



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

ESTUDIO ANATÓMICO, QUÍMICO Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE *Zephyranthes fosteri*, *Habranthus concolor* Y *Habranthus aff. concolor*.

## TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**LUCÍA YOSCELINA CENTENO BETANZOS**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

DR. RICARDO REYES CHILPA. INSTITUTO DE QUÍMICA

COMITÉ TUTOR:

DRA. TERESA MARGARITA TERRAZAS SALGADO. INSTITUTO DE BIOLOGÍA

DR. ZENÓN CANO SANTANA. FACULTAD DE CIENCIAS

MÉXICO, D.F. FEBRERO, 2014.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

ESTUDIO ANATÓMICO, QUÍMICO Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE *Zephyranthes fosteri*, *Habranthus concolor* Y *Habranthus aff. concolor*.

## TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**LUCÍA YOSCELINA CENTENO BETANZOS**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

DR. RICARDO REYES CHILPA. INSTITUTO DE QUÍMICA

COMITÉ TUTOR:

DRA. TERESA MARGARITA TERRAZAS SALGADO. INSTITUTO DE BIOLOGÍA

DR. ZENÓN CANO SANTANA. FACULTAD DE CIENCIAS

MÉXICO, D.F. FEBRERO, 2014.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/055/14

ASUNTO: Oficio de Jurado

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **14 de octubre de 2013** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del (la) alumno (a) **CENTENO BETANZOS LUCÍA YOSCELINA** con número de cuenta **97199678** con la tesis titulada "**Estudio anatómico, químico y actividad biológica de *Zephyranthes fosteri*, *Habranthus concolor* y *Habranthus aff. concolor***", realizada bajo la dirección del (la) **DR. RICARDO REYES CHILPA**:

Presidente: DR. ADOLFO ANDRADE CETTO  
Vocal: DR. GUILLERMO LAGUNA HERNÁNDEZ  
Secretario: DR. ZENÓN CANO SANTANA  
Suplente: DRA. HELIA REYNA OSUNA FERNÁNDEZ  
Suplente: DRA. SILVIA LAURA GUZMÁN GUTIÉRREZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 22 de enero de 2014

Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga  
Coordinadora del Programa



## **AGRADECIMIENTOS**

Al *Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM*, por proporcionarme una plantilla académica de excelencia así como los medios para concluir mis estudios satisfactoriamente.

Al *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)* por la beca número 261899 (CVU 420174) otorgada para la realización de mis estudios.

A *Becas Mixtas CONACYT 2012-2013*, movilidad en el extranjero (290674) por el apoyo complementario durante mi estancia de investigación en el extranjero.

Al *Programa de Apoyo a Mujeres Indígenas del CONACYT* por el apoyo recibido para la compra de equipo de cómputo.

Al *Programa de Movilidad Internacional de Estudiantes de la Coordinación de Estudios de Posgrado*, por la beca complementaria de transportación para realización de la estancia de investigación en el extranjero. Oficio CEP/SPI-M/224/2012.

Al *Comité Académico del Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas* por el apoyo PAEP 2012 para estancias de investigación.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, PAPIIT-DGAPA-UNAM, PROYECTO IG 200513 por la beca otorgada durante la escritura de esta tesis.

*A los miembros del comité tutor:*

Dr. Ricardo Reyes Chilpa.

Dra. Teresa Margarita Terrazas Salgado

Dr. Zenón Cano Santana.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

Mi más sincero agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México, mi *alma mater*, por proporcionarme en sus instalaciones, los servicios académicos, deportivos, médicos, culturales y recreativos para concluir satisfactoriamente esta etapa de formación profesional.

Al Instituto de Química y el Instituto de Biología por proporcionar los recursos humanos, equipo, material e instalaciones para realizar este estudio.

A mi asesor, el Dr. Ricardo Reyes Chilpa, con afecto y admiración, le agradezco profundamente, su asesoría, tiempo, disposición, crítica y paciencia puestos para la concepción y término de este trabajo así como para mi formación profesional y personal. También por transmitirme sus conocimientos, fomentar el pensamiento crítico y autónomo; por el "amor, orden y progreso" y por compartir su pasión no sólo por el estudio integral de las plantas sino por la diversidad de conocimiento. Infinitas gracias por la amistad, atenciones y todos los apoyos recibidos durante mi estancia en su laboratorio.

Al Departamento de Productos Naturales, Biología Vegetal y Edafología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona por el equipo e instalaciones durante mi estancia.

Al Dr. Jaume Bastida Armengol por su buena disposición y todas las atenciones recibidas para poder complementar este trabajo y que la estancia de investigación fuera posible. A todo su excelente equipo de trabajo del que en todo momento recibí apoyo y orientación.

A la Dra. Natalia Belén Pigni por su asesoría, capacitación y enseñanza, así como todo el interés y tiempo invertido durante y fuera de la estancia para que este trabajo se llevara a cabo con éxito. A sí mismo, agradezco sinceramente su calidez, amistad y el gran ejemplo profesional y como ser humano.

*A los miembros del Comité Sinodal:*

Dr. Adolfo Andrade Cetto, Dr. Guillermo Laguna Hernández y la Dra. Reyna Osuna Fernández, por revisar, corregir y comentar este trabajo así como su constante asesoría, apoyo y amistad.

A la Dra. Silvia Laura Guzmán, por sus constantes y valiosas asesorías durante la realización de este trabajo. Por su excelente disposición para transmitir sus conocimientos pero sobre todo por su apoyo y amistad incondicional.

Al Dr. Antonio Lot por permitir extraer de la REPSA, los recursos naturales necesarios para este estudio.

A la P. de Dr. Rocío Gómez Cansino, por todo su apoyo, asesoría técnica y académica recibida en la realización de este estudio, pero principalmente por su compañerismo y amistad.

## RECONOCIMIENTOS

A mi padre por todo su amor, comprensión, ánimo, apoyo y compañía. A mi madre por su cariño, cuidado y atenciones. A mí querida hermana por ser cómplice, confidente y principal apoyo en esta aventura. Gracias familia, por estar cerca y compartir el cumplimiento de una meta más, los amo mucho.

A mis amigos: Teresa Urpí y Victoriano por darme toda su atención, afecto, amistad y contribuir a que mi estancia en Barcelona fuera inolvidable, ¡moltes gràcies per tot!. A Pedro Martínez, Carlos Zapata y Bety Moreno por que con su apoyo y amistad hicieron más divertido este andar.

A todos l@s compañeros del laboratorio 2-5 y 2-10 del IQ, especialmente a Chío, Lau, Carlitos, César, Jhon, Karlita, Gris, J.C, Ili e Itzel por las críticas, asesorías, reuniones y buenos momentos.

A los compañeros del laboratorio de Barce: Nati Pigni, Laura Torras, Gaby Ivanova y Ying Guo; Karla, Rafa, Paco Villadomat y Carles Codina, por toda su amistad, atención y hospitalidad recibidas.

## *Dedicatoria*

*A mi querido abuelito Don Manuel Centeno Trujillo, por ser un hombre alegre, de trabajo, palabra y mucho compromiso. Gracias por compartir los frutos de tu esfuerzo, pero sobretodo por todo el cariño y las enseñanzas que quedarán para siempre en mis recuerdos.*

*También dedico esta tesis a los tantos estudiantes que con sus propios recursos, convicción y muchos esfuerzos le dan sentido a una universidad pública que es y se debe al pueblo, esta máxima casa de estudios que tiene el importante compromiso de educar a su sociedad, asesorarla y ayudarla para que actúe con mayor conocimiento, justicia y equidad.*



## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	10
<b>Abstract</b> .....	12
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	14
La Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel.....	14
<i>Zephyranthes</i> y <i>Habranthus</i> (Amaryllidaceae) en la REPSA.....	16
<b>ANTECEDENTES</b> .....	17
Amaryllidaceae y <i>Zephyranthes</i> .....	17
<i>Zephyranthes fosteri</i> Traub. (Amaryllidaceae).....	18
<i>Habranthus concolor</i> Lindl. (Amaryllidaceae).....	20
<i>Habranthus aff. concolor</i> . (Amaryllidaceae).....	21
La hibridación en plantas.....	22
La anatomía vegetal y química como apoyo en estudios taxonómicos.....	23
<b>OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b> .....	26
<b>Capítulo 1: Anatomía de la hoja, escapo y bulbo de <i>Zephyranthes fosteri</i>, <i>Habranthus concolor</i> y <i>H. aff. concolor</i> (Amaryllidaceae)</b> .....	27
Resumen.....	27
Introducción.....	28
Materiales y métodos.....	32
Resultados.....	33
Discusión.....	40
Conclusiones.....	44
Literatura citada.....	44
<b>Capítulo 2: Alcaloides y actividad biológica de <i>Zephyranthes fosteri</i>, <i>Habranthus concolor</i> y <i>H. aff. concolor</i> (Amaryllidaceae)</b> .....	48
Resumen.....	48
Introducción.....	49
Materiales y métodos.....	53
Resultados.....	67
Discusión.....	93
Conclusiones.....	97
Literatura citada.....	98
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	102
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	103
<b>ANEXOS</b> .....	107

## RESUMEN

En este trabajo se estudió anatómica y químicamente a las especies *Zephyranthes fosteri*, *Habranthus concolor* y *Habranthus aff. concolor* (Amaryllidaceae) con el fin de caracterizar dichos taxa y presentar elementos que apoyaran o refutaran la hipótesis que *H. aff. concolor* es un híbrido de los dos primeros. Estos tres taxa coexisten en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA) situada en la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El estudio se divide en dos capítulos. En el primer capítulo se describe y compara la estructura anatómica de la hoja, el escapo y el bulbo de las dos especies y el híbrido. Los resultados mostraron que los principales caracteres para distinguir a *Z. fosteri* de *H. concolor* fueron: a) las diferencias en el tamaño del mesofilo y del diámetro del escapo, b) la presencia de costillas y la forma estriada de la cutícula en *Z. fosteri*, y c) la ausencia de parénquima en empalizada en *H. concolor*. A nivel estructural, los resultados obtenidos apoyan la propuesta que *H. aff. concolor* es un híbrido, siendo los principales elementos: el carácter anatómico intermedio que presenta y la similitud en la estructura interna con ambas especies parentales.

En el segundo capítulo se describe y compara el perfil de alcaloides presentes en los extractos metanólicos y la fracción alcaloidea de diferentes partes de la planta, como el bulbo y las hojas de las dos especies y el híbrido. Dichos extractos se analizaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los tres taxa presentaron un perfil químico diferente. Los alcaloides mayoritarios de *Z. fosteri* fueron la licorina y un alcaloide cuyo espectro de masas presentó el pico base y el ión molecular en  $m/z$  189 (261). Para identificarlo, se aisló mediante métodos cromatográficos y se analizó por resonancia magnética nuclear de

$^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , indicando que se trata de un compuesto nuevo, el 3'-demetoximesembranol. Para *H. concolor* los alcaloides mayoritarios fueron la galantamina y la clidantina. En el caso del híbrido, presentó licorina y un alcaloide cuyo espectro de masas presentó el pico base y el ión molecular en  $m/z$  175 (247), respectivamente. También se evaluó la capacidad de los extractos metanólicos para inhibir a la enzima acetilcolinesterasa, y así determinar su potencial como fitofármacos en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Los extractos metanólicos de los bulbos presentaron la mayor actividad inhibitoria, siendo *Z. fosteri* el más potente, luego *H. concolor* y por último el híbrido. El compuesto 3'-demetoximesembranol mostró actividad biológica relevante, aunque menor en comparación con el fármaco de referencia, el hidrobromuro de galantamina. Los resultados anatómicos y químicos permitieron concluir que existen diferencias entre los tres taxa los cuales apoyan la existencia del híbrido. Este estudio también pone de manifiesto la relevancia que tiene la REPSA como posible fuente de especies potencialmente útiles en la medicina, así como la importancia de conservar su biodiversidad.

## Abstract

In this work *Zephyranthes fosteri*, *Habranthus concolor* and *Habranthus aff. concolor* (Amaryllidaceae) were studied anatomical and chemically in order to characterize these taxa in order to support or refute the hypothesis that *H. aff. concolor* is a hybrid derived from the former species. These three taxa grow at San Angel's Pedregal Ecological Reserve (REPSA) located in the campus of the National Autonomous University of Mexico (UNAM). The study is divided into two chapters. The first chapter describes and compares the anatomical structure of the leaf, the scape and bulb of the two species and the hybrid. The main differences between *Z. fosteri* of *H. concolor* are: the extent of mesophyll and the diameter of the scape, b) the presence of ribs and the striated outline of the cuticle in *Z. fosteri* and c) the absence of palisade parenchyma in *H. concolor*. Structurally, the results support the proposal that *H. aff. concolor* is a hybrid, being the main elements: its transitional anatomical characters, and the similarity in the internal structure with the parental species.

The second chapter describes and compares the profile of alkaloids present in the methanol extract and the fraction alkaloid of different parts of the plant, such as the bulb and the leaves, of the two species and the hybrid. These extracts were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The three taxa showed a different chemical profile. The major alkaloids of *Z. fosteri* were licorine, followed by an alkaloid whose mass spectrum had a base peak and a molecular ion in  $m/z$  189 (261), respectively. This compound was isolated by chromatographic methods, and analyzed by  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance finding that it is a novel compound, which was named as 3'-demetoximesembranol. In the case of *H. concolor* the major alkaloids were galantamine, and chlidantine. In the case of the hybrid were

licorine, and an alkaloid whose mass spectrum had a base peak and a molecular ion in  $m/z$  175 (247), respectively. We also evaluated the ability of the methanol extracts to inhibit the enzyme acetylcholinesterase and determine their potential as phytodrugs for the treatment of Alzheimer's disease. The methanol extract of the bulbs showed the highest inhibitory activity, *Z. fosteri* being the most potent, then *H. concolor*, and finally the hybrid. The 3'-demetoximesembranol showed significant biological activity, though lesser compared with the reference drug, galantamine hydrobromide. Anatomical and chemical results allowed to conclude that there are differences between the three taxa, and support the existence of the hybrid. This study also demonstrated the relevance of REPSA as a reservoir of potentially useful species in medicine, and the importance of conserving its biodiversity.

## INTRODUCCIÓN

---

### **La Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel**

La Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA) situada en Ciudad Universitaria, protegida desde hace 30 años por la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), representa el último relicto del ecosistema del pedregal de la cuenca de la Ciudad de México, conocido como matorral xerófilo del senecio o palo loco (*Senecio praecox*), (Lot y Camarena, 2009). Esta reserva natural posee un carácter exclusivo por estar inmersa en una zona urbana, pero además por su biodiversidad, geomorfología y valor paisajístico que representa un ecosistema de gran importancia para la conservación de la flora y fauna por la gran variedad de microhábitats que presenta, consecuentes de su topografía accidentada y ubicación confluyente entre las zonas biogeográficas neártica y neotropical (Cano-Santana *et al.*, 2008).

Lot y Camarena (2009), enfatizan que en la actualidad, el conocimiento, uso y conservación de la riqueza natural cobra mayor importancia por el deterioro tan acelerado que experimenta la expansión y contacto de las urbes sobre las áreas rurales y naturales, por lo que consideran que es de suma importancia que en esta reserva no sólo se proteja el ecosistema sino que también se acerque a la comunidad universitaria a que pueda observarla, estudiarla y recorrerla (Lot, 2007).

La REPSA se encuentra clasificada en dos zonas principales, las llamadas zonas núcleo que es dónde se resguarda y conserva a las especies en condiciones menos alteradas de la reserva, y las zonas de amortiguamiento, las cuales además minimizan y protegen a las zonas núcleo de

disturbios como: la contaminación auditiva, la acumulación de basura, la carga constante de visitas y la acción de fauna feral, entre otras, sin embargo, en estas zonas se mantiene una alta riqueza específica ya que resguarda el 51.93% del total de las especies vegetales reportadas para la zona núcleo (Castillo-Argüero *et al.*, 2004); (Fig. 1). En un estudio florístico se reportó que en la REPSA existen alrededor de 337 especies en total (Castillo-Agüero *et al.*, 2007) y de 175 a 194 en las zonas de amortiguamiento y áreas naturales aledañas (Cano-Santana *et al.*, 2008; Maravilla-Romero *et al.*, 2009); (Fig. 1).



**Figura 1.** Localización urbana y zonas de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, (REPSA) D.F. México. En rojo: zonas núcleo (protección estricta). En azul: zonas de amortiguamiento (uso restringido para protección ambiental). Foto: (REPSA, 2013).

## ***Zephyranthes y Habranthus (Amaryllidaceae) en la REPSA***

En estudios florísticos de la REPSA se ha registrado la presencia de tres especies silvestres de la familia Amaryllidaceae, *Zephyranthes fosteri*, *Habranthus concolor* (= *Z. concolor*) y un posible híbrido originado entre ambas, *Habranthus aff. concolor* (Damián-Domínguez *et al.*, 2009; Damián-Domínguez, 2010).

*Zephyranthes concolor* (Lindl.) Benth. *et* Hook f. es también conocida como *Habranthus concolor* Lindl., es decir, son sinónimos según el *International Plant Names Index*. Se encuentra distribuida en las zonas suroriente 1 y 2 (cercanas a la zona núcleo sur oriente) y en áreas de amortiguamiento (Cano-Santana *et al.*, 2008).

*Zephyranthes fosteri* Traub. se encuentra en zonas de amortiguamiento de la REPSA y áreas naturales aledañas no protegidas (Maravilla-Romero *et al.*, 2009).

En el caso de *Habranthus aff. concolor*, Damián-Domínguez *et al.* (2009) y Damián-Domínguez (2010) indican que se trata de un híbrido o morfoespecie propuesto por el botánico Abisai García-Mendoza, el cual se encuentra distribuido en zonas de amortiguamiento de la reserva.

La existencia en la REPSA de estos tres taxa brinda un excelente modelo para estudiar de manera comparativa las características anatómicas y sus principales alcaloides, con el fin de esbozar sus relaciones de parentesco, determinando en particular si la hipótesis del híbrido tiene sustento. A la fecha, ninguno de estos taxa han sido estudiados anatómicamente y sólo existen datos sobre la composición química de *H. concolor* (Berkov *et al.*, 2008; Reyes Chilpa *et al.*, 2011). Adicionalmente, se examinó si los extractos estandarizados química y farmacológicamente podrían inhibir la enzima acetilcolinesterasa, un blanco importante en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.



## ANTECEDENTES

---

### **Amaryllidaceae y *Zephyranthes***

De acuerdo con López-Ferrari y Espejo-Zerna (2002), las Amaryllidaceae son una familia de plantas que tiene una amplia distribución, principalmente en los trópicos, con centros importantes de diversificación en Sudáfrica, en los Andes en Sudamérica y en el Mediterráneo; agrupa alrededor de 860 especies en 50 géneros. En México se encuentran siete géneros silvestres y algunos otros como *Clivia*, *Hippeastrum*, *Eucharis*, *Narcissus*, se cultivan ampliamente en parques y jardines.

El género *Zephyranthes* agrupa alrededor de 60 especies, todas americanas de las cuales 36 se encuentran presentes en México. La circunscripción de especies en *Zephyranthes* ha sido complicada, debido posiblemente a la hibridación que existe entre los taxa. Los caracteres florales (color de la flor, longitud del perianto, del estilo y de los estambres) son muy importantes para el reconocimiento de las especies porque no siempre se aprecian bien en el material herborizado (López-Ferrari y Espejo-Zerna, 2002). A continuación se describe cada una de las especies estudiadas.

### ***Zephyranthes fosteri* Traub.**

*Zephyranthes fosteri* (Lindl) ha sido descrita en detalle por Calderón y Rzedowski, 2005 según se expone es una hierba de 5 a 45 cm de altura; bulbo ovoide, de 0.8 a 2.5 cm de diámetro; tallos 1 a 3, cilíndricos, en ocasiones ligeramente comprimidos, hasta de 40 cm de longitud, de superficie estriada, hojas por lo general tardías, láminas hasta de 35 cm de longitud por 0.5 a 5 mm de longitud, agudas, ligeramente acanaladas, en algunas ocasiones sobrepasando el tallo, las vainas forman una cubierta externa hasta de 12 cm de longitud; bráctea de 1.5 a 4 cm de largo, bífida, con los lóbulos de 0.5 a 2.5 cm de longitud; flores de 2.2 a 6 cm de largo, sésiles o con un pedúnculo hasta de 1 cm de longitud, de color rosa o blancas y con tonos rosados especialmente en la parte media y apical de los segmentos, en ocasiones con tintes verdosos; tubo del perianto de 1 a 2.5 cm de largo, segmentos de la serie externa oblanceolados u oblongo-elípticos, de 1.5 a 3.5 cm de largo por 6 a 15 mm de ancho, cuneados, ápices agudos o acuminados y pilosos, los de la serie interna similares, pero más cortos y angostos; anteras lineares, de 5 a 8 mm de longitud; cápsula subglobosa, de 4 a 12 mm de longitud, trilobada; semillas semicirculares de 3.5 a 6 mm de largo por 1.8 a 3.5 mm de ancho, finamente foveoladas, a menudo con la superficie brillante. En México, se le conoce popularmente como "quiebra platos", "flor de mayo" o "mayitos". Se distribuye en pastizales, matorrales, bosques de encino, de pino-encino y coníferas. Se conoce de San Luis Potosí y Jalisco a Guerrero, Puebla y Oaxaca (Fig. 2).

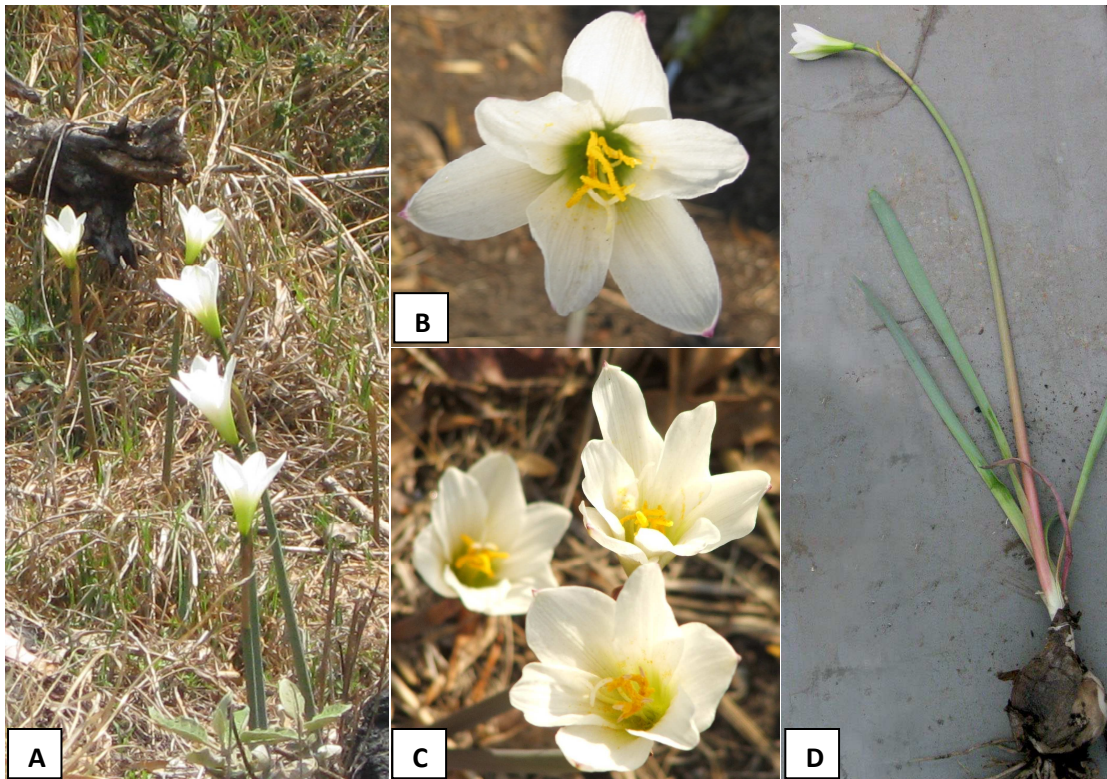


**Figura 2.** *Zephyranthes fosteri* en la REPSA, México, D.F. A) Hábito. B) Detalle de una flor. C) Agrupamiento de plantas. D) Detalle de planta completa con cápsula, flor, escapo, hojas, bulbo y raíces. Fotos: J. Luis Centeno y L. Yoscelina Centeno.

### ***Habranthus concolor* Lindl. (Amaryllidaceae)**

El género *Habranthus* comprende alrededor de 30 especies bulbosas, originarias de América, de las cuales algunas son endémicas de México. *Habranthus concolor* ha sido señalado como sinónimo de *Zephyranthes concolor* Lindl., por el International Plant Names Index. La descripción que se transcribe a continuación corresponde a *Z. concolor* y se basa en Calderón y Rzedowski, 2005 según se expone. Hierba hasta de 50 cm de largo; bulbo ovoide, de 1.5 a 4.5 cm de diámetro; tallos 1 ó 2, de 10 a 40 cm de longitud, de color verde oscuro, ligeramente glaucos, con tonos rojizos sobre todo hacia el tercio inferior, estriados; hojas tardías, desarrolladas en la etapa de fructificación, láminas de 10 a 40 cm de largo por 2.5 a 5.5 (7.5) mm de ancho, agudas, vainas membranosas, formando una cubierta externa hasta de 9 cm de longitud; pedúnculo hasta de 7 cm de largo, bráctea de 2.5 a 5 cm de longitud, membranosas,

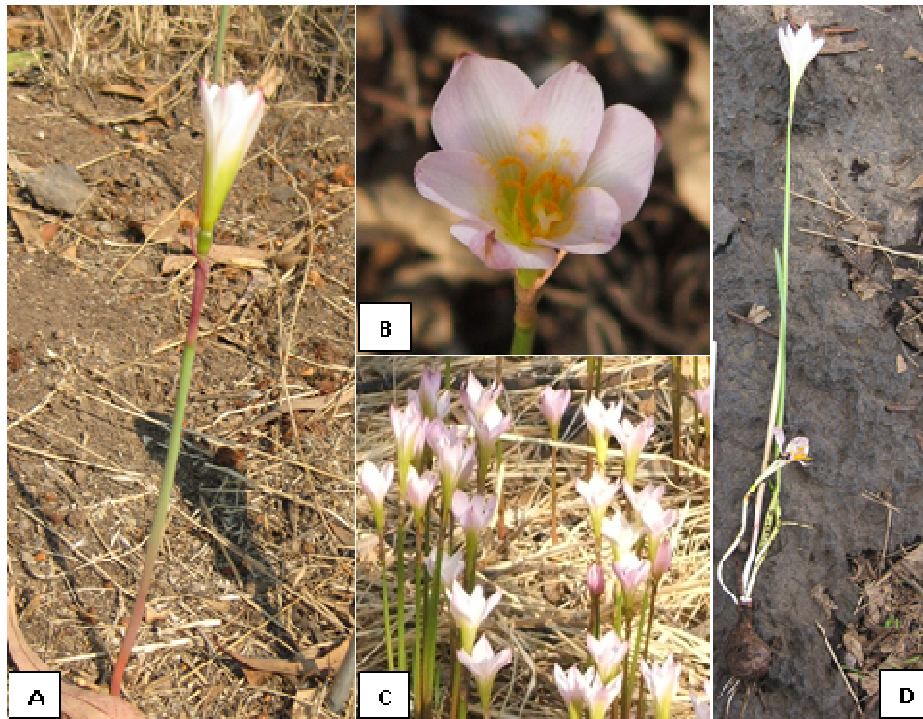
verde o rojiza, con lóbulos de 1 a 2 cm de largo; flores persistentes, de 4 a 5 cm de largo, de color blanco, con tintes verdosos y/o rosados, especialmente distribuidos en la porción media y apical de la cara exterior de los segmentos del perianto, tubo inconspicuo, de 3.5 a 5 mm de longitud, segmentos de la serie externa oblanceolados, de 4.2 a 5 cm de largo por 12 a 22 mm de ancho, ápice agudo y piloso, cuneados en la base, los de la serie interna similares de 8.5 a 16 mm de ancho; anteras lineares de 7 a 10 mm de longitud; cápsula de 1.3 a 1.7 cm de longitud, trilobada, verde, a menudo con tonos rojizos, de color paja al tiempo de la dehiscencia; semillas semicirculares, de 7 a 9 mm de largo por 4 a 5.5 mm de ancho, planas (Fig. 3). Se distribuye principalmente en matorral xerófilo. Se encuentra en Guanajuato y de San Luis Potosí al Distrito Federal.



**Figura 3.** *Habranthus concolor* en la REPSA, México, D.F. A) Hábito. B) Detalle de una flor. C) Agrupamiento de plantas. D) Detalle de planta completa con flor, escapo, hojas, bulbo y raíces. Fotos: J. Luis Centeno y L. Yoscelina Centeno.

***Habranthus aff. concolor* (Amaryllidaceae).**

Damián-Domínguez *et al.*, 2009 (ver también Damián-Domínguez, 2010) reportaron la existencia en la REPSA de una morfoespecie, no registrada anteriormente y propuesta por el botánico Abisaí García-Mendoza. Esta opinión se basa en un estudio de fenología reproductiva y por exhibir una morfología intermedia entre ambas especies parentales, dicha conclusión se basó en un análisis de componentes principales y el conteo de caracteres de las tres especies. *Habranthus aff. concolor* presenta flores rosado pálido con tintes rojizos o verdes en la punta exterior de los tépalos y características morfológicas intermedias entre *H. concolor* y *Z. fosteri*, por lo cual se le ha considerado como híbrido bajo el nombre de *H. aff. concolor*. Es una planta herbácea de hasta 23 cm de altura, con un bulbo de 3 a 6 cm de diámetro, y flores de 4 cm de diámetro (Fig. 4). Los géneros *Habranthus*, *Zephyranthes* y *Sprekelia* forman una subtribu *Zephyranthinae* dentro de la tribu *Hippeastreae*, pero las relaciones al interior de la subtribu aún no están del todo esclarecidas debido a que son muy complejas (Meerow *et al.*, 1998, 2000).



**Figura 4.** *Habranthus aff. concolor* en la REPSA, México, D.F. A) Hábito. B) Detalle de una flor. C) Agrupamiento de plantas. D) Planta completa con flor, escapo, hojas, bulbo y raíces. Fotos: J. Luis Centeno y L. Yoscelina Centeno.

### La hibridación en plantas

La hibridación natural es un fenómeno que ocurre muy frecuentemente en plantas, que permite la generación de descendencia por el entrecruzamiento de individuos pertenecientes a poblaciones que se distinguen por lo menos, por un carácter heredable, independientemente de su estatus taxonómico (Harrison, 1990, 1993; Arnold, 1997; González, 2007). La hibridación interespecífica se lleva a cabo cuando la cruce se da entre dos especies del mismo género, sin embargo, la formación de híbridos interespecíficos dependerá de la compatibilidad genética entre las dos especies, de la fenología de la floración, de la superposición de sus rangos de distribución y de las condiciones adecuadas para el establecimiento de la progenie híbrida, es decir de todo un "hábitat híbrido" (Müller, 1952; Stern, 1974; Donoso, 1995). Desde el punto de vista de la taxonomía y la sistemática, se han documentado miles de casos de hibridación en

prácticamente todos los grupos de plantas y animales; muchos de estos híbridos han sido descritos y caracterizados morfológicamente, y en un número menor de casos mediante diversos tipos de marcadores: citogenéticos, químicos y moleculares (González, 2007).

Desde el punto de vista ecológico y evolutivo, la hibridación tiene importancia dado que contribuye considerablemente a la modificación y al aumento de la diversidad biológica y genética por la combinación de rasgos favorables, o la incorporación de caracteres favorables de una especie hacia la otra, a través de la transferencia de uno o varios genes (Anderson, 1948; Stebbins, 1950; Quiroga, 2005). Cualquier tipo de alteración ambiental puede dar como resultado un hábitat híbrido potencial. Las perturbaciones naturales, derivan en áreas con características medioambientales propicias para la hibridación natural. En estas ocurren grandes cambios en el ambiente dentro de cortas distancias, permitiendo la proximidad necesaria de las especies compatibles y el origen de nichos nuevos favorecen el establecimiento de los híbridos (Zobel y Talbert, 1994; Donoso, 1995; Alarcón, 2000)

### **La anatomía vegetal y la química como apoyo en estudios taxonómicos**

La anatomía o estructura celular de los tejidos vegetales se estudia por métodos microscópicos y centra su estudio en la forma, variabilidad y estructura de los tejidos que componen el cuerpo de una planta (Metcalffe y Chalk 1979; Fahn, 1978). Los caracteres anatómicos han demostrado ser muy valiosos a diferentes niveles en los estudios taxonómicos (Dickinson, 1989). La anatomía sistemática ha proporcionado evidencias para apoyar o refutar la ubicación de individuos en su respectiva especie (Martínez-Cabrera *et al.*, 2003). Considerando la gran plasticidad fenotípica y similitud morfológica que suelen presentar algunas especies en las

hojas y otros órganos como en el caso de la familia Amaryllidaceae, la anatomía se ha convertido en una herramienta importante para el diagnóstico taxonómico (Alves-Araujo y Alves, 2005). En los estudios anatómicos realizados en especies y géneros de la familia Amaryllidaceae, se han generado datos importantes sobre las características anatómicas con implicaciones taxonómicas.

Por otro lado, la quimiotaxonomía o sistemática micromolecular utiliza los metabolitos secundarios de las plantas como caracteres taxonómicos y permite reconocer la afinidad filogenética entre un grupo de especies que se hipotetiza están emparentadas (Grayer *et al.*, 1999). Desde hace tiempo se ha reconocido el valor de los compuestos químicos de las plantas para su clasificación. En particular, los alcaloides son metabolitos secundarios que han sido utilizados como marcadores taxonómicos. Bate (1968) menciona que a finales del siglo XIX, Eymann describía la frecuencia con la que se presentaban los alcaloides en ciertas familias. Es por eso que el estudio de las características químicas que presenta una planta es una importante herramienta para entender su clasificación y procesos evolutivos (Stuessy y Crawford, 1983).

Las Amaryllidaceae producen alcaloides que son biosintetizados exclusivamente por especies pertenecientes a esta familia y son conocidos como alcaloides tipo Amaryllidaceae, por lo que son marcadores taxonómicos (Bastida *et al.*, 2006). Las especies de *Zephyranthes* y *Habranthus* contienen alcaloides tipo Amaryllidaceae de las clases licorina, hemantamina y galantamina. Entre ellos, el más importante desde el punto de vista médico, es la galantamina. Este alcaloide fue aislado por primera vez en 1952 de los bulbos de *Galanthus woronowii* (Amaryllidaceae). La



galantamina actualmente se emplea en la formulación de un grupo de medicamentos inhibidores de acetilcolinesterasa, como el Razadyne® y Reminyl®, administrados para tratar síntomas leves a moderados de la enfermedad de Alzheimer (Bastida *et al.*, 2006).

La galantamina es un alcaloide biosintetizado exclusivamente por especies de Amaryllidaceae, aunque también se puede producir por síntesis. Actualmente se obtiene con fines comerciales de las especies búlgaras *Galanthus nivalis* y de *Leucojum aestivum* que resultan insuficientes para la demanda existente. En el caso de *Z. concolor* (sinónimo: *H. concolor*) se han aislado los alcaloides tipo galantamina y licorina de los bulbos (Berkov *et al.*, 2008; Reyes-Chilpa *et al.*, 2011). A la fecha no se ha estudiado químicamente *Z. fosteri* y el posible híbrido, los cuales podrían ser una fuente de galantamina u otros alcaloides no conocidos con posible actividad sobre la acetilcolinesterasa.

La enfermedad de Alzheimer es considerada uno de los tipos de demencia que más frecuentemente se diagnostican en adultos mayores y se estima que actualmente existen unos 25 millones de personas que la padecen en el mundo, y probablemente en los próximos 20 años se registrarán 70 millones de nuevos casos (OMS, 2009). Debido a que no se practican encuestas epidemiológicas a nivel nacional, las cifras son inciertas, pero existe un estimado de 600,000 personas que padecen Alzheimer en México (CONAPO, 2005). En los países latinoamericanos se espera que en los próximos años se presente el fenómeno de envejecimiento de la población, con lo que se incrementará notablemente el número de casos (Aso, 2005).

## OBJETIVOS

---

Los objetivos de esta tesis son los siguientes:

- Describir y comparar anatómicamente a *Zephyranthes fosteri*, *Habranthus concolor* y *Habranthus aff. concolor*.
- Determinar cualitativa y cuantitativamente los alcaloides presentes en las tres taxa por medio de la cromatografía de gases-espectrometría de masas.
- Conocer la actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa de los extractos de las tres taxa.

## HIPÓTESIS

---

Si *Habranthus aff. concolor* es un híbrido, presentará rasgos anatómicos y químicos que compartirá con las especies parentales *Habranthus concolor* y *Zephyranthes fosteri*.

### **Anatomía de la hoja, escapo y bulbo de *Zephyranthes fosteri*, *Habranthus concolor* y *H. aff. concolor* (Amaryllidaceae)**

#### **Resumen**

Se describe y compara la estructura de la hoja, el escapo y el bulbo de *Zephyranthes fosteri*, *Habranthus concolor* y *Habranthus aff. concolor* (Amaryllidaceae), con el fin de identificar características anatómicas que permitieran diferenciar a las tres especies estudiadas y proporcionar elementos a favor de la propuesta que *H. aff. concolor* es un híbrido de *Z. fosteri* y *H. concolor*. Las principales diferencias estructurales entre las especies se encontraron en las hojas. *Zephyranthes fosteri* se caracterizó por presentar costillas y una forma estriada en la cutícula, presentó parénquima en empalizada y las cavidades del mesofilo fueron circulares. *Habranthus concolor* no presentó papilas y la forma de la cutícula fue lisa, carece de parénquima en empalizada y las cavidades del mesofilo fueron ovaladas. El híbrido presentó caracteres anatómicos cualitativos y cuantitativos intermedios con las especies progenitoras; sin embargo, estos presentaron mayor similitud con *Z. fosteri*. Se encontraron diferencias significativas en el tamaño del mesofilo y el diámetro del escapo de los tres taxa. Los resultados permitieron caracterizar a las especies, aportando características anatómicas que distinguen a uno y otro géneros y apoyan la propuesta que *H. aff. concolor* es un híbrido.

## Introducción

El género *Zephyranthes* (Amaryllidaceae) está compuesto por aproximadamente 60 especies distribuidas en regiones templadas y tropicales del continente americano (Calderón y Rzedowski, 2005). A nivel mundial se les conoce como "lirios de lluvia" ("rain lilies"), pero en México, comúnmente se les conoce como "quebra platos", "flor de mayo" o "mayitos", por su tendencia a florecer después de las primeras lluvias que ocurren en el mes de mayo, sus usos son principalmente ornamentales. Habita en pastizales, matorrales, bosques de encino, de pino-encino y de coníferas (Calderón y Rzedowski, 2005). En la cuenca del Valle de México se han registrado por lo menos seis especies (Calderón y Rzedowski, 2005). En la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA) de la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) se encuentran en las zonas de amortiguamiento *Z. fosteri*, *H. concolor* y una morfoespecie, *H. aff. concolor*, la cual ha sido propuesta como un híbrido de las primeras especies (Castillo-Argüero *et al.*, 2004; Cano-Santana, 2008; Damián-Domínguez *et al.*, 2009; Damián-Domínguez, 2010). Para fines prácticos en este capítulo *H. aff. concolor* será denominado "híbrido" de ahora en adelante.

La hibridación, es un fenómeno natural muy habitual en plantas, considerado como un proceso importante de especiación debido a que produce combinaciones genéticas por la introducción de genes semicompatibles en un genotipo, el cual sometido a la interacción de la variación genética y ambiental puede dar lugar a un nuevo taxón derivado de los tipos parentales (Harrison, 1993; Tovar y Oyama, 2004). Rieseberg y Ellstrand (1993) señalan que los híbridos frecuentemente son un mosaico de caracteres morfológicos parentales e intermedios,

y que una gran proporción de los híbridos de las primeras y últimas generaciones exhiben caracteres extremos o novedosos. En los estudios morfológicos se ha reportado el carácter intermedio que pueden presentar los híbridos, así como la estructura anatómica intermedia en algunos de ellos, siendo la hoja, el órgano en dónde se detectan mayormente dichas características (Baas, 1978; Díaz *et al.*, 2009).

El género *Habranthus* Herb. es un género nativo de América con cerca de 30 especies (Meerow y Snijman, 1998) que se distribuye en América del Sur, México y el Suroeste de los Estados Unidos (Ellenbecker, 1975) y al igual que las especies de *Zephyranthes*, se les conoce como lirios de lluvia (Bailey, 1977). En México se reconocen alrededor de seis especies del género de las cuales cinco son endémicas (Alvarado-Cárdenas y García Mendoza, 2008). Algunas especies de *Habranthus* han sido incluidas dentro del género *Zephyranthes* Hebert, puesto que algunos autores consideran que las características que distinguen a estos dos géneros son subjetivas (Howard, 1996; Fernández-Alonso y Groenendijk, 2004). En este sentido, Arroyo (1981) considera que ambos géneros podrían fusionarse por la poca diferencia en los caracteres morfológicos florales y anatómicos con algunas excepciones, como las diferencias anatómicas en las hojas de ciertas especies de ambos géneros. Por otro lado, Souza, (2006), Alvarado-Cárdenas y García-Mendoza, (2008) reconocen dos géneros, señalan que *Zephyranthes* se distingue de *Habranthus* por tener flores actimofomas, estambres de dos longitudes diferentes, la inserción de los estambres en la base del tubo y la presencia de un paraperigonio o corona (Cuadro 1.1). Souza (2006) al revisar ambos géneros considera que la delimitación de *Habranthus* y *Zephyranthes* aún es confusa y carece de detalles por lo cual dicha delimitación debería comenzar a nivel de las especies. Meerow *et al.* (2000) plantean la realización de una

búsqueda de datos y secuencias de ADN de plastidios para definir su relación filogenética, por lo que en este trabajo se reconoce la existencia de ambos géneros siguiendo el trato taxonómico tradicional, como lo proponen Oliveira y Sano (2009).

**Cuadro 1.1.** Principales diferencias morfológicas entre los género *Zephyranthes* y *Habranthus*.

	<i>Zephyranthes</i>	<i>Habranthus</i>
<b>Flor</b>	Actinomorfas, unifloras.  Erectas y suberectas.	Zigomorfas de 1-4 flores y paraperigonio.  Declinadas a suberectas.
<b>Estambres</b>	Base del perianto con dos longitudes diferentes.	Base del tubo del perianto con cuatro longitudes diferentes y declinadas.
<b>Hoja</b>	10-20 cm X 1 cm	10-20 cm X 1.5-2 cm

El análisis anatómico de los caracteres vegetativos son muy valiosos a nivel taxonómico en diferentes estudios sistemáticos (Dickison, 1989) y numerosos trabajos han dado mérito al estudio de la anatomía foliar para apoyar el reconocimiento de grupos taxonómicos supra e infragenéricos (Andrés-Hernández y Terrazas, 2006). Algunas especies del género *Habranthus* y *Zephyranthes* han sido estudiadas anatómicamente con fines taxonómicos (Arroyo, 1984; Alves-Araújo, 2005); sin embargo, no se han realizado estudios anatómicos de las especies mexicanas objeto del presente trabajo. En este capítulo se pretende contribuir al conocimiento estructural de la hoja, escapo y bulbo de *Z. fosteri*, *H. concolor* y *H. aff. concolor* distribuidas en la REPSA (Fig. 1.1), con el objetivo de aportar datos de interés taxonómico que sirvan para el

conocimiento de dichos géneros, que permitan distinguir a nivel estructural a los tres taxa y apoyar con ello la hipótesis de que *H. aff. concolor* es un híbrido.



**Figura 1.1.** Arriba: de izquierda a derecha, detalle de las flores de *Z. fosteri*, *H. aff. concolor* (híbrido) y *H. concolor*. Abajo: misma distribución, vista del hábito.

## **Materiales y métodos**

**Sitio y especies de estudio.** Se recolectaron de seis a ocho plantas de *Z. fosteri*, *H. concolor* y *H. aff. concolor* en mayo del 2011 y 2012 en zonas de amortiguamiento de la REPSA, ubicada en el campus de Ciudad Universitaria de la UNAM en México, D.F. Se obtuvieron ejemplares de herbario que fueron depositados en el Herbario del IMSS identificados por la Dra. Nelly Diego y la Mtra. Abigail Aguilar.

**Método.** Las hojas, escapo y bulbos fueron lavados y fijados en formaldehído-ácido acético-alcohol etílico (Jensen, 1962) y procesados usando la microtecnia convencional de inclusión en parafina con ayuda de un cambiador automático Leica, TP 1020, el cual deshidrató gradualmente los tejidos hasta llegar a parafina con inmersiones cada 3 h. Se realizaron cortes transversales de aproximadamente 8-10  $\mu\text{m}$  de grosor para las hojas y escapos; y de 18-20  $\mu\text{m}$  para los bulbos, con un micrótopo rotatorio Leica modelo RM2125. Los cortes fueron teñidos con safranina-verde rápido (Jensen, 1962) y montados en resina sintética. Las mediciones se hicieron en un microscopio óptico acoplado al analizador de imágenes Image-Pro Plus versión 6.1. Se calcularon los promedios de 25 mediciones de tres individuos diferentes de cada carácter anatómico para cada taxa. Los datos fueron analizados y comparados estadísticamente, aplicando el análisis de varianza del modelo lineal generalizado (GLM), seguido de la correlación de medias por promedio por el método de Tukey, utilizando el programa estadístico statistical analysis system (SAS).



## Resultados

### Descripción anatómica

**Hoja.** La cutícula adaxial y abaxial es ligeramente estriada en *H. concolor* y el híbrido, pero *Z. fosteri* presenta una pequeña costilla por célula. *H. concolor* tiene la cutícula más gruesa y *Z. fosteri* más angosta (Fig. 1.2. a-b, e-f, i-j). La epidermis adaxial y abaxial es simple en *H. concolor*, en el híbrido las células son rectangulares con la cara más corta de forma angulosa y en *Z. fosteri* sólo son rectangulares (Cuadro 1.2). El tamaño de las células de la epidermis adaxial es similar entre las especies; pero, son más grandes en el caso de la epidermis abaxial de *H. concolor* (Cuadro 1.3). Las tres especies presentan hojas anfiestomáticas con estomas diaclíticos, pero en *H. concolor* se observaron elevados y a nivel en *Z. fosteri* y el híbrido. Las tres especies son bifaciales, pero en *Z. fosteri* el mesofilo es equifaciado con una capa de parénquima en empalizada en ambas caras (Fig. 1.2. b). En *H. concolor* el mesofilo es indiferenciado (Fig. 1.2. i) y en el híbrido el mesofilo se encuentra en un estado de transición entre indiferenciado y con células de parénquima en empalizada en la cara abaxial que no son consistentes en toda la hoja (Fig. 1.2 e, f y h). En el mesofilo hay aerénquima que forma una cavidad ubicada entre los haces vasculares que varía de tamaño (Cuadro 1.3) y de forma, ya que mientras en *Z. fosteri* es circular, en *H. concolor* y en el híbrido es ovalada (Fig. d, h y l). El mesofilo de *Z. fosteri* y el híbrido presenta tamaño similar a diferencia de *H. concolor* (Cuadro 1.3). Todas presentan escasos cristales poligonales en el parénquima esponjoso. En las tres especies el tejido vascular está dispuesto en haces colaterales cerrados, aunque la cantidad de

los vasos del metaxilema y protoxilema varía un poco entre las especies. Se observa contenido citoplasmático en el floema en *Z. fosteri* y *H. concolor* principalmente (Cuadro 1.3).

**Escapo.** La cutícula del escapo es estriada en *Z. fosteri* y el híbrido y casi lisa en *H. concolor*. El grosor de la cutícula es muy similar en el híbrido y *H. concolor*, pero en *Z. fosteri* es más delgada (Fig. 1.3 a, e, i; Cuadro 1.3). La epidermis es simple, de forma rectangular en *Z. fosteri*, en el híbrido son rectangulares con las caras más cortas angulosas y en *H. concolor* son rectangulares con las caras más cortas redondeadas (Cuadro 1.2; Fig. 1.3). El tamaño de la epidermis varía poco, el híbrido presenta un tamaño intermedio (Cuadro 1.3). En las tres especies hay estomas.

El córtex es muy similar en todas las especies ya que después de la epidermis, se encuentra de tres a cinco capas de células de parénquima fotosintético, seguidas de ocho capas de células de parénquima no fotosintético de mayor tamaño con espacios intercelulares y finalmente de una a dos capas de células mucho más grandes y laxas con espacios intercelulares grandes e irregulares que al romperse forman una cavidad (Fig. 1.3 b y j). El tamaño del espacio medular interno y el diámetro externo del escapo es mucho mayor en *H. concolor*, en comparación con *Z. fosteri*, el híbrido presenta un tamaño intermedio (Cuadro 1.3). Se observan algunos rafidios distribuidos en el córtex.

El tejido vascular está dispuesto en haces colaterales cerrados y sólo varía la cantidad de vasos de meta y protoxilema. La cantidad de haces vasculares distribuidos alrededor de la cavidad varía poco entre las especies (Cuadro 1.3).

## **Bulbo**

**Catáfilas.** En las tres, las células de la epidermis adaxial y abaxial son rectangulares, simples y uniformes (Fig. 1.3 c, g y k; Cuadro 1.2). El número de vasos en meta y protoxilema de los haces vasculares varía poco entre las especies (Cuadro 1.3). Enseguida de la epidermis se encuentra un parénquima de reserva con amiloplastos y paquetes de rafidios (de oxalato de calcio), que forman capas continuas en *Z. fosteri* y discontinuas en *H. concolor* y el híbrido (Figura 1.3 c, h y k). La cantidad de almidón y los paquetes de rafidios disminuye gradualmente en las hojas que se encuentran más cercanas al tallo.

**Tallo.** Las tres especies tienen epidermis simple y el córtex se encuentra constituido por células de parénquima estructural delimitado hacia el centro por un tejido de células uniformes de orientación periclinal y de pared irregular. Los haces vasculares son colaterales y se encuentran formando un atactostele. En las tres especies los haces vasculares presentan orientación y distribución desorganizada en el centro del tallo, sin embargo el floema y el xilema pueden observarse con claridad, al igual que el meristemo de engrosamiento secundario (Figura 1.3 d, h y l). El tamaño de los haces vasculares es variable. El parénquima que rodea los haces vasculares presenta granos de almidón. En algunos cortes transversales se observa la estructura celular del escapo y hojas fotosintéticas en estados primarios de desarrollo.

**Cuadro 1.2.** Caracteres anatómicos cualitativos de la hoja y escapo de los tres taxa. Letras diferentes denotan diferencias.

	<b>Carácter</b>	<b><i>Z. fosteri</i></b>	<b><i>H. aff. concolor</i> (Híbrido)</b>	<b><i>H. concolor</i></b>
<b>HOJA</b>	1. Tipo de cutícula	Estriada <sup>a</sup>	Estriada <sup>a</sup>	Ligeramente estriada
	2. Costillas	Presente <sup>a</sup>	Ausente <sup>b</sup>	Ausente <sup>b</sup>
	3. Tipo de epidermis	Simple y uniforme	Simple y uniforme	Simple y uniforme
	4. Forma celular de la epidermis	Rectangular <sup>a</sup>	Rectangular <sup>a</sup> ; Angulosa <sup>b</sup>	Angulosa <sup>b</sup>
	5. Tipo de estomas de la epidermis	Anfiestomáticos	Anfiestomáticos	Anfiestomáticos
	6. Tipo de mesofilo	Bifacial equifaciado	Bifacial indiferenciado <sup>b</sup>	Bifacial indiferenciado <sup>b</sup>
	7. Forma de cavidades	Circular <sup>a</sup>	Irregular <sup>b</sup>	Ovalada <sup>c</sup>
	8. Tipo de haces vasculares	Colaterales cerrados	Colaterales cerrados	Colaterales cerrados
<b>ESCAPO</b>	10. Tipo de cutícula	Estriada <sup>a</sup>	Estriada <sup>a</sup>	Casi lisa <sup>b</sup>
	11. Tipo de epidermis	Simple y uniforme	Simple y uniforme	Simple y uniforme
	12. Forma celular de la epidermis	Rectangular <sup>a</sup>	Angulosa <sup>b</sup>	Redondeada <sup>c</sup>
	13. Estomas	Presentes	Presentes	Presentes
	14. Cristales	Presentes	Presentes	Presentes
	15. Tipo de haces vasculares	Colaterales cerrados	Colaterales cerrados	Colaterales cerrados
	16. Tipo de esclerénquima	Intravascular	Intravascular	Intravascular

En la comparación de los caracteres anatómicos cualitativos se observó que en la hoja los tres taxa presentaron el mismo tipo de epidermis y estomas, así como el mismo tipo de haces vasculares. En los demás caracteres de la hoja *Z. fosteri* y *H. concolor* fueron diferentes, mientras que el híbrido presentó similitud con las otras dos especies. En el escapo, los tres taxa fueron muy similares ya que únicamente presentaron diferencias en el tipo de cutícula y la forma celular de la epidermis (Cuadro 1.2).

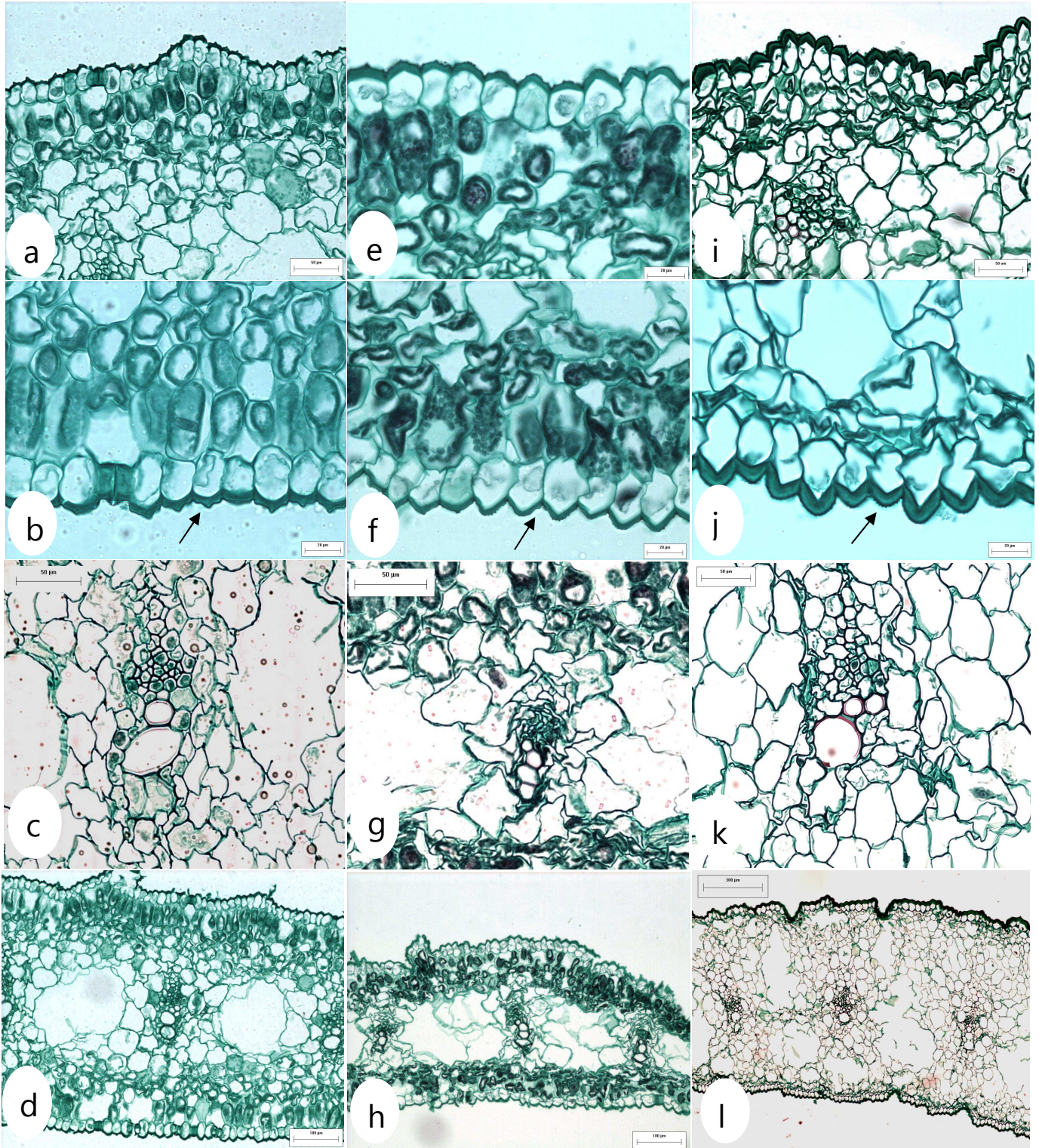
**Cuadro 1.3.** Caracteres anatómicos cuantitativos de la hoja y el escapo de las tres especies. Letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas. Prueba de Tukey.  $P \leq 0.001$ .

	<b>Carácter (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b><i>Z. fosteri</i></b>	<b><i>Híbrido</i></b>	<b><i>H. concolor</i></b>
<b>HOJA</b>	1. Espesor de la cutícula adaxial.	2.77±0.32 <sup>a</sup>	3.71±0.32 <sup>a</sup>	11.34±1.41 <sup>b</sup>
	2. Espesor de la cutícula abaxial.	2.59±0.30 <sup>a</sup>	3.48±0.21 <sup>b</sup>	8.10±0.67 <sup>c</sup>
	3. Espesor de la epidermis adaxial.	25.13±1.46 <sup>a</sup>	24.32±2.87 <sup>a</sup>	30.14±1.85 <sup>b</sup>
	4. Espesor de la epidermis abaxial.	25.59±1.16 <sup>a</sup>	25.95±1.88 <sup>a</sup>	32.49±1.45 <sup>b</sup>
	5. Espesor del parénquima en empalizada adaxial.	44.20±0.65 <sup>a</sup>	--- <sup>b</sup>	--- <sup>b</sup>
	6. Espesor del parénquima en empalizada abaxial.	55.41±0.58 <sup>a</sup>	--- <sup>b</sup>	--- <sup>b</sup>
	7. Espesor del parénquima esponjoso.	684.91±132.72 <sup>a</sup>	268.71±5.10 <sup>b</sup>	857.43±107.31 <sup>c</sup>
	8. Tamaño de las cavidades alto.	11.70±0.04 <sup>a</sup>	210.47±11.06 <sup>b</sup>	488.41±21.24 <sup>c</sup>
	9. Tamaño de las cavidades ancho.	12.23±0.42 <sup>a</sup>	128.39±24.71 <sup>b</sup>	418.29±29.05 <sup>c</sup>
	10. Tamaño del mesofilo.	784.53±132.16 <sup>a</sup>	268.71±5.10 <sup>b</sup>	857.43±107.31 <sup>a</sup>
	11. Vasos de xilema. (n)	2	1	2
	12. Vasos de protoxilema. (n)	2	3	3
<b>ESCAPO</b>	13. Espesor de la cutícula.	4.62±0.42 <sup>a</sup>	7.72±0.55 <sup>b</sup>	8.02±0.26 <sup>b</sup>
	14. Espesor de la epidermis.	32.12±3.46 <sup>a</sup>	33.75±2.24 <sup>a</sup>	35.20±2.89 <sup>a</sup>
	15. Tamaño del cortex.	551.46±41.10 <sup>a</sup>	636.71±69.93 <sup>b</sup>	661.77±55.17 <sup>b</sup>
	16. Espacio medular interno.	1274.23±65.10 <sup>a</sup>	1547.95±82.11 <sup>b</sup>	2215.19±117.52 <sup>c</sup>
	17. Diámetro externo.	2395.85±31.45 <sup>a</sup>	2994.26±115.91 <sup>b</sup>	3944.31±207.76 <sup>c</sup>
	18. Número de haces vasculares grandes. (n)	10	13	12
	19. Número de haces vasculares chicos. (n)	11	10	12

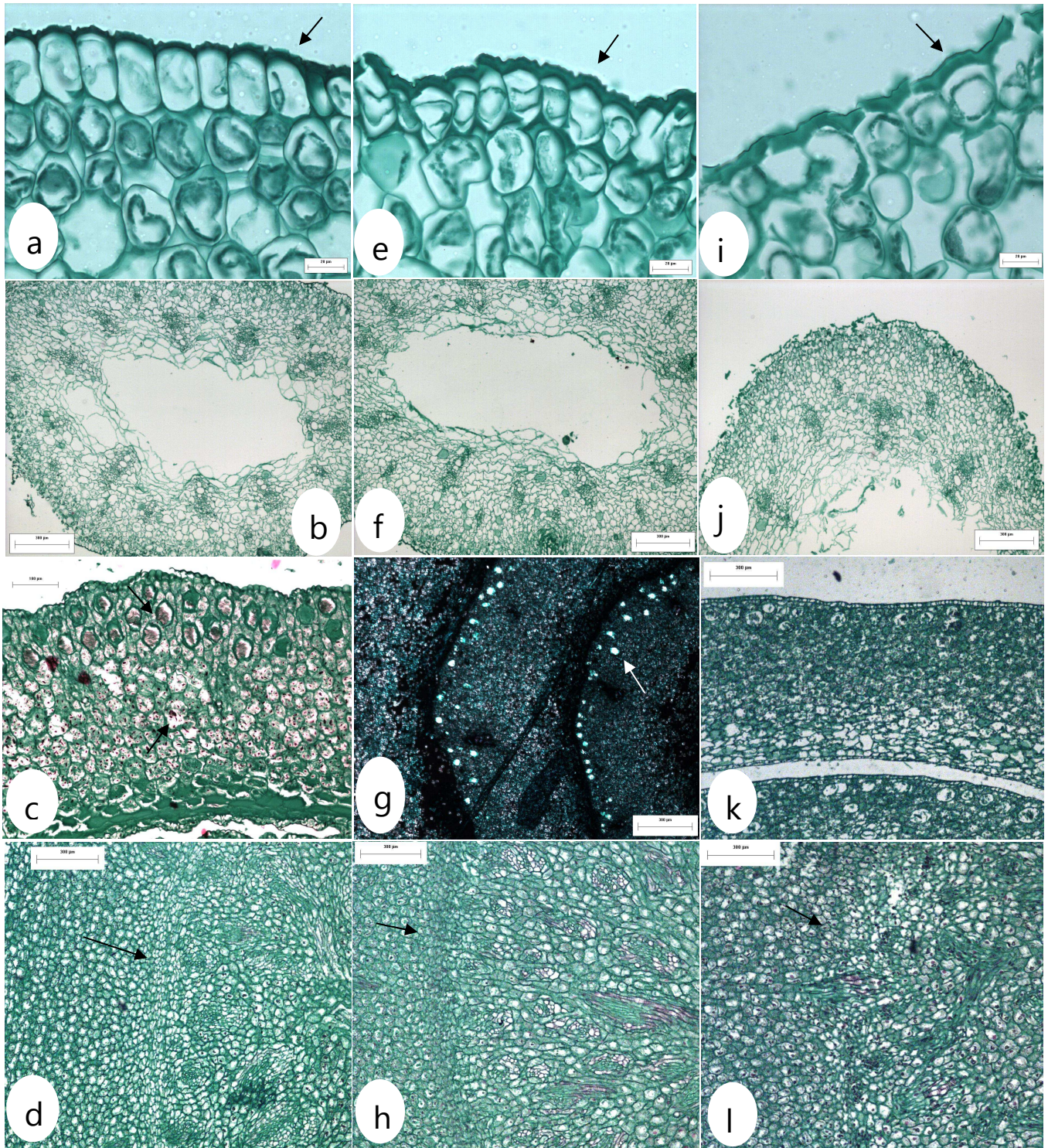
Los datos son el promedio  $\pm$  la desviación estándar para los caracteres de 1 a 10 y del 13 a 17 (n=25 x 3).

La moda para los caracteres 11 y 12 (n=15) y 18 y 19 (n=5). Ausente (---).

En la comparación de los caracteres anatómicos cualitativos se observó que en la hoja, los tres taxa presentaron diferencias estadísticamente significativas en la cutícula abaxial, el parénquima esponjoso y el tamaño de las cavidades. El híbrido y *Z. fosteri* no presentaron diferencias significativas en la cutícula adaxial y en ambas epidermis; mientras que entre el híbrido y *H. concolor*, no existieron diferencias en el parénquima en empalizada. En el escapo, los tres taxa presentaron diferencias estadísticamente significativas en el espacio medular interno y el diámetro externo. En el cuadro 1.3, se observó que *Z. fosteri* y *H. concolor* presentaron mayores diferencias estadísticas en la hoja y el escapo. Mientras que el híbrido presentó valores cuantitativos intermedios entre *Z. fosteri* y *H. concolor*.



**Figura 1.2.** Anatomía foliar. *Zephyranthes fosteri*, **a)** parénquima en empalizada; **b)** cutícula estriada y costilla; **c)** haz vascular; **d)** cavidades redondeadas. **Híbrido**, **e)** parénquima esponjoso; **f)** cutícula lisa y delgada; **g)** haz vascular; **h)** cavidades amorfas. *Habranthus concolor*, **i)** parénquima esponjoso; **j)** cutícula lisa y gruesa; **k)** haz vascular; **l)** cavidades ovaladas. Escalas: B, E, F y J a 20 µm; A, C, G, I y K a 50 µm; D y H a 100 µm; L a 300 µm.



**Figura 1.3** Anatomía del escapo, hojas catáfilas y tallo. Cortes transversales. ***Zephyranthes fosteri***, **a**) cutícula estriada del escapo, **b**) córtex y espacio medular del escapo, **c**) paquete de rafidios (flecha) y amiloplastos en catáfilas, **d**) tallo, meristemo de engrosamiento (flecha). **Híbrido**, **e**) cutícula gruesa y estriada del escapo **f**) córtex y espacio medular del escapo **g**) paquete de rafidios en catáfilas con luz polarizada, **h**) tallo, meristemo de engrosamiento (flecha). ***Habranthus concolor***, **i**) cutícula gruesa y lisa del escapo, **j**) córtex y espacio medular del escapo, **k**) hojas catáfilas, **l**) tallo, meristemo de engrosamiento (flecha). Escalas: A, E, I a 20  $\mu\text{m}$ ; C a 100  $\mu\text{m}$ ; B, D, F, G, H, J, K y L a 300  $\mu\text{m}$ .

## Discusión

### ***Diferencias entre Zephyranthes fosteri y Habranthus concolor***

Las principales diferencias estructurales entre *Z. fosteri* y *H. concolor* se detectaron en el mesofilo y la epidermis de las hojas, las cuales tienen valor taxonómico (Arroyo y Cutler, 1984; Alves-Araújo y Alves, 2005). El rasgo más distintivo de ambas especies se encontró en el mesofilo. *Habranthus concolor* sólo presentó parénquima esponjoso. *Zephyranthes fosteri* presentó tanto parénquima esponjoso, como en empalizada. El tipo de parénquima del mesofilo es un carácter de importancia taxonómica, utilizado previamente en trabajos anatómicos para diferenciar a las especies de distintos géneros en las Amaryllidaceae (Arroyo y Cutler, 1984; Alves-Araújo y Alves, 2005). En el estudio de Arroyo y Cutler (1984) en el que se realizó un amplio estudio anatómico de especies de Amaryllidaceae con fines taxonómicos, se reportó que de tres especies estudiadas de *Habranthus*, dos de ellas (*H. andersonii* y *H. robusta*) no presentaron parénquima en empalizada al igual que *H. concolor*, pero *H. teretifolia* sí lo presentó, al igual que *H. sylvaticus* (Alves-Araújo y Alves, 2005). Por otro lado, Arroyo y Cutler, (1984) reportaron que tres (*Z. candida*, *Z. citrina* y *Z. filifolia*) de diez especies estudiadas de *Zephyranthes* presentaron parénquima en empalizada en ambas caras y las otras lo presentaron únicamente en la cara adaxial. Es por ello, que a pesar de que el parénquima en empalizada tiene importancia taxonómica para diferenciar géneros en las Amaryllidaceae, puede haber variación entre las especies de un mismo género como se reportó en los estudios antes mencionados; sin embargo, en este trabajo dicha característica fue útil para diferenciar y caracterizar a ambas especies. En ese sentido, en un estudio cladístico de la familia Amaryllidaceae realizado con base en marcadores moleculares (Meerow *et al.*, 2000), se hace



mención que la ausencia del parénquima en empalizada es una característica apomórfica (avanzada) de importancia para la familia, lo cual sugiere que probablemente *H. concolor* podría ser más tardíamente divergente que *Z. fosteri*.

*Zephyranthes fosteri* también se caracterizó por presentar en la hoja una cutícula estriada con costillas centrales y una forma rectangular en las células epidérmicas. En *H. concolor* la cutícula fue casi lisa, no presentó costillas centrales y la forma celular de la epidermis fue angulosa. La cutícula y sus ornamentos, así como la epidermis, también han tenido valor taxonómico en varios grupos de Amaryllidaceae (Arroyo y Cutler, 1984; Awasthi *et al.*, 1984; Meerow *et al.*, 1989; Raymunde *et al.*, 2000; Alves-Araújo y Alves, 2005); sin embargo, en dichos estudios se reportan características de la cutícula y epidermis de especies de *Zephyranthes* y *Habranthus*, observadas con microscopía electrónica y otros desde un análisis paradérmico, cuyas técnicas son diferentes a las empleadas en este trabajo, no obstante las diferencias descubiertas en la cutícula y epidermis de *Z. fosteri* y *H. concolor* fueron suficientes para distinguirse cada una.

Por último, se observó que mientras *Z. fosteri* presentó cavidades circulares en el mesófilo de la hoja, en *H. concolor* las cavidades fueron ovaladas. La presencia de cavidades en el mesófilo es una característica que ha sido descrita para algunas especies de Amaryllidaceae la cual es compartida con otras familias (Meerow *et al.*, 2000; Alves-Araújo y Alves, 2005). En las especies de este trabajo se observaron formas y tamaños distintos para cada taxón que fueron útiles para diferenciar a las especies.

*El híbrido.* El carácter intermedio que presentó el híbrido con las especies supuestamente parentales fue muy relevante, ya que en los caracteres cualitativos de la hoja, el híbrido

compartió rasgos con ambas especies en igual proporción. El híbrido presentó una cutícula estriada y células de la epidermis rectangulares en la hoja al igual que *Z. fosteri*. Por otro lado, presentó células angulosas en la epidermis, ausencia de costillas en la cutícula y parénquima en empalizada al igual que *H. concolor* y el único carácter exclusivo para el híbrido fue la forma irregular de las cavidades. En el análisis de los caracteres cualitativos el híbrido también mostró valores intermedios entre ambas especies, principalmente en el espesor del parénquima esponjoso, el tamaño de las cavidades, el espacio medular y el diámetro del escapo (Cuadro 1.3). También se observó que en el mesofilo del híbrido habían algunas células de parénquima en empalizada sólo en la cara abaxial, pero debido a que no fueron constantes ni homogéneas, no pudo asegurarse que el tejido se tratara propiamente de parénquima en empalizada, por lo que es probable que se trate de una aparente transición o una característica intermedia entre la presencia y ausencia de dicho parénquima en los progenitores.

Según Flagg y Smith (2009), la posibilidad de hibridación es común en especies de *Zephyranthes*, ya que se ha observado que especies de este género podrían estar hibridando con especies del género *Cooperia*, lo cual es considerado por dichos autores como un mecanismo de especiación. Es por ello que la hibridación entre especies de *Zephyranthes* y *Habranthus* no se descarta, ya que en el campo se observan ejemplares con características morfológicas intermedias entre ambos géneros (Aarón Rodríguez, com. pers.).

Existen características morfológicas que diferencian al género *Zephyranthes* de *Habranthus*, apoyados por los escasos reportes que existen de dichos géneros a nivel estructural, por lo que la propuesta de la existencia de un híbrido con base en las características morfológicas

intermedias, en conjunto con las características anatómicas intermedias observadas en este trabajo, apoyan claramente el reconocimiento de que *H. aff. concolor* puede ser un híbrido, lo cual tendría que ser corroborado por estudios genéticos.

Finalmente, las dos especies y el híbrido presentaron un arreglo celular semejante en las catáfilas, el tallo y el escapo. Las catáfilas externas presentaron en la cara adaxial paquetes de rafidios (cristales de oxalato de calcio) y células de almacenamiento con amiloplastos (Figs. 1.3 c, g y k). Los amiloplastos son de gran importancia en los órganos de almacenamiento como los bulbos, ya que se ha reportado que incrementan las propiedades de retención de líquidos (Arroyo y Cutler, 1984; Alves-Araújo y Alves, 2005), lo cual es de gran importancia para la supervivencia y mantenimiento de este tipo de plantas que son perennes y florecen una vez al año mientras que el bulbo queda en latencia fuera del periodo de floración y de producción de hojas. Las catáfilas que cubren al tallo forman un bulbo, el cual se encuentra en contacto con el medio subterráneo expuesto a una gran cantidad de organismos que pueden depredarlo, por lo que es probable que los abundantes paquetes de rafidios, en conjunto con los alcaloides que producen, sean mecanismos de defensa contra depredadores de estas plantas (Bastida *et al.*, 2006). La presencia bien delimitada del meristemo de engrosamiento en el tallo de los tres taxa, permitió localizar con precisión la zona de formación de haces vasculares necesarios para afrontar el incremento del tamaño del tallo (Fig. 1.3 d, h y l). Por otro lado, el abundante contenido citoplasmático observado en el floema de las hojas sugiere que este tejido está en gran actividad para transportar sustancias provenientes de la fotosíntesis las cuales son de vital importancia fisiológica para la planta (Fig. 1.2 c, g y k).

## Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos, se concluye que:

1. Las diferencias estructurales en *H. concolor* y *Z. fosteri*, en la epidermis y el mesofilo (parénquima en empalizada y cavidades) así como las diferencias en los caracteres cualitativos proporcionaron en conjunto, suficientes elementos para contribuir a su caracterización y diferenciación anatómica como especies pertenecientes a géneros distintos.
2. *Habranthus aff. concolor* presentó una estructura interna intermedia entre las especies supuestamente parentales que en conjunto con las evidencias morfológicas reportadas previamente, se apoya la propuesta de que se trata de un híbrido.

## Literatura citada

Alvarado-Cárdenas, L. y García-Mendoza, A. 2008. Una especie nueva de *Habranthus* (Amaryllidaceae, Hippeastreae) para la flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Novon* 18: 283-238.

Alves-Araújo, A. y Alves, M. 2005. Anatomical features of three species of Amaryllidaceae from North-Eastern Brazil. *Herbertia* 59: 94-106.

Andrés- Hernández, A. y Terrazas, T. 2006. Anatomía foliar y del pecíolo de especies del género *Rhus* s. str. (Anacardiaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 78: 95-106.

Arroyo, S. 1981. Systematic anatomical studies on Amaryllidaceae. Tesis de Doctorado. Universidad de Reading. Reading, Berkshire.

Arroyo, S. y Cutler, D. 1984. Evolutionary and taxonomic aspects of the internal morphology in Amaryllidaceae from south America and southern Africa. *Kew Bulletin* 39: 467-498.

Bailey, L. 1977. Manual of cultivated plants. Macmillan. Nueva York.

Bass, P y L. F. 1978. Inheritance of foliar and nodal anatomical characters in some *Ilex* hybrids. *Botanical Journal of the Linnean Society* 77: 41-52.

Bastida, J., Lavilla, R. y Viladomat, F. 2006. Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. *The Alkaloids: Chemistry and Biology* 63: 87-179.

Calderón, G. y Rzedowski, J. 2005. Flora fanerogámica del Valle de México. Co-edición entre el Instituto de Ecología, A. C. y la Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán.

Cano-Santana, Z., Castillo-Argüero, S., Martínez-Orea, Y. y Juárez-Orozco, S. 2008. Análisis de la riqueza vegetal y el valor de conservación de tres áreas incorporadas a la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, Distrito Federal (México). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 82: 1-14.

Castillo-Argüero, S., Montes-Cartas, G., Romero-Romero, M., Martínez-Orea, Y., Guadarrama-Chávez, P., Sánchez-Gallén, I. y Núñez-Castillo O. 2004. Dinámica y conservación de la flora del matorral xerófilo de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (D.F. México). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 74: 51-75.

Damián-Domínguez, M., Cano-Santana, Z. y Castellanos-Vargas, I. 2009. Fenología reproductiva de *Habranthus concolor* y *H. aff. concolor* (Amaryllidaceae) y su relación con la lluvia. En: Lot, A. y Cano-Santana, Z. Eds. Biodiversidad del ecosistema del Pedregal de San Ángel. Coordinación de la Investigación Científica y Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel. Ciudad de México. Pp. 319-328.

Damián-Domínguez, M. de J. 2010. Fenología reproductiva de *Habranthus concolor* y *Habranthus aff. concolor* en la reserva ecológica del Pedregal de San Ángel, D. F. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.

Dickison, W. C. 1989. Step toward the natural system of the dicotyledons: vegetative anatomy. *Aliso* 12: 555-566.

Díaz, Z., Andrés, C., Viruel, J. y Cabrera, A. 2009. The alloyploid origin of *Narcissus obsoletus* (Alliaceae): identification of parental genomes by karyotype characterization and genomic *in situ* hybridization. *Botanical Journal of the Linnean Society* 159: 477-498.

Ellenbecker, M. 1975. Geographical distribution of the Amaryllidaceae. *Plant Life* 31: 37-39.

Fernández-Alonso, J. y Groenendijk, J. 2004. A new species of *Zephyranthes* Herb. s.l. (Amaryllidaceae, Hippeastreae), with notes on the genus in Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas* 28: 177-186.

Flagg, R. y Smith, G. 2009. A new mexican *Habranthus* (Amaryllidaceae) and a key to the *Habranthus* of México and Southwestern USA. *Herbertia* 63: 174-180.

Harrison, R. 1993. Hybrids and hybrid zones: historical perspective. En: Harrison, R. Ed. Hybrid zones and the evolutionary process. Oxford University press. Nueva York. Pp-3-12.

Howard, T. 1996. Two new Mexican *Habranthus* species and a review of the Mexican *Habranthus*. *Herbertia* 51: 42-48.

Jensen, W. 1962. Botanical histochemistry: principles and practice. W. H. Freeman. Ed. San Francisco.

Meerow, A. 1989. A monograph of the Amazon lilies, *Eucharis* and *Caliphruria* (Amaryllidaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 76: 136-220.

Meerow, A. y Snijman, D. 1998. Amaryllidaceae. En: Kubitzki, K., Huber, H., Rudall, P., Stevens, P. y Stützel, T. The families and genera of vascular plants. Vol. III. Flowering plants, Monocotyledons: Liliales (except Orchidaceae). Springer. Hamburgo. Pp. 83-110.

Meerow, A. W., Guy, C. L., Li, Q. B. y Yang, S. L. 2000. Phylogeny of the American Amaryllidaceae based on nrDNA ITS sequences. *Systematic Botany* 25: 708-726.

Oliveira, R. S. y Sano, P. T. 2009. Two new species of *Habranthus* (Amaryllidaceae) from the Espinhaco Range, Brazil. *Kew Bulletin* 64: 537-541.

Souza, O. R. 2006. Flora de Cadeia do Espinhaco: *Zephyranthes* Herb. & *Habranthus* Herb. (Amaryllidaceae). Tesis de maestría. Instituto de Biociencias da Universidade de Sao Paulo. Sao Paulo.

Raymunde, M., Xena, N. y Escala, M., 2000. Estudios morfoanatómicos foliares en especies del género *Hymenocallis* Salib. (Amaryllidaceae) presentes en Venezuela: relación entre los caracteres morfoanatómicos foliares y el ambiente en el que se desarrollan las plantas. *Acta Botánica Venezuelica* 23: 69-87.

Rieseberg, L. y Ellstrand, N. 1993. What can morphological and molecular markers tell us about plant hybridization? *Critical Reviews in Plant Science* 12: 213-241.

Tovar-Sánchez, E. y Oyama, K. 2004. Natural hybridization and hybrid zones between *Quercus crassifolia* and *Quercus crassipes* (Fagaceae) in México: morphological and molecular evidence. *American Journal of Botany* 91: 1352-1363.

## CAPÍTULO 2

---

### **Alcaloides y actividad biológica de *Zephyranthes fosteri*, *Habranthus concolor* y *H. aff. concolor* (Amaryllidaceae)**

#### **Resumen**

Las especies de la familia Amaryllidaceae son ampliamente conocidas por la actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa de algunos de sus alcaloides como la galantamina. En este trabajo se describe el contenido de alcaloides presentes en los extractos metanólicos y fracciones alcaloideas de diferentes partes de la planta principalmente hojas y bulbos de *Z. fosteri*, *H. concolor* y el posible híbrido entre ambas especies, *H. aff. concolor* distribuidas en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA). Dicho análisis se llevó a cabo por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los resultados revelaron que los tres taxa presentaron una composición química diferente. Los alcaloides mayoritarios de *Z. fosteri* fueron la licorina y un alcaloide desconocido de  $m/z$  189 (261), el cual fue identificado por RMNH como 3'-demetoximesembranol. En el caso de *H. concolor* los alcaloides mayoritarios fueron la galantamina y la clidantina. *Habranthus aff. concolor* presentó principalmente licorina y un alcaloide desconocido de  $m/z$  175 (247). La mayor actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa en los extractos metanólicos de los bulbos, la presentó *Z. fosteri*, seguida por *H. concolor* y por último *H. aff. concolor*. La fracción alcaloidea de las hojas de *H. concolor* fue por mucho, más potente que las de *Z. fosteri* y *H. aff. concolor*. El alcaloide 3'-demetoximesembranol presentó una actividad menor al hidrobromuro de galantamina, la cual es la forma farmacéutica de la galantamina.

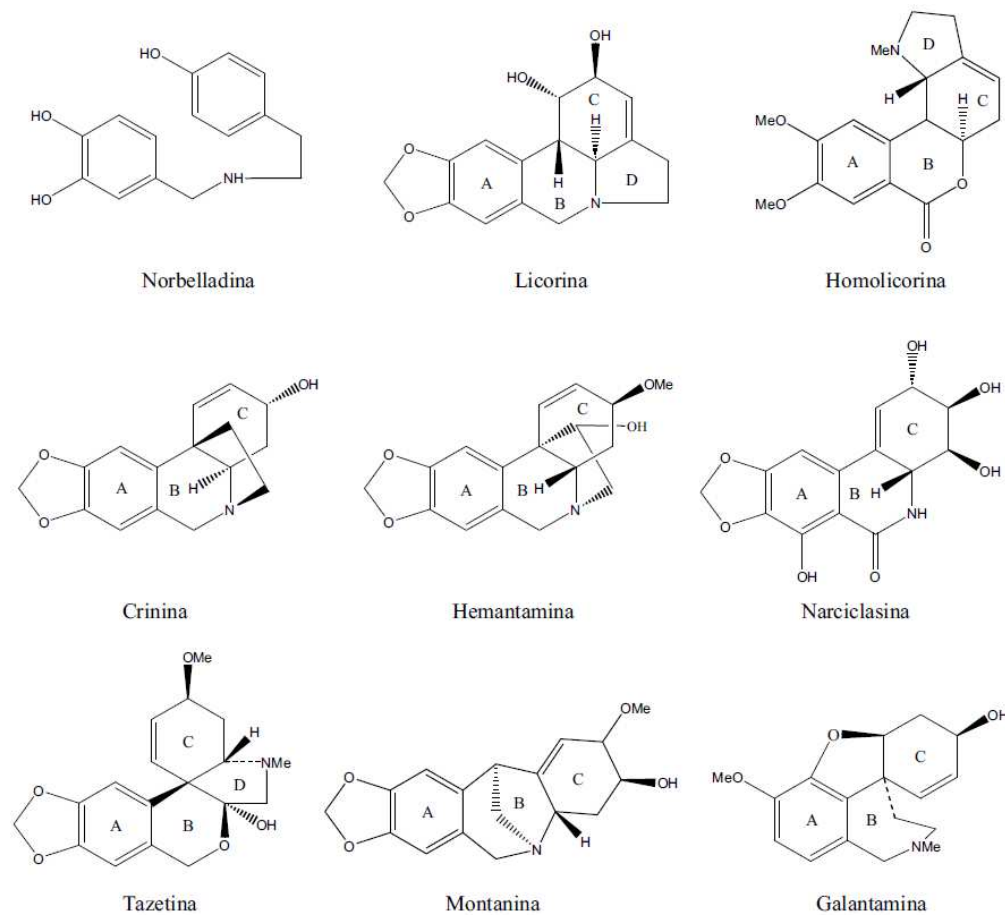


## Introducción

La familia Amaryllidaceae es conocida por su valor ornamental, pero también por la importancia farmacológica de los alcaloides que contiene, como la galantamina, el cual se emplea en el tratamiento sintomático de la enfermedad de Alzheimer (EA) (López *et al.*, 2002). Dichos alcaloides se caracterizan por ser exclusivos de esta familia, particularmente de la subfamilia Amaryllidoideae, lo cual les confiere valor quimiotaxonómico. Estos son clasificados con base en el sistema heterocíclico que presentan en los tipos: norbelladina, licorina, homolicorina, crinina, hemantamina, tazetina, montanina, narciclasina y galantamina (Herrera, 2001); (Fig. 2.1). Algunas de las características principales de los alcaloides de la familia son las siguientes (Jeffer, 1981):

- a) Poseen una estructura base C6-C1, la cual deriva de la L-fenilalanina, así como N-C2-C6 que derivada de la L-tirosina.
- b) Son bases moderadamente débiles con un pKa entre 6 y 9.
- c) Contienen un solo átomo de nitrógeno que puede ser secundario, terciario o incluso cuaternario, y generalmente el número de átomos de carbono oscila entre 16 y 20.

Es inusual encontrar otro tipo de alcaloides en especies de esta familia, aunque se han reportado algunos alcaloides tipo mesembrano, que son característicos de las Aizoaceae (Bastida *et al.*, 1989; Pigni *et al.*, 2013).



**Figura 2.1.** Esqueletos de los alcaloides de Amaryllidaceae

La galantamina es el alcaloide más importante de las Amaryllidaceae desde el punto de vista médico, puesto que se emplea en la formulación de medicamentos para el tratamiento de la E.A (López *et al.*, 2002). Dicha enfermedad se caracteriza por ser un trastorno neurológico degenerativo y progresivo que resulta en el deterioro de la memoria y el comportamiento (Ingkaninan *et al.*, 2003) debido a la pérdida progresiva y constante de acetilcolina, neurotransmisor sináptico involucrado en el aprendizaje, la memoria, el pensamiento y el proceso de formación de recuerdos (Aso, 2005). Los datos epidemiológicos indican que existe una tendencia en el incremento de la enfermedad a nivel mundial en las próximas dos décadas (Johnson *et al.*, 2000).

La mayoría de las estrategias para el tratamiento de la EA se han basado en la llamada “Hipótesis colinérgica” que postula que el deterioro de la memoria en pacientes con esta enfermedad es resultado del déficit de la función colinérgica en el cerebro. Por tanto, una vía terapéutica para el tratamiento de la EA es contrarrestar administrando inhibidores de la acetilcolinesterasa (Perry, 1986; Bartus *et al.*, 1982), los cuales aunque no curan, ni previenen la enfermedad, estabilizan la cantidad de acetilcolina en la sinapsis de la corteza cerebral al impedir su hidrólisis (Mosquera *et al.*, 2004). En este campo se han logrado los mayores avances terapéuticos en el tratamiento de la EA (Sramek *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2003). La galantamina es un inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa, por lo que puede restaurar los niveles de acetilcolina en el cerebro (Bartolucci *et al.*, 2001; López *et al.*, 2002; Berkov *et al.*, 2007). La galantamina es extraída en Bulgaria comercialmente a partir de *Galanthus nivalis* y *Leucojum aestivum* para formular medicamentos (Razadyne® y Reminyl®) que son usados para tratar síntomas leves a moderados de la EA, aunque además, se obtiene por síntesis química (Berkov *et al.*, 2007).

Por otro lado, se ha reportado que otros alcaloides obtenidos de esta familia, como la licorina, trisfaeredina, hemantamina y homolicorina pueden inhibir la replicación del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) *in vitro* (Szlávik *et al.*, 2004). La transdihidronarciclasina obtenidos de *Z. candida* y la pancratistatina de *Z. grandiflora* también han mostrado propiedades antineoplásicas (Pettit *et al.*, 1984, 1990). Finalmente, otros alcaloides han presentado actividad antiprotozoaria potente contra *Leishmania donovani*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* y *T. brucei rhodesiense* (Herrera, 2001).

En la REPSA situada en Ciudad Universitaria de la UNAM, se encuentran *Z. fosteri*, *H. concolor* y *H. aff. concolor*, esta propuesta como un híbrido debido a que presenta una morfología intermedia entre ambas especies (Castillo-Argüero *et al.*, 2004; Cano-Santana *et al.*, 2008; Damián-Domínguez *et al.*, 2009; Damián-Domínguez, 2010). En el capítulo anterior, referente al estudio anatómico de *Z. fosteri*, *H. concolor* y *H. aff. concolor* se describió que los tres taxones presentaron diferencias histológicas, principalmente en la hoja. Estos resultados apoyaron la hipótesis de que *H. aff. concolor* es un híbrido y revelaron que existe mayor similitud en el arreglo estructural del híbrido con *Z. fosteri*.

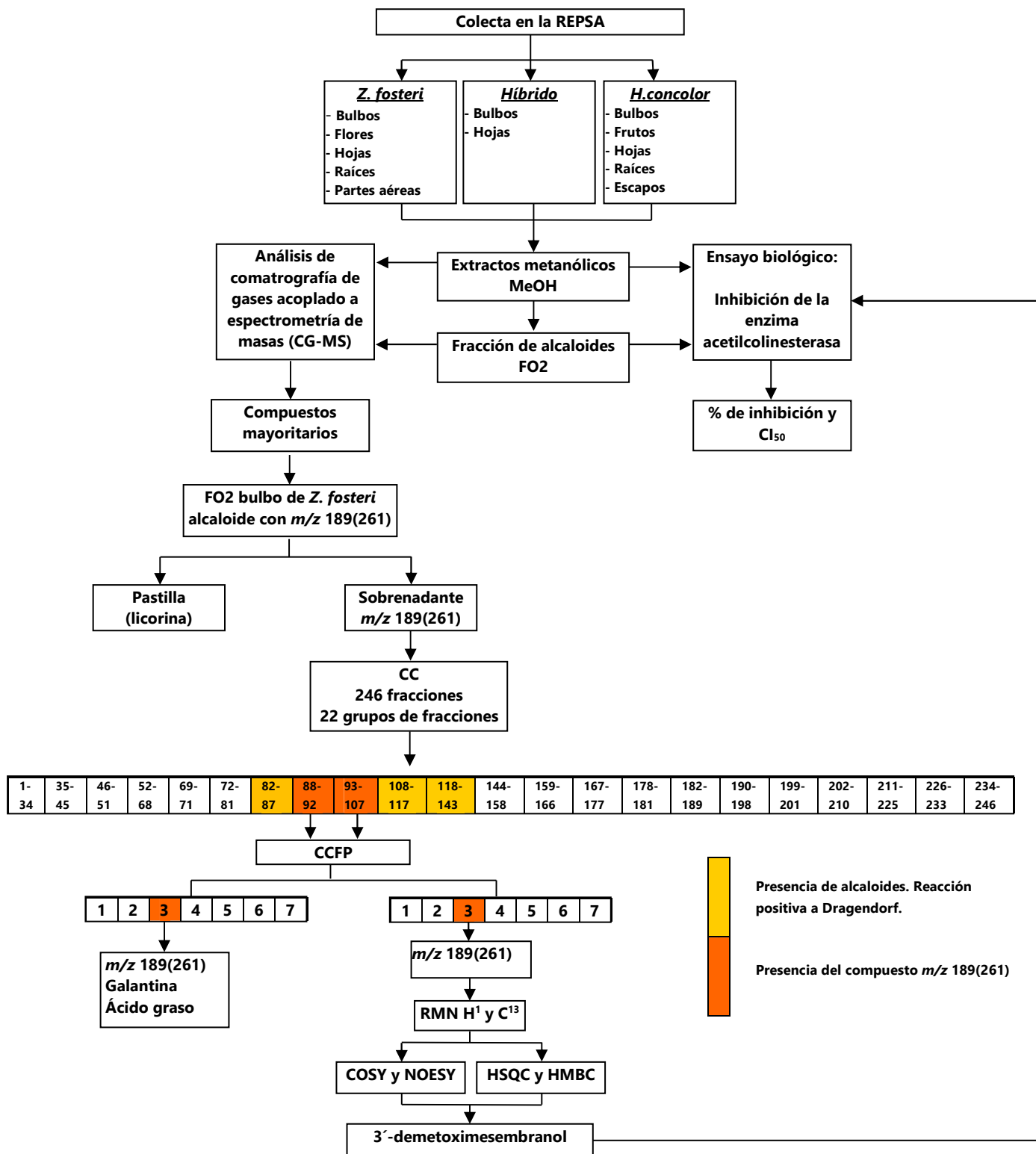
El objetivo del presente capítulo fue conocer y comparar el contenido de alcaloides de los tres taxa y evaluar la posible actividad inhibitoria de los extractos, fracciones alcaloideas y compuestos sobre la acetilcolinesterasa. Actualmente sólo existen estudios químicos para *Z. concolor* (Berkov *et al.*, 2008; Reyes Chilpa *et al.*, 2011), el cual de acuerdo a las evidencias morfológicas (Damián-Domínguez *et al.*, 2009; Damián-Domínguez, 2010; A. García y A. Rodríguez, com. pers.) y anatómicas presentadas en este trabajo (Capítulo 1) debe ser considerado como *H. concolor*. De esta especie se han aislado alcaloides como la galantamina, clidantina, sanguinina, licorina, epinorgalantamina, galantamina N-óxido y narwedina (Berkov *et al.*, 2008; Reyes-Chilpa *et al.*, 2011). Sin embargo, a la fecha no se ha estudiado químicamente a *Z. fosteri*, tampoco el posible híbrido y se ignora si sus extractos podrían tener actividad sobre la acetilcolinesterasa.



## **Materiales y métodos**

**Sitio de estudio.** Se realizaron colectas de *Z. fosteri*, *H. concolor* y *H. aff. concolor* en zonas de amortiguamiento de la REPSA, ubicada en el campus de Ciudad Universitaria de la UNAM. Las colectas de cada especie se realizaron entre los meses de mayo y junio en 2009, 2010 y 2011. El material botánico fue identificado por la Dra. Nelly Diego y los ejemplares de herbario fueron depositados en el Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), a cargo de la M. en C. Abigail Aguilar.

**Preparación de los extractos metanólicos.** En el caso de la colecta de *Z. fosteri* efectuada en 2010 se procesaron los bulbos y las partes aéreas que incluyeron frutos verdes, frutos con semillas, hojas, flores y escapos. La colecta efectuada en 2011 se estudiaron por separado las hojas, flores, raíces. De *H. concolor*, se estudiaron los bulbos, raíces, escapos, frutos y semillas. Del híbrido, las hojas y bulbos. Los órganos frescos se cortaron en pedazos pequeños y se pusieron a secar dentro del invernadero del Instituto de Química por varias semanas. Se trituraron con un molino mecánico y se maceraron en metanol (MeOH) tres veces, una por semana a temperatura ambiente. Los extractos obtenidos fueron concentrados a presión reducida en un rotavapor para eliminar el disolvente. Los extractos permanecieron en una cámara de vacío para secarlos completamente (Fig. 2.2).

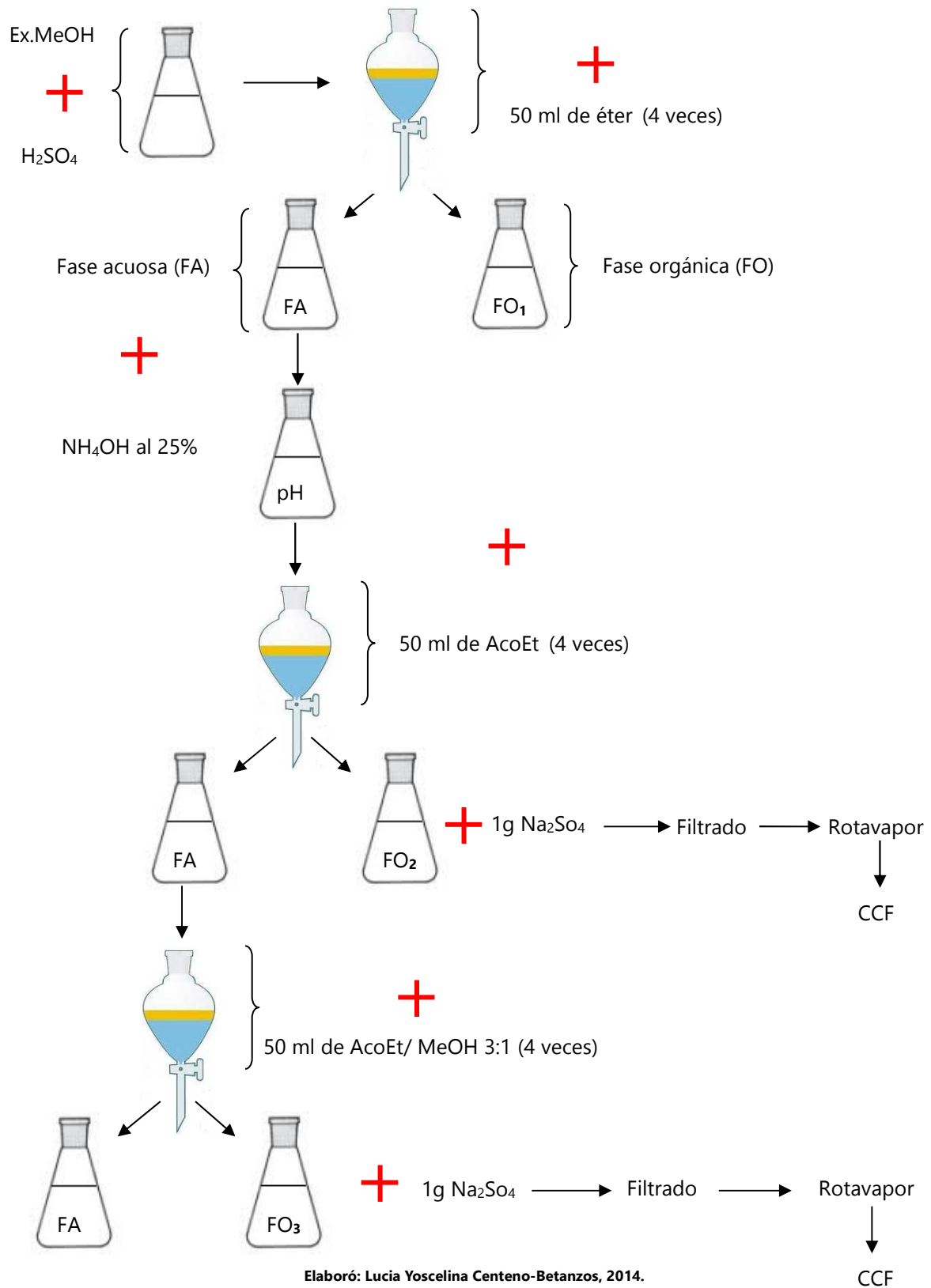
Figura 2.2. Resumen metodológico.



 Presencia de alcaloides. Reacción positiva a Dragendorf.  
 Presencia del compuesto m/z 189(261)

**Fracción alcaloidea.** Con el objeto de contar con una fracción rica en alcaloides, los extractos se sometieron a una extracción ácido-base como se describe a continuación (Fig. 2.3). Para la mayoría de las muestras, para las cuales la cantidad era muy reducida, se pesó una cantidad aproximada de 500 mg del extracto MeOH, se agregaron 2.5 ml de ácido sulfúrico al 25% y se trataron en un baño de ultrasonido por 10 m. El proceso se repitió dos veces. A la solución ácida se les agregó 5 ml de éter en un tubo de vidrio con tapón y se agitaron con un vortex. Después de la agitación se formaron dos fases, la inferior se denominó fase acuosa (FA1) y la superior fase orgánica (FO1), ésta se recogió con una micropipeta y posteriormente se le agregaron 5 ml de éter. El proceso de extracción se realizó repetidas veces hasta que FO1 quedó transparente. Con este proceso, en la fase orgánica se extrajeron las sustancias neutras como clorofilas y compuestos apolares. A la FA1 se le agregó 1 ml de amoníaco hasta alcalinizar el pH de 9 a 10 y enseguida se le agregaron 5 ml de acetato de etilo (AcOEt), se agitó en vortex obteniendo nuevamente dos fases. La fase orgánica (superior) fue denominada FO2 y fue la que contuvo la mayor cantidad de alcaloides. El proceso se repitió exhaustivamente. Finalmente a la fase acuosa restante (inferior) denominada FA2, se le agregaron 5 ml de una mezcla de AcOEt/MeOH (3:1) siguiendo el mismo procedimiento para la obtención de la FO3, esto con el objetivo de extraer los alcaloides que no hubieran sido extraídos en la FO2. El proceso se repitió exhaustivamente. Durante todo el proceso, se monitoreo la extracción de alcaloides mediante cromatografía de capa fina (CCF) empleando el reactivo de Dragendorff (Fig. 2.3).

**Figura 2.3.** Método para la obtención de la fracción de alcaloides (FO2 y FO3).





En el caso de la fracción alcaloidea de los bulbos de *H. concolor*, se aplicó el método descrito anteriormente con algunas modificaciones. Se pesaron 5 g del extracto de MeOH y se disolvió con 100 ml de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) al 5%. La solución ácida, se vertió en un embudo de separación y se extrajo cuatro veces con 50 ml de diclorometano en vez de éter etílico obteniendo 200 ml de la FO1. A los 100 ml de la FA, se le agregaron 100 ml de hidróxido de amonio ( $NH_4OH$ ) al 25% en porciones de 5ml hasta elevar su pH a 9 o 10. La solución basificada nuevamente se vertió en un embudo de separación y se extrajo cuatro veces con 50 ml de AcOEt para obtener la FO2 (200 ml). A ésta se le agregó sulfato de sodio ( $Na_2 SO_4$ ), se filtró y se concentró en rotavapor. Finalmente la FA2 (100 ml) nuevamente se vertió en un embudo de separación y se extrajo cuatro veces con 50 ml de una mezcla de MeOH/AcOEt 1:1 obteniendo la FO3 la cual fue procesada de la misma forma que la FO2.

**Análisis por cromatografía de capa fina (CCF).** Los extractos se analizaron por CCF empleando cromatofolios de sílica gel 60F 254 60/15  $\mu m$  de 20 x 20 cm de tamaño y de 0.25 mm (Merck) y de 0.2 mm (Votre Partenaire Chimie) de espesor. Se aplicaron 5  $\mu l$  de los extractos con ayuda de un capilar graduado. La fase móvil fue diferente dependiendo de la muestra, pero la más usada fue una mezcla de AcOEt-MeOH (3:1). Como reveladores se utilizó la luz UV en onda corta (254 nm) y onda larga (365 nm), así como una solución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2 N y Dragendorff para la detección específica de alcaloides. El reactivo Dragendorff se preparó mezclando partes iguales de la solución A y B. Solución A: 0.85 g nitrato básico de bismuto, 10.0 ml de ácido acético glacial y 40.0 ml de agua destilada. Solución B: 10.0 g de yoduro de potasio y 40 ml de agua destilada.

### ***Análisis del perfil de alcaloides por cromatografía de gases-espectrometría de masas***

**(CG-EM).** El análisis de CG-MS de los extractos metanólicos y las fracciones alcaloidales (FO2 y FO3) se realizó en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (CG-EM Agilent 6890 + MSD 5975) con inyección directa de la muestra, operando en modalidad de energía de ionización a 70 eV por impacto electrónico. Se usó una columna HP-5 MS (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ ). La temperatura programada fue de 100-180°C cada 15°C  $\text{min}^{-1}$ , y por 1 min se mantuvo a 180°C. Luego se alcanzó la temperatura de 180-300°C cada 5°C  $\text{min}^{-1}$  y por 1 min se mantuvo a 300°C. La temperatura de inyección fue a los 280°C. La velocidad de flujo del gas acarreador (Helio) fue de 0.8  $\text{ml min}^{-1}$ . La relación del split fue de 1:20. Se usó una mezcla de hidrocarburos (C9- C36, Restek, cat No. 31614) para realizar la calibración del índice de retención (IR).

Los cromatogramas y espectros de masas fueron analizados usando el software AMDIS 2.64 (NIST). La proporción de cada compuesto en la fracción de alcaloides es reportada como un porcentaje del total de alcaloides. Este dato no expresa la cantidad real, sin embargo puede ser usado para comparar la cantidad relativa de cada componente. Para cada extracto se obtuvo un cromatograma, para cada pico se registró su tiempo de retención (TR) y se calculó su índice de retención (IR) mediante el programa AMDIS analyze. Este valor es característico de cada compuesto. Adicionalmente, cada pico fue identificado con base en su espectro de masas por medio del programa y base de datos AMDIS analyze y Search NIST Library. Los compuestos que no fueron identificados por las bases de datos, se les denominó con base en los picos principales de su espectro de masas, indicando su relación masa/carga ( $m/z$ ), asumiendo que son alcaloides aquellos que presentaron ión molecular ( $M^+$ ) impar (por la presencia de

nitrógeno) y por encontrarse en el cromatograma en el rango de tiempos e índices de retención característicos de los alcaloides. Por ejemplo para el compuesto desconocido denominado  $m/z$  189 (261), indica que tiene un pico base de 189 y el ión molecular es de 261. Los compuestos que presentaron un espectro de masas muy similar con alguno de las bases de datos, pero con índice de retención diferente se les denominó con el nombre del compuesto asignado por la base de datos agregándole dos signos de interrogación al inicio. Por ejemplo: ??homolicorina, significa que el compuesto tiene una estructura probable a la homolicorina.

El análisis de CG-EM de cada uno de extractos estudiados incluyó alcaloides y los otros metabolitos secundarios detectados en las fases (FO1, FO2 y FO3); sin embargo, en este trabajo se organizó y analizó principalmente a los alcaloides por ser objetivo de este estudio y porque están directamente relacionados con la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa. Sólo se presentaron los compuestos no alcaloideos cuando su abundancia relativa era muy alta en el órgano estudiado.

### ***Aislamiento del compuesto mayoritario de Z. fosteri con $m/z$ 189 (261)***

La fracción de alcaloides del extracto de MeOH (65 g) de los bulbos de *Z. fosteri* se obtuvo usando el método antes descrito (Fig. 2.3). De dicha fracción precipitó espontáneamente un sólido, denominándolo "pastilla" (1.61 g) el cual fue separado por decantación de la disolución denominada "sobrenadante" (0.76 g). Previamente se tenía la experiencia que el alcaloide licorina precipitaba de dicha extracción, lo cual fue comprobado por el análisis de CG-EM ya que el precipitado estaba constituido en 82% por licorina y 14% del  $m/z$  189 (261), así como otros compuestos en menor abundancia (Anexo 10). Para el aislamiento del compuesto de  $m/z$

189 (261) se utilizó el sobrenadante donde dicho compuesto se encontraba en 20%, galantina 16% y licorina 14%, así como otros (Anexo 11). Para ello, se empleó cromatografía líquida al vacío (CLV) usando una columna de vidrio de 250 ml y 2.5 cm de diámetro empaquetada (a 4 cm de altura) con sílica gel 60 ACC (0.9 ml/g) con una granulometría de 6-35  $\mu$ . La muestra (0.8 g) fue disuelta con MeOH, mezclada con Celita 545 y colocada en la columna empacada. La elución se inició con hexano 100%, incrementando progresivamente la cantidad de AcOEt hasta 100%. Posteriormente se adicionó MeOH, progresivamente, hasta la proporción final MeOH/AcOEt (3:1). Se obtuvieron seis fracciones de 40 ml con cada mezcla de disolventes. Las fracciones fueron concentradas en un rotavapor Buchi Syncore Polyvap R-24. Las fracciones se analizaron mediante CCF exponiendo los cromatofolios a vapores de amoníaco durante la elución, usando las mezclas de disolventes empleadas previamente para la cromatografía en columna. En total se obtuvieron 249 fracciones, de las cuales las fracciones 82 a 143 presentaron reacción positiva para alcaloides con el reactivo Dragendorff. Se reunieron las fracciones que presentaron el mismo perfil alcaloideo, reduciéndose a 22 grupos (Fig. 2.2).

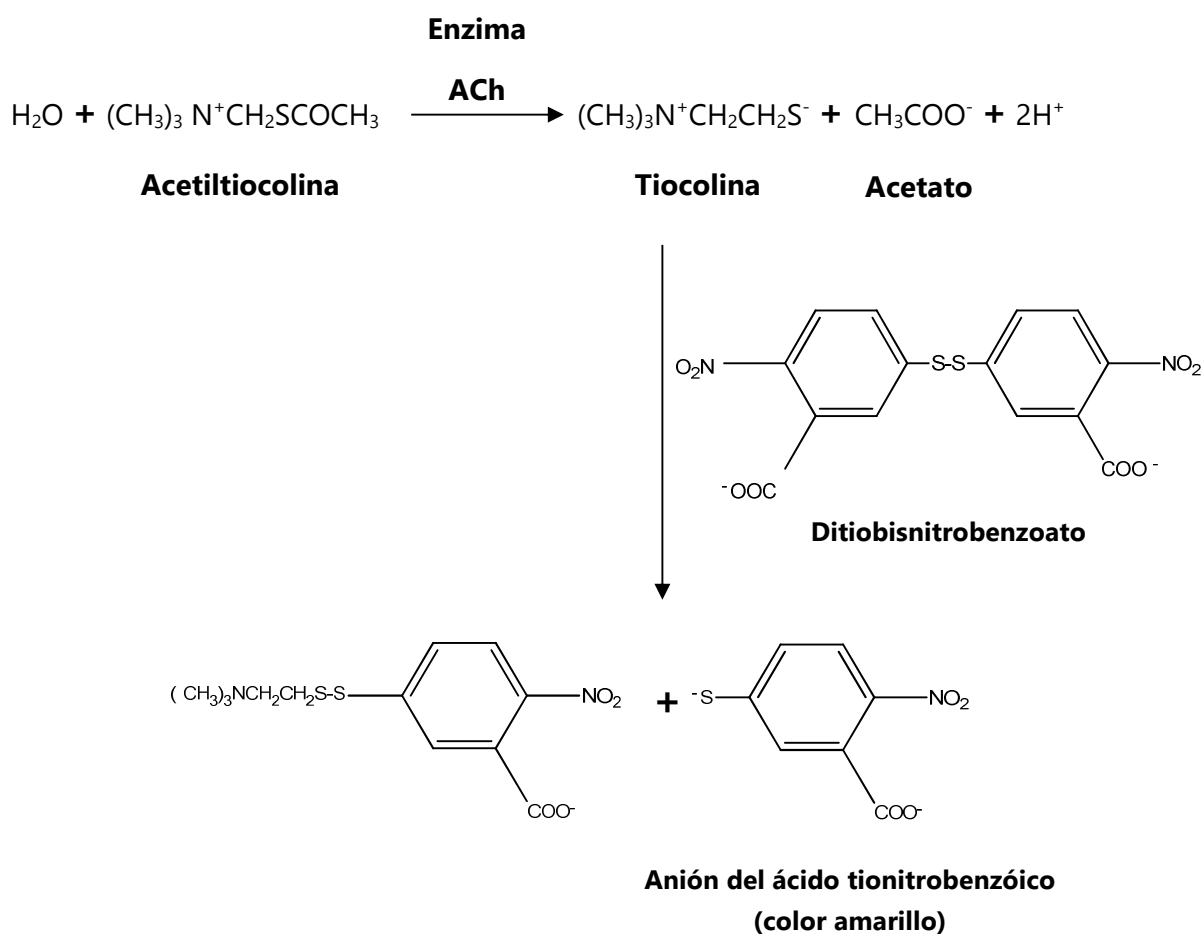
***Cromatografía en capa fina preparativa (CCFP).*** Cinco grupos de fracciones (82 a 87; 88 a 92; 93 a 107; 108 a 117 y 118 a 143) presentaron un alto contenido de alcaloides por CCF y se analizaron por CG-EM. Las fracciones 88-92 (0.014 g) y 93-107 (0.078 g) mostraron la mayor cantidad del compuesto con  $m/z$  189 (261), por lo que éstas fueron sometidas a CCFP por separado. Se usaron cromatofolios de base vidrio, sílica gel 60F 254 60/15  $\mu$ m de 20 x 20 cm y 0.25 mm de espesor (Votre Partenaire Chimie). Como fase móvil se empleó AcOEt-Acetona-MeOH (3:0.5:1.5). La fracción 82-92 se eluyó dos veces y la fracción 93-107 tres. Las zonas con reacción positiva a Dragendorff (zona 3 en el primer caso y zona 5 en el segundo) se rasparon

con espátula. El adsorbente se colocó en tubos Eppendorf y se les agregó AcOEt grado analítico en cantidad variable. Se agitaron con vortex y se trataron 10 min en un baño de ultrasonido. Se centrifugaron a 10,000 rpm por 2 min y el sobrenadante se extrajo con micropipeta automática. Este proceso se repitió tres veces con AcOEt y dos veces con una mezcla de AcOEt/MeOH (85:15) en cada zona raspada. Las soluciones fueron secadas con nitrógeno y analizadas por CG-MS. De la CCFP de la fracción 82-92 (3) se obtuvieron 3.1 mg y de la fracción 93-107 (5) 10 mg.

**Caracterización del compuesto por métodos espectroscópicos (RMN-H y C, COSY, HSQC, NOESY).** Las fracciones 82-92 (3) y 93-107 (5) se analizaron por Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN  $^1\text{H}$ ) a 300 MHz en un equipo Varian modelo Gemini 300 usando cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) como disolvente y usando el TMS como patrón interno. En la segunda se encontró un compuesto puro por lo que se procedió a analizar la fracción a 400 MHz (RMN  $^1\text{H}$ ) y 500 MHz (RMN  $^{13}\text{C}$ ) en un equipo Varian Mercury-400 (2006) y VXR-500, respectivamente. Los valores de los desplazamientos químicos en los espectros se expresaron en unidades  $\delta$  (ppm) y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) en Hz. Como apoyo para la identificación del compuesto, se realizaron experimentos bidimensionales de RMN de correlación homonuclear COSY: Correlation spectroscopy  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  y NOESY: Nuclear overhauser effect spectroscopy, así como de correlación heteronuclear HSQC: Heteronuclear single quantum coherence y HMBC: Heteronuclear multibond coherence. Las correlaciones bidimensionales de  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$ , se efectuaron a 400 y 500 MHz respectivamente. La interpretación y edición de los espectros se realizó en el programa MestRE Nova.

**Ensayo biológico.** La capacidad de los extractos metanólicos, fracciones alcaloidales y compuestos para inhibir a la acetilcolinesterasa, se determinó mediante el método colorimétrico modificado de Ellman *et al.* (1921). La actividad enzimática se determinó mediante el incremento de color producido por la tiocolina, procedente de la hidrólisis de la acetilcolina, cuando ésta reacciona con el ión ditiobisnitrobenzoato para formar el anión del ácidotiobisnitrobenzónico que es de color amarillo (Fig. 2.4).

Reacción:



**Figura 2.4.** Esquema de la reacción enzimática en el que se basa el método colorimétrico para determinar la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa.

### *Reactivos específicos.*

Se usó acetilcolina yodada, A 5751, enzima acetilcolinesterasa de anguila eléctrica tipo VI-S AChE (liofilizada en polvo) y el 5-5'-dinitro (2- ácido nitrobenzoico), DTNB (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania).

### Soluciones:

*Tampón fosfato (PBS).* Para la realización de esta solución se mezclaron los siguientes reactivos:  $K_2HPO_4$  8 mM (1.39 g),  $NaH_2PO_4$  2.3 mM (0.272 g), NaCl 0.15 M (8.77 g), Tween 20, 0.05% (0.5 ml), agua (1 L).

*Solución sustrato.* Se mezclaron los siguientes reactivos:  $Na_2HPO_4$  0.04 M (142 mg), ácido 2,2'-dinitro-5,5'dithiobenzoico (DTNB) 0.2 mM (2 mg), yoduro de acetiltiocolina 0.24 mM (1.7 mg), agua destilada (25 ml). Se ajustó el pH con HCl a pH 7.5.

*Solución enzimática.* Esta solución fue preparada al momento de realizar el ensayo. Solución stock (-20°C): 500 U/ml. Se usaron 4  $\mu$ l de solución stock en 8 ml de PBS para cada placa (0.25 U/ml).

**Cálculo de la  $CI_{50}$ .** La inhibición de la acetilcolinesterasa por los extractos, fracciones y compuestos se determinó mediante el cálculo de su concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) como se describe. Se pesaron 5 mg de extracto, se agregó 1 ml de MeOH grado HPLC, se mezclaron con ayuda de un vortex y se trataron en un baño de ultrasonido (solución madre). Se preparó una solución a concentración de 1 mg/ml diluyendo 200  $\mu$ l de la solución madre en 800  $\mu$ l de PBS. Finalmente, se prepararon seis diluciones logarítmicas de forma seriada, mezclando en la primera, 100  $\mu$ l de la solución a 1 mg/1 ml más 900  $\mu$ l de PBS (Cuadro 2.1). El hidrobromuro de galantamina (HBr Gal) (PM: 367.9 g/mol) se usó como control positivo, el cual

por ser un compuesto farmacéutico (Razadyne®/Reminyl®) se probó a menor concentración que los extractos. Se pesaron 1.104 mg de HBr Gal, se agregó 300 µl de MeOH grado HPLC, se mezclaron con ayuda de un vortex y se trataron en un baño de ultrasonido para obtener una concentración de 10<sup>-2</sup>M (solución madre), de la cual se prepararon seis diluciones logarítmicas sucesivas para los extractos y fracciones alcaloideas (10<sup>-4</sup>M a 10<sup>-9</sup>M) y seis para el compuesto aislado (10<sup>-3</sup>M a 10<sup>-8</sup>M). Los valores fueron transformados a µg/ml (Cuadro 2.1.)

Para el compuesto aislado de *Z. fosteri*, 3'-demetoximesembranol, (PM: 261.367 g/mol), a los 5.4 mg del compuesto se agregó 1 ml de MeOH grado HPLC, se mezclaron con ayuda de un vortex y se trataron en un baño de ultrasonido (solución madre). Se preparó una solución a concentración de 10<sup>-2</sup>M diluyendo 484 µl de la solución madre en 516 µl de PBS de la cual se prepararon siete diluciones logarítmicas sucesivas de 10<sup>-3</sup>M a 10<sup>-8</sup>M (Cuadro 2.1).

**Cuadro 2.1.** Concentraciones ensayadas para los extractos de MeOH, fracciones alcaloideas (µg/ml) y compuestos (M, µg/ml).

Extractos MeOH y fracciones alcaloideas µg/ml	Compuestos		
	Concentración M	Hidrobromuro de galantamina µg/ml	3'-demetoximesembranol µg/ml
-	10 <sup>-3</sup>	367.90	261.36
100	10 <sup>-4</sup>	36.79	26.13
10	10 <sup>-5</sup>	3.67	2.61
1	10 <sup>-6</sup>	0.36	0.26
0.1	10 <sup>-7</sup>	3.67 <sup>-2</sup>	2.61 <sup>-2</sup>
0.01	10 <sup>-8</sup>	3.67 <sup>-3</sup>	2.61 <sup>-3</sup>
0.001	10 <sup>-9</sup>	3.67 <sup>-4</sup>	2.61 <sup>-4</sup>



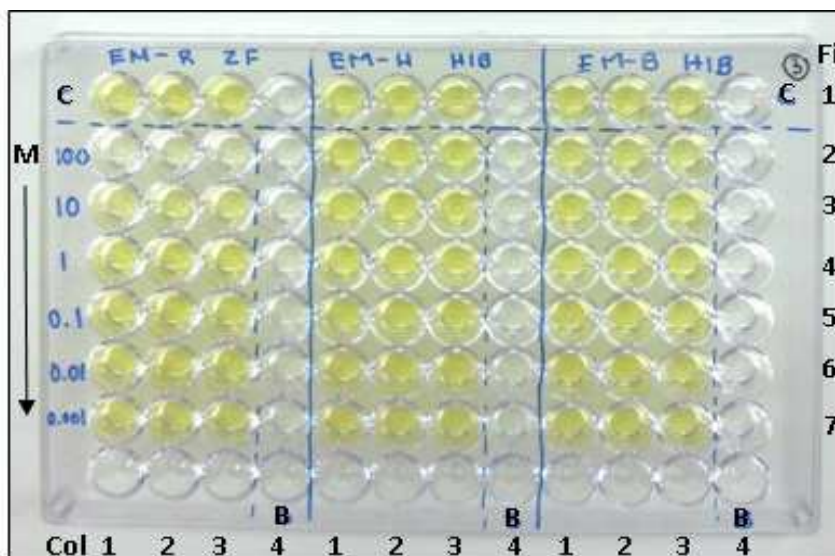
Se aplicaron tres tratamientos:

1. Solución Control: PBS+ Enzima +Sustrato.
2. Solución Blanco: Muestra+ PBS + Sustrato.
3. Solución Ensayo: Muestra + Enzima + Sustrato.

Se utilizaron placas de 96 pozos en las que se ensayaron tres muestras distintas. Para cada muestra probada se ocuparon 32 pozos ya que el ensayo se realizó por triplicado (Fig. 2.5). En la fila 1 se colocó la solución control y en la columna 4 la solución blanco. En cada pocillo se usó un volumen 200 µl con la siguientes proporciones: A) Se añadieron 50 µl de la solución a ensayar (1 a 6) por triplicado, excepto en los pocillos correspondientes al control ya que éste determinó la actividad del enzima sin ningún tipo de inhibidor, por lo que en éstos se añadieron 50 µl de PBS. B) Se añadieron 50 µl de la solución enzimática excepto en los pocillos correspondientes a la solución blanco en dónde se añadieron 50 µl de PBS. C) Las placas se pusieron a incubar durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se le añadieron 100 µl de la solución sustrato preparada al momento de la realización del ensayo. La concentración final en los pocillos de los extractos, fracciones alcaloideas, bromuro de galantamina y 3-demetoxiepimesembranchol se muestra en el cuadro 2.2.

**Cuadro 2.2.** Concentraciones finales en los pocillos de los extractos MeOH, fracciones alcaloideas y compuestos.

Extractos MeOH y fracciones alcaloideas µg/ml	Compuestos		
	Concentración (M)	Hidrobromuro de galantamina µg/ml	3'-demetoximesembranchol µg/ml
-	2.5 <sup>-4</sup>	91.97	65.34
25	2.5 <sup>-5</sup>	9.19	6.53
2.5	2.5 <sup>-6</sup>	0.91	0.65
2.5 <sup>-1</sup>	2.5 <sup>-7</sup>	9.17 <sup>-2</sup>	6.52 <sup>-2</sup>
2.5 <sup>-2</sup>	2.5 <sup>-8</sup>	9.17 <sup>-3</sup>	6.52 <sup>-3</sup>
2.5 <sup>-3</sup>	2.5 <sup>-9</sup>	9.17 <sup>-4</sup>	6.52 <sup>-4</sup>
2.5 <sup>-4</sup>	2.5 <sup>-10</sup>	9.17 <sup>-5</sup>	6.53 <sup>-5</sup>



**Figura 2.5.** Placa de 96 pozos para la realización del ensayo de la acetilcolinesterasa. **C:** Fila con la solución control (negativo); **M:** Muestra a ensayar en diluciones seriadas de mayor a menor concentración (6 filas). **B:** Columna con la solución blanco. **Col:** Columnas (4 por muestra); **Fi:** Filas usadas. A mayor inhibición menor color.

El color amarillo producido por el ácido tiobisnitrobenzoico se determinó leyendo las absorbancias a 410 nm a los 5 y 10 min del inicio de la reacción, en un lector de microplacas Labsystems (Helsinki, Finlandia) con el programa de cómputo ascent software versión 2.6, método JPACHE. Se utilizaron los datos de la lectura a 10 min. Los datos de absorbancia se transformaron a porcentajes de inhibición producidos por cada muestra usando la siguiente ecuación:

$$\% I = 100 - \frac{E - B}{C - B} \times 100$$

**I:** Inhibición; **E:** Ensayo; **B:** Blanco; **C:** Control.

Los porcentajes obtenidos se transformaron a logaritmo y de éstos, se calculó la media de cada muestra realizada por triplicado para la obtención de los valores. Posteriormente, se aplicó la fórmula sigmoideal dosis-respuesta para linearizar los datos, graficar y calcular la  $CI_{50}$ . Los cálculos y la edición de los gráficos se realizaron en el programa informático Graph Pad Prism versión 5.0.

## Resultados

En todas las muestras analizadas, los alcaloides fueron detectados principalmente en la FO2, en menor medida en la FO3 y por último en el extracto metanólico. En el caso de los extractos metanólicos se presentan los alcaloides con abundancia relativa mayor al 1% y otros metabolitos secundarios que fueron mayoritarios. La información completa puede consultarse en los anexos. En las FO1 se encontraron ácidos grasos y esteroides, lo cual indica que el método fue adecuado para remover compuestos no alcaloideos. De FO2 y FO3 únicamente se presentan los alcaloides con abundancia relativa mayor al 10%.

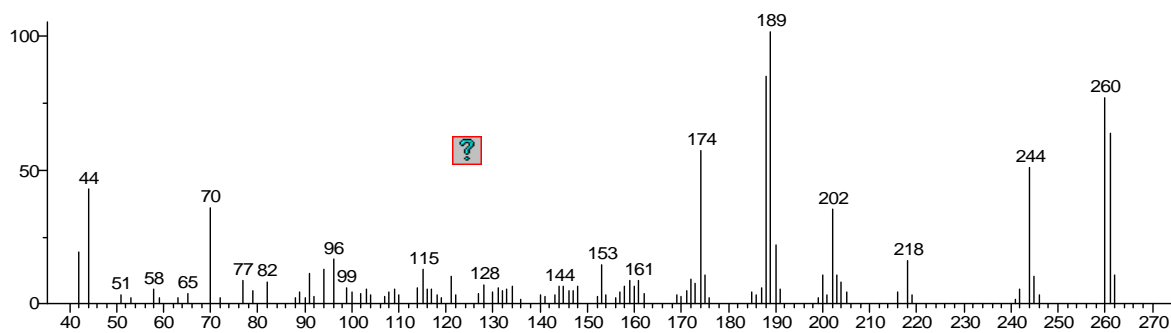
### ***Zephyranthes fosteri***

*Extractos metanólicos.* En los extractos metanólicos de las hojas, bulbos, flores, raíces y partes aéreas se detectaron por CG-EM nueve alcaloides con abundancias relativas mayores al 1% (Cuadro 2.3), dos de ellos no fueron identificados por las bases de datos (Figs. 2.6 y 2.7). En las raíces se encontró el mayor número de alcaloides (cuatro), seguidas por las flores (tres), bulbos (dos), partes aéreas (dos) y por último las hojas (uno). La licorina constituyó el 15.90 y 6.04% de los extractos de raíces y partes aéreas, respectivamente; mientras que el compuesto de  $m/z$  189 (261) representó el 6.24 y 3.63%. También se detectaron otros metabolitos secundarios mayoritarios como los ácidos grasos, ácido glutámico, esteroles y sitosterol (Cuadro 2.3). Los alcaloides que se encontraron en un porcentaje menor al 1%, otros metabolitos secundarios y algunos derivados del benceno contaminantes de los recipientes plásticos, se presentan en los anexos 1 a 5.

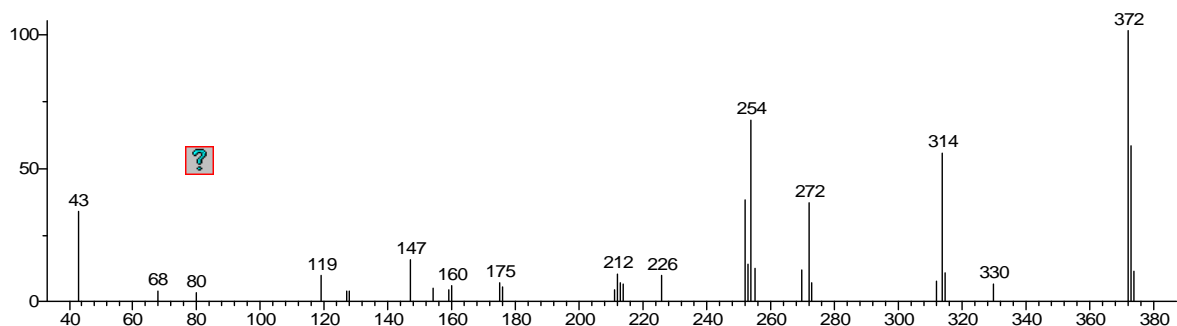
**Cuadro 2.3.** Alcaloides y metabolitos secundarios mayoritarios detectados por CG-EM de los extractos metanólicos de *Z. fosteri*. El compuesto más abundante de cada órgano se muestra en negritas. Los valores son % del total.

IR: índice de retención. I.T: identificación tentativa.

Alcaloide	IR	Hojas	Bulbos	Flores	Raíces	Partes aéreas	Comentarios
2-O-metilpancracina	24.773					1.24	
2-pyrrolidinona, 5-(ciclohexilmetil)-	1536.4			<b>23.22</b>			
3-O-acetilpowelina (NAT)	2746.5			1.99			
9,12-ácido octadecadienoico (Z,Z)-, metil ester	2088.6		<b>19.36</b>				
Acetato de vitatina	2559.9			2.41			
Ácido glutámico	1611.1	<b>56</b>					
Esterol						<b>20.36</b>	
Galantina	2872.3				2.43		
Hipadina	2725.9			1.936			I.T.
Licorina	2740.8		6.04		<b>15.93</b>	1.25	
<i>m/z</i> 189 (261)	2188.4		1.92		3.63	6.24	Desconocido
<i>m/z</i> 372 (373)	2855.9				0.92		Desconocido
Sitosterol	3280.2				<b>31.21</b>		



**Figura 2.6.** Espectro de masas del alcaloide mayoritario de *Z. fosteri* (ión molecular: 261, pico base: 189).



**Figura 2.7.** Espectro de masas del alcaloide de *Z. fosteri* (ión molecular: 373, pico base: 372).

*Fracción alcaloidea FO2.* En el análisis de CG-EM de la fracción de alcaloides (FO2) de las hojas, bulbos, flores, raíces y partes aéreas se detectaron siete alcaloides con abundancias relativas mayores al 10%, de los cuales uno no fue identificado por las bases de datos (Cuadro 2.4). Sin embargo, el número total de alcaloides con abundancias relativas mayores al 1% fue de 57 (Anexo 20), de los cuales 24 no fueron identificados por las bases de datos (Anexos 21 a 44). Otros alcaloides que se encontraron en un porcentaje menor al 1% se presentan en los anexos 6 a 19. En los bulbos se encontró el mayor número de alcaloides, seguido por las partes aéreas, raíces, flores y por último las hojas. La licorina fue el alcaloide mayoritario en todos los órganos, en las raíces representó el 68.1%, seguido del alcaloide desconocido con *m/z* 189 (261) el cual constituyó el 28.6% en partes aéreas y 20.1% en los bulbos. La norlicoramina representó el 17.3% en las hojas, la galantina 16.7% en los bulbos y la 3-O-acetilpowelina el 12.8% en las flores (Cuadro 2.4). En la fracción FO3 fue muy bajo el contenido de alcaloides en todos los órganos (>1%); (Anexos 15 a 19).

**Cuadro 2.4.** Alcaloides mayoritarios (<5%) detectados por (CG-EM) de la fracción alcaloidea (FO2) de *Z. fosteri*. El compuesto más abundante de cada órgano se muestra en negritas. Los valores son el % del total.

IR: índice de retención. I.T: identificación tentativa.

Alcaloide	IR	Hojas	Bulbos	Flores	Raíces	Partes aéreas	Comentarios
2-metoxialbomaculina GC14	1485.1	13.17					I.T.
3-O-acetilpowelina	2745.9			<b>12.81</b>			
Acetato de vitatina	2559			11.90		2.66	
Galantina	2874.6		16.76				
Licorina	2742.2		<b>61.78</b>		<b>68.16</b>	8.00	
<i>m/z</i> 189 (261)	2187.8	6.98	25.10	3.35	7.25	<b>28.66</b>	
Norlicoramina	2588	<b>17.32</b>					I.T.

### ***Habranthus concolor***

*Extractos metanólicos.* En el análisis de CG-EM de los extractos metanólicos de los bulbos, raíces, escapo, frutos y semillas se detectaron siete alcaloides con abundancias relativas mayores al 1% (Cuadro 2.5), de éstos, seis se encontraron en las raíces, cuatro en los bulbos, escapo y semillas y uno en los frutos. La galantamina se presentó en todas las partes analizadas de la planta, siendo el alcaloide mayoritario casi en todas, detectándose en mayor proporción en las semillas con el 51.11% y en los bulbos con 47.50%, mientras que la clidantina constituyó el 24.84% y la sanguinina 17.63% (Cuadro 2.5). Se detectaron otros metabolitos secundarios como los esteroides (19.95%) y también ftalatos (48.94%) los cuales pueden ser contaminantes de los recipientes plásticos. Otros alcaloides que se encontraron en un porcentaje menor al 1% y otros metabolitos secundarios se presentan en los anexos 45 a 50.

**Cuadro 2.5.** Alcaloides y metabolitos secundarios mayoritarios detectados por CG-EM de los extractos metanólicos de *H.concolor*. El compuesto más abundante de cada órgano se muestra en negritas. Los valores son el % del total. IR: índice de retención.

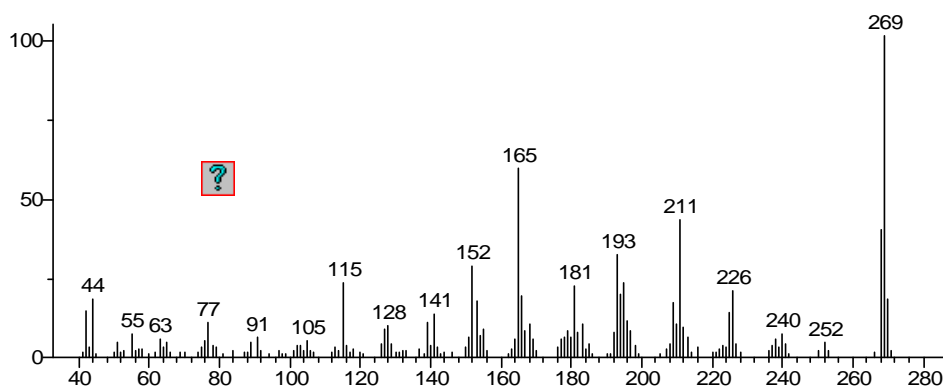
<b>Alcaloide</b>	<b>IR</b>	<b>Hoja</b>	<b>Bulbo</b>	<b>Raíces</b>	<b>Escapo</b>	<b>Frutos</b>	<b>Semillas</b>
Galantamina	2385.7	<b>35.08</b>	<b>47.50</b>	<b>37.85</b>	<b>39.84</b>	18.10	<b>51.11</b>
Sanguinina	2404.2	5.30	8.79	2.88	17.63		5.75
Clidantina	2390.8	20.24	3.30	2.09	24.84		15.54
Narwedina	2461.2		0.87	0.89			
N-demetilgalantamina					2.90		
Licorina				7.56			7.87
8-O-demetilmaritidina				2.95			
Ftalatos						<b>48.94</b>	
Esteroides						19.95	
Azúcares		10.10					
Tocoferol (Vit. E)		3.74					
Esterol		6.58					
$\beta$ -Amirina		7.33					

*Fracción alcaloidea FO2.* En el análisis de CG-EM de la fracción de alcaloides (FO2), de los bulbos, raíces, escapo, frutos y semillas se detectaron cinco alcaloides con abundancias relativas mayores al 10% (Cuadro 2.6), de los cuales el  $m/z$  165(269) no fue identificado por las bases de datos (Fig. 2.8). Sin embargo, el número total de alcaloides con abundancias relativas mayores al 1% fue de 11 (Anexo 55). Otros alcaloides que se encontraron en un porcentaje menor al 1% se presentan en los anexos 51 a 54. En las semillas, se encontraron nueve de los alcaloides totales, cinco en el bulbo y escapo y finalmente dos en raíces. La galantamina fue el alcaloide mayoritario en todos los órganos analizados y constituyó el 79.61% en los bulbos, seguida por la clidantina con el 21.33% en el escapo y el  $m/z$  165 (269) con el 19.46% en las raíces (Cuadro 2.6).

**Cuadro 2.6.** Alcaloides mayoritarios (<10%) detectados por (CG-EM) de la fracción alcaloidea (FO2) de *H. concolor*. El compuesto más abundante de cada órgano se muestra en negritas. Los valores son el % del total.

IR: índice de retención.

Alcaloide	IR	Hoja	Bulbo	Raíces	Escapo	Semillas
Galantamina	2385.7	<b>47.32</b>	<b>79.61</b>	<b>66.382</b>	<b>47.66</b>	<b>64.03</b>
Sanguinina	2404.2	9.91	5.02		17.64	7.25
Clidantina	2390.8	41.20			21.33	20.02
N-demetilgalantamina	2427.1	0.58	3.54		12.16	3.06
Narwedina		0.52				
3-O-acetilsanguinina		0.45				
$m/z$ 165(269)				19.46		



**Figura 2.8.** Espectro de masas del compuesto desconocido de *H. concolor* (ión molecular: 269, pico base de 165).

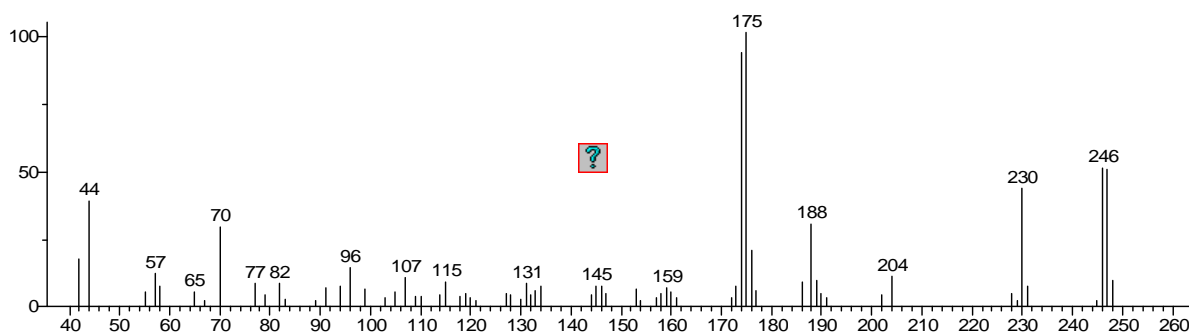
## ***Habranthus aff concolor***

*Extractos metanólicos.* En el análisis de CG-EM de los extractos metanólicos de las hojas y bulbos se detectaron seis alcaloides con abundancias relativas mayores al 1% (Cuadro 2.7), únicamente el  $m/z$  175 (247) no fue identificado (Fig. 2.9). En los bulbos se detectaron seis alcaloides y cuatro en las hojas. La licorina constituyó el 4.61%, el alcaloide con  $m/z$  175 (247) el 2.74% en los bulbos y la homolicorina y el galantindol el 2% en las hojas. En la extracción metanólica se detectaron mayoritariamente otros metabolitos secundarios como el sitoesterol (8.0%) en las hojas y la sacarosa (65.45%) en los bulbos (Cuadro 2.7). Otros alcaloides que se encontraron en un porcentaje menor al 1% y otros metabolitos secundarios se presentan en los anexos 56 y 57.

**Cuadro 2.7.** Alcaloides y metabolitos secundarios mayoritarios detectados por CG-EM de los extractos metanólicos de *H. aff. concolor*. El compuesto más abundante de cada órgano se muestra en negritas.

Los valores son % del total. IR: índice de retención.

<b>Alcaloide</b>	<b>IR</b>	<b>Hoja</b>	<b>Bulbo</b>	<b>Comentarios</b>
281 (galantindol)	2499.4	2	2.35	
Homolicorina	2638.2	2		Estructura probable
Ismina	2269	0.35	0.41	
Licorina	2741.3		4.61	
<i>m/z</i> 175 (247)	2252.8		2.74	
Tazetina	2640.4	0.34	1.19	
Sitosterol	3278.1	<b>8</b>		
Sacarosa	1455.8		<b>65.45</b>	



**Figura 2.9.** Espectro de masas del compuesto desconocido de *H. aff. concolor* (ión molecular: 247, pico base: 175).



*Fracción alcaloidea FO2.* En el análisis de CG-EM de la fracción de alcaloides (FO2), de las hojas y bulbos, se detectaron cuatro alcaloides con abundancias relativas mayores al 10%, de los cuales uno no fue identificado por las bases de datos (Cuadro 2.8). Sin embargo, el número total de alcaloides con abundancias relativas mayores al 1% fue de 27 (Anexo 62), de los cuales 10 no fueron identificados (Anexos 63 a 69). Otros alcaloides que se encontraron en un porcentaje menor al 1% se presentan en los anexos 58 a 61. En las hojas se encontró el mayor número de alcaloides, seguida por los bulbos. La licorina fue el alcaloide mayoritario en los bulbos constituyendo el 23.18% y el *m/z* 175 (247) con 19.62% en la hoja. La tazetina (12.61%) y el galantindol (12.47%) fueron los alcaloides que le siguieron en abundancia (Cuadro 2.8).

**Cuadro 2.8.** Alcaloides mayoritarios (<10%) detectados por (CG-EM) de la fracción alcaloidea (FO2) de *H. aff. concolor*. El compuesto más abundante de cada órgano se muestra en negritas. IR: índice de retención. Los valores son % del total.

Alcaloide	IR	Hoja	Bulbo
281 (galantindol)	2499.9	11.89	12.47
Licorina	2740.8		<b>23.18</b>
<i>m/z</i> 175(247)	2248.5	<b>19.62</b>	10.73
Tazetina	2643.2	12.61	12.59

### **Análisis comparativo**

De todos los alcaloides detectados en los extractos y fracciones alcaloidales de los diferentes órganos, *Z. fosteri* y *H. aff concolor* coincidieron en 10 alcaloides; *Z. fosteri* y *H. concolor* en dos y *H. aff concolor* con *H. concolor* en uno (Cuadro 2.9). *Zephyranthes fosteri* y *H. aff concolor* coincidieron en la presencia del alcaloide con  $M^+$  249 (identificado preliminarmente como 11,12-dehidroanhidrolicorina) y el compuesto de *m/z* 189 (261) en las hojas. *Zephyranthes fosteri* y *H. aff concolor* presentaron en los bulbos anhidrolicorina y el *m/z* 175(247) y licorina

en las raíces, la cual estuvo presente los bulbos de los tres taxa (Anexo 70). En el cuadro 2.10 se presenta los alcaloides mayoritarios en la fracción de alcaloides de los bulbos de los tres taxa.

**Cuadro 2.9** Alcaloides que estuvieron presentes en dos o tres taxa. Los compuestos mayoritarios se muestran en negritas.

<b>Compuesto</b>	<b>Z. fosteri</b>	<b>H. aff. concolor</b>	<b>Z. concolor</b>
<b>Licorina</b>	*	*	*
249 (11,12-dehidroanhidrolicorina)	*	*	
Anhidrolicorina	*	*	
Homolicorina	*	*	
Kirkina STD-db-5	*	*	
Oxoasoanina	*	*	
Trisfaeridina	*	*	
Urgiminorina; ??Leucojum??	*	*	
<b>m/z 175 (247)</b>	*	*	
<b>m/z 189 (261)</b>	*	*	
8-O-demetilmaritidina	*		*

**Cuadro 2.10** Alcaloides mayoritarios (% abundancia) presentes en la fracción de alcaloides de los bulbos de los tres taxa.

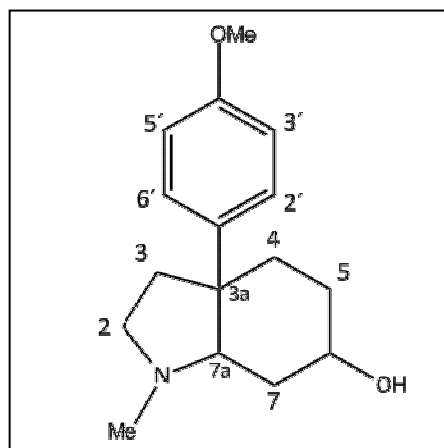
<b>Compuesto</b>	<b>Z. fosteri</b>	<b>H. aff. concolor</b>	<b>Z. concolor</b>
Galantamina	-	-	79.61
Sanguinina	-	-	5.02
Licorina	61.78	23.19	6.32
m/z 175 (247)		10.74	-
m/z 189 (261)	25.10		-
Galantina	16.76	-	-
Galantindol	-	12.47	-

Ausencia (-)

### **Aislamiento del 3'-demetoximesembranol de $m/z$ 189 (261)**

El alcaloide mayoritario presente en los bulbos de *Z. fosteri* con  $m/z$  189 (261) con un tiempo de retención de 17.410 min y un índice de retención de 2184.7 (Fig. 2.12) en CG-EM, no fue identificado por la base de datos NIST, por lo cual se decidió determinar su estructura mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos y correspondió al 3'-demetoximesembranol (Figs. 2.10 a 2.22).

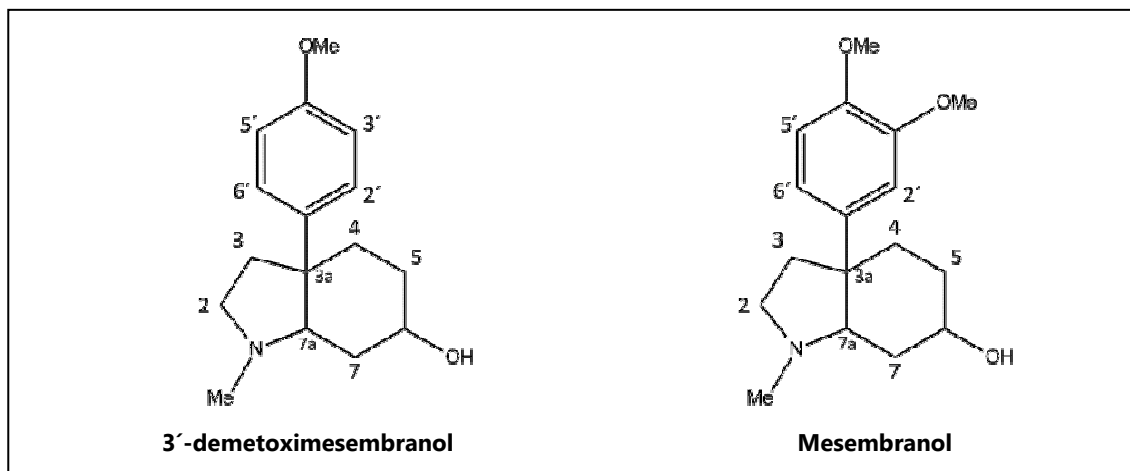
**3'-demetoximesembranol.** Su espectro de masas mostró un pico base a  $m/z$  a 189 y el ión molecular en 261  $[M]^+$  (Fig. 2.13), el cual es congruente para la fórmula molecular  $C_{16}H_{23}NO_2$ . Además, se observaron fragmentos de  $m/z$  260 (80%), 174 (60%), 244 (55%), 44 (45%), 202 (35%), 70 (40%), 96 (20%), 218 (18%) y 153 (15%); (Fig. 2.13). Para facilitar la asignación de las señales de RMN  $^1H$  y  $^{13}C$  (Figs. 2.14 y 2.18) se compararon dichas señales con las del mesembranol (Cuadro 2.12). Además se realizaron experimentos de RMN-2D incluyendo COSY, NOESY (Figs. 2.19 y 2.20; Cuadro 2.11), así como HMBC y HSQC (Figs. 2.21, 2.22; Cuadro 2.11). El espectro de RMN  $H^1$  (500 MHz,  $CD_3OD$ ) fue similar al previamente reportado para el mesembranol (Geoghegan y Evans, 2013) pero a diferencia de éste que posee dos metoxilos, sólo se observó una señal simple para un metoxilo en 3.80 s (3H), así como señales para cuatro hidrógenos aromáticos en 7.28 m (2H)  $H_2'$ ,  $H_6'$  y 6.87 m (2H)  $H_3'$ ,  $H_5'$ . El espectro de RMN  $^{13}C$  (500 MHz,  $CD_3OD$ ) también fue similar al previamente reportado para el mesembranol (Geoghegan y Evans, 2013); pero a diferencia de éste, sólo se observó una señal para un metoxilo en 55.4 ( $OCH_3$ ), así como señales para cuatro metinos aromáticos en 127.8 (2CH)  $C_2'$ ,  $C_6'$  y 113.8 (2CH)  $C_3'$ ,  $C_5'$ . Los datos anteriores permitieron concluir que se trata del compuesto 3'-demetoximesembranol.



**Figura 2.10.** Estructura molecular del 3'-demetoximesembranol.

**Cuadro 2.11** Datos de RMN  $H^{-1}$  y  $C^{-13}$ . COSY, NOESY, HMBC para el 3'-demetoximesembranol.

Posición	$^1H \delta$ (J in Hz)	COSY	NOESY	$^{13}C \delta$	HMBC (H $\rightarrow$ C)
2 $\alpha$	3.27 <i>td</i> (9.0, 9.0, 4.3)	H2 $\beta$ , H3 $\alpha/\beta$	H2 $\beta$ , H3 $\alpha/\beta$	54.5	-
2 $\beta$	2.31 <i>td</i> (10.7, 10.7, 7.0)	H2 $\alpha$ , H3 $\alpha/\beta$	H2 $\alpha$ , H3 $\alpha/\beta$ , H7a		C1, C3
3 $\alpha$	1.92 <i>ddd</i> (12.8, 8.9, 6.5)	H2 $\alpha/\beta$ , H3 $\beta$	H2', H6', H2 $\alpha$ , H3 $\beta$ , H4	40.3	C2, C3a, C4, C7a
3 $\beta$	1.81 <i>ddd</i> (12.9, 11.0, 4.8)	H2 $\alpha/\beta$ , H3 $\alpha$	H2', H6', H2 $\alpha/\beta$ , H3 $\alpha$ , H7a		C1', C2, C3a, C4
3 <sup>a</sup>	-	-	-	46.9	-
4 $\alpha$					
4 $\beta$	2.04 <i>m</i>	H5 $\alpha/\beta$ , H7 $\alpha/\beta$	H2 $\alpha$ , H3 $\alpha$ , H5 $\alpha/\beta$ , H6	34.7	C1', C3, C3a, C5, C6, C7a
5 $\alpha$	1.76 <i>dm</i> (12.5)	H4, H5 $\beta$	H4, H5 $\beta$ , H6	32.9	-
5 $\beta$	1.20 <i>m</i>	H4, H5 $\alpha$	H2', H6', H4, H5 $\alpha$ , H6		C4, C6, C7a
6 $\beta$	4.03 <i>m</i>	H5 $\alpha/\beta$ , H7 $\alpha/\beta$	H4, H5 $\alpha/\beta$ , H7 $\alpha/\beta$	66.9	-
7 $\alpha$	2.18 <i>ddt</i> (13.9, 4.8, 2.5, 2.5)	H6, H7a, H7 $\beta$	H6 $\beta$ , H7 $\beta$ , H7a, Nme	33.1	C3a, C5, C6, C7a
7 $\beta$	1.53 <i>ddd</i> (13.6, 11.1, 3.6)	H4, H6, H7 $\alpha$	H2', H6', H5 $\beta$ , H6, H7 $\alpha$ , H7a		C6, C7a
7 <sup>a</sup>	2.80 <i>br s</i>	H4, H7 $\alpha/\beta$ , NMe	H2 $\beta$ , H3 $\beta$ , H7 $\alpha/\beta$ , NMe	70.4	-
1'	-	-	-	138.5	-
2'-6'	7.28 <i>m</i>	H3'/5'	H3'/5', H3 $\alpha/\beta$ , H4, H5 $\beta$ , H7 $\beta$ , H7a	127.8	C2'/6', C3'/5', C4', C3a
3'-5'	6.87 <i>m</i>	H2'/6'	H2'/6', OMe	113.8	C3'/5', C1', C4'
4'	-	-	-	157.7	-
NMe	2.39 <i>s</i>	-	H7a	40.8	C2, C7a
OMe	3.80 <i>s</i>	-	H3', H5'	55.4	C4'

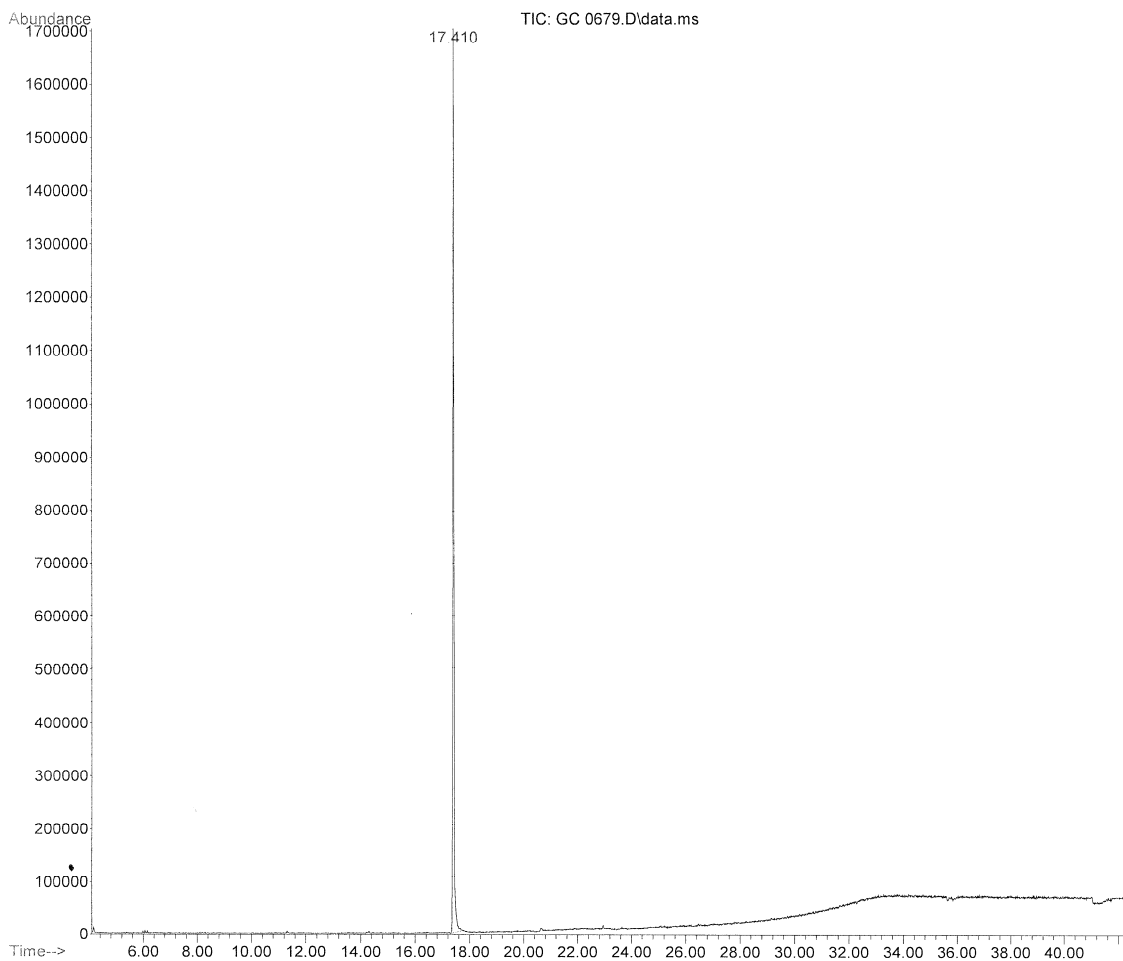


**Figura 2.11.** Estructura molecular del 3'-demetoximesembranol y mesembranol.

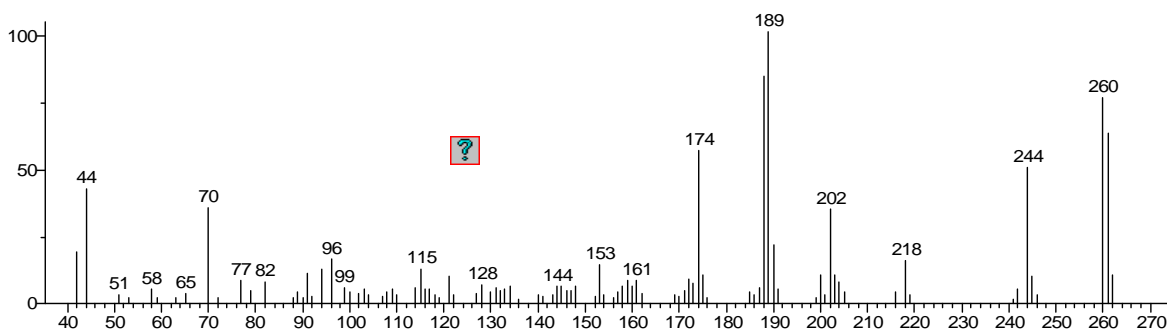
**Cuadro 2.12.** Datos de RMN  $H^{-1}$  y  $C^{-13}$  del 3-demetoximesembranol y el mesembranol.

Posición	3'-demetoximesembranol		Mesembranol*	
	$^1H \delta$ (J in Hz)	$^{13}C \delta$	$^1H \delta$ (J in Hz)	$^{13}C \delta$
2 $\alpha$ y 2 $\beta$	3.27 <i>td</i> (9.0, 9.0, 4.3) 2.31 <i>td</i> (10.7, 10.7, 7.0)	54.5	3.30-3.23 m, 1H 2.34-2.30 m, 1H	54.4 CH <sub>2</sub>
3 $\alpha$	1.92 <i>ddd</i> (12.8, 8.9, 6.5)	40.3	1.97-1.87 m, 1H	40.2 CH <sub>2</sub>
3 $\beta$	1.81 <i>ddd</i> (12.9, 11.0, 4.8)		1.86-1.82 m, 1H	40.2 CH <sub>2</sub>
3a	-	46.9	1.80-1.71 m, 1H	47.3 C
4 $\alpha$	2.04 <i>m</i>	34.7	2.04 <i>dd</i> (8, 3) 2H	34.9 CH <sub>2</sub>
4 $\beta$				34.9 CH <sub>2</sub>
5 $\alpha$	1.76 <i>dm</i> (12.5)	32.9	1.25-1.16 m, 1H	32.8 CH <sub>2</sub>
5 $\beta$	1.20 <i>m</i>			32.8 CH <sub>2</sub>
6 $\beta$	4.03 <i>m</i>	66.9	4.01 <i>m</i> , 1H	66.7 CH
7 $\alpha$	2.18 <i>ddt</i> (13.9, 4.8, 2.5, 2.5)	33.1	2.21-2.16 m, 1H	33.1 CH <sub>2</sub>
7 $\beta$	1.53 <i>ddd</i> (13.6, 11.1, 3.6)		1.59-1.49 m, 1H	33.1 CH <sub>2</sub>
7a	2.80 <i>br s</i>	70.4	2.80 <i>s</i> , 1H	70.2 CH
1'	-	138.5 C		148.9 C
4'	-	157.7 C		147.2 C 139.0 C
2'-6'	7.28 <i>m</i>	127.8 2 CH	6.82-6.79. <i>m</i> , 1H	118.9 CH
3'-5'	6.87 <i>m</i>	113.8 2 CH	6.91-6.77 <i>m</i> , 2H	110.6 CH 111.0 CH
NMe	2.39 <i>s</i>	40.8	2.38 <i>s</i> , 3H	40.7 CH <sub>3</sub>
OMe	3.80 <i>s</i>	55.4	3.86 <i>s</i> , 3H 3.88 <i>s</i> , 3H	56.0 CH <sub>3</sub> 56.1 CH <sub>3</sub>

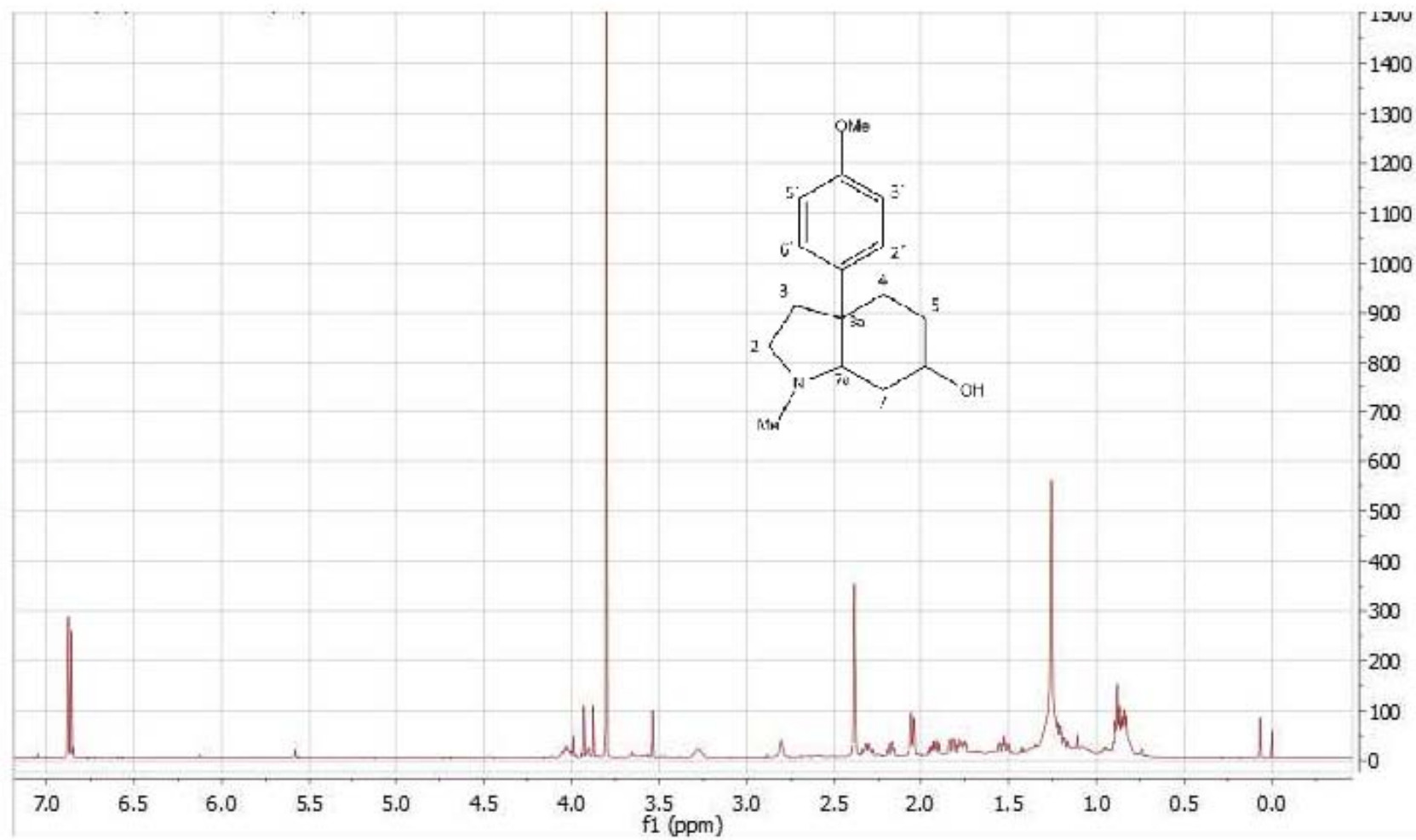
\* Geoghegan y Evans, 2013



**Figura 2.12.** Cromatograma del análisis por CG-EM del 3'-demetoximensebranol.



**Figura 2.13.** Espectro de masas del análisis por CG-EM del 3'-demetoximensebranol (ión molecular: 261, pico base: 189).



**Figura 2.14.** Espectro de RMN- $\text{H}^1$  (500 MHz) del 3'-demetoximesembranol registrado en  $\text{CDCl}_3$

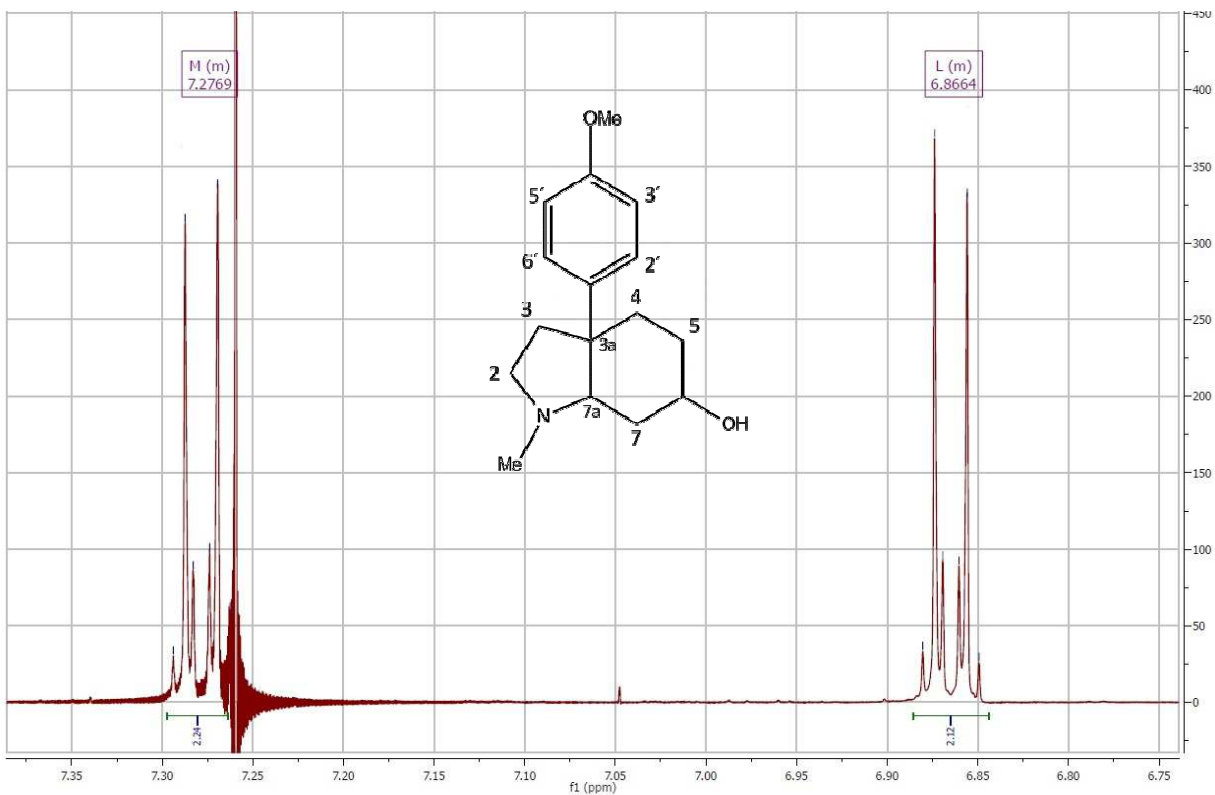


Figura 2.15. Espectro RMN- $^1\text{H}$  (500 MHz) del 3'-demetoximesembranol registrado en  $\text{CDCl}_3$ .

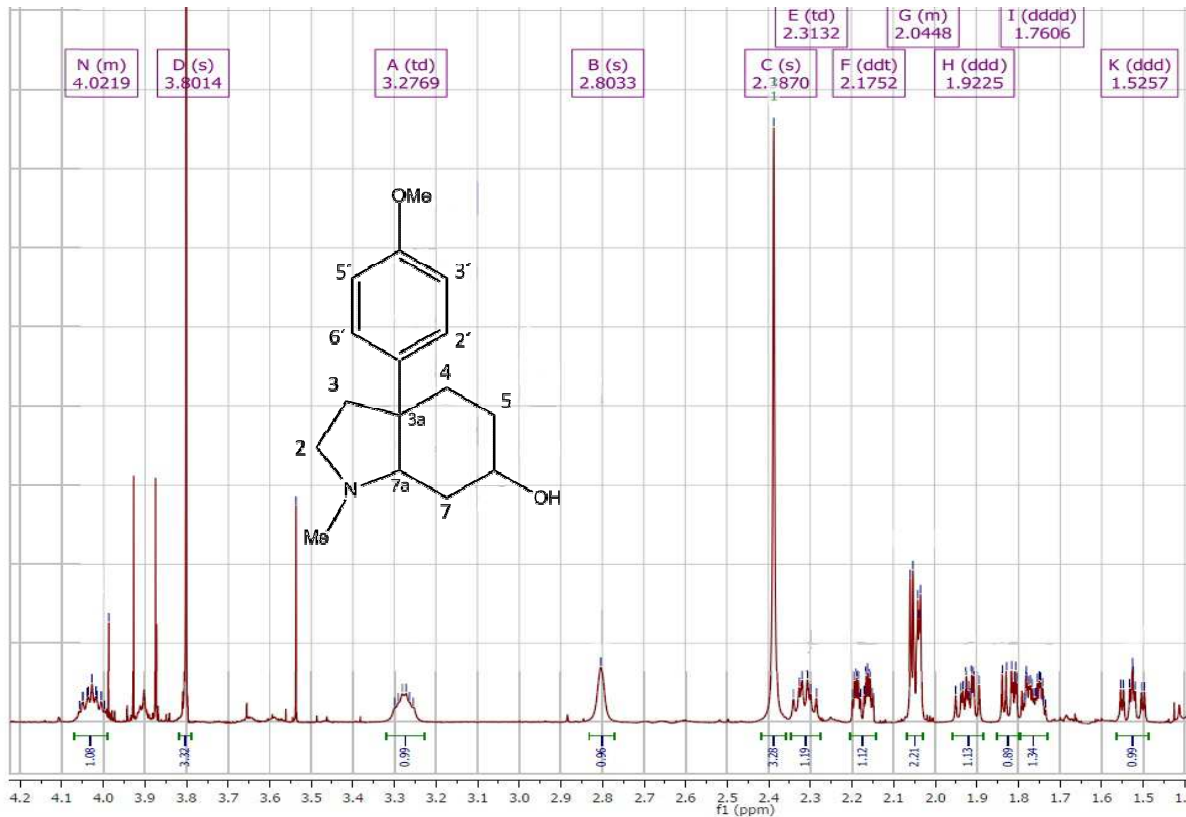


Figura 2.16. Espectro RMN- $^1\text{H}$  (500 MHz) del 3'-demetoximesembranol registrado en  $\text{CDCl}_3$ .



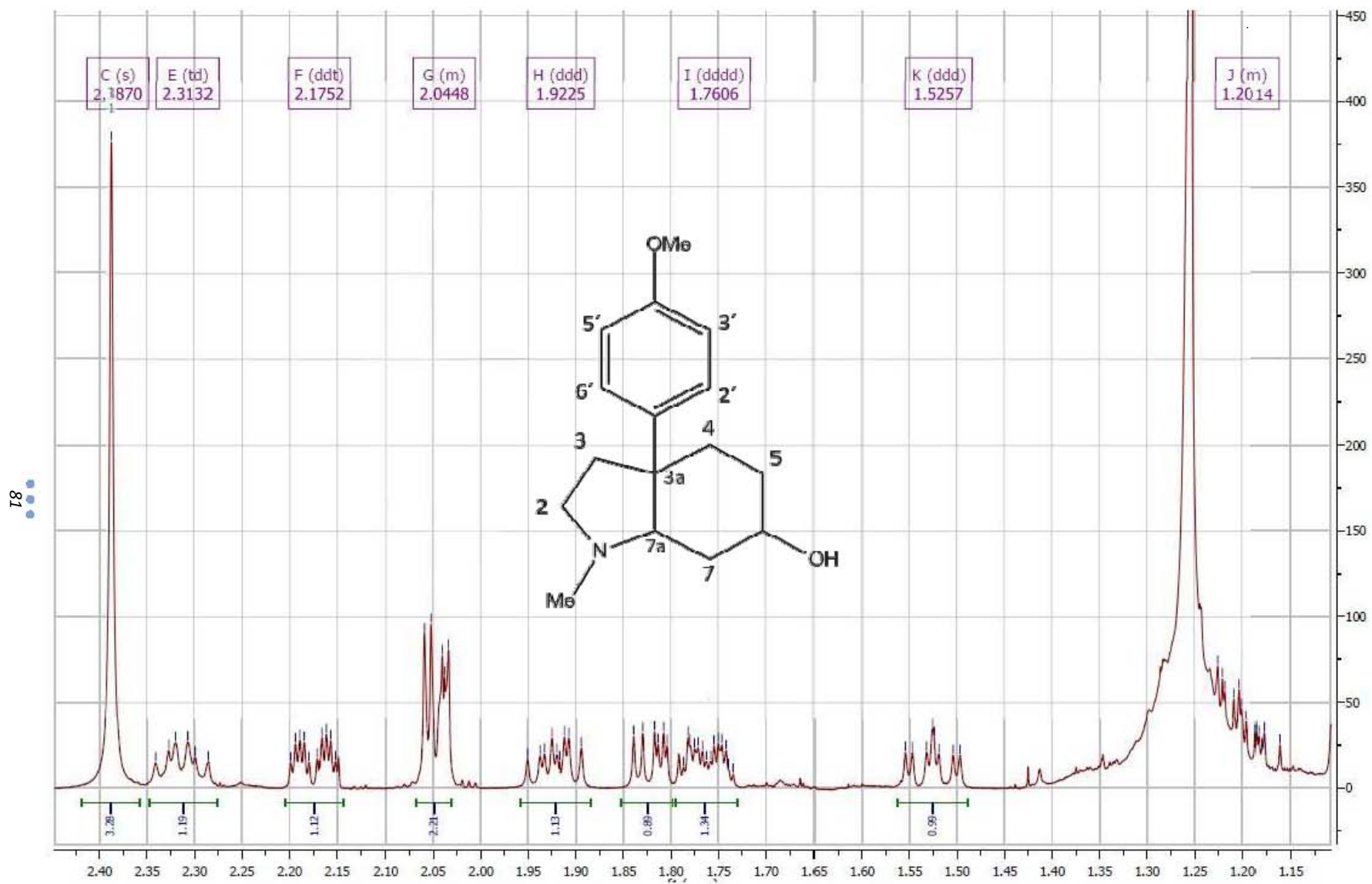


Figura 2.17. Espectro RMN- $H^1$  (500 MHz) del 3'-demetoximesembranol registrado en  $CDCl_3$

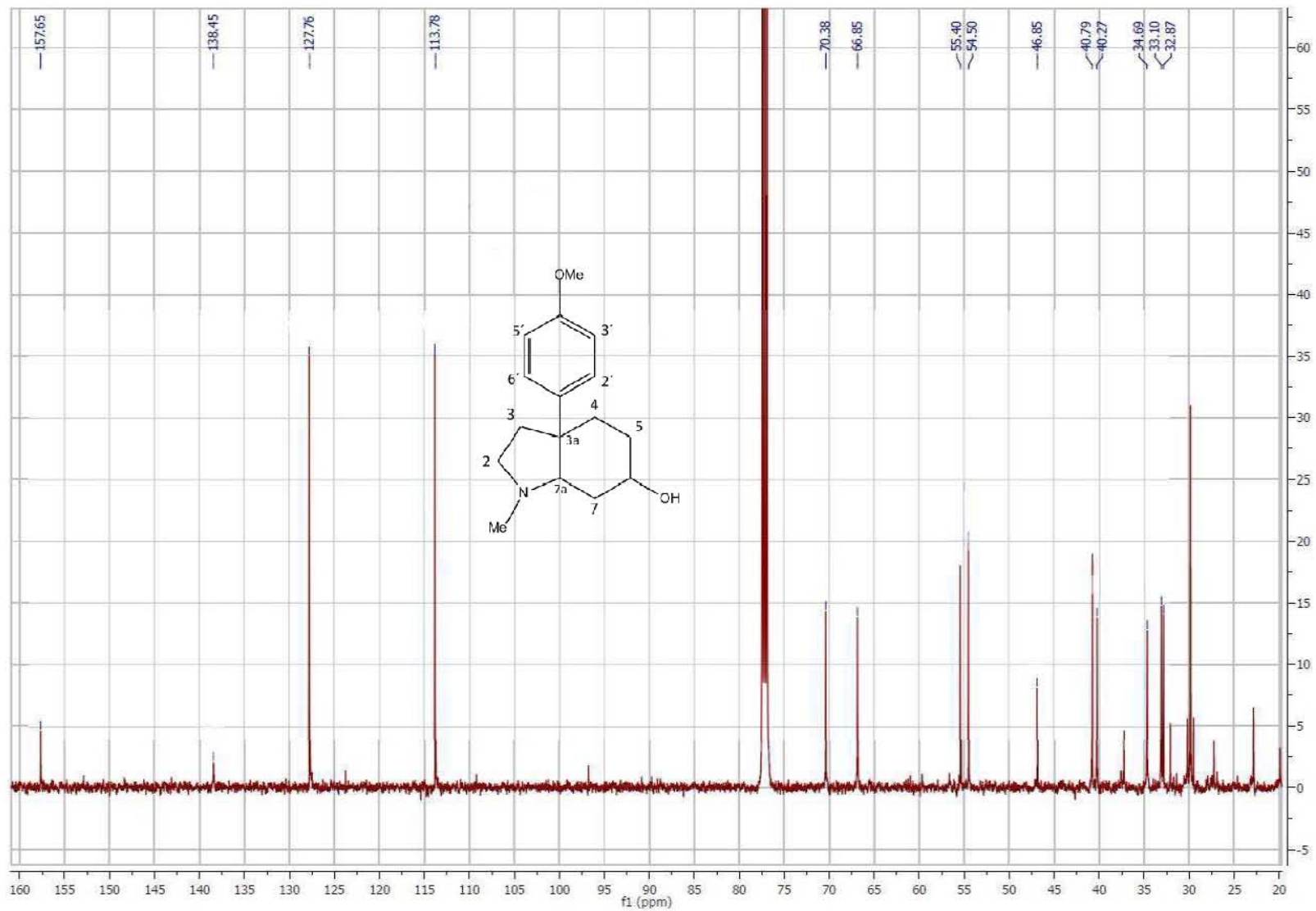
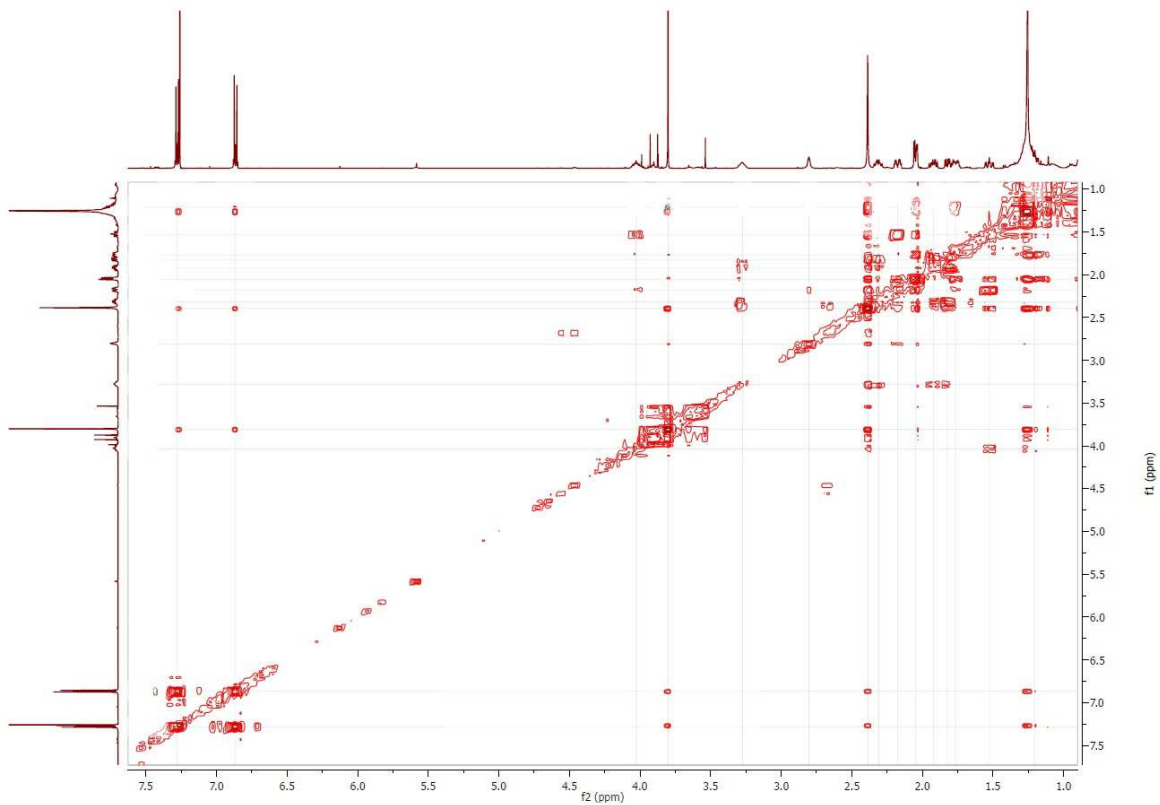
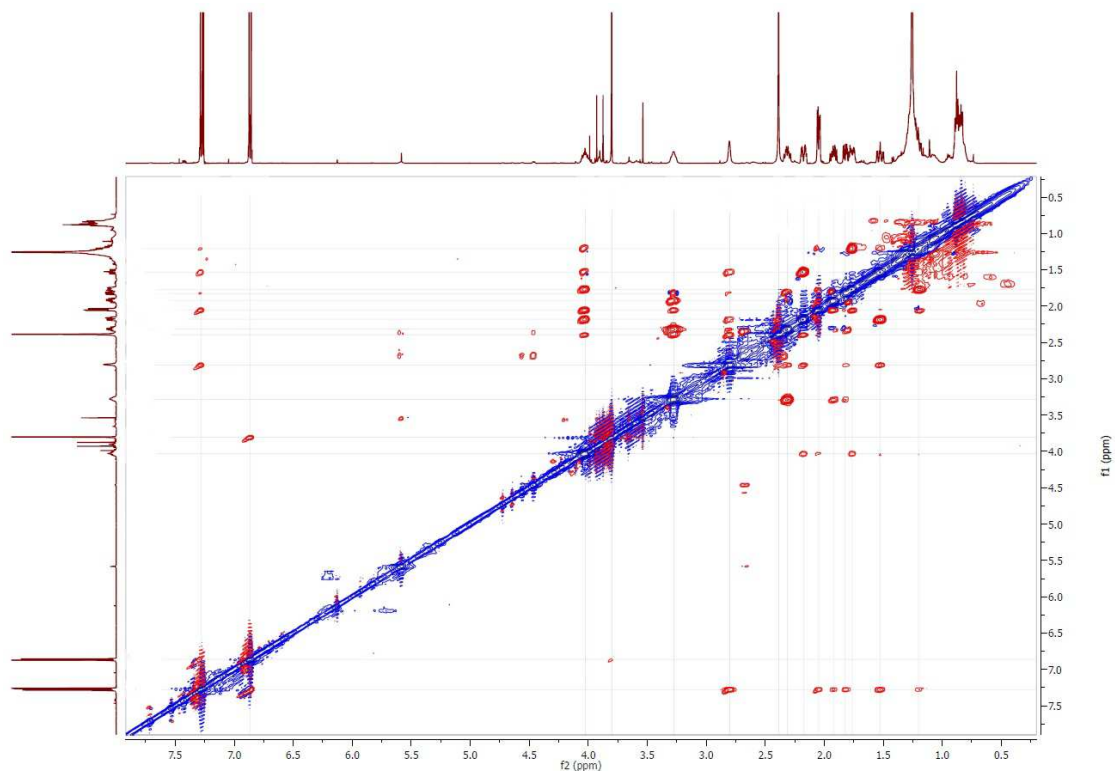


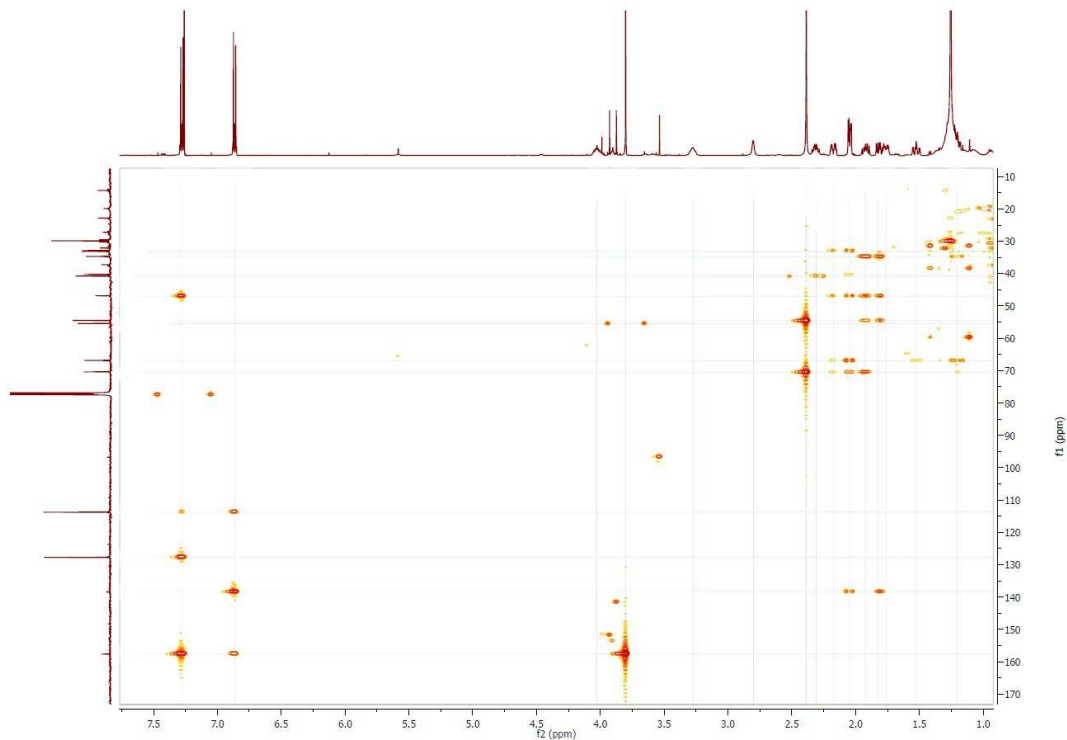
Figura 2.18. Espectro RMN- $^{13}\text{C}$  (400 MHz) del 3'-demetoximesembranol registrado en  $\text{CDCl}_3$



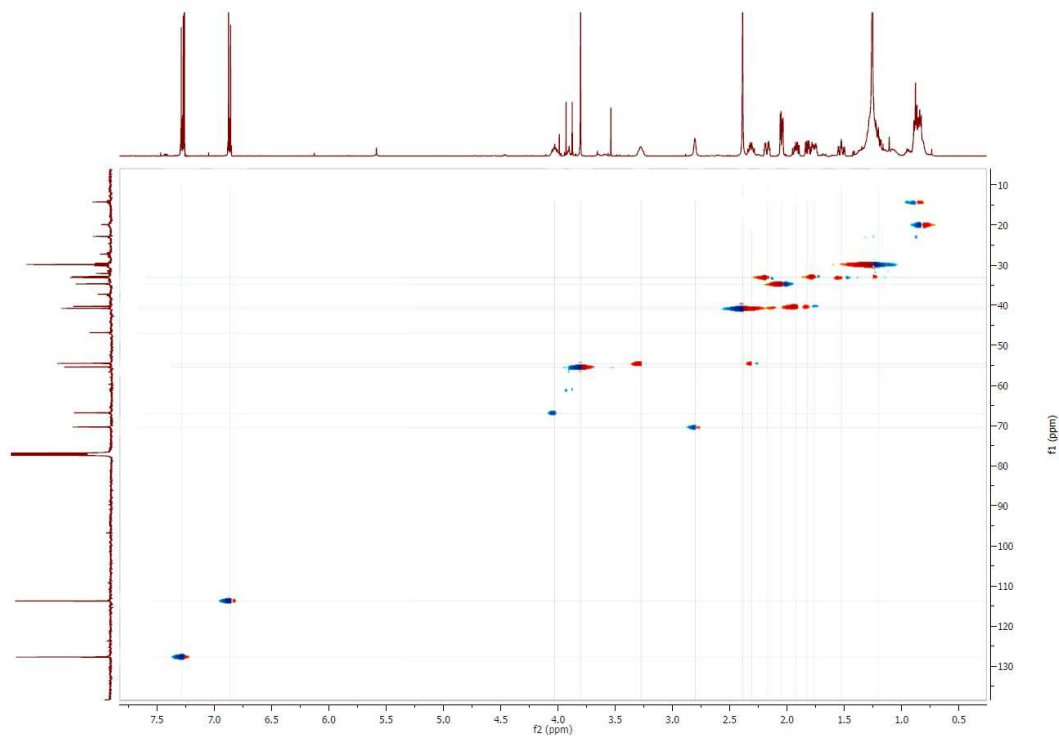
**Figura 2.19.** Espectro de correlación homonuclear RMN- $H^1$ -  $H^1$ , COSY (500 MHz) del 3'-demetoximesbranol registrado en  $CDCl_3$ .



**Figura 2.20.** Espectro de correlación homonuclear RMN- $H^1$ -  $H^1$ , NOESY (500 MHz) del 3'-demetoximesbranol registrado en  $CDCl_3$ .



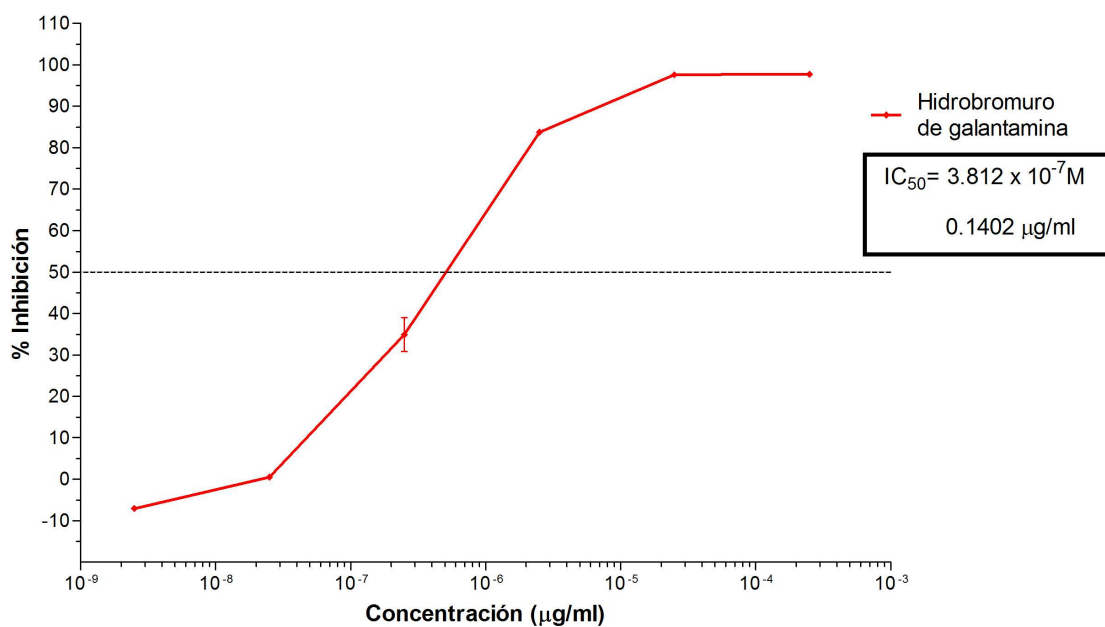
**Figura 2.21.** Espectro de correlación heteronuclear RMN- $H^1$ -  $C^{13}$ , HMBC (400 MHz) del 3'-demetoximesembranol registrado en  $CDCl_3$ .



**Figura 2.22.** Espectro de correlación heteronuclear RMN- $H^1$ -  $C^{13}$ , HSQC (400 MHz) del 3'-demetoximesembranol registrado en  $CDCl_3$ .

## Ensayo biológico

La capacidad de las muestras ensayadas para inhibir la acetilcolinesterasa, se determinó inicialmente a 25  $\mu\text{g/ml}$  y posteriormente mediante la concentración inhibitoria cincuenta ( $\text{CI}_{50}$ ), la cual indica la concentración en la que el extracto, fracción o compuesto logra el 50% de la inhibición de la enzima. Los valores obtenidos se compararon contra un estándar positivo, hidrobromuro de galantamina. Ese compuesto presentó un valor de  $\text{CI}_{50}$   $3.812 \times 10^{-7}$  M ( $0.14 \mu\text{g/ml}$ ) con un error estándar de 1.20 (Fig. 2.23).



**Figura 2.23.** Inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por el hidrobromuro de galantamina (control positivo).

Los valores son promedios  $\pm$  el error estándar,  $n = 3$ .

## ***Zephyranthes fosteri***

Los extractos metanólicos de las raíces, bulbos y flores probados a 25 µg/ml mostraron alta inhibición con 90, 85 y 60%, respectivamente, seguidas por las flores, partes aéreas y por último las hojas con menos del 50% de inhibición (Fig. 2.24). Las raíces tuvieron una  $CI_{50}$  de 3.50 µg/ml (Cuadro 2.13), seguidas de los bulbos una  $CI_{50}$  3.55 µg/ml. Con respecto a las fracciones alcaloideas (véase Pág. 50), el mejor fue el sobrenadante de los bulbos con una  $CI_{50}$  de 1.89 µg/ml (Cuadro 2.13). No se calculó la  $CI_{50}$  de las partes aéreas, flores, raíces, hojas y la pastilla de los bulbos pues la actividad inhibitoria no alcanzó el 50% de inhibición de la enzima (Fig. 2.25).

**Cuadro 2.13.** Concentración inhibitoria cincuenta ( $CI_{50}$ ); (µg/ml) de los extractos metanólicos de *Z. fosteri* en el ensayo de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa.

$CI_{50}$	Raíz	Bulbo	Hoja	Partes aéreas	Flor
<b>Extractos metanólicos</b>	3.50±0.41	3.55±0.86	>25	>25	>25
		Pastilla	Sobrenadante		
<b>Fracción alcaloidea FO2</b>	>25	>25	1.89±0.69	>25	>25

Los valores son promedios ± el error estándar, n = 3.

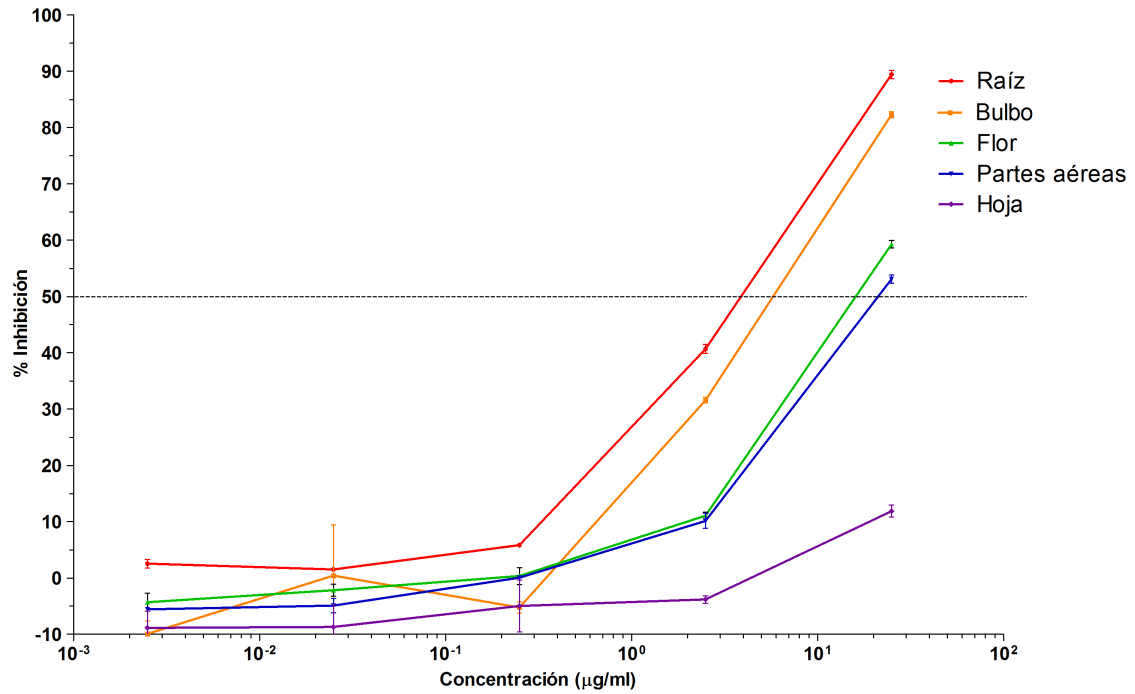


Figura 2.24. Inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por los extractos metanólicos de *Z. fosteri*.

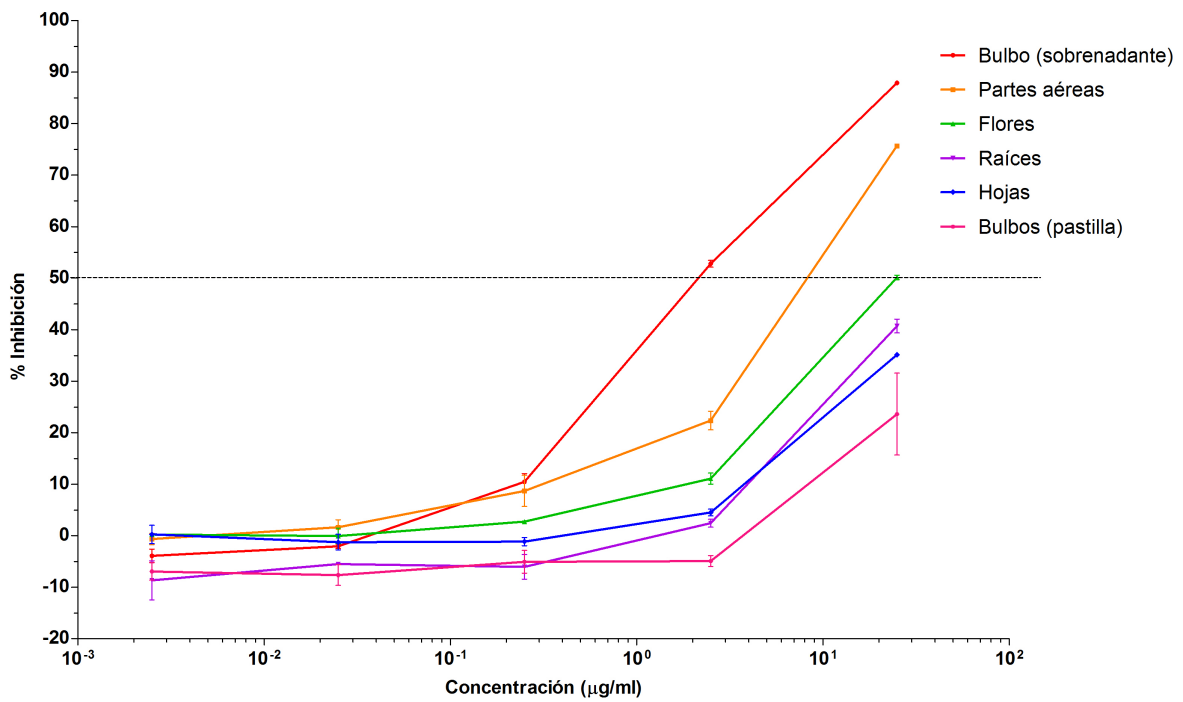


Figura 2.25. Inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por las fracciones alcaloideas de *Z. fosteri*.

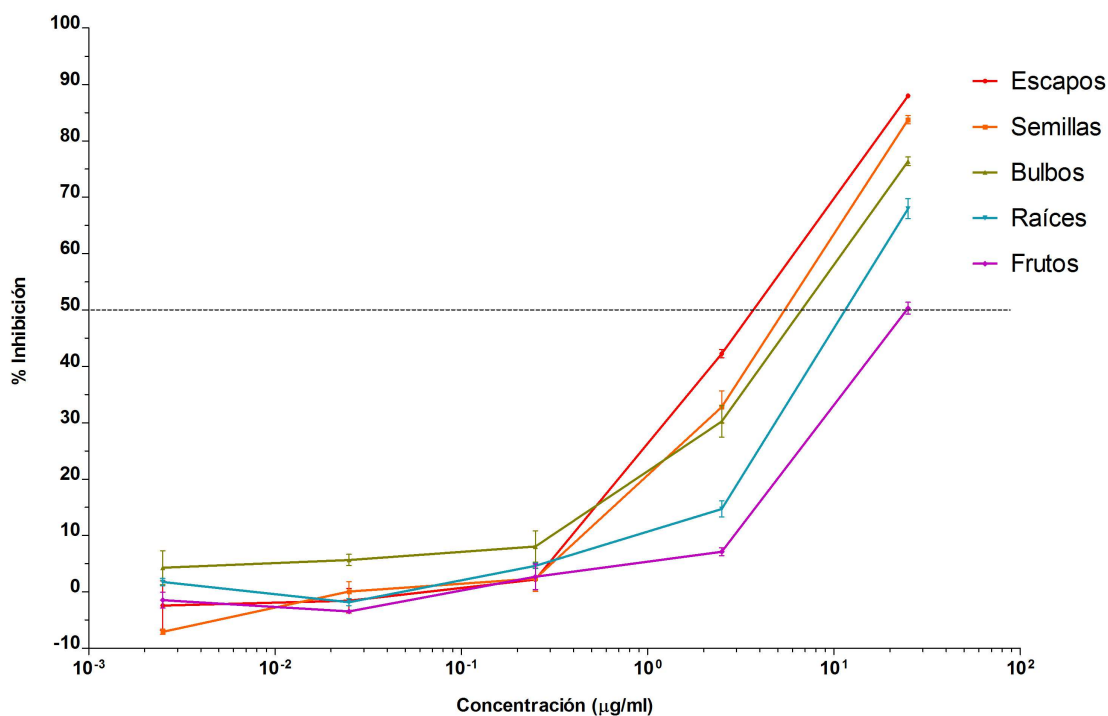
## ***Habranthus concolor***

Los extractos metanólicos de los escapos, semillas, bulbos y raíces probados a 25 µg/ml mostraron alta 90, 85, 75 y 65% de inhibición; seguidas de los frutos con menos de 50% de inhibición (Fig. 2.26). Los escapos presentaron una  $CI_{50}$  de 2.81 µg/ml, las semillas 5.95 µg/ml y los bulbos 6.29 µg/ml (Cuadro 2.14). La fracción alcaloidea de *H. concolor* no fue posible evaluarla en este estudio.

**Cuadro 2.14.** Concentración inhibitoria cincuenta ( $IC_{50}$ ); (µg/ml) de los extractos metanólicos de *H. concolor* en el ensayo de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa.

	<b>Escapo</b>	<b>Semillas</b>	<b>Bulbo</b>	<b>Raíces</b>	<b>Frutos</b>
<b><math>CI_{50}</math></b>	2.81±1.73	5.95±2.22	6.29±1.77	>25	>25

Los valores son promedios ± el error estándar, n = 3.

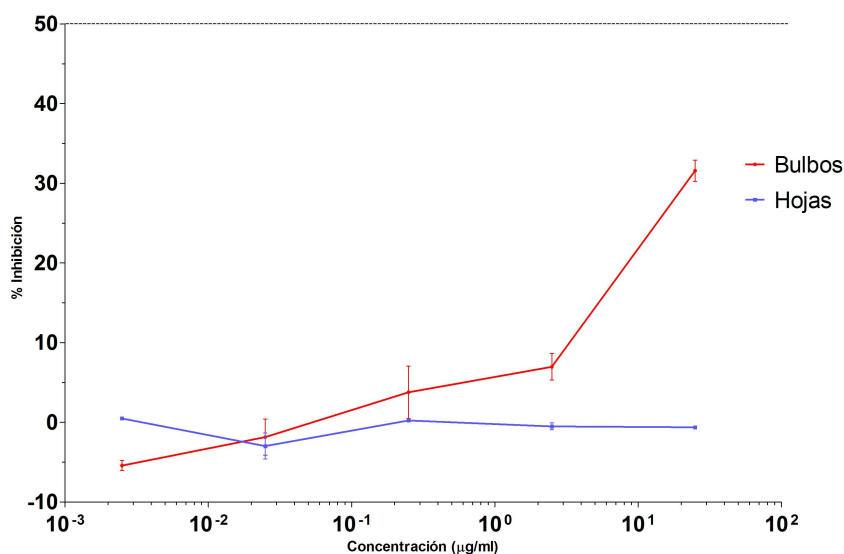


**Figura 2.26.** Inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por los extractos metanólicos de *H. concolor*.

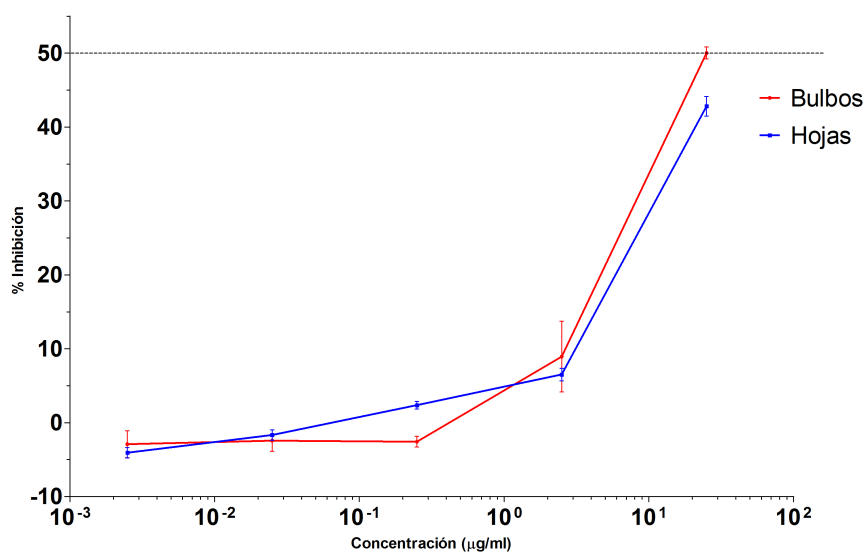


### ***Habranthus aff. concolor***

Solo los extractos metanólicos de los bulbos, probados a 25  $\mu\text{g/ml}$ , presentaron inhibición (30%); mientras que los de las hojas carecieron de actividad por lo que no se pudo calcular la  $\text{CI}_{50}$  (Fig. 2.27). Las fracciones alcaloideas de estos órganos a dicha concentración alcanzaron un 40-50% de inhibición de la enzima (Fig. 2.28).



**Figura 2.27.** Inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por los extractos metanólicos de *H. aff. concolor*.



**Figura 2.28.** Inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por las fracciones alcaloideas de *H. aff. concolor*.

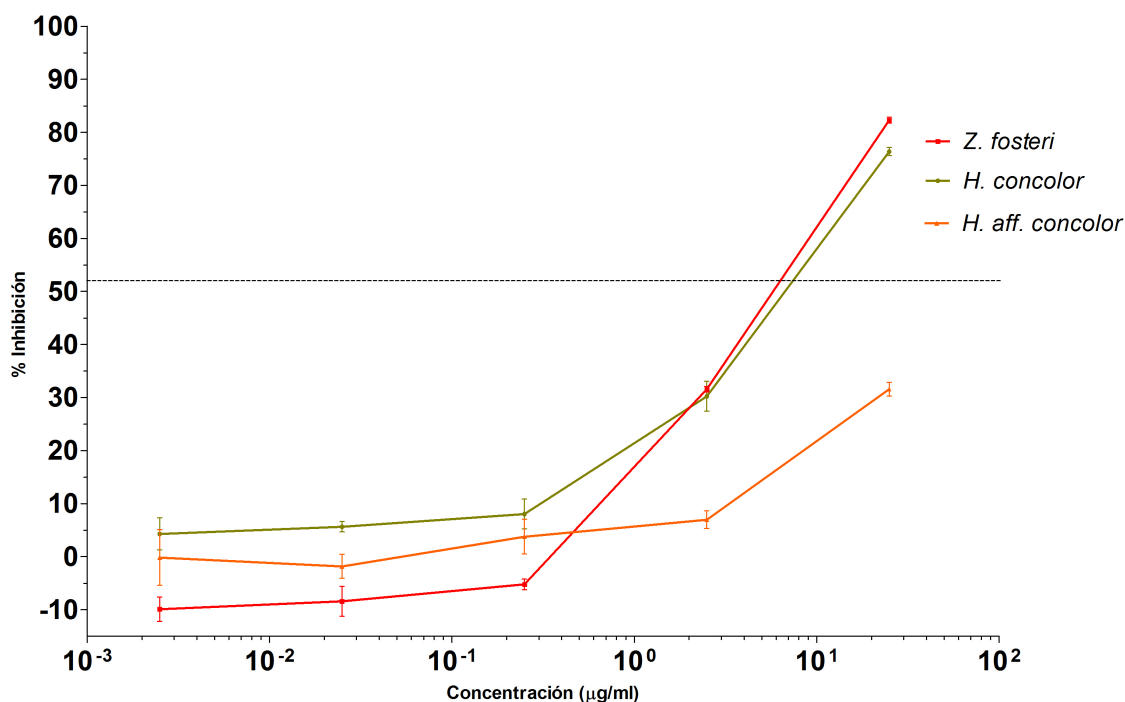
**Análisis comparativo de la actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa de los bulbos y hojas de los tres taxa**

Los extractos metanólicos de los bulbos de *Z. fosteri* probados a 25 µg/ml mostraron alta actividad con una  $CI_{50}$  de 3.55 µg/ml, seguidas por *H. concolor* con una  $CI_{50}$  de 6.29 µg/ml y por último *H. aff. concolor* con menos del 50% de inhibición a dicha concentración, por lo cual no fue posible calcular la  $IC_{50}$  (Cuadro 2.15); (Fig. 2.29).

**Cuadro 2.15.** Concentración inhibitoria cincuenta ( $CI_{50}$ ); (µg/ml) de extractos metanólicos de los bulbos de *Z. fosteri*, *H. concolor* y *H.aff. concolor* en el ensayo de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa.

$CI_{50}$	Bulbos		
	<i>Z. fosteri</i>	<i>H. concolor</i>	<i>H.aff. concolor</i>
	3.55±0.86	6.297±1.77	>25

Los valores son promedios ± el error estándar, n = 3.



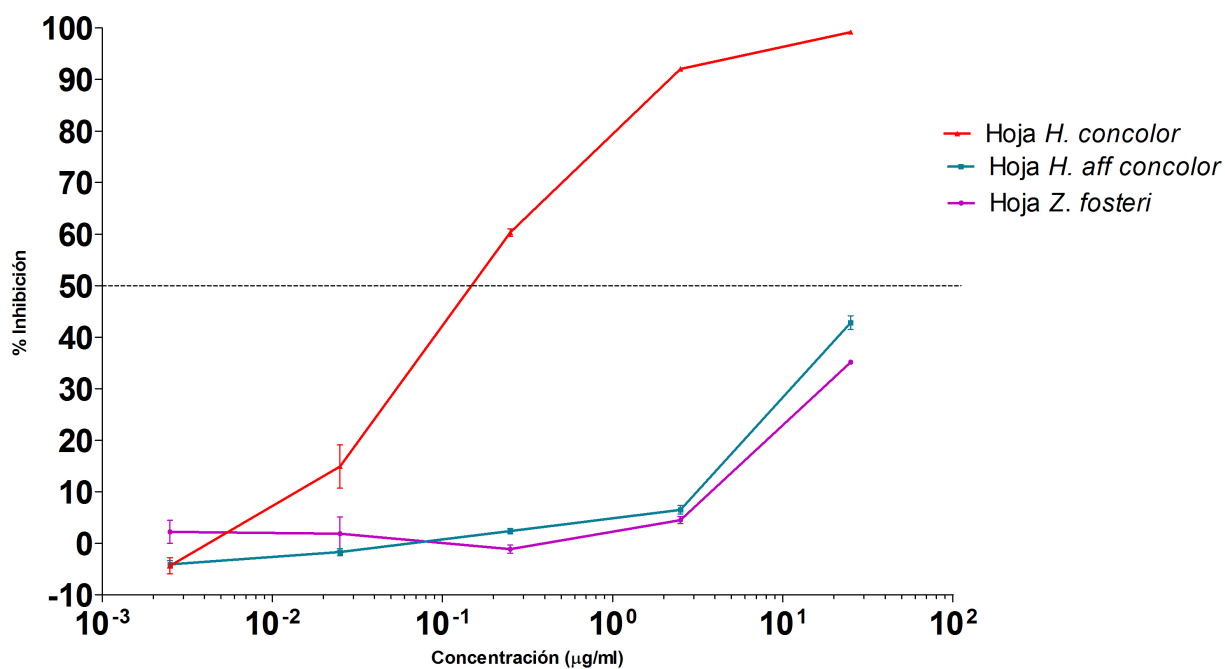
**Figura 2.29.** Inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por los extractos metanólicos de los bulbos de *Z. fosteri*, *H.aff. concolor* y *H. concolor*.

La fracción alcaloidea de las hojas de *H. concolor* probados a 25 µg/ml mostró alta actividad con el 100% de inhibición, presentó una  $CI_{50}$  de 0.13 µg/ml (Cuadro 2.16); seguidas con menos del 50% de inhibición, *Z. fosteri* y *H. aff. concolor* (Fig. 2.30).

**Cuadro 2.16.** Concentración inhibitoria cincuenta ( $CI_{50}$ ) (µg/ml) de extractos metanólicos de los bulbos de *Z. fosteri*, *H. concolor* y *H.aff. concolor* en el ensayo de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa.

	Hojas		
	<i>Z. fosteri</i>	<i>H. concolor</i>	<i>H.aff. concolor</i>
$CI_{50}$	>25	0.13±1.525	>25

Los valores son promedios ± el error estándar, n = 3.



**Figura 2.30.** Inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por las fracciones alcaloideas de las hojas de *Z. fosteri*, *H.aff. concolor* y *H. concolor*.

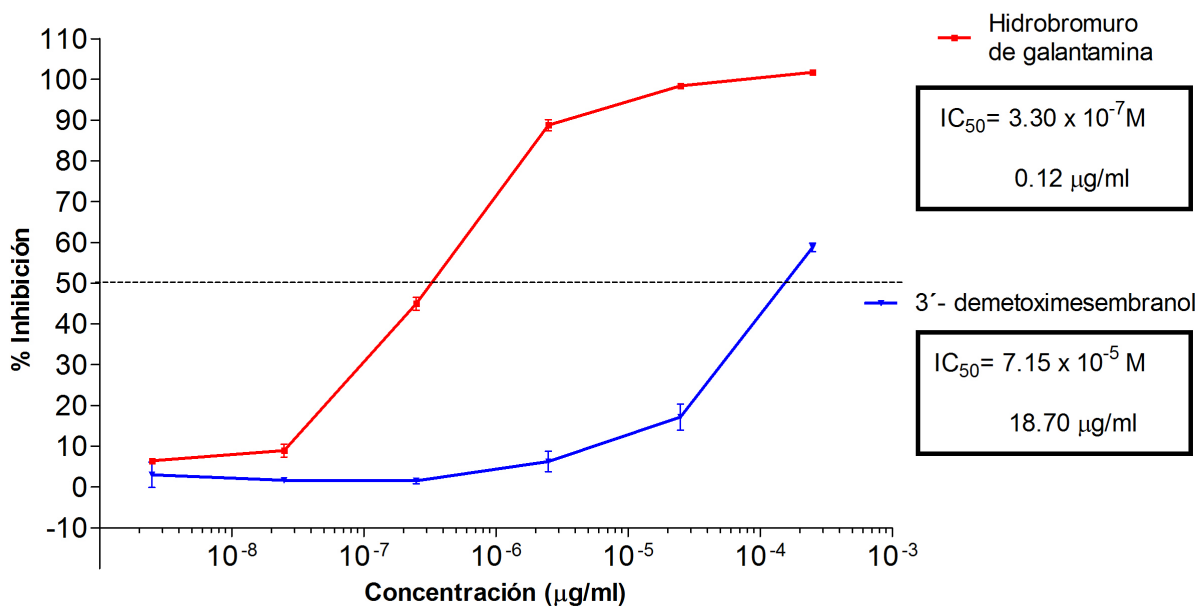
### 3'-demetoximesembranol e hidrobromuro de galantamina

El compuesto mayoritario de los bulbos de *Z. fosteri* presentó una  $CI_{50}$  de  $7.15 \times 10^{-5}M$  (18.70  $\mu g/ml$ ); mientras que el hidrobromuro de galantamina presentó una  $CI_{50}$  de  $3.30 \times 10^{-7}M$  (0.12  $\mu g/ml$ ); (Cuadro 2.17); (Fig. 2.31). Se ha reportado que la galantamina presenta una  $CI_{50}$  de  $5.16 \pm 1.08 \times 10^{-6}M$  (1.48  $\mu g/ml$ ) (Reyes-Chilpa *et al.*, 2011).

**Cuadro 2.17.** Concentración inhibitoria cincuenta ( $CI_{50}$ ) ( $\mu g/ml$ ) de los compuestos en el ensayo de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa.

$CI_{50}$	Compuestos	
	3'-demetoximesembranol	Hidrobromuro de galantamina
	18.70±1.45	0.12±1.00

Los valores son promedios  $\pm$  el error estándar, n = 3.



**Figura 2.31** Inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por el 3'-demetoximesembranol.

## Discusión

Los extractos y fracciones alcaloideas de los tres taxa presentaron perfiles químicos diferentes (Cuadros 2.3 a 2.8). *Zephyranthes fosteri* presentó como compuesto mayoritario licorina, seguido del alcaloide con  $m/z$  189 (261), el cual fue identificado como 3'-demetoximesembranol. Los alcaloides mayoritarios de *Habranthus concolor* fueron principalmente galantamina y clidantina. *Habranthus aff. concolor*, presentó principalmente licorina y un alcaloide no identificado con  $m/z$  175 (274).

Los alcaloides identificados de *Z. fosteri* son de tipo Amaryllidaceae (esqueletos tipo licorina, homolicorina, tazetina, etc.); sin embargo, el 3'-demetoximesembranol, el segundo alcaloide mayoritario, es de tipo mesembrano. Con base en una revisión bibliográfica, se estableció que el 3'-demetoximesembranol no se ha reportado previamente. Se trata de un nuevo compuesto. En este trabajo se reporta por primera vez la presencia de un alcaloide con esqueleto mesembrano en especies del género *Zephyranthes*. El 3'-demetoximesembranol mostró buena actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa, aunque su  $CI_{50}$  es 10 y 100 veces menor que la galantamina (Reyes-Chilpa *et al.*, 2011) y el hidrobromuro de galantamina, respectivamente. Es interesante hacer notar que un compuesto relacionado, la mesembrenona no presentó actividad contra la acetilcolinesterasa (López *et al.*, 2002), lo cual sugiere que la presencia de un grupo OH, la ausencia de un metoxilo y el doble enlace son importantes para la actividad biológica.

Los alcaloides del tipo mesembrano son comunes en especies de *Sceletium* de la familia Aizoaceae (Jeffs, 1981); sin embargo, la presencia ocasional de este tipo de alcaloides en

Amaryllidaceae está documentado. Algunos ejemplos son: a) el mesembrenol presente en *Crinum oliganthum*, b) los alcaloides tipo mesembrina en *Narcissus pallidulus* (Bastida *et al.*, 1989) y c) la mesembrenona en especies de *Narcissus* (Pigni *et al.*, 2013). La investigación de alcaloides tipo mesembrano se inició debido a que especies de *Scelletium* forman parte de un preparado usado en la medicina tradicional en África del Sur (Popelak y Lettenbauer, 1967; Smith *et al.*, 1996). Estos alcaloides mostraron una notable actividad como inhibidores de la recaptación de la serotonina, lo que les confiere potencial como antidepresivos (Gericke y Viljoen, 2008; Harvey *et al.*, 2011).

La licorina fue el único alcaloide que si estuvo presente en las tres plantas; sin embargo su concentración varió entre ellas y dependiendo del órgano. En *Z. fosteri*, se presentó mayoritariamente en las raíces (68%) y bulbos (61%), en *H. concolor* en las raíces (7.56%) y semillas (7.87%) y en *H. aff. concolor* en el bulbo (23%). La licorina es uno de los alcaloides más abundantes en especies de Amaryllidaceae y presenta un amplio rango de actividad biológica como: actividad citotóxica (Cabezas *et al.*, 2013), antitumoral (Li *et al.*, 2007), emético, analgésico, antiinflamatorio, estimulante respiratorio, expectorante (Cabezas *et al.*, 2007), antimicrobiano y antioxidante (Brandt, 2007).

En el caso de *H. concolor*, se encontraron tres alcaloides que no habían sido previamente descritos (Berkov *et al.*, 2008; Reyes-Chilpa *et al.*, 2011): N-demetilgalantamina, 8-O-demetilmaritidina y un alcaloide desconocido con  $m/z$  165 (269), los cuales se encontraron en bulbos y raíces. La galantamina fue el alcaloide mayoritario en todos los órganos estudiados, principalmente en la fracción alcaloidea de los bulbos (80%). La clidantina también estuvo

presente en una cantidad considerable, principalmente en los extractos metanólicos del escapo (25%). La sanguinina se detectó principalmente en las fracciones alcaloides del escapo (17.64%), así como en los extractos metanólicos del bulbo (8.79%) y raíces (2.88%).

La galantamina es el compuesto más importante desde punto de vista farmacológico, aunque la sanguinina ha mostrado una alta inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, incluso mayor que la galantamina (López *et al.*, 2002). La clidantina inhibe la acetilcolinesterasa, pero su actividad es cinco veces menor que la galantamina (Reyes-Chilpa *et al.*, 2011). Finalmente, la narwedina, tiene un esqueleto tetrahydrobenzazepina (Hernández, 2007) lo que estructuralmente le confiere la posibilidad de ser un precursor de la ruta biosintética de la galantamina (Heldt, 2005).

En *H. aff. concolor*, además de la licorina, el compuesto desconocido con  $m/z$  175 (247), presente en las hojas (19%) fue mayoritario, por lo que sería interesante poder aislarlo e identificarlo. La tazetina está presente en hoja y bulbo en concentraciones similares (12.59%), se ha reportado que tiene actividad como hipotensor débil y antitumoral (Cabezas *et al.*, 2007).

La presencia y/o ausencia de los alcaloides identificados constituye una huella digital para cada taxa. De todos los alcaloides detectados en los extractos y fracciones alcaloidales de los diferentes órganos, *Z. fosteri* y *H. concolor* sólo presentaron dos alcaloides comunes, lo cual apoya la consideración taxonómica de que son especies pertenecientes a géneros distintos. Por otra parte *Z. fosteri* y *H. aff concolor* coincidieron en 10 alcaloides, lo cual apoya que están emparentados desde el punto de vista quimiotaxonómico. Finalmente *H. concolor* y *H. aff*

*concolor* solo coincidieron en un solo alcaloide (Cuadro 2.9), por lo cual tienen parentesco más lejano.

En los tres taxa, los extractos de los bulbos presentaron el mayor número de alcaloides (ver Anexos) y en el ensayo biológico presentaron mayor actividad respecto al de otros órganos (Figs. 2.24 a 2.28). Al comparar la actividad de los extractos metanólicos, los bulbos de *Z. fosteri* fue el más potente con una  $CI_{50}$  de 3.55  $\mu\text{g/ml}$  (Cuadro 2.15; Fig. 2.29). En dicho extracto, un ácido graso, el ácido linoleico (9,12-ácido octadecadienoico (Z,Z)-, metil ester ), así como los alcaloides, licorina y el 3'-demetoximesembranol fueron los compuestos con mayor abundancia relativa. De éstos, sólo el 3'-demetoximesembranol inhibe la acetilcolinesterasa ya que la licorina es inactiva (López *et al.*, 2002, Reyes-Chilpa *et al.*, 2011). Es por ello que la alta actividad del extracto de los bulbos de *Z. fosteri*, probablemente podría deberse al sinergismo de los alcaloides y otros compuestos presentes en el extracto.

Se comparó la actividad inhibitoria de las fracciones alcaloideas de las hojas de los tres taxa, *H. concolor* mostró muy alta actividad con una  $CI_{50}$  de 0.13  $\mu\text{g/ml}$  (Cuadro 2.16; Fig. 2.30), seguidas por *Z. fosteri* y el híbrido con muy baja actividad. La galantamina y clidantina fueron los alcaloides con mayor abundancia relativa (47 y 41%, respectivamente); (Cuadro 2.6) y ambos son conocidos por inhibir la acetilcolinesterasa (Reyes-Chilpa *et al.*, 2011). Por el contrario, los ensayos con la fracción alcaloidea de las hojas de *Z. fosteri* sugieren que los alcaloides con mayor abundancia relativa (norlicoramina y 2-metoxialbomaculina) no inhiben esta enzima. Igual situación ocurriría en el caso de *H. aff. concolor* cuyas extractos alcaloideos de las hojas presentaron mayor abundancia relativa del  $m/z$  175 (247), tazetina y galantindol.



## Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos se formulan las siguientes conclusiones.

1. El perfil alcaloideo de *H. concolor* y *Z. fosteri* fue muy diferente, indicando que pertenecen efectivamente a géneros diferentes; sin embargo, el híbrido y *Z. fosteri* presentaron numerosos alcaloides comunes indicando que están estrechamente emparentados.
2. Los tres taxa presentaron licorina, pero el único que presentó galantamina fue *H. concolor*.
3. El compuesto con  $m/z$  189 (261) aislado de los bulbos de *Z. fosteri* fue identificado por RMNH, como 3'-demetoximesembranol y se trata de un compuesto nuevo, el cual es un alcaloide tipo mesembrano característico de las Aizoaceae.
4. En el ensayo biológico el compuesto 3'-demetoximesembranol presentó un  $CI_{50}$  aceptable pero no sobresaliente en comparación con el hidrobromuro de galantamina.
5. En los extractos metanólicos de los bulbos, *Z. fosteri* fue más potente inhibiendo la acetilcolinesterasa; sin embargo, en las fracciones alcaloideas de las hojas *H. concolor* superó notablemente a los otros dos taxa.
6. La identificación de los alcaloides mayoritarios desconocidos podría ser de interés desde el punto de vista quimotaxonómico y farmacológico como el  $m/z$  175(247) en *H. aff. concolor* y el  $m/z$  165(269) en *H. concolor*.

## Literatura citada

Aso, E. 2005. Demencias, investigación y diagnóstico. Elsevier. España.

Bastida, J., Viladomat, F., Llabrés, J., Ramírez, G., Codina, C. y Rubiralta, M. 1989. Narcissus alkaloids, VIII. Mesembrenone: An unexpected alkaloid from *Narcissus pallidulus*. *Journal of Natural Products* 52: 478-480.

Bartolucci, C., Perola, E., Pilger, C., Fels, G. y Lamba, D. 2001. Three-dimensional structure of a complex of *Galanthamine* (Nivalin®) with acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Proteins* 42: 182-191.

Bartus, B., Dean, R., Beer, B. y Lippa, A. 1982. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217: 408-17.

Berkov S., Codina C., Viladomat F. y Bastida J. 2007. Alkaloids from *Galanthus nivalis*. *Phytochemistry* 68: 1791-1798.

Berkov, S. Bastida, J. Nikolova, M. Viladomat, F. y Codina, C. 2008. Rapid TLC/GC-MS identification of acetylcholinesterase inhibitors in alkaloid extracts. *Phytochemical Analysis* 19: 411-419.

Brand, R. 2007. Estudio químico e farmacológico em *Hippeastrum morelianum* Lem. E *Hippeastrum santacatarina* (Traub) Dutilh: duas especies de Amaryllidaceae. Tesis de Maestría. Universidad Federal de Río Grande del Sur. Porto Alegre.

Cabezas, F., Argoti, J., Martínez, S., Codina, C., Bastida, J. y Viladomat, F. 2007. Alcaloides y actividad biológica en *Eucharis amazonica*, *E. grandiflora*, *Caliphruria subedentata* y *Crinum kunthianum*, especies colombianas de Amaryllidaceae. *Scientia et Technica* 33: 237-241.

Cabezas, F., Pigni, N., Bastida, J., Codina, C. y Viladomat F. 2013. Análisis del contenido alcaloidico de *Caliphruria subedentata* Baker (Amaryllidaceae) por el método CG-EM. *Revista Latinoamericana de Química* 41: 68-73.

Cano-Santana, Z., Castillo-Argüero, S., Martínez-Orea, Y. y Juárez-Orozco, S. 2008. Análisis de la riqueza vegetal y el valor de conservación de tres áreas incorporadas a la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, Distrito Federal (México). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 82: 1-14.

Castillo-Argüero, S., Montes-Cartas, G., Romero-Romero, M., Martínez-Orea, Y., Guadarrama-Chávez, P., Sánchez-Gallén, I. y Núñez-Castillo O. 2004. Dinámica y conservación de la flora del matorral xerófilo de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (D.F. México). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 74: 51-75.

Damián-Domínguez, M., Cano-Santana, Z. y Castellanos-Vargas, I. 2009. Fenología reproductiva de *Habranthus concolor* y *H. aff. concolor* (Amaryllidaceae) y su relación con la lluvia. En: Lot, A. y Cano-Santana, Z. Biodiversidad del ecosistema del Pedregal de San Ángel. Coordinación de la Investigación Científica y Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel. Ciudad de México. Pp. 319-328.

Damián-Domínguez, M. de J. 2010. Fenología reproductiva de *Habranthus concolor* y *Habranthus aff. concolor* en la reserva ecológica del Pedregal de San Ángel, D. F. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. Ciudad de México.

Geoghegan, K. y Evans, P. 2013. Double reduction of cyclic aromatic sulfonamides: synthesis of (+)-mesembrine and (+)-mesembranol. *The Journal of Organic Chemistry* 78: 3410–3415.

Gericke, N., Van Wyk, B. 2001. Pharmaceutical compositions containing mesembrine and related compounds. US Patent: 6288104.

Harvey, A., Young, L., Viljoen, A. y Gericke, N. 2011. Pharmacological actions of the South African medicinal and functional food plant *Sceletium tortuosum* and its principal alkaloids. *Journal of Ethnopharmacology* 137: 1124–1129.

Hernández, J. 2007. Preparación de nuevas N-bencilcinamidas en condiciones de química verde y estudio de su transformación hacia la obtención de nuevas 5-fenil-1, 2, 4, 5-tetrahidro-2-benzazepin-3-onas. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga.

Herrera, Ma. del R. 2001. Aislamiento y elucidación estructural de alcaloides de la familia Amaryllidaceae. Tesis de doctorado. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. Barcelona.

Heldt, H. 2005. Plant Biochemistry. 3ra. edition. Elsevier Academic Press. Burlington.

Jeffs, P. 1981. *Sceletium* alkaloids. En: Manske, R. y Rodrigo R. Eds. The alkaloids. Academic Press, Nueva York. Vol. 19. Pp. 1-80.

Johnson, N., Davis, T. y Bosanquet, N., 2000. The epidemic of Alzheimer's disease; how can we manage the costs? *Pharmacoeconomics* 18: 215–223.

Ingkaninan, K., Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T. y Thongnoi, W. 2003. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *Journal of Ethnopharmacology* 89: 261–264.

Li, Y., Liu, J., Tang, L., Shi, Y., Ren, W. y Hu, W., 2007. Apoptosis induced by lycorine in KM3 cells is associated with the G0/G1 cell cycle arrest. *Oncology Reports* 17: 377-384.

López, S., Bastida, J., Viladomat, F. y Codina, C. 2002. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sciences* 71: 2521-2529.

Mosquera, M., Niño, J., Milena, Yaned. y Hernández, J. 2004. Detección *in-vitro* de inhibidores de la acetilcolinesterasa en extractos de cuarenta plantas de la flora colombiana mediante el método cromatográfico de Ellman. *Scientia et Technica* 26: 155-160.

Pigni, N., Ríos-Ruiz, S., Luque, J., Viladomat F., Codina, C. y Bastida, J. 2013. Wild daffodils of the section *Ganymedes* from the Iberian Peninsula as a source of mesembrine alkaloids. *Phytochemistry* 95: 384–393.

Pettit, G., Cragg, G., Singh, S., Duke, J. y Doubek, D. 1990. Antineoplastic Agents, 162. *Zephyranthes candida*. *Journal of Natural Products* 53: 176-178.

Pettit, G., Gaddamidi, V. y Cragg, G. 1984. Antineoplastic agents, 105. *Zephyranthes grandiflora*. *Journal of Natural Products* 47: 1018-1020.

Perry, E. 1986. The cholinergic hypothesis: ten years on. *British Medical Bulletin* 9: 42-63.

Popelak, A. y Lettenbauer, G., 1967. The mesembrine alkaloids. En: Manske, R. Ed. *The Alkaloids: Chemistry and Physiology*. Elsevier Academic Press Inc., Amsterdam. Pp. 467–482.

Reyes-Chilpa, R., Berkov, S., Codina, C., Viladomat, F., Bastida, J., Jankowski, C., Arseneau, S., Hernández-Ortega, S., Clotet-Codina, I. y Esté, A. 2011. Acetylcholinesterase-inhibiting alkaloids from *Zephyranthes concolor*. *Molecules* 16: 9520-9533.

Singh, A. 2003. The role of natural products in pharmacotherapy of Alzheimer disease. *Ethnobotanical Leaflets* 7: 1-5.

Smith, M., Crouch, N., Gericke, N. y Hirst, M. 1996. Psychoactive constituents of the genus *Sceletium* N .E. Br. and other Mesembryanthemaceae: a review. *Journal of Ethnopharmacology* 50: 119–130.

Sramek, J., Zarotsky, V. y Cutler, N. 2002. Review of drug development and therapeutic role of cholinesterase inhibitors in Alzheimer disease. *Drug Development Research* 56: 347-353.

Szlávik, L., Gyuris, A., Minárovits, J., Forgo, P., Molnár, J. y Hohmann, J. 2004. Alkaloids from *Leucojum vernum* and antiretroviral activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Medica* 70: 871-873.

## CONCLUSIONES GENERALES

---

1. Los principales caracteres anatómicos que distinguen *Z. fosteri* de *H. concolor* son: a) grosor del mesofilo y diámetro del escapo, b) presencia de costillas y la forma estriada de la cutícula en *Z. fosteri*, y c) la ausencia de parénquima en empalizada en *H. concolor*.
2. Los alcaloides mayoritarios de *Z. fosteri* fueron la licorina y un compuesto nuevo, el 3'-demetoximesembranol. Para *H. concolor* fueron galantamina y clidantina. El híbrido presentó licorina y un alcaloide cuyo espectro de masas presentó el pico base y el ión molecular en  $m/z$  175 (247), respectivamente.
3. El perfil alcaloideo de *H. concolor* y *Z. fosteri* fue muy diferente, indicando que pertenecen efectivamente a géneros diferentes.
4. El posible híbrido (*H. aff. concolor*) presentó un mayor número de alcaloides comunes con *Z. fosteri* que con *H. concolor*, indicando que tiene mayor parentesco con la segunda especie.
5. Se encontraron elementos a nivel anatómico y químico que apoyan la propuesta de que *H. aff. concolor* es un híbrido de las especies parentales *Z. fosteri* y *H. concolor*.
6. El extracto metanólico de los bulbos de *Z. fosteri* presentó la mayor actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa, comparado con otros extractos.
7. El compuesto 3'-demetoximesembranol mostró actividad inhibitoria relevante de la acetilcolinesterasa, aunque menor en comparación con el fármaco de referencia, el hidrobromuro de galantamina.

## LITERATURA CITADA:

---

Alarcón, D. 2000. Hibridación natural entre laurel (*Laurelia sempervirens*) y tepa (*L. philippiana*, *Laureliopsis philippiana*). Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad Austral de Chile. Valdivia.

Alves-Araújo, A. y Alves, M. 2005. Anatomical features of three species of Amaryllidaceae from North-Eastern Brazil. *Herbertia* 59: 94-106.

Anderson, E. 1948. Hybridization of the habitat. *Evolution* 2: 1-9.

Arnold, M. 1997. Natural hybridization and evolution. Oxford University Press, Nueva York.

Aso, E. 2005. Demencias, investigación y diagnóstico. Elsevier. España.

Bastida, J., Lavilla, R. y Viladomat, F. 2006. Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. *The Alkaloids: Chemistry and Biology* 63: 87-179.

Bate, E. 1968. Chemistry and taxonomy of plants, systematics association special. vol. 2. En: Hawkes J. Ed. Chemotaxonomy and serotaxonomy. Academic Press. Pp. 193-199.

Calderón, G. y Rzedowski, J. 2005. Flora fanerogámica del Valle de México. Co-edición entre el Instituto de Ecología, A. C. y la Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán.

Cano-Santana, Z., Castillo-Arguero, S., Martínez-Orea, Y. y Juárez-Orozco, S. 2008. Análisis de la riqueza vegetal y el valor de conservación de tres áreas incorporadas a la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, Distrito Federal (México). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 82: 1-14.

Castillo-Argüero, S., Montes-Cartas, G., Romero-Romero, M., Martínez-Orea, Y., Guadarrama-Chávez, P., Sánchez-Gallén, I. y Núñez-Castillo O. 2004. Dinámica y conservación de la flora del matorral xerófilo de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (D.F. México). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 74: 51-75.

CONAPO. 2005. <http://www.conapo.gob.mx/publicaciones/enveje2005/enveje02.pdf>

Página visitada: Febrero/2013.

Damián-Domínguez, M., Cano-Santana, Z. y Castellanos-Vargas, I. 2009. Fenología reproductiva de *Habranthus concolor* y *H. aff. concolor* (Amaryllidaceae) y su relación con la lluvia. En: Lot, A. y Cano-Santana, Z. Eds. Biodiversidad del Ecosistema del Pedregal de San Ángel. Coordinación de la Investigación Científica y Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel. Ciudad de México. Pp. 319-328.

Damián-Domínguez, M. de J. 2010. Fenología reproductiva de *Habranthus concolor* y *Habranthus aff. concolor* en la reserva ecológica del Pedregal de San Ángel, D. F. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. Ciudad de México.

Dickison, W. C. 1989. Step toward the natural system of the dicotyledons: vegetative anatomy. *Aliso* 12: 555-566.

Donoso, C. 1995. Bosques templados de Chile y Argentina: variación, estructura y dinámica. 3ra ed. Editorial Universitaria, Santiago de Chile. Pp. 25-44.

Fhan, A. 1978. Anatomía vegetal. H. Blume ediciones. Madrid.

Grayer, R., Chase, M. y Simmonds, M. 1999. A comparison between chemical and molecular characters for the determination of phylogenetic relationships among plant families: an appreciation of Hegnauer's "Chemotaxonomie der planzen". *Biochemical Systematics and Ecology* 27: 369-393.



González, A. 2007. Ecología evolutiva de las zonas de hibridación. En: Eguiarte, L., Souza, V., y Aguirre, X. Eds. Ecología molecular. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. UNAM. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Ciudad de México. Pp: 427-440.

Harrison, R. 1990. Hybrid zones: windows on evolutionary process. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology* 7: 69-128.

Harrison, R. 1993. Hybrids and hybrid zones: historical perspective. En: Harrison, R. Ed. Hybrid zones and the evolutionary process. Oxford University press. Nueva York. Pp-3-12.

López-Ferrari, A. y Espejo-Zerna, A. 2002. Flora de Veracruz. Amaryllidaceae. Fascículo 128. Edit. Instituto de Ecología, A. C. Xalapa, Veracruz.

Lot, A. 2007. Mirar para entender el paisaje del Pedregal. Gaceta UNAM. Sección Voces Académicas. Núm. 3: 9-11.

Maravilla-Romero, M. y Cano-Santana, Z. 2009. Riqueza florística, estado de conservación y densidad de eucaliptos en cinco zonas de amortiguamiento y un área natural no protegida de Ciudad Universitaria. En: Lot, A., y Cano-Santana, Z. Biodiversidad del ecosistema del Pedregal de San Ángel. Coordinación de la Investigación Científica y Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel. Ciudad de México. Pp. 509-521.

Martínez-Cabrera, D., Terrazas, T., y Zavala-Chávez, F. 2003. Arquitectura foliar y anatomía de la corteza y la madera de *Quercus Sartorii* y *Q. xalapensis* (Fagaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 73: 63-72.

Meerow, A. y Snijman, D. 1998. Amaryllidaceae. En: Kubitzki, K., Huber, H., Rudall, P., Stevens, P. y Stützel, T. Eds. The families and genera of vascular plants. Vol. III. Flowering plants, Monocotyledons: Liliaceae (except Orchidaceae). Springer. Hamburgo. Pp. 83-110.

Meerow, A. W., Guy, C. L., Li, Q. B. y Yang, S. L. 2000. Phylogeny of the American Amaryllidaceae based on nrDNA ITS sequences. *Systematic Botany* 25: 708-726.

Metcalfe, C., y Chalk, L. 1979. Anatomy of the dicotyledons. Systematic anatomy of leaf and stem, with a brief history of the subject. Clarendon Press-Oxford. Londres. Vol.1.

Müller, C. 1952. Ecological control of hybridization in *Quercus*: a factor in the mechanism of evolution. *Evolution* 6: 147-161.

OMS. 2009. [http://www.who.int/mental\\_health/policy/FOMENTOdeLaSALUDMENTAL.pdf](http://www.who.int/mental_health/policy/FOMENTOdeLaSALUDMENTAL.pdf)  
Página visitada: Octubre/2013.

Quiroga, P., Romina, V., Russell, A. y Premoli, C. 2005. Evidencia morfológica e isoenzimática de hibridación natural entre *Nothofagus antarctica* y *N. pumilio* en el noroeste patagónico. *Bosque* 26: 25-32.

REPSA. 2013: <http://web.ecologia.unam.mx/repsa/index.php/44-2013-08-07-13-15-59?start=4>  
Página visitada: Septiembre/2013.

Reyes-Chilpa, R., Berkov, S., Codina, C., Viladomat, F., Bastida, J., Jankowski, C., Arseneau, S., Hernández-Ortega, S., Clotet-Codina, I. y Esté, A. 2011. Acetylcholinesterase-inhibiting Alkaloids from *Zephyranthes concolor*. *Molecules* 16: 9520-9533.

Stebbins, G. 1950. Variation and Evolution in plants. Columbia University Press. Nueva York.

Stern, K., y Roche, L. 1974. Genetics of forest ecosystems. Ecological studies 6. Springer-Verlag, Nueva York.

Stuessy, T., y Crawford, D. 1983. Flavonoids and phylogenetic reconstruction. *Plant systematic and evolution* 143: 83-107.

Zobel, B. y Talbert, J. 1994. Técnicas de mejoramiento genético de árboles forestales. Edit.Uteha. Ciudad de México.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Compuestos detectados en la (CG-EM) del extracto metanólico de los bulbos de *Z. fosteri*.

GC 0350.D_Extracto metanólico de las hojas de <i>Z. fosteri</i>					
Mon Oct 08 09:48:02 2012		HLY type >1%			
ID	Rt	RI	% Max	% Total	Comments
2,5-Pyrrolidinedione	4,206	1122.3	0.82%	0.462%	
Methyl nicotinate	4,495	1146	0.14%	0.080%	
Benzoic Acid	4,605	1162.5	3.07%	2%	
4	4,809	1183	3.06%	2%	2-Pyrrolidinone, 5-(hydroxymethyl)-
5	4,928		0.64%	0.363%	
6	5,072	1209.7	2.95%	2%	
Benzofuran, 2,3-dihydro-	5,183	1220.9	1.01%	0.567%	
1H-Pyrrole-2,5-dione, 3-ethyl-4-methyl-	5,336	1235.8	1.61%	0.907%	
Benzeneacetic acid	5,463	1249.2	3.17%	2%	
10	5,820	1284.2	1.27%	0.713%	
11	6,211	1324	5.49%	3%	
12	6,432	1347.1	3.83%	2%	
13	6,610	1364.5	4.37%	2%	
DL-Proline, 5-oxo-, methyl ester	6,763	1380.3	7.64%	4%	
Benzeneacetamide	7,001	1403.9	1.03%	0.577%	
16	7,171	1421.8	1.00%	0.560%	
Methylparaben	7,460	1450.4	1.59%	0.897%	
18	7,808	1485.9	1.54%	0.869%	
19	7,918	1498.1	0.81%	0.458%	
20	8,241	1530.4	9.12%	5%	
<b>L-Glutamic acid</b>	<b>9,057</b>	<b>1611.1</b>	<b>100.00%</b>	<b>56%</b>	
22	10,059	1686.7	2.46%	1%	
2-Pyrrolidinone, 5-(cyclohexylmethyl)-	10,382	1712	1.64%	0.921%	
24	10,841	1747.4	0.79%	0.446%	
25	11,231	1780	1.02%	0.575%	
Cyclohexane, (1-methylethylidene)-	11,461	1795.4	0.40%	0.223%	
2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-	12,081	1836.8	1.10%	0.620%	
1H-Indole-3-carboxylic acid, methyl ester	12,421	1858.8	0.43%	0.242%	
1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	12,506	1864.7	0.51%	0.287%	

*\*Las filas en color gris indica la presencia de alcaloides en el análisis.*

Continuación tabla

Hexadecanoic acid, methyl ester	13,270	1914.8	1.68%	0.946%	
n-Hexadecanoic acid	13,789	1948.8	3.38%	2%	
Dibutyl phthalate	13,941	1958.2	0.99%	0.559%	
33	14,842	2017.6	0.54%	0.303%	
34	16,456	2118.4	0.17%	0.094%	
35	16,651	2130.6	0.59%	0.329%	
S-[2-[N,N-Dimethylamino]ethyl]N,N-dimethylcarbamoyl hiocarbohydroximate	16,983	2151.7	0.21%	0.119%	
37	17,127	2161.1	0.81%	0.458%	9H-Pyrido[3,4-b]indole, 4-methoxy-
38	17,671	2195.5	0.63%	0.356%	
9H-Pyrido[3,4-b]indole-1-carboxylic acid, methyl ester	17,790	2203.1	0.30%	0.170%	
2,6-Diphenylpyridine	18,384	2240.3	0.61%	0.341%	
4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	20,101	2349	0.46%	0.258%	
Bis(2-ethylhexyl) phthalate	23,074	2544.6	0.18%	0.100%	
??- Deaceylcantabricine	23,745	2588.2	0.85%	0.476%	
44	29,191	2974	0.34%	0.190%	
45	30,371	3058.8	0.62%	0.351%	
Carbonic acid, dithio-, S,S-dipropyl ester	30,541	3069.7	0.35%	0.199%	
47	32,300	3195.6	0.56%	0.313%	
2-Methyl-3-(3-methylenebicyclo[3.2.1]oct-6-en-8-yloxy)cyclohex-2-enone	32,521	3210.2	0.15%	0.083%	
49	32,708		0.10%	0.055%	
50	33,472	3278.1	1.72%	0.968%	
<u>&gt;1% Trisphaeridine; ? 249 (11,12-Dehydroanhydrolycorine); ??Homolycorine; ?? 8-O-Demethylhomolycorine.</u>					

**Anexo 2.** Compuestos detectados en la (CG-EM) del extracto metanólico de los bulbos de *Z. fosteri*.

GC 0352.D_ Extracto metanólico del bulbo de <i>Z. fosteri</i>					HLY type > 1%
Mon Oct 08 09:48:23 2012					
ID	Rt	RI	% Max	% Total	Comments
Benzene, (1-butylheptyl)-	9,337	1631.2	2.95%	0.570%	
Benzene, (1-pentylheptyl)-	10,509	1722.2	1.87%	0.362%	
Benzene, (1-butylloctyl)-	10,577	1727.2	1.94%	0.376%	
Benzene, (1-propylnonyl)-	10,739	1740	8.82%	1.707%	
Benzene, (1-ethylundecyl)-	12,514	1865.4	2.32%	0.449%	
6	13,279	1915.3	30.60%	5.926%	
n-Hexadecanoic acid	13,823	1950.5	31.58%	6.116%	
Dibutyl phthalate	13,933	1958.3	2.91%	0.563%	
<b>9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester</b>	<b>15,980</b>	<b>2088.6</b>	<b>100.00%</b>	<b>19.366%</b>	
9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-	16,065	2094.1	20.81%	4.030%	
9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	16,142	2098.9	3.85%	0.745%	
12	16,456	2118.8	3.95%	0.765%	Octadecanoic acid, methyl ester
9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	16,609	2128.5	60.93%	11.799%	
14	16,668	2131.8	26.63%	5.156%	
15	17,042	2155.3	8.30%	1.608%	
16	17,076	2158.1	5.82%	1.127%	
17	17,560	2188	4.62%	0.894%	
18	19,081	2284.6	10.09%	1.954%	
19	19,446	2307.3	3.59%	0.696%	
Eicosanoic acid, methyl ester	19,667	2321.7	5.88%	1.139%	
21	22,275	2491.3	5.51%	1.068%	
Docosanoic acid, methyl ester	22,760	2523.4	5.13%	0.994%	
1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester	23,082	2544.8	2.46%	0.476%	
24	23,388	2565.6	17.45%	3.380%	
25	24,637	2651.3	13.87%	2.687%	
26	24,832	2665.8	9.21%	1.783%	
27	25,104	2684.4	7.33%	1.419%	
28	25,291	2698	25.23%	4.887%	1,3-Benzodioxol-5-ol,6-(7-methoxy-3,4(2H)-dihydro-1-benzopyran
29	26,200	2762.7	4.21%	0.815%	
30	28,562	2930.3	6.68%	1.294%	
Campesterol	32,300	3195.5	16.49%	3.194%	
32	32,708	3224.5	12.44%	2.409%	
33	33,481	3279.4	52.91%	10.246%	
>1% 249(11,12-Dehydroanhydrolycorine; Trisphaeridine; ??-2-O-Methylpancracine (NIST); Lycorine, FIN; ??Homolycorine; ?? m/z 280.					

**Anexo 3.** Compuestos detectados en la (CG-EM) del extracto metanólico de las flores de *Z. fosteri*.

GC 0346.D_EMFZF		HLY type < 1%			
Mon Oct 08 09:47:17 2012					
ID	Rt	RI	% Max	% Total	Comments
1	4,495	1195.3	8.62%	2.001%	
Benzoic Acid	4,571	1158.8	5.70%	1.324%	
3	5,072	1209.5	9.66%	2.242%	
Benzofuran, 2,3-dihydro-	5,183	1220.8	6.62%	1.537%	
Benzeneacetic acid	5,446	1247.7	6.63%	1.538%	
6	5,701	1272.6	7.26%	1.686%	
7	5,769	1280.3	4.42%	1.025%	
: 4-Hydroxy-3-methylacetophenone	6,211	1324	2.67%	0.620%	
DL-Proline, 5-oxo-, methyl ester	6,754	1379.4	10.95%	2.542%	
<b>10</b>	<b>8,300</b>	<b>1536.4</b>	<b>100.00%</b>	<b>23.221%</b>	2-Pyrrolidinone, 5-(cyclohexylmethyl)-
2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-	12,081	1836.9	3.52%	0.818%	
Hexadecanoic acid, methyl ester	13,270	1914.8	27.10%	6.293%	
n-Hexadecanoic acid	13,805	1949.8	69.89%	16.230%	
Dibutyl phthalate	13,933	1958.3	4.24%	0.985%	
15	16,456	2118.3	3.22%	0.747%	Octadecanoic acid, methyl ester
Octadecanoic acid	16,983	2151.7	5.15%	1.195%	
Heneicosane	19,200	2291.6	7.28%	1.691%	
18	22,301	2492.6	14.97%	3.475%	Tridecanol
Bis(2-ethylhexyl) phthalate	23,082	2544.7	5.83%	1.353%	
Vittatine Acetate	23,312	2559.9	10.41%	2.417%	
21	25,266	2695.9	33.29%	7.731%	8-Heptadecanol
??- Hippadine-std-db-5	25,682	2725.9	8.34%	1.936%	
3-O-Acetylpowelline (NAT)	25,979	2746.5	8.60%	1.996%	
8-Heptadecanol	28,044	2893.5	8.15%	1.892%	
25	28,536	2928.2	8.69%	2.017%	
26	30,371	3058.7	13.11%	3.045%	
27	31,578	3143.7	4.78%	1.110%	
28	31,654	3149.5	6.43%	1.492%	
ç-Sitosterol	33,472	3278.6	14.60%	3.389%	
30	34,160	3328.1	10.55%	2.450%	
>1% Vittatine (crinine); 249 (11,12- Dehydroanhydrolycorine); ?? 2-O-Methylpancracine; Powelline.					

**Anexo 4.** Compuestos detectados en la (CG-EM) del extracto metanólico de las raíces de *Z. fosteri*.

GC 0224.D_EMRZF		HLY type < 1%			
Wed Sep 26 10:45:37 2012					
ID	Rt	RI	% Max	% Total	Comments
Benz Derv	7.468	1453.6	2.5	0.782	
Benz Derv	10.756	1743	1.67	0.522	
Benz Derv	11.877	1824.9	2.72	0.85	
Benz Derv	11.988	1831.9	1.35	0.42	
Benz Derv	13.117	1906.3	1.67	0.52	
Benz Derv	13.287	1917.4	9.63	3.004	
Ac. Graso	13.814	1952.2	48.09	15.008	
Ptalato	13.95	1960.8	6.42	2.003	
Ac. Graso	15.98	2089.8	4.08	1.273	
Ac. Graso	16.558	2126.1	8.85	2.763	
Benz Derv	16.634	2131	11.86	3.701	
m/z 189 (261)	17.552	2188.4	11.66	3.639	
Lipido	19.217	2294.3	2.41	0.752	
Lipido	22.318	2496.2	2.81	0.878	
Benz Derv	22.099	2548.7	6.07	1.894	
Lycorine FIN	25.869	2740.8	51.07	15.939	
m/z 372 (373)	27.491	2855.9	2.98	0.929	
Galanthine	27.772	2872.3	7.8	2.435	
Campesterol	32.308	3196.3	23.83	7.436	
Stigmasta-5,22-dien-3-ol	32.725	3225.8	12.94	4.04	
<b>Sitosterol</b>	<b>33.498</b>	<b>3280.2</b>	<b>100</b>	<b>31.211</b>	
<1% 249; 2-O-Methylpancracine; ??Homolycorine; Galanthine.					

**Anexo 5.** Compuestos detectados en la (CG-EM) del extracto metanólico de las partes aéreas de *Z. fosteri*.

GC 2950.D_ZFOS-2-PA		Thu Sep 16 08:35:20 2010		
ID	RI	% Max	% Total	Comments
1	6,890	6.62	1,347	
2	8,029	6.66	1,355	
3	8,419	26.24	5,342	
Bz deriv	8,479	15.31	3,117	
Bz deriv	8,581	4.57	0.930	
Bz deriv	9,583	4.25	0.865	
Bz deriv	9,626	8.79	1,789	
Bz deriv	9,770	7.18	1,463	
Bz deriv	10,059	5.59	1,138	
Bz deriv	10,577	7.27	1,480	
Bz deriv	10,866	8.22	1,675	
Bz deriv	10,926	7.53	1,534	
Bz deriv	11,112	6.06	1,234	
Bz deriv	11,452	5.45	1,109	
Bz deriv	12,038	5.57	1,135	
Bz deriv	12,285	7.68	1,564	
Bz deriv	12,387	4.88	0.994	
Bz deriv	12,599	3.54	0.721	
Bz deriv	12,981	3.23	0.658	
Bz deriv	13,619	3.02	0.614	
FA (ester)	13,797	11.71	2,384	
FA	14,349	51.93	10,574	
FA (ester)	16,532	5.66	1,152	
FA	17,119	6.91	1,408	
FA (ester)	17,221	3.29	0.671	
m/z 189 (261)	18,130	30.67	6,245	?
27	19,642	4.69	0.955	
Diol	23,082	5.43	1,107	
Pht	23,499	7.31	1,488	
30	24,076	10.70	2,179	
2-O-Methylpancracine	24,773	6.10	1,243	
32	25,257	2.73	0.557	
Phenol deriv	25,920	15.61	3,178	
Alcohol	26,073	15.02	3,059	
Lycorine	26,497	6.17	1,257	
36	30,932	5.50	1,121	
Sterol	32,945	23.22	4,729	
Sterol	33,302	19.72	4,015	
<b>Sterol</b>	<b>34,194</b>	<b>100.00</b>	<b>20,362</b>	
Sterol	34,415	11.06	2,253	



**Anexo 6.** Compuestos totales detectados en la (CG-EM) de la Fase Orgánica 1 de la parte aérea de *Z. fosteri*.

ID	Rt	RI	% Max	% Total	Comments
Phenol	4,259		5.79	0.905	
2	6,001		15.62	2,443	
3	7,895		21.57	3,374	
4	8,719		34.90	5,459	
5	9,526		4.16	0.651	
Benzene derivative	11,523		6.41	1,003	
Benzene derivative	11,565		13.68	2,139	
Benzene derivative	11,718		10.48	1,639	
Benzene derivative	12,015		9.19	1,437	
Benzene derivative	12,542		12.23	1,912	
Benzene derivative	12,848		21.55	3,371	
Benzene derivative	12,916		21.68	3,390	
Benzene derivative	13,103		16.62	2,599	
Benzene derivative	13,451		14.51	2,269	
Benzene derivative	14,046		17.79	2,783	
Benzene derivative	14,301		33.00	5,162	
Benzene derivative	14,411		20.25	3,168	
Benzene derivative	14,623		14.81	2,317	
Benzene derivative	15,014		13.33	2,085	
Benzene derivative	15,660		14.15	2,213	
FA derivative	15,838	2028	84.01	13,139	
Hexadecanoic acid	16,373	2060	100.00	15,640	
FA derivative	19,160	2228	11.78	1,842	
Alkane	22,031	2406	10.06	1,574	
Phtalate	25,608		22.55	3,527	
26	28,190		26.15	4,089	
Sterol	33,067		26.05	4,074	
Sterol	36,422		37.06	5,796	

**Anexo 7.** Compuestos totales detectados en la (CG-EM) de la Fase Orgánica 1 de los bulbos de *Z. fosteri*.

ID	Rt	RI	% Max	% Total	Comments
1	6,009		2.55	1,099	
2	7,904		6.39	2,758	
FA derivative	15,847	2028	35.87	15,480	
Hexadecanoic acid	16,382	2060	8.63	3,724	
<b>FA derivative</b>	<b>18,625</b>	<b>2196</b>	<b>100.00</b>	<b>43,149</b>	
FA derivative	18,727	2201	21.06	9,085	
FA derivative	19,168	2229	4.85	2,092	
FA derivative	19,245	2233	20.45	8,825	
FA derivative	19,321	2238	4.92	2,122	
FA derivative	19,721	2263	5.38	2,319	
FA derivative	22,465	2434	5.11	2,204	
FA derivative	25,616	2643	6.53	2,819	
Sterol	36,431		10.02	4,323	

**Anexo 8.** Compuestos detectados en la (CG-EM) de la Fase Orgánica 2 de las hojas de *Z. fosteri*.

GC 0344.D_FO2 H ZF		HLY type < 1%			
Mon Oct 08 09:46:59 2012					
ID	Rt	RI	% Max	% Total	Comments
2,5-Pyrrolidinedione	4,214	1126	25.77%	4.465%	
2	4,783	1180.5	12.59%	2.182%	2-Pyrrolidinone, 5-(hydroxymethyl)-
3	5,072	1209.3	10.48%	1.817%	
4	5,395	1241.7	3.50%	0.607%	
5	6,406	1344.4	5.94%	1.030%	
DL-Proline, 5-oxo-, methyl ester	6,763	1380.2	71.80%	12.442%	
Benzeneacetamide	6,975	1402.1	10.66%	1.847%	
dl-Phenylalanine, methyl ester	7,196	1424.2	6.29%	1.089%	
? 2- Methoxyalbomaculine GC14	7,799	1485.1	13.17%	2.282%	
10	8,037		15.09%	2.615%	
11	8,674	1573.8	3.58%	0.619%	
12	10,841	1747.8	4.27%	0.740%	
13	11,452	1794.6	1.90%	0.329%	
14	14,426	1991	7.15%	1.239%	
15	16,329	2111	13.92%	2.412%	á-Carboline, 6-methoxy-1,2-dimethyl-
16	16,991	2152.5	32.88%	5.698%	9H-Pyrido[3,4-b]indole, 4-methoxy-
m/z 189 (261)	17,552	2187.8	40.32%	6.986%	
9H-Pyrido[3,4-b]indole-1-carboxylic acid, methyl ester	17,773	2201.4	29.50%	5.112%	
19	18,376	2240	11.24%	1.948%	
2,6-Diphenylpyridine	18,818	2267.6	2.57%	0.445%	
Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	20,789	2392.2	54.66%	9.472%	
<b>??Norlycoramine</b>	<b>23,728</b>	<b>2588</b>	<b>100.00%</b>	<b>17.328%</b>	
249 (11,12-Dehydroanhydrolycorine)	23,847	2596.4	6.42%	1.112%	
m/z 260(261)	24,323	2629.5	43.60%	7.554%	
m/z 174 (275)	24,866	2667	15.88%	2.752%	
26	25,232	2695.2	6.91%	1.198%	Morpheridine
? Homolycorine	26,948	2815.5	11.69%	2.026%	
p,p'-Dioctyldiphenylamine	28,706	2940.6	15.32%	2.654%	
>1% Trisphaeridine; ?? Nerinine; ? 2-O- Methylpancracine (NIST).					

**Anexo 9.** Compuestos detectados en la (CG-EM) de la Fase Orgánica 2 de los bulbos de *Z. fosteri*.

GC 8047.D_ZF-BD-02		3 Homolycorine type <1%			
Wed Jan 25 11:17:38 2012					
ID	Rt	RI	% Max	% Total	Comments
FA derivative	15,838	2028	1.02	0.630	
Phtalate	16,348		1.83	1,130	
FA derivative	18,608	2194	2.29	1,418	
m/z 189 (261)	20,188	2292	40.64	25,109	
m/z 174 (247)	21,114	2349	2.50	1,546	
Anhydrolycorine	25,039	2602	2.54	1,571	
Phtalate	25,608		1.89	1,166	
m/z 248 (249)	26,568	2709	2.81	1,734	
<b>Lycorine</b>	<b>28,666</b>	<b>2855</b>	<b>100.00</b>	<b>61,783</b>	
m/z 278 (279)	30,476	2981	6.33	3,913	?

**Anexo 10.** Compuestos detectados en la (CG-EM) en la pastilla de la F.Orgánica 2 de los bulbos de *Z. fosteri*.

GC 0342.D_FO2 B ZF Pastilla		Mon Oct 08 09:46:42 2012			HLY type < 1%	
ID	Rt	RI	% Max	% Total	Comments	
m/z 189 (261)	17,518	2185.5	3.51	2,877	11-12- Dehidroanhidrolycorine	
m/z 175 (247)	18,452	2244.9	0.71	0.581		
Anhydrolycorine	22,292	2492	0.33	0.267		
m/z 248 (249)	23,847	2595.9	1.28	1,047		
m/z 212 (374)	25,325	2700.3	1.64	1,348		
m/z 250 (251)	25,427	2707.4	2.50	2,055		
<b>Lycorine</b>	<b>26,039</b>	<b>2750.8</b>	<b>100.00</b>	<b>82,085</b>		
m/z 344 (375)	26,311	2770.8	2.74	2,250		
Galantina	27,755	2872.4	7.28	5,977		
m/z 264 (265)	28,282	2909.9	0.79	0.652		
m/z 280(281)	29,233	2977.7	1.05	0.862		

>1% Nerinine /HLY type); 8-O-Demethylmaritidine (Crinano type); 2-O-Methylpancracine (NIST); Hippamine.

**Anexo 11.** Compuestos detectados en la (CG-EM) en el sobrenadante de la F.Orgánica 2 de los bulbos de *Z. fosteri*.

GC 0340.D_FO2 B ZF (sobrenadante)		HLY type < 1%			Mon Oct 08 09:46:18 2012
ID	Rt	RI	% Max	% Total	Comments
1	4,775	1179.9	1.06	0.213	
2	6,746	1378.4	3.65	0.736	
3	10,747	1739.9	3.26	0.657	
<b>m/z 189 (261)</b>	<b>17,560</b>	<b>2188.1</b>	<b>100.00</b>	<b>20,156</b>	
m/z 175(247)	18,478	2246	23.93	4,824	
m/z 280(281)	20,542	2376.6	2.53	0.510	
FA deriv.	20,789	2392.2	5.58	1,125	
Nerinine	22,029	2474.6	3.24	0.653	
Anhydrolycorine	22,292	2492	2.41	0.485	
8-O-Demethylmaritidine	22,394	2499.2	8.16	1,644	
Norpluvine??	23,023	2541.2	4.92	0.991	
Kirkine STD-db-5	23,091	2545.9	4.74	0.954	
Assoanine?	23,507	2573.5	2.31	0.465	
	23,779	2591.4	2.01	0.405	Estra-1,3,5(10)-triene-2,17-diol, 3-methoxy-, diacetate, (17á)-
m/z 344(345)					
m/z 248 (249)	23,864	2596.9	26.48	5,337	
2-O-Methylpancracine (NIST)	24,042	2609.3	6.29	1,268	
Isoquinoline,3-4dihydro-6,7dimethoxy-1-[3-methoxyphenyl] (NIST)	24,510	2642.3	12.74	2,568	
m/z 212 (373)	25,351	2702	13.17	2,655	
6,11-Dihydro8-metoxo-1-benzopyrano[4,3-b]indole	25,444	2709.1	37.01	7,459	
Lycorine	25,920	2742.2	73.38	14,790	
Homolycorine??	26,124	2757.4	4.65	0.937	
m/z 272 (315)	26,183	2761.4	3.19	0.643	
2-O-Acetyllycorine	27,237	2835.7	1.48	0.299	
Galanthine	27,780	2874.6	83.16	16,761	
2-Methoxyalbomaculine GC 147	27,925	2883.5	7.11	1,434	
Ungiminorine	28,010	2890.9	5.73	1,156	
m/z 268 (299)	28,213	2904.9	2.59	0.523	
m/z 264 (265)	28,281	2910	18.11	3,649	
Diocetylphenylamine (NIST)	28,715	2940.6	1.62	0.326	
Oxoassoanine	29,241	2977.9	14.58	2,939	
p,p'-Diocetylphenylamine	29,743	3013.7	12.58	2,535	
m/z 278 (279)	30,218	3047.8	4.49	0.904	Dibenzo-1,2,7,8-anthracene

>1% 11,12-Dehydrolicorene; Demethylismine; ?Isimine; Trisphaeridine; Vittatine (crinine); ??Vittatine acetate; Hippamine; Pancracine; ?? 8-O-Demethylhomolycorine; Pseudolycorine (STD); 2-Hydroxyhomolycorine.

**Anexo 12.** Compuestos detectados en la (CG-EM) de la Fase Orgánica 2 de las flores de *Z. fosteri*.

GC 0338.D_FO2-FL ZF		HLY type < 1%			
Mon Oct 08 09:45:55 2012					
ID	Rt	RI	% Max	% Total	Comments
2,5-Pyrrolidinedione	4,206	1122.4	7.68	0.984	
: Butanoic acid, 3-hexenyl ester, (Z)-	4,800	1181.9	10.22	1.310	
3	5,072	1209.2	15.36	1.968	
DL-Proline, 5-oxo-, methyl ester	6,746	1378.5	38.21	4.895	
2-Furanmethanol, 5-ethenyltetrahydro-à,à,5-trimethyl-, cis-	6,814	1386.8	21.04	2.695	
6	7,086	1412.3	10.62	1.361	
7	7,187	1423.4	12.13	1.554	
8	7,706	1475.7	23.24	2.977	
?? 2- Methoxyalbomacoline G.	7,808	1486.1	4.68	0.600	
10	8,428	1548.5	6.67	0.854	
Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)-	13,448	1926.3	5.17	0.662	
1,4-Benzenediamine, N-(1-methylethyl)-N'-phenyl-	16,337	2111	16.61	2.127	
11, 12 - Dehydrolicorene	17,458	2181.9	24.28	3.111	
m/z 189(261)	17,535	2186.5	26.18	3.354	
m/z 282(283)	20,542	2377.1	37.56	4.812	
Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	20,788	2392.2	99.08	12.693	
Vittatine (crinine)	21,842	2462.2	37.22	4.769	
Vittatine acetate	23,303	2559	92.89	11.900	
? Deacetylcantabricine	23,711	23.7049	45.80	5.868	
? 2-O- Methylpancracine (NIST)	24,042	2609.1	12.78	1.637	
m/z 260(333)	24,323	2629.1	11.19	1.433	
Powelline	24,730	2472.52	50.92	6.523	
m/z 189(275)	24,875	2668.6	19.70	2.524	
m/z 246 (319)	25,240	2695.3	9.90	1.268	
<b>3-O-Acetylpowelline</b>	<b>25,971</b>	<b>2745.9</b>	<b>100.00</b>	<b>12.811</b>	
: p,p'-Diocetyldiphenylamine	28,715	2940.7	28.32	3.628	
m/z 309(429)	31,314	3125.5	5.45	0.698	
m/z 311(389)	32,588	3215.6	7.69	0.985	

>1% Trisphaeridine; 249 (11,22- Dehydrolicorine); Homolycorine; ? Crinamide -STD-db-5.

**Anexo 13.** Compuestos detectados en la (CG-EM) de la Fase Orgánica 2 de las raíces de *Z. fosteri*.

GC 0330.D_FO2 R ZF		HLY type < 1%			
Mon Oct 08 09:44:38 2012					
ID	Rt	RI	% Max	% Total	Comments
m/z 189 (261)	17,535	2187	10.65	7.259	
m/z 175 (247)	18,469	2245.9	3.87	2.636	
Nerinine	22,029	2474.7	1.13	0.769	
Anhydrolycorine	22,301	2492.5	1.54	1.047	
249 (11,12-Dehydroanhydrolycorine)	23,855	2596.4	3.16	2.152	
2-O- Methylpancracine	24,042	2608.7	1.51	1.027	
m/z 296 (297)	24,509	2641.9	0.50	0.337	
Crinamina	25,333	2701	1.86	1.269	
m/z 250 (251)	25,435	2708.1	2.46	1.678	
<b>Lycorina</b>	<b>26,081</b>	<b>2753.7</b>	<b>100.00</b>	<b>68.168</b>	
Lycorenan-7-one, 1-methyl-9,10-[methylenebis(oxy)]-	26,965	2816.6	1.85	1.263	
2-O-Acetyllycorine	27,253	2836.9	0.56	0.382	
1- Epidemethoxybowdensine	27,491	2854.2	4.06	2.764	
m/z 278 (279)	27,789	2874.7	10.10	6.887	
Urgiminorine? Leucojum?	28,213	2904.9	1.31	0.890	
?? m/z 264	28,315	2912.1	1.43	0.975	
Oxoassoanine	29,250	2978.5	0.73	0.497	

>1% Coranine; Norpluvine; Ismine; 8-O-Demethylhomolycorine; Montanine; Hippamine; Pancracine, Hippadine-std-db-5;Homolycorine;Galanthine; ??Assoanine.

**Anexo 14.** Compuestos detectados en la (CG-EM) de la Fase Orgánica 2 de las partes aéreas de *Z. fosteri*.

GC 0336.D_FO2-PA ZF		HLY type < 1%			
Mon Oct 08 09:45:35 2012					
ID	Rt	RI	% Max	% Total	Comments
m/z 167(211)	14,426	1990.6	3.68	1.054	
<b>m/z 189 (261)</b>	<b>17,586</b>	<b>2189.9</b>	<b>100.00</b>	<b>28.662</b>	
m/z 175(247)	18,648	2556.4	22.78	6.529	
Trisphaeridine	18,894	2272.5	2.24	0.641	
Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	20,788	2392.3	7.86	2.254	
Vittatine	21,884	2465.1	21.79	6.246	
Nerinine	22,054	2475.9	4.55	1.305	
Anhydrolycorine	22,292	2492.3	3.32	0.952	
m/z 256(315)	22,904	2532.9	1.81	0.519	
Vittatine acetate	23,312	2559.9	9.29	2.664	
?Deacetylcantabricine	23,728	2588	10.24	2.935	
249 (11, 12, bethydroanhydrolycorine)	23,847	2596.1	9.59	2.750	
Pancracine NIST	24,068	2611.1	23.43	6.715	
m/z 260(333)	24,323	2629.6	4.60	1.318	
m/z 296(297)	24,509	2642.5	18.39	5.272	Isoquinoline, 3,4-dihydro-6,7-dimethoxy-1-[3-methoxyphenyl]-
Powelline	24,764	2660.7	24.43	7.002	
Pancracine NIST	25,087	2683.3	8.75	2.508	
6,11-Dihydro-8-methoxy-1-benzopyrano[4,3-b]indole	25,435	2708.1	4.46	1.278	
Lycorine. FIN	25,911	2741.7	27.94	8.008	
3,O- Acetylpowelline (NAT)	25,971	2746.4	7.64	2.189	
Homolycorine	26,132	2757.6	5.02	1.439	
Nerinine	26,956	2815.9	6.72	1.926	
m/z 278(279)	27,763	2873.5	10.14	2.905	Isoquinoline, 3,4-dihydro-6,7-dimethoxy-1-[3-methoxyphenyl]-
p,p'-Dioclyldiphenylamine	28,715	2941	0.59	0.170	
Oxoasoanine	29,241	2978.1	1.95	0.558	
m/z 353(354)	29,734	3013.4	2.68	0.768	
Sitosterol	33,472	3278.3	5.01	1.435	

>1% 11,12-Dehydrolicorene; Ismine; Galanthamina; m/z 276(277); N-Demethylgalanthamine; ?? 281; ? Cheryline; ?? Undulative-db5; Crinamidine-STD-db-5; ? Galanthine.

**Anexo 15.** Compuestos detectados en la (CG-EM) de la Fase Orgánica 3 de las hojas de *Z. fosteri*.

GC 0322.D_F03 H ZF	Mon Oct 08 09:43:05 2012			HLY type < 1%	
ID	Rt	RI	% Max	% Total	Comments
2,5-Pyrrolidinedione	4,214	1123	0.42	0.358	
2	4,401	1141.7	0.28	0.240	
3	4,545	1155.9	0.64	0.550	
4	4,724	1174.6	0.31	0.265	
2-Pyrrolidinone, 5-(cyclohexylmethyl)-	4,800	1181.9	1.59	1.364	
6	4,936	826.7	0.64	0.547	
S-Methyl 4-methylpentanethioate	5,072	826.7	2.54	2.183	
Silane, trimethylpropoxy-	5,370	1238.1	0.67	0.574	
Benzeneacetic acid	5,454	1247.3	1.13	0.966	
10	5,743	1278.1	1.34	1.154	
11	5,820	1284.4	1.18	1.017	
12	5,930	1295.6	0.90	0.771	
Ethanone, 1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)-	6,211	1325	1.11	0.955	
2-Pentanol, 3-chloro-4-methyl-, (R*,R*)-(ñ)-	6,440	1347.9	1.50	1.287	
DL-Proline, 5-oxo-, methyl ester	6,771	1381.6	1.14	0.978	
16	7,154	1420.9	0.29	0.252	
1,6-Anhydro-á-D-glucopyranose (levoglucosan)	7,774	1483.4	0.26	0.227	
<b>Levoglutamide</b>	<b>8,912</b>	<b>1597.8</b>	<b>100.00</b>	<b>85.855</b>	
FA	17,654	2193.5	0.53	0.455	



**Anexo 16.** Compuestos detectados en la (CG-EM) de la Fase Orgánica 3 del bulbo de *Z. fosteri*.

GC 0326.D_FO3 B ZF		Mon Oct 08 09:43:42 2012			HLY type < 1%
ID	Rt	RI	% Max	% Total	Comments
4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	4,495	1151.4	8.40	3.257	
2	4,741	1176	3.33	1.291	
3	5,047	1205.3	6.21	2.406	
<b>2-Furancarboxaldehyde, 5-(hydroxymethyl)-</b>	<b>5,285</b>	<b>1230.1</b>	<b>100.00</b>	<b>38.746</b>	
5	5,514	1253.2	14.30	5.542	Maltol
6	7,366	11.715	30.24	11.715	Sucrose
1,6-Anhydro- $\alpha$ -D-glucopyranose (levoglucosan)	7,757	8.808	22.73	8.808	
Ethyl $\alpha$ -D-glucopyranoside	9,218	6.026	15.55	6.026	
9	10,756	2.569	6.63	2.569	
10	13,755	5.929	15.30	5.929	
11	14,341	2.264	5.84	2.264	
Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	20,789	2.105	5.43	2.105	
13	23,269	5.957	15.38	5.957	
14	24,068	3.385	8.74	3.385	
< 1% Trisphaeridine; 249; 2-O-Methylpancracine; Anhydrolycorine; 4-2- hidroxyhomolycorine; m/z 280; Oxoassoanine.					

**Anexo 17.** Compuestos detectados en la (CG-EM) de la Fase Orgánica 3 de las flores de *Z. fosteri*.

GC 0316.D_FO3 F ZF		HLY type < 1%	Mon Oct 08 09:40:22 2012		
ID	Rt	RI	% Max	% Total	Comments
1	4,401	1141.5	2.99	1.301	
2	4,503	1151.6	3.59	1.565	
3	4,749	1175.5	2.09	0.911	
4	4,851	1187.9	4.02	1.753	
5	4,945	1196.6	1.96	0.854	
6	5,081	1210	8.43	3.673	
7	5,200	1221.9	5.19	2.262	
8	5,378	1239.4	7.76	3.383	
9	5,701	1273.3	4.62	2.012	
10	5,820	1285	4.06	1.769	
11	6,788	1383.4	6.02	2.625	
12	7,188	1424.3	21.31	9.289	
13	7,570	1427	5.68	2.478	
d-Allose	7,748	1479.3	29.71	12.947	
<b>Levoglutamide</b>	<b>8,105</b>	<b>1516.9</b>	<b>100.00</b>	<b>43.580</b>	
16	8,334	1539.3	19.07	8.312	
17	9,524	1645.6	2.95	1.286	

**Anexo 18.** Compuestos detectados en la (CG-EM) de la Fase Orgánica 3 de las raíces de *Z. fosteri*.

GC 0318.D_FO3 R ZF		Mon Oct 08 09:40:45 2012			HLY type < 1%	
ID	Rt	RI	% Max	% Total	Comments	
1	4,401	1141.9	10.13	1.702		
2	4,945	1196.6	11.83	1.989		
3	5,081	1210.3	27.95	4.698		
4	5,378	1240	42.35	7.118		
5	6,737	1372.8	24.54	4.124		
6	7,196	1423.5	13.72	2.306		
7	7,298	1434.7	7.83	1.316		
8	7,494	1454.5	17.80	2.991		
9	7,578	1462.5	34.99	5.881		
1,6-Anhydro- $\alpha$ -D-glucopyranose (levoglucosan)	7,723	1477.4	71.51	12.017		
Levoglutamide	7,995	1504.6	87.80	14.756		
2-Pyrrolidinone, 5-(cyclohexylmethyl)-	8,054	1507.7	31.87	5.356		
<b>Pentane-1,2,3,4,5-pentaol</b>	<b>8,216</b>	<b>1530</b>	<b>100.00</b>	<b>16.806</b>	Pentane-1,2,3,4,5-pentaol	
3-Hydroxy-4-methoxybenzoic acid	8,241	1563.5	93.80	15.764		
Benzoic acid, 4-hydroxy-3,5-dimethoxy-, hydrazide	11,716	1773.4	18.90	3.177		
< 1% 249 (11,12- Dehydroanhydrolycorine)						

**Anexo 19.** Compuestos detectados en la (CG-EM) de la Fase Orgánica 3 de las partes aéreas de *Z. fosteri*.

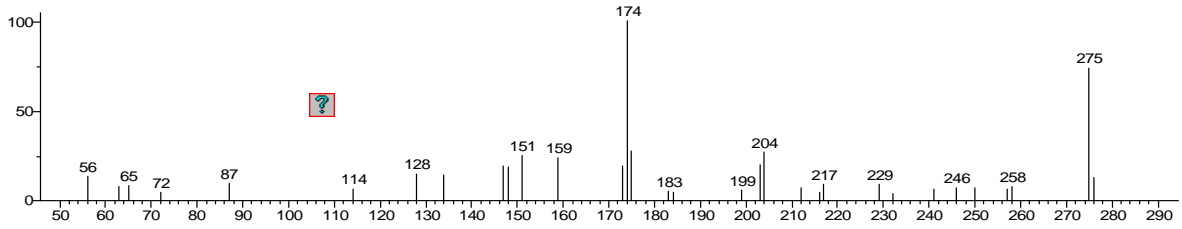
GC 0222.D_27-03- PA		Wed Sep 26 10:44:19 2012			HLY type < 1%	
ID	Rt	RI	% Max	% Total	Comments	
1	4,410		2.47	1.550		
2	4,503		1.97	1.236		
3	4,741		2.46	1.541		
4	4,945		2.45	1.535		
5	5,081		5.18	3.250		
6	5,387		6.42	4.027		
7	5,828		2.64	1.659		
8	6,771	1384.1	5.64	3.539		
9	7,171	1422.7	5.27	3.306		
10	7,578	1477.3	9.12	5.720		
1,6-Anhydro- $\alpha$ -D-glucopyranose (levoglucosan)	7,748	1478.2	9.95	6.241		
<b>2-Pyrrolidinone, 5-(cyclohexylmethyl)-</b>	<b>8,317</b>		<b>100.00</b>	<b>6.274</b>		
13	9,974		2.76	1.729		
m/z 189(261)	17,628	1.0	3.08	1.931		
<1% Trisphaeridine; Montanine, 174 (247), 149 (279).						

**Anexo 20.** Alcaloides detectados en el análisis de (CG-EM) de la FO2 (fracción alcaloidea) de las hojas, bulbos, flores, raíces y partes aéreas de *Z. fosteri*. RI: índice de retención.

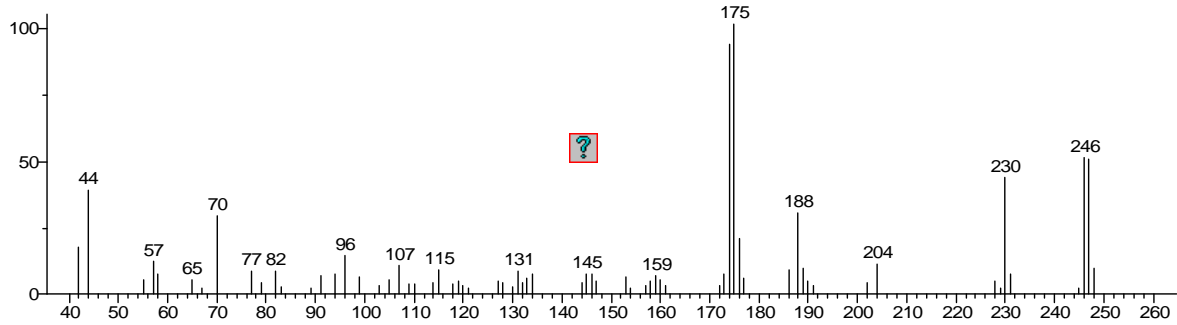
Alcaloide	RI	FOHZF	FOBZF	FOFZF	FORZF	FOPAZF	Comentarios
1- Epidemetoxibowdensina	2854.2				2.764		
11, 12 -Dehidrolicorena	2181.9			3.111			
2- Metoxialbomaculina GC14	1485.1	13.17					Estructura probable
249 (11, 12, betidroanhidrolicorina)	2596.1					2.750	
249 (11,12-Dehidroanhidrolicorina)	2596.4	1.112			2.152		
2-O- Metilpancracina (NIST)	2609.1			1.637			Estructura probable
2-O-Acetilcorina	2835.7		0.299		0.382		
2-O-Metilpancracina (NIST)	2609.3		1,268		1.027		
3,O- Acetilpowelina (NAT)	2746.4					2.189	
3-O-Acetilpowelina	2745.9			<b>12.811</b>			
6,11-Dihidro8-metoxi-1-benzopirano[4,3-b]indole	2709.1		7,459				
8-O-Demetilmaritidina	2499.2		1,644				
Anhidrolicorina	2492		0.485		1.047	0.952	
Asoanina?	2573.5		0.465				
Crinamina	2701				1.269		
Deacetylantabricina	2588			5.868		2.935	Estructura probable
Galantina	2874.6		16,761				
Homolicorina	2815.5	2.026					Estructura probable
Homolicorina	2757.4		0.937			1.439	Son lo mismo?
Isoquinolina,3-4dihidro-6,7dimetoxi-1-[3-metoxipenil] (NIST)	2642.3		2,568				
Kirkina STD-db-5	2545.9		0.954				
Licorina	2742.2		14,790		<b>68.168</b>	8.008	
Lycorenan-7-one, 1-methyl-9,10-[methylenebis(oxy)]-	2816.6				1.263		
m/z 210(211)	1990.6					1.054	
m/z 174 (275)	2667	2.752					
m/z 175(247)	2246		4,824		2.636	6.529	
m/z 189 (261)	2187.8	6.986	<b>20,156</b>	3.354	7.259	<b>28.662</b>	
m/z 189(275)	2668.6			2.524			
m/z 212 (373)	2702		2,655				
m/z 246 (319)	2695.3			1.268			
m/z 248 (249)	2596.9		5,337				
m/z 250 (251)	2707.4		2,055		1.678		
m/z 256(333)	2532.9					0.519	Undulative-db5; Crinamidine-STD-db-5; ? Galanthine.

Continuación tabla

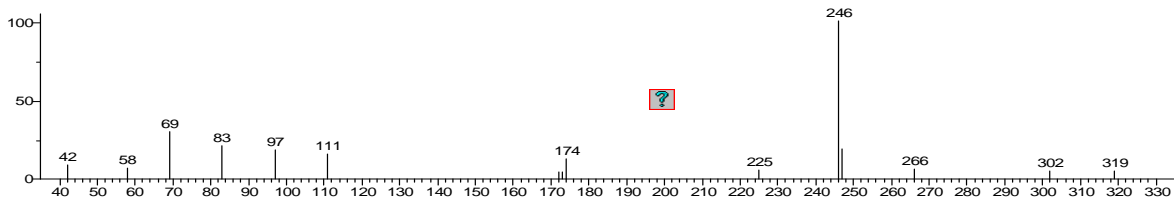
m/z 260(261)	2629.5	7.554				
m/z 260(333)	2629.1		1.433		1.318	
m/z 264	2912.1			0.975		Estructura probable
m/z 264 (265)	2910	3,649				
m/z 268 (359)	2904.9	0.523				
m/z 272 (315)	2761.4	0.643				
m/z 278 (279)	3047.8	0.904	6.887		2.905	
m/z 280(281)	2376.6	0.510				
m/z 282(283)	2377.1		4.812			
m/z 296 (297)	2641.9			0.337	5.272	
m/z 309(429)	3125.5		0.698			
m/z 311(389)	3215.6		0.985			
m/z 344(345)	2591.4	2,250				Estra-1,3,5(10)- triene-2,17-diol, 3- methoxy-, diacetate, (17á)-
m/z 354(354) alcaloide?	3013.4				0.768	
Nerinina	2474.6	0.653	0.769		1.305	Son lo mismo?
Nerinina 2	2815.9				1.926	
Norlicoramina	2588	<b>17.328</b>				Estructura probable
Norpluvina??	2541.2	0.991				
Oxoasoanina	2977.9	2,939			0.558	
p,p'-Dioctildipenilamina	2940.7		3.628		0.170	
Panracina NIST	2611.1			6.715	2.508	
Powelina	2472.52		6.523		7.002	
Trisfaeridina	2272.5				0.641	
Ungiminorina	2890.9	1,156				
Urgiminorina? Leucojum?				0.890		
Vitatina	2465.1			6.246		
Vitatina (crinina)	2462.2		4.769			
Vitatina acetato	2559		11.900		2.664	



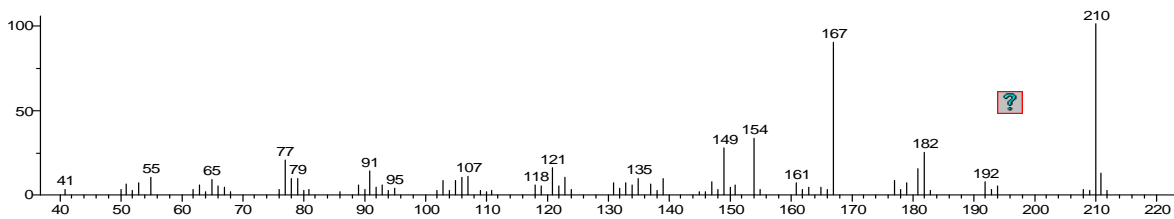
**Anexo 21.** Espectro de masas del compuesto desconocido de *Z. fosteri* con masa molecular de 174 y un pico base de 275.



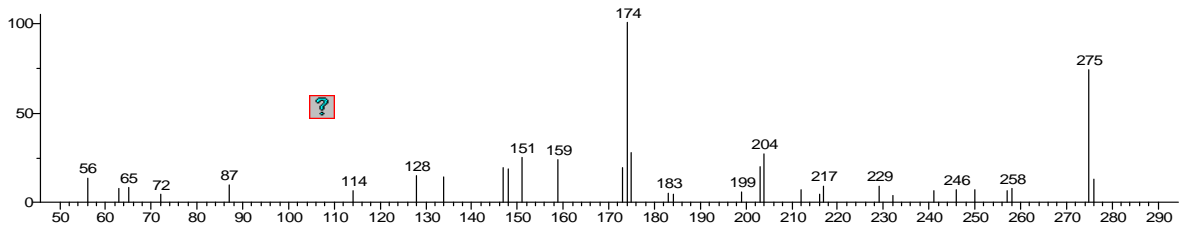
**Anexo 22.** Espectro de masas del compuesto desconocido de *Z. fosteri* con masa molecular de 247 y un pico base de 175.



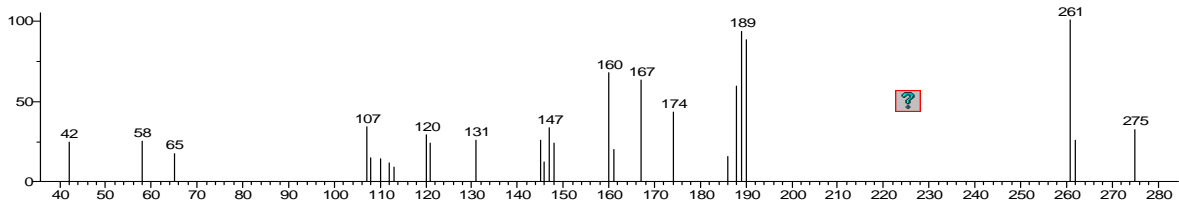
**Anexo 23.** Espectro de masas del compuesto desconocido de *Z. fosteri* con masa molecular de 319 y un pico base de 246.



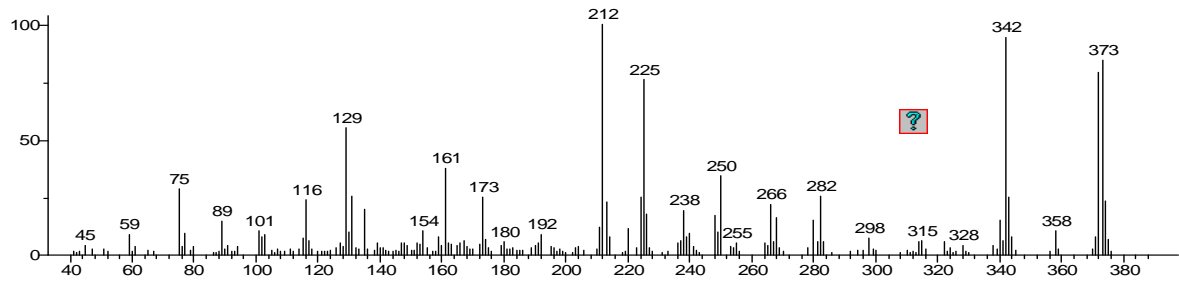
**Anexo 24.** Espectro de masas del compuesto desconocido de *Z. fosteri* con masa molecular de 211 y un pico base de 210.



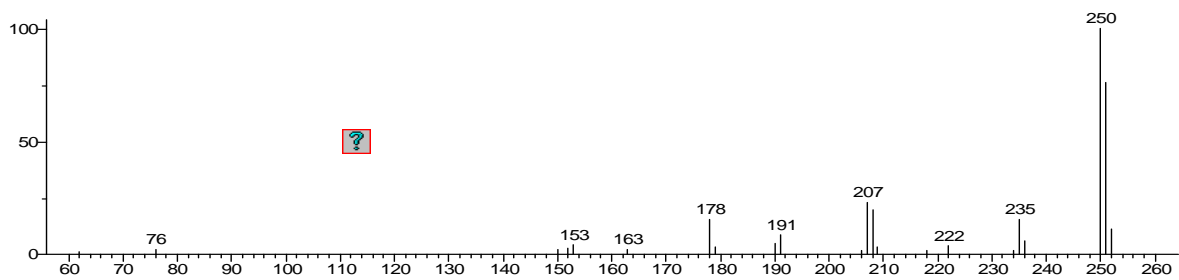
**Anexo 25.** Espectro de masas del compuesto desconocido de *Z. fosteri* con masa molecular de 275 y un pico base de 174.



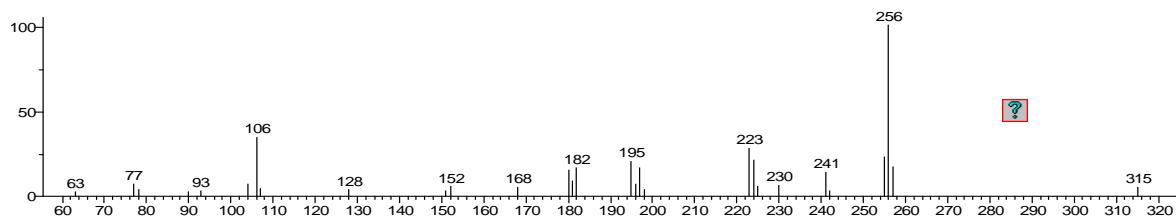
**Anexo 26.** Espectro de masas del compuesto desconocido de *Z. fosteri* con masa molecular de 275 y un pico base de 261.



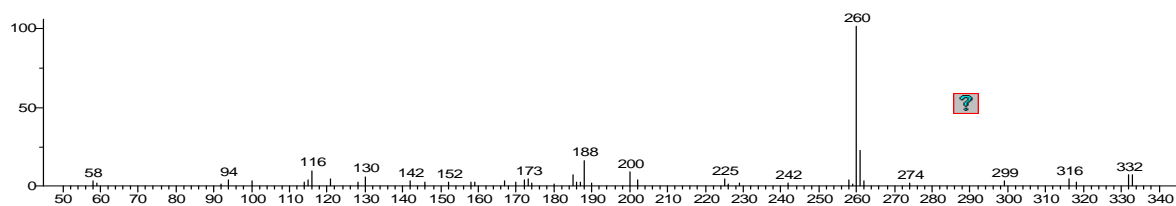
**Anexo 27.** Espectro de masas del compuesto desconocido de *Z. fosteri* con masa molecular de 373 y un pico base de 212.



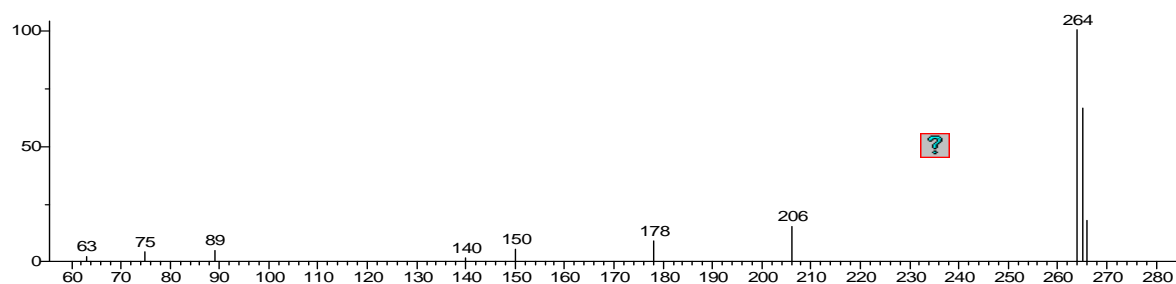
**Anexo 28.** Espectro de masas del compuesto desconocido de *Z. fosteri* con masa molecular de 251 y un pico base de 250.



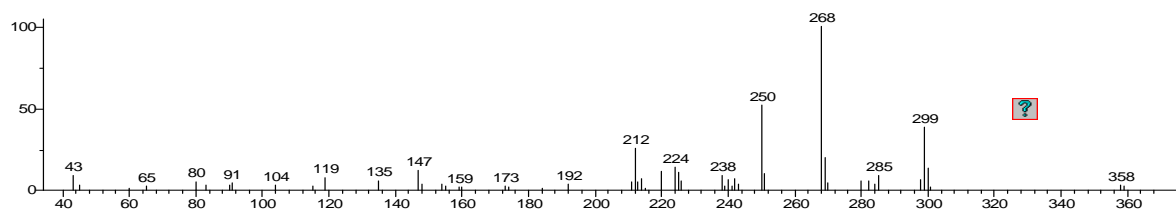
**Anexo 29.** Espectro de masas del compuesto desconocido de *Z. fosteri* con masa molecular de 315 y un pico base de 256.



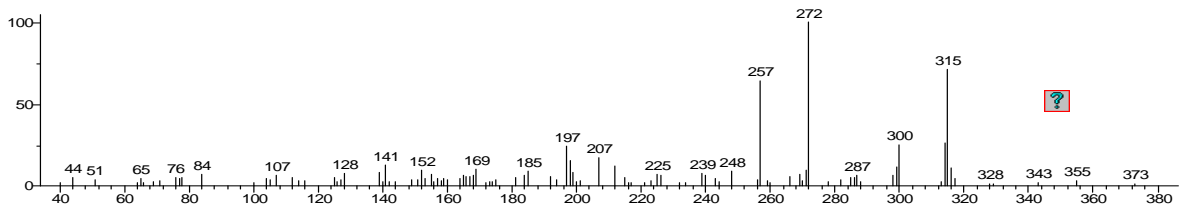
**Anexo 30.** . Espectro de masas del compuesto desconocido de *Z. fosteri* con masa molecular de 333 y un pico base de 260.



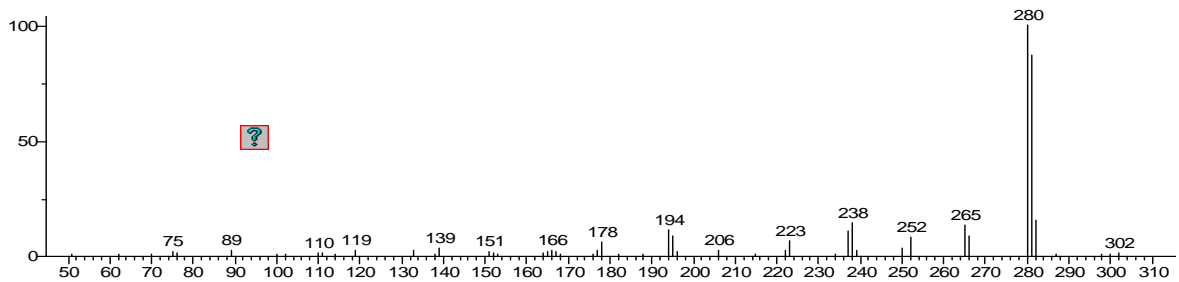
**Anexo 31.** Espectro de masas del compuesto desconocido de *Z. fosteri* con masa molecular de 265 y un pico base de 264.



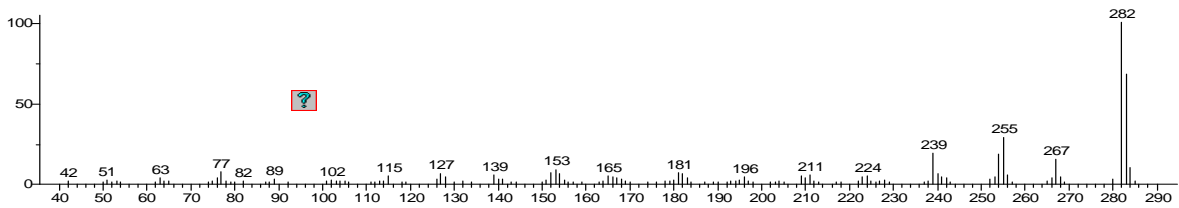
**Anexo 32.** Espectro de masas del compuesto desconocido de *Z. fosteri* con masa molecular de 299 y un pico base de 268.



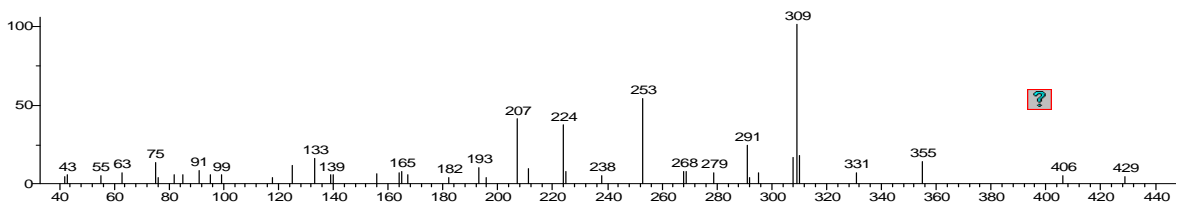
**Anexo 33.** Espectro de masas del compuesto desconocido de *Z. fosteri* con masa molecular de 315 y un pico base de 272.



**Anexo 34.** Espectro de masas del compuesto desconocido de *Z. fosteri* con masa molecular de 281 y un pico base de 280.

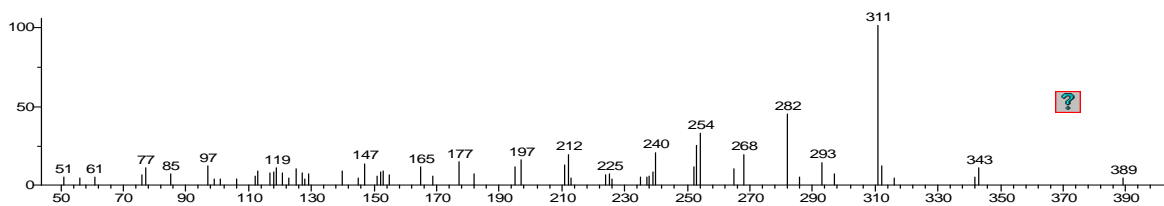


**Anexo 35.** Espectro de masas del compuesto desconocido de *Z. fosteri* con masa molecular de 283 y un pico base de 282.

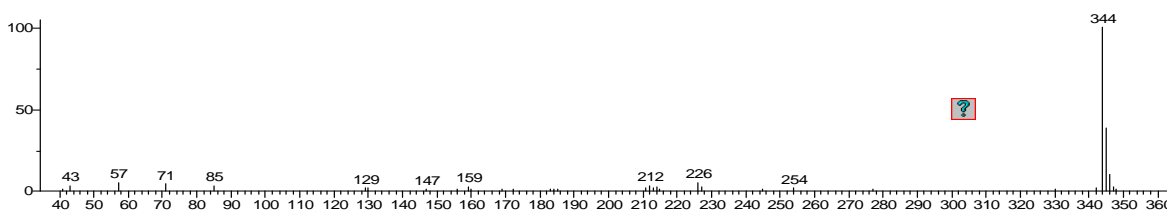


**Anexo 36.** Espectro de masas del compuesto desconocido de *Z. fosteri* con masa molecular de 429 y un pico base de 309.

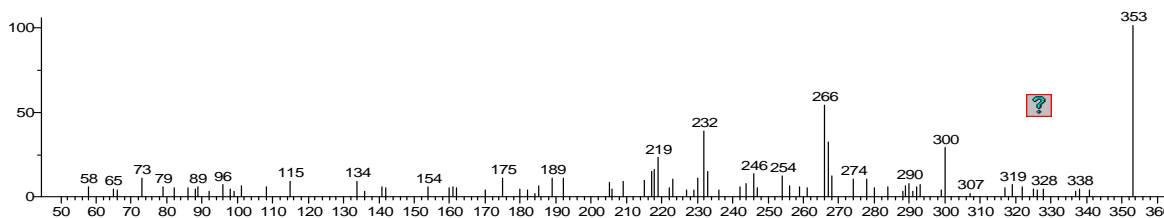




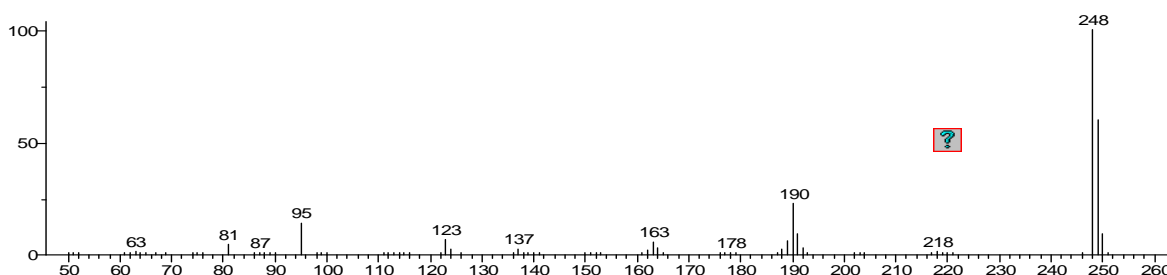
**Anexo 37.** Espectro de masas del compuesto desconocido de *Z. fosteri* con masa molecular de 389 y un pico base de 311.



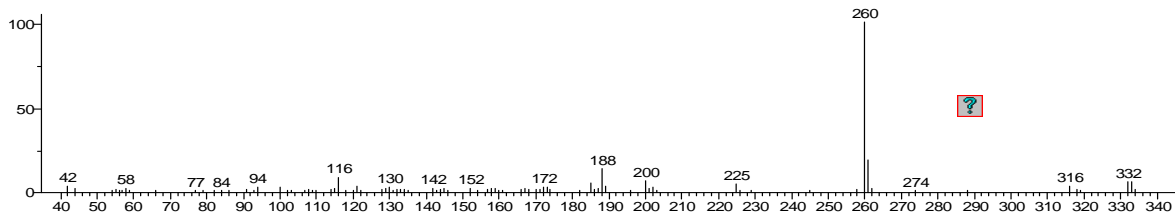
**Anexo 38.** Espectro de masas del compuesto desconocido de *Z. fosteri* con masa molecular de 345 y un pico base de 344.



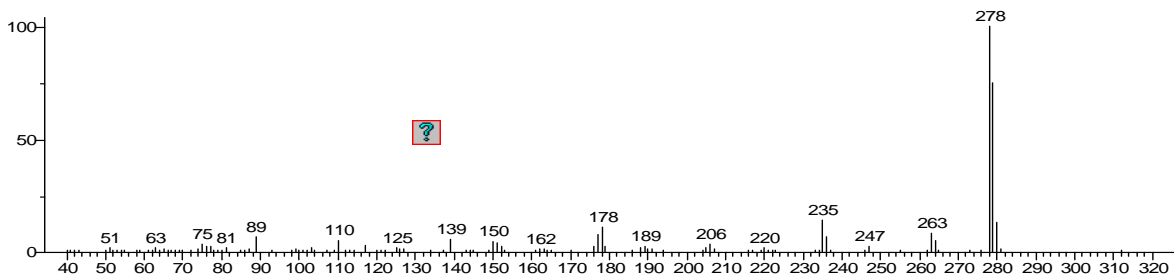
**Anexo 39.** Espectro de masas del compuesto desconocido de *Z. fosteri* con masa molecular de 353 y un pico base de 353.



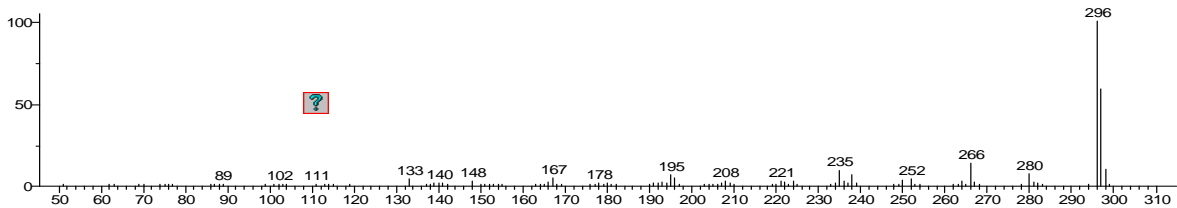
**Anexo 40.** Espectro de masas del compuesto desconocido de *Z. fosteri* con masa molecular de 249 y un pico base de 248.



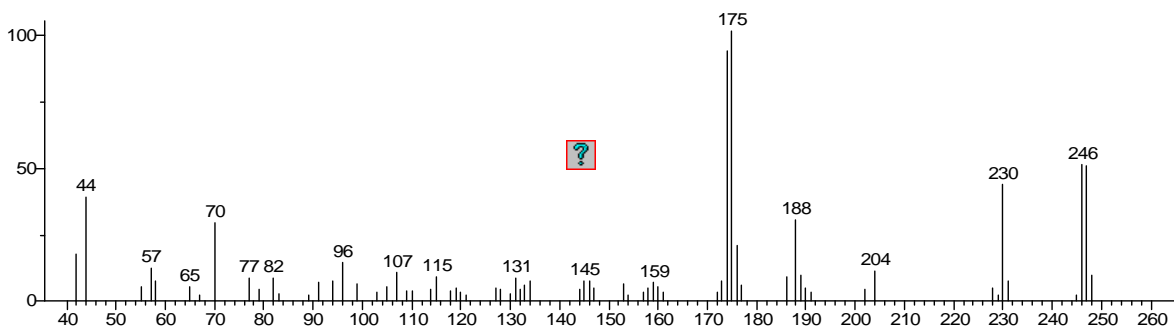
**Anexo 41.** Espectro de masas del compuesto desconocido de *Z. fosteri* con masa molecular de 261 y un pico base de 260.



**Anexo 42.** Espectro de masas del compuesto desconocido en la fracción de alcaloides de *Z. fosteri* con masa molecular de 279 y un pico base de 278.



**Anexo 43.** Espectro de masas del compuesto desconocido en la fracción de alcaloides de *Z. fosteri* con masa molecular de 297 y un pico base de 296.



**Anexo 44.** Espectro de masas del compuesto desconocido en la fracción de alcaloides de *Z. fosteri* con ión molecular de 247 y un pico base de 175.

## *H. concolor*

**Anexo 45.** Compuestos detectados en la (CG-EM) del extracto metanólico de las hojas de *H. concolor*.

GC 5353.D_ZCON EM		Mon Dec 16 12:57:07 2013				
ID	Rt	RI	% Max	% Total	Comments	
	1	4,282	21.47	7,534	x	
Sugar		7,663	28.8	10,104	x	
<b>Galanthamine</b>	<b>21,901</b>	<b>2404.4</b>	<b>100</b>	<b>35,084</b>		
Chlidanthine	21,995	2410.8	57.7	20,243		
Sanguinine	22,182	2422.9	15.12	5,306		
Tocopherol (Vit. E)	32,206		10.66	3,740	x	
Sterol	34,865		18.76	6,582	x	
$\beta$ -Amyrin	35,604		20.91	7,337	x	
	9	36,445	11.6	4,070	x	

**Anexo 46.** Compuestos detectados en la (CG-EM) del extracto metanólico de los bulbos de *H. concolor*.

GC 8432.D_ZC-BF-EM		Mon Feb 27 10:02:51 2012				Lycorine > 1%
ID	Rt	RI	% Max	% Total	Comments	
Sugars	5,684		5.83	2,769		
Sugars	7,706		13.34	6,338		
Sugars	8,037		18.27	8,679		
FA derivative	14,060		7.45	3,539		
FA derivative	16,821		19.01	9,029		
FA derivative	16,923		8.67	4,118		
FA derivative	17,416		4.96	2,355		
FA derivative	17,501		2.62	1,242		
<b>Galanthamine</b>	<b>21,647</b>	<b>2385.7</b>	<b>100.00</b>	<b>47,504</b>		
Chlidantine	21,723	2390.8	6.96	3,308		
Sanguinine	21,936	2404.2	18.51	8,795		
Narwedine	22,811	2461.2	1.84	0,876		
Sterol	34,611		3.05	1,448		

**Anexo 47.** Compuestos detectados en la (CG-EM) del extracto metanólico de las raíces de *H. concolor*.

GC 2727.D_ZCON-1-R		Mon Aug 02 11:04:14 2010		
ID	RI	% Max	% Total	Comments
-	7,637	71.20	26,956	
-	9,123	12.29	4,652	
-	9,401	0.60	0.228	
-	13,124	1.54	0.582	
FA	13,817	1.96	0.741	
Phtalate	14,323	5.99	2,267	
<b>Galanthamine</b>	<b>21,288</b>	<b>100.00</b>	<b>37,859</b>	
Chlidantine	21,381	5.52	2,092	
Sanguinine	21,541	7.62	2,887	
	21,617	2.08	0.789	
Narwedine	22,478	2.36	0.892	
8-O-Demethylmaritidine	22,942	7.80	2,953	
-	23,212	2.83	1,072	
Lycorine	26,505	19.98	7,563	
-	32,954	3.91	1,482	
-	33,317	3.85	1,457	
Sterol	34,204	12.23	4,630	
-	38,070	2.38	0.899	

**Anexo 48.** Compuestos detectados en la (CG-EM) del extracto metanólico del escape de *H. concolor*.

GC 2723.D_ZCON-1-T		Fri Jul 30 13:08:36 2010		
ID	RI	% Max	% Total	Comments
-	8,326	8.59	3,423	
Phtalate	14,332	7.14	2,847	
<b>Galanthamine</b>	<b>21,324</b>	<b>100.00</b>	<b>39,845</b>	
Chlidanthine	21,426	62.35	24,845	
Sanguinine	21,596	44.26	17,635	
N-demethylgalanthamine	21,953	7.29	2,904	
Sterol	34,228	21.33	8,500	

**Anexo 49.** Compuestos detectados en la (CG-EM) del extracto metanólico de los frutos de *H. concolor*.

GC 2725.D_ZCON-1-F		Fri Jul 30 13:10:55 2010		
ID	RI	% Max	% Total	Comments
<b>Phtalate</b>	<b>14,324</b>	<b>100.00</b>	<b>48,948</b>	
Galanthamine	21,290	36.99	18,107	
Phtalate	23,532	17.19	8,415	
-	34,220	9.34	4,572	
steroid	38,102	40.77	19,958	

**Anexo 50.** Compuestos detectados en la (CG-EM) del extracto metanólico de las semillas de *H. concolor*.

GC 2727.D_ZCON-1-S		Fri Jul 30 13:12:49 2010		
ID	RI	% Max	% Total	Comments
-	4,648	5.92	3,026	
-	5,879	4.77	2,441	
-	7,392	12.15	6,210	
<b>Galanthamine</b>	<b>21,298</b>	<b>100.00</b>	<b>51,118</b>	
Chlidanthine	21,400	30.41	15,543	
Sanguinine	21,562	11.26	5,756	
Lycorine	26,515	15.40	7,872	
Sterol	34,228	15.72	8,034	

**Anexo 51.** Compuestos detectados en la (CG-EM) la Fase Orgánica 1 de las hojas de *H. aff. concolor*.

GC 5351.D_ZCON EA		Mon Dec 16 12:56:36 2013			Habranthine, 3-O-Acetylgalanthamine < 1%
ID	Rt	RI	% Max	% Total	Comments
<b>Galanthamine</b>	<b>22,020</b>	<b>2412.5</b>	<b>100</b>	<b>47,322</b>	
Chlidanthine	22,182	2422.0	87.08	41,206	
Sanguinine	22,343	2433.0	20.94	9,910	
N-Demethylgalanthamine	22,649	2452.2	1.24	0.585	
Narwedine	23,176	2486.0	1.11	0.527	
3-O-Acetylsanguinine	23,855	2530.1	0.95	0.45	

**Anexo 52.** Compuestos detectados en la (CG-EM) la Fase Orgánica 1 de los bulbos de *H. aff. concolor*.

GC 8410.D_ZC-BF-01		Galanthamine < 1%		
ID	Rt	% Max	% Total	Comments
FA derivative	14,069	41.77	11,628	
Phtalate	14,595	4.18	1,163	
<b>FA derivative</b>	<b>16,847</b>	<b>100.00</b>	<b>27,838</b>	
4	16,940	48.48	13,495	
FA derivative	17,373	8.27	2,303	
6	17,467	20.50	5,706	
FA	17,552	15.08	4,198	
FA	20,661	6.81	1,897	
FA derivative	23,813	4.39	1,222	
FA derivative	27,729	3.55	0.987	
11	31,459	12.08	3,364	
12	32,155	4.11	1,143	
13	32,410	29.24	8,139	
14	33,421	8.25	2,298	
15	34,296	10.77	2,997	
Sterol	34,627	24.04	6,692	
17	35,307	17.71	4,931	

**Anexo 53.** Compuestos detectados en la (CG-EM) la Fase Orgánica 2 de los bulbos de *H. concolor*.

GC 8412.D_ZC-BF-02		Anhydrolycorine, 3-O-Acetylgalanthamine < 1%			
Mon Feb 27 09:54:22 2012					
ID	Rt	RI	% Max	% Total	Comments
Hydroxyamphetamine	7,791		0.50	0.397	
Dimethyltryptamine	7,901		0.23	0.181	
FA derivative	14,060		0.69	0.551	
FA derivative	16,821		1.86	1,478	
FA derivative	16,923		0.95	0.755	
<b>Galanthamine</b>	<b>21,808</b>	<b>2395.7</b>	<b>100.00</b>	<b>79,611</b>	
Sanguinine	21,986	2407.4	6.31	5,026	
N-Demethylgalanthamine	22,284	2427.1	4.45	3,541	
Narwedine	22,810	2461.4	2.25	1,789	
Phtalate	23,813		0.44	0.347	
Lycorine	26,888	2737.2	7.94	6,323	

**Anexo 54.** Compuestos detectados en la (CG-EM) la Fase Orgánica 3 de los bulbos de *H. concolor*.

GC 8414.D_ZC-BF-03		Anhydrolycorine, Narwedine < 1%			
Mon Feb 27 09:55:39 2012					
ID	Rt	RI	% Max	% Total	Comments
FA derivative	14,060		12.56	4,291	
Phtalate	14,562		7.06	2,412	
FA derivative	16,821		30.01	10,257	
FA derivative	16,923		13.91	4,754	
<b>Galanthamine</b>	<b>21,587</b>	<b>2382.1</b>	<b>100.00</b>	<b>34,174</b>	
Chlidantine	21,681	2388.2	29.33	10,022	
Sanguinine	21,859	2399.2	64.35	21,991	
Phtalate	23,804		10.43	3,566	
Lycorine	26,812	2731.3	13.35	4,562	
Amide	27,415		11.62	3,972	

**Anexo 55.** Alcaloides detectados en el análisis de (CG-EM) de la FO2 (fracción alcaloidea) de las hojas, bulbos, raíces, escapo y semillas de *H. concolor*. RI: índice de retención.

Compuesto	RI	Hojas	Bulbos	Raíces	Escapo	Semillas
<b>Galantamina</b>	2385.7	<b>47.32</b>	<b>79,611</b>	<b>66.382</b>	<b>47.667</b>	<b>64.038</b>
Sanguinina	2404.2	9.91	5,026	x	17.645	7.252
Clidantina	2390.8	<b>41.20</b>		x	21.335	20.027
Narwedina	2461.2	0.52	1,789	x	0.875	1.2
N-demetilgalantamina	2427.1	0.58	3,541	x	12.162	3.06
Licorina	2737.2		6,323	x		7.336
8-O-Demetilmaritidina						
m/z 165(269)				19.469		
Anhidrolicorina						
11,12-Dehidroanhidrolicorina						0.544
3-O-Acetilgalantamina						0.543
N-Formilnorgalantamina						7.336
3-O-Acetylsanguinina		0.45				

## *H. aff. concolor*

**Anexo 56.** Compuestos detectados en la (CG-EM) del extracto metanólico de las hojas de *H. aff. concolor*.

GC 0348.D_EMHH	Mon Oct 08 09:47:35 2012				HLY type < 1%
ID	Rt	RI	% Max	% Total	Comments
Glycerin	4,325	1134.6	53.27	4	
4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	4,495	1147	54.45	4	
1,2,3-Propanetriol, diacetate	4,843	1186.4	4.25	0.333	
4	5,072	1210	26.57	2	
5	5,183	1220.3	11.68	0.916	
6	5,336	1236.1	4.15	0.326	
7	5,429	1245.4	72.85	6	
: 1,2,3-Propanetriol, diacetate	5,701	1272.9	71.39	6	
9	5,769	1280.1	52.91	4	
Ethanone, 1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)-	6,202	1324.4	7.07	0.555	
11	6,381	1341.4	9.58	0.752	
12	6,975	1402	6.59	0.517	
13	7,239	1428.5	50.13	4	Sucrose
14	7,366		54.04	4	
1-Methyl-5-imidazolic hydrazide	7,587	1495.6	26.77	2	
16	8,598	1565.6	36.30	3	2H-1-Benzopyran-3,4-diol, 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-3,4-dihydro-6-à-L-
17	8,734	1579	21.75	2	Galactopyranoside, methyl 6-deoxy-3-Deoxy-d-mannonic lactone
18	8,878	1593.1	59.27	5	
19	8,921	1598.5	46.93	4	
20	9,108	1613	45.50	4	
21	9,176	1618.4	63.47	5	
22	9,439	1639.5	16.39	1	
23	11,231	1777.4	4.81	0.377	
24	11,996	1831.4	9.30	0.730	Cyclohexane, 1,1'-(oxydi-2,1-ethanediyl)bis[4-methyl-
25	12,081	1837	6.66	0.523	
26	13,270	1914.8	9.82	0.770	Pentadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester



Continuación tabla

n-Hexadecanoic acid	13,780	1948.2	18.37	1	
Oxazolidine, 3-phenyl-	13,856	1958.4	3.56	0.279	
29	15,963	2087.8	5.41	0.425	9,15-Octadecadienoic acid, methyl ester, (Z,Z)-
9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-	16,074	2094.4	26.54	2081	
6-Dimethylamino saccharin	16,261	2103	71.95	6	
9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	16,541	2123.8	12.63	0.990	
9,12,15-Octadecatrien-1-ol, (Z,Z,Z)-	16,651	2131.1	87.68	7	
34	16,974	2151.6	4.45	0.349	
35	18,512	2248.2	23.70	2	
Ismine	18,835	2269	4.57	0.359	
37	21,817	2460.7	11.83	0.928	
281	22,394	2499.4	19.70	2	
?? Homolycorine	24,476	2638.2	25.17	2	
Tazettine	24,951	2640.4	4.35	0.341	
41	32,291	3194.9	25.56	2	
42	32,393	3196.2	3.61	0.283	
<b>ç-Sitosterol</b>	<b>33,464</b>	<b>3278.1</b>	<b>100.00</b>	<b>8</b>	
>1% ?Deoxytazettine; 249 (11,12- Dehidroanhydrolycorine)					

**Anexo 57.** Compuestos detectados en la (CG-EM) del extracto metanólico de los bulbos de *H. aff. concolor*.

GC 0220.D_HBEM	Wed Sep 26 10:43:52 2012				HLY type < 1%
ID	Rt	RI	% Max	% Total	Comments
4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	4,520	1151.8	1.10	0.719	
2	5,556	1256.8	3.41	2.231	
3	5,726	1274	3.05	1.998	
4	5,820	1283.9	10.31	6.748	
5	7,213	1427.1	9.88	6.467	
<b>Sucrose</b>	<b>7,493</b>	<b>1455.8</b>	<b>100.00</b>	<b>65.454</b>	
	9,022	1610.4	3.74	2.451	Ac. Aspártico
m/z 175 (247)	18,571	2252.8	4.20	2.749	
Ismine, Trispharedine	18,852	2270,9;2275,5	0.63	0.415	
281	22,411	2502.4	3.60	2.358	
Tazettine	24,501	2644.4	1.83	1.199	
Lycorine. FIN	25,877	2741.3	7.05	4.614	
13	32,673		1.80	1.180	
14	33,107		2.16	1.417	
>1% 249 (11,12-Dehidroanhydrolycorine)					

**Anexo 58.** Compuestos detectados en la (CG-EM) la Fase Orgánica 2 de las hojas de *H. aff. concolor*.

GC 0334.D_F02-BH	Mon Oct 08 09:45:15 2012				HLY type < 1%
ID	Rt	RI	% Max	% Total	Comments
1	5,701	1273.5	2.22	0.515	
2	6,975	1401.4	1.26	0.292	
3	7,205	1426.7	9.90	2.295	
9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester	15,963	2087.8	2.23	0.518	
5	16,201	2102.9	3.02	0.701	
1,4-Benzenediamine, N-(1-methylethyl)-N'-phenyl-	16,337	2111.4	1.19	0.275	
m/z 175 (247)	18,478	2246.5	46.32	10.739	
Trisphaeridine	18,843	2269.4	29.18	6.766	
5,6- Dihidrobicolorine (NAT)	19,642	2320.1	5.27	1.221	Benzo[1,3]dioxol-5-ylmethylene-p-tolyl-amine
Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	20,789	2392.3	7.55	1.751	
m/z 238(299)	21,834	2461.7	21.30	4.939	
Anhydrolycorine	22,301	2492.5	1.48	0.343	Galathan, 1,2,3,12,15,16-hexadehydro-9,10-[methylenebis(oxy)]-
281	22,411	2499.9	53.79	12.472	
Deoxytazettine	22,904	2532.9	23.71	5.497	
m/z 149 (279)	23,082	2545	6.86	1.591	
249 (811, 12-Dehydroanhydrolycorine)	23,855	2596.3	11.43	2.649	
Haemanthamine	24,255	2624.9	16.91	3.921	
Tazettine	24,501	2641.6	54.30	12.590	
m/z 258 (373)	25,325	2699.6	5.90	1.367	
m/z 250(331)	25,427	2708	9.65	2.237	
<b>Licorina. FIN</b>	<b>25,894</b>	<b>2740.8</b>	<b>100.00</b>	<b>23.186</b>	
m/z 278(279)	27,763	2873.4	8.80	2.040	
p,p'-Dioctyldiphenylamine	28,706	2940.8	2.17	0.503	
m/z 280 (Oxassoanine)	29,233	2978.1	6.86	1.591	
>1% Ismine; ??Lycoramine; ??2-Dehydroxylycorine; Epi-macronine.					

**Anexo 59.** Compuestos detectados en la (CG-EM) la Fase Orgánica 2 de los bulbos de *H. aff. concolor*.

GC 0332.D_FO2-H H		Mon Oct 08 09:44:57 2012			HLY type < 1%
ID	Rt	RI	% Max	% Total	Comentarios
1	5,098	1209.9	17.95	3.522	
2	6,729	1377	1.23	0.242	
2H-1-Benzopyran-3,4-diol, 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-3,4-dihydro-6	8,598	1565.9	3.29	0.646	
m/z 225(227)	16,201	2102.8	2.76	0.542	
Benz Deriv.	16,337	2111.3	1.62	0.318	
m/z 189(261)	17,526	2186.3	4.25	0.834	
<b>m/z 175(247)</b>	<b>18,512</b>	<b>2248.5</b>	<b>100.00</b>	<b>19.623</b>	
Ismine	18,852	2270	40.82	8.010	
5-6-Dihydrobicolorine (NAT) 3	19,659	2320.5	5.50	1.080	
??Nerinine	20,789	2364.9	12.14	2.382	
m/z 238(299)	21,842	2462	33.43	6.559	
281	22,411	2500.6	60.63	11.898	
Deoxytazettine	22,929	2533.7	31.70	6.221	
Kirkine STD-db-5	23,099	2546	34.30	6.730	
m/z 283(284)	23,473	2570.8	9.52	1.867	
249(11,12-Dehydroanhydrolycorine)	23,855	2596.4	4.06	0.796	
17	24,255		8.43	1.654	
m/z 109(345)	24,484	2639.9	49.45	9.704	
Tazettine	24,518	2643.2	64.24	1.261	
??Anhydrolycorine	25,436	2708.5	3.77	0.739	
Epi-macronine	26,795	2804.8	3.47	0.682	
m/z 278(279)	27,763	2873.8	7.64	1.499	
??Urgimiorine; ??Leucojum	28,205	2904.5	1.40	0.275	
p,p'-Diocetyl-diphenylamine	28,715	2940.9	4.40	0.863	
Oxoassoanine	29,241	2978.4	3.61	0.709	
>1% ??Lycorine. FIN; Galanthine??.					

**Anexo 60.** Compuestos detectados en la (CG-EM) la Fase Orgánica 3 de las hojas de *H. aff. concolor*.

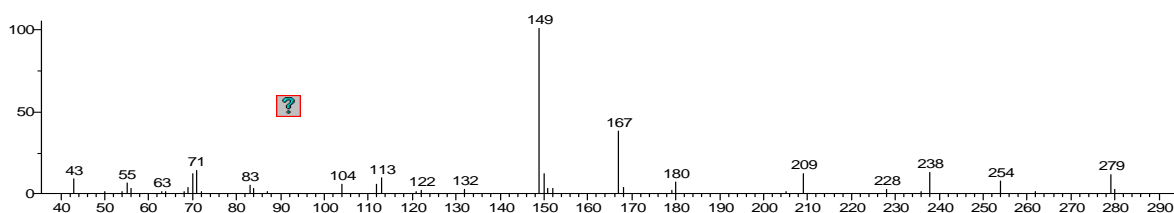
GC 0324.D_FO3 H H		Mon Oct 08 09:43:23 2012			HLY type < 1%
ID	Rt	RI	% Max	% Total	Comments
4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	4,495	1151	46.74	10.004	
2	4,673	1157.6	6.34	1.356	
3	4,741	1176.3	11.76	2.517	
2,3-Diaminobut-2-enedinitrile	4,877	1189.5	22.39	4.792	
<b>5</b>	<b>5,072</b>	<b>1209.9</b>	<b>100.00</b>	<b>21.403</b>	
6	5,242	1226.9	41.61	8.905	
2-Furancarboxaldehyde, 5-(hydroxymethyl)-	5,293	1231.5	99.55	21.307	
8	5,404	1247.9	14.82	3.171	
9	5,454	1250.7	42.70	9.139	2-Propanethiol
10	5,522	1253.6	68.45	14.650	Maltol
11	7,408	1445.6	6.28	1.344	
1,6-Anhydro- $\alpha$ -D-glucopyranose (levoglucosan)	8,003	1505.9	6.60	1.412	
>1% ??? Trisphaeridin					

**Anexo 61.** Compuestos detectados en la (CG-EM) la Fase Orgánica 3 de los bulbos de *H. aff. concolor*.

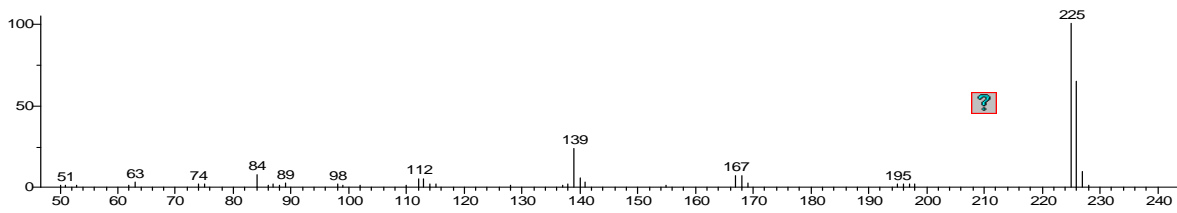
GC 0328.D_FO3 B H		Mon Oct 08 09:44:01 2012			HLY type < 1%
ID	Rt	RI	% Max	% Total	Comments
4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	4,495	1151.1	5.25	3	
Glucosa	4,741	1176	2.72	2	
3	5,038	1204.1	2.38	1	
<b>2-Furancarboxaldehyde, 5-(hydroxymethyl)-</b>	<b>5,302</b>	<b>1230.9</b>	<b>100.00</b>	<b>63</b>	
Glucosa	5,514	1252.8	14.27	9	
Ac. graso	5,701	1272.1	2.33	1	
	6,763	1381.4	6.01	4	1,3-Dioxepane, 2-heptyl-
Glucosa	7,256	1431.6	20.33	13	
Glucosa	7,706	1476.4	6.01	4	

**Anexo 62.** Alcaloides detectados en el análisis de (CG-EM) de la FO2 (fracción alcaloidea) de las hojas y bulbos de *H. aff. concolor*.

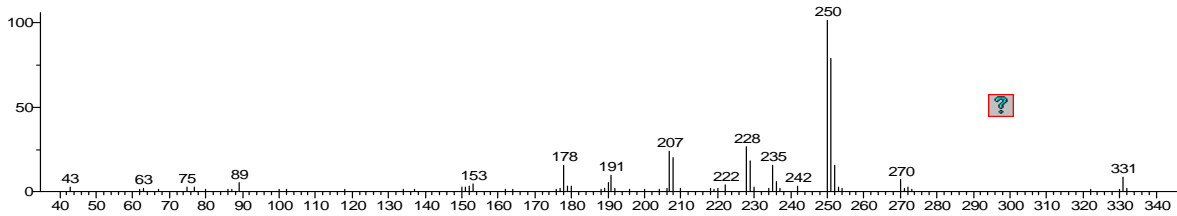
Alcaloide	RI	Hoja	Bulbo	Comentarios
249 (11, 12-Dehidroanhidrolicorina)	2596.3	0.796%	2.649%	
281 (Galantindol)	2499.9	11.898%	12.472%	
5-6-Dihidrobicolorina (NAT) 3	2320.5	1.080%	1.221%	
Anhidrolicorina	2708.5	0.739%		Estructura probable
Anhidrolicorina	2492.5		0.343%	
Deoxitazetina	2532.9	6.221%	5.497%	
Epi-macronina	2804.8	0.682%		
Hemantamina	2624.9		3.921%	
Ismina	2270	8.010%		
Kirkina STD-db-5	2546	6.730%		
<b>Licorina</b>	<b>2740.8</b>		<b>23.186%</b>	
m/z 109(345)	2639.9	9.704%		
m/z 149 (279)	2545		1.591%	
<b>m/z 175(247)</b>	2248.5	<b>19.623%</b>	10.739%	
<b>m/z 189(261)</b>	2186.3	0.834%		
m/z 225(227)	2102.8	0.542%		
<b>m/z 238(299)</b>	2462	6.559%	4.939%	
m/z 250(331)	2708		2.237%	
m/z 258 (373)	2699.6		1.367%	
<b>m/z 278(279)</b>	2873.8	1.499%	2.040%	
m/z 283(284)	2570.8	1.867%		Es alcaloide?
Nerinina	2364.9	2.382%		Estructura probable
m/z 280 (Oxasoanina)	2978.1		1.591%	
Oxasoanina	2978.4	0.709%		
Tazetina	2643.2	12.61%	12.590%	
Trisfaeridina	2269.4		6.766%	
Urgiminorina; ??Leucojum	2904.5	0.275%		Estructura probable



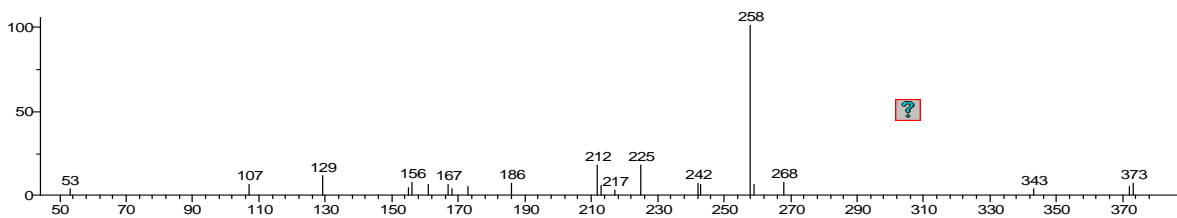
**Anexo 63.** Espectro de masas del compuesto desconocido de *H. aff. concolor* con masa molecular de 279 y un pico base de 149.



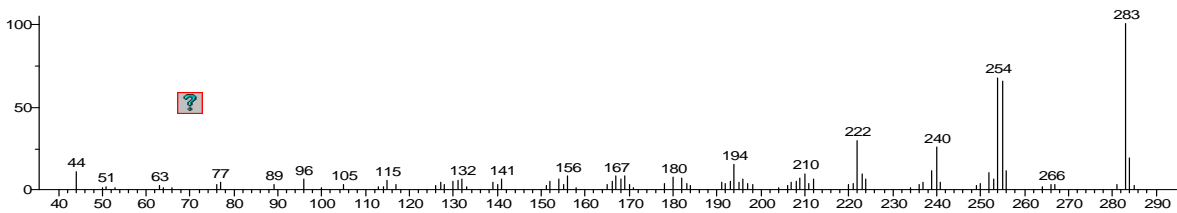
**Anexo 64.** Espectro de masas del compuesto desconocido de *H. aff. concolor* con masa molecular de 227 y un pico base de 225.



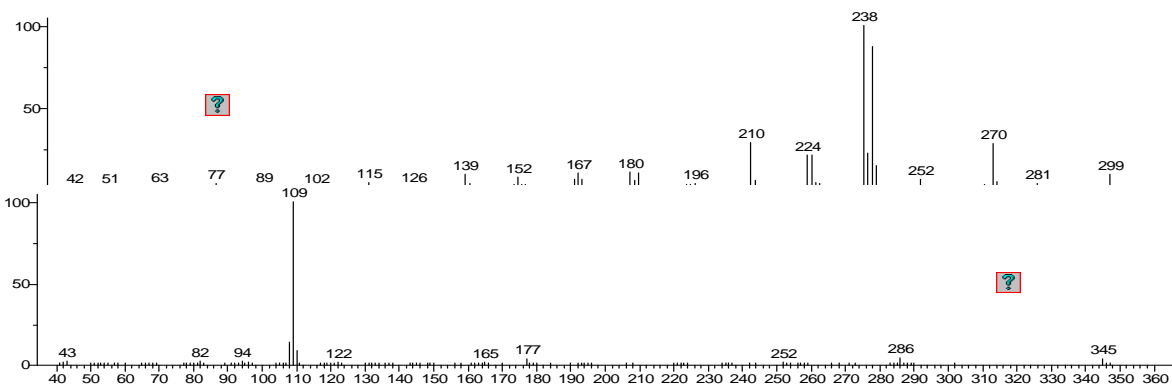
**Anexo 65.** Espectro de masas del compuesto desconocido de *H. aff. concolor* con masa molecular de 331 y un pico base de 250.



**Anexo 66.** Espectro de masas del compuesto desconocido de *H. aff. concolor* con masa molecular de 373 y un pico base de 258.



**Anexo 67.** Espectro de masas del compuesto desconocido de *H. aff. concolor* con masa molecular de 284 y un pico base de 283.



**Anexo 68.** Espectro de masas del compuesto desconocido de *H. aff. concolor* con masa molecular de 299 y un pico base de 238.

**Anexo 69.** Espectro de masas del compuesto desconocido de *H. aff. concolor* con masa molecular de 345 y un pico base de 109.