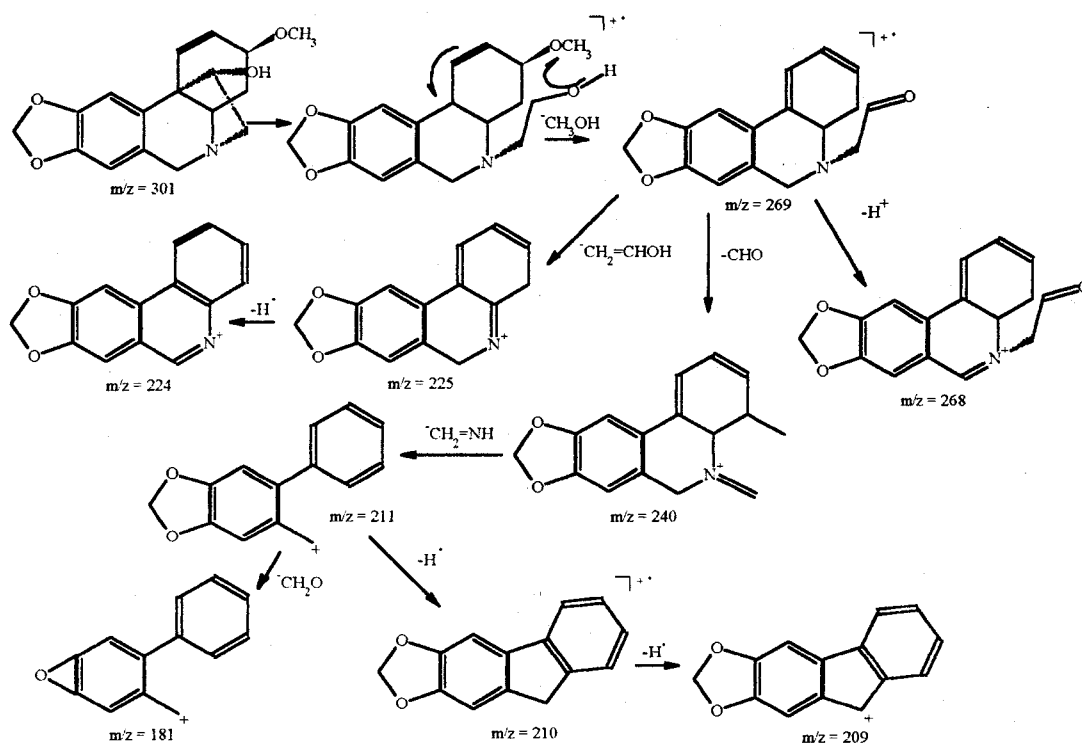


Figura 23. Fragmentaciones de hemantamina. Pérdida de  $\text{CH}_3\text{OH}$ .

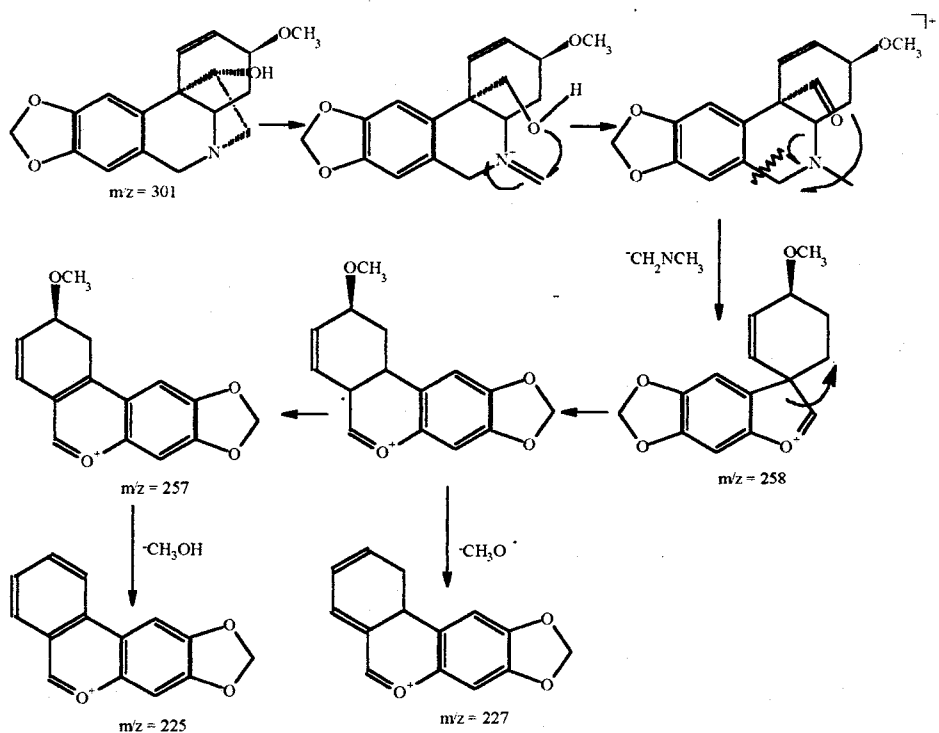


Figura 24. Fragmentaciones de hemantamina. Pérdida de  $\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$ .

La pérdida de CHO observada por Longevialle y colaboradores para otros compuestos del grupo de la **hemantamina**, es poco importante en ésta. Picos característicos de este grupo son los  $m/z = 272$ ,  $m/z = 230$ ,  $m/z = 198$  y  $m/z = 197$  (figura 25).

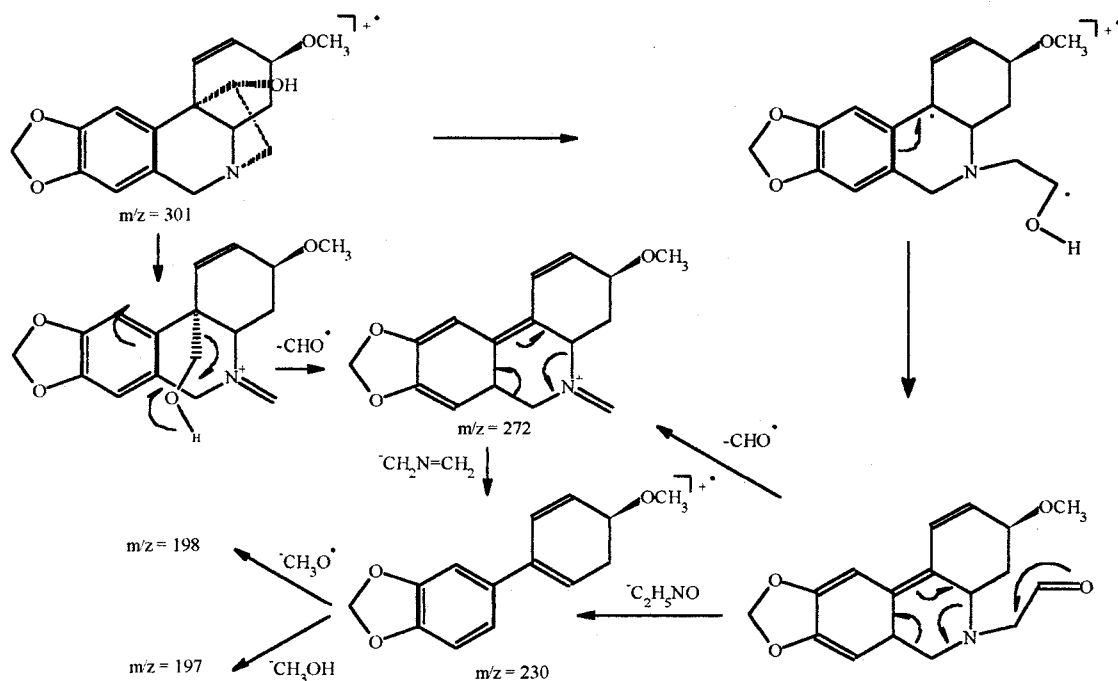


Figura 25. Fragmentaciones de hemantamina. Pérdida de CHO.

**Hemantamina (3)** - cristales plumosos incoloros; Masa exacta  $m/z$  301,1309; calculado para  $C_{17}H_{19}NO_4$  301,1313. Pf: 195-198°.  $[\alpha]_D^{25} +38,3^\circ$  ( $CHCl_3$ ; c 0,45). IR  $\nu_{max}$   $cm^{-1}$  (KBr): 3350-2960, 1480, 1340, 1240, 1040, 940. MS  $m/z$  (int. rel.): 301 (24), 269 (39), 268 (17), 258 (6), 257 (19), 240 (26), 227 (41), 225 (41), 224 (35), 211 (36), 210 (17), 209 (26), 181 (100). Los datos espectroscópicos de  $^1H$  y  $^{13}C$ -RMN se muestran en las tablas 18 y 19.

### 3.1.4. 8-O-Demetilmaritidina

El cuarto alcaloide aislado de *Narcissus primigenius* es una molécula bastante inusual en la familia de las Amaryllidaceae. La primera cita sobre este alcaloide fue su aislamiento en 1987, de *Hymenocallis rotata* Herb. y posteriormente se encontró también en especies del género *Sternbergia* (Pabuçcuoglu et al., 1989). Con este trabajo, pues se reporta, por tercera vez el aislamiento de este alcaloide en una amarilidácea, y la primera en el género *Narcissus*. Además, se han podido completar los datos espectroscópicos de este compuesto al haberse realizado el espectro de  $^{13}C$ -RMN, el cual no estaba descrito en la literatura. Dado que es un producto poco frecuente, se describen con mayor detalle, los diferentes espectros realizados.

Así, el espectro de IR (figura 26) de **8-O-demetilmaritidina** muestra como señales más características:

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

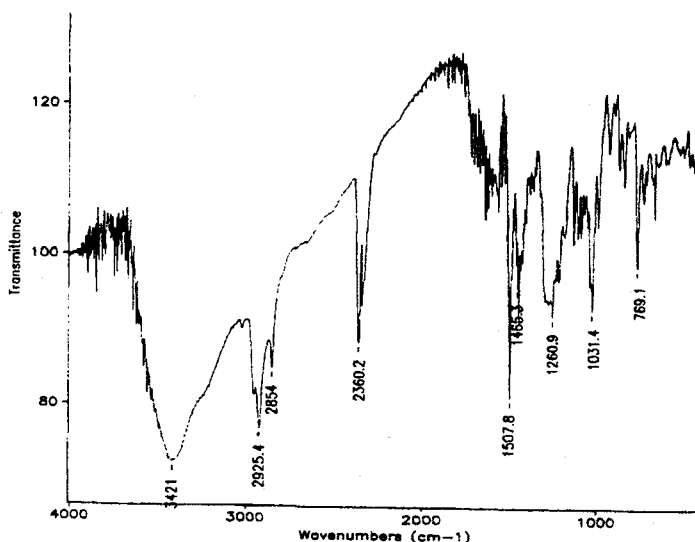
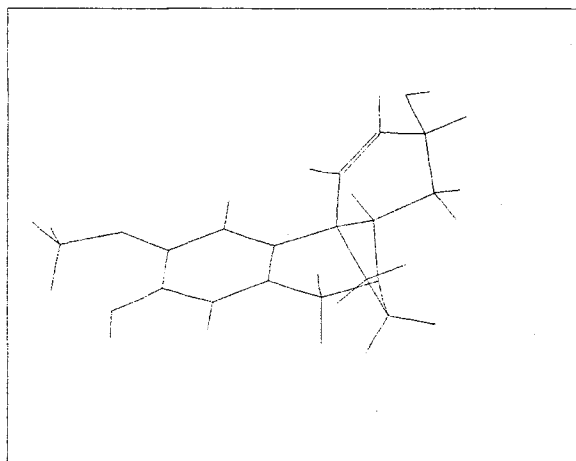


Figura 26. Espectro de IR de **8-O-demetilmaritidina**

El espectro de IR da poca información sobre la estructura de la molécula, siendo el de  $^1\text{H-RMN}$  de mayor utilidad para la elucidación. Este espectro (figura 28, tabla 20) muestra, como señales más características las siguientes:

- un grupo metoxilo aromático a  $\delta$  3,89 ppm, y dos protones aromáticos como singuletes a  $\delta$  6,48 y 6,82 ppm,
- los protones H-1 y H-2, que presentan un acoplamiento *cis*-olefinico entre sí, y H-2, además, con los H-3 $\alpha$  y H-4 $\beta$ , con lo que H-2 se muestra como doblete de dobletes,
- el protón H-3, que aparece en  $\alpha$ , pues si estuviera en  $\beta$  mostraría un acoplamiento alílico cercano a los 2 Hz con H-1, y el acoplamiento de H-2 con H-3 sería aún de más baja intensidad, como ocurre con **epimaritidina** (Ghosal et al., 1985b) y **bulbispermina** (Ali et al., 1984). Todo ello es similar a lo observado en **hemantamina** (Bastida et al., 1987a).

- El protón H-4 $\alpha$  tiene un gran acoplamiento con H-4a debido a la característica posición *trans*-diaxial de la serie de la **hemantamina** para estos dos protones. El H-4 $\beta$  muestra como hecho característico un acoplamiento con H-2, debido a un mecanismo W (ya que se encuentran en el mismo plano). Todas estas afirmaciones pueden verse más claramente en el modelo estructural de mínima energía obtenido para la **8-O-demetilmaritidina** (figura 27).
- Los protones H-6 $\alpha$  y H-6 $\beta$  aparecen como dos dobletes correspondientes a un sistema AB con un acoplamiento geminal de gran intensidad.



 Alchemy II  
TRIPOS Associates  
St. Louis, Mo.

Figura 27. Conformación más estable en 8-O-demetilmaritidina

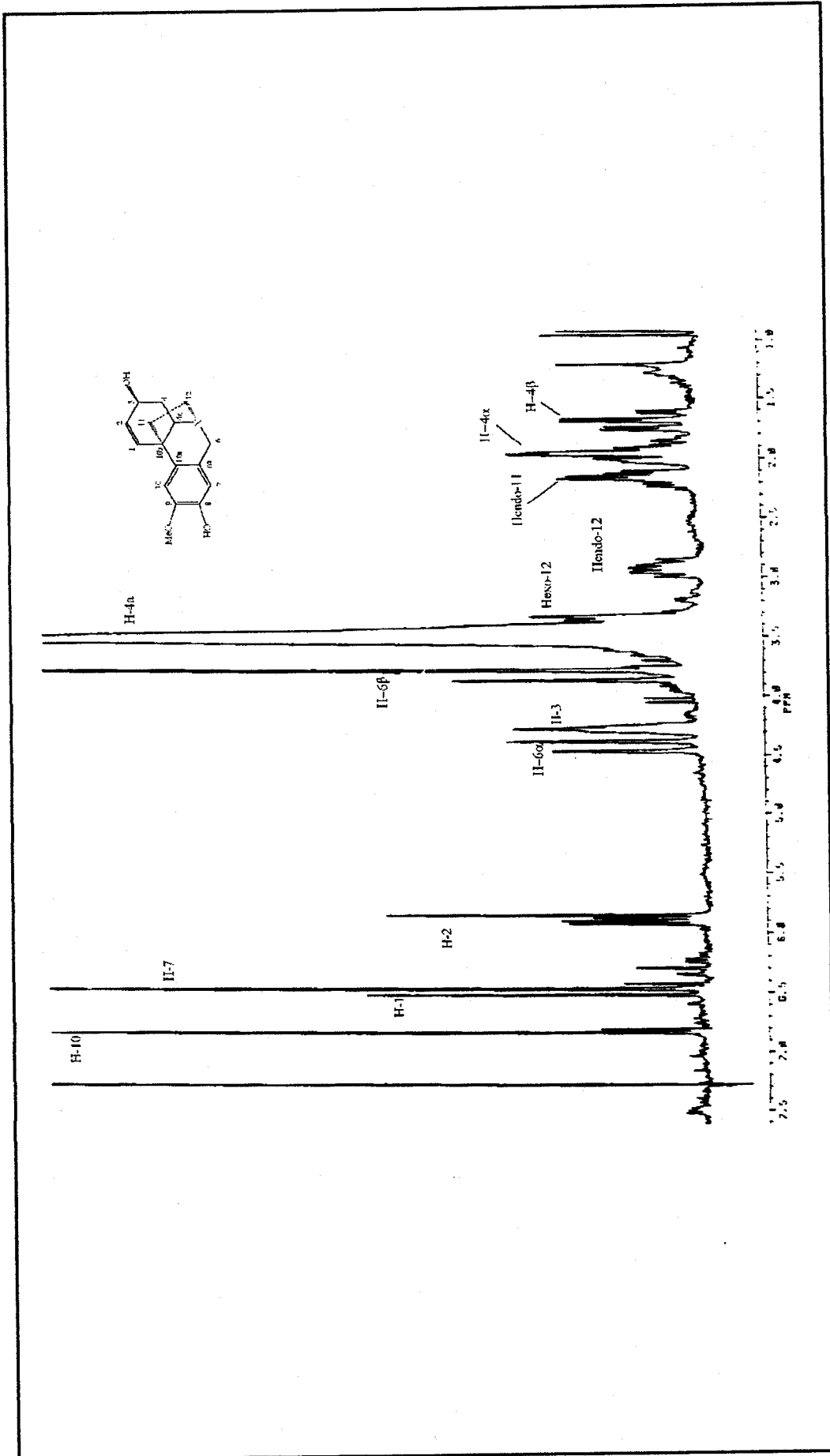


Figura 28. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 8-O-demetilmaritidina (registrado en  $\text{CDCl}_3$ )

**Tabla 20.** Datos del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de **8-O-demetilmaritidina**  
(registrado en  $\text{CDCl}_3$ , a 200 MHz)

H	$\delta$ (ppm)	multiplicidad	J (Hz)
1	6,5	d	1,2 = 10,0
2	5,9	ddd	2,1 = 10,0 2,3 $\alpha$ = 5,2 2,4 $\beta$ < 1
3 $\alpha$	4,25	td	3 $\alpha$ ,2 = 5,2 3 $\alpha$ ,4 $\alpha$ = 4,0
4 $\alpha$	1,7	td	4 $\alpha$ ,4 $\beta$ = 13,3 4 $\alpha$ ,4 $\alpha$ = 13,3 4 $\alpha$ ,3 $\alpha$ = 4,0
4 $\beta$	1,9	m	
4 $\alpha$	3,4-3,6	dd	
6 $\alpha$	4,41	d	6 $\alpha$ ,6 $\beta$ = 16,4
6 $\beta$	3,81	d	6 $\beta$ ,6 $\alpha$ = 16,4
7	6,48	s	
10	6,82	s	
11 $\text{exo}$	1,8-2,0	m	
11 $\text{endo}$	2,18	ddd	11 $\text{endo}$ ,11 $\text{exo}$ = 12,2 11 $\text{endo}$ ,12 $\text{endo}$ = 9,1 11 $\text{endo}$ ,12 $\text{exo}$ = 4,3
12 $\text{exo}$	3,31	ddd	12 $\text{exo}$ ,12 $\text{endo}$ = 12,7 12 $\text{exo}$ ,11 $\text{exo}$ = 10,0 12 $\text{exo}$ ,11 $\text{endo}$ = 4,3
12 $\text{endo}$	2,91	ddd	12 $\text{endo}$ ,12 $\text{exo}$ = 12,7 12 $\text{endo}$ ,11 $\text{endo}$ = 9,1 12 $\text{endo}$ ,11 $\text{exo}$ = 6,2
O-Me	3,89	s	

El complejo sistema de los protones del puente 5,10b-etano fue clarificado con la realización de un COSY (figura 29). En este experimento se observa que los protones del metileno en C-12 aparecen a campos más bajos que los del metileno en C-11 debido al efecto de desapantallamiento al estar en  $\alpha$  respecto al nitrógeno.

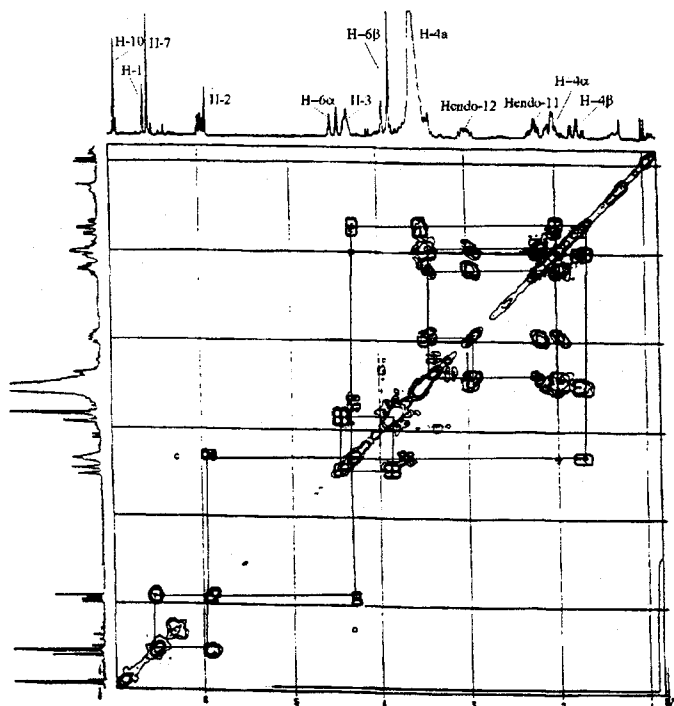


Figura 29. Experimento COSY de 8-O-demetilmaritidina

Para la interpretación del espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de 8-O-demetilmaritidina (figura 30, tabla 21), es de gran utilidad el trabajo de Frahm y colaboradores en el que se estudian otros alcaloides de Amarilidáceas emparentados con éste, entre ellos, los del grupo del (-)-1,2-dehidrocrinano (Frahm et al., 1985).

Las señales que se identifican son las siguientes:

- los dos carbonos olefinicos en C-1 y C-2 entre los dobles aromáticos se situarían en los 130,35 ppm y 127,68 ppm. Se ha observado, por los valores de desplazamiento de C-1 y C-2 para otros compuestos análogos, que éstos dependen de la estereoquímica de C-10b y de C-3, y además son influenciados por el sustituyente en C-3 (Frahm et al., 1985).
- el carbono alílico C-3 responde al cambio de metoxilación en **hemantamina** a hidroxilación en **8-O-demetilmaritidina**, con un apantallamiento de unos 10 ppm en su  $\delta$ . En todos los casos un sustituyente en posición axial produce un apantallamiento de 2 a 3 ppm. Previsiblemente, nuestro sustituyente está en posición axial, pues si comparamos con **bulbispermina**, alcaloide con el mismo núcleo de  $\alpha$ -crinano, y con hidroxilo en ecuatorial en la posición 3, el desplazamiento en esta posición aparece desapantallado en 2 ppm respecto a **8-O-demetilmaritidina**.



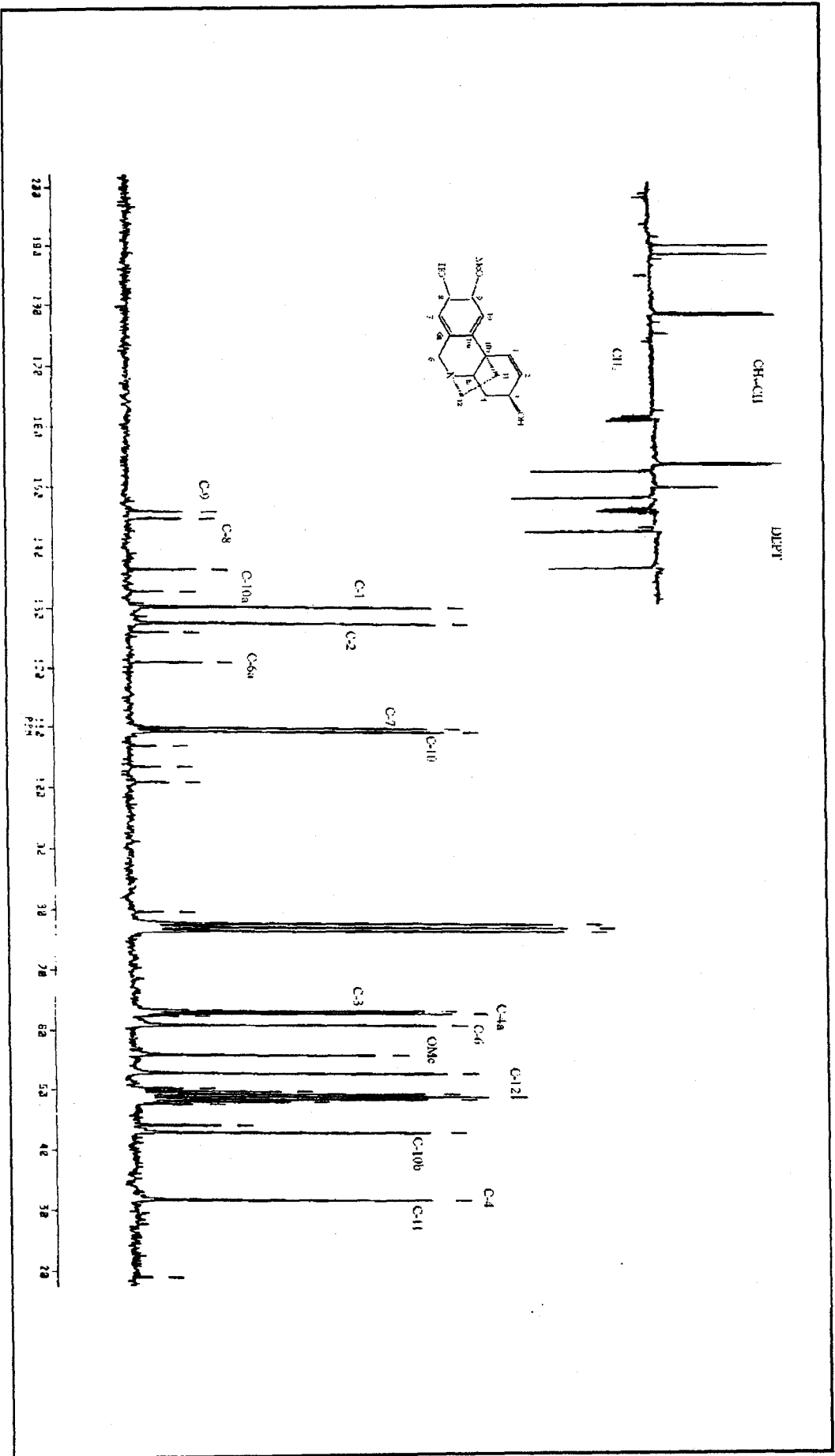


Figura 30. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de 8-O-demethylmaritidina (registrado en  $\text{CDCl}_3$ )

- El carbono C-4 experimenta el efecto inverso a C-3 respecto a la hidroxilación o la metoxilación, y las posiciones en ecuatorial o axial del sustituyente en ese carbono y en **8-O-demetilmaritidina** manifiesta un desapantallamiento mayor que en **hemantamina**.
- El carbono terciario C-4a, que en las uniones *trans* de los anillos B/C presenta un desplazamiento entre 61-63 ppm con un sustituyente en axial en la posición 3, tiene un apantallamiento de 5 ppm si hay epimerización en esa posición, y experimenta un apantallamiento similar con una hidroxilación en 6 $\alpha$ , de lo que se puede deducir, que la unión B/C es *trans* ya que C-3 tiene el sustituyente en posición axial y C-6 no tiene ningún sustituyente, lo cual coincide también con los resultados de  $^1\text{H-RMN}$ .
- El carbono C-6 tiene un desplazamiento acorde con la ausencia de sustitución en este carbono, ya que una hidroxilación desapantallaría del orden de 12 a 14 ppm. Por otra parte, se puede deducir que no hay sustitución en este carbono a partir de los datos del desplazamiento de C-4a y los de  $^1\text{H-RMN}$  de los protones en C-6.
- En cuanto a las señales del anillo aromático, la señal de C-6a, carbono cuaternario, se observa a 121,1 ppm, que concuerda sobre todo, con el hecho de la no-sustitución en C-7, lo mismo que para el caso de C-6. El carbono C-7 aparece también dentro de sus valores normales, 109,8 ppm, al igual que C-8, a 144,8 ppm, que corresponde a una sustitución por hidroxilo; C-10, igual que C-7, muestra doblete. Finalmente, el cuaternario C-10a, resuena a 136,5 ppm.
- El carbono C-10b, carbono terciario, presenta un desplazamiento  $\delta$  de 44,0 ppm, que es el valor normal cuando no hay hidroxilación en 11, ni epóxido en las posiciones del doble enlace 1,2, como ocurre en **flexinina** (Frahm et al., 1985).
- Los carbonos C-11 y C-12, a 42,8 y 52,8 ppm, respectivamente, tienen los valores que están de acuerdo con carbonos no sustituidos en esa posición.
- Finalmente, la señal correspondiente al carbono metoxílico se observa a  $\delta$  55,8, valor característico de los carbonos metoxílicos. No hay carbono metoxílico en el anillo A ni otros metoxilos en otras posiciones.

**Tabla 21.** Datos del espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de **8-O-demetilmaritidina** (registrado en  $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$  a 50,6 MHz)

C	$\delta$ (ppm)	multiplicidad
1	130,3	d
2	127,6	d
3	63,3	d
4	31,6	t
4a	62,8	d
6	60,9	t
6a	121,1	s
7	109,8	d
8	144,8	s
9	146,0	s
10	109,2	d
10a	136,5	s
10b	44,0	s
11	42,8	d
12	52,8	t
MeO	55,8	q

Para la interpretación del espectro de masas de **8-O-demetilmaritidina** (figura 31), que no había sido estudiado a fondo, han sido de gran ayuda los trabajos de Longevialle y colaboradores (Longevialle et al., 1973a y b), y especialmente el de Kihara y colaboradores, en el que se describe por primera vez tras su aislamiento (Kihara et al., 1987). En el espectro de masas de este alcaloide se observa el pico molecular a  $m/z = 273$ . La presencia del doble enlace de las posiciones 1,2 influencia el modo de fragmentación. Así, el modelo de fragmentación de este compuesto es marcadamente diferente del de otro compuesto análogo, pero 11-hidroxilado como es **hemantamina**. La ruta del proceso, incluyendo la pérdida del enlace 1,10b, es de gran importancia, pues incluye la ruptura de los enlaces 4a,10b y 3,4 está caracterizada por la presencia del doble enlace 1,2. Este es el mecanismo más importante que conduce a las subsiguientes fragmentaciones en **8-O-demetilmaritidina**.

Un hecho característico de la fragmentación de ésta molécula (figura 32) es la pérdida de un nitrógeno contenido en la mitad  $\text{C}_3\text{H}_3\text{N}$  (M-55), que puede tener lugar por la rotura de los enlaces 11/12, 10b/4a y 3/4, seguido de pérdida de  $\text{C}_3\text{H}_3\text{N}$ , dando lugar al ión radical conjugado de  $m/z = 218$  que puede perder el hidrógeno hidroxílico formándose el  $m/z = 217$ . Este modelo de fragmentación también es claramente diferente al postulado para **hemantamina**. Este ión puede perder  $\text{CH}_3\text{O}$  dando el fragmento  $m/z = 189$ , que, a su vez, por pérdida de un hidrógeno originará el pico  $m/z = 188$ . Por otra parte, la presencia de un hidroxilo en 3 permite la fragmentación que se deriva de la pérdida de CHO. Así, a partir del ión radical de  $m/z = 218$ , por pérdida de un ión formaldehído se forma el ión de  $m/z = 189$ , el cual puede perder un  $\text{CH}_3\text{O}$  dando el ión radical de  $m/z = 158$ , que por pérdida de un hidrógeno originará el de  $m/z = 157$ .

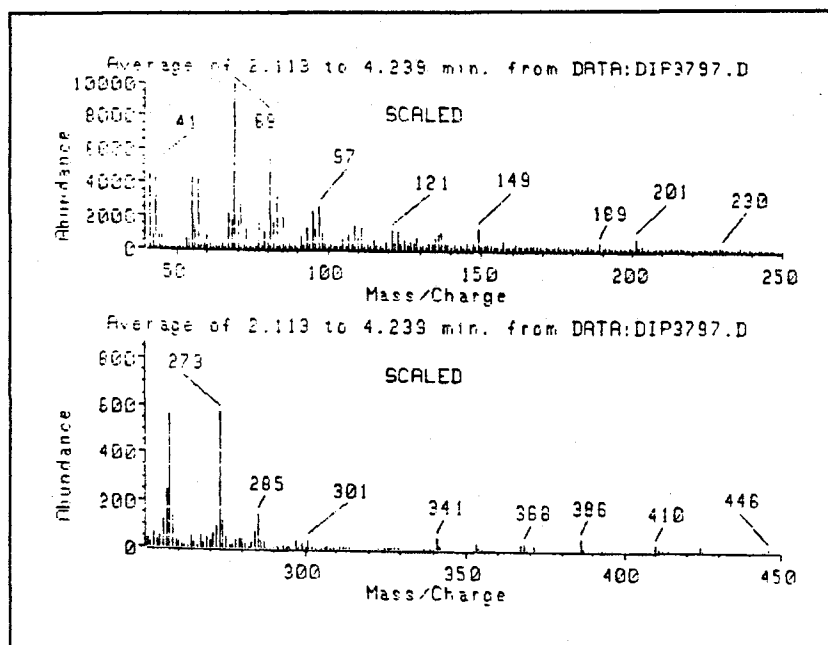


Figura 31. Espectro de Masas de 8-O-demethylmaritidina

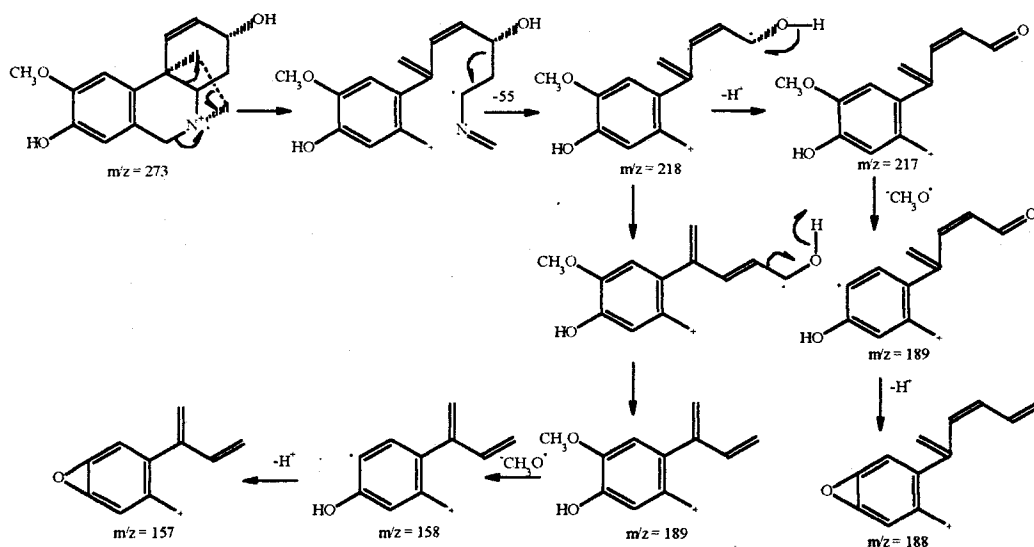


Figura 32. Fragmentaciones de masas en 8-O-demethylmaritidina

La pérdida del átomo de nitrógeno con dos carbonos y 4 ó 5 hidrógenos, constituye otro posible proceso de fragmentación observado en alcaloides con este núcleo. En el caso de **8-O-demethylmaritidina**, no obstante es poco significativo. A consecuencia de una rotura del enlace 4a,10b, seguida de reordenamiento de un hidrógeno de C-11, se abre una forma iminio a partir del ión molecular, el cual puede perder  $C_2H_4N$  para dar el ión  $m/z = 231$ .

La identificación como **8-O-demetilmaritidina** se ha verificado en base al dato físico del punto de fusión. Este dato, es de gran relevancia dado que la diferencia de valores entre ambos isómeros es del orden de 100°C, siendo superior el del isómero en 9.

**8-O-demetilmaritidina (4)** - cristales color azafrán; Masa exacta  $m/z$  273,1360 calculado para  $C_{16}H_{19}NO_3$ , 273,1365. Pf: 139-141°.  $[\alpha]_D^{+28}$  (EtOH, c 0,53). IR  $\nu_{max}$   $cm^{-1}$  (KBr): 3421, 1507, 1260. MS  $m/z$  (int. rel.): 273 (5), 257 (5), 230 (2), 218 (<1), 217 (1), 215 (1), 214 (<1), 189 (4), 188 (<1), 158 (1), 157 (5). Los datos espectroscópicos de  $^1H$  y  $^{13}C$ -RMN se muestran en las tablas 20 y 21.

### 3.1.5. Trisferidina

El quinto alcaloide aislado de *Narcissus primigenius* se ha identificado como **trisferidina** en base al espectro de  $^1H$ -RMN, ya que el producto obtenido no ha permitido realizar un análisis más completo. De todas maneras, la estructura es suficientemente sencilla como para permitir su confirmación. Este alcaloide, derivado de una fenantridina, tiene como nombre sistemático el de **8,9-Metilendioxfenantridina** y parece estar relacionado biosintéticamente con el grupo de la **licorina**. Este hecho ha sido puesto de manifiesto por Suau y colaboradores quienes postulan una relación entre **trisferidina** e **ismina**, compuesto este último aislado en *Lapiedra martinezii* (Suau et al., 1990a). Este sería el segundo aislamiento de este alcaloide en el género *Narcissus* después del realizado en *N. asturiensis* (Sellés, 1993).

El espectro de  $^1H$ -RMN de **trisferidina** (figura 33, tabla 22) presenta las siguientes señales:

- un singulete muy desapantallado a  $\delta$  9,13 ppm, asignable al protón imínico en 6,
- dos dobletes a  $\delta$  8,41 y 8,15 ppm, debidos a los protones de las posiciones 1 y 4 respectivamente,
- dos singuletes a 7,93 y 7,37 ppm, que corresponderían a los protones H-10 y H-7, y debido a su multiplicidad guardan una relación *para* en un sistema bencénico tetrasustituido (la distinción entre estas señales se ha hecho por homología con las equivalentes determinadas para la **trisferidina** aislada en *N. asturiensis*, donde se pudieron corroborar las asignaciones con experimentos bidimensionales de RMN),
- dos dobles dobletes a 7,65 y 7,73, respectivamente, asignables a H-2 y H-3 y, por último, un singulete a  $\delta$  6,22 ppm, asignable a los dos protones del anillo dioxol.

**Trisferidina (5)** - sólido amorfo. AE encontrado: C, 75,41; H, 4,11; N, 6,29.  $C_{14}H_{19}NO_2$  requiere: C, 75,30; H, 4,07; N, 6,29%. Pf: 138°. Los datos espectroscópicos de  $^1H$  se muestran en la tabla 22.

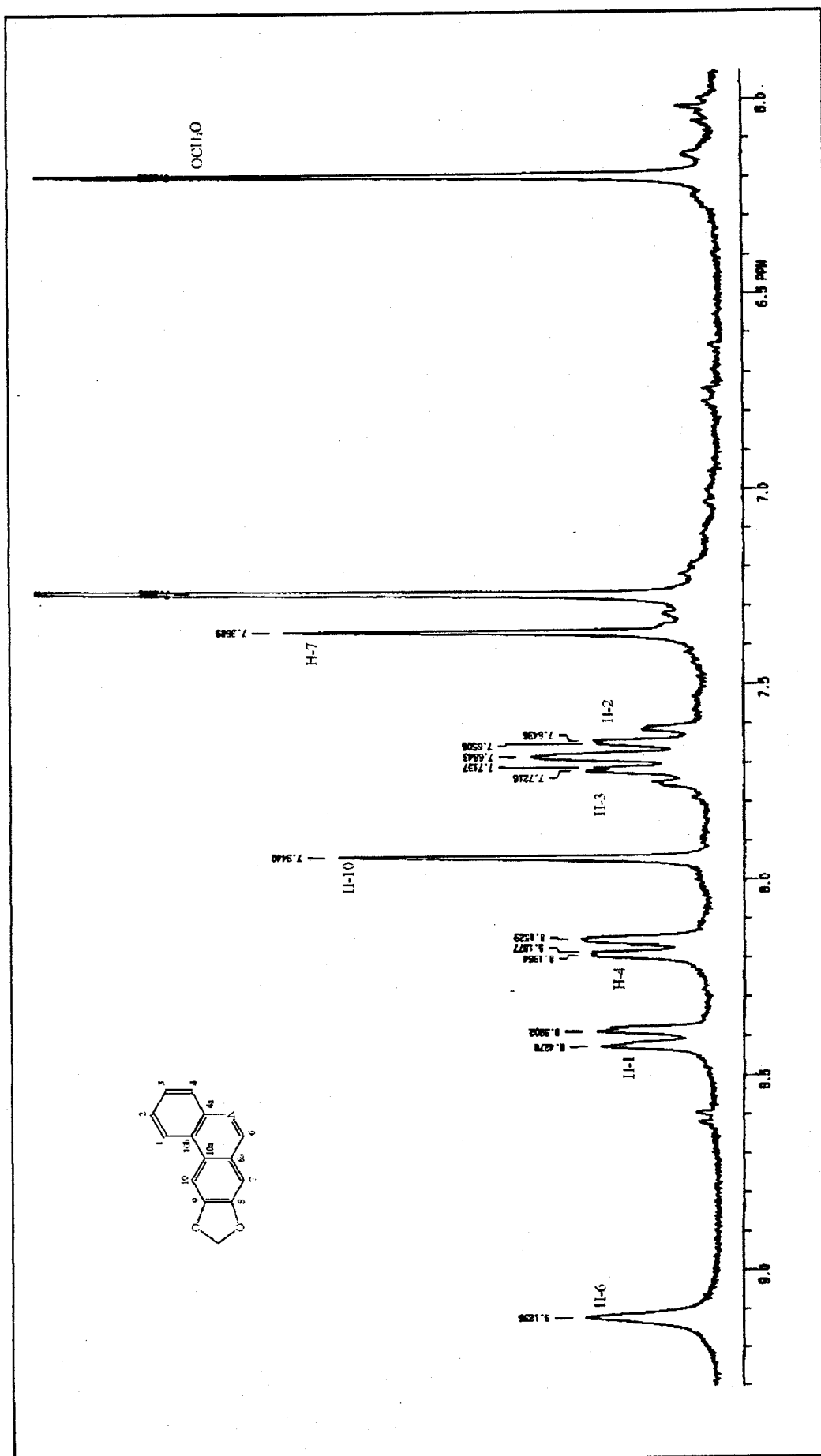


Figura 33. Espectro de  $^1\text{H-NMR}$  de trisferidina (registrado en  $\text{CDCl}_3$ )

**Tabla 22.** Datos del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de trisferidina  
(registrado en  $\text{CDCl}_3$ , a 200 MHz)

H	$\delta$ (ppm)	multiplicidad	J (Hz)
1	8,41	dd	(8, 1,6)
2	7,65	ddd	(8, 8, 1,3)
3	7,73	s	
4	8,15	dd	(8, 1,3)
6	9,13	s	
7	7,37	s	
10	7,93	s	
$\text{OCH}_2\text{O}$	6,22	s	

### 3.2. ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE LOS ALCALOIDES DE *NARCISSUS NEVADENSIS*

Los alcaloides aislados esta especie están representados en la figura 34 y son los siguientes: **licorenina (6)**, **6-O-metil-licorenina (7)**, **licorina (8)**, **2-epi-licorina (9)**, **narcisidina (10)**, **galantina (11)** y **sternbergina (12)**. De ellos, los dos primeros derivan por reordenamiento de un alcaloide que no ha sido aislado en la planta, la **norpluviína**. El resto pertenece al tipo general de la **licorina**.

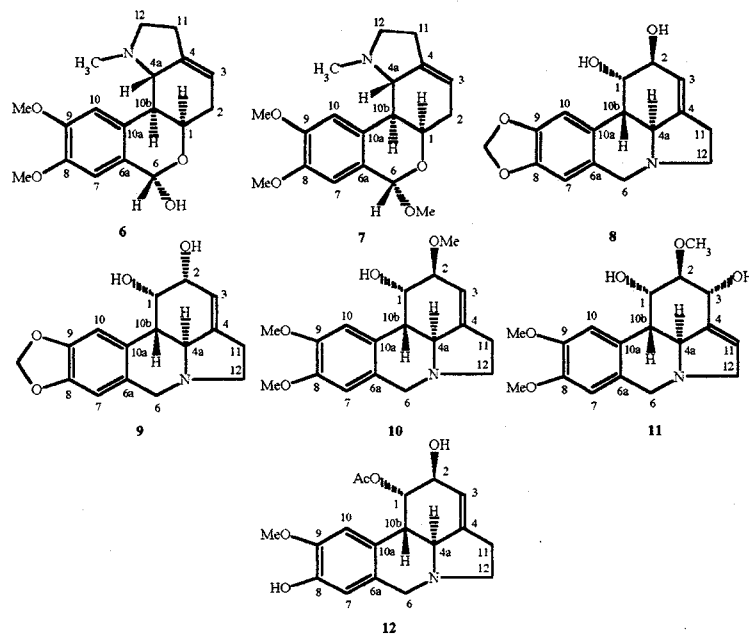


Figura 34. Alcaloides aislados de *Narcissus nevadensis*

#### 3.2.1. Licorenina

Este alcaloide, frecuente en las Amarilidáceas, es del mismo tipo estructural que **homolicorina (1)** y **8-O-demetilhomolicorina (2)** y su elucidación se ha realizado en base a los datos de RMN. La realización del espectro de IR ha permitido comprobar la ausencia de lactona en la posición 6, a diferencia de 1 y 2.

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de **licorenina** (figura 35, tabla 23) posee dos singuletes característicos a  $\delta$  6,99 y 6,87, y que corresponden a los protones aromáticos H-7 y H-10, respectivamente, y otros dos que se observan a 3,88 y 2,08 ppm. El primero de ellos integra 6 protones, asignables a dos grupos metoxilo unidos a un anillo aromático, mientras que el otro singulete, a campos más altos, integra 3 protones que corresponden a un grupo N-metilo. A diferencia del alcaloide lactónico del cual proviene, la **homolicorina (1)**, el protón H-7 de **licorenina** no experimenta el efecto de desapantallamiento debido al carbonilo lactónico, y pasa



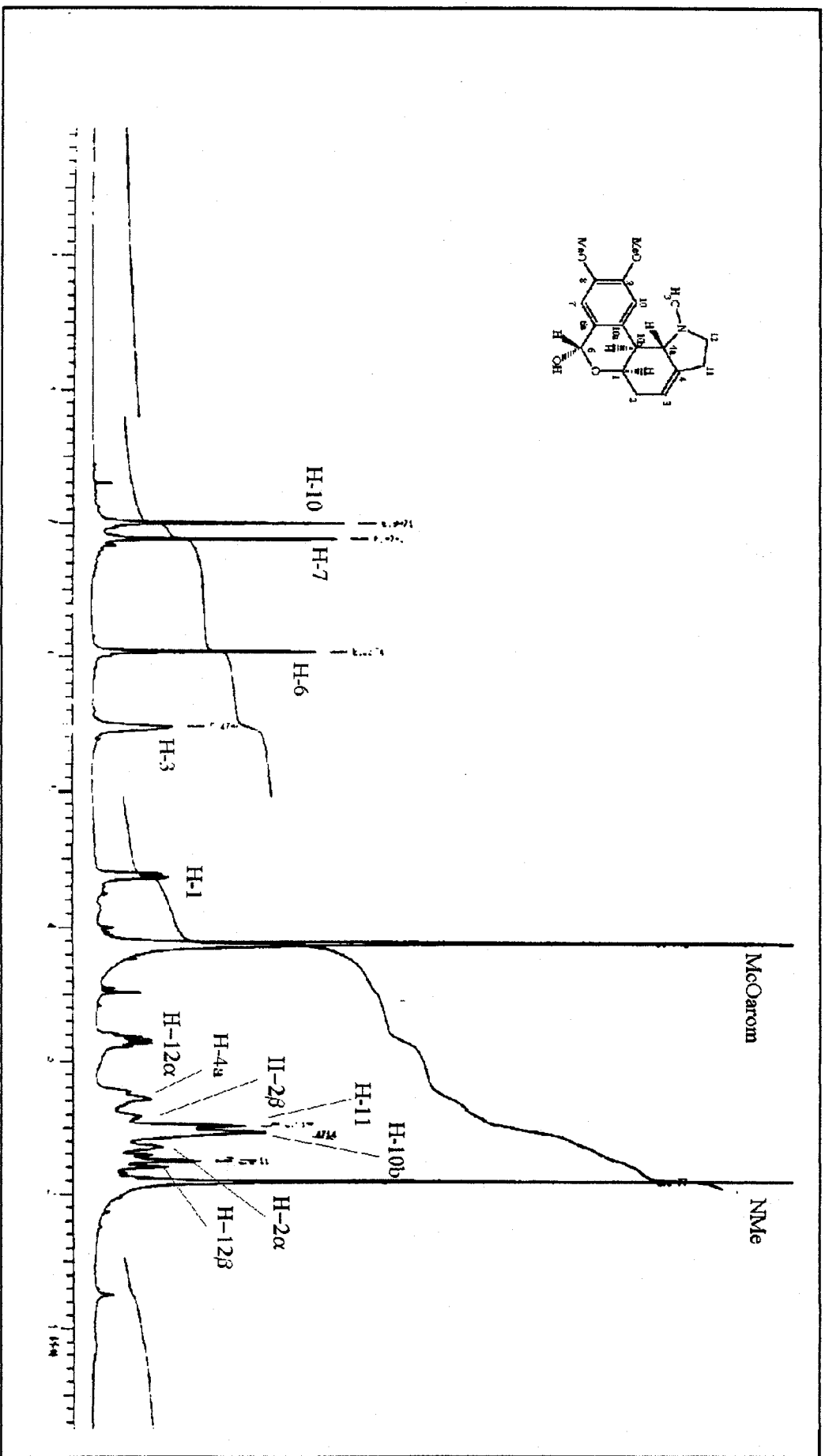


Figura 35. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN de licorenina (registrado en CDCl<sub>3</sub>).

a ocupar una posición a campos más altos (Hawksworth et al., 1965). Por su parte, el desplazamiento del H-10 permanece invariable respecto al alcaloide cabeza de serie.

Otras señales son:

- un singulete a  $\delta$  6,05 ppm, asignable al protón de la posición 6,
- un singulete ancho a  $\delta$  5,47 ppm, correspondiente al protón olefínico de 3,
- un doblete ancho correspondiente al H-1 a  $\delta$  4,35 ppm, y que, a consecuencia del acoplamiento de baja magnitud con H-10b, evidencia una relación *cis* entre los anillos B y C, al igual que sucede con 1 y 2.
- Los protones H-2 aparecen como un multiplete en una zona de difícil resolución, en la que coinciden con los H-11.
- El protón metínico H-4a aparece como doblete ancho a causa de su acoplamiento con H-10b. La magnitud de este acoplamiento sólo puede explicarse en base a una relación *trans* diaxial entre ambos protones.
- Finalmente, los protones H-12 $\alpha$  y H-12 $\beta$  aparecen como doblete de dobletes y doblete de dobletes, respectivamente. La inversión configuracional del nitrógeno está restringida, pues si el grupo N-metilo estuviese en posición  $\alpha$  habría impedimento estérico con H-10.

**Tabla 23.** Datos del espectro de <sup>1</sup>H-RMN de licorenina (registrado en CDCl<sub>3</sub> a 200 MHz)

H	$\delta$ (ppm)	multiplicidad	J (Hz)
1	4,35	brd	1,10b = 5,3
2 $\alpha$	2,35	m	
2 $\beta$	2,60	m	
3	5,47	brs	
4a	2,78	brd	4a,10b = 10,0
6	6,05	s	
7	6,87	s	
10	6,99	s	
10b	2,49	dd	10b,4a = 10,0 10b,1 = 5,3
11	2,40-2,60	m	
12 $\alpha$	3,15	ddd	12 $\alpha$ ,12 $\beta$ = 9,0 12 $\alpha$ ,11 $\beta$ = 6,5 12 $\alpha$ ,11 $\alpha$ = 3,3
12 $\beta$	2,26	dd	12 $\beta$ ,11 $\alpha$ = 18,0 12 $\beta$ ,12 $\alpha$ = 9,0
N-Me	2,08	s	
O-Me	3,88	s	

La zona de más difícil resolución, la comprendida entre los metoxilos aromáticos y el grupo N-metilo, ha podido ser resuelta con la realización de un experimento 2D-COSY (figura 36).

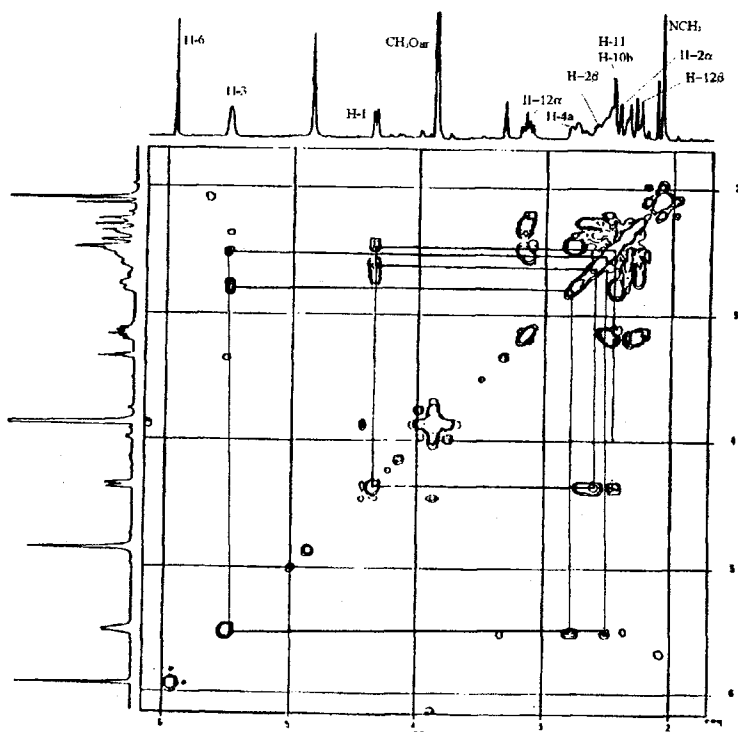


Figura 36. Experimento COSY de licorenina realizado en  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$

En cuanto al espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (figura 37, tabla 24), es consistente con una estructura de la serie **homolicorina** sin el grupo carbonilo (Jeffs et al., 1985). Las señales más características serían: tres cuartetos a  $\delta$  55,9, 55,7 y 43,7 ppm para los grupos metoxilo y grupo N-metilo, respectivamente, y tres carbonos metínicos a 115,9, 112,8 y 109,8 ppm asignables al carbono olefínico C-3 y a los carbonos aromáticos C-10 y C-7. Por comparación con **homolicorina** (tabla 15), se observa la ausencia de la señal de la lactona y, por el contrario, la aparición de una nueva señal a  $\delta$  91,7 ppm que sólo puede ser atribuída a un cambio de sustitución en la posición 6, de una lactona por un hemiacetal (la stereoquímica de esta posición se había verificado previamente con un experimento 2D-NOE, en el cual se comprobó la ausencia de este efecto entre H-1 y H-6). En otra zona del espectro, aparecen tres carbonos metínicos a 67,3, 66,5 y 44,0 ppm para C-4a, C-1 y C-10b, tres carbonos metilénicos a 56,7, 31,5 y 27,8 ppm para C-12, C-2 y C-11, y cinco singuletes a campos bajos para los carbonos cuaternarios C-8, C-9, C-4, C-6a y C-10a, respectivamente.

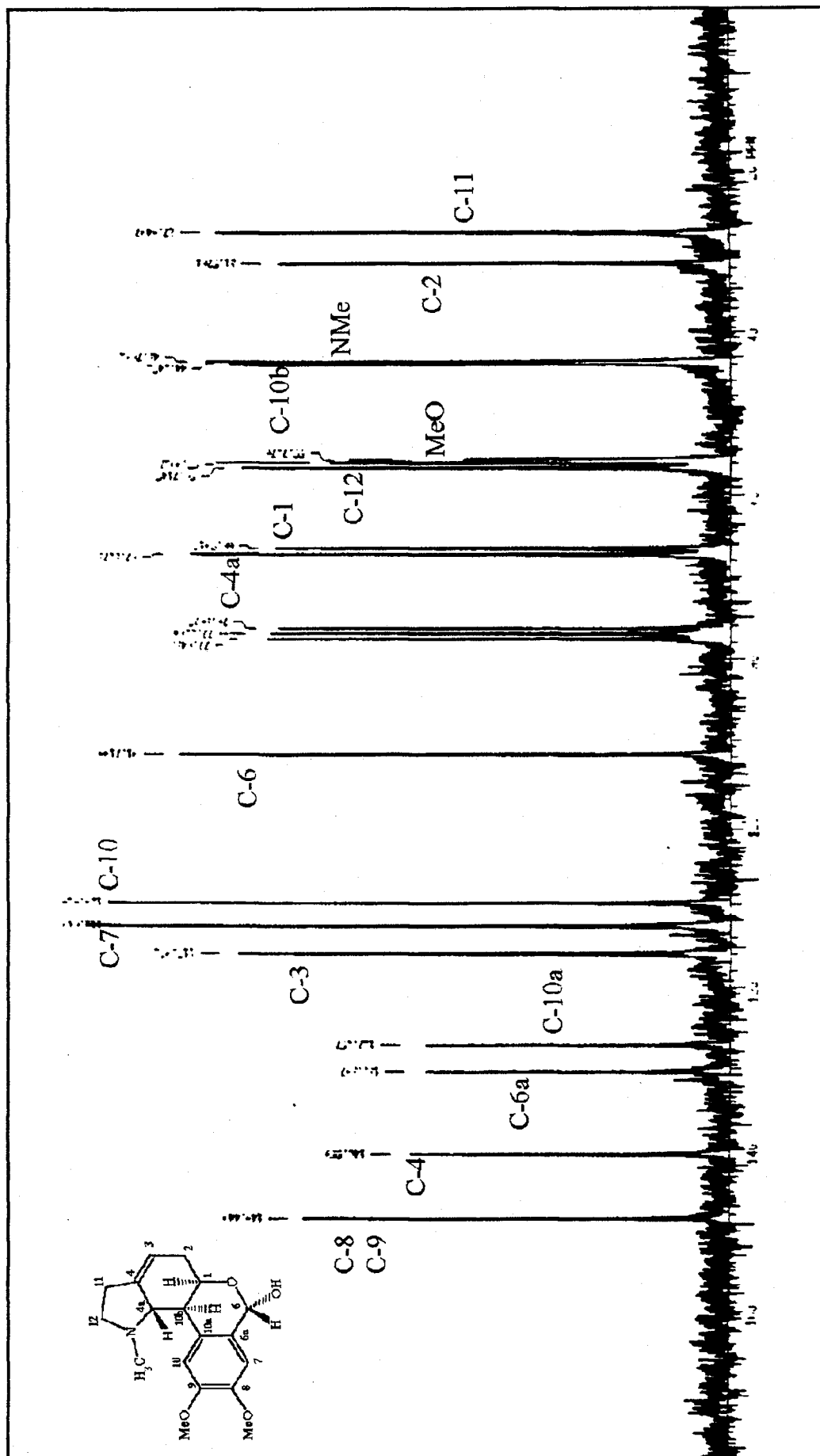


Figura 37. Espectro de <sup>13</sup>C-RMN de licorenina (registrado en CDCl<sub>3</sub>)

**Tabla 24.** Datos del espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de licorenina  
(registrado en  $\text{CDCl}_3$ , a 50,6 MHz)

C	$\delta$ (ppm)	multiplicidad
1	66,5	d
2	31,5	t
3	115,9	d
4	140,5	s
4a	67,3	d
6	91,7	s
6a	130,3	s
7	112,8	d
8	149,4	s
9	149,4	s
10	109,8	d
10a	127,0	s
10b	44,0	d
11	27,8	t
12	56,7	t
MeOAr	55,9	q
MeN	43,7	q

El espectro de masas de **licorenina** es muy similar al de los demás alcaloides de tipo **homolicorina**. Su descripción se hará conjuntamente con la del derivado **6-O-metil-licorenina**, en el apartado siguiente.

**Licorenina (6)** - finas acículas incoloras; AE encontrado: C, 63,78; H, 6,88; N, 4,11.  $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{NO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  requiere: C, 64,44; H, 6,92; N, 4,18%. Pf: 198°.  $[\alpha]_{\text{D}} +169,4^\circ$  (MeOH, c 0,52). IR  $\nu_{\text{maz}}$   $\text{cm}^{-1}$  (KBr): 1528,5, 1503,5, 1216,6, 1121,0, 1031,4. MS m/z (int. rel.): 317 (<1), 208 (<1), 191 (1), 109 (100), 108 (32), 94 (6), 82 (6). Los datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN se muestran en las tablas 23 y 24.

### 3.2.2. 6-O-Metil-licorenina

Este alcaloide es un derivado del anterior, que ha sido aislado hasta la fecha en muy pocas ocasiones. Recientemente se ha aislado y caracterizado completamente en *Narcissus muñozii-garmendiae*. En contra de la opinión de que los alcaloides 6-metoxiderivados podrían ser artefactos de extracción, Numata y colaboradores detectaron una función biológica del tipo repelente de insectos para este compuesto (Numata et al., 1983). Ello hace pensar que este alcaloide es un producto completamente natural, ya que los artefactos no suelen tener funciones biológicas y sobre todo funciones relacionadas con la defensa para las plantas productoras. (Codina et al., 1993).

La realización del espectro de IR de este alcaloide no representa una contribución importante a su elucidación, ya que las señales que muestra son bastante inespecíficas (figura 38) y como mucho, muestra la presencia de los estiramientos de doble enlace a  $1608,0\text{ cm}^{-1}$ , y otras debidas a la vibración de enlaces C-O-C en la zona en torno a  $1000\text{ cm}^{-1}$ .

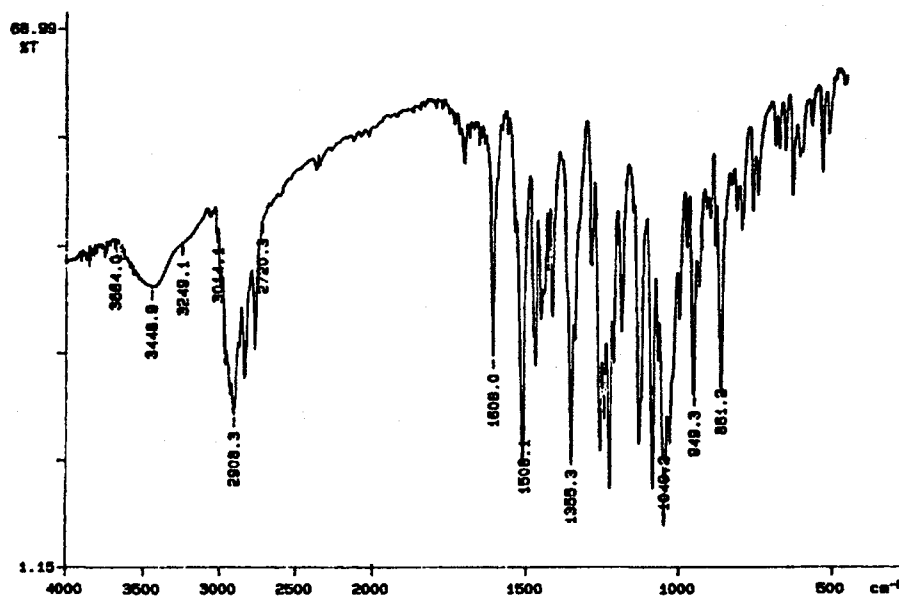


Figura 38. Espectro de IR de 6-O-metil-licorenina

El espectro de  $^1\text{H-RMN}$  (figura 39, tabla 25) de este alcaloide es del todo similar al de **licorenina** (6) (figura 35). La diferencia más visible es la presencia de un singulete a  $\delta$  5,54 ppm, que corresponde al protón de la mitad carbinol, el cual aparece más desapantallado que en el caso del protón análogo de **licorenina**, debido al cambio de sustituyente en esa posición. El resto de desplazamientos están en consonancia con una estructura con una relación *cis* entre los anillos B y C, de forma similar a como ocurría en **licorenina**. Así, la conformación más estable de la molécula es la que aparece representada en la figura 40.

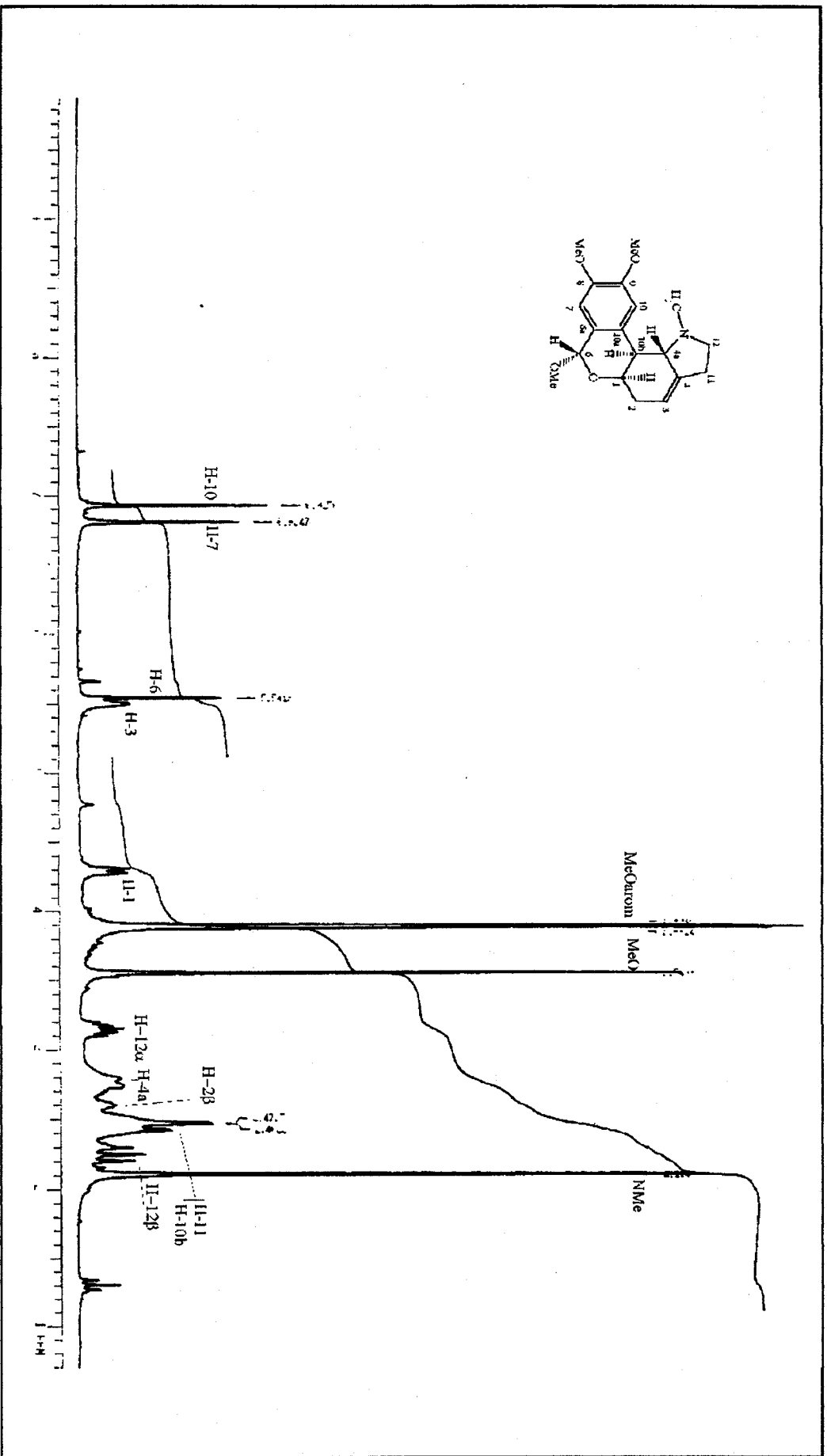
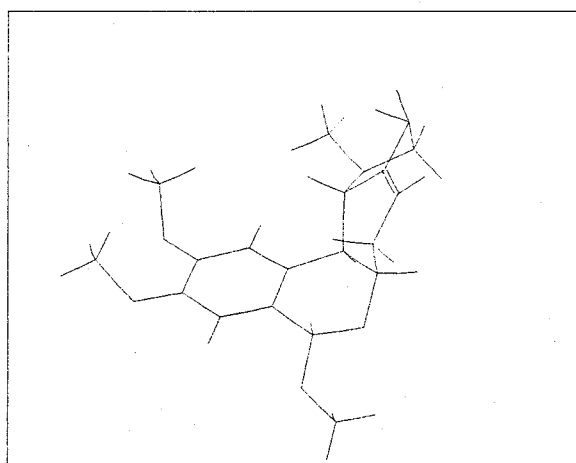


Figura 39. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN de 6-O-metil-licorenia (registrado en CDCl<sub>3</sub>)

Tabla 25. Datos del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de 6-O-metil-licorenina (registrado en  $\text{CDCl}_3$  a 200 MHz)

H	$\delta$ (ppm)	multiplicidad	J (Hz)
1	4,29	brd	1,10b = 5,8
2 $\alpha$	2,35	m	
2 $\beta$	2,65	m	
3	5,50	m	
4a	2,78	brd	4a,10b = 9,3
6 $\beta$	5,54	s	
7	6,80	s	
10	6,93	s	
10b	2,49	dd	10b,4a = 9,3 10b,1 = 5,8
11	2,40-2,60	m	
12 $\alpha$	3,15	ddd	12 $\alpha$ ,12 $\beta$ = 9,2 12 $\alpha$ ,11 $\beta$ = 5,3 12 $\alpha$ ,11 $\alpha$ = 4,1
12 $\beta$	2,26	dd	12 $\beta$ ,11 $\alpha$ = 18,0 12 $\beta$ ,12 $\alpha$ = 9,2
N-Me	2,10	s	
O-Me	3,89	s	
	3,88		
	3,55		



Alchemy II  
TRIPOS Associates  
St. Louis, Mo.

Figura 40. Conformación más estable de 6-O-metil-licorenina

Para confirmar la asignación de las dos señales pertenecientes al anillo aromático se ha llevado a cabo una experiencia 2D-NOE (figura 41), que muestra un claro efecto NOE entre la señal a  $\delta$  6,93 y la debida al grupo N-metilo con  $\delta$  2,10, de tal manera que la primera



correspondería a H-10, mientras que el otro singulete aromático a  $\delta$  6,80, correspondería a H-7. Esta última asignación se confirma por el efecto mostrado con esa señal y la debida a H-6 $\beta$ , con  $\delta$  5,54 ppm. La técnica 2D-NOE, además, ha permitido confirmar la estereoquímica del protón metínico en C-6, observándose proximidad espacial entre H-1 y el grupo metoxilo en C-6, pero no efecto NOE entre el protón H-6 y el H-1, lo cual induce a pensar que el metoxilo se encuentra en la cara  $\alpha$  de la molécula. La conformación más estable de la molécula, representada en la figura 40, confirma la veracidad de estas observaciones.

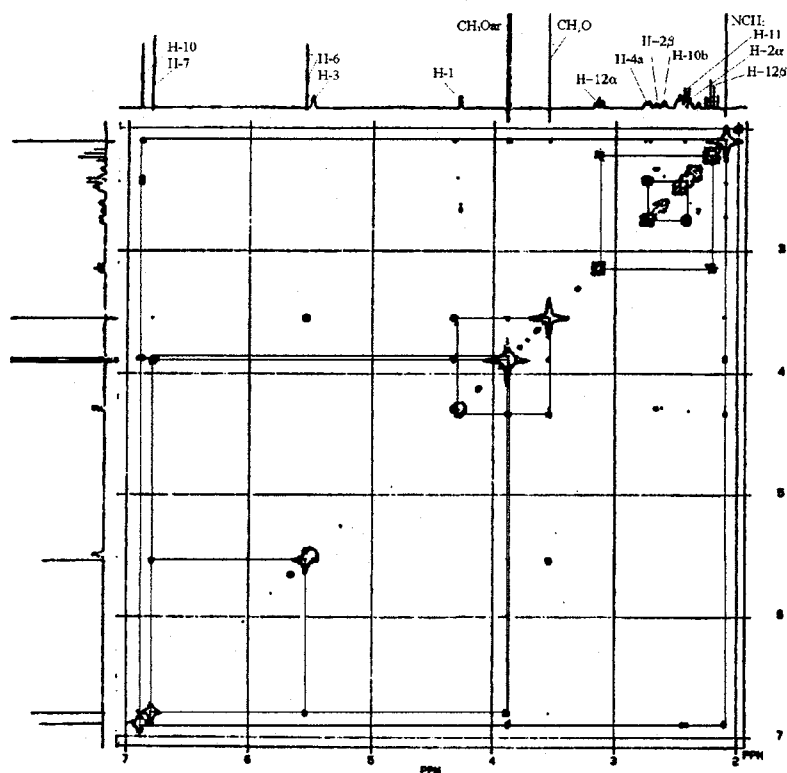


Figura 41. Experimento 2D-NOE de 6-O-metil-licorenia

La realización del espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del producto (figura 42, tabla 26) ha permitido verificar el cambio de hidroxilación por metoxilación en 6-O-metil-licorenia, lo cual representa que el carbono metínico C-6 aparece a  $\delta$  98,2 ppm, que corresponde a un desapantallamiento de unos 6 ppm respecto al carbono de la misma posición de licorenia (6).

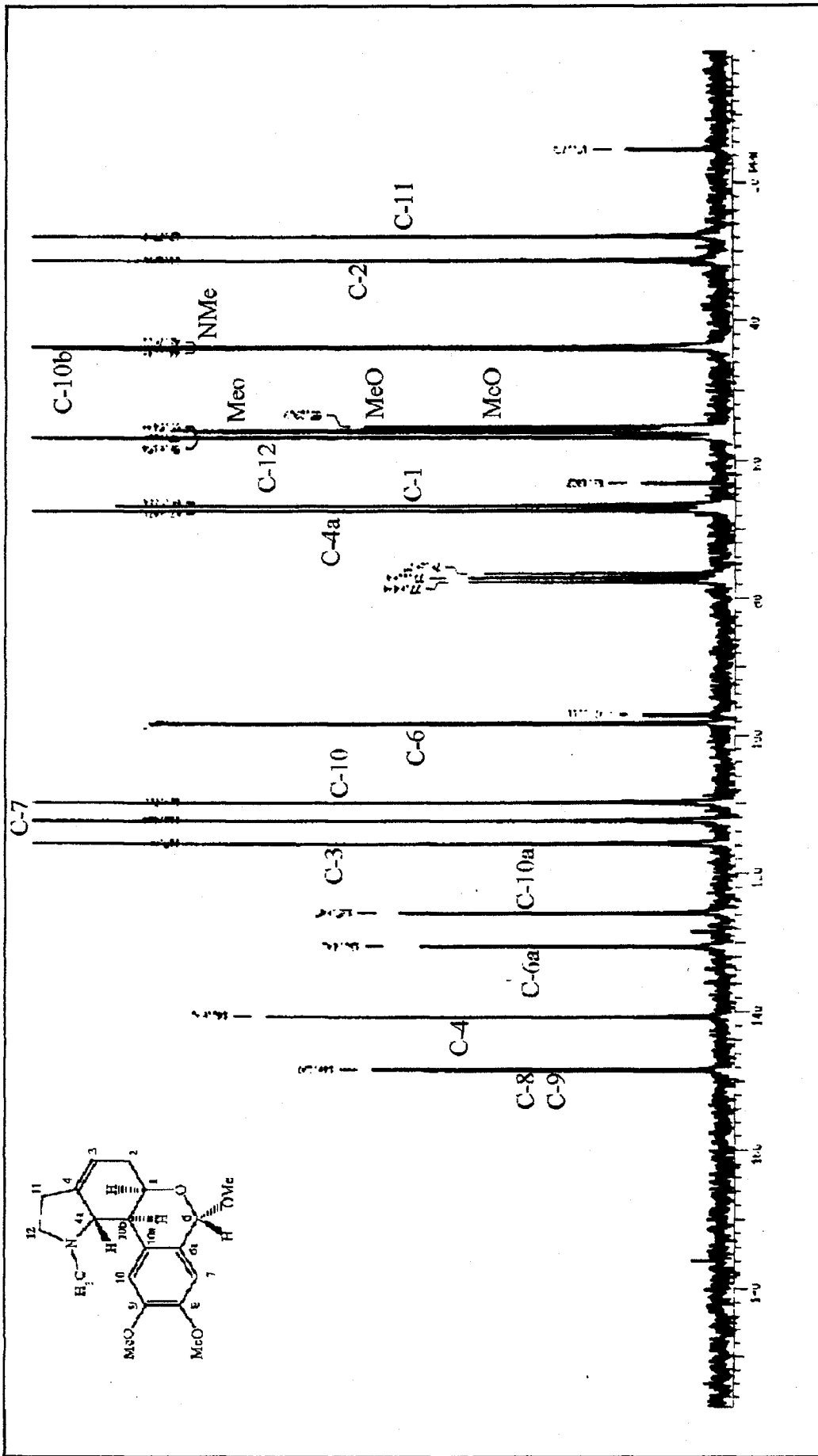
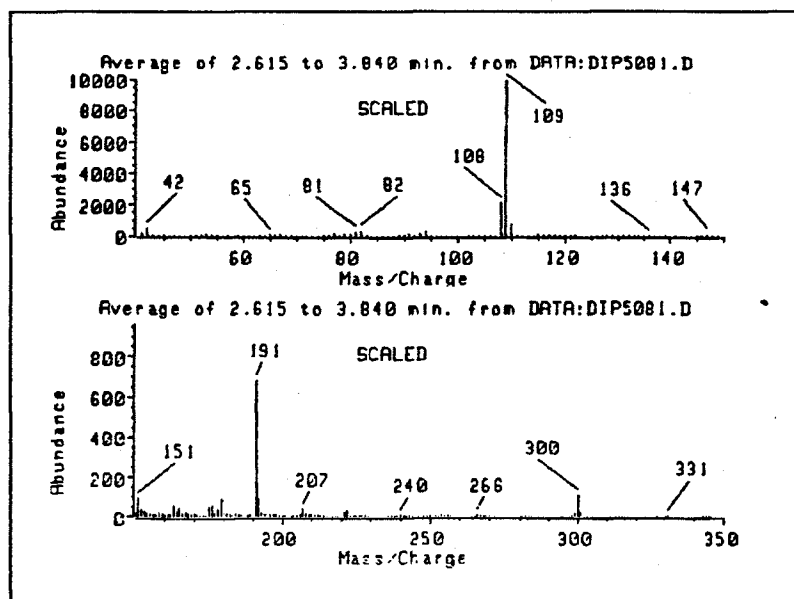


Figura 42. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de 6-O-metil-licorenina (registrado en  $\text{CDCl}_3$ )

**Tabla 26.** Datos comparativos de los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN de **licorenina (1)** y **6-O-metil-licorenina (2)** (registrados en  $\text{CDCl}_3$  a 50,6 MHz)

C	1	2	multiplicidad
1	66,5	66,6	d
2	31,6	31,3	t
3	115,9	115,7	d
4	140,5	140,7	s
4a	67,8	67,3	d
6	91,7	98,2	d
6a	130,8	130,5	s
7	109,8	109,7	d
8	148,4	148,3	s
9	148,4	148,3	s
10	112,6	112,4	d
10a	127,0	125,6	s
10b	44,0	44,0	d
11	27,8	27,8	t
12	56,7	56,6	t
MeOAr	55,9; 55,7	55,8; 55,5	q
MeO	-----	55,1	q
MeN	43,7	43,8	q

Por lo que respecta al espectro de masas, sigue el mismo modelo que **homolicorina (1)**, **8-O-demetilhomolicorina (2)** y **licorenina (6)** ya descritos anteriormente. En este caso, el ión molecular está a  $m/z = 331$  y el pico base a  $m/z = 109$ , lo cual supone seguir el proceso general retro-Diels Alder de los otros alcaloides del tipo **homolicorina**. El espectro de masas y las fragmentaciones propuestas se muestran en las figuras 43 y 44.



**Figura 43.** Espectro de Masas de **6-O-metil-licorenina**

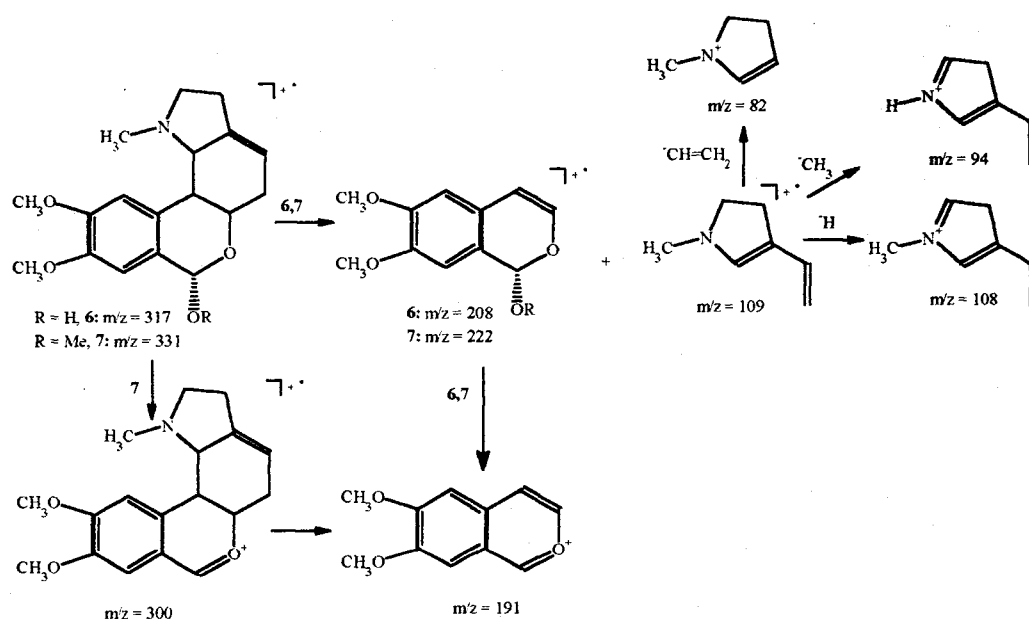


Figura 44. Fragmentaciones más representativas de licorenina y 6-O-metil-licorenina

**6-O-Metil-licorenina (7)** - finas acículas incoloras; masa exacta  $m/z$  331,1789 calculado para  $C_{19}H_{25}NO_4$  331,1784. Pf: 125°.  $[\alpha]_D +164,1^\circ$  ( $CHCl_3$ ; c 0,53). IR  $\nu_{max}$   $cm^{-1}$  (KBr): 1608, 1250, 1080. MS  $m/z$  (int. rel.): 331 (<1), 300 (1), 222 (<1), 191 (6), 109 (100), 108 (21), 94 (3), 82 (3). Los datos espectroscópicos de  $^1H$  y  $^{13}C$ -RMN se muestran en las tablas 25 y 26.

### 3.2.3. Licorina

Este alcaloide, aislado también de *Narcissus nevadensis*, es el alcaloide más frecuente y ampliamente distribuido entre las Amarilidáceas. Fue el primer alcaloide aislado en esta familia, y actualmente se conocen multitud de acciones biológicas para este compuesto, tanto en su forma base como en forma conjugada con azúcares o fosfatos. Da nombre a un grupo genérico de alcaloides del tipo Amaryllidaceae, los derivados de un acoplamiento fenólico *orto-para'*, o "grupo de la licorina".

Todos los alcaloides aislados de esta especie, incluidos los descritos anteriormente licorenina y 6-O-metil-licorenina, pertenecen al mismo tipo biosintético de la licorina, pero los posteriores, 2-epilicorina, galantina, narcisidina y sternbergina, además corresponden al mismo tipo químico, razón por la que comentan con un poco más de detalle las características espectroscópicas de licorina, y en la descripción de los siguientes alcaloides se hace hincapié en los aspectos más relevantes que los diferencian de licorina.

El espectro de IR presenta como únicos rasgos destacables la presencia de las señales correspondientes a un estiramiento de hidroxilo ( $3332\text{ cm}^{-1}$ ), así como a la vibración de los enlaces C-O-C ( $1233\text{ cm}^{-1}$ ) y O-CH<sub>2</sub>-O ( $939\text{ cm}^{-1}$ ).

Frente a la inespecificidad de las señales del IR, los espectros de RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN) ofrecen algo más de información. Así, el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de licorina (figura 45, tabla 27) presenta las siguientes señales:

- dos singuletes en la zona aromática a  $\delta$  6,92 y 6,62 ppm correspondientes a los protones H-10 y H-7 del anillo A, que no acoplan entre sí,
- un singulete a  $\delta$  5,97 ppm, que integra dos protones y que corresponden al grupo metilendioxo del anillo dioxol,
- un singulete ancho a  $\delta$  5,67 ppm, asignable al protón vinílico H-3,
- un singulete ancho a  $\delta$  4,59 ppm, correspondiente al H-1,
- dos dobletes a  $\delta$  4,22 y 3,62 ppm para los protones  $\beta$  y  $\alpha$ , respectivamente, de la posición 6, adyacente al átomo de nitrógeno y al núcleo aromático. La asignación del protón  $\beta$  a campos más bajos está en concordancia con su disposición *cis* con respecto al par de electrones libres del átomo de nitrógeno. Se trata de un sistema AB simple, con una constante de acoplamiento ( $J_{\text{gem}} = 14$  Hz) típica de los protones geminales.
- El protón H-2 aparece como un multiplete solapado con la señal de H-6 $\beta$ .
- Un multiplete a  $\delta$  3,40 ppm, asignado al protón  $\beta$  de la posición 12. El protón  $\alpha$  se encuentra a campos más altos, concretamente a 2,48 ppm como doblete de dobletes. En este caso, los protones de la posición 12 formarían un sistema AX simple (Evidente et al., 1983a).
- Un doblete ancho a  $\delta$  2,97 y otro a 2,70 ppm ( $J = 10,5$  Hz), asignables a H-4a y H-10b, respectivamente, formando un sistema AM. La disposición *trans* entre los anillos B y C del sistema tetracíclico se pone de manifiesto por la magnitud de la constante de acoplamiento (Kotera et al., 1966). Además, en esta zona alifática puede observarse el multiplete correspondiente a los protones de la posición 11.

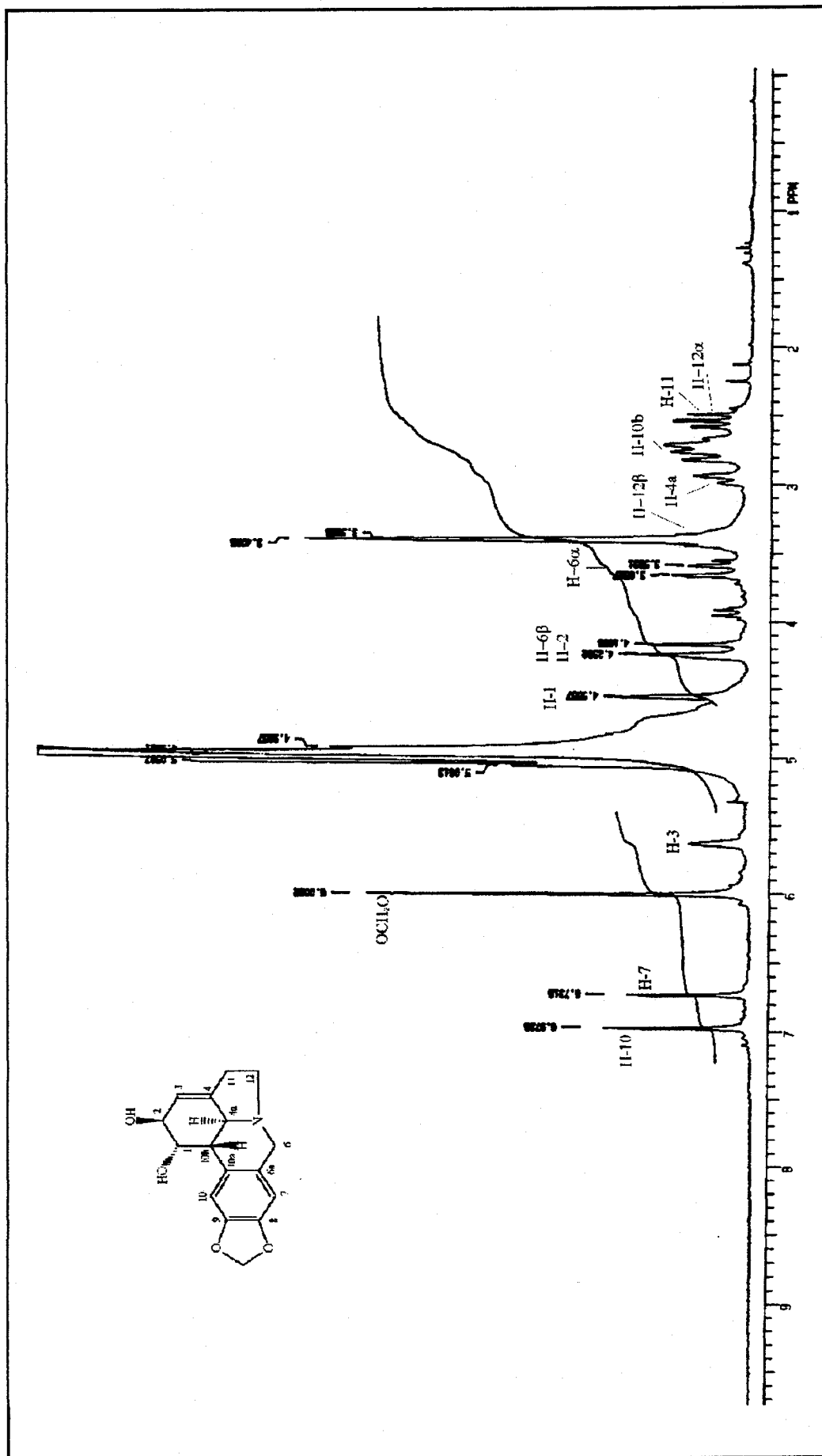
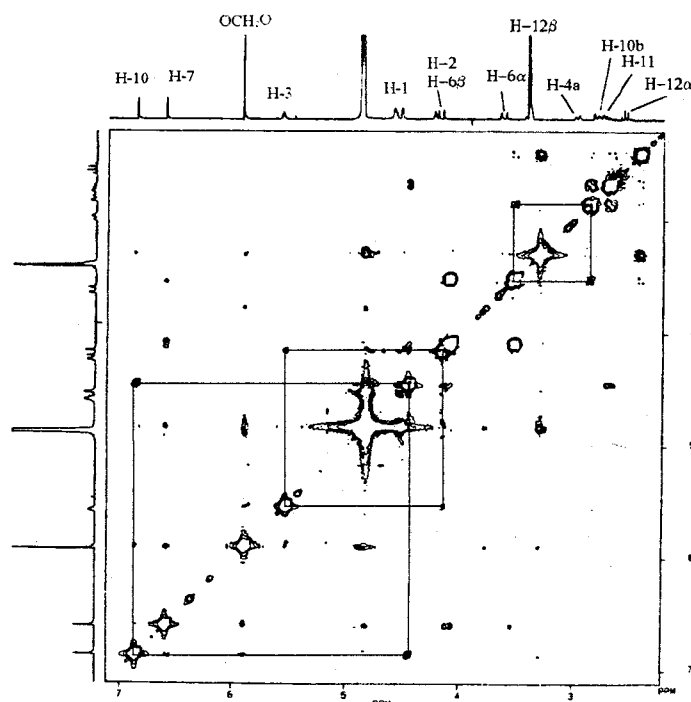


Figura 45. Espectro de  $^1\text{H-NMR}$  de licorina (registrado en  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

**Tabla 27.** Datos del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de licorina  
(registrado en  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 200 MHz)

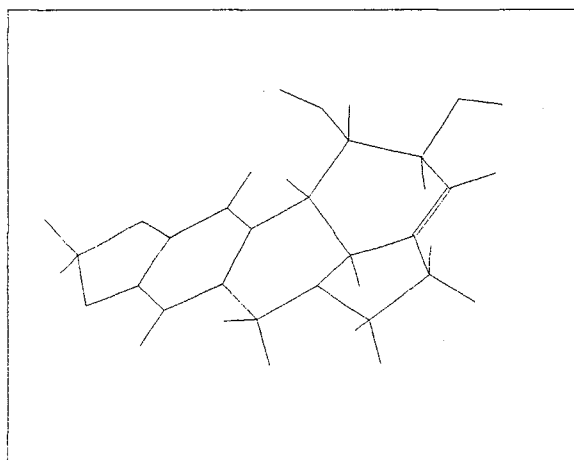
H	$\delta$ (ppm)	multiplicidad	J (Hz)
1	4,59	s	
2	4,22	d	(solapado con $6\beta$ )
3	5,67	brs	
4a	2,97	brd	$4a,10b = 10,3$
$6\alpha$	3,62	d	$6\alpha,6\beta = 14$
$6\beta$	4,22	d	$6\beta,6\alpha = 14$
7	6,62	s	
10	6,92	s	
10b	2,70	brd	$10b,4a = 10,3$
$11\alpha$ y $\beta$	2,40-2,60	m	
$12\alpha$	2,48	dd	$12\alpha,12\beta = 10$
$12\beta$	3,40	m	
$\text{OCH}_2\text{O}$	5,97	s	

La verificación de algunas asignaciones se ha podido realizar mediante un experimento 2D-NOE (figura 46). Así, se observa un claro efecto entre las señales a  $\delta$  6,92 y la de 4,59 ppm, correspondiendo esta última al protón H-1. En cambio, no se observó efecto NOE al irradiar la señal a  $\delta$  6,62 ppm. Por ello el singulete a  $\delta$  6,92 ppm se asigna al protón aromático H-10 y la señal a  $\delta$  6,62 ppm al protón H-7.



**Figura 46.** Experimento 2D-NOE de licorina realizado en  $\text{CD}_3\text{OD}$

Una confirmación ulterior de la estructura de la **licorina** viene dada a través del cálculo de la conformación más estable de la molécula. En esta conformación (figura 47) se puede apreciar datos como la proximidad espacial entre H-10 y H-1, H-6 $\alpha$  y H-4a, H-3 y H-2, así como la disposición en *trans* entre los anillos B y C.



 **Alchemy II**  
TRIPOS Associates  
St. Louis, Mo.

**Figura 47.** Conformación más estable de licorina

El espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de **licorina** (figura 48, tabla 28) y otros alcaloides del mismo tipo es bien conocido y sirve de comparación en el resto de alcaloides, todos ellos correspondientes al mismo esqueleto del licorano.

Las señales que presenta son las siguientes:

- a campos más bajos: cinco señales de baja intensidad, discriminadas en la experiencia DEPT como los carbonos cuaternarios del anillo aromático y el carbono cuaternario del doble enlace. Los carbonos correspondientes al anillo aromático se presentan a  $\delta$  146,5, 146,0, 128,5 y 127,8, y corresponden, respectivamente, a los carbonos C-8, C-9, C-6a y C-10a. Estos desplazamientos varían en función de los sustituyentes en C-8 y C-9, como se verá en los alcaloides que se describen posteriormente. Así, el carbono olefínico y cuaternario C-4 se presenta a 141,9 ppm. A continuación, se observan las señales de los carbonos metínicos. La señal a  $\delta$  117,5 ppm se asigna al carbono olefínico C-3 y está sujeta a variación en los alcaloides derivados de **narcisidina**, en los cuales el doble enlace no se encuentra entre 3 y 4, sino entre 4 y 11. Los dobletes a 106,7 y 104,5 ppm se asignan a los carbonos aromáticos C-7 y C-10. Por último, se encuentra la señal a 100,5 ppm, correspondiente al carbono metilénico del grupo metilendioxo.



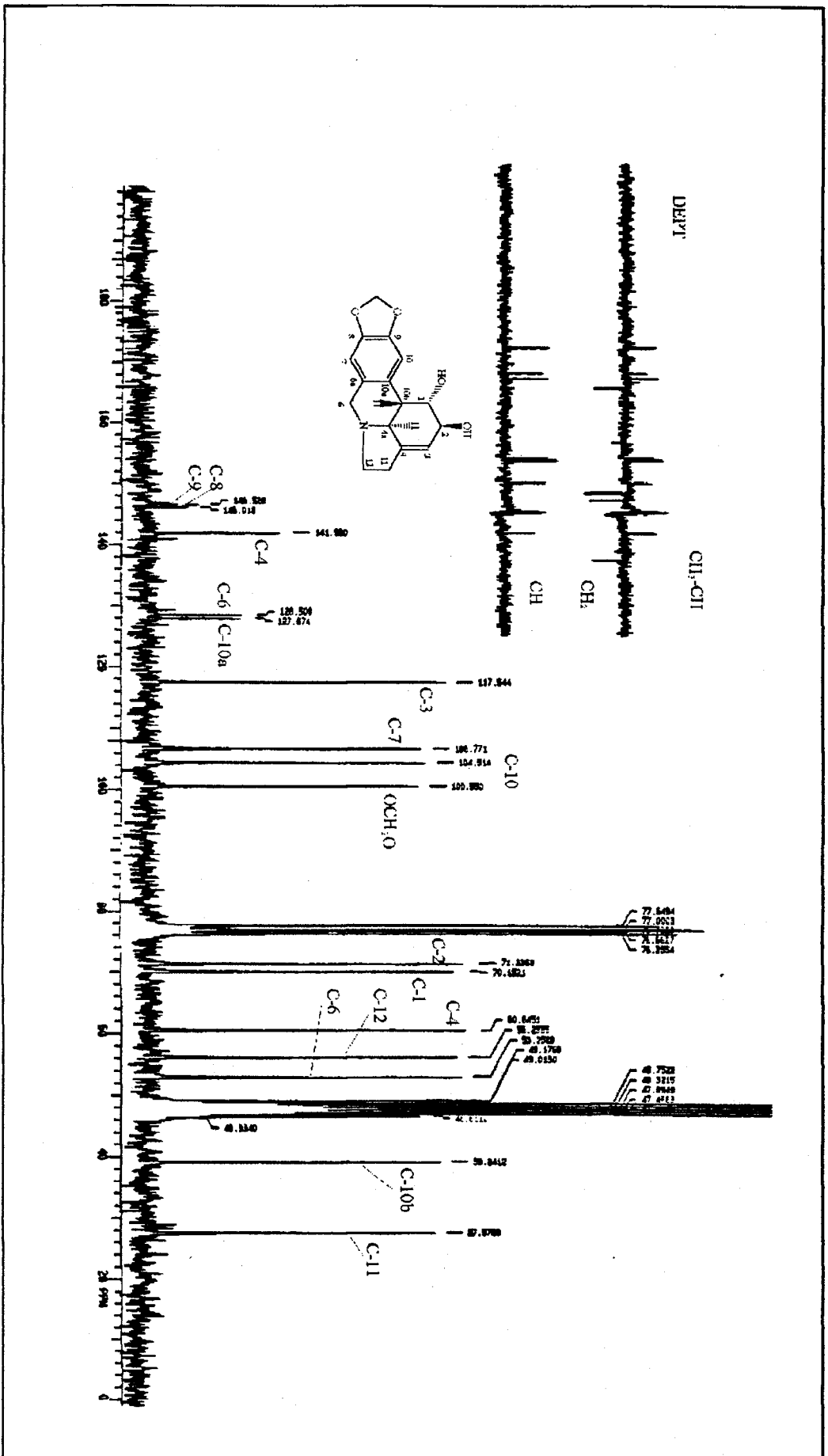


Figura 48. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de Licorina (registrado en  $\text{CDCl}_3$ - $\text{CD}_3\text{OD}$ )

- a campos altos: mediante la experiencia DEPT se distinguen los carbonos metilénicos C-12, C-6 y C-11, los cuales aparecen a  $\delta$  56,2, 53,0 y 27,6 ppm, respectivamente. Las señales restantes corresponderían, las más desapantalladas, a  $\delta$  71,3 y 70,1 ppm, a los carbonos C-2 y C-1 a consecuencia del efecto de los respectivos grupos hidroxilo, y los dos dobletes a  $\delta$  60,6 y 39,2 ppm, a los carbonos C-4a y C-10b. Las señales de los carbonos C-1 y C-2 están sujetas a un pequeño desapantallamiento del orden de 1 ppm para el caso del epímero en 2, que se comentará posteriormente.

**Tabla 28.** Datos del espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de licorina  
(registrado en  $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$  a 50,6 MHz)

C	$\delta$ (ppm)	multiplicidad
1	70,1	d
2	71,3	t
3	117,5	d
4	141,9	s
4a	60,6	d
6	53,0	t
6a	128,5	s
7	106,7	d
8	146,5	s
9	146,0	s
10	104,5	d
10a	127,8	s
10b	39,2	d
11	27,6	t
12	56,2	t
$\text{OCH}_2\text{O}$	100,5	t

En cuanto al espectro de masas de licorina (figuras 49 y 50), presenta un ión molecular relativamente intenso a  $m/z = 287$ . El pico base se observa a 226, aunque es también importante el de  $m/z = 227$ . Estos fragmentos se originan por rotura del anillo C por un proceso tipo retro-Diels Alder, con pérdida subsiguiente de un hidrógeno radical lo que llevaría al fragmento  $m/z = 226$ , más estable. El fragmento restante sería un etilenglicol de  $m/z = 60$ . Otro fragmento importante, es el de  $m/z = 269$ , que representa la pérdida de agua del ión molecular.

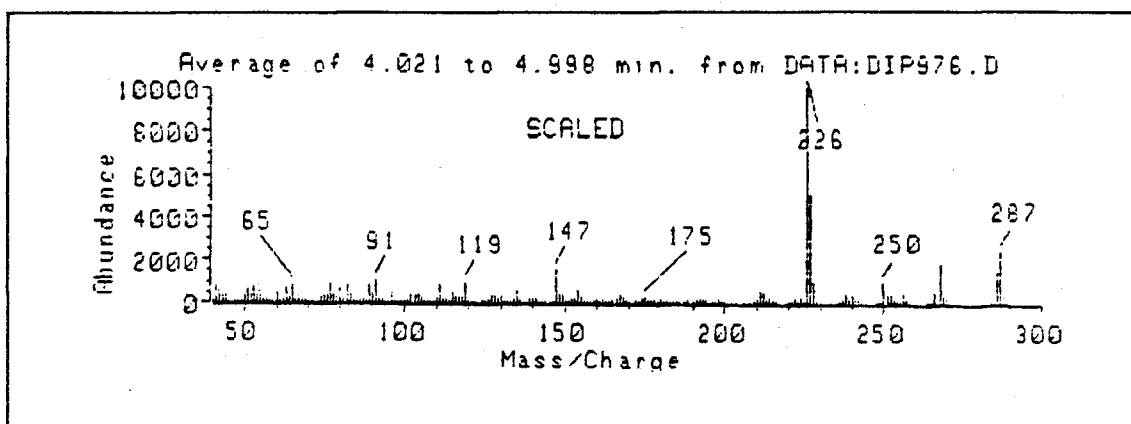


Figura 49. Espectro de masas de licorina

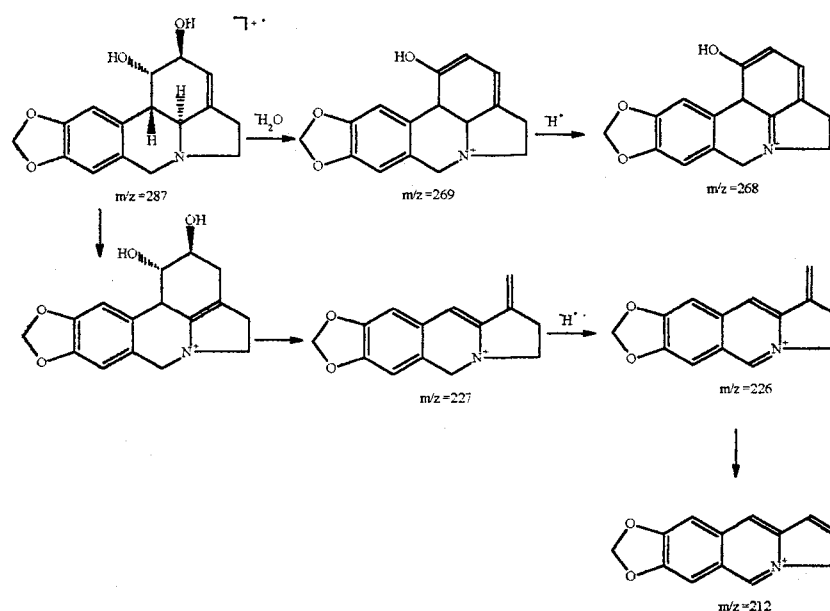


Figura 50. Fragmentaciones de masas de licorina

**Licorina (8)** - finas acículas incoloras; AE encontrado: C, 66,85; H, 5,91; N, 4,43.  $C_{16}H_{17}NO_4$  requiere: C, 66,77; H, 5,95; N, 4,76%. Pf: 256°.  $[\alpha]_D -83,11^\circ$  (EtOH, c 0,48). IR  $\nu_{max} \text{ cm}^{-1}$  (KBr): 3332, 1500, 1233, 939. MS m/z (int. rel.): 287 (24), 269 (4), 268 (18), 227 (51), 226 (100), 212 (4). Los datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN se muestran en las tablas 27 y 28.

### 3.2.4. 2-Epilicorina

Este alcaloide, correspondiente al tipo de la licorina, e idéntico al anterior salvo en la configuración del carbono 2, presenta, como era de esperar, una gran similitud en todos los datos espectroscópicos con los de licorina, presentando únicamente diferencias puntuales que se expondrán a continuación.

La identificación de este compuesto como 2-epilicorina se debe a la interpretación de los datos del análisis de RMN. El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN es prácticamente idéntico al homólogo de licorina, como se puede apreciar en la tabla comparativa (tabla 29). Únicamente se advierten ligeras variaciones en torno a 0,1-0,2 ppm en los protones más directamente afectados por la epimerización en 2, es decir, H-1, H-2 y H-3. Además, se ha realizado, la experiencia COSY (figura 51), que ha confirmado las asignaciones y todos los acoplamientos, y el experimento NOE (figura 53).

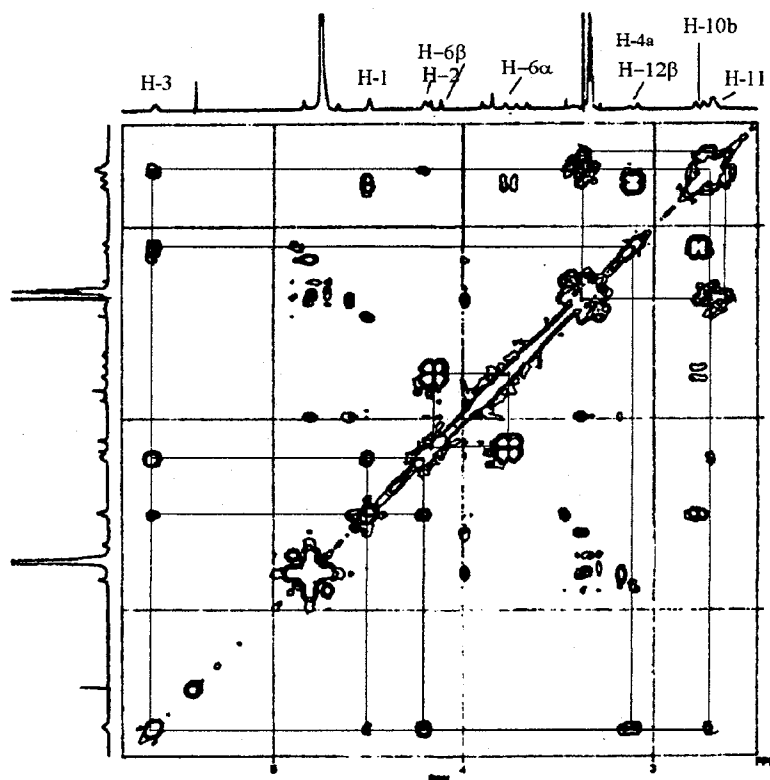
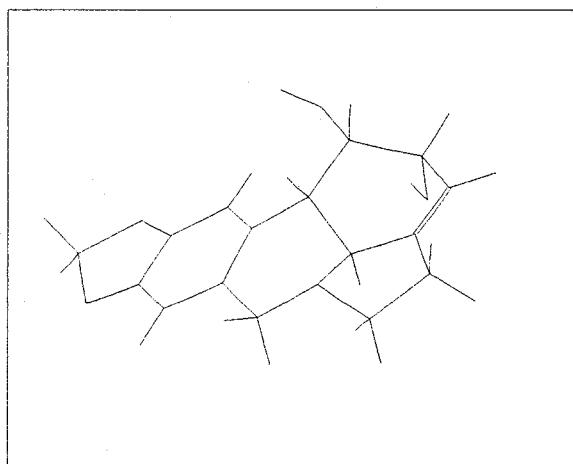


Figura 51. Experimento COSY en 2-epilicorina

**Tabla 29.** Datos comparativos del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de licorina (1) y 2-epilicorina (2) (registrados en  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 200 MHz)

H	1 [ $\delta$ , multiplicidad, J (Hz)]	2 [ $\delta$ , multiplicidad, J (Hz)]
1	4,59 s	4,49 s
2	4,22 d, (solapado con 6 $\beta$ )	4,15 d, (solapado con 6 $\beta$ )
3	5,67 brs	5,61 brs
4a	2,97 brd, 4a,10b = 10,3	2,97 brd, 4a,10b = 10,3
6 $\alpha$	3,62 d, 6 $\alpha$ ,6 $\beta$ = 14	3,62 d, 6 $\alpha$ ,6 $\beta$ = 14
6 $\beta$	4,22 d, 6 $\beta$ ,6 $\alpha$ = 14	4,15 d, 6 $\beta$ , 6 $\alpha$ = 14
7	6,62 s	6,61 s
10	6,92 s	6,88 s
10b	2,70 brd, 10b,4a = 10,3	2,70 brd, 10b,4a = 10,3
11 $\alpha$ y $\beta$	2,40-2,60 m	zona 2,60 m
12 $\alpha$	2,48 dd, 12 $\alpha$ ,12 $\beta$ = 10	2,48 dd, 12 $\alpha$ , 12 $\beta$ = 10,0
12 $\beta$	3,40 m	3,40 m
OCH <sub>2</sub> O	5,97 s	5,91 s

Las diferencias con **licorina** son muy pequeñas, y básicamente se pueden apreciar en el experimento NOE (figura 53). Por medio de este espectro se observa un claro efecto entre la señal a  $\delta$  6,88 ppm y la de 4,49, que permite distinguir entre los protones aromáticos, ya que la primera señal correspondería a H-10 y la segunda a H-1, aunque para definir la estereoquímica del carbono 2 lo que realmente ha sido útil es el efecto NOE observado entre H-2 ( $\delta$  4,15 ppm) y H-10b (2,90 ppm) que únicamente es posible si ambos protones se encuentran en la misma cara de la molécula. El modelo molecular de mínima energía permite apreciar más claramente esta coplanaridad así como las asignaciones de los protones aromáticos (figura 52).




**Alchemy II**  
 TRIPOS Associates  
 St. Louis, Mo.

**Figura 52.** Conformación más estable en 2-epilicorina

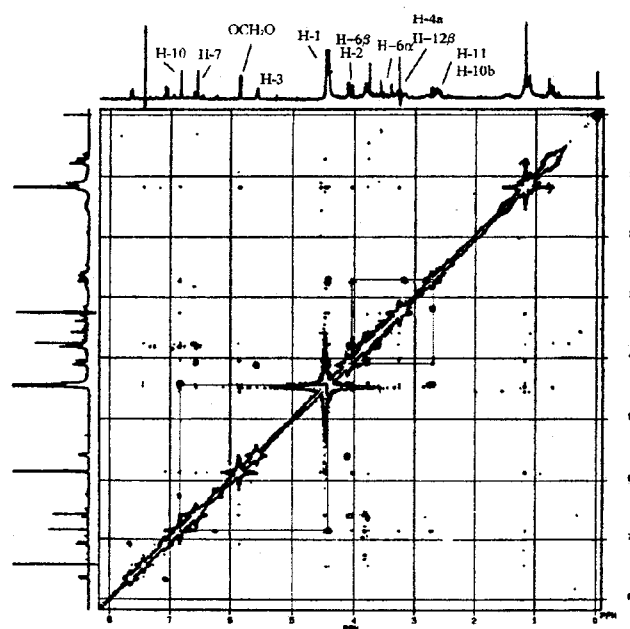


Figura 53. Experimento 2D-NOE de 2-epilicorina

El espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de 2-epilicorina (figura 54, tabla 30) no ha presentado ninguna diferencia significativa respecto a licorina.

Tabla 30. Datos comparativos de los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN de licorina (1) y 2-epi-licorina (2) (registrados en  $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$  a 50,6 MHz)

C	1	2	multiplicidad
1	70,1	71,1	d
2	71,3	72,4	t
3	117,5	119,3	d
4	141,9	nd	s
4a	60,6	61,9	d
6	53,0	54,4	t
6a	128,5	nd	s
7	106,7	107,9	d
8	146,5	nd	s
9	146,0	nd	s
10	104,5	105,8	d
10a	127,8	nd	s
10b	39,2	40,2	d
11	27,6	29,2	t
12	56,2	56,8	t
$\text{OCH}_2\text{O}$	100,5	101,9	t

nd = no detectado (algunos carbonos cuaternarios de 2-epilicorina)

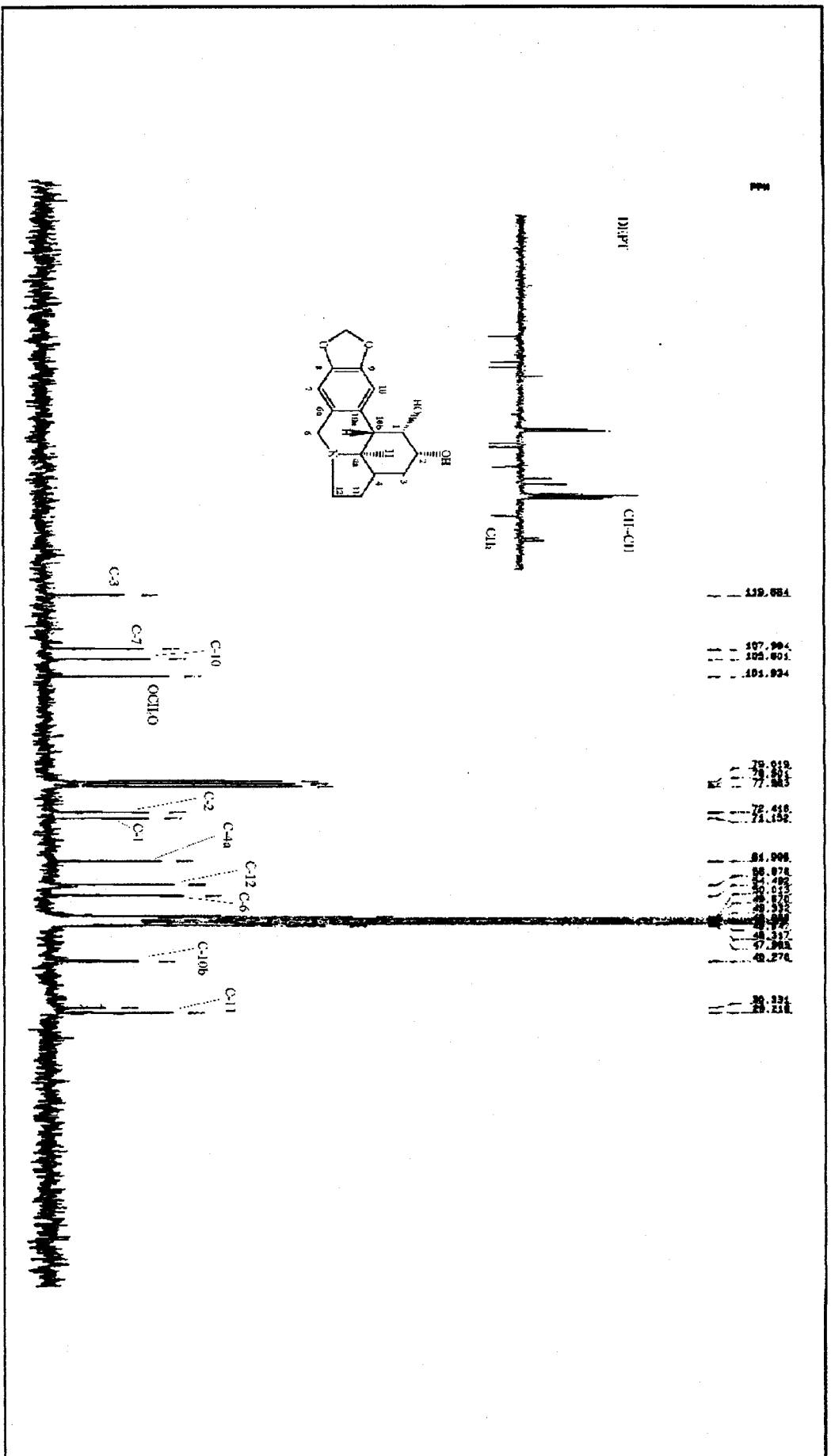


Figura 54. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de 2-epilicorina (registrado en  $\text{CDCl}_3$ - $\text{CD}_3\text{OD}$ )

Con los datos espectroscópicos de RMN se ha asignado tentativamente a este producto aislado de *Narcissus nevadensis* la estructura de **2-epilicorina**, que concuerda casi en su totalidad en todos los datos espectroscópicos con **licorina**, salvo en el pequeño detalle mencionado en el experimento 2D-NOE, pero por contra difiere en propiedades físicas como el hRf en diferentes solventes (veáse la sección de Material y Métodos) y el punto de fusión: 170-172°C para **2-epilicorina**, frente a 258°C para **licorina**.

**2-Epilicorina (9)** - finas acículas; AE encontrado: C, 66,7; H, 6,0; N, 5,1.  $C_{16}H_{17}NO_4$  requiere: C, 66,9; H, 6,0; N, 5,1%. Pf: 170-172°.  $[\alpha]_D^{25} -217,0^\circ$  ( $CHCl_3$ , c. 1,1). MS m/z (int. rel.): 287 (55), 269 (35), 268 (5), 227 (90), 226 (100). Los datos espectroscópicos de  $^1H$  y  $^{13}C$ -RMN se muestran en las tablas 29 y 30.

### 3.2.5. Galantina

Este alcaloide fue aislado por primera vez de *Galanthus voronowii*, y desde entonces se ha encontrado también en otros géneros de Amarilidáceas, incluyendo *Narcissus* (Bastida et al., 1990).

Pese a haberse realizado el espectro de IR (figura 55), en el que lo único destacable es la presencia de la señal de hidroxilo, lo que realmente proporciona información de la estructura son los espectros de RMN (figuras 57 y 59) y las experiencias COSY (figura 56) y XCOR (figura 58) realizadas.

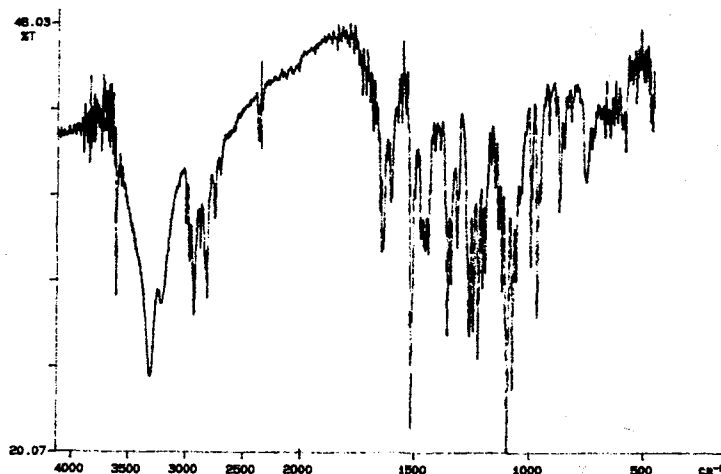


Figura 55. Espectro de IR de galantina

El espectro de  $^1H$ -RMN (figura 57, tabla 31) muestra los singuletes característicos a  $\delta$  6,87 y 6,64 ppm, correspondientes a los protones aromáticos H-10 y H-7, respectivamente, pero además presenta:



- dos dobletes a  $\delta$  4,14 y 3,55 ppm, para el sistema AB correspondiente a los protones de la posición 6,
- tres singuletes a  $\delta$  3,90, 3,88 y 3,55 ppm, para los dos grupos metoxilo del anillo aromático y el metoxilo alifático respectivamente, y un singulete ancho, asignable al protón vinílico H-3, que gracias a los diferentes acoplamiento que muestra con H-2 y H-4a, permite clarificar bastante bien la zona por medio de una experiencia COSY (figura 56).

Posterior exámen del espectro revela:

- un singulete ancho a  $\delta$  4,67 ppm, atribuible al protón H-1,
- dos multipletes a  $\delta$  3,80 y el intervalo 2,45-2,60 ppm, asignables a los protones H-2 y H-11, respectivamente,
- un doble doblete y un doble doblete de dobletes, para los protones  $\alpha$  y  $\beta$  de la posición H-12, respectivamente,
- una señal, aparentemente un singulete, a 2,65 ppm, que integra dos protones, y que se asignaría a las posiciones 4a y 10b. La convergencia de estos dos protones con respecto a la **9-O-metilpseudolicorina** (Evidente et al., 1984) está en concordancia con el efecto de apantallamiento del grupo metoxilo en C-2 sobre el protón de la posición H-4a, el cual se ha observado también en otros compuestos estructuralmente similares, como la **hipamina** y la **licorina**. La correlación, observada por el experimento COSY, de esta señal a 2,65 ppm con H-3 (el cual, a su vez, manifiesta acoplamiento con H-2), clarifica al protón H-4a, con el que acopla por una relación alílica transoide, pero además, la señal con este desplazamiento químico acopla con H-1, lo cual permite clarificar el protón H-10b.

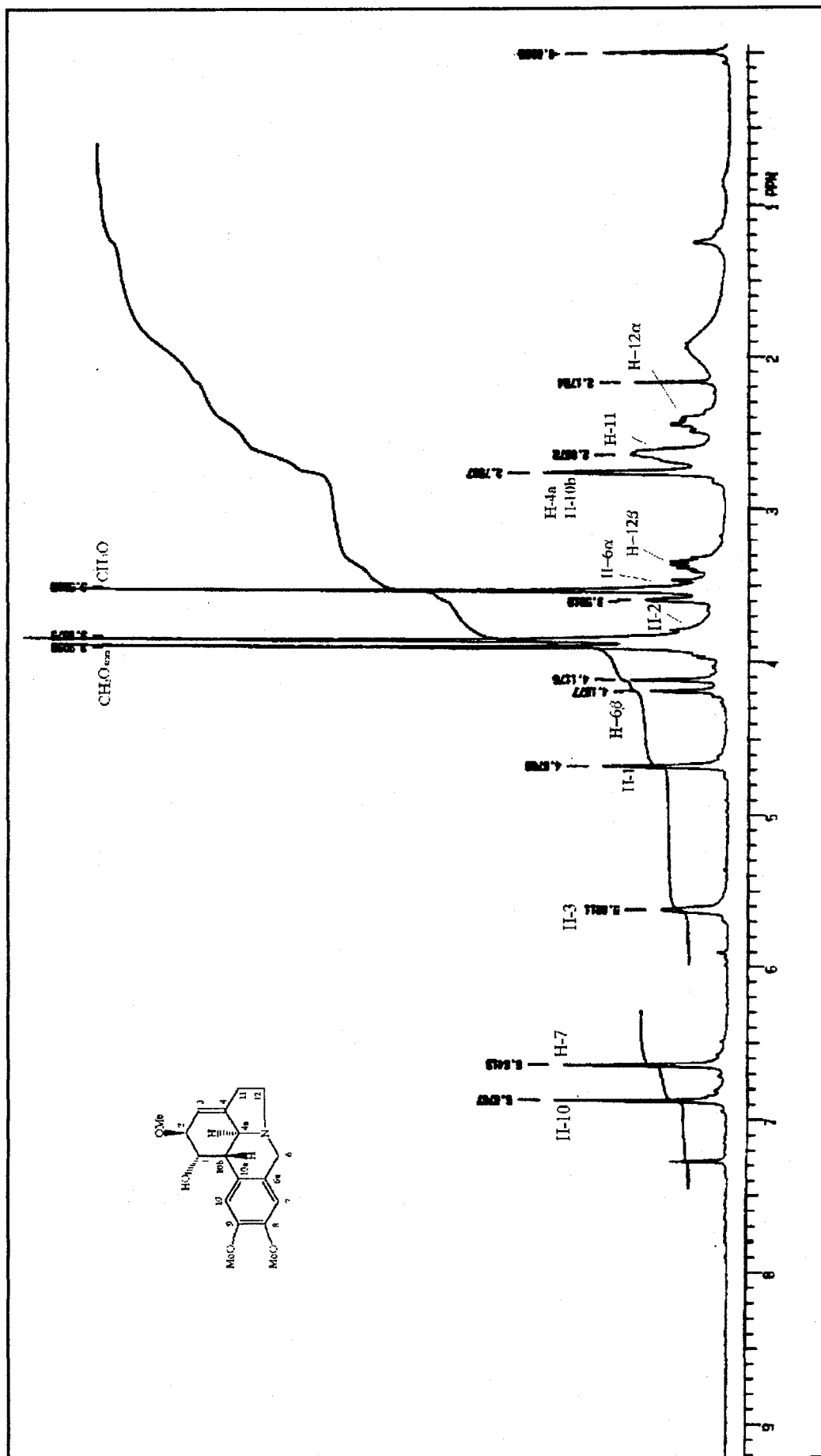


Figura 57. Espectro de  $^1\text{H-NMR}$  de galantamina (registrado en  $\text{CDCl}_3$ )

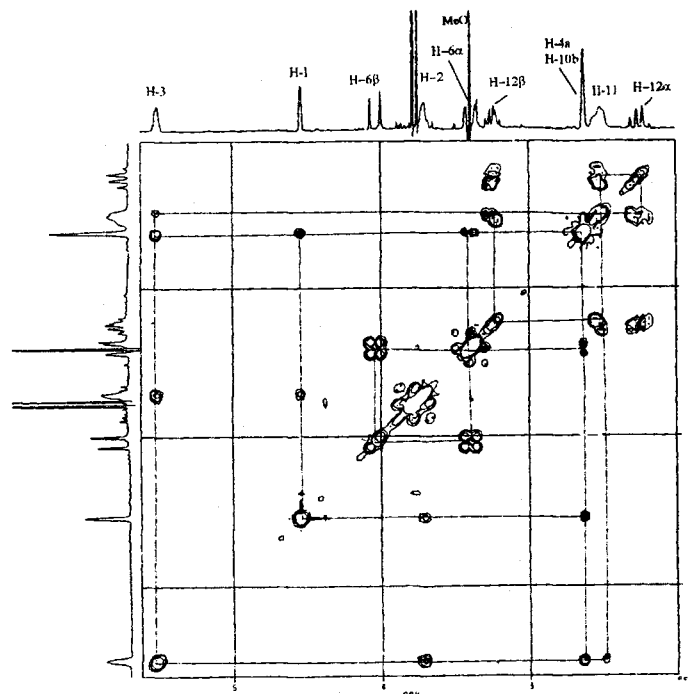


Figura 56. Experimento COSY en galantina

Tabla 31. Datos del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de galantina  
(registrado en  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 200 MHz)

H	$\delta$ (ppm)	multiplicidad	J (Hz)
1	4,67	s	
2	3,80	m	
3	5,62	brs	
4a	2,70	s	
6 $\alpha$	3,55	d	6 $\alpha$ ,6 $\beta$ = 14
6 $\beta$	4,14	d	6 $\beta$ ,6 $\alpha$ = 14
7	6,64	s	
10	6,87	s	
10b	2,70	s	
11 $\alpha$ y $\beta$	2,63	m	
12 $\alpha$	2,40	dd	12 $\alpha$ ,12 $\beta$ = 16,4 12 $\alpha$ ,11 $\beta$ = 8,2
12 $\beta$	3,35	ddd	12 $\beta$ ,12 $\alpha$ = 16,4 12 $\beta$ ,11 $\alpha$ = 10,0 12 $\beta$ ,11 $\beta$ = 6,0
MeOAr	3,90	s	
	3,88	s	
MeO	3,55	s	

El espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de **galantina** (figura 59, tabla 32) está en concordancia con los datos bibliográficos (Kobayashi et al., 1977). Las diferencias fundamentales con un compuesto como el cabeza de serie **licorina** radican en el desplazamiento de los carbonos del anillo C. De esta manera, el carbono que soporta el metoxilo (C-2) experimenta un desapantallamiento de cerca de 8 ppm en el cambio hidroxilación en **licorina** por metoxilación en **galantina**, mientras que los carbonos vecinos C-1 y C-3 experimentan sendos apantallamientos de unos 3 ppm de media, respectivamente. Las posiciones C-8 y C-9 no experimentan variaciones sustanciales en el cambio de carbonos de puente en el sistema benzodioxol, en el caso de **licorina**, a carbonos aromáticos que soportan sendos grupos metoxilo, en el caso de **galantina**. El resto de señales guarda una gran similitud con las del cabeza de serie **licorina**, excepción hecha de los grupos metoxilo y la ausencia del grupo metilendioxo.

**Tabla 32.** Datos del espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de **galantina**  
(registrado en  $\text{CDCl}_3$ , a 50,6 MHz)

C	$\delta$ (ppm)	multiplicidad
1	68,3	d
2	81,0	d
3	115,1	d
4	143,9	s
4a	60,9	d
6	56,6	t
6a	129,3	s
7	110,8	d
8	147,8	s
9	147,6	s
10	108,0	d
10a	126,6	s
10b	41,5	d
11	28,5	t
12	53,8	t
MeOAr	57,3	q
	56,0	q
MeO	55,9	q

La comprobación de las asignaciones realizadas se ha observado por medio de un experimento heteronuclear bidimensional XCOR (figura 58), en el que, por ejemplo, se aprecia la correlación de H-4a/H-10b, los cuales muestran una compleja señal a  $\delta$  2,65 ppm, y tanto C-4a ( $\delta$  60,9 ppm) como C-10b ( $\delta$  41,5 ppm).



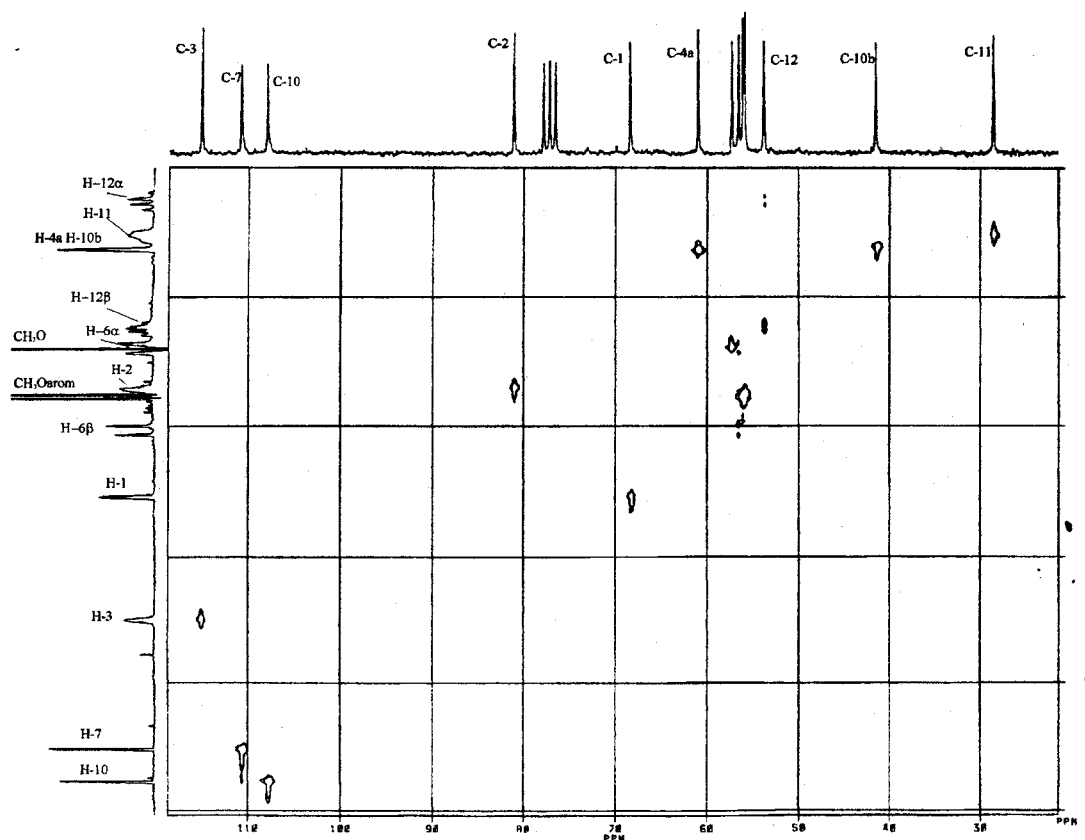


Figura 58. Experimento XCOR de galantina

En cuanto al espectro de masas, ha resultado en concordancia a la literatura citada (figura 60). Este espectro de masas es algo diferente al del cabeza de serie licorina, aunque las fragmentaciones se basan en los mismos procesos. El trabajo de Kinstle y colaboradores, proporciona la base para el estudio de las fragmentaciones en el espectro de masas de los alcaloides del grupo de la licorina (Kinstle et al., 1966).

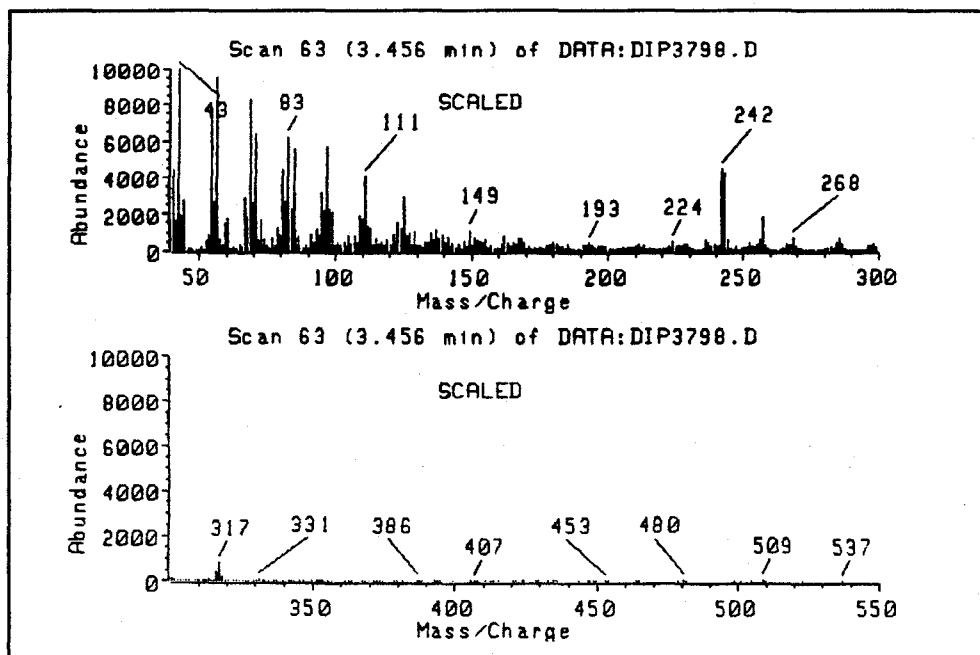


Figura 60. Espectro de masas de galantina

Así, galantina experimenta un proceso muy similar al de metilpseudolicorina (Kinstle et al., 1966), que se concreta en la pérdida de 32, 60 y 61 unidades de masa, no manifestando el anillo A ningún tipo de fragmentación. El proceso de fragmentación (figura 61) es muy similar al de licorina, salvo en las abundancias relativas de los diferentes fragmentos, que difieren sustancialmente, siendo en este caso uno de los fragmentos más importantes el de  $m/z = 242$ , y el de  $m/z = 243$ , a diferencia de las dos licorinas (normal y 2-epi) descritas anteriormente.

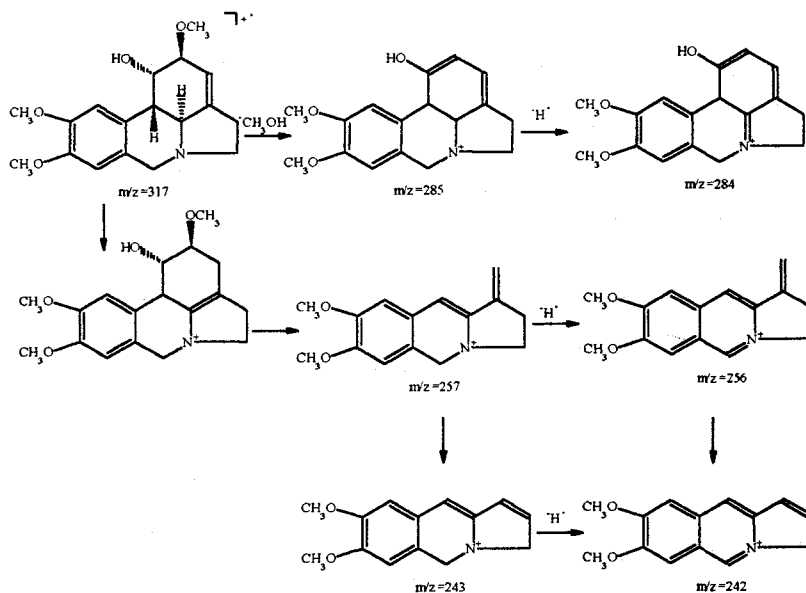


Figura 61. Fragmentaciones de masas más importantes en galantina

**Galantina (10)** - cristales plumosos blancos; masa exacta  $m/z$  317,1658, calculado para  $C_{18}H_{23}NO_4$  317,1627. Pf: 160-162°.  $[\alpha]_D$  -81,6° (EtOH, c 0,21). IR  $\nu_{max}$   $cm^{-1}$  (KBr): 3460, 1650, 1520, 1050. MS  $m/z$  (int. rel.): 317 (8), 285 (6), 284 (5), 257 (18), 256 (5), 243 (42), 242 (44), 125 (29), 111 (40), 43 (100). Los datos espectroscópicos de  $^1H$  y  $^{13}C$ -RMN se muestran en las tablas 31 y 32.

### 3.2.6. Narcisidina

Otro de los alcaloides del tipo **licorina** aislados de esta planta fue **narcisidina**, alcaloide del cual existía una formulación inicial errónea (Fales y Wildman, 1958), que fue posteriormente revisada mediante estudios de espectroscopía de masas (Kinstle et al., 1966). La estructura de **narcisidina** fue finalmente establecida en base al análisis de rayos X (Clardy et al., 1970). De todas maneras, hasta la fecha se carecía de datos de  $^1H$ -RMN o  $^{13}C$ -RMN de esta molécula. Su estudio, pues, se ha podido completar con el presente aislamiento.

El hecho de no existir datos de RMN tiene sus razones, dada la gran inestabilidad de este alcaloide. Es relevante el hecho de los escasos aislamientos de este **narcisidina**, aunque sí de diversos derivados suyos, como por ejemplo, **3-O-Acetilnarcisidina** aislada en *Hippeastrum puniceum* (Quirion et al., 1991), **cloruro de N-clorometilnarcisidinio**, artefacto aislado en *Lapiedra martinezii* (Suau et al., 1990c). Parece clara la gran inestabilidad del alcaloide base, que lo hace especialmente reactivo con los solventes y reactivos utilizados durante los procesos de extracción y separación, lo cual hace muy difícil su aislamiento. Esta gran inestabilidad radica, probablemente, en la olefina presente en el anillo D, que confiere a la estructura una gran rigidez con el átomo de nitrógeno como cabeza de puente de un biciclo, con lo cual la nucleofilia aumenta considerablemente, disminuyendo por tanto la estabilidad del compuesto (Suau et al., 1990c).

Haciendo referencia a la descripción de sus datos espectroscópicos, debe hacerse mención de los datos de RMN del producto. Así, el espectro de  $^1H$ -RMN de **narcisidina** (figura 62 y tabla 33) presentó las siguientes señales:

- seis singuletes característicos, dos a  $\delta$  6,90 y 6,70 ppm, asignables a dos protones aromáticos de un sistema *para*-orientado, uno a 5,60 ppm, para un protón olefínico H-11, y tres singuletes a 3,88, 3,84 y 3,45 ppm, asignables cada uno de ellos a un grupo metoxilo, y estando los dos primeros ligados a un anillo aromático y el tercero a uno alifático.
- otras señales han sido dos dobletes de sistemas AB solapados a  $\delta$  4,10 y 3,57 ppm integrando cada uno dos protones: el primero de ellos a H-6 $\beta$  y H-12 $\alpha$ , y el segundo a H-6 $\alpha$  y H-12 $\beta$ . El hecho de que estas señales engloben dos protones se debe a la similitud entre la posición 6 y la 12, ya que ambas son posiciones alílicas y en  $\alpha$  respecto a un heteroátomo. La diferencia de desplazamientos entre H-6 $\beta$ /H-12 $\alpha$  y H-6 $\alpha$ /H-12 $\beta$  se debe a la orientación respecto al par de electrones no compartido del nitrógeno (Moyenehan et al., 1962). Un hecho que refuerza esta similitud es la baja o nula constante de acoplamiento de ninguno de los protones en 12 con el protón H-11. Igualmente, aparece una señal ancha integrando dos protones a  $\delta$  4,68 ppm para H-3 y H-1 de acuerdo con



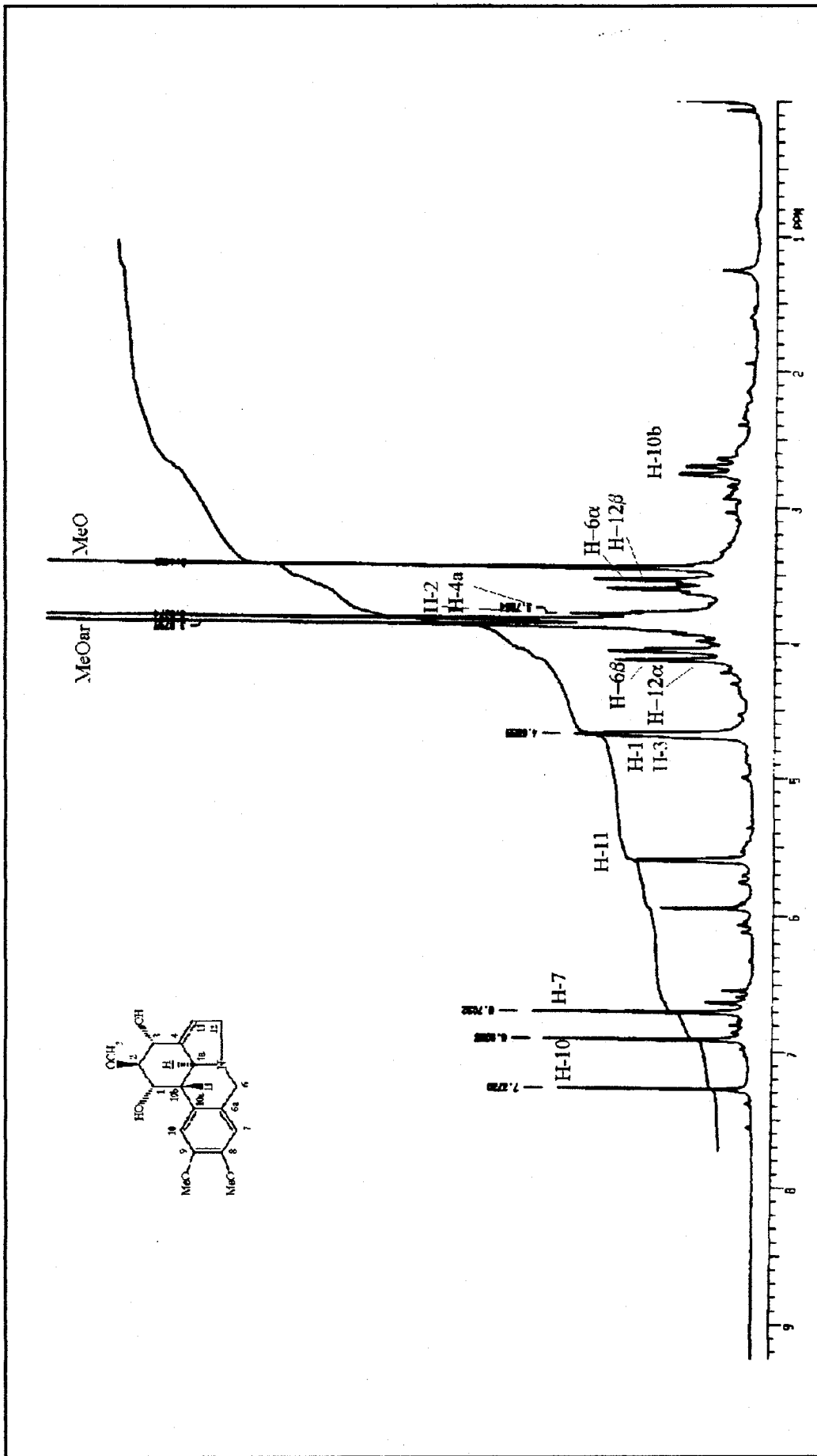


Figura 62. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN de narcisidina (registrado en CDCl<sub>3</sub>)

una orientación *cis* diaxial dada previamente para **ungiminorina** (el análogo de **narcisidina** con un grupo metilendioxo aromático) (Richomme et al., 1989).

- finalmente, aparece un doble doblete a  $\delta$  2,73 ppm, atribuible a H-10b.

Las asignaciones se han realizado en base a las estructuras establecidas para **ungiminorina** y **siculinina** (Richomme et al., 1989).

**Tabla 33.** Datos del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de **narcisidina** (registrado en  $\text{CDCl}_3$  a 200 MHz)

H	$\delta$ (ppm)	multiplicidad	J (Hz)
1	4,68	brs	(solapado con 3)
2	3,79	m	(solapado con 4a)
3	4,68	brs	(solapado con 3)
4a	3,79	m	(solapado con 2)
6 $\alpha$	3,56	d	6 $\alpha$ ,6 $\beta$ = 14
6 $\beta$	4,10	d	6 $\beta$ ,6 $\alpha$ = 14
7	6,70	s	
10	6,90	s	
10b	2,70	dd	10b,4a = 10,3
11	5,59	brs	
12 $\alpha$	4,10	brd	12 $\alpha$ ,12 $\beta$ = 14
12 $\beta$	3,56	d	12 $\beta$ ,12 $\alpha$ = 14
MeOAr	3,87	s	
	3,85	s	
MeO	3,44	s	

El espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (figura 63, tabla 34) ha resultado más clarificador en la elucidación definitiva de la estructura propuesta. Si se compara con el de **licorina**, en los puntos donde es comparable, es decir, básicamente el entorno del anillo D, se puede observar que:

- la señal debida a C-11 desaparece de las posiciones alifáticas a  $\delta$  del orden de 28 ppm,
- la señal debida a C-3, que tiene valores de  $\delta$  en torno a 117 ppm, tampoco aparece, pero sí se observa una señal a  $\delta$  121,3 ppm, que es un doblete. Si se postula una hidroxilación en 3, es imposible por tanto que sea este carbono el que aparezca a 121,3 ppm, ya que lo haría como singulete y no como doblete.
- finalmente, C-12 no aparece a los valores normales, que corresponderían a una posición metilénica con otro metileno adyacente, y el número total de metilenos descende de 3 a 2.

Todo ello parece indicar que la olefina no se encuentra entre 3 y 4, pues el número de metilenos sería 3 y la señal de C-3 aparecería como un singulete, sino que se encuentra entre 4

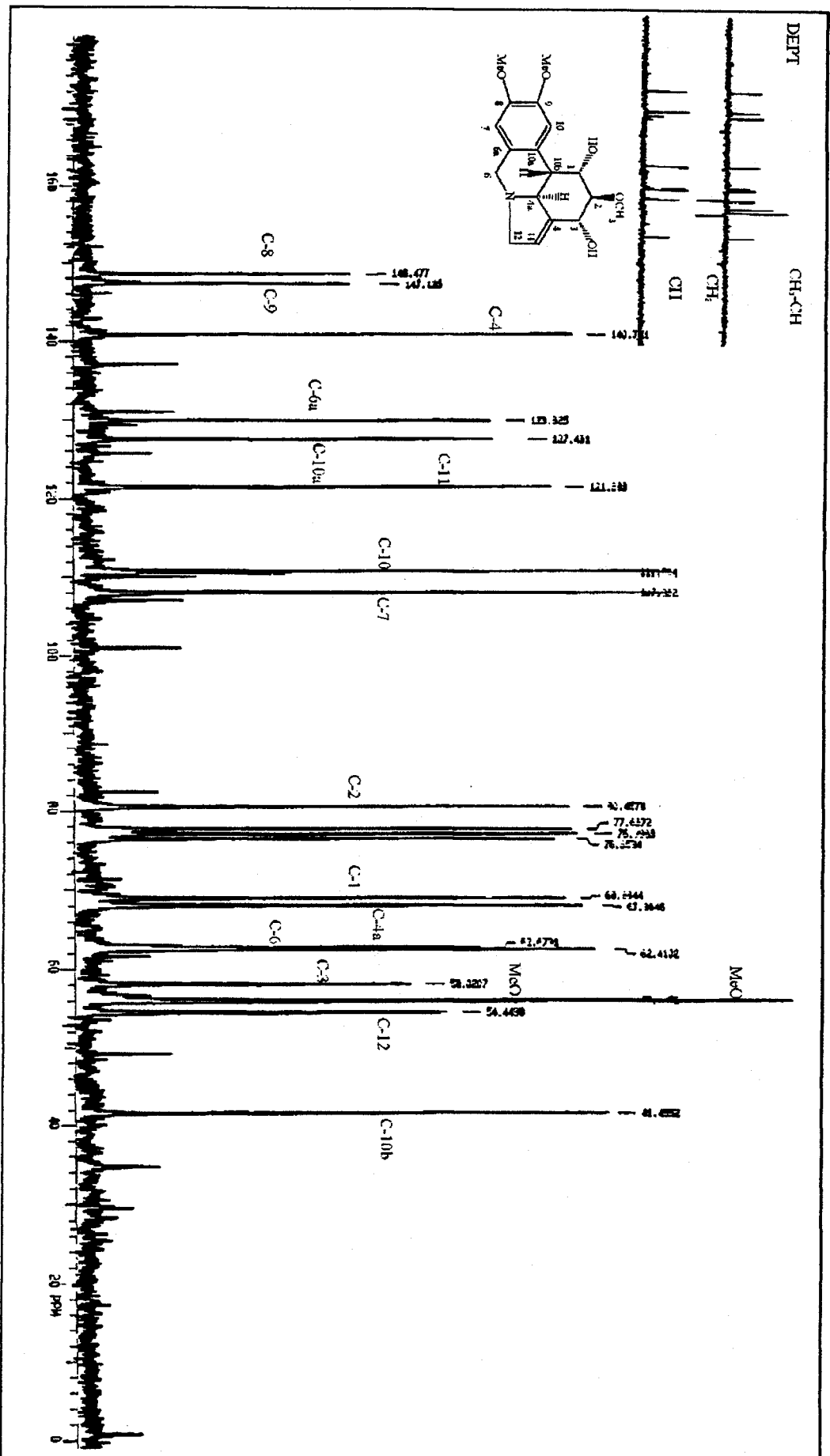


Figura 63. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de narcisidina (registrado en  $\text{CDCl}_3$ )

y 11, lo que favorece que la señal de este carbono no sea alifática sino olefínica, el número de metilenos sea de 2, y C-12 se desapantalle en unos 6 ppm al cambiar de alifático a alílico. En la tabla 33 puede observarse más explícitamente la comparación entre **narcisidina** y **ungiminorina** (Suau et al., 1990b) en base a los datos espectroscópicos de  $^{13}\text{C}$ -RMN.

**Tabla 34.** Datos comparativos de los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN de **narcisidina** (1) y **ungiminorina** (2) (registrados en  $\text{CDCl}_3$  a 50,6 MHz)

C	1	2	multiplicidad
1	67,9	68,1	d
2	80,4	80,3	t
3	68,8	68,4	d
4	140,7	140,2	s
4a	63,4	63,4	d
6	54,4	54,6	t
6a	129,3	131,1	s
7	107,9	105,6	d
8	148,4	147,5	s
9	147,1	145,9	s
10	110,5	107,8	d
10a	127,4	127,2	s
10b	41,4	41,5	d
11	121,3	120,6	d
12	62,6	62,3	t
MeOAr	58,0	-----	q
MeO	56,0	58,1	q
OCH <sub>2</sub> O	-----	101,0	t

En cuanto al espectro de masas de **narcisidina** (figuras 64 y 65), se confirma el peso molecular, aunque parece anómalo dado que no se presentan o son de poca intensidad los picos a  $m/z = 272$  ó  $273$  debido a la pérdida de los carbonos del puente C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub>. Además, también se observan picos intensos en la región  $m/z = 257$  a  $259$ , los cuales requieren una pérdida de C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub> y por tanto, la presencia de sustituyentes de tipo hidroxilo y metoxilo.

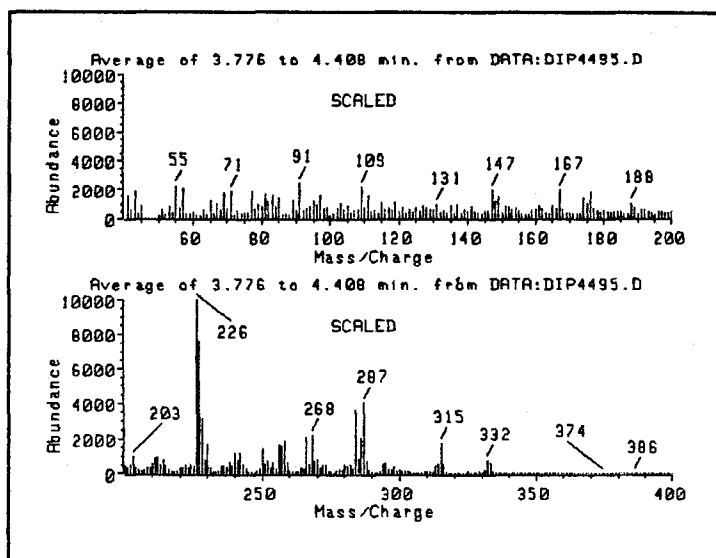


Figura 64. Espectro de Masas de narcissidina

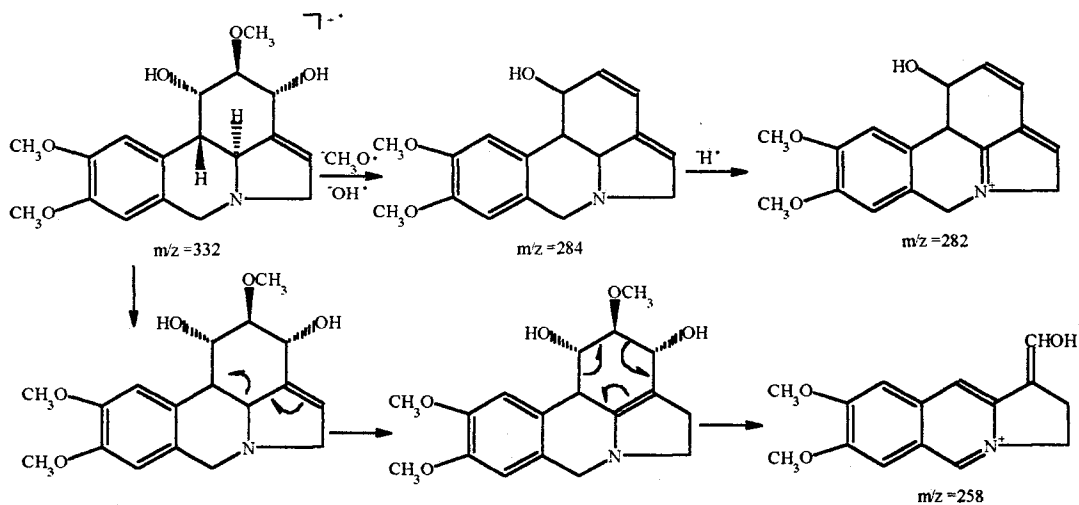


Figura 65. Posibles fragmentaciones de narcissidina

Queda aún un aspecto por discutir y es el que hace referencia, como ya se ha indicado a la gran inestabilidad de este compuesto siendo muy difícil de aislar en forma base, pero no como derivado acetilado en el anillo C y como sal de amonio cuaternario. La explicación probablemente deriva del anillo D altamente tensionado en alcaloides de este tipo, incluyendo a la **ungiminorina**. Las conformaciones de mínima energía obtenidas con el programa Alchemy II para este alcaloide y para los derivados **3-O-acetilnarcisidina** y el **ión clorometilnarcisidinio** (figura 66, tabla 35) no aclaran gran cosa, ya que la energía de esta conformación en el alcaloide base es de 10,9 unidades, mientras que en el derivado acetilado es de 8,3 unidades, y, curiosamente en el ión es todavía superior (la estabilidad de este producto sería debida a las

interacciones intermoleculares iónicas si no se considera la alta reactividad de los otros compuestos en el nitrógeno cabeza de puente). Por otra parte, las energías calculadas están en relación directa con las tensiones angulares obtenidas, y éstas son, en último término, un reflejo del sustituyente presente en la molécula.

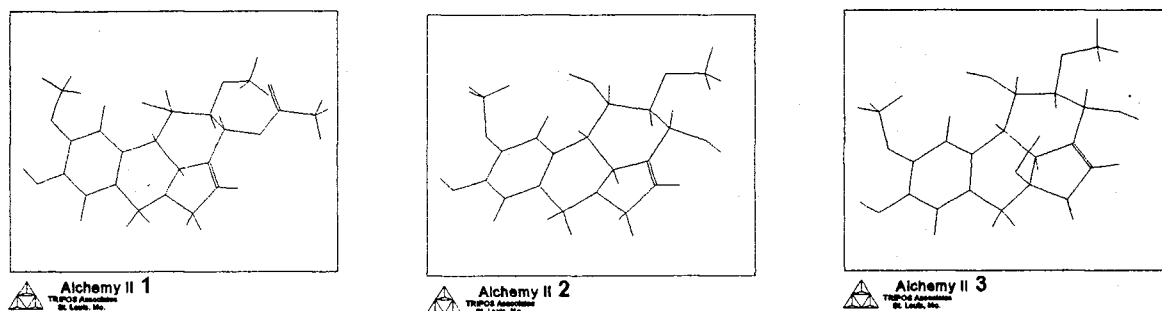
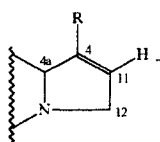


Figura 66. Conformaciones de energía mínima de 3-O-acetylnarcissidina (1), narcissidina (2) y cloruro de N-clorometilnarcissidinio (3)

Si se consideran los ángulos de enlace para la olefina del anillo D, presumible responsable de la alta inestabilidad del alcaloide base, se observa que pasa de 112,3° para el heterociclo sin sustituyentes (Energía=5,9) a una media de 110° en narcissidina (Energía=10,9), 109,1° en clorometilnarcissidina (Energía=15,5) y 110° en 3-O-acetylnarcissidina (Energía=8,3) (tabla 34). Ello indica que el cierre de los ángulos de enlace en el heterociclo del anillo D aumenta la energía de la molécula, y por tanto, está en relación directa con la inestabilidad global de ésta.

Tabla 35. Angulos de enlace y energías en la olefina de Narcissidina y derivados



Molécula	Ang 4a,4,11	Ang 4,11,12	Energía
3-pirrolina	112,3	112,3	5,9
3-O-acetylnarcissidina	110,6	109,1	8,3
narcissidina	111	109,4	10,9
ión clorometilnarcissidinio	109,6	108,7	15,5

**Narcissidina (11)** - finas agujas oscuras; AE encontrado: C, 64,44; H, 7,01; N, 4,11. C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>5</sub> requiere: C, 64,85; H, 6,95; N, 4,20%. Pf: 203-205°. [α]<sub>D</sub><sup>-31</sup> (CHCl<sub>3</sub>, c 1,5). MS m/z (int. rel.):

332 (7), 284 (36), 282 (4), 258 (18), 227 (75), 226 (100). Los datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN se muestran en las tablas 33 y 34.

### 3.2.7. Sternbergina

El séptimo alcaloide aislado de *Narcissus nevadensis* se ha identificado como **sternbergina** (7) en base a sus datos físicos y espectroscópicos.

En el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de **sternbergina** (figura 67, tabla 36) se observa una conformidad con el patrón más o menos general de señales observadas para los alcaloides del grupo de la **licorina**. En este caso, las diferencias básicas radican en la ausencia del anillo dioxol y la presencia de un grupo acetilo en la posición 1. Los desplazamientos de los protones han sido asignados considerando la integración y la multiplicidad de las señales. El patrón de las señales más importantes proporciona la siguiente información:

- la señal que integra 3 protones, singulete a  $\delta$  1,81 ppm, corresponde a un grupo acetilo, probablemente ligado al anillo C. De hecho, sólo uno de los dos protones unidos a los carbonos alifáticos oxigenados fue desapantallado.
- un sigulete a  $\delta$  3,72 ppm integrando 3 protones, indica la presencia de un grupo metoxilo unido a un anillo aromático.

**Tabla 36.** Datos del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de **sternbergina** (registrado en  $\text{CDCl}_3$  a 200 MHz)

H	$\delta$ (ppm)	multiplicidad	J (Hz)
1	5,75	dd	1,2 = 2,2 1,10b = 2,2
2	4,16	m	2,1 = 2,2 (solapado con 6 $\beta$ )
3	5,56	m	
4a	2,78	dd	4a,10b = 10,3 (solapado con 10b)
6 $\alpha$	3,49	d	6 $\alpha$ ,6 $\beta$ = 14
6 $\beta$	4,16	d	6 $\beta$ ,6 $\alpha$ = 14
7	6,64	s	
10	6,70	s	
10b	2,78	dd	10b,4a = 10,3 10b,1 = 2,6
11 $\alpha$ y $\beta$	2,63	m	
12 $\alpha$	3,30	ddd	12 $\alpha$ ,12 $\beta$ = 8,8
12 $\beta$	2,39	brq	12 $\beta$ ,12 $\alpha$ = 8,8
MeOAr	3,72	s	
AcO	1,81	s	

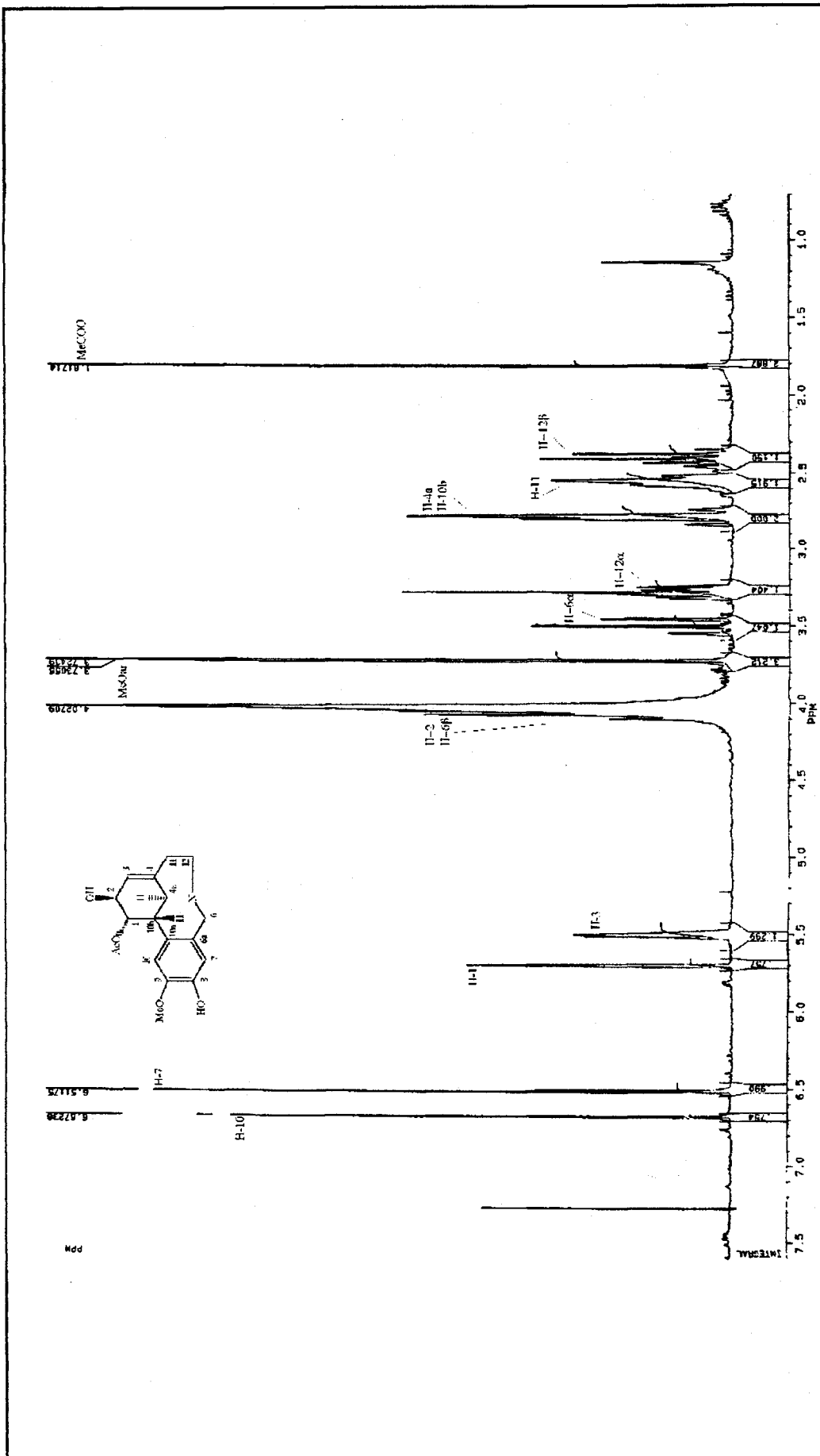


Figura 67. Espectro de  $^1\text{H-NMR}$  de sternbergina (registrado en  $\text{CDCl}_3$ )



Para situar el grupo acetilo se ha realizado la experiencia de ROESY (figura 68). Dicho grupo acetilo se localiza en C-1 por la evidencia de este espectro, en el cual se muestra una proximidad espacial entre los protones H-1 ( $\delta = 5,75$  ppm) y H-10 ( $\delta = 6,67$  ppm). Por otra parte, este espectro también muestra proximidad espacial entre el grupo metoxilo aromático ( $\delta = 3,72$  ppm) y el protón H-10, por lo que el grupo metoxilo se situaría en C-9.

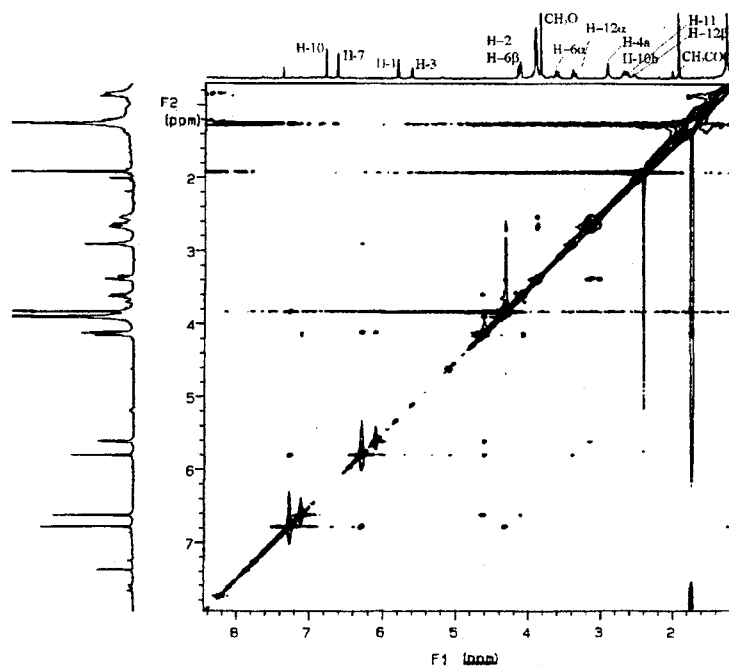


Figura 68. Experimento ROESY de sternbergina

En el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (figura 69, tabla 37) los desplazamientos se han establecido por medio de la experiencia DEPT. La asignación de las resonancias de los carbonos cuaternarios se ha efectuado por comparación con las de los desplazamientos citados para el sistema de la licorina.

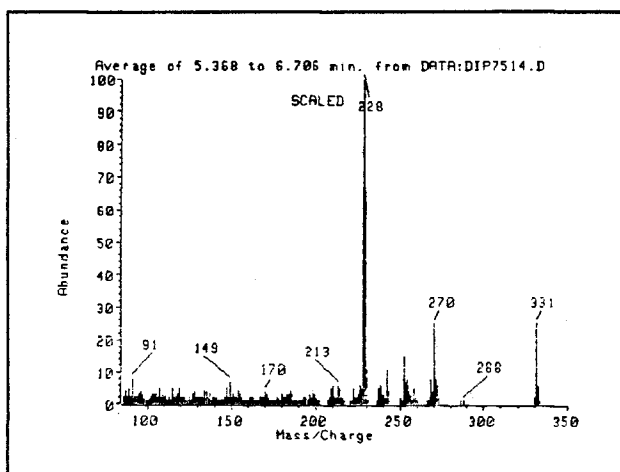


**Tabla 37.** Datos del espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de *sternbergina* (registrado en  $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$  a 50,6 MHz)

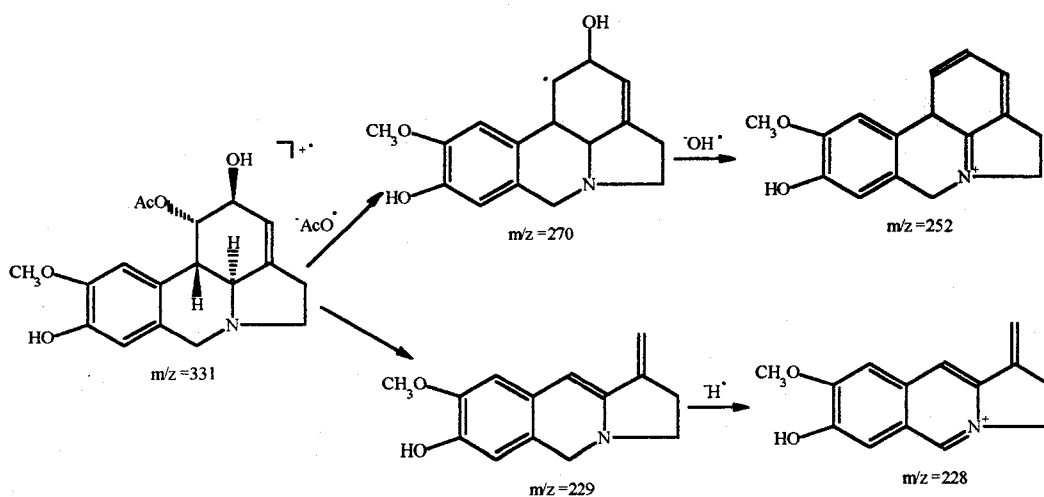
C	$\delta$ (ppm)	multiplicidad
1	71,6	d
2	68,9	d
3	117,8	d
4	144,4	s
4a	61,4	d
6	53,3	t
6a	127,2	s
7	113,4	d
8	146,1	s
9	141,8	s
10	107,6	d
10a	124,3	s
10b	38,1	d
11	27,9	t
12	55,8	t
MeOAr	55,6	q
COMe	20,4	q

También se ha realizado un experimento XCOR que completa a todos los anteriores, confirmando la veracidad de las señales de  $^{13}\text{C}$ -RMN respecto a las de  $^1\text{H}$ -RMN.

En cuanto al espectro de masas de este producto (figuras 70 y 71), también se ha realizado, si bien ha tenido solamente un valor confirmatorio. Este espectro muestra el pico ión molecular a  $m/z = 331$ , teniendo otros picos significativos a  $m/z = 270$ ,  $m/z = 254$  y  $m/z = 252$ , y dos picos muy intensos a  $m/z = 229$  y  $m/z = 228$  (pico base). Estos fragmentos, como era de esperar, están en consonancia con los observados para *licorina* y derivados (Kinstle et al., 1966).



**Figura 70.** Espectro de Masas de *sternbergina*

Figura 71. Fragmentaciones de masas de *sternbergina*

**Sternbergina (12)** - agujas blancas; AE encontrado: C, 65,29; H, 6,98; N, 4,22.  $C_{18}H_{21}NO_5$  requiere: C, 65,24; H, 6,39; N, 4,23%. Pf: 197-202°.  $[\alpha]_D -78,8^\circ$  ( $CHCl_3$ , c 0,7). MS m/z (int. rel.): 331 (25), 270 (25), 252 (15), 229 (66), 228 (100). Los datos espectroscópicos de  $^1H$  y  $^{13}C$ -RMN se muestran en las tablas 36 y 37.

### 3.2.8. Observaciones finales

Para finalizar, merece la pena destacar la presencia en *Narcissus nevadensis* de alcaloides con origen biosintético por acoplamiento fenol-oxidativo *orto-para'*, así como la ausencia de otros tipos alcaloídicos incluido el tipo fenantridina, que supuestamente afecta a la sección *Pseudonarcissus* DC. Por otra parte, es curioso constatar que tanto en esta especie como en *Narcissus primigenius* han resultado mayoritarios los alcaloides del tipo homolicorina, concretamente **homolicorina** y **8-O-demetilhomolicorina** en *N. primigenius* y **licorena** y **6-O-metillicorena** en *N. nevadensis*. Por último, el contenido alcaloídico ha sido mayor en la especie cantábrica (*N. primigenius*) que en la penibética (*N. nevadensis*), aunque el número de alcaloides aislados ha sido mayor en esta última.

#### **4. CONCLUSIONES**





Del trabajo fitoquímico realizado en la presente memoria se pueden establecer las siguientes conclusiones:

1. Con este trabajo se ha realizado una primera aportación al estudio de la composición alcaloídica de dos especies ibéricas del género *Narcissus* L., *N. primigenius* (Fdez. Suárez ex Laínz) Fdez. Casas & Laínz y *N. nevadensis* Pugsley, pertenecientes ambas a la sección *Pseudonarcissus* DC.
2. De la especie *Narcissus primigenius* se han aislado cinco alcaloides, todos ellos conocidos, de los cuales, dos pertenecen al tipo homolicorina, **homolicorina** y **8-O-demetilhomolicorina**, otros dos al tipo  $\alpha$ -crinano, **hemantamina** y **8-O-demetilmaritidina**, y el último, correspondiente al núcleo químico de la fenantridina, y ha resultado ser la **8,9-metilendioxifenantridina** o **trisferidina**.
3. Se han completado los datos espectroscópicos de **8-O-demetilmaritidina**, uno de los alcaloides minoritarios de *N. primigenius*, siendo la tercera vez que se obtiene de una amarilidácea y la primera de una especie de *Narcissus*.
4. El estudio fitoquímico de *Narcissus nevadensis* ha conducido al aislamiento de siete alcaloides, todos ellos conocidos, de los cuales cinco (**licorina**, **galantina**, **narcisidina**, **2-epilicorina** y **sternbergina**) pertenecen al grupo estructural de la licorina, mientras que los dos restantes, **licorenina** y **6-O-metil-licorenina**, pertenecen al tipo homolicorina.
5. El aislamiento de **narcisidina** en *Narcissus nevadensis* representa una contribución importante a la caracterización de esta molécula, pues se han realizado por primera vez los espectros de  $^1\text{H-RMN}$  y  $^{13}\text{C-RMN}$ .
7. Finalmente, se han completado los datos espectroscópicos de **2-epilicorina**, epímero del alcaloide **licorina**, el más ampliamente distribuido entre la familia Amaryllidaceae.



## **5. BIBLIOGRAFIA**





- Ali AA Ramadan MK & Frahm AW (1984) Alkaloidal constituents of *Crinum bulbispermum*. III: Bulbispermine, a new alkaloid of *Crinum bulbispermum*. *Planta Med.* 50: 424
- Amico A & Stefanizzi L (1980) Struttura, embriologia, localizzazione citochimica degli alcaloidi di *Nerine undulata* Herb. *Fitoterapia.* 51: 211
- Arrigoni O Arrigoni-Liso R & Calabrese G (1975) Lycorine as an inhibitor of ascorbic acid biosynthesis. *Nature.* 256: 513
- Arrigoni O Arrigoni-Liso R & Calabrese G (1976) Ascorbic acid as a factor controlling the development of cyanide-insensitive respiration. *Science.* 194: 332
- Barton DHR Kirby GW Taylor JB & Thomas GM (1963) Phenol oxidation and biosynthesis. Part VI. The biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids. *J. Chem. Soc.* 4545
- Bastida J Viladomat F Llabrés JM Codina C Feliz M & Rubiralta M (1987a) Alkaloids from *Narcissus confusus*. *Phytochemistry.* 26: 1519
- Bastida J Llabrés JM Viladomat F Codina C Rubiralta M & Feliz M (1987b) *Narcissus* alkaloids, III. 9-O-demethylhomolycorine from *Narcissus confusus*. *J. Nat. Prod.* 50: 199
- Bastida J Viladomat F Llabrés JM Ramírez G Codina C & Rubiralta M (1989) *Narcissus* alkaloids, VIII. Mesembrenone, an unexpected alkaloid from *Narcissus pallidulus*. *J. Nat. Prod.* 52: 478
- Bastida J Codina C Viladomat F Rubiralta M Quirion JC Husson HP & Ma GE (1990) *Narcissus* alkaloids, XIII. Complete assignment of the NMR spectra of papyramine and 6-epipapyramine by two-dimensional NMR spectroscopy. *J. Nat. Prod.* 53: 1456
- Bastida J Bergoñón S Viladomat F & Codina C (1994) Alkaloids from *Narcissus primigenius*. *Planta Med.* 60: 95
- Battersby AR Fales HM & Wildman WC (1961) Biosynthesis in the Amaryllidaceae. Tyrosine and norbelladine as precursors of haemanthamine. *J. Am. Chem. Soc.* 83: 4098
- Battersby AR Binks R Brener SW Fales HM Wildman WC & Highet RJ (1964) Alkaloid biosynthesis. Part III. Amaryllidaceae alkaloids: The biosynthesis of lycorine and its relatives. *J. Chem. Soc.* 1595
- Bax A Freeman R & Morris GA (1981a) Correlation of proton chemical shifts by two-dimensional Fourier transform NMR. *J. Magn. Reson.* 42: 164

- Bax A Freeman R & Morris GA (1981b) A simple method for suppressing dispersion-mode contributions in NMR spectra: the "pseudoecho". *J. Magn. Reson.* 43: 333
- Baytop T & Mathew B (1984) *The Bulbous Plants of Turkey. An Illustrated Guide to the Bulbous Petaloid Monocotyledons of Turkey.* Batsford, London
- Beijersbergen JCM Mijnsen GWAV & Bergman BHH (1987) Tulpevingers meest voorkomende beroepsziekte. Irriterende stoffen veroorzaken ongeneeslijke aandoening. *Bloembollencultuur.* 98: 12
- Bergoñón S (1994) Datos no publicados
- Blanchard JW (1990) *Narcissus. A Guide to wild daffodils.* (p.16) Bird R (Ed.) Alpine Garden Society, Surrey
- Boit HG & Mehlis B (1961) Clivimin und clivatin, zwei neue alkaloide aus *Clivia miniata*. *Naturwissenschaften.* 48: 603
- Booth VH (1957)  $\beta$ -carotene in the flowers of *Narcissus*. *Biochem. J.* 65: 660
- Booth VH (1963) Rapidity of carotene biosynthesis in *Narcissus*. *Biochem. J.* 87: 238
- Clardy JC Wildman WC & Hauser FM (1970) Crystal and molecular structure of narcissidine. *JACS.* 92: 1781
- Clark-Still W Kahn M & Mitra A (1978) Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J. Org. Chem.* 43: 2923
- Clusius (1576) *Rariorum aliquot stirpium per Hispaniam observatarum Historia. Antverpiae.* In: Pugsley HW (1933) *A monograph of Narcissus subgenus Ajax.* *J. Roy. Hort. Soc.* 58: 17
- Codina C Bastida J Viladomat F Fernández JM Bergoñón S Rubiralta M & Quirion JC (1993) Alkaloids from *Narcissus muñozii-garmendiaë*. *Phytochemistry.* 32: 1354
- Codina C Viladomat F Bastida J Rubiralta M & Quirion JC (1990) A heterodimer alkaloid from *Narcissus pallidiflorus*. *Phytochemistry.* 29: 2685
- Dahlgren RMT (1980) A revised system of classification of the Angiosperms. *Bot. J. Lin. Soc.* 80: 91
- Dahlgren RMT Clifford HT & Yeo PF (1985) *The Families of the Monocotyledons. Structure, Evolution and Taxonomy.* Springer Verlag, Berlin

- Díaz TE & Fernández JA (1980) Estudio de la variabilidad en algunas poblaciones silvestres de la sección Pseudonarcissus DC. (género Narcissus L.) en la cordillera cantábrica. *Anal. Jard. Bot. Madrid.* 36: 153
- Döpke W (1963) Über den zusammenschang von aminosäure und alkaloigehalt bei der Narcissus jonquilla hybride "Golden sceptre". *Planta Med.* 11: 154
- Döpke W Sewerin E & Trimiño Z (1980) Zur struktur des alkaloid amisin. *Z. Chem.* 20: 298
- Döpke W Sewerin E Trimiño Z & Julierrez C (1981) Isolierung, struktur und stereochemie ein neue alkaloid aus Crinum oliganthum. *Z. Chem.* 21: 358
- Duffield AM Aplin RT Budzikiewicz H Djerassi C Murphy CF & Wildman WC (1965) Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. LXXXII. A study of the fragmentation of some Amaryllidaceae alkaloids. *J. Am. Chem. Soc.* 87: 4902
- Emboden WA Jr (1972) *Narcotic Plants.* Mac Millan, New York (p. 172).
- Evidente A Cicala MR Randazzo G & Riccio R (1983a)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  NMR analysis of lycorine and  $\alpha$ -dihydrolycorine. *Phytochemistry.* 22: 581
- Evidente A Cicala MR Randazzo G Riccio R Calabrese G Liso R & Arrigoni O (1983b) Lycorine structure-activity relationships. *Phytochemistry.* 22: 2193
- Evidente A Iasiello I & Randazzo G (1984) Isolation of sternbergine, a new alkaloid from bulbs of Sternbergia lutea. *J. Nat. Prod.* 47: 1003
- Fales HM & Wildman WC (1958) Interconversions of Amaryllidaceae alkaloids by sodium and amylalcohol. *J. Am. Chem. Soc.* 80: 4395
- Fales HM (1963) *In vitro* alkaloid biosynthesis in the Amaryllidaceae; norbelladine O-methylperase. *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2025
- Feinstein AI & Wildman WC (1976) Biosynthetic oxidation and rearrangement of vittatine and its derivatives. *J. Org. Chem.* 41: 2447
- Fernandes (1951) Sur la phylogénie des espèces du genre Narcissus L. *Bol. Soc. Brot. Sér. 2:* 113
- Fernandes (1968) Keys to the identification of native and naturalized taxa of the genus Narcissus L. *Daffodil and Tulip Year Book.* 37
- Fernandes (1975) L'evolution chez le genre Narcissus L. *Anal. Inst. Bot. Cav.* 32: 843

- Fernández Casas J (1983) Materiales para una monografía de Narcissus I. Fontqueria. 3: 33
- Fernández Casas J (1984) Remiendos y enmiendas en el género Narcissus L. Fontqueria. 6: 35
- Fernández Casas J (1986) Acerca de unos cuantos narcisos norteños. Fontqueria. 11: 15
- Fernández Casas J & Rivas Ponce MA (1988) Algunos narcisos cantábricos. Fontqueria. 20: 17
- Frahm AW Ali AA & Ramadan MA (1985)  $^{13}\text{C}$  Nuclear magnetic resonance spectra of Amaryllidaceae alkaloids. I- Alkaloids with the crinane skeleton. Magn. Reson. Chem. 23: 804
- Frey-Wyssling A (1967) Über die carotinkristalle in der nebenkrone der narzissenbluete. An. Edaf. Agrobiol. 26: 25
- Fuganti C & Mazza M (1971) Late intermediates in the biosynthesis of narciclasine. Chem. Comm. 1388
- Fuganti C & Mazza M (1972) The absolute configuration of narciclasine: a biosynthetic approach. J. Chem. Soc. Comm. 239
- Fuganti C (1973) Further information on the biosynthesis of the alkaloid ismine. Tetr. Lett. 20: 1785
- Fuganti C & Mazza M (1973) Biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids. Stereochemistry of hydrogen removal  $\alpha$  to the tertiary nitrogen atom in the biological conversion of norpluviine into lycorenine. J. Chem. Soc. Perkin I. 954
- Fuganti C Ghiringhelli D & Grasselli P (1974a) Biosynthesis of narcissidine. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 350
- Fuganti C Ghiringhelli D & Grasselli P (1974b) Further information on the origin of the aromatic  $\text{C}_6\text{-C}_1$  unit of the Amaryllidaceae alkaloids. Tetr. Lett. 20: 1785
- Gerrad AW (1877) Pharm J. 8: 214
- Ghosal S & Razdan S (1984) Ryllistine, the first 4-oxygenated norbelladine alkaloid from *Amaryllis vittata*. J. Chem. Res. (s). 412
- Ghosal S Saini KS & Razdan S (1985a) *Crinum* alkaloids: their chemistry and biology. Phytochemistry. 24: 2141

- Ghosal S Ashutosh & Razdan S (1985b) (+)-Epi-maritidine, an alkaloid from *Zephyranthes rosea*. *Phytochemistry*. 24: 635
- Ghosal S Shanty A Kumar A & Kumar Y (1985c) Palmillicorine and lycoriside: Acyloxy and acylglucosyloxy alkaloids from *Crinum asiaticum*. *Phytochemistry*. 24: 2703
- Ghosal S Kumar Y Chakrabarti DK Lal J & Singh SK (1986a) Parasitism of *Imperata cylindrica* on *Pancreatium biflorum* and the concomitant chemical changes in the host species. *Phytochemistry*. 25: 1097
- Ghosal S Singh SK & Srivastava RS (1986b) Alkaloids of *Zephyranthes flava*. *Phytochemistry*. 25: 1975
- Ghosal S Singh SK & Unnikrishnan S (1987) Phosphatidylpyrrolphenanthridine alkaloids from *Zephyranthes flava*. *Phytochemistry*. 26: 823
- Ghosal S Singh SK Kumar Y & Srivastava RS (1989a) Isocarbostyryl alkaloids from *Haemanthus kalbreyeri*. *Phytochemistry*. 28: 611
- Ghosal S Unnikrishnan S & Singh SK (1989b) Occurrence of two epimeric alkaloids and metabolism compared with lycorine in *Crinum latifolium*. *Phytochemistry*. 28: 2535
- Greathouse GA & Rigler NE (1941) Alkaloids from *Zephyranthes texana*, *Cooperia pedunculata* and other Amaryllidaceae and their toxicity to *Phymatotrichum omnivorum*. *Am. J. Bot.* 28: 702
- Gude M Hausen BM Heitsch H & König WA (1988) An investigation of the irritant and allergenic properties of daffodils (*Narcissus pseudonarcissus* L., Amaryllidaceae). A review of daffodil dermatitis. *Contact Dermatitis*. 19: 1
- Haugwitz RD Jeffs PW & Wenkert E (1965) Proton magnetic resonance spectral studies of some Amaryllidaceae alkaloids of the 5,10b-ethanophenanthridine series and of criwelline and tazettine. *J. Chem. Soc.* 2001
- Hausen BM & Oestmann G (1988) Untersuchungen über die häufigkeit berufsbedingter allergischer hauterkrankungen auf einem blumengrossmarkt. *Dermat. Ber. Umw.* 34: 117
- Hawksworth WA Jeffs PW Tidd BK & Toubé TP (1965) The alkaloids of the Amaryllidaceae. Part XII. The aromatic oxygenation patterns and stereochemistry of some trioxyaryl alkaloids of the hemiacetal and lactone series. *J. Chem. Soc.* 1991
- Henry TA (1949) *The Plant Alkaloids*. J. and A. Churchill, London



- Ibuka T Irie H Kato A & Uyeo S (1966) Mass spectrometry of some Amaryllidaceae alkaloids. *Tetr. Lett.* 39: 4745
- Imaseki H & Kang BG (1984) Mechanism of action of lycoricidinol, a plant growth inhibitor isolated from *Lycoris radiata* Herb. *Plant Cell Physiol.* 25: 309.
- Jaspersen-Schib R (1970) Toxische Amaryllidaceen. *Pharm. Acta Helv.* 45: 423
- Jeffs PW Abou-Donia A Campau D & Staiger D (1985) Structures of 9-O-demethyl-homolycorine and 5 $\alpha$ -hydroxyhomolycorine. Alkaloids of *Crinum defixum*, *C. scabrum* and *C. latifolium*. Assignment of aromatic substitution patterns from <sup>1</sup>H-coupled <sup>13</sup>C-spectra. *J. Org. Chem.* 50: 1732
- Kang BG Lee JS Oh SE & col. (1984) Inhibition of auxin-induced ethylene production by lycoricidinol. *Plant Cell Physiol.* 25: 249.
- Kihara M Koike T Imakura Y Kido K Shingu T & Kobayashi S (1987) Alkaloids constituents of *Hymenocallis rotata* Herb. (Amaryllidaceae). *Chem. Pharm. Bull.* 35: 1070
- Kinstle TH Wildman WC & Brown CL (1966) Mass spectra of Amaryllidaceae alkaloids. The structure of narcissidine (from *Amaryllis* spp.) *Tetr. Lett.* 39: 4659
- Kirby GW & Tiwari HP (1966) Phenol oxidation and biosynthesis. Part IX. The biosynthesis of norpluviine and galanthine. *J. Chem. Soc. (C)*. 676
- Kobayashi S Ishikawa H Kihara M Shingu T & Hashimoto T (1977) Isolation of carinatine and pretazettine from the bulbs of *Zephyranthes carinata* Herb (Amaryllidaceae). *Chem. Pharm. Bull.* 25: 2244
- Kobayashi S Ishikawa H Sasakawa E Kihara M Shingu T & Kato A (1980) Isolation of clivacetine from *Clivia miniata* Regel (Amaryllidaceae). *Chem. Pharm. Bull.* 28: 1827
- Kotera K Hamada Y Tori K Hono K & Kuriyama K (1966) Absolute configurations and the C-ring conformations of lycorine and related compounds evidenced by NMR and CD spectroscopies. *Tetr. Lett.* 18: 2009
- Kuhn (1970) Chemismus, struktur und entstehung der carotinkriställchen in der nebenkrone von *Narcissus poeticus* L. "La Riante". *J. Ultrastruct. Res.* 33: 332
- Lavermicocca P Garuccio I Surico G & Arrigoni O (1989) The microbial populations of the rhizosphere of *Sternbergia lutea* Ker. Gawl. in relation to the presence of lycorine. *Ann. Microbiol. Enzimol.* 39: 93.
- Lexikon der Dufbausteine (1985) Haarmann and Reimer edit.. Glöss-Verlag, Hamberg

- Long HC (1924) *Plants Poisonous to Livestock*. 2nd. Ed. Cambridge University Press, Cambridge
- Longevialle P Smith DH Burlingame AL Fales HM & Highet RJ (1973a) High resolution mass spectrometry in molecular structure studies -V: The fragmentation of Amaryllis alkaloids in the crinine series. *Org. Mass Spectr.* 7: 401
- Longevialle P Fales HM Highet RJ & Burlingame AL (1973b) High resolution mass spectrometry in molecular structure studies -VI: The fragmentation of Amaryllis alkaloids in the crinine series. Compounds bearing a hydroxyl substituent at C-11 (and some 11-oxo derivatives). *Org. Mass Spectr.* 7: 417
- Loo A & Richard H (1988) A study on narcissus absolute composition. In: Lawrence BM Mookherjee BD & Willis BJ (Eds.). *Flavors and Fragrances: A World Perspective*. Proc. 10th Int. Congr. Ess. Oils, Frags. Flavs. Developments in Food Science, 18: 355
- Lüders G (1977) Die narzissenkrankheit der gärtner. *Hautarzt*. 11 (supp): 49
- Lyle RE Kielar EA Crowder JR & Wildman WC (1960) The alkaloids of *Nerine bowdenii* W. Watts and *Crinum moorei* J. D. Hook. *J. Am. Chem. Soc.* 82: 2620
- Mann JD Fales HM & Mudd SH (1963) Alkaloids and plant metabolism. VI. O-methylation in vitro of norbelladine, a precursor of Amaryllidaceae alkaloids. *J. Biol. Chem.* 238: 3820
- Mothes K Schütte HR & Lückner M (1985) *Biochemistry of Alkaloids*. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin
- Moyenehan TM Schofield K Jones RAY & Katrizky RA (1962) The synthesis and stereochemistry of quinolizidine and the monoethylquinolizidines, and of their salts and quaternary salts. *J. Chem. Soc.* 2637
- Nieto Feliner G (1985) *Flora orófila del SW de León*. Ruizia. 201
- Nightingale GT & Robbins WR (1928) Some phases of nitrogen metabolism in *Polyanthus narcissus* (*Narcissus tazetta*). *New Jersey Agric. Exp. Stat. Bull.*: 472
- Numata A Takemura T Ohbayashi H Katsuno T Yamamoto K Sato K & Kobayashi S (1983) Anthifeedants for the larvae of the yellow butterfly, *Eurema hecabe* Mandarina in *Lycoris radiata*. *Chem. Pharm. Bull.* 31: 2146
- Okamoto T Torii Y & Isogai Y (1968) Lycoricidinol and lycoricidine, new plant-growth regulators in the bulbs of *Lycoris radiata* Herb. *Chem. Pharm. Bull.* 16: 1860
- Overton SG (1926) Dermatitis from handling flower bulbs. *Lancet*, 2: 1003

- Pabuççuoglu V Richomme P Gözler T Kivçak B Freyer AJ & Shamma M (1989) Four new crinine-type alkaloids from *Sternbergia* species. *J. Nat. Prod.* 52: 785
- Piozzi F Fuganti C Mondelli G & Ceriotti G (1968) Narciclasine and narciprimine. *Tetr. Lett.* 24: 1119
- Polunin O (1981) *Guía de Campo de las Flores de Europa.* (1982). Omega, Barcelona
- Pugsley HW (1933) A monograph of *Narcissus* subgenus *Ajax*. *J. Roy. Hort. Soc.* 58: 17
- Quirion JC Husson HP Weniger B Jiménez F & Zanoni TA (1991) (-)-3-O-Acetylnarcisidine, a new alkaloid from *Hippeastrum puniceum*. *J. Nat. Prod.* 54: 1112
- Ramstad E (1953) Über das vorkommen und die verbreitung von chelidonsäure in einigen pflanzenfamilien. *Pharm. Acta Helv.* 28: 45
- Richomme P Pabuççuoglu V Gözler T Freyer AJ & Shamma M (1989) (-)-siculinine: a lycorine-type alkaloid from *Sternbergia sicula*. *J. Nat. Prod.* 52: 1150
- Sañudo A (1984) Estudios citogenéticos y evolutivos en poblaciones españolas del género *Narcissus* L. Sect. *Pseudonarcissus* DC. Nota previa: número de cromosomas. *Anal. Jard. Bot. Madrid.* 40: 361
- Schnoes HK Smith DH Burlingame AL Jeffs PW & Döpke W (1968) Mass spectra of Amaryllidaceae alkaloids: The lycorenine series. *Tetrahedron.* 24: 2825
- Sellés M (1993) Contribució a l'Estudi de la Composició Alcalòidica de *Narcissus asturiensis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona
- Singh RP & Pant NC (1980) Lycorine- a resistance factor in the plants of subfamily Amaryllidoideae (Amaryllidaceae) against desert locust, *Schistocerca gregaria* F. *Experientia.* 36: 552
- Smith WH & Parker JC (1966) The effect of temperature upon intensity of color in the coronas of cut blooms of narcissus var. *Soleil d'Or*. *Ann. Appl. Biol.* 58: 193
- Suau R Rico R García AJ & Gómez AI (1990a) New Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus papyraceus* Ker-Gawler. *Heterocycles.* 31: 517
- Suau R Gómez AI Rico R Vázquez Tato MP Castedo L & Riguera R (1990b) Alkaloid N-oxides of Amaryllidaceae. *Phytochemistry.* 27: 3285
- Suau R Gómez AI Rico R (1990c) Alcaloides de *Lapiedra martinezii*. *An. Quím.* 86: 672
- Van Damme EJM Allen AK & Peumans WJ (1988) Related mannose-specific lectins from different species of the family Amaryllidaceae. *Physiol. Plant.* 73: 52

- Van Damme EJM & Peumans WJ (1990) Isolectins in *Narcissus*: complexity, inter- and intraspecies differences and developmental control. *Physiol. Plant.* 79: 1
- Van Damme EJM Goldstein IJ & Peumans WJ (1991) A comparative study of mannose-binding lectins from the Amaryllidaceae and Alliaceae. *Phytochemistry.* 30: 509
- Vickery HB Pucher GW Wakeman AJ & Leavenworth CS (1946) Chemical investigations of the metabolism of plants. 1. The nitrogen nutrition of *Narcissus poeticus*. *Conn. Agric. Exp. Stat. Bull.*: 496
- Vigneau C Tsao J Ducluceau R & Galzot J (1984) Deux cas cliniques d'intoxication par la jonquille. *J. Toxicol. Med.* 1: 21
- Viladomat F Bastida J Tribó G Codina C & Rubiralta M (1990) Alkaloids from *Narcissus bicolor*. *Phytochemistry.* 29: 1307
- Walsh D (1910) Investigation of a dermatitis amongst flower-pickers in the Scilly Islands, the so-called "lily rash". *Br. Med. J.* 11: 854
- Webb (1980) *Flora Europaea*. (Vol. 5) Ed. Tutin TG et al. Cambridge University Press, Cambridge
- Wildman WC & Heiner NE (1967) Alkaloid biosynthesis and interconversions. The conversion of caranine to lycorine. *J. Am. Chem. Soc.* 89: 5265
- Wildman WC & Bailey (1969) Amaryllidaceae interconversions. Partial syntheses of [2] benzopyrano [3,4-c] indoles. *J. Am. Chem. Soc.* 91: 150