



Universidad de Los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Postgrado en Química de Medicamentos
Opción Productos Naturales



Análisis químico y evaluación de actividades biológicas de los extractos metanólicos y alcaloidales de diferentes especies del género *Crinum* (Amaryllidaceae) recolectadas en los Municipios Alberto Adriani, Libertador y Santos Marquina del estado Mérida

Trabajo de grado para optar al título de Magister Scientiae en Química de Medicamentos

Autora: Gina Lisbeth Achito Mina, Lcda. en Educ. Men. Química

Tutora: Dra. Janne del Carmen Rojas Vera, *PhD*

Octubre, 2019

Mérida-Venezuela

C.C.Reconocimiento

Resumen

En la presente investigación se realizó el estudio fitoquímico de las especies *C. amabile* (CA), *C. erubescens* (CE), *C. moorei* (CM) y *C. latifolium* (CL), (Amaryllidaceae) colectadas en diferentes localidades del estado Mérida (Venezuela). El análisis cualitativo de los extractos metanólicos de las hojas y bulbos de estas especies mostraron abundante presencia de alcaloides, moderada para compuestos fenólicos, glicósidos y flavonoides, mientras que, las saponinas, cumarinas, antraquinonas, triterpenos y esteroides se observaron en menor proporción. Los extractos metanólicos fueron sometidos a tratamiento ácido/base para obtener las fracciones alcaloidales, las cuales fueron analizadas por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, lográndose identificar 56 alcaloides, de los cuales 30 son de estructuras conocidas. De los alcaloides identificados, ambelina mostró ser el más abundante 21,0 %, seguido por licorina 18,5 %. Los resultados de la actividad citotóxica *In Vitro* de los extractos metanólicos y alcaloidales de las especies en estudio mediante el ensayo de letalidad contra nauplios de *A. salina*, mostraron un aumento del porcentaje de mortalidad dependiente de la concentración de los extractos. De las 16 muestras valoradas y clasificadas por su toxicidad de acuerdo a los parámetros del CYTED, se encontró que los extractos alcaloidales de los bulbos de CL, CE, CA y hojas de CA fueron los más tóxicos (CL₅₀ entre 38,06 y 96,90 ppm) al compararlos con el control positivo DDSS (13,11 ppm). Con respecto a la actividad antibacteriana, el posible sinergismo entre los compuestos presentes en la mezcla pudo haber incidido en la inhibición del crecimiento de las bacterias *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* y *K. pneumoniae* observado en los extractos alcaloidales de CM (bulbos, CIM entre 120 y 270 mg/mL) y los extractos metanólicos (CIM entre 250 y 320 mg/mL); actividad moderada fue observada en los extractos de CA contra *S. aureus*, *E. coli* y *K. pneumoniae* (hojas, CIM entre 200 y 290 mg/mL) y frente a *S. aureus* y *E. faecalis* en el extracto metanólico de las hojas y bulbos (CIM entre 200 y 470 mg/mL). En relación a la inhibición enzimática de los extractos alcaloidales frente a las enzimas AChE y BuChE, se observó que las hojas de CA y CE mostraron el mayor poder inhibidor frente a la enzima AChE con valores de IC₅₀ de 0,88 y 1,75 µg/mL y para la enzima BuChE, CA (IC₅₀ 4,46 µg/mL); valores cercanos al compuesto de referencia Galantamina® (0,48 y 3,70 µg/mL). Mientras que, los extractos de bulbos de CA y CE presentaron actividad moderada frente a AChE (IC₅₀ 2,44 y 3,27 µg/mL) y para BuChE el extracto de CE mostró inhibición a la concentración de 8,92 y 9,03 µg/mL. La presencia de los AAs 1-*O*-acetillicorina, licorina, epivittatina, crinina, epibufanisisina, crinamina, entre otros, con efectos inhibidores demostrados frente a AChE, pudieron contribuir con los resultados observados en este estudio. Los extractos evaluados en la presente investigación revelaron actividad inhibidora frente a ambas enzimas, por tanto, podrían considerarse como una alternativa terapéutica para la enfermedad de Alzheimer (EA). Además, la elevada actividad frente a la enzima acetil colinesterasa observada en el

extracto de **CA**, indica que dicha especie podría considerarse como posible fuente de moléculas bioactivas.

Abstract

Phytochemical study was carry out with *C. amabile* (**CA**), *C. erubescens* (**CE**), *C. moorei* (**CM**) and *C. latifolium* (**CL**), (Amaryllidaceae) species, collected from different locations at Merida State (Venezuela) in present investigation. Qualitative analysis of methanol extracts from bulbs and leaves of these species showed abundant presence of alkaloids, moderate to phenolic compounds, glycosides and flavonoids, while saponins, coumarins, anthraquinones, triterpenes and steroids were observed in minor proportions. Methanolic extracts were subjected to acid/base treatment to obtain alkaloidal fractions that where analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry, achieving the identification of 56 alkaloids from which 30 were of known structures. From the identified alkaloids, ambelline showed to be the most abundant 21.0 %, followed by lycorine 18.5 %. *In Vitro* cytotoxic activity of methanolic and alkaloidal extracts of leaves and bulbs of species under study, measured through *A. salinanauplius* lethality assay, showed an even increase mortality percentage depending on the extracts concentration. Through 16 assayed and classified samples, regarding toxicity in accordance to the CYTED standard values, it was found that alkaloidal bulbs fractions of **CL**, **CE**, **CA** and leaves of **CA** were the most toxic samples (CL_{50} between 38.06 and 96.90 ppm) comparing to the positive control DDSS (13.11 ppm). With respect to antibacterial activity, a possible synergism between compounds present in the mixture might have had effect on the growth inhibition of *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* and *K. pneumoniae* bacteria observed in alkaloid extracts of **CM** (bulbs, MIC between 120 and 270 mg/mL) and methanolic extracts (MIC between 250 and 320 mg/mL); moderate activity was observed in **CA** extracts against *S. aureus*, *E. coli* and *K. pneumoniae* bacterial strains (leaves, MIC between 200 and 290 mg/mL) and against *S. aureus*, *E. faecalis* for methanolic extract of leaves and bulbs (MIC between 200 and 470 mg/mL). Regarding enzymatic inhibition of alkaloidal extracts against AChE y BuChE enzymes, it was observed that leaves extracts of **CA** and **CE** showed the best inhibition capacity against AChE with IC_{50} values of 0.88 and 1.75 μ g/mL while for BuChE, **CA** (IC_{50} 4.46 μ g/mL); these values are very close to Galantamina® used as reference drug (0.48 y 3.70 μ g/mL). In addition, bulb extracts of **CA** and **CE** showed a moderate activity against AChE (IC_{50} 2.44 and 3.27 μ g/mL) and for BuChE the **CE** extract showed inhibition at concentration of 8.92 and 9.03 μ g/mL. Presence of AAs 1-*O*-acetyllycorine, lycorine, epivittatine, crinine, epibuphanisine, crinamine, among others, with proved inhibitory effect against AChE, might have contributed to the results observed in present study. All extracts assayed in current investigation revealed inhibitory activity against both enzymes, thus, it could be considered as a therapeutic alternative for the Alzheimer disease (EA).

Furthermore, the strong activity observed against acetylcholinesterase in **CA** extract, might indicate that, this species could be considered as possible source of bioactive molecules.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AAs: alcaloides Amaryllidaceae.	CoA: coenzima A.
ACh: acetilcolina.	COX-1: enzima ciclooxigenasa-1.
AChE: acetilcolinesterasa.	COX-2: enzima ciclooxigenasa-2.
ADN: ácido desoxirribonucleico.	CP: <i>Crinum powellii</i> .
APG: grupo para la filogenia de las angiospermas.	CPR: <i>Crinum pronkii</i> .
b: bulbos.	CZ: <i>Crinum zeylanicum</i> .
BJ: <i>Brunsvigia josefinae</i> .	DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.
BuChE: butirilcolinesterasa.	EA: enfermedad de Alzheimer.
C.: <i>Crinum</i> .	FDA: administración de drogas y alimentos.
CA: <i>Crinum amabile</i> .	GABA: ácido gamma amino butírico.
CAM: <i>Crinum americanum</i> .	Glc: glucosa.
CAS: <i>Crinum asiaticum</i> .	GP: <i>Galanthus plicatus</i> .
CAU: <i>Crinum augustum</i> .	NT: <i>Narcissustrandrus</i> .
CB: <i>Crinum bulbispermum</i> .	h: hojas.
CE: <i>Crinum erubescens</i> .	HA: <i>Hippeastrum aulicum</i> .
CF: <i>Crinum firmifolium</i> .	HPLC: cromatografía líquida de alta resolución.
CG/EM: cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.	IC₅₀: concentración efectiva media máxima.
CH: <i>Crinum hardyi</i> .	IUPAC: Unión Internacional para Química Pura y Aplicada.
CIM: concentración inhibitoria mínima.	L.: Linnaeus.
CJ: <i>Crinum jagus</i> .	LA: <i>Lycoris aurea</i> .
CK: <i>Crinum kirkii</i> .	m s. n. m.: metros sobre el nivel del mar.
CL: <i>Crinum latifolium</i> .	Nic: nicotinato.
CL₅₀ = concentración letal media.	NMDA: N-metil-D-aspartato.
CM: <i>Crinum moorei</i> .	Palm: palmitoil.
CMW: <i>Crinum macowanii</i> .	
CO: <i>Cyrtanthus obliquus</i> .	

ppm: partes por millón.

PTZ: pentilentetrazol.

RMN: resonancia magnética nuclear.

SNC: sistema nervioso central.

Xil: xilosido.

www.bdigital.ula.ve

C.C.Reconocimiento

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
ÍNDICE DE ANEXOS.....	iv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
II.1. Descripción botánica de la especie en estudio.....	3
II.1.1. Familia Amaryllidaceae.....	3
II.1.2. Género <i>Crinum</i> L.....	3
II.1.3. Especie <i>Crinum amabile</i> Roxb. ex Steud, Steudel.....	5
II.1.4. Especie <i>Crinum erubescens</i> Kunth.....	6
II.1.5. Especie <i>Crinum latifolium</i> L.....	7
II.1.6. Especie <i>Crinummoorei</i> Hook F.....	8
II.2. Distribución geográfica del género <i>Crinum</i> a nivel mundial y en Venezuela.....	9
II.3. Enfermedad de Alzheimer.....	11
II.3.1. Tratamiento de la EA.....	12
II.3.2. Hipótesis colinérgica.....	12
II.3.3. Efecto y degradación de la acetilcolina.....	12
II.3.4. Enzimas: acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa.....	12
II.3.5. Inhibidores de la acetilcolinesterasa.....	13
II.4. Composición química del género <i>Crinum</i> L.....	13
II.4.1. Alcaloides.....	14
II.4.1.1. Esqueleto tipo licorina.....	14
II.4.1.2. Esqueleto tipo homolicorina.....	17
II.4.1.3. Esqueleto tipo crinina.....	18
II.4.1.4. Esqueleto tipo hemantamina.....	22
II.4.1.5. Esqueleto tipo narciclasina.....	24
II.4.1.6. Esqueleto tipo tazetina.....	25
II.4.1.7. Esqueleto tipo galantamina.....	26
II.4.1.8. Esqueleto tipo montanina.....	26
II.4.1.9. Otros tipos de esqueletos en la familia Amaryllidaceae.....	27
II.4.2. Compuestos fenólicos.....	29
II.4.3. Flavonoides.....	30

II.4.4. Terpenos.....	33
II.4.5. Cumarinas	36
II.4.6. Cromonas y cromanos	37
II.4.7. Carbohidratos.....	37
II.4.8. Minerales.....	38
II.5. Estudios de actividad biológica reportados para el género <i>Crinum</i> L.	38
II.6. Usos etnobotánicos.....	44
III. Hipótesis.....	48
IV. Objetivos.....	48
IV.1. Objetivo general.....	48
IV.2. Objetivos específicos.....	48
V. Parte experimental.....	49
V.1. Materiales y métodos.....	49
V.1.1. Recolección del material botánico.....	49
V.1.1.1. Determinación taxonómica del material vegetal	49
V.1.1.2. Selección y división del material vegetal.....	49
V.1.1.3. Secado, molienda pesada del material vegetal.....	49
V.1.2. Extracción por maceración	50
V.1.3. Determinación cualitativa de los metabolitos secundarios.....	50
V.1.4. Obtención de las fracciones alcaloidales	53
V.1.5. Identificación de la composición alcaloidal por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG/EM).....	54
V.1.6. Ensayos para determinar actividad biológica en las especies en estudio.....	54
V.1.6.1. Ensayo de toxicidad sobre <i>Artemia salina</i>	55
V.1.6.2. Actividad antibacteriana.....	56
V.1.6.3. Actividad inhibitoria de las enzimas acetilcolinesterasas (AChE) y butirilcolinesterasas (BuChE)	57
VI. Resultados y discusión	59
VI.1. Análisis cualitativo de los metabolitos secundarios presentes en especies de <i>Crinum</i> L.	59
VI.2. Identificación de la composición química por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG/EM).....	62
VI.3. Pruebas de actividad biológica	69
VI.3.1. Ensayo de letalidad sobre <i>Artemia salina</i>	69

VI.3.2. Actividad antibacteriana de los extractos metanólicos y alcaloidales obtenidos de las especies en estudio	74
VI.3.3. Actividad inhibitoria de las enzimas acetilcolinesterasas y butirílcolinesterasas	78
VII. Conclusiones	82
VIII.Referencias bibliográficas	84
IX. Anexos	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Partes: flor y bulbo de <i>C. amabile</i> Roxb. ex. Steud.....	6
Figura 2.- Partes aéreas: flor, flores y hojas de <i>C. erubescens</i> Kunth	7
Figura 3.- Partes:floral, hojas y bulbo de <i>C. latifolium</i> L.....	8
Figura 4.- Partes: floral y bulbo de <i>C. moorei</i> Hook F.....	9
Figura 5.- Distribución mundial de especies del género <i>Crinum</i> L.....	10
Figura 6.- Distribución en Venezuela de especies del género <i>Crinum</i> L.	10
Figura 7.- Fraccionamiento ácido/base para la obtención de extractos ricos en alcaloides de hojas y bulbos de especies del género <i>Crinum</i> L.....	53
Figura 8.- Porcentaje de abundancia de alcaloides totales presentes en hojas y bulbos de especies <i>Crinum</i> por CG/EM.....	65
Figura 9.- Porcentaje de abundancia de los tipos de alcaloides presentes en hojas y bulbos de especies <i>Crinum</i> por CG/EM.....	65
Figura 10.- Porcentajede alcaloides detectadosen las hojas y bulbos de especies <i>Crinum</i> por CG/EM.....	68
Figura 11.- Porcentaje (%) de letalidadde los extractos metanólicos de especies de <i>Crinum</i> ensayadas en diferentes concentraciones expresadas en µg/mL	70
Figura 12.- Porcentaje (%) de letalidad de los extractos alcaloidales de especies de <i>Crinum</i> ensayadas en diferentes concentraciones expresadas en µg/mL	71
Figura 13.- Clasificación expresada en porcentaje de los extractos de <i>Crinum</i> según los parámetros toxicidad del CYTED	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Especies del género <i>Crinum</i> L. observadas en Venezuela	11
Tabla 2.- Alcaloides tipo licorina aislados de especies dela familia Amaryllidaceae	15
Tabla 3.- Alcaloides tipo homolicorina aislados de especies del género <i>Crinum</i> , familia Amaryllidaceae.....	18

Tabla 4.- Alcaloides tipo crinina aislados de especies de la familia Amaryllidaceae	19
Tabla 5.- Alcaloides tipo hemantamina aislados de especies de la familia Amaryllidaceae.	23
Tabla 6.- Alcaloides tipo narciclasina aislados de especies del género <i>Crinum</i> , familia Amaryllidaceae.....	25
Tabla 7.- Alcaloides tipo tazetina aislados de especies del género <i>Crinum</i> , familia Amaryllidaceae.....	25
Tabla 8.- Alcaloides tipo galantamina aislados de especies del género <i>Crinum</i> , familia Amaryllidaceae.....	26
Tabla 9.- Otros tipos de alcaloides no típicos aislados en la familia Amaryllidaceae.....	27
Tabla 10.- Fenóles aislados en especies del género <i>Crinum</i> , familia Amaryllidaceae	30
Tabla 11.- Flavonoides aislados en especies del género <i>Crinum</i> , familia Amaryllidaceae..	31
Tabla 12.- Triterpenos y esteroides aislados en especies del género <i>Crinum</i> , familia Amaryllidaceae.....	35
Tabla 13.- Cumarina aislada en especies del género <i>Crinum</i> , familia Amaryllidaceae	36
Tabla 14.- Cromonas aisladas en especies del género <i>Crinum</i> , familia Amaryllidaceae	37
Tabla 15.- Especies del género <i>Crinum</i> L. y sus usos etnobotánicos a nivel mundial	45
Tabla 16.- Procedimiento para el tamizaje fitoquímico que se realizaran en los extractos metanólicos de especies del género <i>Crinum</i> L.	51
Tabla 17.- Resultados de la obtención del extracto metanólico de las distintas especies de <i>Crinum</i>	59
Tabla 18.- Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos metanólicos de especies del género <i>Crinum</i>	60
Tabla 19.- Identificación de los alcaloides presentes en hojas y bulbos de especies de <i>Crinum</i> por CG/EM	63
Tabla 20.- Valores de CL ₅₀ para los extractos de hojas y bulbos de las especies <i>Crinum</i> contra nauplios de <i>Artemia salina</i>	70
Tabla 21.- Resultados de la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos y alcaloidales de las especies del género <i>Crinum</i>	75
Tabla 22.- Resultados de la actividad inhibidora de AChE y BuChE de especies <i>Crinum</i> ...	78

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.- Representación de las localidades de recolección en el estado Mérida	95
Anexo 2.- Biosíntesis de los tipos de esqueletos principales en la familia Amaryllidaceae.	96

I. INTRODUCCIÓN

Desde la aparición de los seres humanos en el planeta, las plantas se han empleado con fines biológicos (alimenticio, salud y habitáculo) o cultural (religioso, mágico, filosófico, artístico y en el uso de emblemas u ornamentos para el hogar). El descubrimiento del Nuevo Mundo en el siglo XVI por los europeos, es consecuencia de la búsqueda de especímenes vegetales lo cual condujo a las colonizaciones y conquista de territorios. Desde entonces y hasta la presente fecha, el reino vegetal ha jugado un papel importante en la economía de las naciones a nivel mundial. En este contexto, en la actualidad existe un gran interés por el estudio de especies botánicas del orden Asparagales como lo es la familia Amaryllidaceae, particularmente el género *Crinum* L., uno de los más representativos por su prometedor e inagotable potencial curativo.

Las especies del género *Crinum* L. se conocen comúnmente como “lirios de agua”, su distribución es Pantropical, aunque es nativa del continente africano. Esta planta se emplea en África en la medicina tradicional para tratar distintas dolencias corporales como alergias, enfermedades tumorales, inflamaciones, heridas, forúnculos, tos, mucosidad, fiebre, como laxante, diurético, diaforético, antiasmático, antipalúdico, antienvjecimiento, sedante, para el tratamiento de artritis, lesiones óseas, infecciones de la piel, epilepsia, convulsiones, ansiedad, psicosis, entre otros. En Venezuela, el género *Crinum* se encuentra ampliamente distribuido en todo el territorio, frecuentemente en regiones como llanuras, mesetas, desiertos e incluso en zonas elevadas, a consecuencia de su evolución y adaptación a condiciones climáticas severas, como las cordilleras andinas. Al igual, que en Venezuela y la mayor parte del continente americano, su uso es principalmente ornamental y se les observa en parques, plazas, jardines, viveros, entre otros.

Investigaciones recientes sobre la elucidación de compuestos químicos en las especies del género *Crinum* L. evidencian la presencia de alcaloides de núcleo isoquinolina característicos de la familia Amaryllidaceae. Con relación a las actividades farmacológicas los estudios han revelado propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antibacterianas, hepatoprotectoras, antialérgicas, citotóxicas frente a varias líneas celulares, comocicatrizante y en la reducción del período de epitelización, entre otros.

Por otra parte, la demencia afecta a alrededor de 50 millones de personas en todo el mundo, 60-70% de los cuales padecen EA (Enfermedad de Alzheimer), considerada una enfermedad incapacitante, degenerativa y mortal, por ello, el AA más importante es la galantamina por su potencial actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa. Sin embargo, esta terapia clínica ofrece solo efecto paliativo, siendo indispensable investigar sobre un tratamiento efectivo.

La presente investigación tiene como principal objetivo identificar y cuantificar los alcaloides presentes en las especies: *C. amabile*, *C. erubescens*, *C. latifolium* y *C. moorei*, mediante pruebas fitoquímicas cualitativas y el análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas. Asimismo, se estudió la actividad antibacteriana, ecocitotóxica y la actividad inhibitoria sobre las enzimas acetilcolinesterasa y butirícolinesterasa en los extractos alcaloidales y metanólicos de las hojas y bulbos de las especies mencionadas, con la finalidad de evaluar su potencial biológico.

En base a las consideraciones planteadas, se presentará en los apartados I: Introducción, II: los antecedentes que fundamentan la base de este trabajo de investigación, III: la hipótesis, IV: el objetivo general y los objetivos específicos, V: la metodología experimental con las distintas actividades a ejecutar en el transcurso de la investigación, VI: resultados y discusión de las actividades realizadas, VII: conclusiones, VIII: referencias bibliográficas y IX: anexos.

II. ANTECEDENTES

II.1.-Descripción botánica de la especie en estudio

II.1.1.-Familia Amaryllidaceae

Pertenece al orden de las Asparagales (clase liliopsida), recientemente reconocida como una familia expandida que incluye las subfamilias Agapanthaceae y Alliaceae, sin embargo, conserva el nombre Amaryllidaceae sobre Alliaceae pese a que éste último es más antiguo (Jin 2016; Angiosperm Phylogeny Group (APG), 2009). Se agrupa en 15 tribus formadas por 90 géneros y aproximadamente 1600 especies (Jin, 2016; Kouam y col., 2014; Guo, 2015), encontrándose ampliamente extendida a lo largo de los trópicos, subtropicos y regiones cálidas; con mayor incidencia en la región Andina y en Suráfrica (Kouam y col., 2014; Bastida y col., 2011).

En la descripción morfológica de la familia, se distingue en el hábito: bulbos tunicados, perennes, terrestres, ocasionalmente acuáticos. Las hojas son anuales, fibrosas sésiles y lineales (raramente caulinas) o algunas veces rígidas y con forma de espada, endospermo nuclear o helobial; a veces envainando y formando un pseudotallo aéreo, generalmente glabro, raramente con tricomas. Las inflorescencias se presentan en umbelas racemosas o paniculadas, a veces con una sola flor. Presenta el escapo largo con bracteolas internas generalmente presentes y sucesivamente más cortas y más estrechas. las flores son bisexuales, grandes, vistosas, sésiles o pediceladas, perianto de seis (6) segmentos libres o unidos como pétalos, un (1) pistilo, sin tejido parietal, a veces los filamentos están conectados basalmente por un velamen coroliforme (coronal estaminal). Los frutos pueden presentarse como cápsulas dehiscentes loculicidamente o una baya cuyas semillas pueden ser de color verde, rojo, negro o azulado (Izco y col., 2004; Lawrence, 1951; Core, 1955; Meerow, 2009).

II.1.2.-Género *Crinum* L.

El género *Crinum* L. (C) pertenece a la tribu Amaryllideae Dumortier (Amaryllidaceae), considerado un grupo endémico representativo con aproximadamente 160 especies distribuidas en los trópicos y regiones templadas cálidas del mundo tales como, Asia, Australia, África y América (Tram y col., 2002b). Históricamente, Linnaeus estableció el grupo *Crinum* en 1737 reconociendo en un principio cuatro especies: *C. latifolium*, *C. asiaticum*, *C. americanum* y *C.*

africanum, sin embargo, con el tiempo se han ido agregando las diferentes especies que hoy la conforman. Cabe mencionar que, desde el comienzo han existido imprecisiones con relación a la descripción y ubicación de las especies, por ejemplo, algunas eran agrupadas en el género *Amaryllis*, otras como *C. africanum* fueron ubicadas en el género *Agapanthus*. Estas inconsistencias pudieron deberse a una mala interpretación o un reconocimiento incorrecto del material vegetal durante la preparación de los especímenes en el herbario. Por lo que, en 1806, Ker-Gawler al revisar las placas y descripciones publicadas disponibles, agrupó todas las formas conocidas de pétalos anchos en un grupo llamado *Amaryllis ornate*, un clan K-G ornamentado y del cual el nombre fue propuesto por Linneo en 1782 (Yakandawala & Samarakoon, 2006).

Entre 1800 y 1830, se recolectaron varias especies de *Crinum* de la India, África occidental y el Caribe, las mismas fueron colectadas por diferentes investigadores, lo que condujo a la determinación de las especies con diferentes interpretaciones, dándole varios nombres botánicos a una misma especie. Con el tiempo, estudios del género realizados por Salisbury (1805), Hooke (1892) y Herbert (1820) contribuyeron a ordenar y reclasificar las especies. En 1837, Herbert redefinió el género reconociendo 46 especies y dividiéndolo en dos secciones, Patentes y Semipatentes; estos autores se basaron en los caracteres morfológicos de la flor y el follaje para su agrupación. No obstante, fue Baker en 1888, quien dividió el género en tres subgéneros *Stenaster*, *Platyaster* y *Codonocrinum*, mejorando la clasificación basado en aspectos florales, forma y disposición de los pétalos e incluso conservó varios nombres clásicos más antiguos (Yakandawala & Samarakoon, 2006).

En otro estudio, Traub estableció el nombre *Crinum* en vez del subgénero *Platyaster*, sin embargo, fue el investigador Hannibal quien recopiló y ordenó la documentación del género *Crinum*, en la que separa la mayoría de estas especies en sus grupos polimórficos o cladales reconocibles (Tram y col., 2002b). Por su parte, el nombre *Crinum* deriva de la palabra griega "*Krinos*", que significa pelo o cola de cometa; es necesario contemplar una flor de *Crinum* con sus largos pétalos para apreciar el significado del nombre (Yakandawala & Samarakoon, 2006). Sin embargo, otros señalan que el término proviene de la palabra griega "*krinon*" significado de "lirio blanco", haciendo honor a nombres populares: "lirio blanco", lirio de río" o "lirio de

sabana” (Maroyi, 2016; Mederos, 2015). Estas especies destacan por ser plantas de gran tamaño, perennes con bulbos carnosos que se estrechan en cuellos alargados, hojas de 30 cm de largo y 5-6 cm de ancho. Pueden llevar más de seis (6) flores con 10cm de diámetro, seis (6) sépalos grandes en varios colores como: blanco, rosado y rojo, los cuales florecen en racimos. Sus estambres pueden sobrepasar el tamaño de los pétalos y brotar de los laterales de la planta con disposición en la región terminal de un pedúnculo mayor a 50 cm. (Missouri Botanical Garden, 2018).

II.1.3.-Especie *Crinum amabile*

Crinum amabile(CA) fue reconocido por Roxburgh, William. ex Steud y publicado en Nomencl. Bot. [Steudel], ed. 2.1: 438. 1840 (IPNI, 2018). Es una especie híbrida de *C. zeylanicum* y *C. asiaticum* (Portero, 2017), de origen vietnamita (Pham y col., 1998) comúnmente conocido como “lirio” (Portero, 2017). La etimología “*amabile*” deriva del epíteto latino que significa digno de amor (Carrasco, 2017), aunque también se le atribuyen otras denominaciones como: “lirio de araña púrpura”, “lirio de *Crinum* rosado” o “lirio de araña gigante rosado”, especialmente en Ecuador (Portero, 2017; Zapata, 2017). Esta especie se encuentra distribuida a nivel mundial en zonas de temperaturas cálidas, principalmente en el continente africano y en menor proporción en las islas de Centro América (Bahamas, Cuba, La Española, Jamaica, Puerto Rico, Antillas Menores como Anguila, Santa Lucía y Margarita), en los Andes de Suramérica y el Mediterráneo (Zapata, 2017; Acevedo-Rodríguez & Strong, 2012).

Macromorfológicamente se describen como plantas herbáceas perennes, formadas por bulbos carnosos de 7-15 cm de diámetro. Hojas muy largas, planas y arrosetadas, de color rojo verdoso, de una longitud de 5-11 cm. Flores grandes cilíndricas de 2,5-7,5 cm de colores rojo, rosado o blanco de hasta 15 cm de diámetro, son muy vistosas, hermafroditas y actinomorfas. Presentan un tubo floral de aproximadamente 15 cm de largo con seis pétalos, sépalos y estambres con filamentos y anteras versátiles; el perigonio está constituido por seis pétalos unidos, formando un tubo abierto o cilíndrico (Figura 1). El fruto tiene forma de cápsula de 3,85 cm de espesor, el cual contiene las semillas (Zapata, 2017; Portero, 2017; Carrasco, 2017).



Figura 1.-Partes: flor y bulbo de *C. amabile* Roxb. ex Steud.
Fotos tomadas por: Janne Rojas, cámara Canon, lente C18-55 mm.

II.1.4.-Especie *Crinum erubescens* Kunth

Crinum erubescens (CE) descrita por F. W. H. von Humboldt, A.J.A. Bonpland & C.S. Kunth. In: Nov. Gen. Sp. (quarto ed.) 1: 279 en 1816, actualmente se considera un nombre ilegítimo, mientras que, *Crinum kunthianum* M. Roem. (In: Fam. Nat. Syn. Monogr. 4: 80. 1847) es el nombre válido. Sin embargo, *Crinum erubescens* L.f. ex Aiton (Hort. Kew. 1: 413 1789) es aceptado como sinónimo (Roskov y col., 2015; The Plant List, 2013). La palabra “*erubescens*” deriva del latín “*erubescens*” o “*erubescens*”, el cual significa se sonroja o se torna rojizo (González, 2015). Hoy en día, es descrito como un género Pantropical (Guerrieri, 2015), siendo su área de distribución en Centro América (desde Panamá al sur de México) y América del Sur (Paraguay, Brasil, Perú, Ecuador, Venezuela y Guyana) (Plants of the world online (POWO), 2018; Quattrocchi, 2012; Meerow, 2000).

Los especímenes de *C. erubescens* Kunth, Figura 2, presentan una morfología particular por ser una hierba acaule con bulbo oviforme de 7–10 cm de diámetro. Hojas sésiles, 60–90 cm de largo y 4–7 cm de ancho, lineares, de ápice obtuso. Escapo floral de 60–80 cm de alto, terminando en una umbela de 4-12 cm. Presenta valvas de la espata lanceolado-deltaideas entre 7-9 cm de largo. Flores fragantes en forma de trompeta, suberectas, interiormente blancas y de color purpura-rojizo en la parte anterior, a veces completamente blancas con brácteas libres. Tubo del perianto 10-20 cm de largo de color morado rojizo o blanco verdoso y los lóbulos del perianto 5-9 cm de largo. Filamentos de los estambres libres, rojos en su parte superior, biselados pero insertados en el mismo nivel; anteras lineares de unos 12 mm de largo. Fruto indehiscente, casi globoso,

coriáceo; semillas de 1 a varias de 2-3 cm, más o menos globosas, carnosas con una testa blanca, corchosa (Schnne y col., 2010; Meerow, 2000).



Figura 2.-Partes aéreas: flor, flores y hojas de *C. erubescens* Kunth
Fotos tomadas por: Janne Rojas, cámara Canon, lente C18-55 mm.

II.1.5.-Especie *Crinum latifolium* L.

Crinum latifolium (CL) fue una de las cuatro especies reconocidas por Carl Linnaeus en 1753 cuando se estableció el grupo *Crinum* (Yakandawala & Samarakoon, 2016; IPNI, 2018). Etimológicamente *latifolium* es un equivalente de “*latifolia*” un epíteto latino que significa “con las hojas anchas” (González, 2015), su distribución nativa es desde la India al sur de China (POWO, 2018). Esta especie botánica presenta los siguientes caracteres morfológicos: un hábito vertical con hojas erectas con una altura distintiva que oscila entre de 40-150 cm. Los bulbos son ovoides o subesféricos, 8-15 cm de ancho, estrechado en un vástago falso robusto de hasta 25 cm de largo. Las hojas 12-20, 60-125 x 4-7 cm, algo estrechas y siempre flácidas, loradas, acuminadas, en su mayoría planas, a veces algo onduladas, de color verde brillante, más pálidas por el envés, con las venas longitudinales claramente marcadas, brillantes, carnosas, estrechamente canalizadas en el medio (Yakandawala & Samarakoon, 2006; Dassanayake, 2000).

Posee pedúnculos largos de 60-125 cm de largo, 2-3 cm de ancho, son de color verde violáceo o verde con un matiz purpurino o completamente púrpura, fuertemente comprimido hacia el final. Brácteas de 5-7 cm de largo, muy ovadas, purpúreas y persistentes. Bractéolas lineales, 10 cm x 3-4 mm. Pedicelo entre 5-8 mm de largo. Perianto en forma de embudo, tubo de 9-13 cm de largo, verde purpúreo proximalmente, verde pálido distalmente, curvado; extremidad de 10-15 cm de ancho; segmentos de 10-13 x 2,5-3,5 cm, lanceolados o estrechamente elípticos, agudos u

obtusos, algo retusivos, a menudo apiculados o poco caudados, blancos, con tinción media purpúrea amplia desde la base hasta el ápice, tornándose más oscuro en el exterior (Yakandawala & Samarakoon, 2006; Dassanayake, 2000).

Los estambres declinan filamentos de 5,5-9 cm de largo, blancos, púrpuras distalmente, arqueados hacia abajo y curvados hacia arriba cerca del ápice; Anteras de 2,5-3 cm de largo, lineales, que se vuelven curvas, de color gris violáceo después de la dehiscencia. Ovario oblongo, con 5 o 6 óvulos en cada lóculo. Estilo 17-23 cm de largo, declinado, blanco, púrpura distalmente. Estigma puntiforme, poco frondoso, papiloso, de color púrpura. Los brotes florales de 10-20 cm son más largos y ligeramente más delgados (Yakandawala & Samarakoon, 2006; Dassanayake, 2000). Algunos caracteres se observan en la Figura 3.



Figura 3.-Partes: floral, hojas y bulbo de *C. latifolium* L.
Fotos tomadas por: Janne Rojas, cámara Canon, lente C18-55 mm.

II.1.6.-Especie *Crinum moorei* Hook F.

Crinum moorei (CM) fue descrita por primera vez por Joseph Dalton Hooke en 1874 en el Curtis's Botanical Magazine Vol. 100: Tab. 6113. (IPNI, 2018). Hasta la fecha se ha registrado una sola especie vegetal con una variedad de sinónimos (IPNI, 2018; Roskov y col., 2015; The plant list, 2013). Es nativa de Suráfrica (distribuida desde la Provincia Cabo Oriental hasta KwaZulu-Natal) e introducida en países como Irlanda, México, Ecuador, Corea del Norte y Corea del Sur (Hook, 1874; POWO, 2018).

Curtis's Botanical Magazine, fechado el 1 de agosto de 1874, refiere la siguiente descripción morfológica: "bulbo de 30,48 - 45,72 cm de largo, ovoide estrecho contraído en un cuello largo. Hojas de 30,48 - 45,72 x 10,16 cm de ancho, muy numerosas, erecto-patentes, de forma

completa, con puntas herbáceas obtusas, estrechamente estriadas con nervios fuertes, de color verde intenso y brillante. Escape más alto que las hojas, tan grueso como el pulgar, color verde. Espatas (brácteas amplias) de 15-24 cm de largo, oblongo-lanceoladas, subagudas, cóncavas, herbáceas. Flores de 6-8 en una cabeza, sésiles o muy poco pediceladas. Ovario de 2,54 cm de largo. Tubo de perianto de 7, 62 cm de largo; extremidad de 10,16 cm de diámetro, muy ancha, acanalada, color rojo rosa brillante; segmentos que se extienden casi desde la base, ampliamente elípticos, con una punta obtusa verde calloso. Estambre de 3,82 cm de largo; anteras de 1,27 cm de largo de color amarillo.” En la figura 4 se observan algunos rasgos de la flor y el bulbo de la especie *C. moorei*.(Hooke, 1874).



www.bdigital.ula.ve
Figura 4.-Partes: floral y bulbo de *C. moorei* Hook F.

Fotos tomadas por: Janne Rojas, cámara Canon, lente C18-55 mm.

II.2.-Distribución geográfica del género *Crinum* a nivel mundial y en Venezuela

El género *Crinum* L. se distribuye en los Trópicos y subtrópicos de África, Asia, América, África meridional, Madagascar, Islas Mascareñas y las Islas del Pacífico, entre otros; especialmente en áreas húmedas como bosques, bordes de ríos, pozas de temporada o salinas (Presley y col., 2016). En este sentido, Jin (2016) refiere que “la biología molecular moderna y la evidencia de la evolución filogenética han revelado que la familia evolucionó originalmente en África y se dispersó posteriormente a otros continentes, como Eurasia, Australasia y América”. Es un género que presenta una extensa hibridación (Tram y col., 2002b) y se distribuye ampliamente como se muestra en la Figura 5.

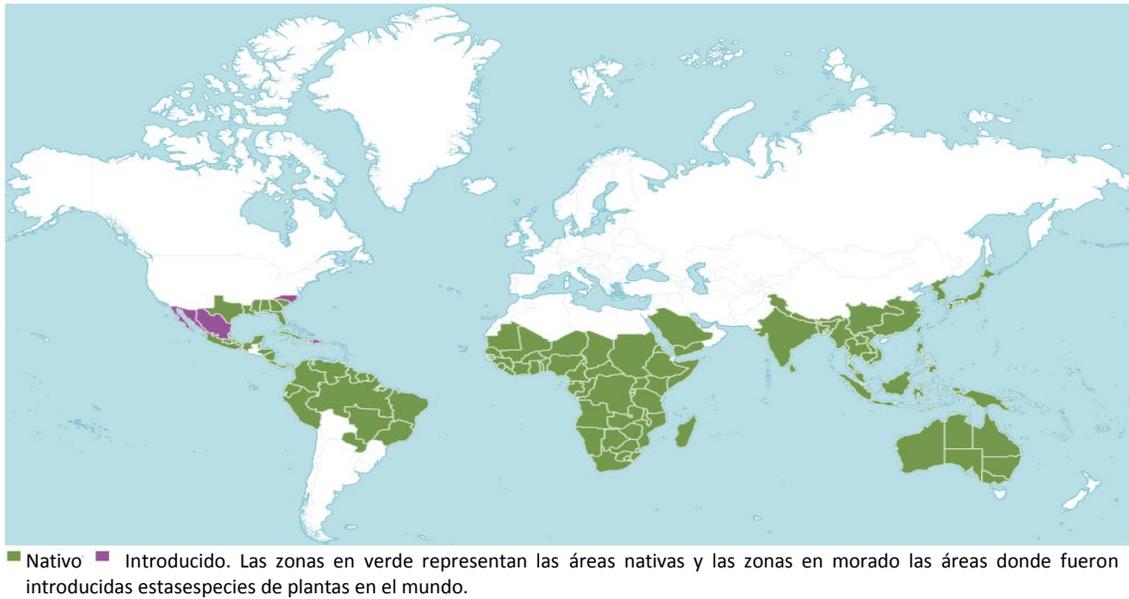


Figura 5.-Distribución mundial de especies del género *Crinum* L. (POWO, 2018)

Por su parte, Venezuela es un país suramericano que forma parte de la zona intertropical, y gracias a su ubicación, cuenta con bondadosas condiciones climáticas y de relieves, los cuales son propicios para el crecimiento de una variedad de grupos taxonómicos florales; especialmente algunas especies de la familia Amaryllidaceae abundantemente distribuidas en todo el territorio (Figura 6), las cuales se describen con más detalle en la Tabla 1.



Figura 6.-Distribución en Venezuela de especies del género *Crinum* L

Tabla 1.-Especies del género *Crinum* L. observadas en Venezuela

Nombre botánico	Nombre común	Localización	Referencia	Altitud (m s. n. m.)
	Lirio	estado Nueva Esparta (Antillas Menores)	Acevedo- Rodríguez, & Strong, 2012	media 159
<i>Crinum erubescens</i> L. f. ex Aiton nom Kunth, Hook. Kew	-	Amazona, Aragua, Carabobo, Delta Amacuro, Distrito Federal, Falcón, Lara, Sucre, Táchira, Trujillo y Zulia (introducida, cultivada y naturalizada).	Hokche y col., 2008	0 a 300
<i>Crinum granciliflorum</i> Kunth & Bouché, Ind. Sem, Hort. Bot, berol 1844	-	Aragua, Distrito Federal, Lara y Zulia		1300
<i>Crinum amabile</i> Donn-Hort. Cantabrig., 1811	-	estado Nueva Esparta	Acevedo- Rodríguez, & Strong, 2012	media 159

Elaborada por: Gina Achito, 2019.

II.3.-Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza desde el punto de vista anatómico por la disminución gradual de la sinapsis neuronal, así como la presencia de placas seniles y degeneración neurofibrilar. Es considerada la causa más frecuente de demencia en las personas de más de 65 años, con un período de duración aproximado de 2-15 años desde su diagnóstico (Donoso, 2005). Se considera como una enfermedad incapacitante y degenerativa de carácter progresivo; por lo general comienza con el deterioro de la memoria reciente con preservación de la memoria a largo plazo, lo que conduce a una disfunción cognitiva progresiva. Esta enfermedad se encuentra asociada a factores como: edad, sexo (mayor frecuencia en el sexo femenino), alelo ApoE4/ApoE4, mutaciones cromosómicas, historia familiar, bajo nivel educacional, factores de riesgo vascular, factores ambientales, entre otros (Carrasco, 2017).

II.3.1.-Tratamiento de la EA

Según los estudios realizados, la EA es una patología que no puede revertirse, hasta el momento, no existen tratamientos que promuevan la regeneración de la actividad neuronal, sin embargo, se aplican tratamientos farmacológicos que están dirigidos a mejorar los efectos cognitivos y corregir los trastornos conductuales que presentan los pacientes (Carrasco, 2017).

II.3.2.-Hipótesis colinérgica

A finales de 1960 se demostró que la insuficiencia en la generación de acetilcolina (ACh) en pacientes con EA propicia el deterioro cognitivo en el SNC, por tanto, la hipótesis colinérgica o déficit de ACh se ha convertido en una guía que ha dirigido las investigaciones de la EA al campo farmacológico. La teoría propone que al conseguir evitar la metabolización de la ACh aumentará la disponibilidad de ésta en el espacio sináptico evitando el deterioro cognitivo (Huete y López, 2009).

II.3.3.-Efecto y degradación de la acetilcolina

La acetilcolina es una amina biógena que actúa como mediador químico de los impulsos nerviosos (Korolkovas & Burckhalter, 1982), su disponibilidad en la sinapsis depende de la acetilcolinesterasa, la cual degrada la acetilcolina terminando así su acción biológica. Una vez que la acetilcolina es sintetizada, ésta se almacena en las vesículas especializadas presentes en el terminal presináptico, desde donde es liberada al espacio sináptico por acción de un impulso externo el cual causa la despolarización de la membrana neuronal. Cuando, la ACh es liberada se une a los receptores postsinápticos colinérgicos (muscarínicos y nicotínicos) generando una respuesta biológica específica del tipo de receptor activado. Posteriormente, este neurotransmisor es inactivado por la AChE liberándose colina, la cual es almacenada en la neurona presináptica (Huete y López, 2009).

II.3.4.-Enzimas: acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa

La acetilcolinesterasa es una enzima del grupo de las hidrolasas (EC. 3.1.1.7), responsable de la hidrólisis de la acetilcolina liberada, produciendo colina y acetato. En los seres humanos se localiza principalmente en los eritrocitos (no se encuentra en el plasma), neuronas colinérgicas y en la unión neuromuscular. Entre tanto, la butirilcolinesterasa o pseudocolinesterasa es una enzima

estructural y funcionalmente relacionada con la AChE, encargada de hidrolizar de forma similar la acetilcolina, ésteres de colina (p. ej. succinilcolina) y otros ésteres (p.ej. procaína). Se encuentra abundantemente en las células gliales, en el plasma, el hígado y otros tejidos y en baja concentración en las neuronas colinérgicas (Lorenzo y col., 2009, Carrasco, 2017).

II.3.5.-Inhibidores de la acetilcolinesterasa

Los primeros estudios se centraron en los denominados “vasodilatadores cerebrales”, sin embargo, en la actualidad los inhibidores de la AChE son considerados más útiles ya que prolongan la vida media de la acetilcolina en la corteza cerebral (Donoso, 2005), al inhibir la acción de la acetilcolinesterasa, enzima que degrada la AChE (Lorenzo y col., 2009). Entre los fármacos anticolinesterásicos aprobados por la FDA se tienen: Tacrina®, Donepezilo®, Rivastigmina® y Galantamina® (Huete y López, 2009), los cuales son eficaces para mejorar algunos síntomas de la EA, tales como: alucinaciones, apatía, comportamiento agresivo, sin embargo, el daño neuronal es irreversible por lo que dicha enfermedad es considerada degenerativa y mortal (Carrasco, 2017).

www.bdigital.ula.ve

II.4.-Composición química del género *Crinum* L.

La familia Amaryllidaceae está conformada por especies que biosintetizan un grupo exclusivo de alcaloides del tipo isoquinolina, los cuales se encuentran almacenados principalmente en las hojas y bulbos. Por lo general, estos compuestos se agrupan en nueve tipos de esqueletos denominados norbelladina, licorina, homolicorina, crinina, hemantamina, montanina, tazetina, narciclasina y galantamina; aunque sus estructuras varían abundantemente, estos alcaloides se consideran relacionados biogenéticamente (Bastida y col., 2011). Cabe señalar que, los alcaloides tipo crinina se aíslan exclusivamente del género *Crinum* y presentan diferencias en sus características estructurales, sin embargo, se consideran como el tipo más común entre los alcaloides aislados de éste género (Refaat y col., 2012b).

Sin embargo, al igual que todas las plantas, biosintetizan otros metabolitos secundarios que cumplen diferentes funciones. En este sentido, investigaciones fitoquímicas desarrolladas por casi 200 años sobre la familia, han permitido establecer la presencia de fitoconstituyentes, tales como:

alcaloides, glucósidos, carbohidratos, taninos, fenoles, terpenos, esteroides, saponinas, mucílagos, flavonoles (principalmente quercetina o kaempferol y quercetrina) entre otros (Font, 1962; Aziz y col., 2014; Tijani y col., 2012; Dewan & Das 2013; Watson & Dallwitz, 1992). Los metabolitos biosintetizados en las especies del género *Crinum* L. se describen a continuación.

II.4.1.-Alcaloides

Los alcaloides son metabolitos secundarios que contienen nitrógeno y por lo general forman parte de un heterociclo de carácter básico con activación fisiológica por su estructura parcial o total, proveniente de aminoácidos (Claramunt y col., 2017; Dewick, 2009). En este contexto, los alcaloides presentes en la familia Amaryllidaceae son un grupo cuantioso y exclusivo, de ahí su calificativo de “alcaloides de las Amaryllidaceae” (**AAs**), aún en expansión con aproximadamente 500 compuestos identificados en varias especies botánicas (Maroyi, 2016). Desde el aislamiento del primer alcaloide hace más de 140 años, representan un potencial grupo en desarrollo que se encuentran exclusivamente en plantas de todos los géneros de esta familia. A continuación, se describen los principales esqueletos (esquema de la biosíntesis de éstos compuestos en la familia Amaryllidaceae, anexo 2, pág. 96) en los que se clasifican los **AAs** (Bastida y col., 2011).

II.4.1.1.-Esqueleto tipo licorina

La licorina es un compuesto cuyo núcleo básico es el pirrol [d, e] fenantridina (Tabla 2); fue el primer alcaloide aislado de la familia Amaryllidaceae en 1877 de la especie *Narcissus pseudonarcissus* (Bastida y col. 2011). La biosíntesis de este alcaloide parte de la norbelladina (el precursor más importante originado a partir de la reducción de la base de Schiff) que al sufrir una reacción de *O*-metilación catalizada por enzimas metiltransferasa (MT) dependiente de S-adenosil-L-transferasa (SAM) se convierte en 4-*O*-metilnorbelladina (un importante intermediario protegido por la metilación); seguidamente, ésta se cicla por acoplamiento oxidativo del fenol en la posición *orto-para'* produciendo la norpluvina, que luego se convierte en caranina. Posteriormente, forma un intermediario epóxido, con inversión de configuración y finalmente se hidroxila en la posición 2 β para dar lugar a la licorina (**1**) y sus derivados respectivamente (Singh & Desgagné-Penix, 2014; de Andrade, 2014; Bastida y col., 2011).

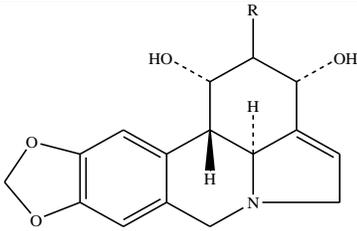
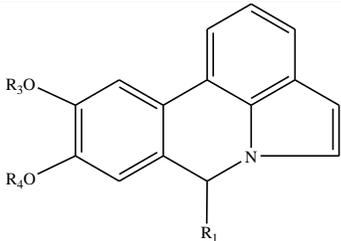
Tabla 2.-Alcaloides tipo licorina aislados de especies de la familia Amaryllidaceae

ESQUELETOS TIPO LICORINA									
N°	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Nombre	Especie	Referencia
1	OH	OH	CH ₂		βH	αH	licorina	CA CL CM CH, CPR CMW CAS CB CAM, CAU, CP, CE, CJ, CK, CZ CF	Tallini y col., 2018a; Refaat y col., 2012a. Ghosal y col., 1989; Kobayashi y col., 1984; Ghosal y col., 1983; Refaat y col., 2012a; Elgorashi y col., 2003; Fennell y col., 2003 Aldhafer y col., 2017 Maroyi, 2016; Kouam y col., 2014; Refaat y col., 2012a. Rahmatullah y col., 2014; Refaat y col., 2012a. Refaat y col., 2012a; Elgorashi y col., 2003 Refaat y col., 2012a Aldhafer y col., 2017; Refaat y col., 2012a.
2	αOH	OH	CH ₂		βH	αH	epi-licorina	CL	Refaat y col., 2012a
3	H	H	CH ₂		βH	αH	licoreno	CA	Tallini y col., 2018a
4	OH	AcO	CH ₂		βH	αH	1-O-acetillicorina	CA CL CM CK, CP CMW CB	Tallini y col., 2018a Kobayashi y col., 1984 Refaat y col., 2012a; Elgorashi y col., 2003 Refaat y col., 2012a Maroyi, 2016; Kouam y col., 2014 Elgorashi y col., 2003
5	AcO	OH	CH ₂		βH	αH	2-O- acetillicorina	CA CK, CAU	Tallini y col., 2018a Refaat y col., 2012a
6	OH	OH	CH ₂		αH	βH	(11b,11c)epi-licorina	CMW	Kouam y col., 2014
7	OH	Palm	CH ₂		βH	αH	(-) palmilicorina	CAS	Rahmatullah y col., 2014

Tabla 2.-Alcaloides tipo licorina aislados de especies de la familia Amaryllidaceae (Continuación)

N°	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Nombre	Especie	Referencia
8	OH	OH	Me	Me	β H	α H	(-) pseudolicorina	CPR	Aldhafer y col., 2017
								CAS	Refaat y col., 2012a
9	O	AcO		CH ₂	H	H	1- <i>O</i> -acetillicorin-2-ona	CL	Ghosal y col., 1989
10	H	AcO		CH ₂	β H	α H	1- <i>O</i> -acetilcaranina	CM	Refaat y col., 2012a
11	O	OH		CH ₂	H	H	licorina-2-ona	CL	Ghosal y col., 1989
12	AcO	OH	Me	H	β H	α H	sternbergina	BJ	Hoshino, 1998
13	AcO	AcO	CH ₂		β H	α H	1,2-diacetillicorina	CB	Kobayashi y col., 1984
14	AcO	AcO	CH ₂		β H	α H	(-)-1,2- <i>O</i> -diacetyllicorina	CM, CK	Refaat y col., 2012a
15	OMe	OH	Me	Me	β H	α H	galantina	CA, CM, CP	
16	OH	GlcO	CH ₂		β H	α H	licorina-1- <i>O</i> - β -D-glucósido	CL, CAS, CAU	
<p style="text-align: center;">www.digital.ula.ve</p>									
N°	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Nombre	Especie	Referencia		
17	O ⁻	CH ₂		H	ungeremina	CAS, CL, CAM, CAU	Rahmatullah y col., 2014; Refaat y col., 2012a.		
							Ghosal y col., 1989		
							Refaat y col., 2012a.		
18	O ⁻	Me	Me	H	criasbetaina	CAS	Rahmatullah y col., 2014; Refaat y col., 2012a.		
19	H	Me	Me	O	oxoasonina	CL	Tram y col., 2002a		
N°	R ₁	R ₂	R ₃	Nombre	Especie	Referencia			
20	OH	C=C		6,7,11b,11c-didehidrolicorinio	CH, CF, CPR	Aldhafer y col., 2017			
21	H	H	OMe	mooreina	CM	Elgorashi y col., 2001			

Tabla 2.-Alcaloides tipo licorina aislados de especies de la familia Amaryllidaceae (Continuación)

						
N°	R			Nombre	Especie	Referencia
22	α OH			2-epi-pancrasidina	CL	Ghosal y col., 1989
23	β OH			pancrasidina		
						
N°	R ₁	R ₂	R ₃	Nombre	Especie	Referencia
24	O	CH ₂		hipadina	CL	Ghosal y col., 1989; Ghosal y col., 1983
					CF	Aldhaer y col., 2017
					CAM, CAU, CB, CK, CP	Refaat y col., 2012a
					CE	Presley y col., 2016
					CMW	Maroyi, 2016
					CAS	Rahmatullah y col., 2014; Refaat y col., 2012a
25	H	CH ₂		11,12-dehidroanhidro-licorina	CE	Guerrieri y col., 2015
					CL	Ghosal y col., 1989
26	O	H	Me	pratorimina	CAS	Rahmatullah y col., 2014; Refaat y col., 2012a
					CL	Ghosal y col., 1983
27	O	Me	H	pratorinina	CAM, CAU, CB	Refaat y col., 2012a
					CL	
28	O	Me	Me	pratosina	CAM, CAS, CAU	Ghosal y col., 1983
					CAM, CAS	
29	O	Me	OAc	O-acetil-pratorimina	CL	

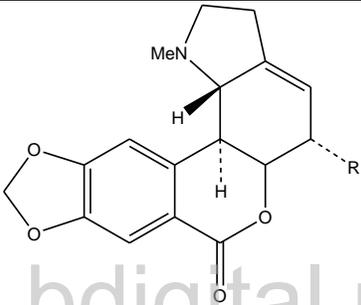
Elaborada por: Gina Achito, 2019.

II.4.1.2.-Esqueleto tipo homolicorina

Estos compuestos presentan diferencias marcadas con respecto al núcleo licorina debido al rearrreglo estructural que sufre en el proceso de biosíntesis, en el cual se forman alcaloides tipo

licorina pero con un anillo aromático, a los cuales se les conoce como homolicorina (Tabla 3). Este grupo de compuestos tiene como esqueleto básico el 2-benzopirano-[3,4-c] indol, y al igual que la licorina se originan a partir de un acoplamiento fenol-oxidativo *orto-para'*. Se forman por oxidación en la posición 6 de la norpluviína, seguido por la ruptura del enlace C-6/N y un giro de 180° para formar el hemiacetal. Después sufre metilación en el hidroxilo aromático de la posición 8 y en el nitrógeno, dando lugar al alcaloide licorenina, que subsiguientemente, por oxidación de la posición 6 se transforma en homolicorina (de Andrade, 2014; Bastida y col., 2011).

Tabla 3.-Alcaloides tipo homolicorina aislados de especies del género *Crinum*, familia Amaryllidaceae

ESQUELETOS TIPO HOMOLICORINA				
				
N°	R	Nombre	Especie	Referencia
30	OH	hipeastrina	CF	Aldhaher y col., 2017
31	H	masonina		

Elaborada por: Gina Achito, 2019.

II.4.1.3.-Esqueleto tipo crinina

Son los alcaloides más representativos del tipo crinano, encontrándose en mayor proporción en las especies del género *Crinum* del cual se han aislado y caracterizado desde el año 1987. El núcleo 5,10b-etanofenantridina constituye la estructura crinina (Tabla 4), que se caracteriza por tener el puente 5,10b-etano orientado sobre el plano (Hoshino, 1998). En la biosíntesis de este tipo de esqueletos, un paso crucial ocurre cuando la reacción de oxidación fenólica *para-para'* de la *O*-metilnorbelladina forma la oxovittatina (Guo, 2015; Bastida y col., 2011), el cual es un intermediario directo para la formación de la crinina (**32**) (Hoshino, 1998).

Tabla 4.-Alcaloides tipo crinina aislados de especies de la familia Amaryllidaceae

ESQUELETOS TIPO CRININA									
N°	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Nombre	Especie	Referencia
32	OH	CH ₂		H	H	H	crinina	CA	Tallini y col., 2018a; Refaat y col., 2012b
								CMW	Maroyi, 2016; Kouam y col., 2014
								CM	Refaat y col., 2012b; Fennell y col., 2003
								CAS	Rahmatullah y col., 2014; Refaat y col., 2012b
								CB	Refaat y col., 2012b; Elgorashi y col., 2003
								CL	Kobayashi y col., 1984
								CH, CF	Aldhafer y col., 2017
								CE, CAM, CAU, CK, CZ, CP	Refaat y col., 2012b
33	OMe	CH ₂		H	H	H	bufanisina	CA	Tallini y col., 2018a; Pham y col., 1998
								CB, CAU	Refaat y col., 2012b
34	OMe	CH ₂		OMe	H	OH	ambelina	CA	Tallini y col., 2018a; Pham y col., 1998
								CL	Hanh y col., 2018; Refaat y col., 2012b
								CAS	Rahmatullah y col., 2014; Refaat y col., 2012b
								CZ, CP	Refaat y col., 2012b
35	OMe	CH ₂		OMe	OH	H	6-hidroxi-bufanidrina	CA	Tallini y col., 2018a
								CL	Hanh y col., 2018; Tram y col., 2002a
								CZ	Refaat y col., 2012b
36	OMe	CH ₂		H	H	H	*N-óxido de bufanisina	CA	Tallini y col., 2018a

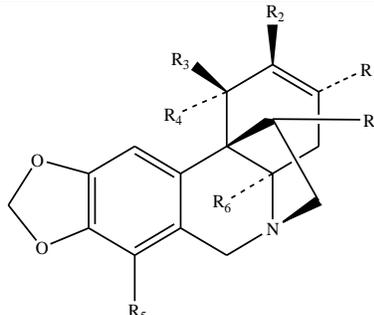
Tabla 4.-Alcaloides tipo crinina aislados de especies de la familia Amaryllidaceae (Continuación)

N°	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Nombre	Especie	Referencia
37	OAc	CH ₂		H	H	H	3- <i>O</i> -acetilcrinina	CMW	Maroyi, 2016;
								CM	Elgorashi y col., 2001
38	OMe	CH ₂		OMe	H	H	bufanidrina	CE	Refaat y col., 2012 b
								CMW	Maroyi, 2016; Refaat y col., 2012 b
								CL	Tram y col., 2002 a
39	OH	CH ₂		OMe	H	H	powelina	CMW	Maroyi, 2016
								CM	Refaat y col., 2012 b , Fennell y col., 2003
								CB	
								CL	Tram y col., 2002 a ; Kobayashi y col., 1984
CE, CP, CAS,	Refaat y col., 2012 b								
40	OH	Me	H	H	H	H	macowina	CMW	Maroyi, 2016;
								CK	Refaat y col., 2012 b
41	OH	CH ₂		OMe	OH	H	powelina-6-hidroxi	CL	Tram y col., 2002 a
42	OAc	CH ₂		H	H	H	<i>O</i> -acetilcrinina	CB	Kobayashi y col., 1984
43	OMe	CH ₂		OMe	H	OAc	11- <i>O</i> -acetilambelina	CL	Refaat y col., 2012 b
44	OMe	CH ₂		OMe	H	ONic	filifolina	CL	Hanh y col., 2018
45	H	CH ₂		H	H	OH	1,2-didehidrocrinan-11-ol	CL	Tram y col., 2002 b
46	OMe	CH ₂		OMe	OMe	H	6 α -metoxibufanidrina	CO	Jin & Xu, 2013
N°	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄			Nombre	Especie	Referencia
47	OMe	H	OMe	H			undulatina	CA	Tallini y col., 2018 a
								CL	Hanh y col., 2018; Tram y col., 2002 a
								CMW, CM	Maroyi, 2016; Refaat y col., 2012 b ; Elgorashi y col., 2003; Fennell y col., 2003
								CB	Elgorashi y col., 2003
								CP	Refaat y col., 2012 b

Tabla 4.-Alcaloides tipo crinina aislados de especies de la familia Amaryllidaceae (Continuación)

48	OMe	H	H	H	augustina	CA	Tallini y col., 2018a; Pham y col., 1998
						CAM, CAU	Refaat y col., 2012b
49	OMe	H	H	H	*N-óxido de augustina	CA	Tallini y col., 2018a
50	OMe	OMe	OMe	H	6-metoxiundulatina	CL	Hanh y col., 2018
51	OH	OMe	OMe	H	6-metoxicrinamidina		
52	OMe	H	OMe	H	*N-óxido de undulatina		
53	OH	H	OMe	H	crinamidina	CL	Hanh y col., 2018; Tram y col., 2002a
						CMW	Maroyi, 2016; Refaat y col., 2012b
						CE	Refaat y col., 2012b
						CM	
						CP	
CB	Kobayashi y col., 1984; Ghosal y col., 1983						
54	OH	H	H	H	flexinina	CAS	Rahmatullah y col., 2014
						CE, CK, CAM, CAU	Refaat y col., 2012b
						CA	Pham y col., 1998
55	OH	OH	OMe	H	6- α -hidroxi-crinamidina	CL	Refaat y col., 2012b Tram y col., 2002a
						CA	Pham y col., 1998
56	OMe	OH	OMe	H	6-hidroxiundulatina	CL	Hanh y col., 2018; Tram y col., 2002a
						CMW, CP	Refaat y col., 2012b
57	OMe	H	OMe	OH	1 β -2 β -epoxiamelina	CL	
						CAS, CAU	
58	OMe	H	OMe	OAc	11-O-acetil-1,2- β -epoxiamelina	CL	

Tabla 4.-Alcaloides tipo crinina aislados de especies de la familia Amaryllidaceae (Continuación)

										
N°	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	Nombre	Especie	Referencia
59		CH ₂	H	OH	OMe	H	H	bufanamina	CMW	Maroyi, 2016
60	H	OH	OH	H	H	H	H	4 α -dehidroxi-crinamabina	CA	Pham y col., 1998
									CMW	Maroyi, 2016; Refaat y col., 2012b
61	H	OH	OH	H	OMe	H	H	1-epideacetil-bowdensina	CM	Elgorashi y col., 2003; Fennell y col., 2003
									CMW	Maroyi, 2016; Elgorashi y col., 2003
									CB	Elgorashi y col., 2003
62	H	OAc	H	OAc	OMe	H	H	bowdensina	CE	Guerrieri y col., 2015
									CB	Kobayashi y col., 1984
63	H	OAc	OAc	H	H	H	H	1-epidemetoxi-bowdensina	CE	Guerrieri y col., 2015
64	OH	H	H	H	H	H	H	crinano-3 α -ol		
65	H	H	H	H	H	H	O	dihidro-oxo-demetoxi-hemantamina	CL	Tram y col., 2002a
66	H	OH	OH	H	H	OH	H	crinamabina	CA	Pham y col., 1998
67	H	α OH	H	OH	H	H	H	amabilina	CA	Refaat y col., 2012b
									CK	
68	H	OH	H	OH	OMe	H	H	deacetilbow-densina	CE	
									CB	Kobayashi y col., 1984
69	OH	H	H	OH	OMe	H	H	nerbowdina	CE	Refaat y col., 2012b

Elaborada por: Gina Achito, 2019.

II.4.1.4.-Esqueleto tipo hemantamina

Se forma por el acoplamiento fenol-oxidativo *para-para'* que ocurre en la estructura enantiomérica de la crinina (5,10b-etanofenantridina) donde el puente 5,10b-etano se encuentra orientado en posición α (Tabla 5). En la conversión a hemantamina (70), la oxocrinina se oxida a

vittatina (77), luego ocurre la pérdida del hidrógeno pro-R del C-11 e hidroxilación en el mismo sitio para finalmente ocurrir la *O*-metilación en el C-2. Aunque, los tipos crinina y hemantamina estructuralmente guardan similitud no son intercambiables, por ello, se biosintetizan de forma independiente (Bastida y col., 2011; de Andrade, 2014).

Tabla 5.-Alcaloides tipo hemantamina aislados de especies de la familia Amaryllidaceae

ESQUELETOS TIPO HEMANTAMINA										
N°	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Nombre	Especie	Referencia	
70	H	OMe	CH ₂		H	OH	hemantamina	CA	Tallini y col., 2018a	
								CAS	Rahmatullah y col., 2014; Refaat y col., 2012a	
								CL	Kobayashi y col., 1984	
								CJ, CAM, PO	Refaat y col., 2012a	
71	H	OH	Me	H	H	H	8- <i>O</i> -demetil-maritidina	CA	Tallini y col., 2018a	
72	OH	H	CH ₂		H	OH	hamaina	CA	Maroyi, 2016; : Refaat y col., 2012b	
								CMW		
								CAS	Rahmatullah y col., 2014; Refaat y col., 2012b	
								CL	Kobayashi y col., 1984	
								CZ, CK, CJ, CF, CB, CAM	Refaat y col., 2012b	
73	OAc	H	CH ₂		H	OH	3- <i>O</i> -acetil-hamaina	CMW	Maroyi, 2016; Refaat y col., 2012b	
								CM	Fennell y col., 2003	
								CL	Kobayashi y col., 1984	
								CB, CZ, CK	Refaat y col., 2012b	
74	OMe	H	CH ₂		H	OH	crinamina	CA	Tallini y col., 2018a; Likhitwitayawuid y col., 1993	
								CMW	Maroyi, 2016; : Refaat y col., 2012b	

Tabla 5.-Alcaloides tipo hemantamina aislados de especies de la familia Amaryllidaceae (Continuación)

N°	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Nombre	Especie	Referencia
								CE	Guerrieri y col., 2015; Refaat y col., 2012b
								CL	Kobayashi y col., 1984
								CAS	Rahmatullah y col., 2014; Refaat y col., 2012b
								CB	Refaat y col., 2012b; Kobayashi y col., 1984
								CZ, CF, CAM, CAU, CP, CJ	Refaat y col., 2012b
75	OMe	H	CH ₂	OH	OH		6-hidroxi- crinamina	CPR	Aldhafer y col., 2017
76	Tir	H	CH ₂	H	OH		3-[(4'- 8áminoetil) fenoxi]bulbisper mina	CM	Elgorashi y col., 2001
77	H	OH	CH ₂	H	H		(+)-vittatina	LA, HA	Jin, 2016; Guo, 2015
78	OAc	H	CH ₂	H	OAc		diacetilamina		
79	OMe	H	CH ₂	H	OMe		11- <i>O</i> - metilcrinamina	CL	Kobayashi y col., 1984
80	OMe	H	CH ₂	H	H		epibufanisina	CM, CB, CMW	Elgorashi y col., 2003; Fennell y col., 2003 Fennell y col., 2003
81	OMe	H	CH ₂	α OH	OH		(+)-crinamina- 6- α -hidroxi	CAS, CB, CE, CF,	Refaat y col., 2012b
82	OMe	H	CH ₂	β OH	OH		(+)-crinamina- 6- β -hidroxi	CJ, CP, CZ	

Elaborada por: Gina Achito, 2019.

II.4.1.5.-Esqueleto tipo narciclasina

Los esqueletos del tipo narciclasina poseen el núcleo fenantridina (Tabla 6) y su obtención se deriva de la ruta biosintética del esqueleto crinano (alcaloides tipo crinina y hemantamina). En este sentido, la *O*-metilnorbellaadina y vittatina (77) son considerados productos intermediarios en la transformación de narciclasina por la pérdida del puente de etano mediada por reacción retro-Prins en el compuesto 11-hidroxivittatina, seguido de reacciones de hidroxilación (Bastida y col., 2011). Inusualmente, las fenantridinas y fenantridionas pertenecen a un grupo más específico de alcaloides parcialmente aromáticos que se encuentran en la familia Amaryllidaceae (Jin, 2016).

Tabla 6.-Alcaloides tipo narciclasina aislados de especies del género *Crinum*, familia Amaryllidaceae

ESQUELETOS TIPO NARCICLASINA					
N°	R	R ₁	Nombre	Especie	Referencia
83	N	H	trisfaeridina	CE	Guerrieri y col., 2015
84	O	NH	*cinasiadina	CAS	Rahmatullah y col., 2014

Elaborada por: Gina Achito, 2019.

II.4.1.6.-Esqueleto tipo tazetina

Los compuestos tipo tazetina presentan una estructura básica 2-benzopirano [3,4-c] indol (Tabla 7). La hemantamina es su precursor; estudios de sobre la biosíntesis revelaron que la conversión del esqueleto 5,10b-etanofenantridina a 2-benzopirano [3,4-c] indol se lleva de manera irreversible por la ruta de la hemantamina, la cual cuando se oxida forma los epímeros hemantidina/6-epihemantidina (una mezcla que no puede separarse por HPLC), seguido de la ruptura C-6/N (de Andrade, 2014), permitiendo la formación de un hemiacetal que luego sufre una metilación, dando paso a la conformación de la estructura pretazetina, que se mantiene en equilibrio con tazetina debido a que es inestable tanto en medio básico como ácido (Escobar, 2014).

Tabla 7.-Alcaloides tipo tazetina aislados de especies del género *Crinum*, familia Amaryllidaceae

ESQUELETO TIPO TAZETINA			
N°	Nombre	Especie	Referencia

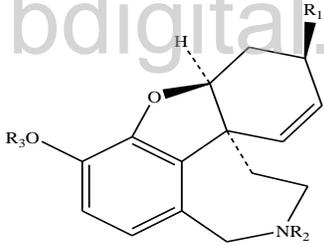
89	macronina	CE	Guerrieri y col., 2015
----	-----------	----	------------------------

Elaborada por: Gina Achito, 2019.

II.4.1.7.-Esqueleto tipo galantamina

La galantamina, originalmente se aisló de *Galanthus nivalis* L. en 1940; este alcaloide tiene un núcleo dibenzofurano y es el único esqueleto que se origina a partir del acoplamiento oxidativo *para-orto'* fenol (Guo, 2015; Bastida y col., 2011) de la *O*-metilnorbelladina transformándose en una dienona que se cierra espontáneamente sobre el puente de éter que produce la *N*-demetilnarwedina. Seguidamente sufre una reducción estereoselectiva y se convierte en norgalantamina que luego se *N*-metila para dar lugar a la galantamina(85) (Tabla 8). Es preciso señalar, que el compuesto narwedina no es el precursor directo de la galantamina(85), posiblemente ambos compuestos se encuentran coexistiendo en equilibrio, en una reacción catalizada por una oxidoreductasa reversible(Bastida y col., 2011).

Tabla 8.-Alcaloides tipo galantamina aislados de especies del género *Crinum*, familia Amaryllidaceae

ESQUELETOS TIPO GALANTAMINA						
						
N°	R ₁	R ₂	R ₃	Nombre	Especie	Referencia
85	OH	Me	Me	galantamina	CMW	Maroyi, 2016
86	OH	Me	H	sanguinina	CA	Tallini y col., 2018a
87	OAc	Me	H	3- <i>O</i> -acetilsanguinina		
88	OH	CHO	Me	<i>N</i> -formilnorgalantamina	CAS, CL, CB	Kobayashi y col., 1984

Elaborada por: Gina Achito, 2019.

II.4.1.8.-Esqueleto tipo montanina

Esta clasificación agrupa los compuestos que presentan el núcleo 5,11-metanomorfantridina. Estudios de marcaje indican que la montanina proviene de la serie hemantamina por acoplamiento *para-para'*, teniendo como intermediario clave la vittatina (77),

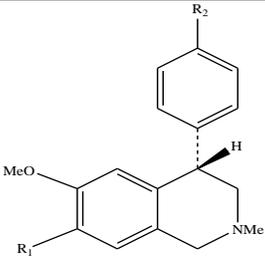
seguido de la migración del enlace del anillo B C-6 a C-7, O-metilación y finalmente una β -hidroxilación en C-3 (de Andrade, 2014). Por otra parte, la 11-hidroxitatina también se ha propuesto como un intermediario en la biosíntesis de hemantamina (**70**) y montanina (Bastida y col., 2011).

II.4.1.9.-Otros tipos de esqueletos en la familia Amaryllidaceae

Como se ha mencionado anteriormente, la biosíntesis de **AAs** es específica para especies de la familia Amaryllidaceae, sin embargo, se han aislado alcaloides no típicos como: cherilina(**90**), augustamina(**92**), galantindol(**93**), ismina(**94**), mesembrenona (**96**), perlolirina(**97**), cripowelina, entre otros. Algunos compuestos se observan en la Tabla 9 (Bastida y col., 2011; Guo, 2015). La cherilina (**90**) es un derivado de 4-ariltetrahidroisoquinolina, un alcaloide fenólico inusual aislado por primera vez a partir de *Crinum powellii* en 1970.

Mientras que, augustamina fue identificada en *Crinum augustum* en 1981 y algunos de sus derivados se aislaron años más tarde de *Crinum kirkii*. Por su parte, el nuevo grupo de alcaloides fue dirigido por el galantindol (**93**), un representante de anillo indol no fusionado, inicialmente aislado de *Galanthus plicatus ssp. Byzantinus* (Guo, 2015). Otro alcaloide inusual es la ismina (**94**) (Tallini y col., 2018a), la cual proviene de la serie crinina/hemantamina. Los experimentos han demostrado que la noroxomaritidina es un precursor de ismina (**94**) (Bastida y col., 2011). Finalmente, los alcaloides del tipo mesembrenol (sceletium), generalmente presentes en la familia Aizoaceae se han aislado en algunas especies de la subfamilia Amaryllidoideae, como es el caso del mesembrenol obtenido en *Crinum oliganthum* en 1981 (de Andrade, 2014).

Tabla 9.-Otros tipos de alcaloides no típicos aislados en la familia Amaryllidaceae

					
N°	R ₁	R ₂	Nombre	Especie	Referencia
90	OH	OH	cherilina	CM	Elgorashi y col., 2003; Fennell y col., 2003

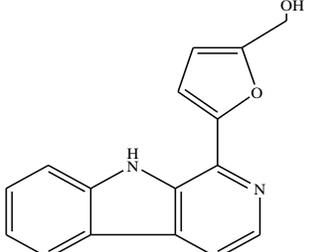
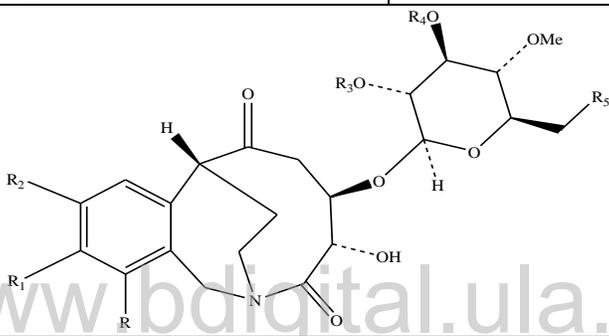
				CMW	Maroyi, 2016; Elgorashi y col., 2003
				CL	Kobayashi y col., 1984
				CB	Elgorashi y col., 2003

Tabla 9.-Otros tipos de alcaloides no típicos aislados en la familia Amaryllidaceae (Continuación)

N°	R ₁	R ₂	Nombre	Especie	Referencia	
91	OMe	OMe	<i>O, O</i> -dimetilcherilina	CL	Kobayashi y col., 1984	
N°	Nombre	Especie	Referencia			
92	augustamina	CA	Tallini y col., 2018a			
		CL	Hanh y col., 2018; Tram y col., 2002a			
N°	Nombre	Especie	Referencia			
93	galantindol	GP	Guo, 2015			
N°	R	Nombre	Especie	Referencia		
94	Me	ismina	CA, CE	Tallini y col., 2018a Guerrieri y col., 2015		
95	H	demetilismina	CA	Tallini y col., 2018a		
N°	Nombre	Especie	Referencia			

96	2-oxomesembrenona	NT	Jin, 2016
----	-------------------	----	-----------

Tabla 9.-Otros tipos de alcaloides no típicos aislados en la familia Amaryllidaceae (Continuación)

									
N°	Nombre					Especie	Referencia		
97	perlolirina					CL	Hanh y col., 2018		
									
N°	R	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Nombre	Especie	Referencia
98	H	-OCH ₂ O-		.CH ₂ OCH ₂ ·		OH	cripowelina A	CE	Presley y col., 2016
99	H	-OCH ₂ O-		Me	Me	OH	cripowelina B		
100	H	-OCH ₂ O-		Me	Me	H	cripowelina D		
101	H	OMe	OMe	.CH ₂ OCH ₂ ·		H	4,8-dimetoxi-cripowelina C	CL	Chen y col., 2018
102	H	OMe	OMe	Me	Me	H	4,8-dimetoxi-cripowelina D		
103	OMe	-OCH ₂ O-		Me	Me	OH	9-metoxi-cripowelina B		
104	H	OMe	OMe	Me	Me	OH	4-metoxi-8-hidroxi-cripowelina B		
105	H	-OCH ₂ O-		.CH ₂ OCH ₂ ·		H	cripowelina C	CL, CE	Chen y col., 2018; Presley y col., 2016

Elaborada por: Gina Achito, 2019.

II.4.2.-Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos constituyen un grupo heterogéneo debido a que pueden formarse a través de varias rutas: a) fenoles simples C6, son originados por descarboxilación del ácido benzoico y son escasos en la naturaleza; b) del ácido benzoico C6-C1, son formados por la transformación de precursores directos del ácido shikímico y son comunes en plantas superiores; c) de las acetofenonas C6-C2, son los más frecuentes que derivan de compuestos C6-C3 (tipo estireno, fenil etanoide y acetofenona) mediante un proceso de descarboxilación; y d) del ácido cinámico C6-C3, son productos de reacciones de reducción de los fenilpropanoides, son raros en la naturaleza, aunque algunos pueden provenir del ácido acético (Buitrago, D., 2018; Lincoln & Zeiger, 2007). En la Tabla 10 se muestran algunos compuestos fenólicos aislados de especies del género *Crinum*.

Tabla 10.-Fenoles aislados en especies del género *Crinum*, familia Amaryllidaceae

N°	R ₁	R ₂	R ₃	Nombre	Especie	Referencia
106	COMe	OMe	OH	4'-hidroxi-3'-metoxiacetofenona	CMW	Kouam y col., 2014
107	COMe	OH	OMe	3'-hidroxi-4'-metoxiacetofenona		
108	(CH ₂) ₂ NH ₂	H	OH	4-(2-aminoetil) fenol		Maroyi, 2016

Elaborada por: Gina Achito, 2019.

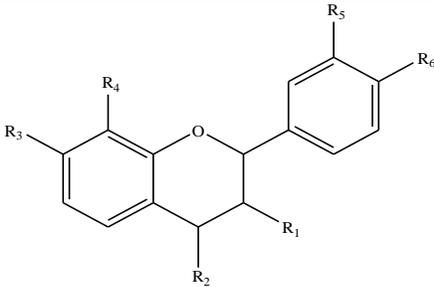
II.4.3.-Flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios que se encuentran en casi cualquier vegetal superior formando parte principal de la dieta de los herbívoros. En su biosíntesis, la reacción inicial involucra una unidad de cinamoil-CoA y tres moléculas de malonil-CoA catalizada por la enzima PKS tipo III empleando ésteres de coenzima A, los cuales extienden la cadena produciendo un policétido, seguido de una condensación aldólica generando anillos aromáticos y finalmente la ciclación; siendo su unidad estructural C15: C6-C3-C6. Su estructura básica se denomina “núcleo flavano”, el cual presenta un esqueleto básico *cis* que incluye un anillo cromano junto a un anillo

aromático en la posición 2, 3 o 4. (Dewick, 2009; Marcano & Hasegawa, 2002; Seigler, 1998), algunos ejemplos de este tipo de compuestos se muestran en la Tabla 11.

Entre las generalidades de los flavonoides están: variabilidad estructural, amplia distribución en el reino vegetal, algunos se pueden encontrar de manera libre y poseen estabilidad química. La solubilidad dependerá de la clase de sustituyentes y la forma como estén presentes; de esta manera existen monómeros, dímeros, trímeros y polímeros. Estos compuestos sufren hidroxilaciones aromáticas y son de fácil identificación por su estructura altamente aromática (Buitrago, D. 2018). En relación a su clasificación, existen varias formas de agruparlos, según su esqueleto, la IUPAC los divide en: flavonoides, isoflavonoides y neoflavonoides. Mientras que, al clasificarlos por su grado de oxidación se tienen: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavononoles, flavanoles, chalconas, auronas y antocianidinas. En referencia a esta última, Marcano & Hasegawa (2002), señalan la importancia de las antocianidinas porque “constituyen los pigmentos principales de las flores y de las hojas de otoño, sus colores van desde el rojo hasta el azul. Son agliconas de polihidroxiavililio en los cuales la unión glicosídica esta principalmente en C-3”. Es importantes acotar, que los taninos son polifenoles o flavonoides poliméricos de elevado peso molecular y de estructura amorfa capaz de combinarse de forma estable a proteínas y otros polímeros vegetales como los polisacáridos; sin embargo, no todos los materiales polifenólicos son taninos.

Tabla 11.-Flavonoides aislados en especies del género *Crinum*, familia Amaryllidaceae

							Nº	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Nombre	Especie	Referencia
109	H	O	OH	OMe	H	H		7-hidroxi-8-metoxiflavanona	CB	Tram						
110	H	O	OH	H	H	OH		7, 4'-dihydroxiflavanona	CB							
111	H	H	OMe	H	H	OH		4'-hidroxi-7-metoxiflavano	CAM, CM							

112	H	H	OMe	Me	H	OH	(-)-4'-hidroxi-7-metoxi-8-metilflavano	C AU	y col., 2002b
113	OH	H	OMe	H	H	OH	4'-Hidroxi-7- metoxiflavan-3-ol	CB	
114	H	H	OMe	H	OH	OH	2(S)-3',4'-dihidroxi-7-metoxiflavano	CB	
115	OH	H	OMe	H	OMe	OH	4'-Hidroxi-7-metoxi-5'-metilflavan-3-ol	CAM	
116	H	H	OH	H	OMe	OH	4',7-dihidroxi-3'-metoxiflavano	CL	Nam y col., 2004
117	H	H	OH	H	H	OH	4',7-dihidroxiflavano	CL	

Tabla 11.-Flavonoides aislados en especies del género *Crinum*, familia Amaryllidaceae (Continuación)

N°	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Nombre	Especie	Referencia
118	HC=CH		H	OH	H	OH	2',4,4'-trihidroxichalcona	CAM, CB	Tram y col., 2002b
119	HC=CH		H	OH	Me	OH	2',4,4'-trihidroxi-3-metil chalcona	CAU	
120	H	H	OMe	OMe	H	H	4-hidroxi-2',4'-dimetihidroxidihidro-chalcona	CB	
121	H	H	OH	OH	H	OH	2',4',7-trihidroxihidrochalcona	CL	Nam y col., 2004
N°	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Nombre	Especie	Referencia
122	O-Xil	H	H	H	H	H	kaempferol-3-xilosido	CB	Tram y col., 2002b
123	H	OH	Me	OMe	OH	OMe	5,6,3'-trihidroxi-7,8,4'-trimetoxi flavona	CL	Nam y col., 2004

Elaborada por: Gina Achito, 2019.

Se encuentran presentes en todas las partes de la planta y suelen localizarse mayormente en las vacuolas de las células vegetales. Los taninos hidrolizables derivan de la vía del ácido shikímico, al ser tratados con ácido o enzimas, se separan de la aglicona (ácido gálico y elágico o sus derivados) y los azúcares. Estos compuestos se caracterizan por ser: amorfos; de sabor astringente; la solubilidad dependerá del grado de polimerización, pueden ser solubles en agua, alcohol y en soluciones coloidales de cetonas e insolubles en solventes de baja polaridad (Seigler, 1998; Marcano & Hasegawa, 2002).

II.4.4.-Terpenos

Son los metabolitos secundarios derivados del isopreno, que proporcionan las características organolépticas (aroma y sabor) de las plantas, se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, solos o formando glicósidos, su frecuencia y abundancia es dependiente de factores genéticos y climáticos. La unidad básica de los terpenos es el *isopreno*, el cual contiene cinco átomos de carbonos y se encuentra en la naturaleza bajo dos formas isoméricas, dimetilalilpirofosfato (DMAPP) e isopentenilpirofosfato (IPP). La ruta de formación de estos compuestos se conoce como ruta del ácido mevalónico y comienza por la unión de dos unidades de acetilcoenzima A para originar acetoacetilcoenzima A, de éste último se produce β -cetoácido, el cual se comporta como sustrato para una nueva condensación aldólica, dando lugar a (S)-3-hidroxi-3-metilglutiril-CoA (también derivado del éster del ácido glutacónico, formado a partir de leucina o valina), que se reduce con el ataque del NADPH sobre el carbono del tioéster de la coenzima A, involucrando un cambio de quiralidad en el C-3 para la formación del ácido (3R) mevalónico. Por otro lado, a través de experimentos de marcaje isotópico se ha determinado que existe una vía alterna para la formación de la unidad de isopreno, la cual comprende la unión de las moléculas de piruvato y gliceraldehído-3-fosfato, que al condensarse pierden CO_2 y se forma 1-desoxi-xylulosa-5-fosfato como precursor del IPP. Con respecto a su clasificación, los terpenos se agrupan de acuerdo al número de unidades de isopreno (C_{5n}) que contienen en: Hemiterpenos (1), Monoterpenos (2), Sesquiterpenos (3), Diterpenos (4), Sesterpenoides (5), Triterpenos (6), Tetraterpenos (8) y Politerpenos (>20) (Dewick, 2002; Marcano & Hasegawa, 2002).

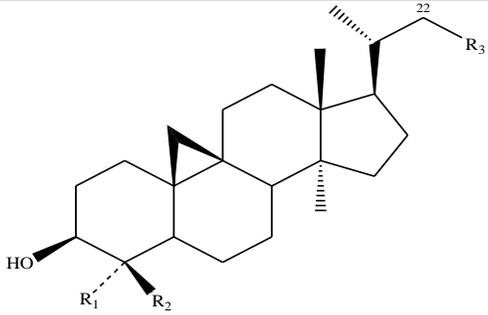
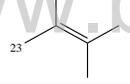
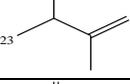
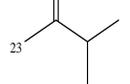
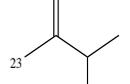
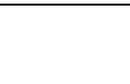
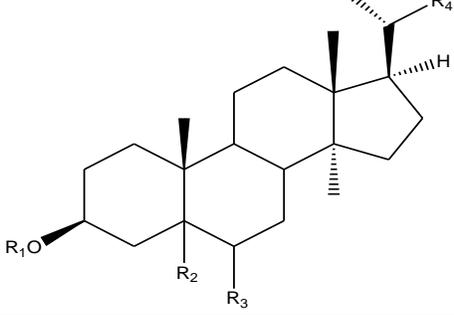
Los triterpenos son un grupo numeroso de compuestos con un esqueleto básico de 30 átomos de carbono o seis unidades de isopentenilpirofosfato (IPPF) y están ampliamente distribuidos en la naturaleza en los reinos vegetal y animal, ya sea en forma libre o asociados con azúcares o aminoácidos. Estos compuestos se forman bajo sistemas similares pese a la variabilidad de estructuras en las etapas iniciales de bioformación, donde el precursor común es el escualeno (Marcano & Hasegawa, 2002), el cual se produce por la unión cola-cola de dos unidades de farnesilpirofosfato (FPF) (C-15) donde tiene lugar en una de las unidades FPF la inversión de la configuración del C-1 y en la otra el hidrógeno en C-1 pro-S se pierde, esto es posible con la presencia de la enzima nicotinamida-adenina- dinucleótido-fosfato(NADPH).

El pre-escualeno es considerado el precursor del escualeno, del cual se generan estructuras policíclicas (tetracíclicas y pentacíclicas) dependiendo de la forma de ciclación (Marcano & Hasegawa, 2002), tal es el caso del cicloartenol (**124**)(Tabla 12). Los esteroides, también llamados fitoesteroides (Tabla 12) son componentes estructurales presentes en las membranas de las células vegetales de las plantas, algas y hongos, afectando la permeabilidad de las membranas. Su estructura es un tetracíclo del grupo protostano y se origina del 2,3-epóxido de escualeno que al ciclarse a través de una secuencia de silla-bote-silla-bote, forma el cicloartenol(**124**) (Marcano & Hasegawa, 2002; Dewick, 2009).

Generalmente se hallan en forma de alcohol libre, sin embargo, también se encuentran bajo la forma de ésteres de ácidos grasos de cadena larga (palmítico, oleico, linoleico y ácidos α -linolénicos), como glucósidos, y glucósidos acilados con ácidos grasos (Marcano & Hasegawa, 2002; Dewick, 2009). Los fitoesteroides son importantes en las plantas por contribuir en su actividad reguladora del crecimiento, modificación del desarrollo y estimulación de la floración en plantas (Seigler, 1998). Dentro de los tetraterpenos, los glicósidos cardiotónicos son glucósidos esteroidales encontrados en las plantas. Son cardanólidos por presentar una lactona insaturada de cinco miembros; tienen anillos fusionados *cis* A/B y C/D pero *trans* B/C; es poco común encontrar residuos de azúcar en C-3 (β -OH) y en C-14 un grupo OH. Se generan por la conversión de colesterol \rightarrow pregnenolona \rightarrow progesterona \rightarrow cardanólido. La progesterona en su

última etapa de formación se reduce y oxida, seguidamente ocurre una oxidación en C-21, y finalmente, se esterifica para adosar y formar el anillo (Marcano & Hasegawa, 2002).

Tabla 12.-Triterpenos y esteroides aislados en especies del género *Crinum*, familia Amaryllidaceae

							
N°	R ₁	R ₂	R ₃	Nombre	Especie	Referencia	
124	Me	Me		cicloartenol	CAS	Tram y col., 2002b	
					CL	Nam y col., 2004	
125	Me	Me		ciclolaudenol	CAS	Tram y col., 2002b	
126	Me	H		31-norciclolaudenol			
127	Me	Me		24-metilenecicloartenol			
128	Me	H		Cicloeucadenol			
							
N°	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Nombre	Especie	Referencia

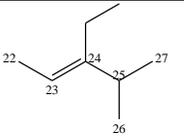
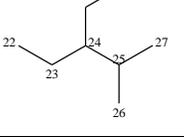
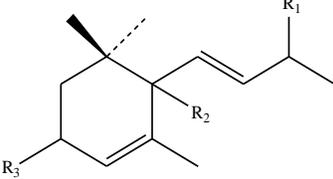
129	H	HC=CH		estigmasterol	CAS, CB	Tram y col., 2002b
					CAS	Rahmatullah y col., 2014
130	H	HC=CH		sitosterol	CM	Tram y col., 2002b
131	H	H		dihidrositosterol	CB	
132	D-Glc	HC=CH		ditosterol-O-D-glucopirano	CAU	

Tabla 12.-Triterpenos y esteroides aislados en especies del género *Crinum*, familia Amaryllidaceae (Continuación)

						
N°	R ₁	R ₂	R ₃	Nombre	Especie	Referencia
133	O	H	H	α -ionona	CF	Tram y col., 2002b
134	α -OH	α -OH	O	vomifoliol		

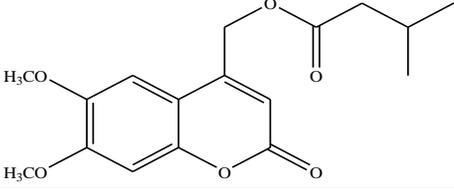
Elaborada por: Gina Achito, 2019.

www.bdigital.ula.ve

II.4.5.-Cumarinas

Las cumarinas son productos naturales ampliamente distribuidos en las plantas y en algunos microorganismos. Son conocidos como benzo- α -pironas o lactonas de ácidos fenilpropanoicos con un núcleo 2H-1-benzopirano-2-ona, y se forman por una reacción de lactonización del ácido *o*-cumárico. Comprenden otra clase de compuestos C6-C3 y entre las propiedades generales se tiene que son lactonas insaturadas; algunas son fluorescentes bajo luz ultravioleta (UV); se hallan oxigenadas en C-7; pocas veces presentan una o varias unidades de isopreno en posición *orto* al oxígeno fenólico, pudiendo a su vez formar furocumarinas lineales o angulares al degradarse la cadena; se encuentran principalmente en semillas, raíces y hojas (Reija, 2007; Marcano & Hasegawa, 2002). La 7-hidroxycumarina (umbeliferona) y otros compuestos relacionados como se muestran en la Tabla 13, presentan actividades biológicas de interés terapéutico como: anticoagulante, antibacteriano, antitrombótico, antiinflamatorio, vasodilatador, anticancerígeno, así como la acción fotosensibilizadora de ciertas furanocumarinas (Rivas-Morales y col., 2016; Reija, 2007).

Tabla 13.-Cumarina aislada en especie del género *Crinum*, familia Amaryllidaceae

			
Nº	Nombre	Especie	Referencia
135	4-seneciioiloximetil-3,4-dimetoxicumarina	CL	Nam y col.,2004

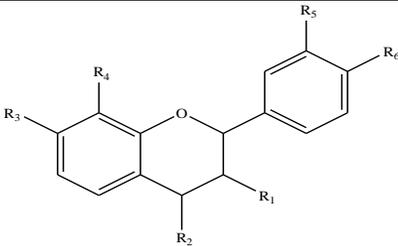
Elaborada por: Gina Achito, 2019.

II.4.6.-Cromonas y cromanos

Los compuestos aromáticos derivados de anillos bencénicos condensados se agrupan según su relación biogenética y entre ellos se encuentran las cromonas, (Tabla 14) que tienen el núcleo benzo- γ -pirano o 1,4-benzopirona, un isómero de cumarina que se distingue por presentar un rango de absorción en UV intenso de 240-250 nm, mientras que, las cumarinas presentan un mínimo en ese mismo rango. Sus derivados se obtienen generalmente a partir de fenoles β -ceto esterres por calentamiento con pentaóxido de difósforo (Marcano & Hasegawa, 2002; Beyer & Walter, 1987).

Otro grupo está representado por los cromanos que tienen el núcleo α -benzopirano y provienen de un dihidroderivado o 4H-cromeno que se obtiene por condensación *orto* de un núcleo benzo- γ -pirano. Su esqueleto está presente en muchos productos naturales tales como: neolignanos, flavonoides y cumarinas, los cuales exhiben importantes propiedades biológicas. Los tocoferoles representan el grupo de mayor interés, estos compuestos difieren en el número de grupos metilo y la mezcla de estos se le conoce como vitamina E, su acción principal es como antioxidante natural y su carencia puede conducir a la esterilidad (Beyer & Walter, 1987; López, 2013; Marcano & Hasegawa, 2002).

Tabla 14.-Cromonas aisladas en especies del género *Crinum*, familia Amaryllidaceae

						
N°	R ₁	R ₂	R ₃	Nombre	Especie	Referencia
136	H	OMe	H	Eugenil	CM	Tram y col., 2002b
137	OMe	OH	Me	5,7-dihidroxi-6-metoxi-2,8-dimetilcroma		
138	H	OH	H	Noreugenin		

Elaborada por: Gina Achito, 2019.

II.4.7.-Carbohidratos

Los carbohidratos son sustancias comunes en plantas, animales y microorganismos, constituidos principalmente por carbono, hidrógeno y oxígeno. Son los primeros productos formados a partir de la fotosíntesis en plantas y son los precursores en la biosíntesis de algunos metabolitos secundarios (Dewick, 2009). Los carbohidratos se agrupan según el número de moléculas que la componen, en: monosacáridos (formados por una sola molécula de sacárido y no pueden ser hidrolizados a moléculas más pequeñas), disacáridos (formados por dos moléculas de monosacárido unidas por un enlace glucosídico), oligosacáridos (compuestos por 3 a 9 unidades de sacáridos, los formados por 3 unidades son de sabor dulce, mientras que de 4 a 9 son insípidos) y polisacáridos (constituidos por >10 moléculas de monosacáridos y cumplen funciones importantes como la reserva de alimento y formar parte de la estructura rígida de las plantas) (Rojas, 2018). Estudios en las especies de *Crinum* han reportado la presencia de sacáridos, oligo y polisacáridos (con cierta actividad farmacológica antiinflamatoria e inmunoestimulante citostático), pectinas y hemicelulosa en los bulbos de especies de *C. amabile* mientras que, en los rizomas de *C. latifolium* se hallaron entre sus compuestos: glucógeno, glucano A y glucano B (Tram y col., 2002b).

II.4.8.-Minerales

Los minerales o microelementos son compuestos nutritivos requeridos por las plantas en bajas cantidades, ante su ausencia no podría garantizarse el desarrollo de las funciones biológicas como

la fotosíntesis, la formación de los azúcares, la síntesis de las proteínas, entre otras. Entre los elementos más importantes están: hierro (Fe), boro (B), manganeso (Mn), cobre (Cu), zinc (Zn), molibdeno (Mo) y cloro (Cl). Estas sustancias son suministradas por el suelo generalmente en forma de solución como aniones y cationes para ser absorbidos por las plantas (Aguilar, 2011). En el estudio de la distribución de los microelementos en diferentes partes de la especie *C. asiaticum* se detectó alto contenido de Cd (Cadmio) en los órganos reproductivos y bajo contenido de Ca (Calcio) en las flores (Tram y col., 2002b). Otros estudios recientes en bulbos de *C. jagus* determinaron la presencia de constituyentes como sales de calcio (mezcla de oxalato de calcio y tartrato de calcio) (Taiwe y col., 2016).

II.5.-Estudios de actividad biológica reportados para el género *Crinum* L.

En esta sección se presentan los estudios de las actividades biológicas reportadas para especies del género *Crinum* en los últimos ocho años, los mismos se encuentran en orden cronológico descendente, destacándose que existe mayor prevalencia de ensayos de actividad antioxidante, citotóxica, inhibidora de las enzimas AChE y BuChE, antiinflamatoria y antimicrobiana.

Los extractos acuosos y metanólicos de las hojas de doce especies de *Crinum* fueron ensayados para determinar actividad antioxidante, anti-diabética e inhibidora de la enzima AChE. Los resultados revelaron que el extracto metanólico de *C. asiaticum* presentó una fuerte actividad antioxidante a la concentración de $462,81 \pm 1,98$ mg Fe^{II}/g extracto (método FRAP), $116,03 \pm 3,80$ mg AAE/g extracto (método fosfomolibdeno) y $111,54 \pm 2,03$ mg TE/g extracto (método DPPH). El extracto de *C. latifolium* mostró mayor efectividad por el método ABTS ($39,65 \pm 0,91$ mg de extracto de TE/g). Con relación, a la actividad antidiabética el extracto de *C. jagus* reveló la mayor inhibición de la enzima α -amilasa (60,30%) y α -glucosidasa (94,04%). En el ensayo con la enzima AChE, el extracto de *C. latifolium* exhibió 76,52% de inhibición (S. Ghane y col., 2018).

Por otro lado, del extracto etanólico de los bulbos de *C. latifolium* se aislaron cinco alcaloides tipo cripowelinas y se evaluaron *In Vitro* las actividades citotóxica, antimicrobiana, antioxidante y antiinflamatoria. En consecuencia, los alcaloides **101-105** (Tabla 9) mostraron una alta citotoxicidad contra todas las líneas celulares de cáncer de pulmón ensayado (A549, ATCC, H446, H460, H292, 95-D y SPCA-1) con valores de $IC_{50} < 30$ nM (Tabla 2) significativo, mediante el método MTT, empleando como fármaco de referencia Doxorubicina®. Los alcaloides **103** y

104 (Tabla 9) mostraron el mayor potencial antimicrobiano contra todos los microorganismos ensayados (*S. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *E. cloacae*, *S. dysenteriae*) con un valor de $IC_{50} < 0,50$ mM, usando como control positivo Netilmicina®. En la actividad antioxidante se evidenció una actividad significativa en los compuestos **102**, **103** y **104** con valores entre 67,3-73,4 µg en las pruebas ABTS⁺ (Trolox®: 80,9 µg) y DPPH los compuestos **102**, **103** y **103** (IC_{50} entre 62,1-80,1 µg; Trolox®: 43,2 µg) (MX. Chen y col., 2018).

T. Hanh y col., (2018) comprobaron la citotoxicidad del alcaloide perloririna (**97**) aislado de las hojas de *C. latifolium* al mostrar actividad contra cinco líneas celulares de cáncer humano KB (carcinoma epidermoide), HepG2 (hepatocarcinoma), MCF7 (cáncer de mama), SK-Mel2 (melanoma) y LNCaP (cáncer de próstata) con valores de IC_{50} entre $22,12 \pm 2,80$ y $28,45 \pm 3,75$ µM con relación al control positivo de Elipticina® (IC_{50} entre $1,83 \pm 0,20$ a $1,54 \pm 0,16$ µM).

La actividad inhibitoria de las enzimas AChE y BuChE fue ensayada en los bulbos de la especie *C. amabile* usando el método modificado de Ellman; observándose inhibición significativa de la enzima AChE de $2,24 \pm 0,01$ µg/mL, cercana al compuesto de referencia galantamina (**85**) ($0,27 \pm 0,03$ µg/mL). Mientras que, frente a BuChE el efecto fue menor ($116,59 \pm 2,85$ µg/mL) en comparación al fármaco de referencia, Galantamina® ($4,88 \pm 0,17$) (A. Carrasco, 2017).

Orto estudio realizado con los extractos crudos y alcaloidales de las hojas y bulbos de *C. amabile* revelaron una baja actividad antioxidante en los extractos ensayados (IC_{50} entre 6818,24 y 112080,7 ppm) en comparación con el ácido acetilsalicílico (IC_{50} 36,8 ppm) usado como patrón de referencia. La actividad antiinflamatoria *In Vitro* también fue ensayada observándose que el extracto crudo y alcaloidal de los bulbos mostraron actividad a las concentraciones de 56,35 y 57,12 ppm, respectivamente. Finalmente, los extractos alcaloidales de las hojas y los bulbos presentaron actividad citotóxica frente a líneas celulares tumorales a la concentración de 12,5 ppm (S. Portero, 2017).

El extracto de las hojas de *C. giganteum* fue evaluado *In Vivo* para determinar su efecto frente a un cuadro de esquizofrenia inducido en ratas Wistar. Los resultados mostraron que el extracto acuoso a concentraciones de 5 y 10 mg/kg presenta actividad neuroprotectora, atenuando el efecto del antagonista de los receptores de NMDA, el cual fue inducido por clorhidrato de Ketamina®. Este ensayo fue comparado con el control positivo, Clorpromazina® a dosis de 25 mg/kg (E. Finbarrs-Bello y col., 2016).

C. Presley y col., (2016), reportaron la actividad antipalúdica y antiproliferativa de cuatro alcaloides del tipo cripowelina **98, 99, 100** y **105** (Tabla 9) aislados del extracto metanólico de *C. erubescens*; los compuestos aislados, mostraron actividad antimalárica frente a la cepa Dd2 con valores de IC₅₀ que oscilan entre 26±,2 y 260±2 nM, usando el ensayo de fluorescencia con SYBRG I, la Artemisina® se utilizó como control positivo IC₅₀ de 6 ± 1 nM). Por otro lado, el análisis frente a la línea celular de cáncer de ovario humano A2780 mostró actividad a las concentraciones de IC₅₀ entre 11,1±0,4 y 28±1 nM.

La actividad anticonvulsivante del extracto de hojas de *C. jagus* fue ensayada *In Vivo* aplicando convulsiones PTZ inducidas en ratones Swiss. Los resultados revelaron que el extracto disminuye las convulsiones sin mostrar toxicidad a la dosis de 12,5-5,0 mg/kg en las especies manipuladas. Con este ensayo validaron científicamente el uso de los extractos vegetales en el tratamiento de la epilepsia en la medicina tradicional en Camerún (G. Taiwe y col., 2016).

Por otro lado, el potencial de cicatrización en las heridas del extracto metanólico de *C. jagus* fue ensayado *In Vivo* en ratas Wistar albinas, revelando un tiempo de epitelización/curación completa a las dosis (12,14±1,47 / 19,14±0,7 días y 11,2±1,144 / 16,85±1,65 días) en comparación con el fármaco Sulfato de Framicetina usado como control (17,80±1,2 / 25,28±1,04 días). Las pruebas de toxicidad mostraron que el extracto metanólico de los bulbos de *C. jagus* no presenta toxicidad a la dosis de 2000 mg/kg (S. Udegbumam y col., 2015a).

Otro estudio realizado con la misma especie mostró el efecto antioxidante y antimicrobiano del extracto metanólico de los bulbos de *C. jagus*. Las bacterias *B. subtilis* y *S. aureus* fueron inhibidas a la CIM de 25 y 12,5 mg/mL, respectivamente. Con respecto al ensayo *In Vivo* en modelos de cicatrización de heridas, se observó actividad antimicrobiana frente a las bacterias *B. subtilis*, *S. aureus* y la levadura *C. albicans*, ya que, las mismas no fueron observadas en las heridas después del tratamiento. El fármaco usado como control positivo fue Sulfato de Framicetina®/Clotrimazol®. En cuanto a la actividad antioxidante no enzimática *In Vitro* determinada por el método DPPH, se observó que la misma es dependiente de la concentración ensayada (10-400 µg/mL con 6,82±0,05 - 58,19±1,51%) al compararlo con el fármaco de referencia (ácido ascórbico 73,65±0,85 - 79,18±0,16%). Mientras que, la actividad antioxidante enzimática *In Vivo* por el método SOD fue significativa para el 10% del extracto (4,22±0,09; 4,57±0,02 y 5,24±0,06 µ/mg de proteína) en comparación al fármaco Sulfato de Framicetina®/Clotrimazol® (4,20±0,06; 4,68±0,07 y 4,61±0,06 µ/mg de proteína) (S. Udegbumam y col., 2015b).

Estudios del efecto antihelmíntico, citotóxico y antioxidante *In Vitro* del extracto metanólico de hojas de *C. latifolium*, establecieron que el extracto es un potente antihelmíntico al registrar el tiempo más bajo para la parálisis y letalidad en los parásitos a la dosis de 50 mg/mL en comparación con el fármaco de referencia, Albendazol®. Por otro lado, el ensayo de citotoxicidad con *Artemia salina* mostró letalidad con un LC_{50} de 15,652 $\mu\text{g/mL}$ comparado con el estándar Sulfato de Vincristina® (0,839 $\mu\text{g/mL}$), mientras que los ensayos de actividad antioxidante mostraron efectividad del extracto a la concentración de $17,50 \pm 2,64$ mg/mL (A. Aziz y col., 2014).

Iannello y col., (2014), ensayaron la actividad antimicrobiana y antifúngica del extracto alcaloidal de *C. angustum*, demostrando actividad significativa contra seis de las cepas examinadas con valores de IC_{50} después de 8 h incubación de 312 $\mu\text{g/mL}$ (*S. aureus* y *S. pyogenes*), 156 $\mu\text{g/mL}$ (*S. epidermidis*) y 625 $\mu\text{g/mL}$ (*K. pneumoniae* y *E. faecalis*), siendo inactivo frente a las cepas Gram-negativas *E. coli*, *P. aeruginosa* y *P. mirabilis*. Utilizaron como control positivo, Gentamicina® para las bacterias y Nistatina® para las levaduras.

El extracto acuoso de los bulbos de *C. glaucum* fue ensayado para determinar los efectos anticonvulsivante, ansiolítico e hipnótico *In Vivo* en ratones albinos. Para el ensayo de la actividad anticonvulsivante utilizaron Fenobarbitona® (40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) como fármaco control. Los resultados mostraron que el extracto logró disminuir las convulsiones inducidas por Picrotoxina® a los $468 \pm 81,39$ y $528 \pm 81,39$ segundos (400-1200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), mientras que las convulsiones inducidas por Isoniacida® fueron inhibidas a los $32,80 \pm 2,55$ min a $47 \pm 2,10$ minutos. Con respecto al efecto ansiolítico, el extracto fue efectivo a la dosis de 100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($124,00 \pm 1,18$ s) siendo significativamente más alto que el producido por el Diazepam® ($84,4 \pm 2,84$ s), mientras, el efecto hipnótico del extracto se observó a los $1,52 \pm 0,01$ minutos a la dosis de 400 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ inducido por Hexobarbitona® en comparación con el Diazepam® ($2,40 \pm 0,24$ min). Estos resultados pueden sugerir que el extracto actúa por interacción con los sistemas GABAérgico, nitrérgico y glutaminérgico para ejercer sus efectos (I. Isholay col., 2103).

La citotoxicidad *In Vitro* fue evaluada en el extracto de las hojas de *C. latifolium*, utilizando células EL4-luc2, una línea celular de linfoma murino singénica del ratón C57BL/6. Los resultados indican que los extractos de CL y la fracción de alcaloides a concentraciones de 25 $\mu\text{g/mL}$ inhiben la proliferación de células de linfoma en múltiples vías con la particularidad que no presentan toxicidad en las células normales (H-Y. T. Nguyen y col., 2013).

S. Dewan & A. Das (2013), evaluaron el potencial trombolítico *In Vitro* del extracto metanólico crudo de las hojas de *C. latifolium*, obteniendo una actividad trombolítica significativa ($p < 0.001$) con una lisis moderada del coágulo, mostrando efectividad de $14,64 \pm 0,540\%$, $18,01 \pm 0,766\%$, $21,78 \pm 1,039\%$, $28,43 \pm 0,982\%$ y $33,84 \pm 1,749\%$ a concentraciones entre 2 a 10 mg/mL, en contraste con el control positivo Estreptoquinasa® a $47,27 \pm 1,998\%$ de lisis de los coágulos.

M. Rahman y col., (2013), investigaron los efectos analgésicos y antiinflamatorios *In Vivo* del extracto etanólico de las hojas de *C. asiaticum* (1,0 g/kg y 2,0 g/kg) usando el modelo de retorcimiento inducido por ácido acético y el modelo de lamido provocado por formalina en ratones suizos albinos (control positivo Diclofenaco sódico® a 10 mg/kg); los resultados mostraron disminución del dolor a la dosis de $42,34 \pm 3,20\%$. Por otro lado, el efecto antiinflamatorio medido a través del modelo de edema de la pata inducido por carragenina en rata albina mostró actividad a la dosis de $51,60 \pm 2,50\%$ (control positivo Morfina® a 0,5 mg/kg). Además, no observaron mortalidad en la prueba de toxicidad aguda en ratas albinas Wistar.

Un estudio *In Vivo* demostró la actividad cicatrizante del extracto metanólico de los bulbos de *C. zeylanicum* al colocar la crema preparada a las concentraciones de 1, 5 y 10 % m/m sobre las heridas de ratas Wistar. En este ensayo se observó que hubo un aumento significativo al reducir el período de epitelización de 22 días en control a 20, 18 y 15 días. La dosis tóxica dérmica aguda (CL_{50}) fue superior a 2000 mg/kg en peso corporal. Estos resultados, validan el uso de la especie como cicatrizante en la medicina tradicional de los yorubas que habitan en la región occidental de Nigeria (A. Tijani y col., 2012).

M. Asmawi y col., (2011), ensayaron la actividad antinociceptiva *In Vivo* de los extractos (éter de petróleo, cloroformo y metanol) de las hojas de *C. asiaticum* en ratas albinas macho (Sprague Dawley) utilizando el método de hiperalgesia en la pata trasera inducida por carragenina. Ensayaron dosis entre $250-1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ y la mejor actividad fue mostrada por el extracto en cloroformo a la dosis de $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($n = 4-5$ en cada grupo; $p < 0,05$), además observaron que dosis elevadas ($1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), causaron la letalidad de los animales de experimentación. El fármaco control fue la Indometacina® a la concentración de $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Las propiedades antinociceptivas del extracto metanólico de los bulbos de *C. asiaticum* fueron ensayadas en ratones albinos suizos, mostrando una disminución del dolor inducido por ácido acético del 40,71% a la dosis de 1,5 g/kg de peso. Con relación a la actividad antiinflamatoria

realizada en ratas albinas Wistar inducida por carragenina observaron inhibición del proceso de la inflamación a la dosis de 52,56 %. Posteriormente, en la cuarta administración a una dosis de 1 g/kg se observó una inhibición del 37,5 % con respecto al fármaco de referencia (Diclofenaco sódico® 40 mg/kg.) usado en cada ensayo (M. Rahman y col., 2011).

O. Fawole y col., (2010) evaluaron la actividad antiinflamatoria, anticolinesterasa y antioxidante de los extractos de bulbos de *C. moorei*, revelando una fuerte inhibición contra las enzimas COX-1 (84,0 a 99,2 %) y COX-2 (52 a 95,6 %), validando su uso en la medicina tradicional sudafricana para el tratamiento del dolor, sin embargo, los porcentajes de inhibición de la AChE se consideran bajos (EC_{50} entre 2,9 a 22,5 %). Por otro lado, el ensayo del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) mostró un $IC_{50} = 5,06 \pm 1,54 \mu\text{g/mL}$.

El estudio de la actividad inhibidora de la enzima AChE *In Vitro* realizado a las hojas y bulbos de cinco especies de *Crinum* mostró que a la dosis de 100 μg , las hojas de *C. zeylanicum*, los bulbos y las hojas de *C. amabile* y las hojas de *C. jagus* presentaron una fuerte inhibición de la enzima AChE, mientras que, las hojas de *C. erubescens*, los bulbos de *C. powellii* y los bulbos de *C. zeylanicum* mostraron inhibición moderada y las hojas *C. powellii* mostraron un efecto leve sobre esta enzima (A. Calderón y col., 2010).

S. Ilavenil y col., (2010) ensayaron los extractos acuosos y de etanol de las hojas de *C. asiaticum* para determinar su actividad antibacteriana frente a cepas Gram negativas *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC10031), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) y *Escherichia coli* (ATCC 25922) y bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 11632) y *Bacillus subtilis* (ATCC 23859); utilizando los métodos de difusión de agar en pocillo, difusión en discos de papel y dilución en caldo. Los resultados revelaron que los extractos de *C. asiaticum* mostraron actividad frente a *S. aureus* y *K. pneumoniae* a la concentración de 0,5 mg/mL, mientras que, a las concentraciones entre 1,0 y 1,5 mg/mL observaron actividad en todas las cepas ensayadas.

El ensayo citotóxico *In Vitro* para determinar la mortalidad del camarón en salmuera mostró que el aceite esencial obtenido por hidrodestilación del extracto de bulbos de *C. ornatum*, presenta toxicidad a la concentración de 1,701 $\mu\text{g/mL}$ con un intervalo de confianza entre 2,137 y 0,4678, respectivamente. El análisis por CG/EM reveló que el aceite está compuesto principalmente por hidrocarburos de cadena lineal, lo que podría explicar la alta toxicidad observada en el ensayo (Oloyede, Oladosu & Shodia, 2010).

II.6.-Usos etnobotánicos

Las especies del género *Crinum* se encuentran distribuidas ampliamente en las regiones tropicales y templadas de todo el mundo, particularmente en África, Asia, Australia y en menor cantidad en los Andes al sur de América. Se conoce que, desde tiempos remotos estas plantas han sido usadas en preparados medicinales para tratar diversas dolencias (Rahmatullah y col., 2014; Carrasco, 2017). Teniendo en cuenta que, la documentación de estos usos en contextos culturales concretos, revelan que las plantas utilizadas en etnomedicina tienen actividades farmacológicas que aquellas seleccionadas al azar o por criterios quimiotaxonómicos (Mender, 2015); en la Tabla 15 se resumen los usos etnobotánicos reportados para especies del género *Crinum*.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 15.-Especies del género *Crinum* y sus usos etnobotánicos a nivel mundial

Nombre botánico	Nombre común	Localidad	Usos medicinales	Referencia
<i>Crinum latifolium</i> L.	Sukhdarshan	Sonapur, República Popular de Bangladés	Como rubefaciente, tónico para el tratamiento de trastornos como: prostatitis, adenoma, aumento prostático benigno, alergias y enfermedades tumorales.	Aziz y col., 2014
	Sukhdarshan	República Popular de Bangladés	En problemas graves de salud como: prostatitis adenoma, aumento de próstata benigna, fibrosis uterina, hipoxia, inflamación, desintoxicación, regeneración tisular, equilibrio hormonal, para mejorar la inmunidad mediada por células y como un activador efectivo de linfocitos.	Dewan & Das, 2013
	-	Vietnam y China	Para el tratamiento de reumatismo, fístula, tumores, otitis. Actualmente se ha popularizado su uso como antiviral y antitumoral.	Jenny y col., 2011
<i>Crinum moorei</i> Hook. F.	-	Suráfrica	Tratamiento de afecciones relacionadas con el dolor.	Fawole y col., 2010
<i>Crinum amabile</i> Donn.	-	Vietnam	Emético para tratar el reumatismo y la otitis.	Pham y col., 1998
	-	Ecuador (Playa de Muisne, Provincia de Esmeraldas)	Dolores abdominales y contusiones en el cuerpo (hojas y bulbos), y para tratar resfriados (flores).	Carrasco, 2017
	Lirio		En enfermedades pectorales (flores), cicatrizante (hojas), inflamaciones y contusiones (bulbos).	Zapata, 2017
<i>Crinum hardyi</i> Lehm. H.	-	República de Madagascar	Tratamiento externo de diferentes enfermedades parasitarias de la piel.	Aldhafer y col., 2017
<i>Crinum pronkii</i> Lehm. H.				
<i>Crinum firmifolium</i> Baker J.				
<i>Crinum macowanii</i> Baker	-	África Oriental y meridional	En remedios para los forúnculos, diarrea, fiebre, inflamación, problemas del sistema respiratorio, erupciones cutáneas, tuberculosis, heridas y problemas del tracto urinario en humanos y animales.	Maroyi, 2016

Tabla 15.-Especies del género *Crinum* y sus usos etnobotánicos a nivel mundial (Continuación)

<i>Crinum asiaticum</i> L.	-	Islas del Pacífico Sur	Heridas e inflamación corporal (hojas), en partos y hemorragia posparto (raíz).	Rahmatullah y col., 2014
	-	Micronesia	Dolores de espalda y retracción de testículos (hojas) y emético (bulbo).	
	-	República Popular de Bangladés	Tratamiento para la acidez y la disentería (jugo de hoja y la fruta); forúnculos, tos, mucosidad y fiebre (raíz); dolor reumático severo (hojas); edema, dolor y reumatismo (planta entera); amigdalitis (rizomas); ictericia (tallos); inflamación de los dedos de manos y pies (hojas con aceites); hernia.	
	-	República de la India	Laxante y problemas urinarios (bulbo); dolor de oídos y amigdalitis (extracto bulbo); fiebre y cicatrización de heridas (hoja y tubérculos); antihelmínticos y afrodisíacos (se ingiere el bulbo hervido); reumatismo (jugo de hoja); reumatismo y hemorroides (bulbo triturado y asado).	
	-	República de Vanuatu	Para la indigestión (el extracto de las hojas).	
	-	Distrito de Kutchum, Tailandia	Tratamiento de la fiebre (hojas).	
	-	Malasia	Para áreas externas con fracturas óseas (hojas).	
	-	República de la Unión de Myanmar	Tratamiento de artritis, lesiones, infecciones de la piel y herpes (hojas).	
	bunga tembaga suasa	Malasia peninsular	Tratamiento de articulaciones inflamadas, esguince, vómito, hemorroides, contusión, fractura, dolor de oído y otras inflamaciones.	
<i>Crinum zeylanicum</i> L.	Llamado en el norte "Albasaar Kwaadii" (cebolla de rana) y en el sur "Isumer"	Occidente de Nigeria	Tratamiento de problemas de la piel, lesiones y úlceras refractarias (bulbo).	Tijani y col., 2012
	-	República de Sierra Leona	Estimulante para infantes con debilidad general, raquitismo (hojas de infusión fría).	
	-	República de Ghana	Como vermífugo.	

Tabla 15.-Especies del género *Crinum* y sus usos etnobotánicos a nivel mundial (Continuación)

<i>Crinum jagus</i> L.	Lirio Harmattan	Camerún (comunidades rurales del sur)	Tratar el dolor, epilepsia, convulsiones infantiles, ansiedad, psicosis e inflamación.	Taiwe y col., 2016
	Lirio Harmattan, lirio de San Cristóbal, Frest <i>Crinum</i> o bulbo de veneno.	África y Sudeste de Nigeria	Tratamiento de diferentes dolencias como dolor, asma, tos, dolor de oído, estreñimiento, inflamaciones, pérdida de memoria, heridas (bulbo) y forúnculos.	Udegbuna m y col., 2015a
	Nombre común cebollas de Bush	Nigeria		
	Gadalli, Albacce Buru o Albacce Dawaddi	En el norte de Nigeria (Camerún y República de Níger)	En el tratamiento de la esquizofrenia y otras afecciones mentales.	Finbarrs-Bello y col., 2016
<i>Crinum glaucum</i> A. Chev. Bull.	“Tsumeri”. En regiones de habla Yoruba “Ede chukwu” o “Ede mmo” (Cocoyam de Dios). Y de habla Igbo “Albasar kwa'adi” (Cebolla de rana)	Nigeria	Como un remedio eficaz para el alivio de la tos, el asma y las convulsiones, antihelmínticos, eméticos, tratamiento de llagas, enfermedades de transmisión sexual y dolor de espalda. El bulbo se usa para la pérdida de memoria y otros síntomas mentales asociados con el envejecimiento.	Ishola y col., 2013
		África occidental	El extracto acuoso se usa comúnmente como antiespasmódico.	

Elaborada por: Gina Achito, 2019.

En virtud al resumen en la Tabla anterior, Mender (2015), refiere que: “la alta diversidad de especies vegetales con importantes propiedades terapéuticas ha promovido en los últimos años un incremento en las investigaciones científicas, que buscan comprobar los conocimientos de la medicina popular. Esto deriva en la búsqueda y obtención de principios activos alternativos que presenten efectos colaterales en menor medida respecto a las convencionales y de ser posible, se conviertan en herramientas útiles para mejorar las condiciones socioeconómicas de las comunidades que usan y comercializar sus propias plantas”.

III. HIPÓTESIS

Las especies del género *Crinum* han mostrado ser fuentes importantes de alcaloides con gran potencial como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades tales como, trastornos gastrointestinales, infecciones, epilepsia, tratamiento paliativo de la enfermedad de Alzheimer, anticancerígeno, entre otras, por lo que se espera que las especies objeto del presente estudio exhiban alcaloides con actividades similares o superiores a las reportadas.

IV. OBJETIVOS

IV.1.-Objetivo general

Analizar la composición química alcaloidal presente en las especies del género *Crinum* (Amaryllidaceae) recolectadas en los Municipios Alberto Adriani, Libertador y Santos Marquina del estado Mérida y evaluar diversas actividades biológicas.

IV.2.-Objetivos específicos

- Obtener la fracción alcaloidal de las hojas y los bulbos mediante el fraccionamiento ácido/base de las especies en estudio.
- Determinar la composición química alcaloidal de las hojas y bulbos de cada especie a través de la técnica acoplada CG/EM.
- Analizar el impacto ecotoxicológico de los extractos metanólicos y las fracciones alcaloidales de bulbos y hojas de las especies de *Crinum* mediante el ensayo de letalidad de *Artemia salina* por la técnica de micropocillos según Kinner.
- Ensayar la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos y las fracciones alcaloidales obtenidas de las hojas y bulbos de las especies de *Crinum* por el método de difusión en agar con discos de papel.
- Evaluar la actividad inhibitoria sobre las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa de las fracciones alcaloidales de bulbos y hojas de las especies de *Crinum* mediante el ensayo en microplacas.

V. PARTE EXPERIMENTAL

V.1.-Materiales y métodos

V.1.1.-Recolección del material botánico

El material vegetal fresco fue colectado entre 2016-2017 en período de floración. La especie *Crinum amabile* Roxb. ex Steud (**CA**) se recolectó el 30 de julio 2016 en el sector La Mucuy baja, Municipio Santos Marquina del estado Mérida, ubicada a 1898 **m s. n. m.**, mientras que, la especie *Crinum moorei* Hook F. (**CM**) se recolectó el 16 de septiembre de 2016 en el sector El Valle, cerca del parque Eco Wild, Municipio Libertador del estado Mérida, ubicada a 1720 **m s. n. m.** La especie *Crinum erubescens* Kunth (**CE**) se recolectó el 30 de marzo de 2017 en el sector La Mucuy Alta, cerca del Parque Nacional Sierra Nevada “La Mucuy”, Municipio Santos Marquina del estado Mérida, ubicado a 2150 **m s. n. m.** Por su parte, la especie *Crinum latifolium* L. (**CL**) se recolectó el 13 de noviembre de 2017 en el sector el Taparo (frente al Liceo María C. Márquez de P.) y en el sector KM 51 (entrada de la escuela U.E.B. Carmen E. Socorro de U.), Municipio Alberto Adriani del estado Mérida, ubicado a 63 **m s. n. m.** (representación de recolección, anexo 1, pág. 95).

V.1.1.1.-Determinación taxonómica del material vegetal

Las diferentes muestras recolectadas de **CA**, **CM**, **CE** y **CL** fueron identificadas por el Profesor Pablo Meléndez. Una muestra testigo fue depositada, para cada especie, en el Herbario “Dr. Luis Ruíz Terán” (**MERF**), Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Las mismas se resguardan en el inventario con los códigos: **CA** (JR 69), **CM** (JR 70), **CE** (JR 73) y **CL** (JR 74).

V.1.1.2.-Selección y división del material vegetal

El material vegetal recolectado para cada una de las especies, fue sometido por separado, a un proceso de selección para eliminar las impurezas y material deteriorado de las hojas (**h**) y bulbos (**b**).

V.1.1.3.-Secado, molienda y pesada del material vegetal

El material vegetal seleccionado para la obtención de extractos de las diferentes especies: **CA**, **CM**, **CE**, y **CL** (bulbos y hojas), se secó por separado en una estufa con recirculación de aire a una temperatura máxima de 40 °C, durante 5 días. Transcurrido este periodo, se verificó que el material se encontrara libre de humedad y quebradizo al tacto, luego se realizó el proceso de molienda mediante un molino eléctrico, marca Arthur H. Thomas C.O. Phila, PA.USA., hasta obtener un polvo fino capaz de traspasar un tamiz de malla número 20. El material obtenido se pesó y registró: **CA** (**h**: 97,963 g y **b**: 98,160 g), **CM** (**h**: 98,587 g y **b**: 98,744 g), **CE** (**h**: 195 g y **b**: 102 g), y **CL** (**h**: 58 g y **b**: 188 g). Seguidamente, se colocó por separado en envases rotulados, y se conservó a temperatura ambiente en un lugar seco y fresco, protegido de la luz hasta la realización de los análisis.

V.1.2.-Extracción por maceración

El material seco y molido de cada una de las especies: **CA**, **CM**, **CE**, y **CL**, una vez pesado, se sometió a extracción sólido-líquido por maceración a temperatura ambiente, utilizando metanol como solvente, durante un período de 15 días divididos en tres etapas de cinco días. Finalizado el tiempo de maceración, se procedió a separar el extracto metanólico del residuo vegetal por filtración usando papel de filtro Whatman® No.1. Una vez filtrado se procedió a evaporar el solvente en un rotavapor Fisatoma presión reducida a una temperatura máxima de 60 °C, obteniendo así los extractos concentrados. Todos los extractos fueron pesados y guardados en frascos rotulados color ámbar en la nevera a una temperatura de 4 °C alejados de la luz y el calor hasta la realización de los ensayos.

V.1.3.-Determinación cualitativa de los metabolitos secundarios

La determinación cualitativa de los metabolitos secundarios de cada uno de los extractos en estudio: **CAH** (*C. amabile* hojas), **CAB** (*C. amabile* bulbos), **CMH** (*C. moorei* hojas), **CMB** (*C. moorei* bulbos), **CEH** (*C. erubescens* hojas), **CEB** (*C. erubescens* bulbos), **CLH** (*C. latifolium* hojas) y **CLB** (*C. latifolium* bulbos), se realizó en el Laboratorio C de Productos Naturales “Antonio Morales” del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes, bajo la supervisión de la Dra. Janne Rojas y el Dr. Alexis Buitrago. El screening fitoquímico permitió corroborar la presencia de los metabolitos

secundarios en las muestras de estudio. En la Tabla 16, se resumen las reacciones químicas para cada grupo de compuestos a identificar.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 16.-Procedimiento para el tamizaje fitoquímico que se realizará en los extractos metanólicos de especies del género *Crinum*L. (Marcano & Hasegawa, 2002; Trease y Evan, 2002; Shyamala-Gowri y Vasantha, 2010; Buitrago A., 2018)

Grupo	Ensayo	Reactivo	Preparación de muestra	Procedimiento	Resultado
Alcaloides	Warner	Solución I ₂ y KI	Se disolvieron en tubos de ensayo, tres porciones del extracto con 2 mL de HCl al 5 %. Luego, se agitaron en vortex y filtraron	Adición de gotas de reactivo	Precipitado color rojo pardo
	Dragendorff	Bi(NO ₃) ₃ ·5H ₂ O y KI			Precipitado color rojo o anaranjado
Glucósidos y Glicósidos cardiotónicos	Reacción con hidróxido de sodio	Solución de NaOH 2N	Se disolvieron en tubos de ensayo, tres porciones del extracto con 2 mL metanol. Luego, se agitaron en vortex y filtraron	Adición de cinco gotas de la base	Color amarillo (glicósidos)
	Keller–Killiani	H ₂ SO ₄ concentrado, CH ₃ COOH glacial y FeCl ₃			Adición de reactivo con cinco gotas del ácido fuerte
Flavonoides	Reacción de Pew's	Polvo de zinc y HCl 5 N	Se disolvieron en tubos de ensayo, tres porciones del extracto con 2 mL metanol. Luego, se agitaron en vortex y filtraron	Adición de gotas del ácido y una porción del polvo	Color rojo púrpura o rojo cereza (dihidroflavonas). Color rosa o café (flavononas y dihydrochalconas)
	Reacción de hidróxido de sodio	NaOH 10 %		Adición de 3 gotas de la base fuerte	Color amarillo a rojo (xantonas y flavonas). Color café a púrpura rojizo (chalconas). Color azul (antocianinas)
Terpenos	Reacción de Lieberman Bouchard	H ₂ SO ₄ concentrado y CH ₃ COOH glacial	Se disolvieron en tubos de ensayo, tres porciones del extracto con 2 mL metanol. Luego, se agitaron en vortex y filtraron	Adición de 2 gotas del ácido débil y esterificar con 2 gotas del ácido fuerte	Interfase de color azul o verde (esteroides). Color amarillo anaranjado (triterpenoides)
	Reacción de Rosenthaler Vainillina Triterpenoides	Vainillina y H ₂ SO ₄ concentrado		Adición de 2 gotas reactivo con 2 gotas del ácido fuerte	Interfase de color violeta (triterpenoides)
	Prueba de Salkowski (esteroides)	H ₂ SO ₄ concentrado		Adicionar lentamente 2 mL del ácido fuerte	Interfase de color marrón rojizo (anillo esteroideo)
Mucilagos	Enfriamiento a 0-5 °C	Agua destilada	Se disolvieron en tubos de ensayo, tres porciones del extracto con 2 mL agua.	Enfriar a una temperatura de 0-5	Consistencia gelatinosa (mucilago)

Luego, se agitaron en vortex y filtraron °C

Tabla 16.-Procedimiento para el tamizaje fitoquímico que se realizará en los extractos metanólicos de especies del género *Crinum*L. (Continuación)

Compuestos Fenólicos	Prueba de FeCl ₃	FeCl ₃ , solución de NaCl 0,9 % m/v y CH ₃ COONa	Se disolvieron en tubos de ensayo, tres porciones del extracto con 2 mL metanol. Luego, se agitaron en vortex y filtraron	Adición de 3 gotas del acetato, neutralizada con 3 gotas la sal férrica en solución fisiológica	Color rojo vino, verde o azul (compuestos fenólicos)
Antraquinonas	Reacción con Amonio	NH ₄ OH concentrado	Se disolvieron en tubos de ensayo, tres porciones del extracto con 2 mL metanol. Luego, se agitaron en vortex y filtraron	Adicionar 1 gota del reactivo	Color rojo (antraquinonas)
	Reacción con ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄ concentrado		Adicionar 1 gota del reactivo	Color rojo (quinonas)
Cumarinas	Reacción con hidróxido de amonio	NH ₄ OH concentrado	Se disolvieron en tubos de ensayo, tres porciones del extracto con 2 mL metanol. Luego, se agitaron en vortex y filtraron	Adición de 2 gotas de la base	Fluorescencia de color azul, verde o amarillo a una longitud de onda de 365 nm
Saponinas	Prueba de la altura de la espuma	Aguadestilada	Se disolvieron en tubos de ensayo, tres porciones del extracto con 2 mL de agua. Luego, se agitaron en vortex y filtraron	El extracto acuoso se agitó vigorosamente y se medirá la altura de la espuma	Altura de la espuma entre 8 a 10 mm, estable por 30 minutos
	Prueba de Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	Se disolvió una porción del extracto con 50 mL de agua. Luego, se agitó en vortex y filtra	Adición de gotas de la sal y agitar vigorosamente durante 3 minutos	La formación de espuma en forma de panal de abeja (saponinas)
Taninos	Control	Agua destilada, CH ₃ CH ₂ OH y NaCl	Se disolvieron 100 mg del extracto en 10 mL de etanol y se agitó durante 5 minutos. Luego se realizó una extracción con 25 mL de agua destilada, la solución resultante se calentó hasta ebullición durante 15 minutos. A la solución se le adicionó 0,2 mL de NaCl al 10 % y se filtró. Se rotularon 5 tubos de ensayo y se le adicionaron 3 mL del filtrado	Tubo 1: control	Sin reacción
	Gelatina 1 %	Gelatina		Tubo 2: agregar 5 gotas de solución de gelatina	Precipitado de color blanco (taninos)
	Gelatina (1%) – Sal (10%)	Gelatina y NaCl		Tubo 3: agregar 5 gotas de la solución salina en gelatina	Precipitado de color blanco (taninos)
	Tricloruro férrico	FeCl ₃ 10 %		Tubo 4: agregar 3 gotas de la solución de la sal férrica	Colorrojo-vino (compuestos fenólicos). Color verde intenso (taninos pirocateólicos). Color azul (taninos pirogalatánicos)
	Ferricianuro de potasio	K ₃ Fe(CN) ₆ 1 %		Tubo 5: agregar 1 gota de la cuaternaria	Color azul (fenólicos)

La determinación de los metabolitos se realizó de manera cualitativa a través del sistema no paramétrico de cruces: +++: abundante, ++: medio, +: escaso, -: ausencia **Tomado y modificado de:** A. Buitrago, 2018.

www.bdigital.ula.ve

V.1.4.-Obtención de las fracciones alcaloidales

La obtención de las fracciones alcaloidales de cada uno de los extractos en estudio (CA, CM, CE y CL) se realizó en el Laboratorio C de Productos Naturales “Antonio Morales” del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes, bajo la supervisión de la Dra. Janne Rojas y el Dr. Alexis Buitrago.

El extracto metanólico seco de las hojas y bulbos de cada especie se llevó a pH 2, por separado, con una solución al 2 % v/v de ácido sulfúrico (H_2SO_4), la solución ácida se extrajo con éter etílico y luego con acetato de etilo. Posteriormente, se llevó a pH 10 con una solución de NH_4OH al 25%, v/v y se extrajo nuevamente con acetato de etilo. Las fases orgánicas, se concentraron a presión reducida en un rotavapor. Una vez obtenidos los extractos secos, se pesaron y guardaron en frascos ámbar rotulados, en resguardo de la luz y el calor hasta la realización de los ensayos de actividad biológica. El procedimiento del fraccionamiento ácido/base para obtención de extractos alcaloidales de las hojas y bulbos de las distintas especies del género *Crinum* se esquematiza en la Figura 7.

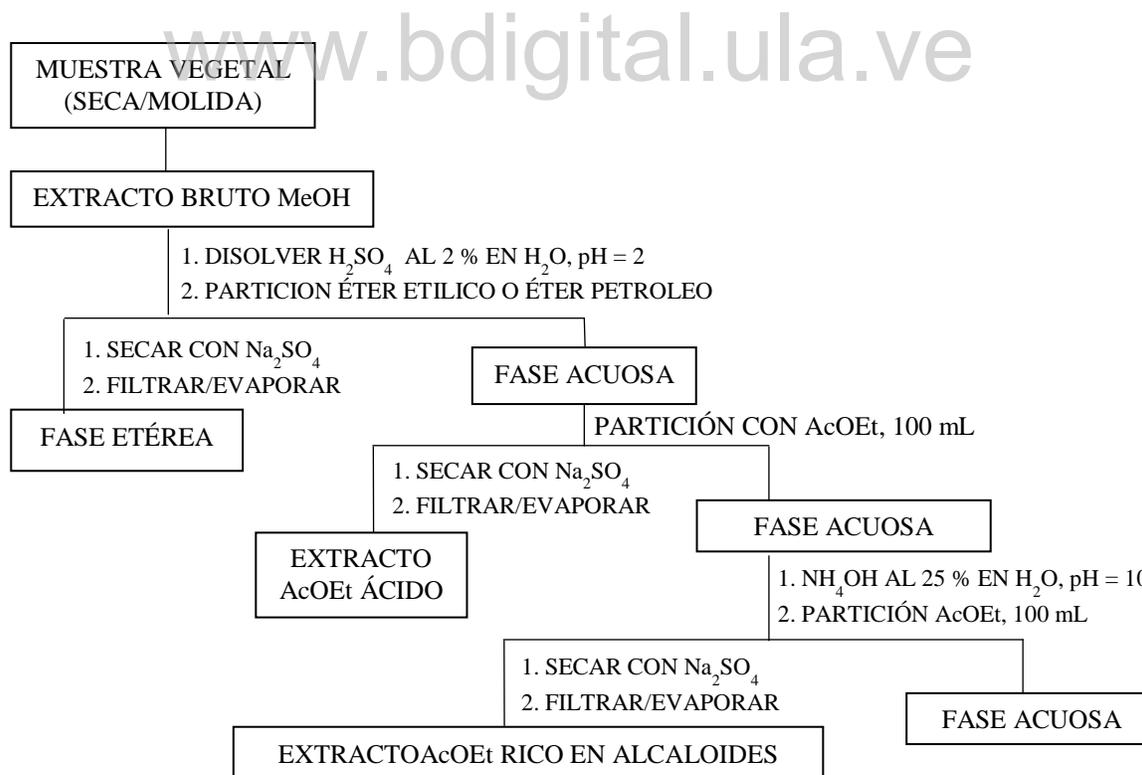


Figura 7.-Fraccionamiento ácido/base para la obtención de extractos ricos en alcaloides de hojas y bulbos de especies del género *Crinum* L.

Realizada por: Gina Achito, 2019.

V.1.5.-Identificación de la composición alcaloidal por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM)

Este análisis se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, España bajo la supervisión del Dr. Jaume Bastida Armengol, coordinador del proyecto “La biodiversidad iberoamericana como fuente de recursos naturales para su explotación sostenible” Código P415RT0062.

La identificación y cuantificación de los alcaloides se realizó en un cromatógrafo de gases (CG) modelo 6890N (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.), acoplado a un espectrómetro de masas modelo 5975 inerte XL que opera a 70 eV a una temperatura de 230 °C en la fuente iónica. El CG dispone de una columna Sapiens-X5 EM (30 m × 0,25 mm id, espesor de película 0,25 µm). Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 250 y 280 ° C y el flujo de gas portador (He) fue de 1 mL/min. Se disolvieron 2 mg de cada extracto en 1 mL de la mezcla MeOH:CHCl₃ (1: 1, v / v) y se inyectó 1 µL utilizando el modo splitless. Como alcaloide estándar de referencia para todos los análisis se utilizó codeína (0,05 mg/mL). La temperatura inicial fue de 100 ° C durante 12 min, luego se fue incrementando 15 ° C/min hasta 180 ° C, seguidamente se aumentó 5 ° C/min hasta llegar a 300 ° C para dejarlo a esa temperatura por 10 min.

Para la identificación de los alcaloides se utilizó la base de datos NIST 05 y comparaciones de los índices de retención con los publicados en literatura. La base de datos fue ampliada utilizando las características espectrales de alcaloides previamente aislados y elucidados a través de los métodos espectroscópicos y espectrométricos RMN, UV, CD, IR, EM en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, España.

V.1.6.-Ensayos para determinar actividad biológica en las especies en estudio

Los extractos metanólicos y fracciones alcaloidales de bulbos y hojas obtenidos de las diferentes especies del género *Crinum*, se evaluaron en cuanto a la actividad antimicrobiana, ecotóxica frente *Artemia salina*, inhibición de las enzimas acetilcolinesterasa y

butirilcolinesterasa. En este sentido, los protocolos experimentales de las distintas actividades biológicas, están descritos a continuación:

V.1.6.1.-Ensayo de toxicidad sobre *Artemia salina*

Este análisis se llevó a cabo en el Departamento de Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo la supervisión del Dr. Tomás Visbal y la Dra. Marielba Morillo, y en colaboración con el Dr. Alexis Buitrago y la Dra. Janne Rojas del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. A continuación, se detalla el procedimiento para el análisis del impacto ecotoxicológico de los extractos (metanólicos y alcaloidales) de las especies de *Crinum*, medida a través de la mortalidad de los nauplios de *Artemia salina* por el método de micropocillos de Kinner (1971):

1. Sistema de incubación: se adecuó un recipiente rectangular (≈ 57 L) al que se le agregó agua natural hasta alcanzar una altura de 7 cm. La solución marina artificial (1 L), la cual se preparó con cloruro de sodio (NaCl), sulfato de magnesio hexahidratado ($MgSO_4 \cdot 6H_2O$), cloruro de magnesio hexahidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), cloruro de potasio (KCl), bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$), carbonato de sodio (Na_2CO_3) y cloruro de calcio ($CaCl_2$) se sometió a oxigenación por 72 h. y posteriormente se llevó a un pH de 7 aproximadamente.
2. Incubación: transcurrido el tiempo de aireación, la solución marina se dividió en dos porciones de 500 mL cada una, colocándose en recipientes Erlenmeyer. A uno de estos envases se le agregaron 200 mg de quistes de *Artemia* (Yourfishstuff yfs®-USA) y el otro se dejó para preparar las diluciones de extractos y llenado de las placas. Ambos recipientes se colocaron en la cámara de incubación con aireado e iluminación (regulador LifeTech aquarium 200 watts) constantes a temperatura de $28^\circ C$ por 48 h.
3. Bioensayo: cada microplaca de 96 pozos se le adicionó 130 μL de solución salina, 10 μL de solución marina que contenía 15 nauplios, 10 μL de levadura comercial diluida (5 mg/mL) y se incubó en un área iluminada por 24 h a temperatura

ambiente. Transcurrido el tiempo, se colocaron 50 μL de extracto (metanólico o alcaloidal) a distintas concentraciones (5, 25, 250, 750, 1250 y 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

4. Valoración de extractos sobre nauplios de *Artemia salina*: al cabo de 24 h. se contabilizaron los nauplios tanto vivos como muertos. Con estos datos se realizó el cálculo del porcentaje de letalidad y la concentración letal media (CL_{50}), con un intervalo de confianza del 95% usando el método de análisis Probit descrito por Finney (Meyer y col., 1982). Para esto, se usó el programa estadístico SPSS 23. Para estimar el grado de toxicidad se usaron los parámetros establecidos por el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Para este ensayo se usó como control positivo Dodecil Sulfato de Sodio (DSS) al 10% y como control negativo solución marina en DMSO en relación 9:1.

V.1.6.2.-Actividad Antibacteriana

El análisis de la actividad antibacteriana se desarrolló en el Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios (SGU) "Profesora Luisa Vizcaya", del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo la supervisión de la Dra. Judith Velasco Carrillo; empleando el método de difusión en agar con discos impregnados. Se utilizaron para el ensayo, microorganismos de referencia internacional: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). La metodología establecida que se aplicó para el análisis de la actividad antibacteriana (Velasco y col., 2007) es como sigue:

1. Preparación del medio de cultivo: se colocó aproximadamente 20 mL de agar Müeller-Hinton (Himedia®) en placas de Petri. Una vez solidificado el agar en la placa, se realizó el control de esterilidad y se conservaron a 4 °C hasta el día del ensayo.
2. Preparación de los discos: los discos de papel de filtro con un diámetro de 6 mm, se impregnaron con 20 μL de la solución a probar (extractos metanólicos y alcaloidales) preparados a una concentración de 500 mg/mL, usando como solvente el mismo de la extracción. Luego se colocaron en placas de Petri y esterilizaron bajo luz UV, durante 90 minutos previo al ensayo.

3. Reactivación de los microorganismos: las bacterias se mantuvieron en medio de conservación a temperatura ambiente (Weng-Aléman y col., 2003); a partir de este medio se reactivaron las cepas y se verificó su pureza.
4. Preparación de los inóculos: los inóculos se prepararon en solución salina estéril (0,85 % p/v NaCl), a partir de un cultivo fresco de cada cepa bacteriana repicada en caldo Müeller-Hinton, hasta lograr una turbidez correspondiente al patrón de McFarland N° 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) para las cepas bacterianas.
5. Inoculación: los inóculos de cada microorganismo, se sembraron en la superficie del agar con un hisopo estéril. Seguidamente, se colocaron sobre el agar inoculado, los discos de papel de filtro impregnados con las muestras, solventes (control negativo) y fármacos de referencia para cada microorganismo (controles positivos).
6. Pre-incubación e incubación: con el interés de permitir que los componentes presentes en los extractos se difundan sobre el agar inoculado, se realizó una pre-incubación durante 18 h a la temperatura de 4 °C. Transcurrido este tiempo, las placas fueron incubadas en estufa a 37 °C por 48 h.
7. Lectura de los ensayos: se realizaron las lecturas de los halos de inhibición a las 24 h y 48 h, expresando el diámetro de la zona de inhibición en milímetros (mm). La prueba se consideró negativa cuando se observó crecimiento microbiano alrededor de los discos.
8. Determinación de la (CIM): esta prueba se realizó en aquellos microorganismos que mostraron susceptibilidad frente a los extractos metanólicos y fracciones alcaloidales. Para esto, se prepararon diluciones a diferentes rangos de concentración y se aplicó el procedimiento antes descrito, el cual, permitió establecer la concentración más baja capaz para inhibir el crecimiento bacteriano (CLSI, 2018).

V.1.6.3.-Actividad inhibitoria de las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE)

La valoración de la actividad inhibidora *In Vitro* de las enzimas AChE y BuChE de las muestras alcaloides de las diferentes especies de *Crinum* se realizó en la Universidad de Barcelona, España bajo la supervisión del Dr. Jaume Bastida Armengol, empleando la técnica fotométrica en microplacas de acuerdo al método de Ellman y col., (1961) con

algunas modificaciones. En la ejecución del ensayo de inhibición de AChE y BuChE fue imprescindible la siguiente secuencia de adición de reactivos:

1. A cada pozo de las placas de Elisa se le agregó 50 μ L de extracto alcaloidal disuelto en MeOH al 1,5% diluido en PBS (buffer fosfato salino).
2. Seguidamente se adicionó la solución PBS preparada con K_2HPO_4 8 mM y NaH_2PO_4 2,3 mM.
3. El sustrato se preparó mezclando yoduro de acetiltiocolina (ATC) o cloruro de butiriltiocolina (BTC) y ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) (Merck, Alemania Darmstadt) y se colocó en un matraz de 25 mL de capacidad y se cubrió con papel aluminio; se guardó en refrigeración a una temperatura de $-20\text{ }^\circ\text{C}$.
4. La enzima comercial se pesó y disolvió en PBS, luego, se distribuyó en eppendorfs (6,24 U para ambas enzimas usadas), los cuales se rotularon y conservaron en refrigerador ($-30\text{ }^\circ\text{C}$). En el momento del ensayo, se disolvió el contenido de un eppendorf en 25 mL de solución (matraz) para obtener 0,25 U/mL ($6,24\text{ U} / 25\text{ mL} = 0,25\text{ U/mL}$).
5. Posteriormente se agregó 50 μ L de la enzima AChE o BuChE con pipeta multicanal a las placas que contenían las muestras y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente.
6. Por último, se adicionó 100 μ L de solución de sustrato con pipeta multicanal (0,1 M Na_2HPO_4 ; 0,5 M DTNB y 0,6 mM ATCI o 0,24 mM BTCI en agua Millipore, pH 7,5).
7. La lectura de las placas se realizó a los 10 minutos usando un espectrofotómetro de absorbancia de microplacas Labsystem (Thermo Fischer, Waltham, MA, EE.UU.) a 405 nm.
8. En la determinación del IC_{50} las muestras se evaluaron a 10, 100 y 200 μ g/mL en ambas enzimas. Las muestras con valores de concentración superior a 200 μ g/mL se consideraron inactivas; mientras que las muestras que presentaron actividad a concentraciones menores de 200 μ g/mL se les determinó el IC_{50} . Se usó como control

positivo Galantamina®. Los datos de inhibición de la colinesterasa se analizaron con el software Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, Redmond, WA, EE. UU.).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1.1.-Análisis cualitativo de los metabolitos secundarios presentes en las especies de *Crinum L.*

Los extractos metanólicos concentrados de las hojas y bulbos de cada especie en estudio fueron pesados y con estos datos se realizó el cálculo de rendimiento para cada muestra. Como puede observarse en la Tabla 17, las hojas de **CL** mostraron el mayor rendimiento (53,83 %), seguido por los extractos de **CAH**(19,82%), **CEB**(17,99 %), **CMH**(17,74 %), **CEH** (12,13 %) y **CMB** (11,29 %). Las proporciones más bajas observadas en los bulbos de las especies **CL** (7,14 %) y **CA** (6,69 %).

Tabla 17.-Resultados de la obtención del extracto metanólico de las distintas especies de *Crinum*

Especie	Peso planta seca (g)	Peso extracto MeOH (g)	% Rendimiento
CLH	107	57,60	53,83 %
CAH	156	30,93	19,82 %
CEB	102	18,35	17,99 %
CMH	195	34,60	17,74 %
CEH	195	23,65	12,13 %
CMB	183	20,66	11,29 %
CLB	173	12,35	7,14 %
CAB	179	11,98	6,69 %

Elaborada por: Gina Achito, 2019.

El tamizaje fitoquímico de los extractos metanólicos obtenidos de bulbos y hojas de **CA**, **CM**, **CE** y **CL** permitió determinar cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios tales como: alcaloides, glicósidos, flavonoides, esteroides, terpenos, mucílagos, compuestos fenólicos, antraquinonas, cumarinas, saponinas y taninos. Los resultados presentados en la Tabla 18, muestran altas concentraciones de alcaloides en los ensayos de Wagner y Dragendorff, observándose la mayor proporción en **CAH**, **CMH**, **CEB**, **CLB** y **CEH**. Al mismo tiempo, se observaron niveles moderados en **CAB**, **CMB** y **CLH**.

Por otra parte, los ensayos de Pew's e hidróxido de sodio revelaron la mayor cantidad de flavonoides en el extracto **CMH**, a diferencia de **CAH, CAB, CEB, CLB, CMB, CLH** y **CEH** donde se encontraron en cantidades de moderada a escasa.

Tabla 18.-Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos metanólicos de especies del género *Crinum*

Metabolitos secundarios	Pruebas	Especie							
		<i>C. amabile</i>		<i>C. moorei</i>		<i>C. erubescens</i>		<i>C. latifolium</i>	
		h	b	h	b	h	b	h	b
Alcaloides	Wagner	+++	++	+++	++	++	+++	+	+++
	Dragendorff	+++	++	+++	++	+++	+++	++	+++
Glicósidos	NaOH _{conc}	+	+++	+++	+	++	+++	+++	+++
	Keller Killiani	-	++	+	++	++	-	+	+
Flavonoides	Pew's	+++	+	+++	++	-	+	-	+
	NaOH 10 %	+	+++	+++	+	++	+++	+++	+++
Esteroides	Lieberman	+	++	+++	+++	++	+	++	++
	Bouchard	+	++	+++	+++	++	+	++	++
Terpenoides	Rosenthaler	+	+	+++	+	++	++	-	+
	Salkowski	+	+++	+++	+++	+	-	+++	++
Mucílagos	Enfriamiento 5 °C	-	-	-	-	-	-	-	-
Compuestos Fenoles	FeCl ₃ 5 %	+	+++	++	++	++	+++	+++	++
	NaCl 0,9 %	+	+++	++	++	++	+++	+++	++
Antraquinonas	NH ₄ OH _{conc}	+	+	+++	++	-	-	-	-
	H ₂ SO _{4conc}	+	+++	++	+++	-	-	-	-
Cumarinas (fluorescencia)	NH ₄ OH	+	+++	+	++	+	++	+	++
Saponinas	Altura de la espuma	+	-	+	++	+	+	+	+
	NaHCO ₃	++	+	+	++	NE	NE	NE	NE
Taninos	Gelatina 1 %	+	-	-	-	-	-	-	-
	Solución gelatina-NaCl	+	-	-	+	-	-	-	-
	FeCl ₃	+++	+	++	+	-	-	+	-
	K ₃ Fe(CN) ₆	++	-	-	-	-	-	-	-

h: hojas; **b:** bulbos; **NE:** no ensayada; **+++:** abundante; **++:** medio; **+**: escaso; **-:** ausencia

Elaborada por: Gina Achito, 2019.

Las pruebas de Lieberman, Rosenthaler y Salkowski mostraron la presencia de triterpenos y esteroides para las todas las especies analizadas. Mientras que, en el ensayo con hidróxido de sodio se detectó abundante presencia de glicósidos en **CAB**; moderada para **CLH, CLB, CMH, CEH** y bajas concentraciones para **CEB, CMB** y **CAH**. Por otro lado, el ensayo con tricloruro férrico determinó la presencia de compuestos fenólicos, siendo abundante para **CAB, CEB** y **CLH**; moderada para los extractos de las especies **CMH, CMB, CEH** y **CLB**; y escaso para **CAH**. Con relación a la presencia de cumarinas, el ensayo con hidróxido de amonio mostró elevada presencia de este tipo de metabolito en el extracto de **CAB**,

moderada en **CLB**, **CMB** y **CEB**, mientras que, en los extractos de las hojas de todas las especies en estudio, la reacción fue leve.

El ensayo de la altura de la espuma permitió la determinación de saponinas en todas las especies de *Crinum*, apreciándose cantidades moderadas para **CMB** y **CAH**; y en forma escasas para los demás extractos metanólicos. Con relación a las concentraciones de antraquinonas por medio de las reacciones con hidróxido de amonio y ácido sulfúrico, se encontraron elevados niveles en **CMH**, **CMB** y **CAB**; escasa cantidad en **CAH** y completa ausencia para los extractos de las especies **CE** y **CL**. En la detección de taninos, solo en **CAH** se evidenció la mayor proporción de estos metabolitos; mientras que, pequeñas cantidades en las especies **CMH**, **CMB**, **CAB** y **CLH**; y no se evidenció la presencia en **CEH**, **CEB** y **CLB**. Finalmente, las pruebas para determinar mucilagos arrojaron la ausencia de estos compuestos químicos en las especies ensayadas.

Estudios previos han revelado la presencia de alcaloides en especies del género *Crinum*, tales como: *C. amabile*, *C. latifolium*, *C. erubescens*, *C. asiaticum*, *C. zeylanicum*, *C. jagus*, *C. powellii*, *C. brachynema*, *C. pratense*, *C. solapureense*, *C. viviparum*, *C. malabaricum* y *C. woodrowii* (Ghane y col., 2018; Vinueza y col., 2018; Portero, 2017; Zapata, 2017; Udegbunam y col., 2015a; Udegbunam y col., 2015b; Dewan & Das, 2013; Tijani y col., 2012; Solanki y col., 2011; Calderón y col., 2010), lo cual concuerda con lo reportado en la literatura sobre la presencia de alcaloides en las especies de la familia Amaryllidaceae. Por otro lado, elevada presencia de flavonoides ha sido evidenciada en las especies de *C. asiaticum*, *C. latifolium*, *C. jagus*, *C. powellii*, *C. brachynema*, *C. pratense*, *C. solapureense*, *C. viviparum*, *C. malabaricum*, *C. woodrowii*, *C. amabile* y *C. zeylanicum* (Ghane y col., 2018; Vinueza y col., 2018; Portero, 2017; Zapata, 2017; Tijani y col., 2012; Solanki y col., 2011). Así como, estructuras correspondientes a los núcleos esteroides, cumarinas en extractos de *C. amabile* (Zapata, 2017; Vinueza y col., 2018).

Otras investigaciones han evidenciado la presencia de glucósidos cardiotónicos en *C. amabile*, *C. jagus* y *C. latifolium* (Vinueza y col., 2018; Udegbunam y col., 2015a; Udegbunam y col., 2015b; Dewan & Das, 2013; Solanki y col., 2011); compuestos fenólicos y taninos en *C. amabile*, *C. latifolium*, *C. asiaticum*, *C. jagus*, *C. powellii*, *C.*

brachynema, *C. pratense*, *C. solapurense*, *C. viviparum*, *C. malabaricum*, *C. woodrowii*, *C. zeylanicum* y *C. jagus* (Ghane y col., 2018; Vinueza y col., 2018; Zapata, 2017; Udegbunam y col., 2015a; Udegbunam y col., 2015b; Dewan & Das, 2013; Tijani y col., 2012; Solanki y col., 2011). Así mismo, la existencia de saponinas en *C. amabile*, *C. jagus* y *C. zeylanicum* (Vinueza y col., 2018; Portero, 2017; Udegbunam y col., 2015a; Udegbunam y col., 2015b; Tijani y col., 2012; Solanki y col., 2011).

Es importante resaltar que no se encontró en la literatura consultada, ensayos con hidróxido de amonio o ácido sulfúrico para determinar antraquinonas, sin embargo, mediante otrostest (ensayo de Borntrager) se reveló la presencia de quinonas y glucósidos de antraquinona en *C. amabile* y *C. latifolium* (Portero, 2017; Zapata, 2017; Solanki y col., 2011). Finalmente, los estudios concuerdan con la ausencia de mucilagos en los bulbos de *C. amabile* (Portero, 2017); por otra parte, otros reportes indican que han sido aislados en las hojas de *C. latifolium* y *C. amabile* (Zapata, 2017; Dewan & Das, 2013; Solanki y col., 2011).

VI.1.2.-Identificación de la composición química alcaloidal por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM)

Los extractos de las hojas y los bulbos de **CA**, **CE**, **CL** y **CM** se liofilizaron para la obtención de tejido seco, cuantificación del rendimiento, y respectivo análisis del contenido de alcaloides por CG/EM, en el Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad de Barcelona. La cantidad de material seco obtenido para las especies de *Crinum* recolectadas en distintos Municipios del estado Mérida, fueron los siguientes: **CA (h: 5,21 g; b: 5,16 g)**, **CE (h: 5,09 g; b: 5,20 g)**, **CL (h: 5,7 g; b: 5,4 g)** y **CM (h: 5,06 g; b: 5,05 g)**.

Los resultados obtenidos por CG/EM de las especies de *Crinum* se muestran en la Tabla 19, los mismos se identificaron mediante comparación con los tiempos de retención (**Rt**); los patrones de fragmentación y la interpretación de los datos del cromatograma. Adicionalmente, se utilizó la base de datos constituida por de más de 500 alcaloides previamente aislados e identificados por los métodos RMN, UV, CD, IR, EM en el Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad de Barcelona España, la base de datos

NIST 05 y datos de la literatura (de Andrade y col., 2012; de Andrade y col., 2014; Torras-Claveria y col., 2014; Tallini y col., 2017a; Tallini y col., 2017b; Guo y col., 2014). En el presente estudio, se identificaron 56 alcaloides: 30 de estructuras conocidas y 26 que no pudieron ser identificados y serán objeto de estudios posteriores.

Tabla 19. Identificación de los alcaloides presentes en hojas y bulbos de especies de *Crinum* por CG/EM

ALCALOIDE	<i>C. amabile</i>		<i>C. erubescens</i>		<i>C. moorei</i>		<i>C. latifolium</i>		
	IK	% h	% b	% h	% b	% h	% b	% h	% b
Tipo hemantamina/crinina									
bufanina (33)	2458,6	15,75	11,79	-	-	-	-	-	0,61
vittatina (77)/ crinina (32)	2506,2	<0,1	3,67	-	1,15	0,57	17,64	0,92	8,38
8-O-demetilmaritidina (71)	2536,9	-	-	-	0,50	-	-	-	-
hemantamina (70)	2542,0	6,44	-	-	-	-	-	-	-
augustina (48)	2599,7	3,85	6,24	-	-	-	-	-	-
bufanidrina (38)	2642,1	-	-	-	-	16,02	1,62	2,37	1,92
6-metoxibufanidrina (46)	2644,1	-	-	-	-	-	-	0,98	-
crinamina (74)	2681,2	-	6,93	19,33	9,78	1,04	<0,1	-	-
powelina (39)	2695,7	-	-	-	-	2,71	12,53	-	-
1,2-didehidro-crinan-11-ol (45)	2727,8	-	-	3,31	-	-	-	-	-
undulatina (47)	2786,0	-	-	-	-	18,76	-	1,24	-
ambelina (34)	2811,0	3,65	3,38	-	-	-	-	78,65	55,66
6-hidroxibufanidrina (35)	2820,6	0,61	-	-	-	-	-	-	-
crinamidina (53)	2881,4	-	-	-	-	1,85	1,41	-	-
bowdensina (62)	2976,5	-	-	-	-	1,10	-	-	-
Tipo licorina									
1-O-acetilcaranina (10)	2554,8	-	1,60	-	-	-	-	-	-
11,12-dehidroanhidrolicorina (25)	2638,0	<0,1	0,55	1,57	3,20	-	0,38	-	-
sternbergina (12)	2739,4	-	1,35	-	-	-	-	-	-
1-O-acetillicorina (4)	2746,9	0,93	0,29	-	7,76	-	9,81	-	-
hipadina (24)	2771,5	-	<0,1	-	<0,1	-	<0,1	-	-
licorina (1)	2783,8	16,37	45,49	4,81	46,28	-	11,65	-	-
Tipo galantamina									
galantamina (85)	2427,5	-	0,25	-	-	-	-	-	0,38
sanguinina (86)	2450,1	0,96	1,64	-	-	-	-	-	-
Tipo narciclasina									
triferaidina (83)	2327,1	-	-	<0,1	-	-	-	-	-
Tipo tazetina									
macronina (89)	2850,2	-	-	2,74	2,45	-	-	-	-
Otros tipos									
demetilismina (95)	2291,2	-	-	0,75	0,29	-	-	-	-
ismina (94)	2305,2	-	-	<0,1	0,16	0,62	0,82	-	-

galantindol (93)	2531,3	-	-	-	-	0,67	0,80	-	-
cherilina (90)	2601,8	-	-	-	-	0,80	4,67	-	-
2-oxomesembrenona (96)	2693,6	-	-	-	-	-	-	-	0,42

IK: Índice de Kovats, **%h:** porcentaje de abundancia en hojas respecto a la mezcla total, **%b:** porcentaje de abundancia en bulbos respecto a la mezcla total, **m/z:** relación masa/carga

Tabla19.-Identificación de los alcaloides presentes en hojas y bulbos de especies de *Crinum* por CG/EM (continuación)

ALCALOIDE	IK	<i>C. amabile</i>		<i>C. erubescens</i>		<i>C. moorei</i>		<i>C. latifolium</i>	
		% h	%b	% h	%b	% h	%b	% h	%b
No identificados									
m/z 287 [M=287]	2485,3	0,55	-	-	-	-	-	-	-
m/z 300 [M=301]	2497,7	2,18	-	-	-	-	-	-	-
m/z 260 [M=315]	2517,2	1,93	-	-	-	-	-	-	-
m/z 228 [M=315]	2545,8	-	2,15	-	-	-	-	-	-
m/z 210 [M=285]	2590,5	-	-	-	-	-	0,96	-	-
m/z 343 [M=343]	2627,3	-	-	-	-	<0,1	-	-	-
m/z 314 [M=345] 6-metoxibifanidrina?	2651,4	14,15	-	-	-	-	-	-	-
m/z 246 [M=301] O-metilmartidina?	2654,0	<0,1	-	-	-	-	-	-	-
m/z 272 [M=273]	2683,4	11,44	-	-	-	-	-	-	-
m/z 329 [M=329]	2717,9	-	-	-	-	-	-	-	0,53
m/z 315 [M=315]	2720,9	-	-	-	-	-	-	8,29	-
m/z 287 [M=331]	2742,2	0,57	-	-	-	-	-	-	-
m/z 373 [M=226]	2791,8	-	-	-	-	-	-	-	32,09
m/z 226 [M=331]	2794,3	-	-	-	-	-	12,96	-	-
m/z 375 [M=375]	2849,0	-	-	-	-	-	<0,1	-	-
m/z 315 [M=315]	2874,1	1,17	-	-	-	-	-	-	-
m/z 389 [M=287]	2891,5	-	-	-	3,85	-	-	-	-
m/z 260 [M=315]	2895,5	-	-	19,99	-	-	-	-	-
m/z 319 [M=319]	2904,7	-	-	-	-	1,03	-	-	-
m/z 329 [M=329]	2924,3	-	-	-	0,30	-	-	-	-
m/z 319 [M=319]	2924,4	-	-	-	-	7,14	-	-	-
m/z 316 [M=289]	2940,4	0,29	-	-	-	-	-	-	-
m/z 316 [M=389]	2944,4	-	-	-	-	-	-	7,55	-
m/z 361 [M=361]	2970,2	-	-	-	-	9,60	-	-	-
m/z 389 [M=389]	3045,7	-	-	1,94	-	-	-	-	-
m/z 225 [M=343]	3173,3	-	-	2,14	-	-	-	-	-

IK: Índice de Kovats, **%h:** porcentaje de abundancia en hojas respecto a la mezcla total, **%b:** porcentaje de abundancia en bulbos respecto a la mezcla total, **m/z:** relación masa/carga

Elaborada por: Gina Achito, 2019.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la mayor concentración de alcaloides se detectó en las hojas de **CA**, luego se ubican los bulbos de **CM**, **CA** y hojas de **CM**; mientras que, el

contenido más bajo fue para los bulbos y las hojas de **CL**. Cabe resaltar que el 44,6 % de los alcaloides identificados son de los tipos hemantamina/crinina, licorina, galantamina, narciclasina y tazetina (Figura8). El alcaloide vittatina (77)/crinina (32) se encuentra presente en todas las especies, excepto en las hojas de **CE** con mayor proporción en los bulbos de **CM** y en menor contenido en las partes aéreas de **CA**.

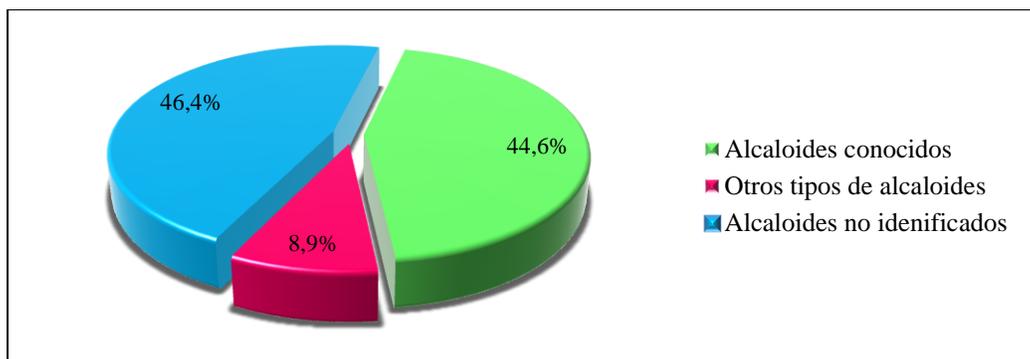


Figura8.-Porcentaje de abundancia de alcaloides totales presentes en hojas y bulbos de especies *Crinum* por CG/EM.

Elaborada por: Gina Achito, 2019.

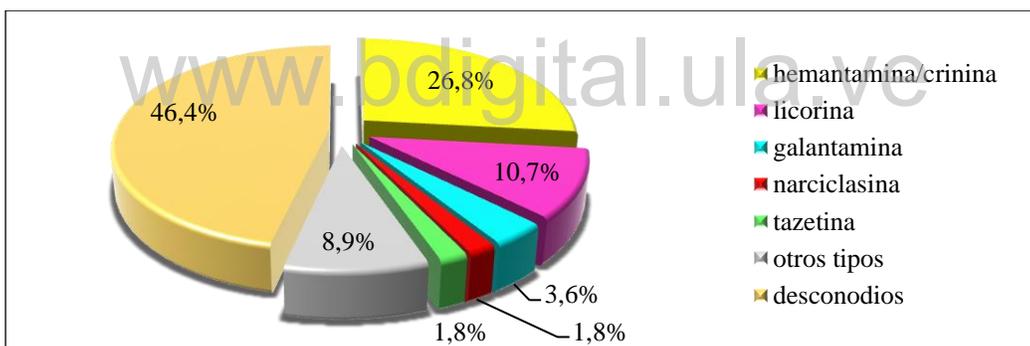


Figura9.-Porcentaje de abundancia de los tipos de alcaloides presentes en hojas y bulbos de especies *Crinum* por CG/EM

Elaborado por: Gina Achito, 2019.

De las muestras analizadas, se detectaron alcaloides tipo hemantamina/ crinina en todas las especies de *Crinum*, predominando en las hojas de **CM** y **CA**; y en menor proporción en las hojas de **CE**. Por su parte, los alcaloides tipo licorina se encontraron en todas las muestras, excepto en los bulbos y hojas de la especie **CL** y en las hojas de **CM**; siendo más representativo en los bulbos de **CA**, y en menor proporción en las hojas de **CE**. Con relación a los alcaloides del tipo galantamina se detectaron solo en bulbos de **CA** y **CL**, y en las partes aéreas de **CA**. El alcaloide tipo narciclasina se detectó en las hojas de **CE**.

Mientras que, la macronina (**89**) un alcaloide tipo tazetina se localizó tanto en bulbos como en las hojas de la especie **CE**.

Es importante resaltar que, 26 compuestos no se pudieron identificar utilizando las bases de datos disponibles, lo que representa un 46,4 % del contenido neto analizado (Figura 8), siendo significativamente representativo entre las muestras. El mayor contenido de alcaloides no identificados se encontró en las partes aéreas de **CA** con un 16,1 % (Tabla 18). Por el contrario, las proporciones más bajas se localizaron en los bulbos de la misma especie con un 1,8 %; seguidamente con un 3,6 % se ubican los bulbos de **CL** y **CE**, y las hojas de **CL**, respectivamente. Por último, el análisis de CG/EM detectó que un 8,9 % (Figura 9), se encuentra representado por otros tipos de núcleos como: mesembrenona, cherilina, galantindol e ismina, estos compuestos se hicieron presentes en todas las muestras de *Crinum*, excepto en las partes de **CA**.

Investigaciones previas de la composición química en especies del género *Crinum* analizadas mediante métodos cromatográficos, revelaron la presencia de galantamina (**85**), sanguinina (**86**), 11,12-dehidroanhidrolicorina (**25**), 1-*O*-acetillicorina (**4**), ambelina (**34**), vittatina (**77**), sternbergina (**12**), crinamina (**74**), augustina (**48**), bufanisina (**33**) y licorina (**1**); en los bulbos de *C. amabile* recolectados en Brasil (Tallini y col., 2018a), Ecuador (Carrasco, 2017), Vietnam (Pham y col., 1998) y Tailandia (Likhitwitayawuid y col., 1993). Al comparar estos resultados con el presente análisis, en las muestras de **CA**, el alcaloide licorina (**1**) es el compuesto más representativo. De igual forma, en las hojas de **CA**, también se observaron los alcaloides hemantamina (**70**) y 6-hidroxibufanidrina (**35**), previamente reportados en el estudio realizado por Tallini y col., (2018a). Pese a que la cantidad de alcaloides identificados es similar a los de **CA**, nueve estructuras aún son desconocidas, lo que significa un campo abierto para nuevas moléculas bioactivas.

De las hojas frescas de *C. erubescens* recolectadas en Costa Rica se identificaron los alcaloides trisfaeridina (**83**), 11,12-dehidroanhidrolicorina (**25**), crinamina (**74**), macronina (**89**) e ismina (**94**) (Guerrieri y col., 2015); detectados también en los bulbos de **CE** en el

presente estudio. Por su parte, el alcaloide hipadina (**24**) obtenido en la investigación por Presley y col., (2016), coincide con los resultados del presente análisis.

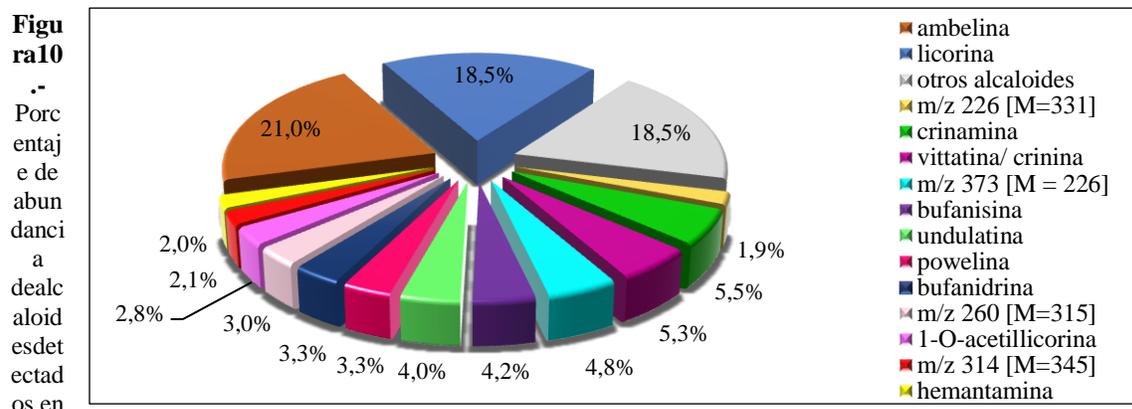
Por otra parte, los resultados de CG de la especie *C. moorei* oriunda de Vietnam (Elgorashi y col., 2003) y Sur África (Elgorashi y col., 2001); revelaron la presencia de licorina (**1**), cherilina (**90**), powelina (**39**), crinamidina (**53**), crinamina (**74**), crinina (**32**), undulatina (**47**), 1-*O*-acetillicorina (**4**), bufanidrina (**38**) y bowdensina (**62**); resultados que concuerdan con los obtenidos en las partes analizadas de **CM**, conjuntamente con los alcaloides: 11,12-dehidroanhidrolicorina (**25**), hipadina (**24**) (estos dos sólo en las hojas), ismina (**94**) y galantindol (**93**).

Con relación a especímenes de *C. latifolium*, una investigación reciente realizada por Hahn y col., (2018); señala la presencia de ambelina (**34**) y undulatina (**47**) en las hojas de la especie colectada en Vietnam. Mientras que, un estudio comparativo del contenido de alcaloides desarrollado por Tram y col., (2002a); cuantificó la presencia de estos componentes (en floración/ después de floración) observándose la presencia de los siguientes alcaloides: ambelina (**34**) (6,2/3,0%), undulatina (**47**) (19,9/<0,1%) y bufanidrina (**38**) (2,2/ 0%). Previamente, en plantas colectadas en Japón (Kobayashi y col., 1984) e India (Ghosal y col., 1983) se había confirmado la presencia de estas sustancias en la especie. Al compararlo con estudios previos con el presente, se observó una diferencia en el contenido de alcaloides identificados en **CL**.

Con respecto, al análisis del extracto alcaloidal de hojas y bulbos de las especies de *Crinum* estudiadas en la presente investigación se pudo establecer un estudio correlativo de la abundancia de las estructuras alcaloidales en las muestras ensayadas. Con referencia a lo anterior, de los 14 compuestos más representativos según el porcentaje (%) de abundancia respecto a la mezcla total (Figura 10), los alcaloides ambelina (**34**) y licorina (**1**) muestran los mayores porcentajes, 21,0 y 18,5 %, respectivamente, mientras que, el restante 18,5 % lo constituyen la sumatoria de los 42 alcaloides detectados en proporciones inferiores al 6 %. Entre estos alcaloides se encuentran crinamina (**74**), vittatina (**77**)/ crinina (**32**), bufanisina (**33**), undulatina (**47**), powelina (**39**), bufanidrina (**38**), 1-*O*-acetillicorina

(4), hemantamina (70) y tres compuestos desconocidos con unidades de ion molecular m/z 373, m/z 260 y m/z 314.

Estudios previos han demostrado que el alcaloide ambelina (34) junto con 1,2- β -epoxiamelina (57) activan los linfocitos esplénicos de ratón, siendo su actividad comparable con la de un mitógeno conocido, la concanavalina A (Fennell & van Staden, 2001).



hojas y bulbos de especies *Crinum* por CG/EM

Elaborada por: Gina Achito, 2019.

La licorina (1) es el alcaloide más frecuente en las especies de la familia Amaryllidaceae (Carrasco, 2017). Los estudios han reportado que posee efecto analgésico superior a la Aspirina®, lo cual se ha relacionado con su estructura similar a la morfina y codeína. Además, se ha demostrado que inhibe la biosíntesis del ácido ascórbico, posee acción antiarrítmica y bajo la forma de clorhidrato de licorina es un broncolítico fuerte (Bastida y col., 2011). También se le ha atribuido potente actividad antimalárica contra *P. falciparum*, antiinflamatoria superior a la Indometacina®, vasodilatadora y antitumoral al inhibir el crecimiento y la síntesis *In Vivo* de ADN y proteínas en células tumorales de ascitis murinas (Refaat y col., 2013). La variedad de propiedades farmacológicas y la baja toxicidad de este compuesto lo convierten en un posible precursor en el desarrollo de nuevos fármacos (Jin, 2016).

Por su parte, el alcaloide crinamina (74) ha reportado importantes actividades citotóxicas contra células fibroblásticas LMTK no tumorales, efectos inhibidores sobre la producción de óxido nítrico y la inducción de óxido nítrico sintasa (NOS) en macrófagos activados por lipopolisacáridos, y moderada actividad antipalúdica. Además, tanto la crinamina (74) como

la hemantamina (**70**) son potentes inductores de la apoptosis en células tumorales a concentraciones micromoleculares, siendo los elementos farmacofóricos el puente alfa-C-2 y un pequeño sustituyente (H u OH) en C-11 (Bastida y col., 2011). Asimismo, inhibe la actividad del factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1), posee efecto depresor respiratorio, antiproliferativo en doce líneas celulares (Refaat y col., 2013), actividad hipotensora al igual que la licorina (**1**) y la crinina (**32**) (Fennell y van Staden, 2001) y actividad antibacteriana frente a *B. subtilis* y *S. aureus* (Adesanya y otros, 1992).

En estudios recientes, el alcaloide bufanisina (**33**) demostró actividad anticancerígena al suprimir la invasión celular *In Vitro* (Carrasco, 2017). Por su parte, el 1-*O*-acetillicorina (**4**) es dos veces más potente que la galantamina (**85**) en la actividad de inhibición de la AChE (Elgorashi, Stafford & van Staden, 2004; Elgorashi & van Staden, 2009). Mientras que, hemantamina (**70**) ha demostrado efecto hipotensor y poseer fuerte actividad antirretroviral (Bastida y col., 2011).

Los estudios realizados a las diferentes especies de la familia Amaryllidaceae han mostrado una amplia variedad de propiedades biológicas de los alcaloides (Elgorashi & van Staden, 2009), en este sentido, el género *Crinum* se considera una fuente de compuestos bioactivos, destacando los alcaloides del tipo crinina, licorina y tazetina como los grupos más comúnmente aislados (Refaat y col., 2012a).

VI.1.3.-Pruebas de actividad biológica

VI.1.3.1.-Ensayo de letalidad sobre *Artemia salina*

La actividad ecotóxica *In Vitro* se determinó para los extractos metanólicos y alcaloidales de las hojas y bulbos, preparados a diferentes concentraciones de las especies del género *Crinum* mediante el bioensayo de letalidad con nauplios de *Artemia salina* a través de la técnica de micropocillos según Kinner, (1971).

Los resultados que se presentan en la Tabla 20, muestran que los % de letalidad sobre nauplios de *A. salina*, aumentaron en forma proporcional a la concentración de los extractos (Figuras 11 y 12). Estadísticamente, de las 16 muestras valoradas

y clasificadas por su toxicidad según el CYTED, 44 % se catalogaron como moderadamente tóxicas, seguido por 25 y 19 % de muestras altamente tóxicas y relativamente inocuas, respectivamente. Solo un 6% se consideraron entre ligeramente tóxicas y prácticamente no tóxicas (Figura 13). En resumen, los extractos metanólicos se ubicaron en el orden de moderadamente tóxico y relativamente inocuo, mientras que, los extractos alcaloidales mostraron ser entre moderadamente y altamente tóxicos.

Tabla 20.-Valores de CL₅₀ para los extractos de hojas y bulbos de especies *Crinum salina*

Extractos	especie (parte analizada)	concentración letal(ppm)	Límites de confianza (95%) (ppm)		Categoría según el CYTED
			inferior	Superior	
METANÓLICOS	CA (h)	121,40	10,75	383,64	Moderadamente tóxico
	CA (b)	654,17	166,03	1483,63	Ligeramente tóxico
	CE (h)	2405,10	1429,73	-	Relativamente inocuo
	CE (b)	2801,53	1613,56	-	Relativamente inocuo
	CL(h)	325,28	125,80	728,52	Moderadamente tóxico
	CL (b)	209,45	6,49	916,04	Moderadamente tóxico
	CM (h)	125,23	17,56	434,20	Moderadamente tóxico
	CM (b)	3400,98	1780,66	-	Relativamente inocuo
ALCALOIDALES	CA (h)	96,90	15,67	280,37	Altamente tóxico
	CA (b)	77,69	17,96	206,91	Altamente tóxico
	CE (h)	1121,27	287,46	-	Prácticamente no tóxico
	CE (b)	66,83	8,96	251,33	Altamente tóxico
	CL (h)	120,83	23,85	246,92	Moderadamente tóxico
	CL (b)	38,06	0,09	179,10	Altamente tóxico
	CM (h)	108,31	2,15	409,53	Moderadamente tóxico
	CM (b)	153,67	3,01	534,52	Moderadamente tóxico
controles	DMSO	-	-	-	Relativamente inocuo
	DDSS	13,11	0,00	223,93	Altamente tóxico

CA: *C. amabile*, CE: *C. erubescens*, CL: *C. latifolium*, CM: *C. moorei*, h: hojas, b: bulbos, ppm: partes por millón. CL₅₀: concentración letal media, CYTED: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, DMSO: Dimetilsulfóxido, DDSS: Dodecil sulfato de sodio, (-): valores muy altos

Elaborada por: Gina Achito, 2019.

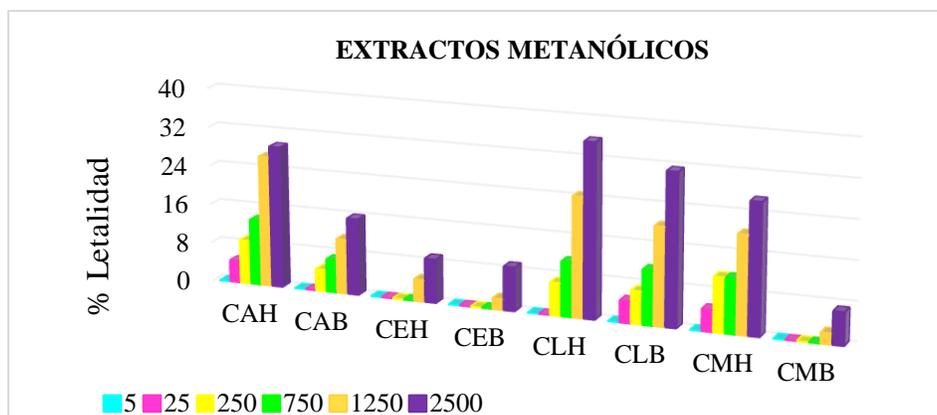


Figura 11.-Porcentaje (%) de letalidad de los extractos metanólicos de especies *Crinum* ensayadas en diferentes concentraciones expresadas en µg/mL
Elaborada por: Gina Achito, 2019.

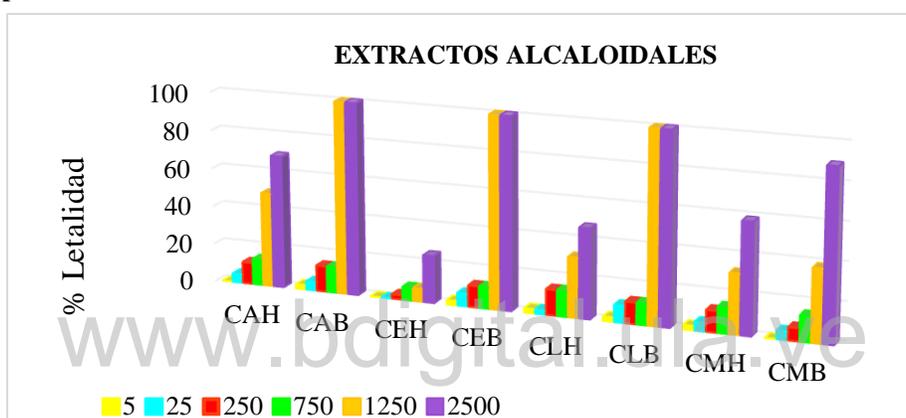


Figura 12.-Porcentaje (%) de letalidad de los extractos alcaloidales de especies *Crinum* ensayadas en diferentes concentraciones expresadas en µg/mL
Elaborada por: Gina Achito, 2019.

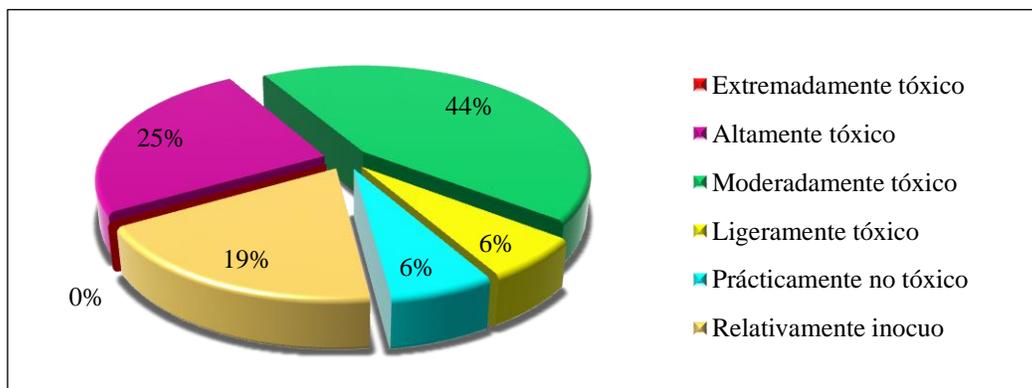
Con relación a los extractos metanólicos **CAH**, **CMH**, **CLB** y **CLH**, se ubicaron en la categoría moderadamente tóxico con valores de CL_{50} entre 121,40 y 325,28 ppm. **CAB** mostró ser ligeramente tóxico con un valor de CL_{50} de 654,17, mientras que **CAH**, **CLH**, **CMH**, y **CLB** son relativamente inocuas al presentar valores de CL_{50} entre 2405,10 y 3400,98 ppm. Por otra parte, las fracciones alcaloidales categorizadas como altamente tóxicas son **CLB**, **CEB**, **CAB** y **CAH** con CL_{50} entre 38,06 y 96,90 ppm; mientras que, **CMH**, **CLH** y **CMB** se consideran moderadamente tóxicas con un rango de concentración entre 108,31 y 153,67 ppm. Por último, la muestra **CEH** está en la clasificación de prácticamente no tóxico con una CL_{50} de 1121,27 ppm. Cabe mencionar, que ninguna de las muestras ensayadas se ubicó en la categoría de extremadamente tóxico.

Figura 13.-Clasificación expresada en porcentaje de los extractos de *Crinum* según los parámetros de toxicidad del CYTED

Elaborada por: Gina Achito, 2019.

El estudio biológico *In Vivo* de la letalidad de los nauplios de *A. salina* es un instrumento sencillo, rápido, económico y fiable que permite relacionar la toxicidad y concentración de una determinada muestra. Es ampliamente utilizado como indicador preliminar del efecto tóxico de extractos crudos y compuestos puros (Kaya, Sarıkaya, Çiçek & Somer, 2010), por tanto, puede ser una herramienta útil para predecir el comportamiento de una variedad de estructuras químicas con potencial biológico (Johnson y col., 2018).

De acuerdo a la revisión bibliográfica realizada hasta la presente fecha, solo se encontró un estudio sobre actividad ecotóxica en nauplios de *Artemia salina* para la especie *C. latifolium*. Por lo tanto, se realizaron comparaciones con estudios reportados para algunas especies de la familia Amaryllidaceae. En este sentido, Johnson y col., (2018), evaluaron la actividad citotóxica en extractos de diferentes polaridades obtenidos de *Pancratium triflorum* Roxb (Amaryllidaceae); especie recolectada en South Vagaikulam, India. Este estudio reveló las propiedades citotóxicas de la planta (incluyendo las anteras y partes subterráneas) contra nauplios de camarón en salmuera a distintas concentraciones (2,5, 5, 7,5, 10 y 12,5 mg/mL). Se encontró que el extracto en éter de petróleo fue el más tóxico con una LC_{50} de 49990 $\mu\text{g/mL}$, mientras que, el extracto metanólico mostró menos citotoxicidad ($CL_{50} = 76320 \mu\text{g/mL}$) que los demás extractos, cloroformo ($CL_{50} = 65230 \mu\text{g/mL}$) y acetona ($CL_{50} = 61480 \mu\text{g/mL}$).



El estudio del efecto citotóxico realizado por A. Aziz y col., (2014), para el extracto metanólico de hojas de *C. latifolium*, recolectadas de Noakhali región de

Bangladesh; mostró que dicho extracto posee toxicidad leve sobre *Artemia salina* con un valor de CL_{50} de 15,652 $\mu\text{g/mL}$ en comparación con Sulfato de Vincristina® 0,839 $\mu\text{g/mL}$ usado como control. Otra investigación realizada con el aceite esencial obtenido por hidrodestilación del extracto de bulbos de *C. ornatum*, recolectados al norte de Ibadan, en el estado de Oyo, Nigeria; mostró que el aceite esencial ensayado a diferentes concentraciones (1000, 100 y 10 $\mu\text{g/mL}$) es tóxico a la dosis de 1,701 $\mu\text{g/mL}$ en un ensayo realizado en camarones en salmuera (Oloyede y col., 2010). Por otro lado, Babajid y col., (2010), estudiaron la actividad citotóxica mediante el ensayo de letalidad con *A. salina* de tres especies de *Gethyllis* (Amarillidaceae). *Gethyllis multifolia* (GM), *G. gregoriana* (GG) y *G. villosa* (GV) recolectadas en Sudáfrica. Para este estudio se ensayaron las concentraciones de 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/mL}$, con las cuales se demostró que los niveles más altos de actividad se observaron en los extractos metanólicos GG ($CL_{50} = 0,2229 \mu\text{g/mL}$), GM ($CL_{50} = 6,201 \mu\text{g/mL}$) y GV ($CL_{50} = 4,233 \mu\text{g/mL}$), mientras que para los extractos acuosos fueron GG ($CL_{50} = 120,66 \mu\text{g/mL}$), GM ($CL_{50} = 139,55 \mu\text{g/mL}$) y GV ($CL_{50} = 1956,39 \mu\text{g/mL}$). Los extractos en hexano mostraron poca o ninguna toxicidad.

Galanthus nivalis L. colectada en Bayramiç, Canakkale, Turquía; mostró que, el extracto etanólico de las partes aéreas presentó actividad a la $CL_{50} = 643,50 \text{ ppm}$ y el bulbo de la especie de *Galanthus* obtenido durante la temporada de fructificación presentó actividad a la dosis de $CL_{50} = 564,85 \text{ ppm}$. Por otro lado, se observó que los extractos alcaloidales, revelaron valores significativos de CL_{50} (planta total = 42,69 ppm, bulbos en floración = 140,09, hojas en floración = 231,04, bulbos en fructificación = 53,77 y hojas en fructificación = 269,69 ppm). Para este ensayo se usó colchicina como referencia ($CL_{50} = 0,3018 \text{ ppm}$) (Kaya & Gözler, 2005). En este sentido, en estudio previo realizado a esta misma especie, se mostró el efecto tóxico de las fracciones frente a nauplios de *A. salina*, así como toxicidad en los alcaloides (-)-licorina (**1**) ($CL_{50} = 10,27 \text{ ppm}$), (+)-11-hidroxitatina ($CL_{50} = 211,80 \text{ ppm}$) y (+)-vittatina (**77**) ($CL_{50} = 282,43 \text{ ppm}$), aislados de esta (Kaya, Unver, Gözler & Bastida, 2004). Por su parte, Ahmad (1996), reportó la actividad citotóxica de varios extractos foliares de *C. asiaticum* L. mediante la prueba de letalidad del camarón en salmuera. El extracto metanólico mostró el efecto tóxico más fuerte con un valor de $CL_{50} = 257,1 \text{ ppm}$.

Contrastando los resultados obtenidos en el presente estudio con la literatura citada, se deduce que los extractos metanólicos exhiben menos toxicidad que las muestras alcaloidales. En tal sentido, la bioactividad pudiera ser atribuida a la presencia de alcaloides como licorina (1), hemantamina (70), crinamina (74), augustina (48), 6- α -hidroxibufanisina (35), 6-etoxibufanidrina, vittatina (77) y ambelina (34), los cuales poseen actividades citotóxicas y anticancerígenas demostradas (Refaat y col., 2013; Berkov y col., 2011; Kaya y col., 2004; Pettit y col., 1984); asimismo, compuestos como saponinas, taninos, flavonas y polifenoles, entre otros, los cuales son conocidos por sus propiedades secuestrantes de radicales libres, inhibidores de especies reactivas, donadores de hidrógeno, activadores de enzimas antioxidantes, promotores de diferenciación celular normal, inhibidores de tumores celulares entre otros (Kaya y col., 2010; Refaat y col., 2013). Es importante resaltar que, los estudios sobre la letalidad de una muestra en nauplios de *Artemia* se ha relacionado no solo con la actividad antitumoral, sino también como un indicio de ser un buen agente antimicrobiano y antiviral (Babajide y col., 2010).

VI.1.3.2.-Actividad antibacteriana de los extractos metanólicos y alcaloidales obtenidos de las especies en estudio

La actividad antibacteriana se determinó con los extractos metanólicos y alcaloidales obtenidos por fraccionamiento ácido/base de las hojas y los bulbos de distintas especies del género *Crinum*. Las muestras identificadas como: **CAH, CAB, CMH, CMB, CEH, CEB, CLH y CLB**, se ensayaron utilizando el método de difusión en agar con discos impregnados descrito por Velasco y col., (2007); frente a las bacterias de referencia internacional: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

En la Tabla 21, se observan los valores obtenidos con los distintos extractos de las especies en estudio que mostraron actividad frente a las cinco cepas ensayadas. Todos los extractos metanólicos, tanto de hojas como de bulbos, de las cuatro especies ensayadas mostraron actividad frente a *S. aureus* con valores de **CIM** entre 200 y 470 mg/mL. Los extractos

CAH, CAB, CMB, CLH y CLB inhibieron el crecimiento bacteriano de *E. coli* con valores de **CIM** entre 200 y 320 mg/mL, mientras que, **CMB** mostró actividad frente a *E. faecalis* y *K. pneumoniae* a la **CIM** de 300 mg/mL y 320 mg/mL, respectivamente.

Con respecto a los extractos alcaloidales, se observó mejor actividad frente a *E. coli*, el cual mostró ser sensible a los extractos **CAH, CAB, CMB, CEB, CLH y CLB** con un rango de concentración entre 120 y 265 mg/mL. Seguidamente, las muestras **CAH, CMB, CLH y CLB** inhibieron el crecimiento de *S. aureus* con valores de **CIM** entre 150 y 290 mg/mL. Con respecto a la cepa *K. pneumoniae*, la misma fue inhibida por **CAH y CMB** a la concentración de 250 y 270 mg/mL, respectivamente.

www.bdigital.ula.ve

Tabla21.-Resultados de la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos y alcaloidales de las especies del género *Crinum*

Especie	Microorganismos	Zona de inhibición (mm)*									CIM (mg/mL)			
		metanólico		Alcaloidal		Antibiótico					metanólico		alcaloidal	
		h	b	h	b	0XA	VA	AMX	CFM	PIP	h	b	h	b
<i>C. anabile</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	7*	7*	8*	NA	22*					470	455	290	NE
	<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	NA	NA	NA	NA		25*				NE	NE	NE	NE
	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	10*	14*	18*	12*			46*			300	200	200	250
	<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 23357)	NA	NA	8*	NA				28*		NE	NE	250	NE
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	NA	NA	NA	NA					27*	NE	NE	NE	NE
<i>C. moorei</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	10*	10*	NA	12*	22*					300	300	NE	250
	<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	NA	9*	NA	12*		25*				NE	300	NE	180
	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	NA	22*	NA	22*			46*			NE	300	NE	120
	<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 23357)	NA	13*	NA	13*				28*		NE	320	NE	270
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	NA	NA	NA	NA					27*	NE	NE	NE	NE
<i>C. erubescens</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	10*	12*	NA	NA	22*					300	250	NE	NE
	<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	NA	NA	NA	NA		25*				NE	NE	NE	NE
	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	NA	NA	NA	8*			46*			NE	NE	NE	265
	<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 23357)	NA	NA	NA	NA				28*		NE	NE	NE	NE
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	NA	NA	NA	NA					27*	NE	NE	NE	NE
<i>C. latifolium</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	10*	14*	12*	10*	22*					450	200	235	150
	<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	NA	NA	NA	NA		25*				NE	NE	NE	NE
	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	9*	14*	9*	20*			46*			320	200	255	140
	<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 23357)	NA	NA	NA	NA				28*		NE	NE	NE	NE
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	NA	NA	NA	NA					27*	NE	NE	NE	NE

h: hojas; b: bulbos; OXA: Oxacilina®(10 µg; BBL™); VA: Vancomicina® (30 µg; HIMEDIA); AMX: Amoxicilina® (30 µg; HIMEDIA); CFM: Cefixima®(5 µg; BBL™); PIP: Piperacilina®(100 µg; BBL™); CIM: concentración inhibitoria mínima; NA: no activo; NE: no ensayado; *mm: de los halos de inhibición (disco de 6 mm de diámetro)

Elaborada

por:

Gina

Achito,

2019.

El extracto **CMB** fue el único en presentar actividad frente a *E. faecalis* con un **CIIM** de 250 mg/mL. Cabe resaltar que, ninguno de los extractos ensayados en la presente investigación mostró actividad frente a la bacteria *P. aeruginosa*.

En virtud de los resultados obtenidos, se puede deducir que los extractos tanto metanólico como alcaloidal de **CMB** exhibieron un amplio espectro de actividad al inhibir el crecimiento de bacterias tanto Grampositivas *S. aureus* y *E. faecalis* como Gram negativas *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. En este orden de ideas, los extractos metanólicos y alcaloidales de las especies **CL**, **CE** y **CA** mostraron un rango de actividad menor al inhibir solo el crecimiento de dos cepas bacterianas, *S. aureus* y *E. coli*. Sin embargo, los resultados obtenidos se consideran un aporte al estudio de los productos naturales debido a la importancia que representa para el área de la salud.

En cuanto a las investigaciones de la sensibilidad bacteriana *In Vitro* reportadas en especies del género *Crinum*, Chen y col., (2018), realizaron el estudio antimicrobiano con cinco alcaloides tipo cripowelininas aislados del extracto alcohólico de los bulbos de *C. latifolium* recolectados en Yongning, provincia de Guanxi, China; revelando que los alcaloides **102** y **103** (Tabla 9) exhibieron actividad significativa con valores de $IC_{50} < 0,50$ mM para ocho bacterias: *S. pneumoniae* (**100 Hi**: 20; **102 Hi**: 23 y **103 Hi**: 24), *S. aureus* (**102 Hi**: 24 y **103 Hi**: 23), *S. epidermidis* (**102 Hi**: 24 y **103 Hi**: 24), *K. pneumoniae* (**102 Hi**: 24 y **103 Hi**: 22), *P. aeruginosa* (**102 Hi**: 23 y **103 Hi**: 23), *H. influenzae* (**100 Hi**: 20; **102 Hi**: 23 y **103 Hi**: 20), *E. cloacae* (**100 Hi**: 20; **102 Hi**: 24 y **103 Hi**: 20), *S. dysenteriae* (**100 Hi**: 20; **102 Hi**: 24 y **103 Hi**: 20).

El ensayo del efecto antimicrobiano *In Vitro* e *In Vivo* del extracto metanólico de los bulbos de *C. jagus* procedente de la ciudad de Amokwe, estado de Enugu, Nigeria; mostró que las bacterias *B. subtilis*, *S. aureus* fueron inhibidas a una **CIM** de 25 y 12,5 mg/mL, respectivamente. Con respecto al ensayo *In Vivo* en modelos de cicatrización de heridas, se observó actividad frente a los microorganismos *B. subtilis*, *S. aureus* y *C. albicans* al no ser observadas en las heridas después del tratamiento (Udegbunam y col., 2015b). Otro estudio previo en la misma especie realizada por Adesanya y col., (1992), con cuatro alcaloides obtenidos de las fracciones de los extractos metanólicos, recogida en el campus de la

Universidad Obafemi Awolowo, Ile-Ife, Nigeria; reveló una fuerte actividad antibacteriana del alcaloide crinamina (**74**) y los acetatos de hamaina y crinamina a una CIM de 10 µg/mL contra las bacterias *B. subtilis* y *S. aureus*.

En este sentido, Iannello y col., (2014), ensayaron la actividad antimicrobiana y antifúngica del extracto alcaloidal de *C. angustum* (un híbrido entre *C. asiaticum* var. y *C. zeylanicum*), colectado del Jardín Botánico de la Universidad de Bolonia, Italia; exhibiendo una actividad significativa contra seis de las cepas examinadas: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae* y *C. albicans* con valores de IC₅₀ en el rango de 156 a 625 µg/mL después de 8 h incubación; no obstante, fue inactiva para las cepas Gram-negativas: *E. coli*, *P. aeruginosa* y *P. mirabilis*. Es importante resaltar que la especie CA es un híbrido filogenéticamente relacionado con *C. angustum*, por lo que los resultados observados en la presente investigación están en concordancia con los publicados en este artículo.

Finalmente, los extractos acuosos y alcohólicos de las hojas de *C. asiaticum* recolectadas en el distrito de Thanjavur, Tamilnadu, India, mostraron actividad frente a *S. aureus* y *K. pneumoniae* a la CIM de 0,5 mg/mL; mientras que, a concentraciones entre 1,0 y 1,5 mg/mL se observó actividad en todas las cepas Gram negativas *P. aeruginosa* (ATCC10031), *K. pneumoniae* (ATCC 10031) y *E. coli* (ATCC 25922) y la bacteria Gram positiva *S. aureus* (ATCC 11632), ensayadas por Ilavenil y col., (2010). Notablemente, *C. asiaticum* posee amplio espectro antibacteriano a bajas concentraciones difiriendo de las especies de *Crinum* ensayadas en el presente estudio Tabla 21.

El presente estudio fue realizado con extractos tanto metanólicos como alcaloidales de las hojas y bulbos de 4 especies del género *Crinum*, por lo cual, es difícil relacionar la actividad observada con un metabolito secundario en específico, ya que los extractos están formados por mezclas complejas de estos. Sin embargo, de acuerdo a los estudios previos reportados en compuestos puros, tales como: vittatina (**77**), bufanidrina (**38**), hipadina (**24**) y crinamina (**74**) (Elgorashi y col., 2009; Maroyi, 2016; Andesaya y col., 1992), los cuales han mostrado actividad antibacteriana, se podría inferir que estos alcaloides, que están presentes en los extractos ensayados, hayan contribuido en la inhibición del crecimiento

bacteriano observado. Además, no se descarta un posible efecto sinérgico entre los diferentes metabolitos presentes en las muestras en estudio.

De acuerdo a la revisión bibliográfica realizada existen muy pocos estudios de actividad antibacteriana en el género *Crinum*, no encontrándose ningún reporte en especies recolectadas en Venezuela, por lo que la presente investigación se considera un aporte al estudio de las especies de la familia Amaryllidaceae colectadas en la región de los andes venezolanos.

VI.1.3.3.-Actividad inhibitoria de las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa

La evaluación *In Vitro* de la actividad inhibitoria de las enzimas AChE y BuChE de las muestras de alcaloides provenientes de las hojas y bulbos de **CA**, **CE**, **CM** y **CL** se determinó por la técnica en microplaca según la metodología de Ellman y col., (1961) con algunas modificaciones de López y col., (2002). Los resultados se expresaron en valores de IC₅₀ (µg/mL) y se detallan en la Tabla 22.

Tabla 22.-Resultados de las actividades inhibitorias de AChE y BuChE de especies *Crinum*

Especie (parte analizada)	AChE (µg/mL)	BuChE (µg/mL)	R ²
<i>C. amabile</i> (h)	0,88 ± 0,08	4,46 ± 0,26	> 0,99
<i>C. amabile</i> (b)	2,44 ± 0,14	11,26 ± 2,22	> 0,99
<i>C. erubescens</i> (h)	1,75 ± 0,32	8,92 ± 0,81	> 0,99
<i>C. erubescens</i> (b)	3,27 ± 0,24	9,03 ± 0,75	> 0,99
<i>C. moorei</i> (h)	4,91 ± 0,13	22,20 ± 3,59	> 0,99
<i>C. moorei</i> (b)	4,65 ± 0,29	12,42 ± 0,26	> 0,99
<i>C. latifolium</i> (h)	EP	EP	-
<i>C. latifolium</i> (b)	EP	EP	-

h: hojas, **b:** bulbos, **EP:** en proceso. Fármaco de referencia galantamina con valores de IC₅₀ 0,48 ± 0,70 y 3,70 ± 0,24 µg/mL

Realizada por: Gina Achito, 2019.

Los extractos alcaloidales de las hojas de **CA** y **CE** exhibieron fuerte actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa con valores de IC₅₀ de 0,88 ± 0,08 y 1,75 ± 0,32 µg/mL,

respectivamente; mientras que para la enzima butirilcolinesterasa **CA** causó fuerte inhibición a la dosis de $4,46 \pm 0,26 \mu\text{g/mL}$. Como puede notarse que, las concentraciones a los que estos extractos inhibieron las enzimas AChE y BuChE son muy cercanos a los de la Galantamina® usada como control positivo.

Por su parte, los extractos **CA** y **CE** mostraron actividad moderada frente a la enzima AChE, **CA** (**b**: $2,44 \pm 0,14 \mu\text{g/mL}$) y **CE** (**b**: $3,27 \pm 0,24 \mu\text{g/mL}$), mientras que para BuChE el extracto **CE** mostró los siguientes valores **h**: $8,92 \pm 0,81$ y **b**: $9,03 \pm 0,75 \mu\text{g/mL}$. Los extractos alcaloidales con menor capacidad de inhibición frente a la enzima BuChE fueron **CA** (**b**: $9,03 \pm 0,75 \mu\text{g/mL}$) y **CM** (**h**: $22,20 \pm 3,59$ y **b**: $12,42 \pm 0,26 \mu\text{g/mL}$), mientras que para AChE fue **CM** (**h**: $4,91 \pm 0,13$ y **b**: $4,65 \pm 0,29 \mu\text{g/mL}$).

Estudios previos han revelado el efecto inhibitorio de las especies del género *Crinum* frente a las enzimas AChE y BuChE. En los extractos acuosos y metanólicos de las hojas de doce genotipos de *Crinum* resaltó el efecto de *C. latifolium* con una actividad de 76,52% (Ghane y col., 2018). Los resultados encontrados en las especies del género *Crinum* en el presente estudio son superiores a los reportados en plantas chilenas del género *Rhodophiala* de la familia Amaryllidaceae donde las hojas y los bulbos de *R. splendens* fueron los inhibidores más activos de AChE (IC_{50} : 5,78 y 3,62 $\mu\text{g/mL}$) y BuChE (IC_{50} : 16,26 y 14,37 $\mu\text{g/mL}$) por Tallini y col., 2018b.

En otro estudio, se determinó la actividad inhibitoria de las enzimas AChE y BuChE en el extracto de los bulbos de *C. amabile*; obteniendo valores de IC_{50} significativos ($2,24 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$), cercanos al compuesto de referencia, Galantamina® ($0,27 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$); mientras que, en la inhibición de BuChE ($116,59 \pm 2,85 \mu\text{g/mL}$) fue menor la actividad frente al fármaco de referencia ($4,88 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los bulbos de **CA** al ser similares para el ensayo de AChE. Por el contrario, la inhibición de BuChE exhibe una potente actividad superando 10 veces a la reportada en la literatura. (Carrasco, 2017).

Un estudio realizado con los bulbos de *C. moorei* fueron extraídos con solventes de diferentes polaridades; diclorometano, etanol, metanol y éter de petróleo fueron evaluados

en su capacidad inhibidora de la enzima AChE revelando porcentajes de inhibición dependiendo del solvente usado para la extracción (DCM $2,9 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$; PE $18,9 \pm 8,7 \mu\text{g/mL}$; 50% MeOH $21,5 \pm 8,4 \mu\text{g/mL}$; EtOH $22,5 \pm 6,5 \mu\text{g/mL}$) (Fawole y col., 2010). Otro estudio realizado con las hojas, bulbos y raíces de *C. moorei* mostró que el extracto de las hojas presenta baja actividad a las concentraciones de 1; 0,5 y 0,025 mg/mL (IC_{50} entre 6 a 48 %), mientras que los bulbos y raíces presentaron mejor actividad a las mismas concentraciones con un IC_{50} entre 7 a 86 % (Jäger, Adsersen & Fennell, 2004). Por otro lado, las especies *C. zeylanicum* (hojas), *C. amabile* (hojas y bulbos) y *C. jagus* (hojas) presentaron una fuerte inhibición de la enzima AChE a la dosis de 100 μg , mientras que, las especies *C. erubescens* (hojas y bulbos), *C. powellii* (bulbos) y *C. zeylanicum* (bulbos) mostraron una inhibición moderada y *C. powellii* (hojas) mostró una inhibición débil, según el ensayo realizado por Calderón y col., (2010).

Son diversos los estudios realizados a especies de la familia Amaryllidaceae para determinar el efecto inhibidor *In Vitro* sobre las enzimas AChE y BuChE; los resultados indican que la inhibición de AChE se asocia principalmente a la presencia de alcaloides; aun cuando, la selectividad es menor para la BuChE. Hay una variedad de reportes que señalan que la capacidad de inhibición de las enzimas se relaciona con los núcleos del tipo galantamina, como en el caso de la sanguinina (**86**) que inhibe dicha enzima con una potencia 10 veces superior a la galantamina (**85**) (Carrasco, 2017). De la misma manera, los alcaloides tipo licorina, como 1-*O*-acetillicorina (**4**) cuyo efecto inhibitorio es dos veces más potente que la galantamina (**85**) (Elgorashi, y col., 2004). Ungeremina (**17**) y licorina (**1**) también han mostrado ser fuertes inhibidores de las enzimas AChE y BuChE, encontrando que la primera es 6-8 veces más potente que la galantamina (**85**) (Refaat y col., 2013).

En concordancia a los resultados del análisis cromatográfico CG/EM se podría inferir que, los altos niveles de abundancia de los compuestos del tipo crinina, licorina, hemantamina y del núcleo cherilina detectados en las especies del género *Crinum* en el presente estudio, por la relación estructural que representan entre sí, pueden causar sinergismo el cual podría ser el responsable de la bioactividad exhibida en el ensayo (Fawole y col., 2010). Al respecto, los **AA** como 1-*O*-acetillicorina (**4**), 1,2-*Di-O*-acetillicorina (**13**), licorina (**1**), epivittatina, crinamidina (**53**), cherilina (**90**), crinina (**32**), 6-hidroxicrinamina

(75), epibufanisina (80), hamaina (72) y crinamina (74) se reportan con efectos inhibidores de la AChE (Refaat y col., 2013; Fawole y col., 2010; Elgorashi y col., 2009; Elgorashi y col., 2004).

En el marco de las observaciones hechas, actualmente en la industria farmacéutica, la galantamina es usada clínicamente, pero ofrece solo efectos paliativos para la EA (Tallini y col., 2018a). De allí que, las especies botánicas **CA**, **CE**, **CM** y **CL** pueden ser consideradas como alternativa terapéutica en la generación de agentes inhibidores de AChE y BuChE con amplio espectro no sólo en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA), sino para el tratamiento de otras enfermedades.

www.bdigital.ula.ve

VII. CONCLUSIONES

- El análisis fitoquímico realizado en el presente estudio, permitió determinar cualitativamente en los extractos metanólicos de cuatro especies del género *Crinum*, metabolitos como alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides, antraquinonas, triterpenos, esteroides, cumarinas, saponinas, taninos, glucósidos cardiotónicos y glicósidos.
- La composición química alcaloidal de las hojas y los bulbos de las diferentes especies del género *Crinum*, analizadas mediante CG/EM permitió detectar un total de 30 alcaloides conocidos y 26 compuestos no identificados, lo que representa una fuente interesante de nuevos compuestos bioactivos en la familia Amaryllidaceae. En estos análisis se observó la presencia de AAs tipo licorina, hemantamina/crinina, narciclasina, tazetina y galantamina; además de otros núcleos como: mesembrenol, cherilina, galantindol e ismina. Los resultados mostraron que el alcaloide ambelina (**34**) fue el más abundante con un porcentaje de 21,0%, seguido de la licorina (**1**) con un 18,5 % y en proporciones inferiores al 6 % se encuentran los alcaloides hemantamina (**70**), 1-*O*-acetillicorina (**4**), bufanidrina (**38**), vittatina (**77**)/crinina (**32**), undulatina (**47**), bufanisina (**33**), crinamina (**74**) y powelina (**39**).
- En el análisis de ecotoxicidad *In Vitro* de los extractos metanólicos y alcaloidales de las hojas y bulbos de las especies del género *Crinum*, se observó que los % de mortalidad, se incrementaron en forma proporcional a la concentración de los extractos. De las 16 muestras valoradas y clasificadas por su toxicidad según el CYTED, se encontró que los extractos alcaloidales de los bulbos de **CL**, **CE**, **CA** y hojas de **CA** fueron los que mostraron mayor toxicidad con valores de CL_{50} entre 38,06 y 96,90 ppm.
- Los extractos de bulbos de la especie **CM** exhibieron un amplio espectro antibacteriano al inhibir cuatro bacterias, dos Gram positivas *S. aureus*, *E. faecalis* y dos Gram negativas *E. coli* y *K. pneumoniae* con valores de CIM entre 120 y 320

mg/mL. Seguidamente, se encuentran las muestras de **CA** con actividad frente a las cepas *S. aureus*, *E. coli* y *K. pneumoniae* con valores en el rango de 200 y 470mg/mL. Mientras que, los extractos de **CL** solo tuvieron efecto contra los microorganismos *S. aureus* y *E. colia* concentraciones de 140y 450 mg/mL, respectivamente. Por último, se ubican las especies **CE** y **CM** las cuales causaron inhibición del crecimiento bacteriano de las cepas de *E. coli* y *S. aureus* con valores de CIM entre 250 y 300 mg/mL; así como las hojas de **CM** que causaron inhibición a los mismos microorganismos a concentraciones de 190 y 300mg/mL, respectivamente.

- La evaluación de la actividad inhibidora de AChE y BuChE *In Vitro* realizada con los extractos alcaloidales de las hojas y bulbos de las especies en estudio revelo que, las hojas de **CA** y **CE** mostraron el mayor efector inhibidor de dichas enzimas (IC_{50} $0,88 \pm 0,08$ y $1,75 \pm 0,32$ $\mu\text{g/mL}$), mientras que **CA** exhibió un fuerte efecto inhibidor frente a la enzima BuChE (IC_{50} $4,46 \pm 0,26$ $\mu\text{g/mL}$). Por su parte, se observó actividad moderada en los extractos de los bulbos de **CA** y **CE** frente a la enzima AChE (IC_{50} $2,44 \pm 0,14$ y $3,27 \pm 0,24$ $\mu\text{g/mL}$); mientras que el extracto **CE** mostró valores moderados frente a BuChE (**h**: $8,92 \pm 0,81$ y **b**: $9,03 \pm 0,75$ $\mu\text{g/mL}$). Las fracciones alcaloidales con menor capacidad de inhibición frente a la enzima BuChE fueron **CA** (**b**: $9,03 \pm 0,75$ $\mu\text{g/mL}$) y **CM** (**h**: $22,20 \pm 3,59$ y **b**: $12,42 \pm 0,26$ $\mu\text{g/mL}$), mientras que, para AChE fue **CM** (**h**: $4,91 \pm 0,13$ y **b**: $4,65 \pm 0,29$ $\mu\text{g/mL}$).

En el presente estudio, todos los extractos mostraron actividad inhibitoria frente a las enzimas AChE y BuChE, cuyos valores son superiores a los reportados en la literatura. Es importante destacar que los extractos de **CA** fueron los que presentaron mayor actividad por lo que podría considerarse esta especie como fuente de moléculas bioactivas.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo-Rodríguez, P., & Strong, M. T. (2012). Catalogue of seed plants of the West Indies, N° 98. Smithsonian Institution, Scholarly Press. USA, Whashington DC, 26.
- Adesanya, S. A., Olugbade, T. A., Odebiyi, O. O. & Aladesanmi, J. A. (1992). Antibacterial Alkaloids in *Crinum jagus*. International Journal of Pharmacology, 30 (4), 303-307.
- Aguilar, B. (2011). UF0001: El suelo de cultivo y las condiciones climáticas. Editorial Innovación y Cualificación S. L. España, Málaga.
- Ahmad, M. (1996). Cytotoxic activity of the leaf extract of *Crinum asiaticum* Linn. Australian Journal of Medical Herbalism, 8 (1), 3-6.
- Aldhafer, A. H., Langat, M. K., Knirsch, W., Andriantiana, J. L., & Mulholland, D. A. (2017). Isoquinoline alkaloids from three Madagascan *Crinum* (Amaryllidaceae) species. Biochemical Systematics and Ecology, 77(s/n), 7-9.
- Angiosperm Phylogeny Group (APG). (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Botanical Journal of the Linnean Society, 161 (2), 105–121.
- Asmawi M. Z., Arafat, O. M., Amirin, S., & Eldeen, I. M. (2011). *In Vivo* antinociceptive activity of leaf extract of *Crinum asiaticum* and phytochemical analysis of the bioactive fractions. International Journal of Pharmacology, 7 (1), 125-129.
- Aziz, A., Raju, G. S., Das, A., Ahmed, J., & Rahman Md. M. (2014). Evaluation of *In Vitro* anthelmintic activity, total phenolic content and cytotoxic activity of *Crinum latifolium* L. (Family: Amaryllidaceae). Advanced Pharmaceutical Bulletin, 4 (1), 15-19.
- Babajide, O. J., Mabusela, W. T., Green, I. R., Ameer, F., Weitz, F. & Iwuoha, E. I. (2010). Phytochemical screening and biological activity studies of five South African indigenous medicinal plants. Journal of Medicinal Plants Research, 2 (18), 1924-1932.
- Bastida, J., Berkov, S., Torras, L., Pigni, N. B., de Andrade, J. P., Martínez, V., Codina, C., & Viladomat, F. (2011). 3. Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. Recent advances in pharmaceutical sciences, 37/661(2), 65-100.

- Berkov, S., Romani, S., Herrera, M., Viladomat, F., Codina, C., Momekov, G., Ionkova, I. & Bastida, J. (2011). Antiproliferative alkaloids from *Crinum zeylanicum*. *Phytotherapy Research*. 25(11), 1686-1692.
- Beyer, H. & Walter, W. (1987). *Manual de química orgánica*. Barcelona, España: Editorial: Reverté S. A.
- Buitrago, A. A. (2018). Estudio comparativo de la composición química y bioactividad de las especies *Vismia baccifera* y *Vismia macrophylla*, colectadas en los estados Táchira y Mérida-Venezuela (tesis Doctoral). Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Buitrago, D. (2018). Ruta del ácido shikímico [Material de clase]. *Productos Naturales*, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Calderón, A. I., Cubilla, M., Espinosa, A., & Gupta, M. P. (2010). Screening of plants of Amaryllidaceae and related families from Panamá as sources of acetylcholinesterase inhibitors. *Pharmaceutical Biology*, 48 (9), 988-993.
- Carrasco, A. F. (2017). Determinación de la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirícolinesterasa del extracto de alcaloides de *Crinum x amabile* [tesis de grado]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador.
- Chen, M.-X., Huo, J.-M., Hu, J., Xu, Z.-P., & Zhang, X. (2018). Amaryllidaceae alkaloids from *Crinum latifolium* with cytotoxic, antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities. *Fitoterapia*, 130 (s/n), 48-53.
- Claramunt, R. M., Farrán, M. A., López, C., Pérez, M. y Gutiérrez, D. S. M. (2017). *Química bioorgánica y productos naturales*. Publicaciones Universidad Nacional de Educación a Distancia. España, Madrid.
- CLSI. (Estados Unidos). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 28th Edition. [Wayne, PA]: Clinical and Laboratory Standards Institute. <https://www.clsi.org/media/1930/m100ed28_sample.pdf> [Consulta: 28 de enero de 2018].
- Core, E. L. (1955). *Plant taxonomy*. Prentice-Hall, Inc. USA, Englewood Cliffs, N. J., pp 277-278.
- Dassanayake, M. D. (2000). Amaryllidaceae. En Dassanayake, M. D. & Clayton, W. D. (Eds.). *A revised handbook to the flora of Ceylon*. Volume XIV. (pp. 15-19). Peradeniya, Sri Lanke: A.A. Balkema/Rotterdam/Brookfiel.
- de Andrade, J. P. (2014). Estudio de la composición alcaloídica de *Narcissus broussonetii* y de tres especies brasileñas del género *Hippeastrum* (Amaryllidaceae) [Tesis de doctor]. Universidad de Barcelona, España.

- de Andrade, J.P., Pigni, N.B., Torras-Claveria, L., Berkov, S., Codina, C., Viladomat, F., & Bastida, J. (2012). Bioactive alkaloid extracts from *Narcissus broussonetii*: Mass spectral studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 70(s/n), 13-25.
- Dewan, S. & Das, A. (2013). Investigation of *In Vitro* thrombolytic potential and phytochemical nature of *Crinum latifolium* L. leaves growing in coastal region of Bangladesh. *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research*, 4(1), 1-7.
- Dewick P. M. (2009) *Medicinal natural products: a biosynthetic approach* (13rd). University of Nottingham, United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd., Publication.
- Donoso, A. (2005). Cap. 54. La enfermedad de Alzheimer. En Nogales-Gaete, J., Donoso, A. y Verdugo, R. J. (Eds.) *Tratado de neurología clínica* (pp. 459-464). Santiago de Chile, Chile: Editorial Universitaria.
- Elgorashi, E. E. & van Staden, J. (2009). Bioactivity and bioactive compounds of African Amaryllidaceae. *African Natural Plant Products: New Discoveries and Challenges in Chemistry and Quality*, s/vol.(s/n), 151-170
- Elgorashi, E. E., Stafford, G. I. & van Staden, J. (2004). Acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Medica*, 70 (3), 260-262.
- Elgorashi, E. E., Drewes, S. E., Morris, C., & van Staden, J. (2003). Variation among three *Crinum* species in alkaloid content. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31 (6), 601-615.
- Elgorashi E. E., Drewes, S. E. & van Staden J. (2001). Alkaloids from *Crinum moorei*. *Phytochemistry*, 56 (6), 637-640.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. Jr., & Featherstone, R. M. (1961). A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7 (2), 88-95.
- Escobar, A. (2014), *Caracterización química de alcaloides del género Zephyranthes sp.* [Tesis de grado]. Universidad ICESI, Cali, Colombia.
- Fawole, O. A., Amoo, S. O., Ndhlala, A. R., Light, M. E., Finnie, J. F. & Van Staden, J. (2010). Anti-inflammatory, anticholinesterase, antioxidant and phytochemical properties of medicinal plants used for pain-related ailments in South Africa. *Journal of ethnopharmacology*, 127 (2), 235-241.
- Fennell, C. W., Elgorashi, E. E. & van Staden, J. (2003). Alkaloid production in *Crinum moorei* cultures. *Journal of Natural Products*, 66(11), 1524-1526.
- Fennell, C. W. & van Staden, J. (2001). *Crinum* species in traditional and modern medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 78(1), 15-26.

- Finbarrs-Bello, E., Obikili, E. N, Anayochukwu, E. E., & Godson A. E. (2016). Curative effect of aqueous leaf extract of *Crinum giganteum* on NMDA-receptor antagonist-induced schizophrenic Wistar rat model. *Macedonia Journal Medical Sciences*, 4 (3), 337-341.
- Font, P. (1962). *Plantas Medicinales. EL Dioscórides renovado*. Editorial Labor. España, Barcelona.
- Ghanea, S. G., Attar, U. A, Yadav, P. B., Lekhak, M. M. (2018). Antioxidant, anti-diabetic, acetylcholinesterase inhibitory potential and estimation of alkaloids (lycorine and galanthamine) from *Crinum* species: an important source of anticancer and anti-Alzheimer drug. *Industrial Crops & Products* 125 (s/n), 168-177.
- Ghosal, S., Saini K. S. & Frahm, A. W. (1983). Alkaloids of *Crinum latifolium*. *Phytochemistry*, 22 (10), 2305-2309.
- Ghosal, S., Unnikrishnan, S., & Singh, S. K. (1989). Occurrence of two epimeric alkaloids and metabolism compared with lycorine in *Crinum latifolium*. *Phytochemistry*, 28 (9), 2535-2537.
- González, J. (2015). Flora Digital de La Selva Organización para estudios tropicales: explicación etimológica de las plantas de la selva. Recuperado de <<https://sura.ots.ac.cr/local/florula4/docs/ETIMOLOGIA.pdf>>[Consulta 30 de Enero de 2018]
- Guerrieri, C. G., Pigni, N. B., de Andrade, J. P., dos Santos, V. D., Binns, F., de Souza, W., Viladomat, F., & Bastida, J. (2015). Alkaloids from *Crinum erubescens* Aiton. *Arabian Journal of Chemistry*, 9 (5), 688-693.
- Guo, Y. (2015). Research on the Alkaloids of Amaryllidaceae plants: Genera *Lycoris* and *Hippeastrum* [Tesis de doctor]. Universidad de Barcelona, Barcelona, España.
- Guo, Y., Pigni, N. B., Zheng, Y., de Andrade, J. P., Torras-Claveria, L., Borges, W. S., Viladomat, F., Codina, C. & Bastida, J. (2014). Analysis of bioactive Amaryllidaceae alkaloid profiles in *Lycoris* species by GC-MS. *Natural Product Communications*, 9(8), 1081-1086.
- Hanh, T. T., Anha, D. H., Huonga, P. T. T., Thanh, N. V., Trung, N. Q., Cuongc, T. V., Mai, N. T., Cuong, N. T., Cuong, N. X., Nam, N. H., & Minh, C. V. (2018). Crinane, augustamine, and β -carboline alkaloids from *Crinum latifolium*. *Phytochemistry letters*, 24 (s/n), 27-30.
- Hokche, O., Berry, P. E. y Huber, O. (2008). Nuevo catálogo de la flora vascular de Venezuela. Ediciones Fundación Instituto Botánico de Venezuela "Dr. Tobías Lasser". Venezuela, Caracas, 677-688.
- Hooker, J. D. (1874). Tab. 6113. *Crinum moorei*. En Hooker, J. D., M. H., C. B., P. R. S., F. L. S., & c. (Eds.), *Curtis's Botanical Magazine*. Plants of the Royal Gardens of

- Kew and of other botanical establishments in Great Britain, Vol. 30: (100: t. 6113).
Covent Garden, London: L. Keeve & Co. Publications.
- Hoshino, O. (1998). Chapter 4. The Amaryllidaceae alkaloids. En Cordell, G. A. (Ed.). The Alkaloids: Chemistry and Biology. Vol. 51, (pp. 323-424). San Diego, California, USA.
- Huete, B. & López, P. (2009). Cap. 18. Inhibidores de la acetilcolinesterasa. En Salazar, M., Peralta, C. y Pastor, F. J. (Eds.), Tratado de Psicofarmacología: bases y aplicación clínica. 2^{da}Ed: (pp. 260-263). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- Iannello, C., Bastida, J., Bonvicini, F., Antognoni, F., Gentilomi, G. A. & Poli, F. (2014). Chemical composition, and *In Vitro* antibacterial and antifungal activity of an alkaloid extract from *Crinum angustum* Steud. Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters, 28 (10), 704-710.
- Ilavenil, S. B., Kaleeswaran, B., & Ravikumar, S. (2010). Evaluation of antibacterial activity and phytochemical analysis of *Crinum asiaticum*. International Journal of Current Research, 1 (s/n.), 35-40.
- Ishola, I. O., Olayemi, S. O., & Idowu A. R. (2013). Anticonvulsant, anxiolytic and hypnotic effects of aqueous bulb extract of *Crinum glaucum* A. Chev (Amaryllidaceae): Role of GABAergic and Nitregic systems. Pakistan Journal of Biological Sciences, 16 (15), 701-710.
- Izco, J., Barreno, E., Brugués, M., Costa, M., Devesa, J., Fernández, F., Gallardo, T., Llimona, X., Salvo, E., Talavera, S., & Valdés, B. (2004) Botánica (2^{da} Ed). McGraw-Hill-Interamericana de España. España, Madrid.
- Jäger, A. K., Adsersen, A. & Fennell, C. W. (2004). Acetylcholinesterase inhibition of *Crinum* sp. South African Journal of Botany, 70(2), 323-325.
- Jenny, M., Wondrak, A., Zvetkova, E., Tram, N. T., PHI P. T., Schennach, H., Culig, Z., Ueverall, F., & Fuchs, D. (2011). *Crinum latifolium* leave extracts suppress immune activation cascades in peripheral blood mononuclear cells and proliferation of prostate tumor cells. Scientia Pharmaceutica, 79 (2), 323–335.
- Jin, Z. (2016). Amaryllidaceae y Sceletium alkaloids. Natural Product Reports, 33 (11), 1318-1343.
- Jin, Z. & Xu, X.-H. (2013). Amaryllidaceae Alkaloids. In: Ramawat K., Mérillon JM. (eds) Natural Products. Springer, Berlin, Heidelberg, 479–522.
- Johnson, M., Maharaja, P., N. Janakiraman, N., Adaikala Raja, G., Menezes, I. R. A., da Costab, J. G. M., Verdeb, L. C. L. & Coutinhob H.D.M. (2018). *Pancratium triflorum* Roxb. (Amaryllidaceae) and *Molineria trichocarpa*(Wight) N.P. Balakr

- (Hypoxidaceae): cytotoxic and antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology*, 119 (s/n), 290-295.
- Kaya, G. I., Sarıkaya, B., Çiçek, D., Somer, N. U. (2010). *In Vitro* cytotoxic activity of *Sternbergia sicula*, *S. lutea* and *Pancratium maritimum* Extracts. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 30(1), 41-48.
- Kaya, G. I., Gözler, B. (2005). Quantitative and cytotoxic activity determinations on *Galanthus nivalis* subsp. *cilicicus*. *Fitoterapia*, 76 (3-4), 340-343.
- Kaya, G. I., Unver N., Gözler B., Bastida, J. (2004). (-)-Capnoidine and (+)-bulbocapnine from an Amaryllidaceae species, *Galanthus nivalis* subsp. *cilicicus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32 (11), 1059-1062.
- Kinne, O. (1971). *Marine ecology. Environmental factors. Vol. 1. A comprehensive, integrated treatise on life in oceans and coastal waters.* New York, USA: 1^{ra} Ed. Wiley-Interscience pp. 579.
- Kobayashi, S., Tokumoto, T., Kihara, M., Imakura, Y., Shingu, T., & Taira, Z. (1984). Alkaloidal constituents of *Crinum latifolium* and *Crinum bulbispermum* (Amaryllidaceae). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 32 (8), 3015-3022.
- Korolkovas, A & Burckhalter, J. H. (1982). *Química Farmacêutica.* DF.: Editora: Guanabara Dois. Brasil, Brasília, 1-748.
- Kouam, Fomania, M., Toze, F. A., Wansi, J. D., Waffo, A. F., Koorbanalli, N. A., Mulholland, D. Crouch, N., & Nkengfack, A. E. (2014). A new epi-lycorine from *Crinum macowanii* Baker (Amaryllidaceae). *Sciences, Technologies et Développement*, 15(s/n), 31-40.
- Lawrence, G. H. M. (1951). *Taxonomy of vascular plants.* The Macmillan Company. USA, New York, 417-420.
- Likhitwitayawuid, K., Angerhofer, C. K., Chai, H., Pezzuto, J. M., & Cordell, G. A. (1993). Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the bulbs of *Crinum amabile*. *Journal of Natural Products*, 56 (8), 1331-1338.
- Lincoln, T. & Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal. Vol. 1. Book Prinnt Digital, SA: Publications de la Universidad Jaume I, D. L.*
- López, C. (2013). *Aplicación de nuevas metodologías en síntesis de trisporoides y neolignanós [tesis doctoral].* Almería, España: Editorial Universidad de Almería.
- López, S., Bastida, J., Viladomat, F. & Codina, C. (2002). Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sciences*, 71 (21), 2521-2529.

- Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J. C., Moro, M. A., y Portolés, A. (2009). Velázquez: farmacología básica y clínica (18^{va} Ed.). Editorial Médica Panamericana. España, Madrid, 1-1305.
- Marcano D. & Hasegawa M. (2002) Fitoquímica orgánica.: Publicaciones Universidad Central de Venezuela. Venezuela, Caracas, 1-536.
- Maroyi, A. (2016). A review of ethnobotany, therapeutic value, phytochemistry and pharmacology of *Crinum macowanii* Baker: A highly traded bulbous plant in Southern Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 194, 595-608.
- Mederos, K. (2015). *Naturaleza Tropical* Copyright © 2018: Plantas con flores del género *Crinum*. Recuperado de <<https://naturalezatropical.blogspot.com/2015/10/Plantas-genero-Crinum.html>> [Consulta 01 de Febrero de 2018]
- Meerow, A. W. (2009). Neotropical Amaryllidaceae. En: Milliken, W., Klitgrd, B. & Baracat, A. (2009 onwards), Neotropikey-Interactive key and information resources for flowering plants of the Neotropics. <<http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Amaryllidaceae.htm>> [Consulta 05 de Febrero de 2018]
- Meerow, A. W. (2000). Missouri Botanical Garden [on línea]: Manual de plantas de Costa Rica: Amaryllidaceae. [Saint Louis] Missouri Botanical Garden <http://www.mobot.org/MOBOT/research/treat/amaryllid.shtml> [Consulta: 30 de octubre de 2018]
- Mender, T. (2015). Modelo de gestión etnográfica de conocimiento de las plantas medicinales del Jardín Botánico del Orinoco y la comunidad de los Caribes. Municipio Heres, estado Bolívar, Venezuela (tesis Doctoral no publicada).
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols D. E., & McLaughlin, J. L. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal Medicinal Plant Research*, 45 (5), 31-34.
- Missouri Botanical Garden. *Crinum* [en línea]: <<http://www.missouribotanicalgarden.org>> [consulta el 03 de febrero de 2018].
- Nam, N.-H., Kim, Y., You, Y.-J., Hong, D.-H., Kim, H.-M., & Ahn † B.-Z. (2004). New constituents from *Crinum latifolium* with inhibitory effects against tube-like formation of human umbilical venous endothelial cells. *Natural Product Research*, 18 (6), 485-491.
- Nguyen, H.-Y. T., Vo, B.-H. T., Nguyen, L.-T. H., Bernad, J., Alaeddine, M., Coste, A., Reybier, K., Pipy, B., & Nepveu, F. (2013). Extracts of *Crinum latifolium* inhibit the cell viability of mouse lymphoma cell line EL4 and induce activation of anti-tumour activity of macrophages *In Vitro*. *Journal of Ethnopharmacology*, 149 (1), 75-83.

- Oloyede, G. K., Oladosu, I. A. & Shodia, A. F. (2010). Chemical composition and cytotoxicity of the essential oils of *Crinum ornatum* (Ait.) Bury. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 4 (3), 35-37.
- Pettit, G.R., Gaddamidi, V., Goswami, A. & Crag, G.M. (1984). Antineoplastic Agents, 99. *Amaryllis belladonna*. *Journal of Natural Products*, 47 (5), 796-801.
- Pham, L. H., Döpke, W., Wagner, J., & Mügge, C. (1998). Alkaloids from *Crinum amabile*. *Phytochemistry*, 48 (2), 371-376.
- Plants of the world online (POWO). Copyright Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew [en línea]: Kew science. <<http://powo.science.kew.org/>> [Consulta 05 de Febrero de 2018]
- Portero H., S. A., (2017). Evaluación de la actividad antiinflamatoria y citotóxica *In Vitro* de *Crinum x amabile* [tesis de grado]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Presley, C. C., Krai, P., Dalal, S., Su, Q., Cassera, M., Goetz, M., & Kingston, D. G. I. (2016). New potentially bioactive alkaloids from *Crinum erubescens*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24(21), 5418-5422.
- Quattrocchi, U. (2012). *CRC World Dictionary of Medicinal and Poisonous Plants*. CRC Press, Taylor & Francis Group, USA, Boca Ratón, 1171-1177.
- Rahman, Md. A., Hossain, S. M. A., Ahmed, N.U. & Islam, Md. S. (2013). Analgesic and anti-inflammatory effects of *Crinum asiaticum* leaf alcoholic extract in animal models. *African Journal of Biotechnology*, 12 (2), 212-218.
- Rahman Md. A., Sharmin R., Uddin Md. N., Mahbub-UZ-Zaman, Rana S., & Ahmed N. U, (2011). Antinociceptive and anti-inflammatory effect of *Crinum asiaticum* bulb extract. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 4 (3), 34-37.
- Rahmatullah, M., Jahan, S., & Haque, M. (2014). Ethnomedicinal uses of *Crinum asiaticum*: a review. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3 (9), 119-128.
- Refaat, J., Kamel, M. S., Ramadan, M. A., & Ali, A. A. (2013). *Crinum*; an endless source of bioactive principles: a review. Part V. Biological profile. *International Journal of Pharmaceutical Science and Research*, 4(4), 1239-1252.
- ^aRefaat, J., Kamel, M.S., Ramadan, M. A., & Ali, A.A. (2012). *Crinum*; an endless source of bioactive principles: a review. Part 1. *Crinum* alkaloids: lycorine-type alkaloids. *International Journal of Pharmaceutical Science and Research*, 3 (7), 1883-1890.
- ^bRefaat, J., Kamel, M.S., Ramadan, M. A., & Ali, A.A. (2012). *Crinum*; an endless source of bioactive principles: a review, part II. *Crinum* alkaloids: crinine-type alkaloids. *International Journal of Pharmaceutical Science and Research*, 3(9), 3091-3100.

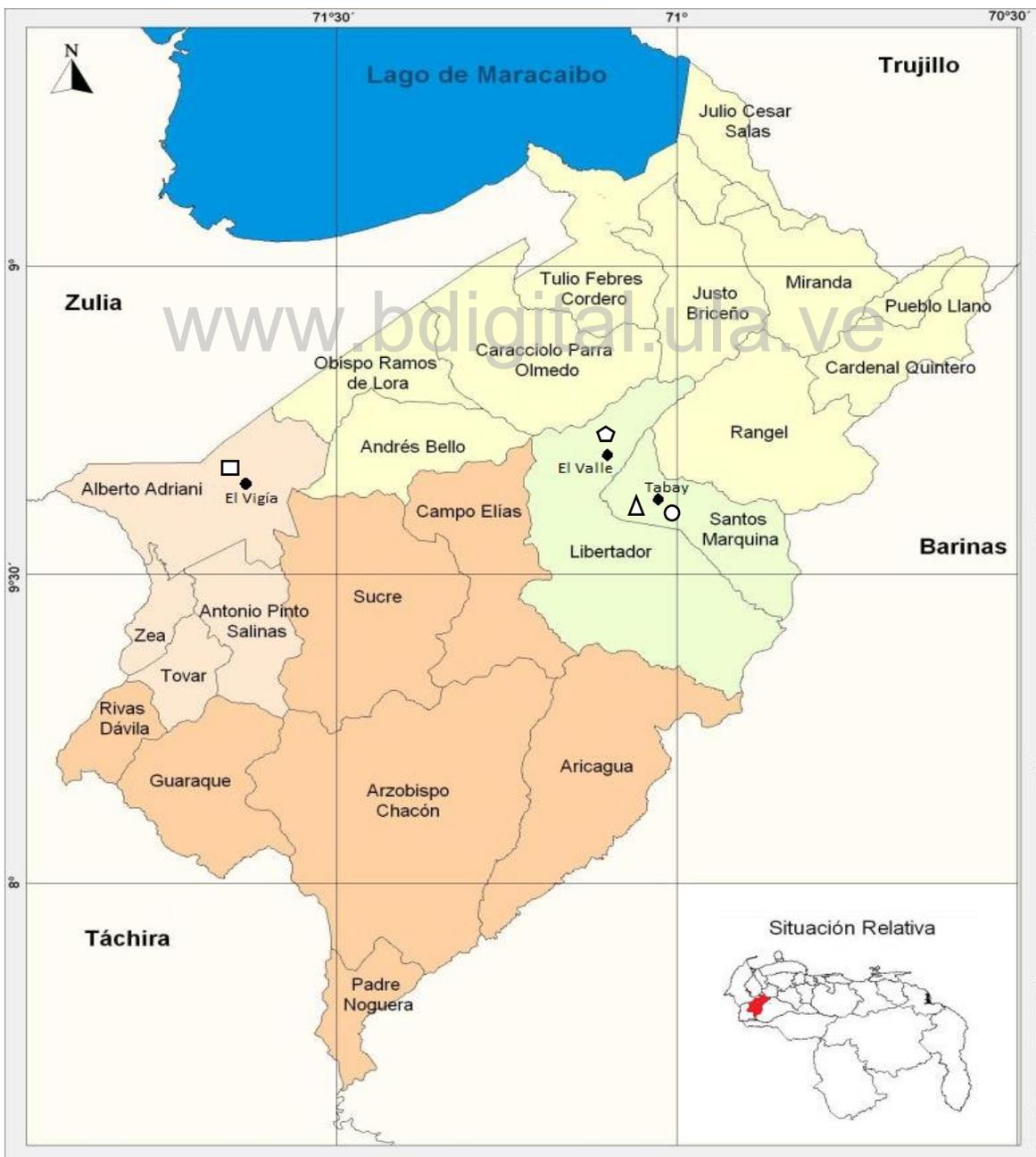
- Reija, B. (2007). Estudio estructural y dinámico de sistemas organizados mediante sondas fluorescentes [Tese de doctoramiento]. Universidad de Santiago de Compostela, La Coruña, España.
- Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, M. A., y Verde-Star, M. J., (Ed.) (2016). Investigación en plantas de importancia médica. Universidad Autónoma de Nuevo León, México: Publicaciones Omnia S. L.
- Rojas, J. C. (2018). Carbohidratos [Material de clase]. Productos Naturales, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Roskov Y., Abucay L., Orrell T., Nicolson D., Kunze T., Culham A., Bailly N., Kirk P., Bourgoin T., DeWalt R.E., Decock W., & De Wever A., (Ed.). (2015). Species 2000 & ITIS catalogue of life, 2015 annual checklist. Digital resource at <www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2015> [Consulta 05 de Febrero de 2018]
- Schnne, E., Leal, F. & Benitez, C. E. (2010). Manual de plantas comunes de Venezuela de Luigwi Schnne. Ediciones de la Facultad de Agronomía de la UCV. Venezuela, Maracay.
- Seigler, D. S. (1998). Plant secondary metabolism. 1^a Ed. Urbana, Springer Science Business Media, LLC. USA, University of Illinois.
- Shyamala-Gowri, S., & Vasantha, K. (2010). Phytochemical screening and antibacterial activity of *Syzygium cumini* (L.) (Myrtaceae) leaves extracts. International. Journal of PharmTech Research, 2(s/n), 1569-1573.
- Singh, A & Desgagné-Penix, I. (2014). Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloids. Plant Science Today 1 (3), 114-120.
- Solanki, J., Dhiman, A., Nanda, A. & Dhankhar, A. (2011). Pharmacognostic and preliminary phytochemical evaluation of the leaves of *Crinum latifolium*. International Journal of Pharmaceutical Science and Research, 2 (12), 3219-3223.
- Taiwe, G. S., Tchoya, T. B., Menanga, J. R., Dabole, B. & De Waard, M. (2016). Anticonvulsant activity of an active fraction extracted from *Crinum jagus* L. (Amaryllidaceae), and its possible effects on fully kindled seizures, depression-like behaviour and oxidative stress in experimental rodent models. Journal of Ethnopharmacology, 194 (s/n), 421-433.
- ^aTallini, L. R., Torras-Claveria, L., de Souza, W., Kaiser, M., Viladomat, F., S. Zuanazzi, J. A., & Bastida, J. (2018). N-oxide alkaloids from *Crinum amabile* (Amaryllidaceae). Molecules, 23 (6), 1277.
- ^bTallini, L. R., Bastida, J., Cortes, N., Osorio, E. H., Theoduloz, C. & Schmeda-Hirschmann, G. (2018). Cholinesterase inhibition activity, alkaloid profiling and

- molecular docking of Chilean *Rhodophiala*(Amaryllidaceae). *Molecules*, 23 (7), 1532.
- ^aTallini, L. R., de Andrade, J. P., Kaiser, M., Viladomat, F., Nair, J. J., Zuanazzi, J. A. S., & Bastida, J. (2017). Alkaloid constituents of the Amaryllidaceae plant *Amaryllis belladonna* L. *Molecules*, 22 (9), 1437.
- ^bTallini, L. R., Osorio, E. H., dos Santos, V. D., Borges, W. d. S., Kaiser, M., Viladomat, F., Zuanazzi, J. A. S. & Bastida, J. (2017). *Hippeastrum reticulatum* (Amaryllidaceae): alkaloids profiling, biological activities and molecular docking. *Molecules*, 22(12), 2191.
- The international plant names index (IPNI). Published on the Internet <<http://www.ipni.org>> [Consulta: 19 de Febrero de 2018].
- The plant list (2013). Version 1.1. [on line] <<http://www.theplantlist.org/>> [Consulta 27 de Enero de 2018]
- Tijani A. Y., Salawu O. A., Good-luck J., Madara A. A., Ikwuka A. C., & Chindo B. A. (2012). Wound healing activity of *Crinum zeylanicum* L. (Amaryllidaceae). *Phytopharmacology*, 3(2), 319-325.
- Torras-Claveria, L., Berkov, S., Codina, C., Viladomat, F. & Bastida, J. (2014). Metabolomic analysis of bioactive Amaryllidaceae alkaloids of ornamental varieties of *Narcissus* by GC-MS combined with k-means cluster analysis. *Industrial Crops and Products*, 56(s/n), 211-222.
- ^aTram, N. T. N., Mitova, M., Bancova, V. Handjieva, N, & Popov, S. (2002). GC-MS of *Crinum* L. alkaloids. *Fitoterapia*, 57 (3-4), 239-242.
- ^bTram, N. T. N., Titorenkova, Tz. V., Bankova, V. St., Handjieva, N.V. & Popov, S. S. (2002). *Crinum* L. (Amaryllidaceae). *Fitoterapia*, 73 (3), 183-208.
- Trease, G.E., & Evans, W.C. (2002). *Pharmacognosy*. London, England: Ed. Saunders Publishers.
- ^aUdegbumam, D. O., Chukwujekwu, R. O., Anika, S. M., Udegbumam, R. I., Nnaji, T. O. & Anyanwu, M. U. (2015). Evaluation of wound healing potential of methanolic *Crinum jagus* bulb extract. *Journal of Intercultural Ethnopharmacol*, 4 (3), 194–201.
- ^bUdegbumam, D. O., Udegbumam, R. I., Nnaji, T. O., Anyanwu, M. U. Chukwujekwu, R. O., & Anika, S. M. (2015). Antimicrobial and antioxidant effect of methanolic *Crinumjagus* bulb extract in wound healing. *Journal of Intercultural Ethnopharmacol*, 4 (3), 239-248.
- Valdés, B. (1988). *La flora iberoamericana* N° 64. Ediciones Amaya, S.A. España, Madrid.
- Velasco, J., Rojas, J., Salazar, P., Rodríguez, M., Díaz, T., Morales, A., & Rondón, M. (2007). Antibacterial activity of the essential oil of *Lippia oreganoides* against multiresistant bacterial strains of nosocomial origin. *Natural Product Communications*, 2, 85-88.

- Vinueza, D., Portero, S., Pilco, G., García, M., Acosta, K., & Abdo, S. (2018). *In Vitro* anti-inflammatory and cytotoxicity of *Crinum x amabile* grown in Ecuador. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11 (10), 99-103.
- Watson, L. & Dallwitz, M.J. (1992). The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Recuperado de <<http://delta-intkey.com/angio/www/amarilli.htm>> [Consulta 20 de Marzo de 2018]
- Yakandawala, D. M. & Samarakoon, T. M. (2006). An empirical study on the taxonomy of *Crinum zeylanicum* (L.) L. and *Crinum latifolium* L. (Amaryllidaceae) occurring in Sri Lanka, Ceylon. *Journal of Science (Biological Sciences)*, 35 (1), 53 -72.
- Zapata, V. F. (2017). “Estudio etnobotánico y farmacognóstico de especies vegetales en la isla de muisne (esmeraldas)” [Tesis de grado]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.

www.bdigital.ula.ve

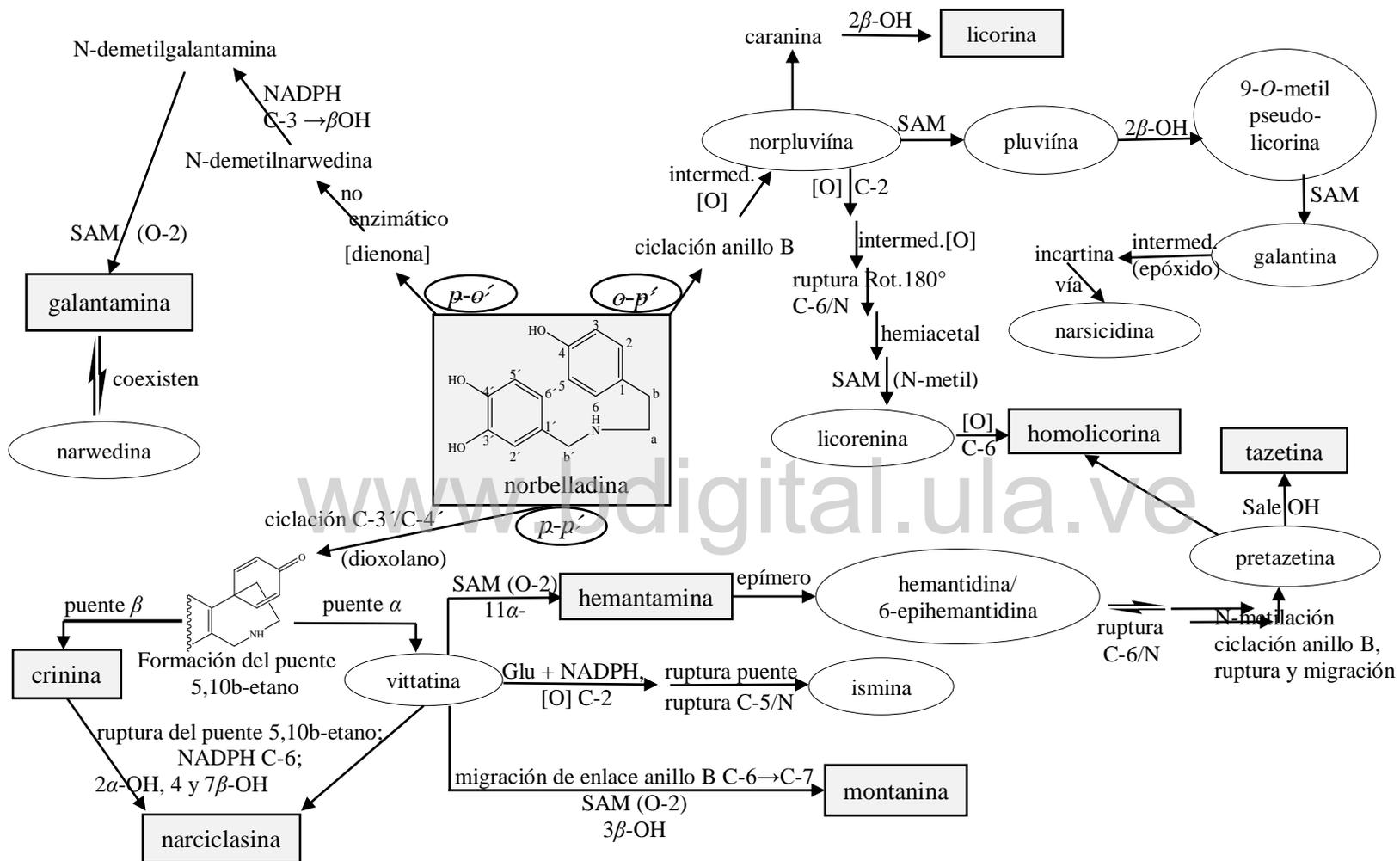
IX. ANEXOS



Simb.	Especie	Municipio	Cuidad	Sector	m s. n. m.	Fecha de recolección	Recolector(a)
△	C. amabile	Santos Marquina	Tabay	La mucuy baja	1898	30-07-2016	Janne Rojas, Alexis Buitrago
○	C. erubescens			La Mucuy alta	2150	30-03-2017	
◡	C. moorei	Libertador	El Valle	Valle Grande	1720	16-09-2016	
□	C. latifolium	Alberto Adriani	El Vigía	El Taparo	63	13-11-2017	Gina Achito

Anexo 1.-Representación de las localidades de recolección de las distintas especies en el estado Mérida
Elaborado por: Gina Achito, 2019.

www.bdigital.ula.ve



Anexo 2.-Biosíntesis de los tipos de esqueletos principales en la familia Amaryllidaceae
Elaborado por: Gina Achito, 2019.