

**Determinación de la Actividad Citotóxica, Fitotóxica y Anticoagulante de los  
Extractos Etanólicos totales de Hojas y Raíces de *Phaedranassa lehmannii*  
(Amaryllidaceae)**

**YESSICA ZUÑIGA PERAFAN**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA DE COMPUESTOS  
BIOACTIVOS (QCB)  
POPAYÁN  
2019**

**Determinación de la Actividad Citotóxica, Fitotóxica y Anticoagulante de los  
Extractos Etanólicos totales de Hojas y Raíces de *Phaedranassa lehmannii*  
(Amaryllidaceae)**

**YESSICA ZUÑIGA PERAFAN**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Química

Director

**Andrea Carolina Cabanzo, Ph.D.**

PROFESORA DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Asesor

**FABIO ANTONIO CABEZAS FAJARDO, Ph.D.**

PROFESOR DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA DE COMPUESTOS  
BIOACTIVOS  
POPAYÁN  
2019**

**Nota de aceptación**

---

---

---

---

Director

---

**Andrea Carolina Cabanzo, Ph.D.**

Jurado

---

**Danny Alejandro Arteaga, Ph.D.**

Jurado

---

**Jaime Martin Franco, Ph.D.**

Fecha de sustentación: Popayán, 31 de Octubre de 2019

## **DEDICATORIA**

A Dios por fortalecer mi fe cada día y por permitirme lograr tan anhelado sueño.

A mis padres David Zuñiga y Clara Perafán por su esfuerzo y apoyo incondicional durante todo mi proceso académico.

A mi abuela María Inés Hoyos por todo el apoyo, consejos, ejemplo y amor que siempre me ha brindado.

A todos mis familiares que de alguna u otra manera contribuyeron en mi formación.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al profesor Fabio Cabezas Ph.D., quien ha sido un gran ejemplo a seguir, me ha enseñado, apoyado y acogido en el grupo de investigación en Química de Compuestos Bioactivos.

A la profesora Andrea Cabanzo Ph.D., por dedicarme su tiempo y su gran aporte a mi trabajo de investigación que permitieron finalizar mi proyecto.

Al profesor Fernando Hernandez Ph.D., por su colaboración y apoyo en el desarrollo del trabajo.

Al profesor Juan Carlos Argoti Ph.D., por el aporte de sus conocimientos en los ensayos de actividad biológica.

Al profesor Emerson Rengifo Ph.D., por sus asesorías en química computacional.

Al profesor Eliecer Jiménez Ph.D., por recibirme en su laboratorio, Universidad del Valle, para realizar ensayos de actividad antiofídica de los extractos, y por su colaboración durante el desarrollo de la actividad.

A los miembros de la unidad de análisis industriales de la Universidad del Cauca por permitirnos el uso de los equipos necesarios para culminar éste trabajo.

A los profesores del Departamento de Química por su enseñanza y contribución en mi formación académica y como persona.

A mis amigos y compañeros de Laboratorio Edith Muñoz, Jorge Luis Parra, Arley Jiménez y Juan Carlos Ortiz por su compañía, consejos y colaboración en los ensayos.

A mi familia, que sin ellos no hubiese sido posible mi formación profesional y personal.

## TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN.....	1
2	MARCO TEÓRICO .....	3
2.1	Metabolitos secundarios .....	3
2.2	Familia Amaryllidaceae.....	3
2.2.1	Género <i>Phaedranassa</i> .....	5
2.2.2	Clasificación taxonómica de <i>Phaedranassa lehmannii</i> (Regel, s.f.)	6
2.2.3	Alcaloides de la familia Amaryllidaceae .....	6
2.2.3.1	Biosíntesis y clasificación de alcaloides de Amaryllidaceae .....	6
2.3	Cromatografía líquida de alta resolución HPLC .....	8
2.4	Espectrometría de masas y fuente de iones por electrospray ESI-MS.....	10
2.5	Actividad citotóxica sobre <i>Artemia salina</i> .....	12
2.6	Actividad fitotóxica sobre <i>Allium cepa</i> .....	13
2.7	Actividad anticoagulante <i>in vitro</i> .....	14
2.8	Mapas de potencial electrostático molecular (MESP) .....	15
3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
4	OBJETIVOS.....	19
4.1	OBJETIVO GENERAL .....	19
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
5	METODOLOGÍA .....	20
5.1	Reactivos y materiales.....	20
5.2	Material vegetal.....	21
5.3	Obtención de los extractos etanólicos totales.....	22

5.4	Caracterización de metabolitos secundarios de los extractos etanólicos totales.....	22
5.5	Obtención de alcaloides totales .....	23
5.6	Análisis cualitativo de la fracción de alcaloides de hojas y raíces de <i>P. lehmannii</i> mediante UHPLC-MS .....	24
5.7	Determinación de la actividad citotóxica sobre <i>A. salina</i> de los extractos etanólicos totales .....	26
5.8	Determinación de la actividad fitotóxica sobre <i>A. cepa</i> de los extractos etanólicos totales .....	28
5.9	Evaluación de la actividad anticoagulante de los extractos etanólicos totales sobre plasma sanguíneo .....	29
5.10	Cálculo de energía de las moléculas identificadas y generación de los MESP .....	31
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
6.1	Rendimiento de extracción .....	32
6.2	Caracterización de metabolitos secundarios de los extractos etanólicos totales.....	32
6.3	Rendimiento de alcaloides .....	36
6.4	Identificación de los alcaloides presentes en <i>P. lehmannii</i> mediante UHPLC-MS.....	37
6.5	Determinación de la actividad citotóxica sobre <i>A. salina</i> de los extractos etanólicos totales .....	45
6.6	Determinación de la actividad fitotóxica de los extractos etanólicos totales sobre <i>A. cepa</i> .....	48
6.7	Evaluación de la actividad anticoagulante de los extractos etanólicos totales sobre plasma sanguíneo .....	50

<b>6.8</b>	<b>Obtención de los MESP de las moléculas identificadas.....</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>57</b>
<b>8</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>58</b>
<b>9</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>59</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Algunas de las especies de la familia Amaryllidaceae sobre las cuales se han adelantado estudios. A. *Z. candida*; B. *C. subedentata*; C. *P. lehmannii*; D. *E. bonplandii*; E. *E. caucana*; F. *C. jagus*; G. *H. elegans*; H. *C. miniata*.

**Figura 2.** Especies del género *Phaedranassa*. A. *P. brevifolia*, B. *P. cinérea*, C. *P. dubia*, D. *P. glauciflora*, E. *P. schizantha* F. *P. tunguraguae*, G. *P. lehmannii*, H. *P. carmiolii*, I. *P. viridiflora*, J. *P. cuencana* (*Phaedranassa*, 2017).

**Figura 3.** Tipos de alcaloides de Amaryllidaceae.

**Figura 4.** Representación de los principales componentes de un sistema HPLC.

**Figura 5.** Componentes de un espectrómetro de masas.

**Figura 6.** Ionización por electrospray ESI- diagrama general de la fuente de iones.

**Figura 7.** Nauplio de *A. salina* (Muthukrishnan et al., 2017).

**Figura 8.** A. Hojas y B.raíces frescas de *P. lehmannii* (Fuente: fotografía tomada por el autor en el laboratorio de QCB, Unicauca).

**Figura 9.** A. Montaje de extracción Soxhlet de los metabolitos secundarios de *P. lehmannii*, B. Equipo de rotaevaporación. (Fuente: fotografía tomada por el autor en el laboratorio de QCB, Unicauca).

**Figura 10.** Proceso de extracción de alcaloides.

**Figura 11.** Bloque térmico a 37°C. (Fuente: fotografía tomada por el autor en el laboratorio de investigación de farmacología, Univalle).

**Figura 12.** Cromatograma de la fracción de alcaloides de hojas de *P. lehmannii*.

**Figura 13.** Cromatograma de la fracción de alcaloides de raíces de *P. lehmannii*.

**Figura 14.** Espectro de masas del estándar de galantamina.

**Figura 15.** Espectro MS/MS de *m/z* 288-hojas.

**Figura 16.** Espectro MS/MS de *m/z* 288-raíces.

**Figura 17.** Espectro MS/MS de *m/z* 274-hojas.

**Figura 18.** Espectro MS/MS de *m/z* 274-raíces.

**Figura 19.** Espectro MS/MS de *m/z* 290-hojas.

**Figura 20.** Espectro MS/MS de *m/z* 290-raíces.

**Figura 21.** Concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) de los extractos etanólicos totales de hojas y raíces de *P. lehmannii*. (\**p* < 0,05).

**Figura 22.** Crecimiento de las raíces de *A. cepa* del grupo de control y de las diferentes concentraciones de EETH.

**Figura 23.** Crecimiento de las raíces de *A. cepa* del grupo de control y de las diferentes concentraciones de EETR.

**Figura 24.** Concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) de los extractos etanólicos totales de hojas y raíces de *P. lehmannii* (\*\**p* < 0,01).

**Figura 25.** Inhibición de la actividad coagulante inducida por el veneno de *B. asper* por los EET. (\**p* < 0,05, \*\*\**p* < 0,0001).

**Figura 26.** MESP de los alcaloides A) galantamina, B) Pseudolicorina y C) Sanguinina.

**Figura 27.** Visualización molecular de la interacción electrostática de AChE con galantamina generada en VMD.

**Figura 28.** Representación de las interacciones no enlazantes de galantamina con los residuos aminoácidos que conforman la enzima acetilcolinesterasa (---, enlaces de hidrógeno; ---, interacciones hidrofóbicas)

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Reactivos y equipos utilizados.

**Tabla 2.** Pruebas cualitativas realizadas a los extractos etanólicos totales de hojas y raíces de *P. lehmannii* para la determinación de metabolitos secundarios.

**Tabla 3.** Porcentaje de rendimiento de la extracción etanólica de hojas y raíces de *P. lehmannii*.

**Tabla 4.** Resultados obtenidos de las pruebas cualitativas realizadas a los extractos etanólicos totales de hojas y raíces de *P. lehmannii*.

**Tabla 5.** Resultados del rendimiento de extracción de los alcaloides presentes en el extracto etanólico total de hojas y raíces de *P. lehmannii* y de su prueba cualitativa.

**Tabla 6.** Patrón de fragmentación de masas y compuesto identificado por UHPLC/ESI-MS/MS en hojas y raíces de *P. lehmannii*.

**Tabla 7.** Clasificación de toxicidad según el CYTED.

**Tabla 8.** Citotoxicidad de los extractos etanólicos totales de hojas y raíces sobre *A. salina*.

**Tabla 9.** Porcentaje de crecimiento de la raíces de *A. cepa* expuestas a diferentes concentraciones de EET.

**Tabla 10.** Fitotoxicidad de los extractos etanólicos totales de hojas y raíces sobre *A. cepa* (CI<sub>50</sub>, mg/L) .

**Tabla 11.** Actividad anticoagulante de los extractos etanólicos totales de hojas y raíces *P. lehmannii* sobre de plasma sanguíneo.

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

**Esquema 1.** Ruta biosintética del núcleo de los alcaloides de Amaryllidaceae.

**Esquema 2.** Patrón de fragmentación de galantamina.

**Esquema 3.** Patrón de fragmentación de sanguinina.

**Esquema 4.** Patrón de fragmentación de pseudolicorina.

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media
CL <sub>50</sub>	Concentración letal 50
DFT	Teoría del Funcional de Densidad
DMSO	Dimetilsulfóxido
EET	Extracto Etanólico total
EETH	Extracto etanólico total de Hojas
EETR	Extracto etanólico total de Raíces
ESI	Ionización por electrospray
EtOH	Etanol
MeOH	Metanol
MESP	Mapas de Potencial Electrostático Molecular
MS	Espectrometría de masas
PDB	Protein Data Bank
ppm	partes por millón
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SD	Desviación estándar
TP	Tiempo de protrombina
TTPa	Tiempo de tromboplastina parcial activado
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VMD	Visual Molecular Dynamics

## 1 INTRODUCCIÓN

Las plantas con propiedades medicinales han sido empleadas desde hace varios siglos para curar diferentes problemas de salud, y se han estudiado debido a que producen sustancias responsables de la actividad biológica, conocidos como metabolitos secundarios, los cuales se clasifican en tres grupos principales de acuerdo a su origen biosintético: terpenos, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados (Pérez y Jiménez, 2011). Dentro de las plantas con propiedades medicinales utilizadas por el hombre, se encuentran las especies de la familia Amaryllidaceae, familia con una amplia gama de actividades biológicas atribuidas a su contenido de metabolitos secundarios.

La familia Amaryllidaceae comprende 75 géneros y al menos 1600 especies de plantas bulbosas, que se distribuyen ampliamente en regiones tropicales y subtropicales alrededor del mundo, dentro de la cual se encuentra el género *Phaedranassa* que comprende nueve especies, como *P. lehmannii* que es de origen Colombiano (Universitat de les Illes Balears, s.f.). Las especies de esta familia están siendo ampliamente estudiadas por la diversidad de metabolitos secundarios que presentan; dentro de éstos y de gran interés, se encuentran los alcaloides, que tienen en común el precursor norbelladina, son estructuralmente exclusivos de la familia y poseen una gran variedad de actividades biológicas como actividad antitumoral, citotóxica, inhibidora de la acetilcolinesterasa, antiinflamatoria, y de unión al ADN (Osorio et al., 2010). Alcaloides de Amaryllidaceae como galantamina y licorina se conocen por ser potentes inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa, asociada al deterioro de la memoria en pacientes con enfermedad de alzheimer (Kimura et al., 2014).

La especie *P. lehmannii* crece en terrenos pedregosos de las montañas, es endémica de Colombia y se distribuye en el Departamento del Cauca, el cual cuenta con una gran riqueza en flora y fauna. Según un informe del Sistema de información Ambiental de Colombia, SIAC, Colombia forma parte del grupo de países denominados Megadiversos, posee cerca del 10% de las especies conocidas, lo que lo ubica dentro de

los 14 países que albergan el mayor índice de la biodiversidad en la Tierra (Sistema de Información ambiental de Colombia, s.f).

Con la caracterización fitoquímica de *P. lehmannii*, especie endémica de Colombia que hace parte de la flora de nuestro Departamento, se pretende contribuir en la búsqueda de productos naturales con actividad biológica que podrían emplearse a futuro en el tratamiento de diferentes enfermedades, además, se desea hacer un aporte a la preservación de esta especie, debido a que está en peligro de extinción por el detrimento de su hábitat.

## **2 MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Metabolitos secundarios**

Las plantas realizan procesos fisiológicos como la respiración y la biosíntesis de proteínas en los que están implicadas rutas metabólicas fundamentales para que los organismos se mantengan vivos, a las cuales se les denomina metabolismo primario. Sin embargo, existen otras rutas metabólicas que son exclusivas de las plantas y por las cuales se sintetizan diferentes compuestos denominados metabolitos secundarios. Estos últimos, son sintetizados por las plantas principalmente como mecanismo de defensa química para protegerse de depredadores, su producción es demasiado baja, siendo menor al 1% en peso seco, lo cual depende primordialmente de la etapa fisiológica y de desarrollo de la planta (Thakur et al., 2019). Además, los metabolitos secundarios son los implicados en las propiedades medicinales de las plantas, sin embargo su distribución es más limitada que la de los metabolitos primarios, debido a esto, las investigaciones se han centrado en estos compuestos con valor medicinal producidos por las plantas (Jamwal, Bhattacharya y Puri, 2018).

Los metabolitos secundarios son clasificados de acuerdo a su ruta biosintética en tres grupos principales: terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos y esteroides), compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides y taninos) y compuestos nitrogenados (alcaloides y glicósidos cianogénicos) (Pérez y Jiménez, 2011). Los precursores de la biosíntesis de metabolitos secundarios provienen de rutas del metabolismo primario, como la glucólisis, el ciclo de Krebs o la ruta del ácido shikímico (Sepúlveda, Porta y Rocha, 2003).

### **2.2 Familia Amaryllidaceae**

La familia Amaryllidaceae es una familia de plantas bulbosas que se distribuyen a través de las regiones tropicales y subtropicales del mundo y son prominentes dentro de tres

áreas geográficas distintas que incluyen América Andina, el Mediterráneo y el sur de África. Esta familia se conforma de aproximadamente 1600 especies que se dividen en 75 géneros (Masi et al., 2018).

Las especies de la familia Amaryllidaceae se han usado como medicina tradicional debido a las propiedades farmacológicas que presentan, lo que las hace interesantes para su caracterización fitoquímica y estudio de sus potenciales actividades (Nair y van Staden, 2013).



**Figura 1.** Algunas de las especies de la familia Amaryllidaceae sobre las cuales se han adelantado estudios. A. *Z. candida*; B. *C. subdentata*; C. *P. lehmannii*; D. *E. bonplandii*; E. *E. caucana*; F. *C. jagus*; G. *H. elegans*; H. *C. miniata*.

La actividad biológica que presentan las plantas de esta familia se atribuye a su contenido de metabolitos, por lo que se han realizado estudios y actualmente se desarrollan diferentes investigaciones enfocados en éstos (Nair et al., 2017). Algunos estudios llevados a cabo sobre esta familia, incluyen especies (**Figura 1**) como *Zephyranthes candida*, que por su contenido de flavonas han mostrado actividad antiinflamatoria *in vitro* (Zhan et al., 2016), otra de las especies con actividades biológicas interesantes es *Caliphurria subdentata*, que de acuerdo a un estudio realizado por Castillo et al. (2018), sobre el extracto de esta planta, se encontró que muestra un efecto neuroprotector e induce un efecto antígenotóxico sobre células SH-SY5Y, el cual se relaciona con su contenido de alcaloides, por otro lado, la investigación

llevada a cabo por Cortes et al. (2018) para evaluar la fracción de alcaloides de las especies *Phaedranassa lehmannii* Regel, *Eucharis bonplandii* Traub, *Eucharis caucana* Meerow, *Crinum jagus* Dandy, *Hippeastrum elegans* H. E. Moore y *Clivia miniata* Regel, usando un modelo de excitotoxicidad del glutamato en neuronas corticales de rata logró relacionar el mecanismo de acción de la neuroprotección con la actividad antioxidante y estabilización de radicales libres.

### 2.2.1 Género *Phaedranassa*

El género *Phaedranassa* comprende nueve especies, de las cuales, seis son endémicas de Ecuador (*P. brevifolia*, *P. cinérea*, *P. dubia*, *P. glauciflora*, *P. schizantha* y *P. tunguraguae*) y las tres restantes son de Colombia (*P. dubia* y *P. lehmannii*) Costa Rica (*P. carmiolii*) y Perú (*P. viridiflora*). Sin embargo, los investigadores Minga et al. (2015), encontraron una nueva especie *P. cuencana*, la cual se distribuye en el valle interandino de la provincia de Azuay y a lo largo de la frontera con la provincia de Cañar al sur de Ecuador. Estas especies crecen en áreas perturbadas y florecen después del verano (*Phaedranassa*, 2017), en la **Figura 2**, se muestran las especies de éste género.



**Figura 2.** Especies del género *Phaedranassa*. A. *P. brevifolia*, B. *P. cinérea*, C. *P. dubia*, D. *P. glauciflora*, E. *P. schizantha* F. *P. tunguraguae*, G. *P. lehmannii*, H. *P. carmiolii*, I. *P. viridiflora*, J. *P. cuencana* (*Phaedranassa*, 2017).

### 2.2.2 Clasificación taxonómica de *Phaedranassa lehmannii* (Regel, s.f.)

**Clase:** Equisetopsida

**Subclase:** Magnoliidae

**Superorden:** Liliales

**Orden:** Asparagales

**Familia:** Amaryllidaceae

**Género:** *Phaedranassa*

**Especie:** *Phaedranassa lehmannii*

### 2.2.3 Alcaloides de la familia Amaryllidaceae

En la biosíntesis de metabolitos secundarios, en particular la de alcaloides, se llevan a cabo varios tipos de reacciones como metilación, condensación, reducción, oxidación, hidroxilación, acoplamiento fenol-fenol y formación de puentes de óxido (Kilgore y Kutchan, 2015).

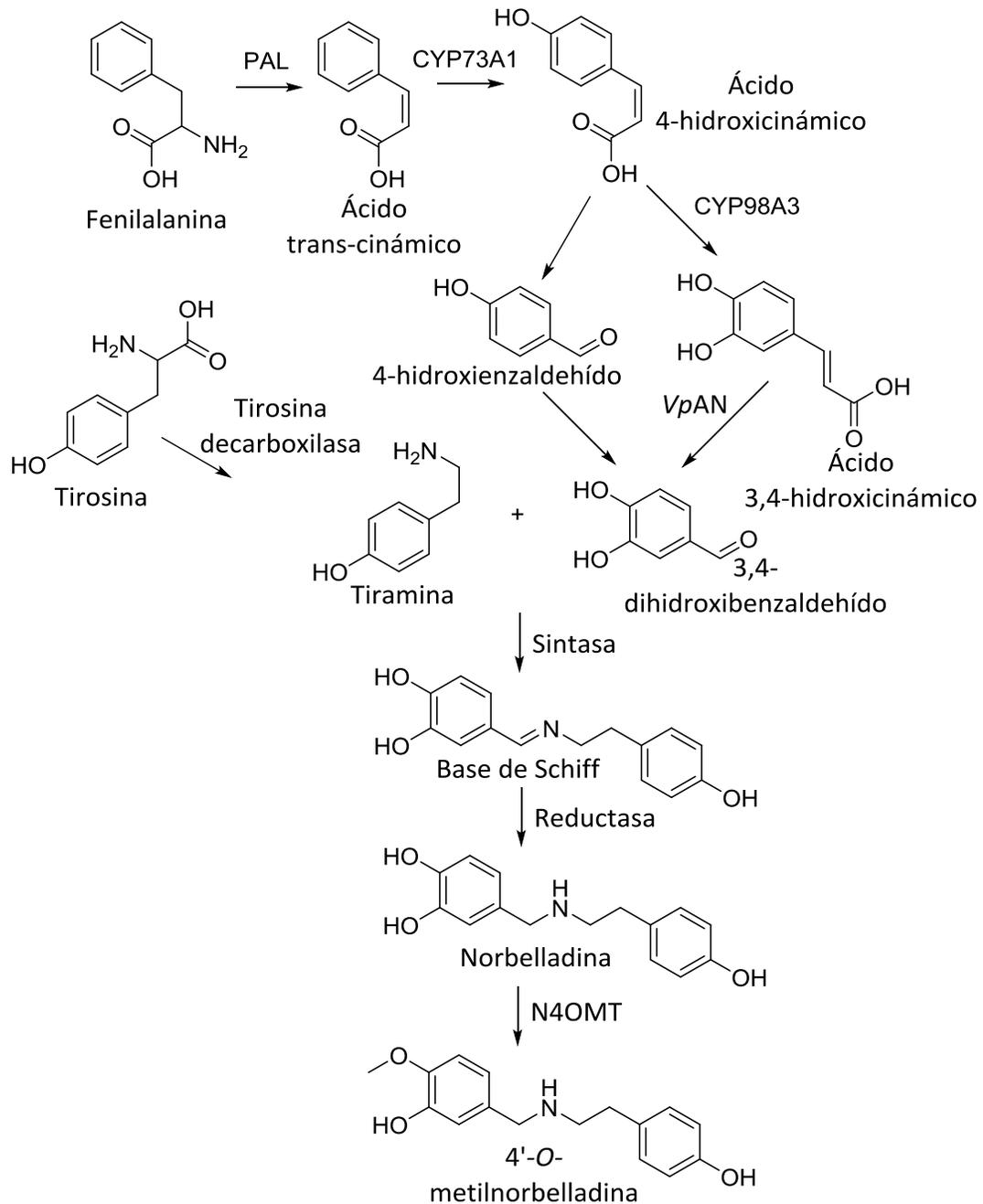
Se han identificado diferentes grupos de metabolitos en las especies de la familia Amaryllidaceae como flavonoides, lectinas, péptidos, chalconas y terpenoides, sin embargo, los alcaloides isoquinolínicos caracterizan químicamente a esta familia, se derivan del precursor norbelladina y se les atribuye una amplia gama de actividades biológicas (Masi et al., 2017).

#### 2.2.3.1 Biosíntesis y clasificación de alcaloides de Amaryllidaceae

Todos los alcaloides de Amaryllidaceae provienen de L-Phe y L-Tyr, sin embargo las diversas estructuras se derivan de los tres tipos alternativos de acoplamiento fenol oxidativo conocidos como *orto-para*, *para-para* y *para-orto*.

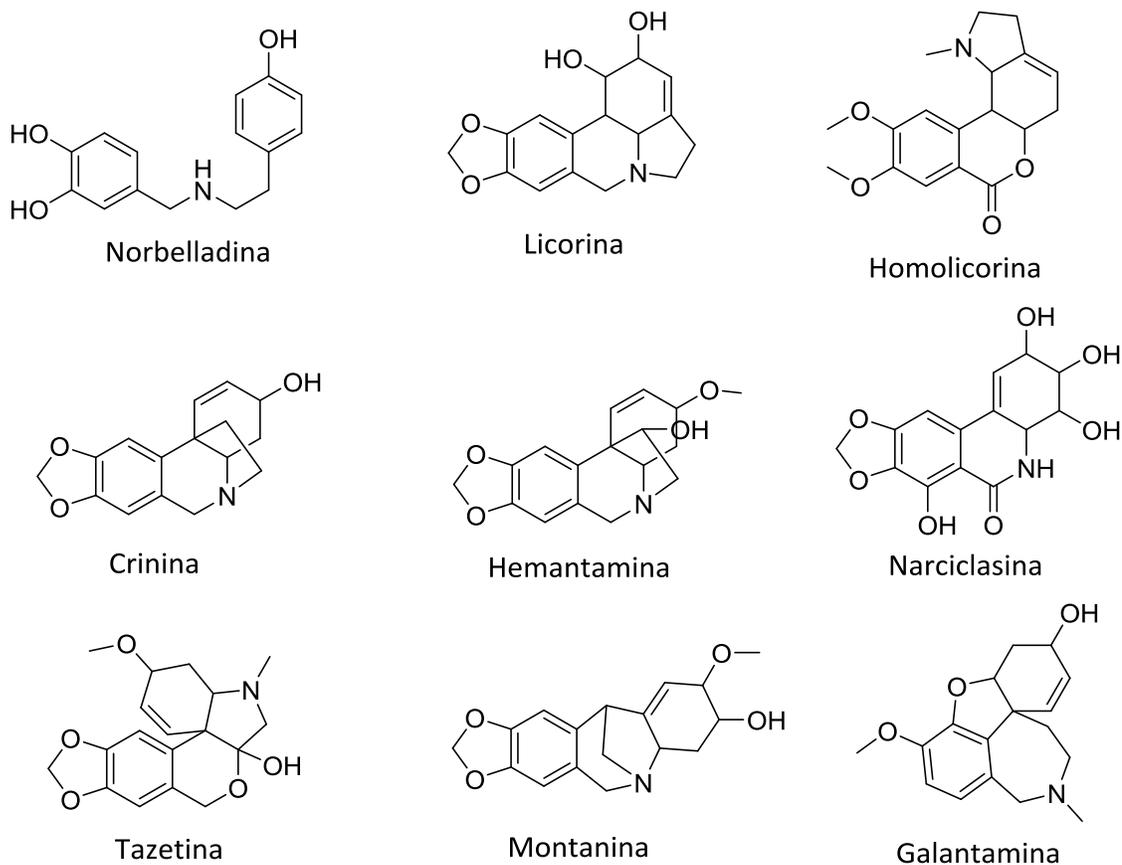
La biosíntesis del núcleo de este tipo de alcaloides consiste en producir inicialmente 3,4-dihidroxibenzaldehído y tiramina, la condensación y reducción de estos precursores a

norbellaína y su posterior metilación a 4'-*O*-metilnorbellaína. El 3,4-dihidroxibenzaldehído y la tiramina se forman a partir de la fenilalanina y la tirosina mediante la escisión de la cadena lateral del ácido cinámico. En el siguiente esquema (**Esquema 1**), se muestra la ruta biosintética de los precursores de alcaloides de Amaryllidaceae (Kilgore y Kutchan, 2015).



**Esquema 1.** Ruta biosintética del núcleo de los alcaloides de Amaryllidaceae.

Los alcaloides de Amaryllidaceae comprenden nueve tipos de esqueleto, cuyos alcaloides representativos son: norbelladina, licorina, homolicorina, crinina, hemantamina, narciclasina, tazetina, montanina y galantamina (**Figura 3**). Son bases débiles, contienen solo un átomo de nitrógeno que puede ser secundario, terciario y cuaternario, y su estructura base  $C_6-C_1-N-C_2-C_6$  proviene de los aminoácidos L-fenilalanina ( $C_6-C_1$ ) y L-tirosina ( $N-C_2-C_6$ ) (Bastida et al., 2011).



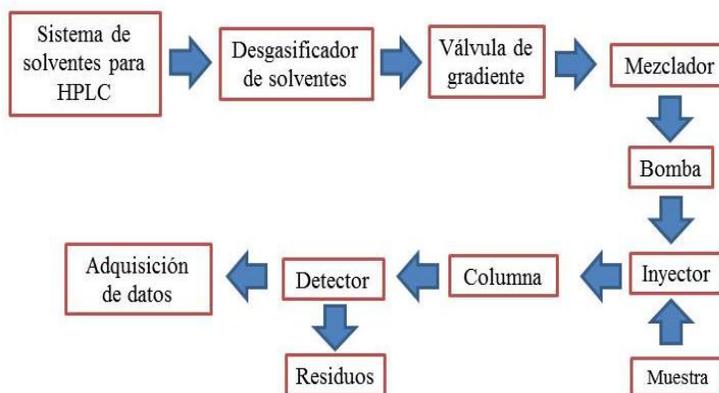
**Figura 3.** Tipos de alcaloides de Amaryllidaceae.

### 2.3 Cromatografía líquida de alta resolución HPLC

El descubrimiento de la cromatografía se debe al botánico ruso Mikal Tswett, quien a principios de 1900, realizó un estudio con pigmentos vegetales, en el que utilizó cromatografía líquida de adsorción en columna con carbonato de calcio como adsorbente y como eluyente mezclas de éter de petróleo/etanol, para separar las clorofilas y los carotenoides (Majors, 2019).

El principal objetivo de la cromatografía líquida CL es separar e identificar los componentes de una mezcla, sin embargo, una forma de CL es HPLC, en la cual se necesita menos tiempo para hacer un análisis, se emplean columnas más resistentes debido a las altas presiones generadas y las columnas son mucho más pequeñas, lo que permite una mejor separación y una excelente resolución.

Un sistema de HPLC consiste en un depósito de solventes, una bomba alternativa para bombear la fase móvil a través de la columna, una válvula dosificadora y una cámara de mezcla para preparar y mezclar los solventes, válvulas para regular el flujo de solvente y muestra y un detector para detectar los componentes separados (Rathore y Joshi, 2019). En la siguiente figura (**Figura 4**), se muestran los principales componentes de un sistema de cromatografía líquida de alta resolución.



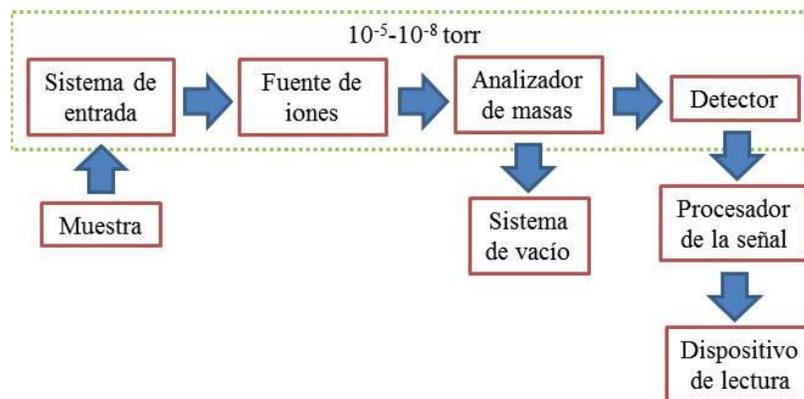
**Figura 4.** Representación de los principales componentes de un sistema HPLC.

Los métodos que emplean cromatografía líquida de alta resolución son adecuados para la separación y cuantificación de compuestos no volátiles, sin embargo, éstos presentan inconvenientes para el análisis de extractos crudos de plantas debido a sus bajos límites de detección y sensibilidad, por lo que al hacer el acoplamiento de HPLC con espectrometría de masas, se mejora enormemente la sensibilidad del método (Marchetti et al., 2019).

Los métodos de HPLC se han empleado con mayor frecuencia para el análisis de alcaloides de Amaryllidaceae usando columnas C<sub>18</sub> y diferentes fases móviles que contienen ácidos o amonio (Petruczynik et al., 2016). Por ejemplo, el análisis de alcaloides de *Crinum* por HPLC acoplado a ionización por electrospray-espectrometría de masas en tándem se llevó a cabo en una columna ODS-100V empleando como fase móvil acetonitrilo y agua con ácido acético 0,2% y acetato de amonio 40 mM (Zhang et al., 2009). La determinación de galantamina en plasma humano heparinizado se llevó a cabo empleando cromatografía líquida combinada con espectrometría de masas en tándem en una columna Waters C<sub>18</sub> usando como fase móvil acetato de amonio 0,01 M y acetonitrilo (Verhaeghe et al., 2003).

#### 2.4 Espectrometría de masas y fuente de iones por electrospray ESI-MS

La espectrometría de masas es una técnica analítica utilizada para cuantificar, identificar y caracterizar las moléculas que componen una muestra. En el proceso se lleva a cabo la conversión completa de la muestra en iones gaseosos, la caracterización por la relación masa/carga ( $m/z$ ) de los iones formados y sus abundancias relativas (Alsaleh et al., 2019).

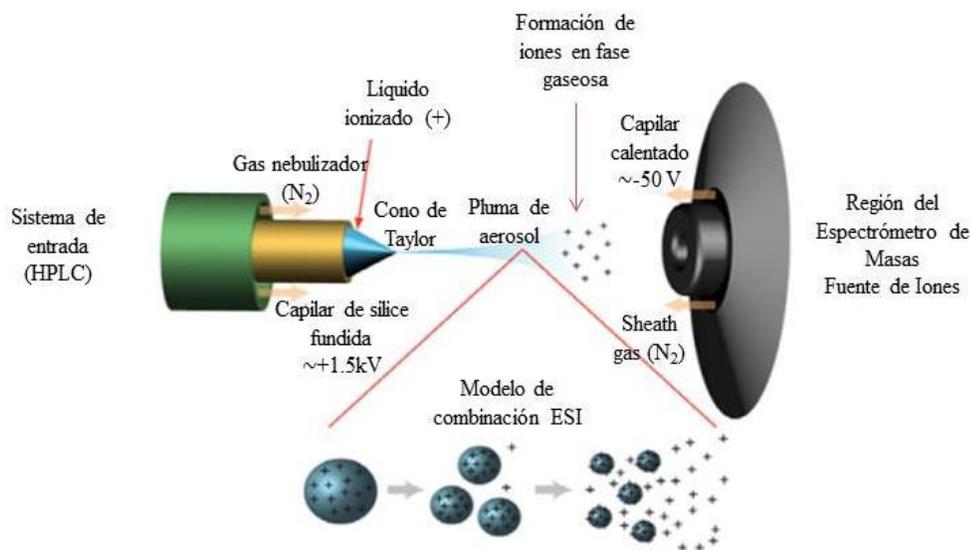


**Figura 5.** Componentes de un espectrómetro de masas.

El espectrómetro de masas consta de un sistema de entrada donde se inyecta la muestra, una fuente de iones que genera los iones, un analizador de masas que separa los iones en función de su relación masa/carga y un detector que convierte el haz de iones en una

señal eléctrica, cuyos componentes están dentro de un sistema de vacío para mantener bajas presiones (Ren et al., 2018). En la **Figura 5** se muestra de manera general los componentes de un espectrómetro de masas.

La fuente de iones es un elemento muy importante en el desarrollo del espectrómetro de masas, y estas se eligen de acuerdo al tipo de muestra y la aplicación que se le vaya a dar al instrumento, por ejemplo la fuente de iones por electrospray (ESI), es usada principalmente para la detección de compuestos polares en solución. El proceso general de la generación de los iones (**Figura 6**) consiste en hacer pasar la muestra en solución a través de un capilar al que se le aplica un alto potencial eléctrico, a la salida del capilar la solución se dispersa en forma de spray formado por pequeñas gotas cargadas, las cuales se evaporan rápidamente por un proceso de desorción del campo eléctrico o de evaporación del solvente, liberando moléculas protonadas a la fase gaseosa. Los iones generados pueden estar protonados de forma múltiple dando lugar a diferentes especies para una misma molécula (QIAN et al., 2017). Todo el proceso de ionización se realiza a presión atmosférica, y además, es un método de ionización suave (Chetwani et al., 2010).



**Figura 6.** Ionización por electrospray ESI- diagrama general de la fuente de iones.

La técnica ESI se puede acoplar a múltiples analizadores, entre los que se encuentra la trampa iónica, la cual funciona como un espectrómetro de masas de amplio rango de masa, resolución de masa variable y como un depósito de iones en el que se pueden confinar iones gaseosos, opera a 1 mTorr de Helio. Las moléculas se bombardean con electrones de 50-80 eV emitidos desde un filamento calentado y se introducen en la trampa. Durante la ionización, se aplica una tensión al electrodo de anillo para confinar los iones en un rango dado de masa/carga, los cuales se someten a colisiones con helio, se vuelven inestables y abandonan la trampa de iones de acuerdo a su relación masa/carga, golpean el detector y se produce una señal de salida (March, 2010).

## 2.5 Actividad citotóxica sobre *Artemia salina*

*Artemia salina* o camarón de mar (**Figura 7**) tiene gran flexibilidad para ambientes hipersalinos, como lagos salinos, aguas poco profundas, aguas salinas artificiales, y desempeña un papel importante en el flujo de energía de la cadena alimentaria (Muthukrishnan, Senthil y Rao, 2017).



**Figura 7.** Nauplio de *A. salina* (Muthukrishnan et al., 2017).

Se utiliza *A. salina* en el laboratorio como ensayo inicial de citotoxicidad de extractos para determinar su grado de toxicidad, debido a que presenta buena correlación con la toxicidad *in vitro*, y es un indicador preliminar de actividades antitumorales, insecticidas, entre otras. Además, es un bioensayo de rápida respuesta, confiable, fácil manejo y no implica altos costos para su desarrollo (Martínez et al., 2006). Se ha empleado para evaluar residuos de pesticidas, micotoxinas, corrientes contaminadas,

anestésicos, toxicidad de aceites dispersantes, cocarcinógenos y tóxicos en ambientes marinos (Morales y García, 2000).

Los huevos o quistes de *A. salina* secos se consiguen en tiendas de peces. La eclosión se lleva a cabo en solución salina y se requiere desde 48 a 72 horas para obtener una alta cantidad de nauplios. Además, para obtener una eclosión óptima se debe controlar varios parámetros o condiciones como desinfección de los huevos, temperatura, oxígeno, densidad de huevos, iluminación, salinidad y pH (Pino y Lazo, 2010).

## **2.6 Actividad fitotóxica sobre *Allium cepa***

Las plantas vasculares como *Allium cepa*, se han empleado como modelos genéticos para evaluar y detectar compuestos con actividad citotóxica y genotóxica (Muñoz y Guerrero, 2013), que se utiliza frecuentemente por su rápida respuesta, sensibilidad y alta reproducibilidad (Yadav et al., 2019). *A. cepa* es una de las especies de plantas superiores utilizada como bioindicador para evaluar la contaminación ambiental, debido a su alta sensibilidad para detectar diferentes tipos de contaminantes (Scherer et al., 2019). Las células de la raíz de la cebolla (células meristemáticas) son adecuados para el análisis de parámetros macroscópicos (crecimiento,  $EC_{50}$ ) y microscópicos (c-mitosis, rupturas cromosómicas) (Liman, Ciğerci y Gökçe, 2018).

Los bulbos de *A. cepa* se someten a hidratación para estimular el crecimiento celular, lo cual se evidencia en la elongación de sus raíces, sin embargo, al someter los bulbos a soluciones de sustancias tóxicas, éste proceso se inhibe afectando el crecimiento de la raíz, lo cual está relacionado con el grado de toxicidad del compuesto. El efecto de fitotoxicidad (toxicidad que afecta el crecimiento de la raíz) se determina mediante la comparación de la elongación de las raíces de cebollas expuestas a una sustancia respecto a las de cebollas no expuestas (raíces de control), después de 72 horas, y se cuantifica estableciendo el porcentaje de inhibición del crecimiento de las raíces respecto a la longitud promedio de las raíces de control (Fiskesjö, 1985).

## 2.7 Actividad anticoagulante *in vitro*

La hemostasia o coagulación es el resultado de la interacción entre los componentes de la sangre y los de la pared vascular, responsables de impedir la salida de la sangre. La coagulación de la sangre es un proceso dinámico en el que participan proteínas plasmáticas (factores y cofactores de la coagulación), los cuales circulan como procofactores que necesitan activación enzimática para llevar a cabo sus funciones. El proceso de coagulación se lleva a cabo mediante reacciones en cadena “cascada de la coagulación”, cuya principal función es generar la activación de protrombina (FII) a trombina (IIa), para transformar el fibrinógeno en fibrina mediante las concentraciones necesarias de IIa y formar el coágulo (Martinuzzo, 2017). Generalmente se emplea el tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa) como pruebas para evaluar la mayoría de los factores de la coagulación. Los valores normales de las pruebas de coagulación para TP están entre de 10 y 14 segundos y los de TTPa entre 25 y 45 segundos (López, 2016).

*Bothrops asper* (familia Viperidae) está ampliamente distribuida en el bosque lluvioso tropical a una altitud de entre 0 y 1200 m sobre el nivel del mar, su extensión incluye este y oeste de los Andes Colombianos (Saldarriaga et al., 2003). El veneno de la serpiente *Bothrops asper* causa efectos locales como edema, hemorragia, necrosis y ampollas, y efectos sistémicos tales como desordenes en la coagulación, sangrado en varios órganos, los cuales pueden causar un trauma cardiovascular y falla renal aguda (Fernández et al., 2010). Este veneno se compone principalmente de fosfolipasas A<sub>2</sub>, metaloproteinasas dependientes de Zinc y serina proteinasas, además contiene bajas cantidades de otras proteínas como proteínas secretoras ricas en cisteína, L-aminoácido oxidadasas, proteínas de lectina tipo C y desintegrinas (Vélez et al., 2017).

Los tratamientos efectivos hasta ahora para las mordeduras de serpiente son los anti-venenos, sin embargo, tienen desventajas como alto costo, poca disponibilidad y sobre todo, su limitada eficacia para neutralizar el daño tisular local (Salama, Abdel y Fahmy,

2018). Debido a las limitaciones que tienen los antivenenos, una buena alternativa ha sido emplear extractos de plantas y compuestos aislados para evaluar la posible inhibición de los efectos que causan las mordeduras de serpiente. Dentro de los trabajos que se han desarrollado en Colombia sobre plantas con actividad antiofídica se encuentra el de Pereañez et al. (2008), quienes evaluaron la capacidad de inhibición de algunas actividades inducidas por el veneno de *B. asper* de extractos etanólicos de *Heliconia latispatha*, *Hemedismus indicus* y *Heliconia curtispatha*, los cuales mostraron capacidad inhibitoria de los efectos tóxicos inducidos por el veneno. Así mismo, el trabajo realizado por Gómez et al. (2014), en el que se reportó los efectos inhibitorios contra el veneno de *B. asper* al evaluar los extractos de *Renealmia alpinia*.

## 2.8 Mapas de potencial electrostático molecular (MESP)

MESP proporciona un método visual tridimensional para comprender el efecto electrostático neto de una molécula. Se correlaciona con las cargas parciales, la electro negatividad y la reactividad química de las moléculas, por lo que es un descriptor útil para determinar la densidad relativa de electrones en una molécula y para estudiar las interacciones no-enlazantes entre las moléculas (Raghi et al., 2018). El potencial electrostático en cualquier punto  $\vec{r}$  en el espacio que rodea a una molécula se define por la siguiente expresión (Ecuación 1)

$$V(\vec{r}) = \sum_A \frac{Z_A}{|\vec{R}_A - \vec{r}|} - \int \frac{\rho(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d\vec{r}' \quad (1)$$

Donde  $Z_A$  es la carga del núcleo A ubicado a la distancia  $\vec{R}_A$  y  $\rho(\vec{r})$  es la función de densidad electrónica molecular. El signo de  $V(\vec{r})$  en una determinada región depende de si el efecto del núcleo o los electrones es dominante (Pramanik, Dey y Mukherjee, 2019).

Generalmente las moléculas en estudio se someten a un cálculo computacional empleando la teoría del funcional densidad DFT, el método B3LYP y un conjunto de

bases como 6-31G , para generar MESP y otras propiedades estructurales (Ahmed et al., 2016). Dentro de los estudios realizados sobre este cálculo computacional, se encuentra el estudio de Dey et al. (2017), quienes correlacionaron el mapeo MESP con la forma de empaque de cristales de tres derivados de oxima a través de interacciones intermoleculares. Por otro lado, en el trabajo desarrollado por Raghi et al. (2018), emplearon MESP para evaluar la reactividad del ácido gálico fusionado con derivados de 1,3,4-Oxadiazol contra el receptor de quinasa ABL.

### 3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estilo de vida como la alimentación, sedentarismo, consumo de sustancias psicoactivas, exposición a campos electromagnéticos y a contaminantes ambientales se asocian a la formación de sustancias que pueden causar diferentes tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, metabólicas, articulares, entre otras. Uno de los principales padecimientos que sufre la población Colombiana, son las neoplasias malignas, que cobra la vida de 33,100 personas al año, de las cuales 16,300 son hombres y 16,800 mujeres, además cada año se diagnostican 2,200 casos de cáncer en niños (Ministerio de Salud y Protección Social, 2011). Por otro lado, un riesgo menos frecuente que afecta a la población, sobre todo a hombres agricultores, son los accidentes ofídicos, que para el año 2017 fueron registradas 4978 mordeduras de serpiente, de las cuales el género *Bothrops* es causante del 90%, el género *Crótalos* del 5% y el género *Micrurus* del 1%, convirtiéndose en un problema de salud pública; los venenos se componen principalmente de enzimas, proteínas y polipéptidos no enzimáticos que sirven para iniciar la digestión de los tejidos y que tienen efectos hemorrágicos, nefrotóxicos, hipertensores y neurotóxicos (Instituto Nacional de Salud, 2017). Las plantas han sido fuente de metabolitos con propiedades que pueden contrarrestar efectos ocasionados por factores externos, como los mencionados anteriormente, y por ello el estudio científico de extractos de plantas medicinales es de gran importancia.

El trabajo que se pretende desarrollar, se deriva de un estudio reciente dentro del grupo de investigación Química de Compuestos Bioactivos QCB sobre la misma especie, en el cual se realizaron ensayos de citotoxicidad, actividad antioxidante y de inhibición enzimática en extractos etanólicos totales (EET) de hojas y bulbos (Trujillo, 2015). Actualmente hay pocos trabajos reportados sobre *P. lehmannii*, por lo que es necesario seguir contribuyendo a la caracterización fitoquímica detallada de esta especie endémica de Colombia, de manera que se logre caracterizar la mayor cantidad de metabolitos secundarios, determinar su actividad citotóxica (*Artemia salina*), fitotóxica (*Allium*

*cepa*) y evaluar la actividad anticoagulante sobre plasma sanguíneo de los EET de hojas y raíces. Al corroborar sus potenciales actividades, se estaría aportando un gran avance en las investigaciones de una especie que hace parte de la flora Colombiana y de la que se podrían generar productos de valor agregado para tratamientos de ciertas patologías que con otros tratamientos tendrían un mayor costo. Por otro lado, también se quiere contribuir a la conservación y propagación de la especie.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad citotóxica, fitotóxica y anticoagulante de los extractos etanólicos totales de hojas y raíces de *Phaedranassa lehmannii*.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar metabolitos secundarios en los extractos etanólicos totales de hojas y raíces de *P. lehmannii*.
- Determinar la actividad citotóxica sobre *A. salina* y fitotóxica sobre *A. cepa* de los extractos etanólicos totales de hojas y raíces de *P. lehmannii*.
- Evaluar la actividad anticoagulante de los extractos etanólicos totales de hojas y raíces de *P. lehmannii* sobre plasma sanguíneo.

## 5 METODOLOGÍA

### 5.1 Reactivos y materiales

En la siguiente tabla (**Tabla 1**) se muestran los reactivos y equipos empleados en el presente trabajo.

**Tabla 1.** Reactivos y equipos utilizados

Reactivos	Especificaciones
Ácido 3,5-dinitrobenzoico	Alfa Aesar (Nueva York, USA)
Dimetilsulfóxido, cloruro de potasio, cloruro de calcio, bicarbonato de sodio, yoduro de potasio	Carlo Erba (Val de Reuil, Francia)
Ácido sulfúrico concentrado, Metanol, acetato de etilo	Fisher Scientific (Nueva York, USA)
Dicromato de potasio, ácido clorhídrico (37%), hidróxido de potasio	J.T. Baker (Xalostoc, México)
Acetato de plomo (II)	Laboratorios Biocroma (Cali, Colombia)
Cloroformo, éter etílico, sulfato de magnesio	Mallinckrodt (Xalostoc, México)
Cloruro de magnesio hexahidratado, ácido pícrico, ácido acético glacial, (+) cinchonina, ácido (+)-tartárico	MERCK (Darmstadt, Alemania)
Ácido gálico	Panreac (Barcelona, España)
Cloruro de sodio, Nitrato de Bismuto III pentahidratado, hidróxido de sodio,	SIGMA ALDRICH (St. Louis, USA)
Equipos	Especificaciones
Balanza analítica	Adventurer OHAUS (China)
Bloque térmico	TORREY PINES SCIENTIFIC (USA)
Cámara ambiental	BIOTRONETTE MARK III (USA)

Centrifuga	Hettich Universal 32R (Alemania)
Incubadora	Memmert (Alemania)
Lámpara ultravioleta GL-58 handheld 254/365 nm	UVP (USA)
Rotaevaporador	Heidolph (Alemania)
Ultrasonido	Fisher Scientific (México)
Cromatógrafo UHPLC	UHPLC UltiMate 3000, Thermo Fisher Scientific (Alemania)
Columna	Kinetex C <sub>8</sub> , Phenomenex (USA)
Espectrómetro de masas	LCQ-fleet, Thermo Fisher Scientific (Alemania)

## 5.2 Material vegetal



**Figura 8.** A. Hojas y B.raíces frescas de *P. lehmannii* (Fuente: fotografía tomada por el autor en el laboratorio de QCB, Unicauca).

El material vegetal, raíces y hojas de la especie *Phaedranassa lehmannii* se obtuvo del vivero a cargo del grupo de investigación en Química de Compuestos Bioactivos QCB (2017) ubicado en el Parque Temático “La Rejoya”, el cual hace parte de las instalaciones de la universidad del Cauca y en el que se encuentran diferentes especies de la familia Amaryllidaceae. En la **Figura 8** se muestra las hojas y raíces frescas. La recolección del material se realizó de acuerdo al decreto 1376 del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, y con autorización mediante resolución CRC 0152 de Febrero 12 del 2015. La especie *P. lehmannii* proviene del municipio de La Sierra

Cauca. La planta fue identificada por el taxónomo Philip Arthur Silverstone Sopkin asociado al Departamento de Biología de la Universidad del Valle.

### 5.3 Obtención de los extractos etanólicos totales

El material vegetal colectado se cortó en pequeños trozos y se secó en estufa a 40°C por cinco días, aproximadamente. Los metabolitos secundarios del material seco se extrajeron mediante la técnica de extracción sólido-líquido con un montaje tipo Soxhlet, empleando como solvente etanol durante 46 horas aproximadamente (**Figura 9**). Los extractos crudos obtenidos se concentraron en rotaevaporador a presión reducida y se guardaron en desecador para los análisis posteriores.



**Figura 9.** A. Montaje de extracción Soxhlet de los metabolitos secundarios de *P. lehmannii*, B. Equipo de rotaevaporación. (Fuente: fotografía tomada por el autor en el laboratorio de QCB, Unicauca).

### 5.4 Caracterización de metabolitos secundarios de los extractos etanólicos totales

Sobre los extractos etanólicos totales se realizó el tamizaje fitoquímico con reactivos de precipitación y coloración para determinar grupos de metabolitos secundarios como alcaloides, cumarinas volátiles, flavonoides, taninos, saponinas, triterpenos y esteroides. Se siguió el procedimiento descrito por Sanabria, López y Gualdrón (1997), con algunas modificaciones hechas por Rondón et al. (2018). El tamizaje fitoquímico es un análisis preliminar que consta de varias pruebas para identificar las funciones químicas presentes en la especie vegetal. En la **Tabla 2** se registran las pruebas realizadas a cada extracto.

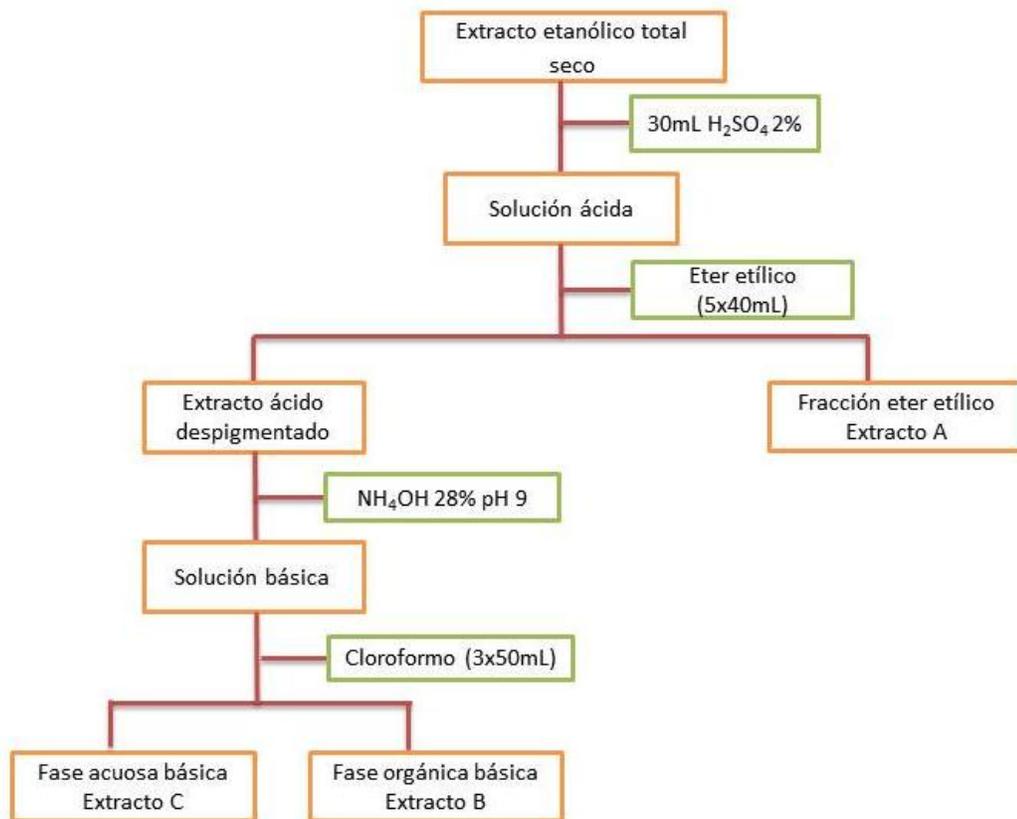
**Tabla 2.** Pruebas cualitativas realizadas a los extractos etanólicos totales de hojas y raíces de *P. lehmannii* para la determinación de metabolitos secundarios.

<b>Grupo de metabolitos secundarios</b>	<b>Ensayo</b>
Alcaloides	Dragendorff Mayer Wagner
Cumarinas volátiles	Papel filtgro impregnado con NaOH, luz UV
Taninos	FeCl <sub>3</sub>
Saponinas	Formación de espuma
Triterpenos y/o esteroides	Liebermann-Burchard Salkowski
Flavonoides	Shinoda NaOH diluido
Derivados antracénicos libres	Reacción Bomtraeger

### 5.5 Obtención de alcaloides totales

A partir de los extractos etanólicos totales de hojas y raíces se realizó el fraccionamiento de los alcaloides presentes en éstos, mediante el método establecido previamente por Berkov et al. (2008). Se tomó aproximadamente un gramo de cada extracto, el cual se disolvió en 30 mL de ácido sulfúrico 2% para que los alcaloides quedaran disueltos en la fase acuosa. En la etapa siguiente, se despigmentó con un solvente apolar, éter etílico (5x40mL), para eliminar los pigmentos más lipófilos (Extracto A). Posteriormente la fase acuosa obtenida se basificó con NH<sub>4</sub>OH 28% hasta pH 9 y se extrajo con cloroformo (3x50mL). Los alcaloides cuaternarios y N-óxidos quedaron en la fase acuosa (Extracto C) y los alcaloides terciarios en la fase orgánica (Extracto B). Las

fracciones obtenidas se secaron en rotaevaporador a 40°C, se realizó la prueba de Dragendorff y se determinó la cantidad de alcaloides totales en la fase clorofórmica. En la **Figura 10** se muestra el diagrama del proceso de extracción.



**Figura 10.** Proceso de extracción de alcaloides.

## 5.6 Análisis cualitativo de la fracción de alcaloides de hojas y raíces de *P. lehmannii* mediante UHPLC-MS

Inicialmente, se planteó llevar a cabo la separación e identificación de los alcaloides presentes en la fracción correspondiente de las hojas y las raíces de la planta.

### Preparación del estándar de galantamina

Se preparó una solución madre de hidrobromuro de galantamina (Reminyl) en MeOH, a partir de la cual se preparó una solución de 1 ppm en MeOH y ácido fórmico 0,1%; la solución de 1 ppm se inyectó directamente al espectrómetro de masas para calibrar el

equipo con las condiciones óptimas requeridas para el análisis de fragmentación del estándar. Posteriormente, se hizo el acople con el cromatógrafo para determinar la influencia de la fase móvil sobre la muestra y poder determinar la relación de solventes adecuada (MeOH:agua 70:30).

### **Preparación de la muestra**

Se preparó una solución madre de la fracción de alcaloides tanto de hojas como de raíces, de la cual se tomó el volumen necesario para preparar soluciones más diluidas, de 20, 40 y 80 ppm. Sin embargo, a una concentración de 20 y 40 ppm de la fracción de hojas, no se observó una respuesta adecuada para el análisis, por lo que en ambas fracciones se trabajó a una concentración de 80 ppm. Para preparar la solución madre, se pesó la muestra y se disolvió en acetonitrilo-agua (tipo 1) 1:4, de la cual se prepararon las diluciones necesarias en ácido fórmico 0,1%. Todas las soluciones se filtraron a través de un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$ .

Con la información reportada en la literatura sobre los alcaloides de la familia Amaryllidaceae, y el análisis mediante GC-MS de la especie *P. lehmannii* realizado por Cabezas (2016), se procedió a buscar el ión molecular de los alcaloides más representativos. A los iones moleculares encontrados en el análisis inicial, se les realizó una fragmentación masas-masas para tratar de identificar los alcaloides de acuerdo a su patrón de fragmentación.

### **Condiciones UHPLC**

El sistema cromatográfico consistió en un equipo de cromatografía líquida de ultra alto rendimiento Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Fisher Scientific, Alemania), y el software Chromeleon. Se empleó una columna C<sub>8</sub> de 100 mm x 2,1 mm, tamaño de partícula 1,7  $\mu\text{m}$  a 20°C. La fase móvil consistió en 70% MeOH (ácido fórmico 0,1%) como disolvente A y 30% agua (ácido fórmico 0,1%) como disolvente B, en modo isocrático.

El flujo de la fase móvil fue 0,1 mL/min, el volumen de inyección fue 15  $\mu$ L y el tiempo de corrida seis minutos.

### **Condiciones ESI-MS**

La espectrometría de masas se llevó a cabo en un espectrómetro de masas LCQ Fleet con trampa de iones (Thermo Fisher Cientific, Alemania) equipado con una fuente de ionización por electrospray ESI y el software Xcalibur. Las condiciones del espectrómetro de masas se calibraron con un estándar de galantamina de 1 ppm (hidrobromuro de galantamina) y fueron las siguientes: polaridad positiva, voltaje del capilar 33,98 V, voltaje del spray 3,92 kV, flujo de gas auxiliar 22,01 unidades arbitrarias, flujo de gas de arrastre 0,10 unidades arbitrarias, temperatura del capilar 275,06 °C, lente de tubo 70 V y energía de colisión 30 eV.

### **5.7 Determinación de la actividad citotóxica sobre *A. salina* de los extractos etanólicos totales**

La determinación de citotoxicidad con *A. salina* se realizó en el laboratorio de QCB en una cámara ambiental para garantizar las condiciones adecuadas durante el ensayo. El procedimiento se llevó a cabo según la metodología descrita por Sanabria et al. (1997), y de acuerdo a las condiciones reportadas por Sorgeloos et al. (1986) para la eclosión de los nauplios.

#### **Obtención de los nauplios de *A. salina***

Para obtener los nauplios de *A. salina*, se pesaron 50 mg de huevos, los cuales fueron desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio (20 ppm) durante 2 h. Posteriormente, los huevos se lavaron con agua destilada, se transfirieron al recipiente usado para la eclosión y se adicionaron 300 mL de solución salina (agua de mar sintética) previamente preparada que consistía en una mezcla de sales (Sorgeloos et al., 1986), se conectó una bomba de acuario para garantizar un flujo de aire de (100

mL/min) y que los huevos se mantuvieran en suspensión, los huevos se dejaron en una cámara ambiental con luz incandescente a una temperatura entre 26-28°C por 48 horas para su eclosión. También se conectó el flujo de aire (100 mL/min) de la misma bomba a otro vaso con solución salina (por 48 horas) para diluir las muestras y realizar el ensayo de citotoxicidad.

### **Preparación de la muestra**

Se preparó una solución de 5000 ppm de cada extracto (disuelta en 0,5 mL de DMSO y se completó el volumen necesario con la solución salina previamente oxigenada), a partir de la cual se prepararon concentraciones más diluidas.

### **Ensayo de citotoxicidad**

Para realizar el ensayo, se utilizó una placa de 12 pozos con capacidad de 5 mL. Inicialmente se adicionó 2 mL de solución salina a cada pozo, se transfirieron manualmente con pipeta Pasteur 10 nauplios de *A. salina* y se adicionó el volumen necesario de la solución más concentrada del extracto para obtener soluciones de concentración logarítmica de 1, 10, 100 y 1000 ppm, se completó a 5 mL con la misma solución salina y se incubó en una cámara ambiental a las condiciones de luz y temperatura utilizados para la eclosión. Se realizó el conteo de nauplios muertos a las 24 horas (dosis crónica). Cada concentración se realizó por triplicado. A partir del ensayo realizado inicialmente, se utilizaron concentraciones más cercanas a la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>). Se emplearon cuatro concentraciones de cada extracto, para EETH se hicieron diluciones a partir de la solución madre para obtener concentraciones de 500 a 62 ppm, y para EETR se hicieron diluciones de 600 a 75 ppm.

Los resultados y el cálculo del valor de CL<sub>50</sub> de los EETH y EETR mediante el uso de nauplios de *A. salina*, se procesaron utilizando el software bioestadístico GraphPad Prism 5, mediante regresión no lineal, y se determinó por triplicado.

### **Control positivo**

Se realizó el control positivo con dicromato de potasio a las mismas condiciones utilizadas para el ensayo de letalidad de la muestra. Se emplearon concentraciones de 10, 20, 30 y 40 ppm.

### **Control negativo**

Se realizó un control negativo con el máximo volumen de DMSO agregado en el ensayo de citotoxicidad (50  $\mu$ L en EETH y 60  $\mu$ L en EETR en 5 mL de solución salina) y otro solo con solución salina, ambos se sometieron a las mismas condiciones empleadas en las muestras.

## **5.8 Determinación de la actividad fitotóxica sobre *A. cepa* de los extractos etanólicos totales**

El ensayo de fitotoxicidad con *A. cepa* se realizó en el laboratorio de QCB en una cámara ambiental para garantizar las condiciones adecuadas durante el ensayo.

### **Selección de los bulbos de *A. cepa***

Se seleccionaron bulbos de tamaño uniforme (3,27  $\pm$ 0,45 cm) adquiridos en el mercado local, se lavaron retirando el catafilo externo y se cortó las raíces evitando dañarlas para no afectar su crecimiento. Se dejaron en agua destilada por 48 horas para favorecer el crecimiento de nuevas raíces. Pasado ese tiempo, se utilizaron los bulbos con mayor crecimiento de raíces para realizar el ensayo.

### **Preparación de la muestra**

Se preparó una solución de 5000 ppm de cada extracto etanólico seco (se disolvió la muestra en 0,5 mL de DMSO y se completó el volumen con agua destilada), de la cual se tomó el volumen necesario para preparar soluciones de menor concentración.

Inicialmente el ensayo se realizó con concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 ppm para tener una idea del efecto de inhibición del crecimiento de la raíz, y posteriormente se emplearon concentraciones más cercanas a la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>). Se emplearon cuatro concentraciones de cada extracto, para ambos extractos se hicieron diluciones a partir de la solución madre para obtener concentraciones de 250 a 31 ppm.

### **Ensayo de fitotoxicidad**

Se seleccionaron los bulbos de *A. cepa* con mejor crecimiento de la raíz, se cortaron las nuevas raíces que habían crecido en ese tiempo evitando dañarlas y se colocaron en los frascos con cada concentración. Los bulbos se dejaron expuestos a las concentraciones durante 72 horas, reponiendo el volumen de cada frasco dos veces al día y se midió la longitud de la raíz con un calibrador pie de rey al cabo de ese tiempo. Cada tratamiento o concentración se realizó por triplicado.

El cálculo del valor de CI<sub>50</sub> de los EETH y EETR mediante el uso de bulbos de *A. cepa*, se procesó utilizando el software bioestadístico GraphPad Prism 5, mediante regresión no lineal, y se determinó por triplicado.

### **Control negativo**

Se realizó un control negativo con el máximo volumen de DMSO agregado en el ensayo de fitotoxicidad (500 µL en 250 mL de agua destilada) y otro solo con agua destilada, y se sometieron a las mismas condiciones empleadas en las muestras.

## **5.9 Evaluación de la actividad anticoagulante de los extractos etanólicos totales sobre plasma sanguíneo**

Se trabajó con el veneno liofilizado de *Bothrops asper* colectado en el municipio de Juan de Acosta ubicado en el occidente del Departamento del Atlántico, se almacenó a -21°C,

y fue provisto por el grupo de investigación de farmacología de la Universidad del Valle para realizar el ensayo de actividad anticoagulante, en dichas instalaciones.

### **Obtención del plasma sanguíneo**

La muestra de sangre se colectó en tubos al vacío con citrato de sodio, se centrifugó a 2500 rpm por 15 minutos y se separó el plasma del resto de componentes de la sangre para realizar el ensayo.

### **Preparación de las muestras de EET y veneno**

Los extractos etanólicos totales se pesaron, se disolvieron en solución salina (NaCl 0,9%, pH 7,0) y se preparó una solución madre de 1000 ppm de cada uno de los extractos, de la cual se prepararon soluciones más diluidas. La muestra de veneno liofilizado se pesó, se diluyó en solución salina y se preparó una solución madre de 1000 ppm, de la cual se tomó el volumen necesario para el ensayo.

### **Ensayo de la actividad anticoagulante**

El ensayo de la actividad anticoagulante se realizó adicionando 50  $\mu\text{L}$  (25  $\mu\text{L}$  veneno y 25  $\mu\text{L}$  EET) de mezclas de veneno/extracto (incubadas previamente a 37°C por 15 minutos) sobre 200  $\mu\text{L}$  de plasma sanguíneo citratado (incubado a 37°C por cinco minutos en un bloque térmico). Se mantuvo la concentración de veneno constante (5  $\mu\text{g}$  *B. asper*) y se varió la concentración del extracto. Se registró el tiempo de coagulación del plasma después de adicionar las mezclas veneno/extracto, lo cual se realizó en un bloque térmico para mantener la temperatura a 37°C, como se muestra en la **Figura 11**.

### **Control positivo**

Se realizó un control positivo con 50  $\mu\text{L}$  de la mezcla veneno (5  $\mu\text{g}$ )/solución salina (previamente incubada a las mismas condiciones de las mezclas veneno/extracto), para determinar el tiempo de coagulación del plasma sanguíneo.



**Figura 11.** Bloque térmico a 37°C. (Fuente: fotografía tomada por el autor en el laboratorio de investigación de farmacología, Univalle).

### **Control negativo**

El control negativo se realizó adicionando 50  $\mu\text{L}$  de solución salina (previamente incubada) al plasma sanguíneo, además de otro control negativo con el extracto y solución salina.

### **5.10 Cálculo de energía de las moléculas identificadas y generación de los MESP**

Se realizaron cálculos computacionales para obtener los MESP de tres alcaloides: galantamina, pseudolicorina y sanguina, que fueron identificados en los extractos obtenidos en el presente trabajo. Los cálculos se hicieron a nivel DFT con el funcional B3LYP y un conjunto de bases 6-31G implementado en el paquete computacional Gaussian-09 (Frisch et al., 2009). La visualización de los Mapas de Potencial Electrostatico se realizó a través del programa GaussView 5.0.8.

Adicionalmente, se empleó el software VMD (Visual Molecular Dynamics) para observar la interacción de la galantamina con la enzima acetilcolinesterasa obtenida de Protein Data Bank PDB.

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Rendimiento de extracción

Se eligió el método de extracción Soxhlet y etanol como solvente para obtener los extractos del material vegetal debido a que éstos permiten aplicar una mayor temperatura y mejorar la solubilidad de los metabolitos secundarios, con lo que se consigue aumentar el rendimiento de la extracción. El rendimiento de extracción del material vegetal seco de hojas y raíces de *P. lehmannii* con etanol se muestra en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Rendimiento de la extracción etanólica de hojas y raíces de *P. lehmannii*.

Extracto etanólico total	Rendimiento de extracción (%p/p) ±SD, n=2
Hojas	34,1 ±2,6
Raíces	28,4 ±0,2

El rendimiento de extracción etanólica por el método Soxhlet en hojas fue mayor 34,1 (±2,6) %, que en raíces 28,4 (±0,2)%, lo cual se puede atribuir a que las hojas contenían compuestos más solubles en etanol. Sin embargo, los rendimientos de extracción de metabolitos de las plantas, dependen de factores como composición de la planta, lugar de desarrollo, parte de la planta y condiciones de extracción, entre otros, por lo que es difícil hacer una comparación entre especies y partes de la planta, incluso entre la misma especie que se haya desarrollado en diferentes condiciones climáticas y de suelo (Gong y Gao, 2019).

### 6.2 Caracterización de metabolitos secundarios de los extractos etanólicos totales

Las pruebas cualitativas realizadas a los EETH y EETR indican la presencia de varios grupos de metabolitos secundarios como alcaloides, taninos, triterpenos, esteroides y flavonoides, como se muestra en la **Tabla 4**.

**Tabla 4.** Resultados obtenidos de las pruebas cualitativas realizadas a los extractos etanólicos totales de hojas y raíces de *P. lehmannii*.

Metabolito secundario	Raíces	Hojas	Ensayo
Alcaloides	+	+	Dragendorff
	+	+	Mayer
	+	+	Wagner
Cumarinas volátiles	-	-	Papel filtro impregnado con NaOH, luz UV
Taninos	+	+	FeCl <sub>3</sub>
Saponinas	-	-	Formación de espuma
Triterpenos y/o esteroides	+	+	Liebermann-Burchard
Flavonoides	+	+	Salkowski
	-	-	Shinoda
Derivados antracénicos libres	+	+	NaOH diluido
	-	-	Reacción Bomtraeger

(+) =Presencia, (-) =Ausencia

La presencia de alcaloides se confirmó mediante tres pruebas cualitativas Dragendorff, Mayer y Wagner, en las que se observaron precipitados vino, beige y marrón, respectivamente para los dos extractos. Se empleó un estándar de Cinconina como control positivo para observar los precipitados con sus respectivas coloraciones y poder comparar con los EET.

Las plantas de la familia Amaryllidaceae son bien conocidas por producir alcaloides de gran importancia farmacéutica. Dentro de estos, se ha encontrado que la galantamina tiene acción inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa, por lo que su principal aplicación es en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Ivanov et al., 2012). La licorina es otro alcaloide importante de ésta familia, y presenta actividades antivirales, antibacterianas, antiparasitarias, antiinflamatorias, y sobre todo, es un potente compuesto antitumoral (Roy et al., 2018).

En la prueba cualitativa realizada a los EET con  $\text{FeCl}_3$ , se observó una coloración verde oscuro y marrón-verdoso en hojas y raíces, respectivamente. La coloración observada se debe al complejo formado por el hierro y los taninos presentes en la muestra, clasificados como taninos condensados por su coloración verdosa. Además, se utilizó ácido gálico como control positivo para evaluar el procedimiento del ensayo y compararlo con las muestras, su coloración fue azul oscuro, lo cual indica que sí hubo formación del complejo, sin embargo éste último forma polímeros denominados taninos hidrolizables, al cual se le atribuye la coloración azul.

Los taninos son un grupo heterogéneo de compuestos fenólicos con alto peso molecular, formados por la polimerización de polifenoles simples que tienen la capacidad de unir y precipitar proteínas, los cuales se clasifican en taninos hidrolizables y taninos condensados (Huang et al., 2018). Los taninos hidrolizables tienen efectos antimicrobianos y antivirales, y se utilizan ampliamente para el procesamiento del cuero (Shirmohammadli, Efhamisisi y Pizzi, 2018). Las plantas con taninos condensados se usan en la medicina tradicional para tratar la diarrea, la gastritis y las úlceras, y sus propiedades se atribuyen a la capacidad para quelatar metales, la actividad antioxidante, antibacteriana y poder de complejación con otras moléculas (Demarque et al., 2018).

La reacción de Liebermann Burchard se utilizó para determinar la presencia cualitativa de triterpenos y esteroides. Al realizar la prueba con el EETH, se observó una coloración verde, cuyo resultado se atribuyó a la presencia de esteroides, mientras que en el EETR se observó una coloración rosa tenue, que es característica de los triterpenos. Posteriormente, se realizó una reacción con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado “reacción de Salkowski” y en ambos extractos se comprobó la presencia del anillo esteroidal. Los triterpenos y esteroides se deshidratan en medio ácido para formar dienos, que posteriormente son oxidados para formar polienos, responsables la coloración observada.

Los terpenoides constituyen un grupo amplio y biológicamente activo de terpenoides con una gran diversidad estructural, entre los que se incluyen triterpenos, esteroides,

limonoides y saponinas triterpenoides y esteroides (Sandjo y Kuete, 2013). Los triterpenos pentacíclicos se han aislado de fuentes como plantas, algas y organismos marinos, son biodegradables y tienen muchas actividades biológicas, sin embargo tienen baja toxicidad, y sus aplicaciones son limitadas debido a que su biodisponibilidad es reducida por su alta lipofilidad (Csuk y Deigner, 2019). Hsu et al. (2015) llevaron a cabo un estudio sobre el efecto antiinflamatorio in vitro de compuestos triterpénicos y esteroides aislados del tallo de *Hiptage benghalensis* y encontraron que éstos suprimen las respuestas inflamatorias y las expresiones de las proteínas relacionadas con la inflamación. Por otro lado, en un estudio fitoquímico realizado por Timité et al. (2015) en el que evaluaron la citotoxicidad de algunos compuestos esteroides aislados de *Allium schoenoprasum* sobre células de cáncer de colon humano HCT 116 y HT-29, hallaron una actividad buena a moderada.

Para la determinación cualitativa de flavonoides, se emplearon las pruebas de Shinoda (HCl concentrado y virutas de Mg), y NaOH diluido, sin embargo, los extractos no presentaron coloración con la primera prueba, debido a que algunos tipos de flavonoides no reaccionan en este medio. Sin embargo, al someter los extractos a la segunda prueba, se observó una coloración amarilla para EETH y para EETR, lo cual indica la presencia de flavonas. Para corroborar el procedimiento de los ensayos, se utilizó un estándar de quercetina, el cual si presentó la coloración característica para flavonoles.

Las plantas producen compuestos antioxidantes para contrarrestar las especies reactivas de oxígeno ROS y poder sobrevivir (Johnson et al., 2018). La capacidad antioxidante de los flavonoides, una clase de compuestos polifenólicos, se atribuye a la capacidad que tienen de eliminar directamente los ROS, capturar radicales libres vía donación de hidrógeno o transferencia de un electrón, quelación de iones metálicos como  $Fe^{2+}$  y  $Cu^{+}$ , actuar como antioxidantes intracelulares mediante la supresión de la actividad de las enzimas involucradas en la generación de radicales libres y activar las enzimas antioxidantes internas (Ibrahim, El-Newary y Ibrahim, 2019). Los flavonoides se clasifican en seis subclases principales: flavonoles, flavan-3-oles, flavonas, flavanonas,

antocianidinas e isoflavonas, los cuales presentan diferentes bioactividades dependiendo de la posición de los grupos carbonilo e hidroxilo (Bondonno et al., 2019). Se ha reportado que las flavonas, glucósidos de flavonol, flavanonas e isoflavonas poseen actividad antimicrobiana, mientras que se ha encontrado que flavan-3-ol es más efectivo que las flavonas y flavononas en la inhibición de los retro virus de inmunodeficiencia humana VIH-1 y VIH-2 (Karak, 2018).

La diversidad de grupos de metabolitos secundarios presentes en los EET son los responsables de la actividad biológica estudiada en este trabajo, y sería el punto de partida para aislar e identificar los metabolitos que contribuyen a las diferentes actividades planteadas en futuras investigaciones.

### 6.3 Rendimiento de alcaloides

En la **Tabla 5** se muestran los resultados obtenidos del rendimiento de extracción de alcaloides a partir de los EET, mediante extracción ácido-base.

**Tabla 5.** Resultados del rendimiento de extracción de los alcaloides presentes en el extracto etanólico total de hojas y raíces de *P. lehmannii* y de su prueba cualitativa.

Extracto etanólico total	Masa extracto (g)	Masa alcaloides totales (g)	Rendimiento (%p/p)	Ensayo de Dragendorff
Hojas	1,5777	0,0183	1,16	+
Raíces	1,2221	0,0134	1,10	+

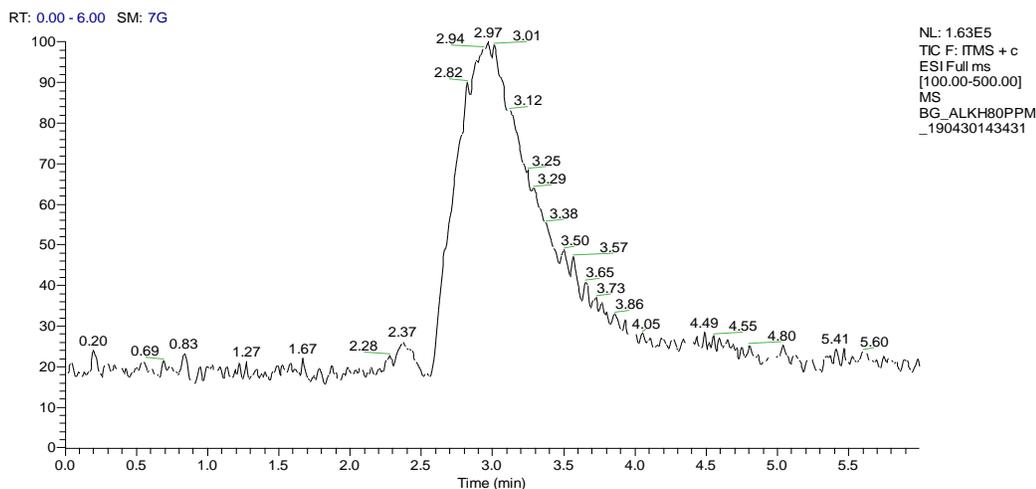
Se realizó el ensayo de Dragendorff a los crudos de alcaloides de EETH y EETR y se observó el precipitado naranja correspondiente a la formación de yoduros entre los alcaloides presentes en la muestra y los reactivos empleados en el ensayo. El signo “+” se empleó para indicar la presencia de estos metabolitos.

El rendimiento de alcaloides se determinó en el extracto B, que contenía los alcaloides terciarios solubles en solventes orgánicos. El mayor porcentaje se obtuvo a partir del

EETH 1,16%, mientras que se obtuvo un rendimiento menor a partir de EETR 1,10%. Los resultados obtenidos empleando la metodología descrita, fueron buenos, ya que por ejemplo en *Caliphurria subedentata*, López y Segura (2003) mediante extracción ácido-base obtuvieron un rendimiento más bajo 0,48%. Sin embargo, la influencia de factores ambientales donde creció la planta, entre otros, afectan el contenido de estos metabolitos en las diferentes especies y órganos de la planta.

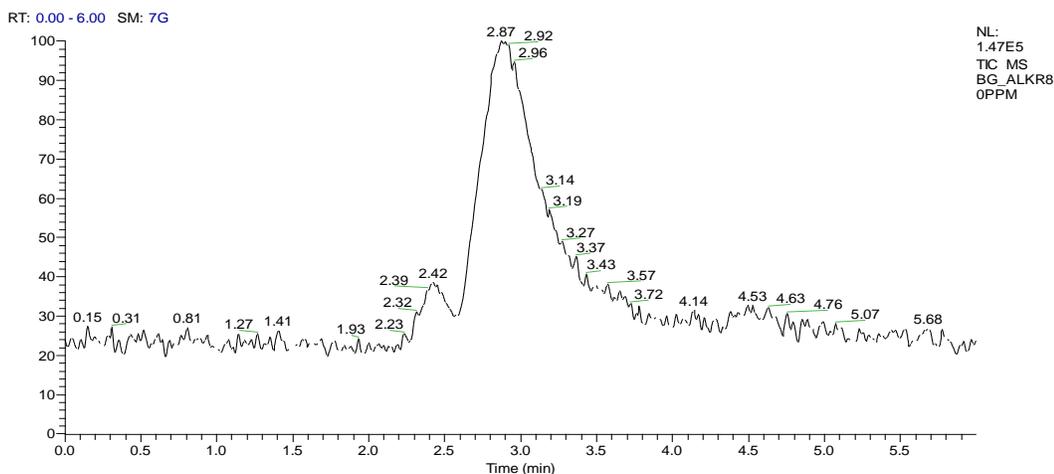
#### 6.4 Identificación de los alcaloides presentes en *P. lehmannii* mediante UHPLC-MS

En la **Figura 12** y **13** se muestran los cromatogramas obtenidos de la fracción alcaloídica de hojas y raíces de la planta. En los cromatogramas se observa una señal a un tiempo de retención entre 2,5 y 3,7 segundos, e indica que no hubo separación de los componentes de la mezcla, debido a que no hubo interacción entre los alcaloides polares y la columna apolar. En un principio se decidió emplear esta columna apolar por su disponibilidad en el Departamento de Química de la Universidad del Cauca y también porque se había pensado en adecuar el medio en el que estaba disuelta la muestra para que hubiera interacción entre sus componentes y la columna, sin embargo, a pesar de modificar el pH, los solventes y la relación de estos, no fue posible la separación.



**Figura 12.** Cromatograma de la fracción de alcaloides de hojas de *P. lehmannii*.

En los análisis de identificación de alcaloides de Amaryllidaceae mediante HPLC/MS, se han empleado columnas con cierto grado de polaridad para lograr que este tipo de compuestos sean retenidos y separados (Petruczynik et al., 2016).



**Figura 13.** Cromatograma de la fracción de alcaloides de raíces de *P. lehmannii*.

Los iones detectados en el análisis inicial de los posibles alcaloides reportados en la literatura para la familia Amaryllidaceae, se sometieron a un posterior análisis de fragmentación masas/masas.

**Tabla 6.** Patrón de fragmentación de masas y compuesto identificado por UHPLC/ESI-MS/MS en hojas y raíces de *P. lehmannii*.

Fracción de alcaloides	[M+H] <sup>+</sup>	MS/MS	Compuesto identificado
Hojas	274	274, 256, 225, 217, 200	Sanguinina
	288	288, 270, 256, 231, 225, 213, 136	Galantamina*
	290	290, 272, 254	Pseudolicorina
Raíces	274	274, 256, 225, 217, 199	Sanguinina
	288	288, 270, 231, 225, 213	Galantamina*
	290	290, 272, 254, 147	Pseudolicorina

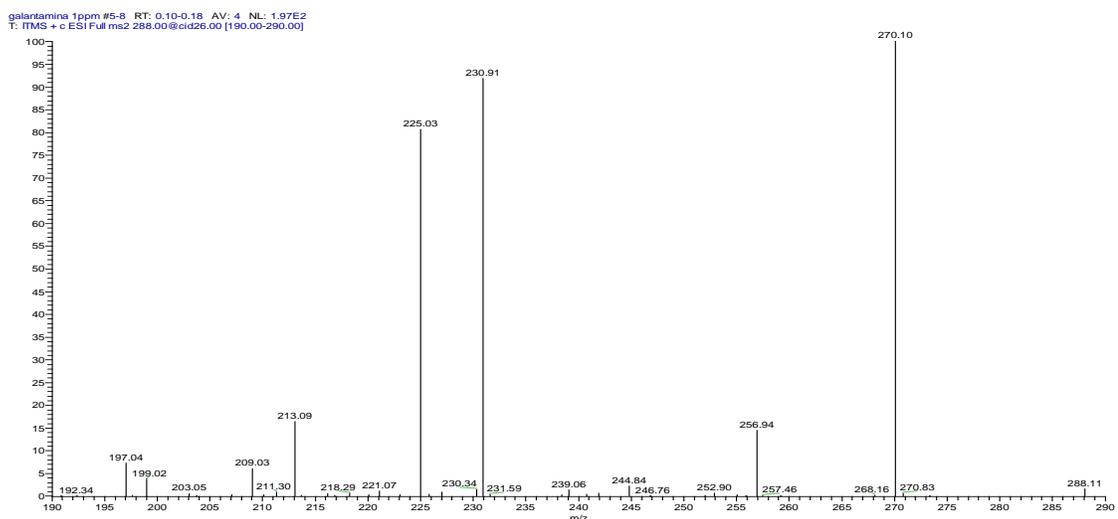
\*Galantamina o posiblemente uno de sus isómeros.

Los espectros obtenidos a partir del análisis de espectrometría masas/masas se compararon con los patrones de fragmentación reportados en otros estudios para tratar de identificar los alcaloides presentes en la muestra. En la **Tabla 6** se muestra la información obtenida del análisis UHPLC/ESI-MS/MS.

A continuación se muestran los iones detectados y sus respectivas rutas de fragmentación:

- $m/z= 288$

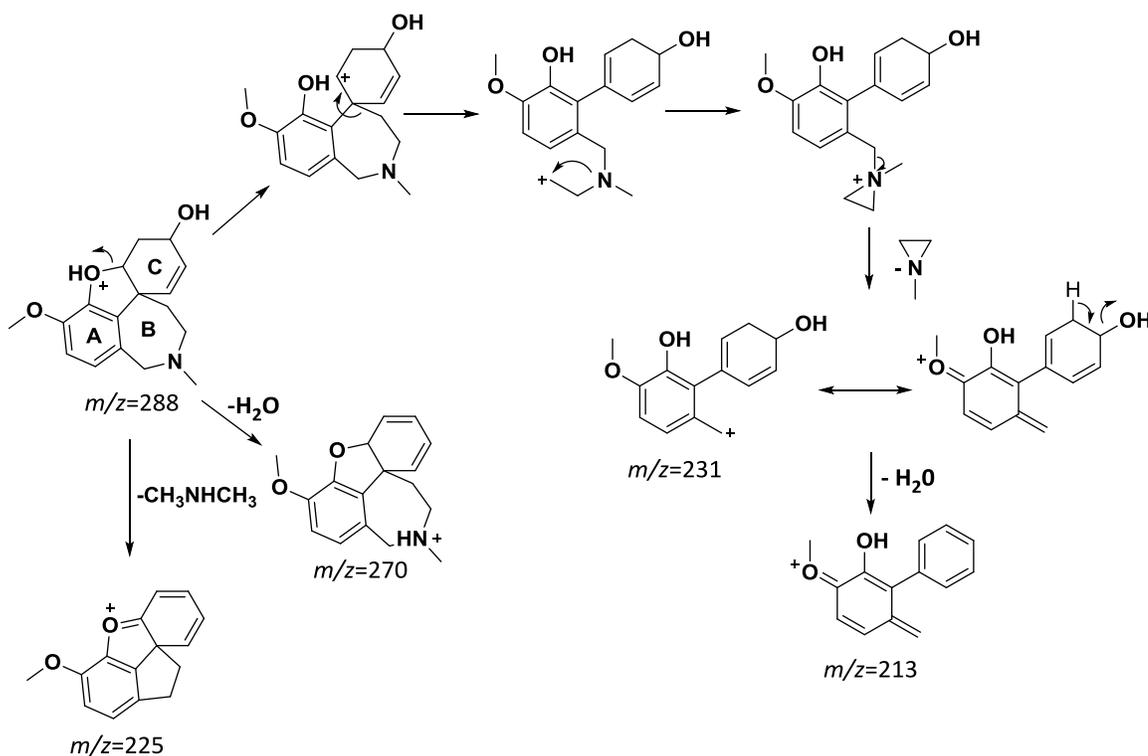
En la **Figura 14** se muestra el espectro de masas del estándar de galantamina obtenido en éste estudio. Los alcaloides de tipo galantamina generalmente producen fragmentos por ruptura del anillo B y pérdida de elementos del anillo C (Katoch et al., 2012). El espectro de masas del estándar de galantamina muestra un ion molecular a  $m/z$  288  $[M+H]^+$ , y fragmentos de masa a 270, 231, 225 y 213.



**Figura 14.** Espectro de masas del estándar de galantamina.

En el **Esquema 2** se muestra el patrón de fragmentación de galantamina, en el que se observan tres modos de fragmentación. La pérdida de una molécula de agua ( $[M+H-H_2O]^+$ ,  $m/z$  270) del anillo C se favorece por la facilidad con que se eliminan los elementos neutros. El fragmento de masa  $m/z$  231  $[M+H-C_3H_7N]^+$  se debe a la ruptura del enlace C-O, cuya carga positiva queda sobre el anillo B, se rompen dos enlaces

sucesivos y se favorece la salida de la molécula heterocíclica  $C_3H_7N$ , dejando una molécula con una carga positiva sobre el átomo de carbono adyacente al anillo aromático, la cual se estabiliza a través del anillo y el átomo de oxígeno unido a este, y la señal que corresponde a  $m/z$  213 corresponde a la eliminación de una molécula de agua. Por otro lado, el fragmento observado a  $m/z$  225 corresponde al fragmento  $[M+H-C_2H_7N]^+$ .

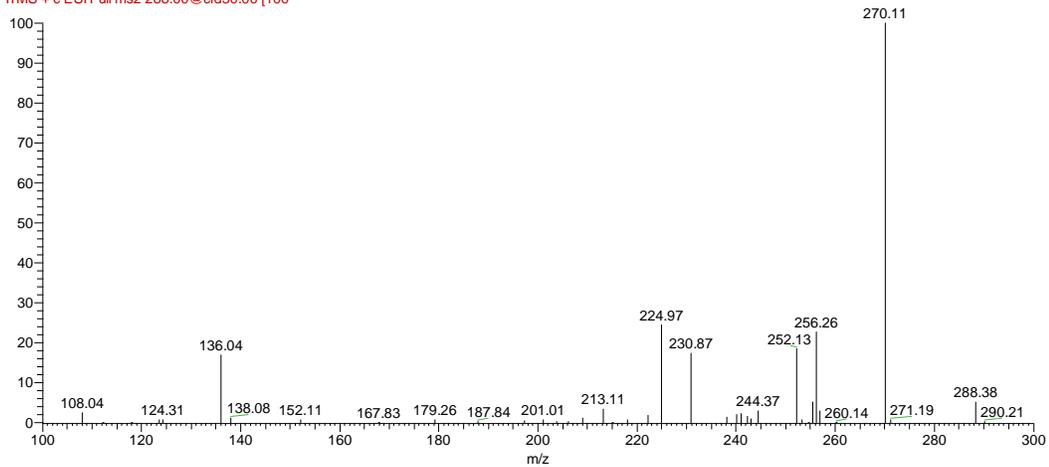


**Esquema 2.** Patrón de fragmentación de galantamina.

En el espectro de fragmentación del ión  $m/z$  288 de la fracción de alcaloides de hojas y raíces (**Figura 15** y **16**), respectivamente, se observa un patrón similar en las pérdidas de masa, sin embargo, la intensidad de los fragmentos es diferente, y se relacionan con la abundancia de los iones formados a partir de la muestra.

En la **Figura 17** y **18** se muestran los espectros masas/masas del ión  $m/z$  274 de hojas y de raíces, respectivamente. Se observa diferencia en la intensidad del ion molecular y de algunos fragmentos, sin embargo el pico base  $m/z$  225 es igual en ambos espectros.

BG\_ALKH80PPM\_190430150416 #126 RT: 2.92 AV: 1 NL: 2.71E3  
F: ITMS + c ESI Full ms2 288.00@cid30.00 [100]

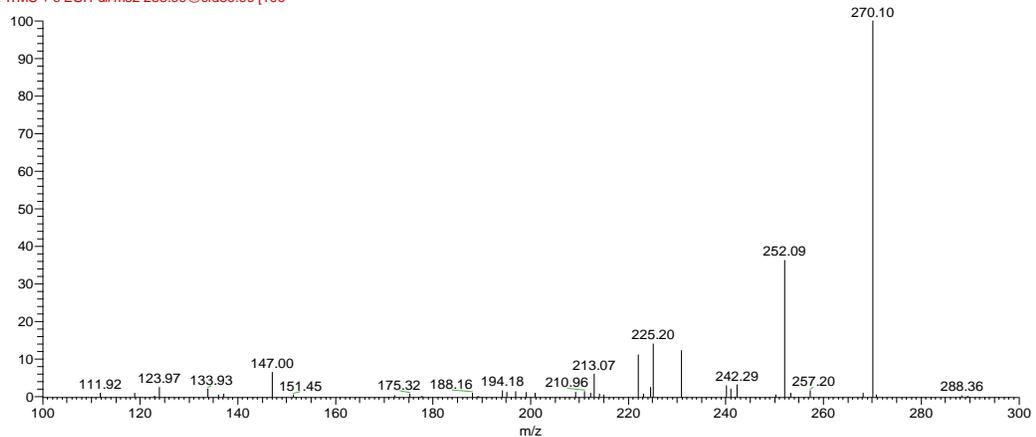


**Figura 15.** Espectro MS/MS de  $m/z$  288-hojas.

- $m/z=274$

De acuerdo al patrón de fragmentación de sanguinina (**Esquema 3**) planteado por Mroczek (2016), se observa que los fragmentos  $m/z$  256 y  $m/z$  217 también están presentes en los espectros de fragmentación del ión  $m/z$  274 de hojas y de raíces, estas pérdidas de masa corresponden a  $[M+H-H_2O]^+$  y  $[M+H-C_3H_7N]^+$ , típico de un alcaloide de tipo galantamina.

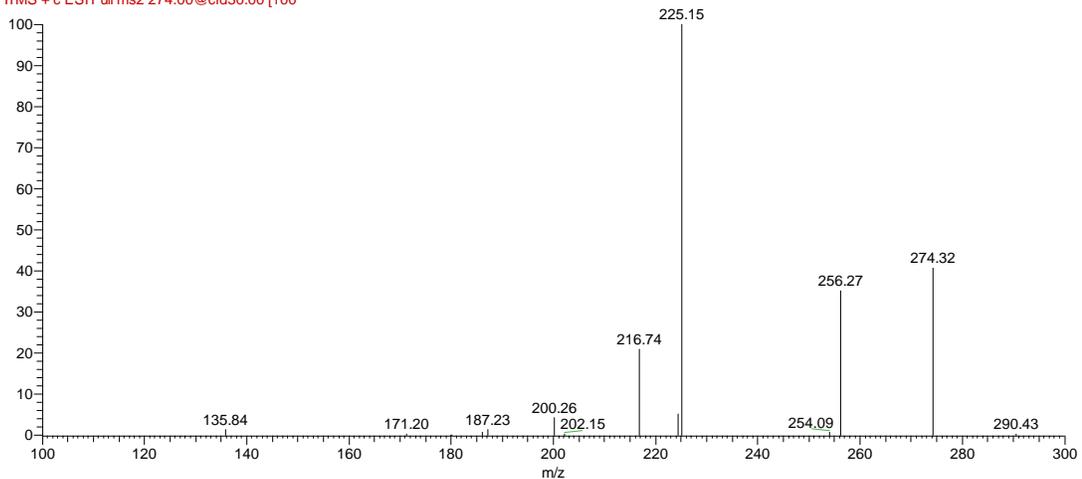
BG\_ALKR80PPM\_190430151133 #130 RT: 2.93 AV: 1 NL: 1.34E4  
F: ITMS + c ESI Full ms2 288.00@cid30.00 [100]



**Figura 16.** Espectro MS/MS de  $m/z$  288-raíces.

Sin embargo, el autor no reporta una pérdida de masa correspondiente a un fragmento  $m/z$  225, el cual si fue observado en los espectros de masa obtenidos en el presente estudio.

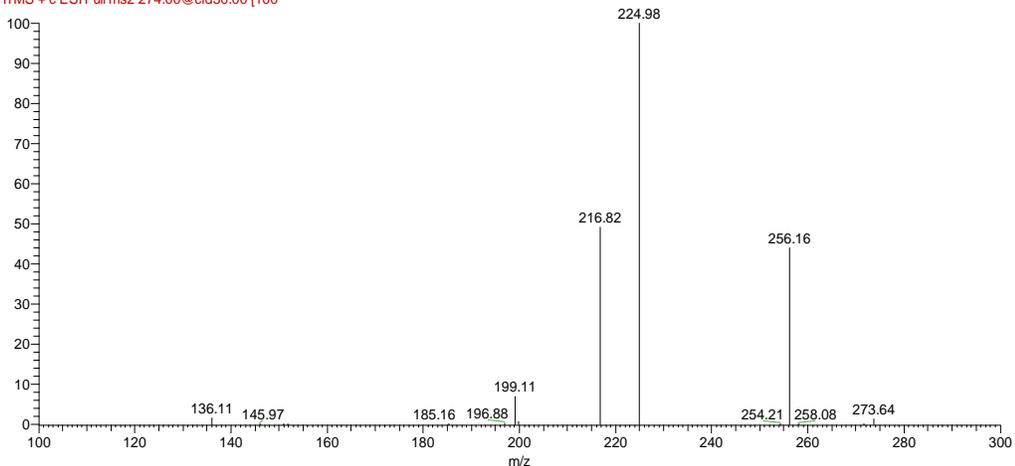
BG\_ALKH80PPM\_190430150416 #131 RT: 2.99 AV: 1 NL: 5.12E2  
F: ITMS + c ESI Full ms2 274.00@cid30.00 [100]



**Figura 17.** Espectro MS/MS de  $m/z$  274-hojas.

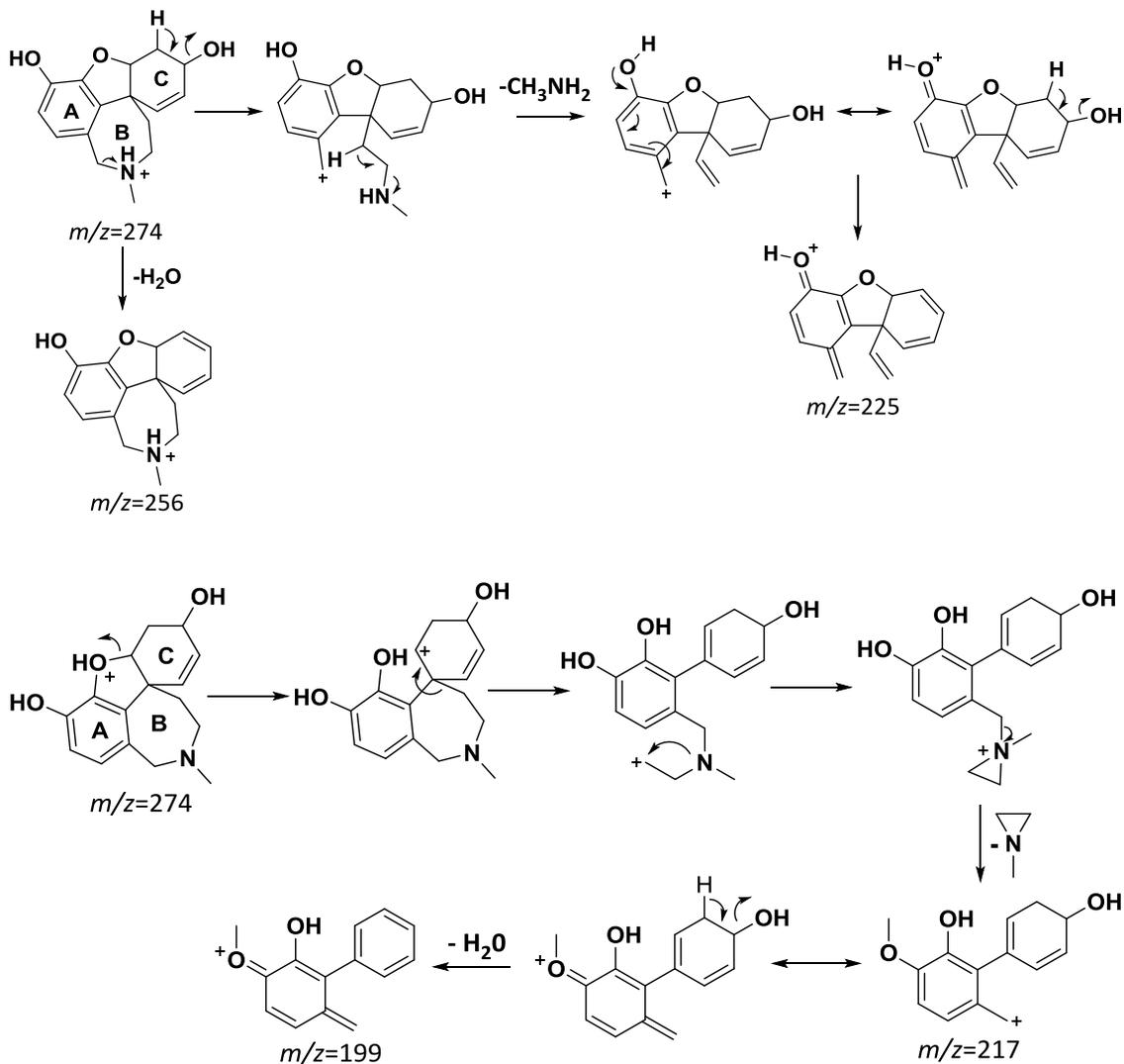
En el caso de ser sanguinina, podría corresponder a una pérdida de masa de  $[M+H-CH_3N-H_2O]^+$ , cuya fragmentación se propone de la siguiente manera: inicialmente se presenta una ruptura heterolítica  $\alpha$  al átomo de Nitrógeno, que deja una carga positiva queda sobre el átomo de Carbono adyacente al anillo A, la posterior ruptura de dos enlaces sucesivos favorece la elimina el fragmento neutro  $CH_3NH_2$ , dicha carga se estabiliza a través del anillo aromático y el átomo de oxígeno adyacente, y finalmente se elimina una molécula de agua.

BG\_ALKR80PPM\_190430151133 #115 RT: 2.69 AV: 1 NL: 1.69E3  
F: ITMS + c ESI Full ms2 274.00@cid30.00 [100]



**Figura 18.** Espectro MS/MS de  $m/z$  274-raíces.

Es importante tener en cuenta que en el trabajo realizado por Mroczek (2016) se usó un analizador de masas diferente al que se empleó en esta tesis, y por tanto la fragmentación podría variar.

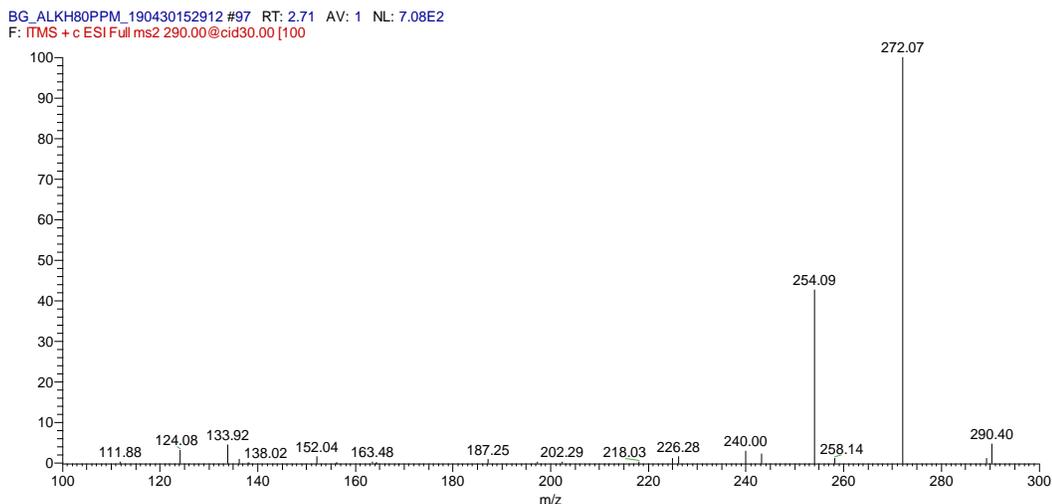


**Esquema 3.** Patrón de fragmentación de sanguinina.

- $m/z=290$

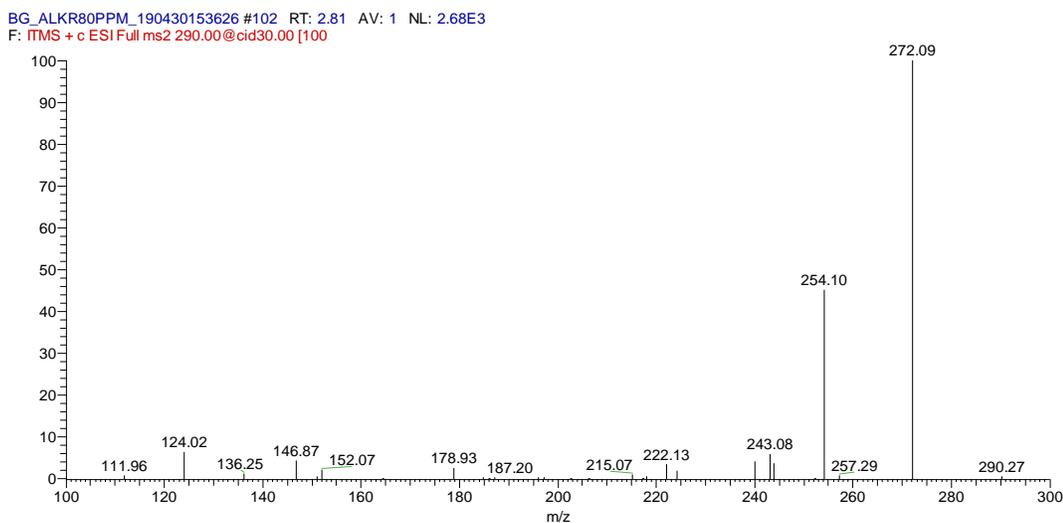
En la **Figura 19** y **20** se muestran los espectros de fragmentación masas/masas del ión  $m/z$  290 de hojas y de raíces, respectivamente. Se observa el ión molecular de baja intensidad, el pico base a una masa de  $m/z$  272 y un fragmento relativamente intenso a una masa de  $m/z$  254 en ambos espectros. El patrón de fragmentación del ion  $m/z$  290

indica la transferencia del doble enlace, y la eliminación simultanea de moléculas de agua de los grupos hidroxilo de C-1 y C-2 (**Esquema 4**), cuyo patrón de fragmentación es característico de los alcaloides de tipo licorina (Katoch et al., 2012).



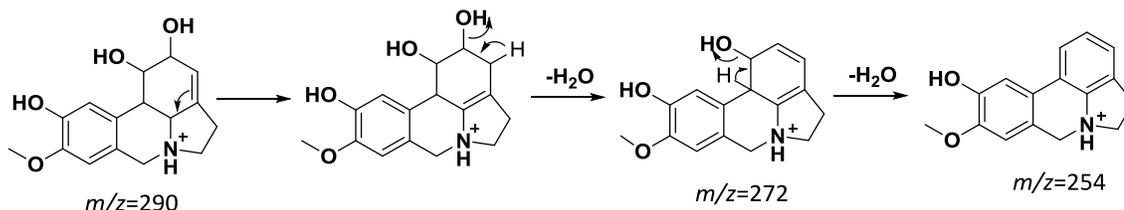
**Figura 19.** Espectro MS/MS de  $m/z$  290-hojas.

Katoch y Sharma (2019) reportaron en su trabajo, el espectro de fragmentación de pseudolicorina, en el que se observan fragmentaciones de masas similares a las mostradas en los espectros de hojas y de raíces, sin embargo, la intensidad de los iones es diferente, pero se podría explicar de acuerdo a la alternativa planteada anteriormente respecto al analizador de masas.



**Figura 20.** Espectro MS/MS de  $m/z$  290-raíces.

Además, se compararon los espectros de masa obtenidos en este trabajo, con el reportado para licoramina  $m/z$  290 (Katoch et al., 2012), y no se observaron similitudes con el patrón de fragmentación que siguen los alcaloides de tipo galantamina.



**Esquema 4.** Patrón de fragmentación de pseudolicorina.

### 6.5 Determinación de la actividad citotóxica sobre *A. salina* de los extractos etanólicos totales

El bioensayo de letalidad de *A. salina* se ha empleado como un ensayo inicial de selección de extractos crudos, así como compuestos aislados para evaluar su toxicidad sobre los crustáceos, indicando posibles propiedades citotóxicas *in vitro*, relacionadas con las posibles actividades antitumorales *in vivo* (Ahmed et al., 2016).

El grado de toxicidad de los extractos se clasificó de acuerdo al rango en el que se encuentra el valor de la  $CL_{50}$  en la **Tabla 7** según el CYTED (Sánchez y Neira, 2005).

**Tabla 7.** Clasificación de toxicidad según el CYTED.

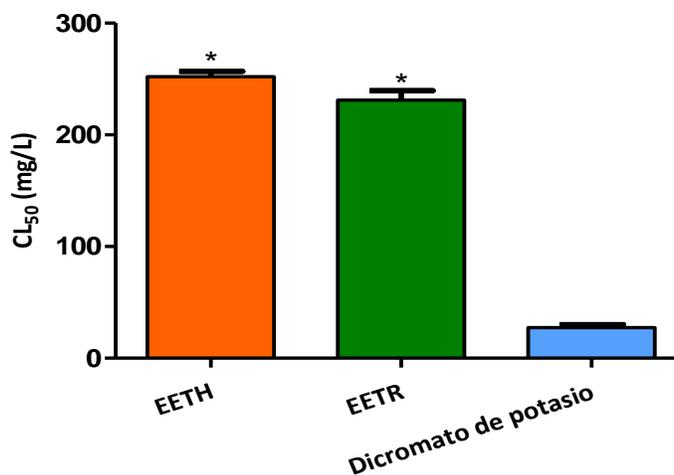
Categoría	$CL_{50}$ (mg/L)
Extremadamente tóxico	1-10
Altamente tóxico	10-100
Moderadamente tóxico	100-500
Ligeramente tóxico	500-1000
Prácticamente no tóxico	1000-1500
Relativamente inocuo	>1500

Los extractos etanólicos totales de hojas y raíces presentaron toxicidad sobre *A. salina* a las 24 horas de exposición, con valores de  $252,2 \pm 4,7$  mg/L para hojas y  $231,1 \pm 8,7$  mg/L para raíces, como se muestra en la **Tabla 8**.

**Tabla 8.** Citotoxicidad de los extractos etanólicos totales de hojas y raíces sobre *A. salina*.

Muestra	CL <sub>50</sub> (mg/L) $\pm$ SD, n=3	Clasificación de toxicidad
Extracto etanólico total de hojas	$252,2 \pm 4,7$	Moderadamente tóxico
Extracto etanólico total de raíces	$231,1 \pm 8,7$	Moderadamente tóxico
Dicromato de potasio	$27,3 \pm 2,8$	Altamente tóxico

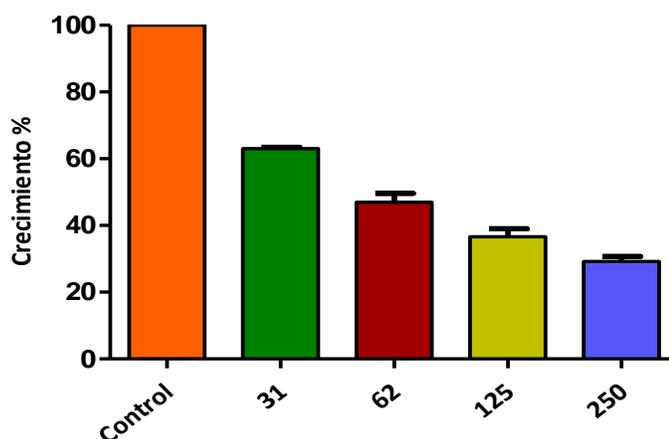
De acuerdo a lo anterior, los dos EET se clasificaron como moderadamente tóxicos (**Tabla 7**). Además, se realizó el ensayo con dicromato de potasio como control positivo, que presentó toxicidad con una CL<sub>50</sub> de  $27,3 \pm 2,8$ , y se clasificó como altamente tóxico.



**Figura 21.** Concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) de los extractos etanólicos totales de hojas y raíces de *P. lehmannii*. (\* $p < 0,05$ ).

La actividad citotóxica de los extractos podría atribuirse a los compuestos presentes en la planta con propiedades tóxicas. De acuerdo al análisis fitoquímico cualitativo llevado a cabo en este estudio, se encontraron diferentes grupos de metabolitos secundarios que podrían ejercer dicha actividad. Sin embargo, debido a que se trabajó con los extractos totales, no se podría determinar el tipo de estructura química que actúa sobre los nauplios de *Artemia*, además de que éste ensayo es preliminar y no es posible determinar el mecanismo de acción de los compuestos bioactivos.

Los extractos etanólicos de esta planta podrían ser empleados en ensayos sobre líneas celulares debido a que presentaron actividad sobre las larvas de *A. salina*, además, para futuras investigaciones se debería fraccionar y aislar los compuestos presentes en la planta, y así poder comparar los resultados obtenidos en éste estudio. Se empleó el cálculo estadístico t-Student de dos colas para determinar las diferencias significativas (**Figura 21**) entre la media de la CL<sub>50</sub> de EETH y EETR, y se observó que sí hay diferencias significativas, ya que el P-valor fue menor de 0,05.



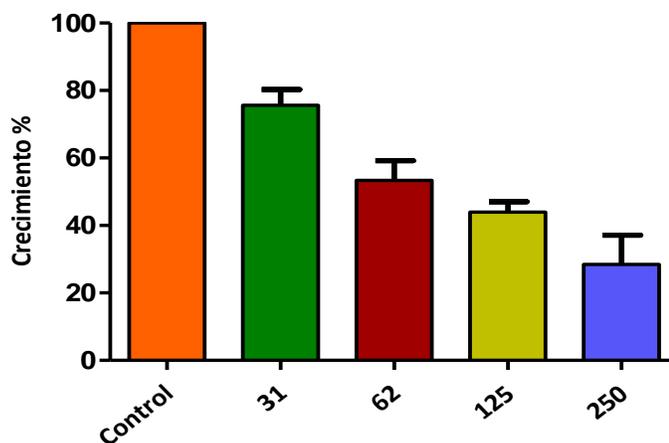
**Figura 22.** Crecimiento de las raíces de *A. cepa* del grupo de control y de las diferentes concentraciones de EETH.

Diferentes autores plantean que éste método es conveniente para determinar la actividad citotóxica de diferentes sustancias. Gandhi et al. (2019) emplearon éste ensayo para evaluar la citotoxicidad de nanopartículas de cobre sintetizadas a partir de sulfato de cobre y Panchagavya, encontrando un efecto tóxico significativo de las nanoestructuras.

Además, éste ensayo es muy útil para evaluar la toxicidad de extractos de plantas que en un futuro se puedan emplear como agentes anticancerígenos. Khan et al. (2015), realizaron el ensayo de letalidad del extracto crudo de *Ocimum basilicum* sobre *Artemia* y encontraron buena actividad citotóxica. Al-Saeedi, Al-Ghafri y Hossain (2017) determinaron la citotoxicidad de diferentes polaridades de extracto crudo de hojas y frutos de *Ziziphus jujuba* y obtuvieron resultados de actividad tóxica moderada de todas las fracciones.

### 6.6 Determinación de la actividad fitotóxica de los extractos etanólicos totales sobre *A. cepa*

En este estudio, el bioensayo de *A. cepa* se empleó para evaluar el efecto fitotóxico de los extractos. En la **Figura 22** y **23** se observa el efecto de los EET sobre el crecimiento de la raíz frente al grupo de control a las 72 horas de exposición a diferentes concentraciones de extracto, los valores obtenidos se registraron en la **Tabla 9**.



**Figura 23.** Crecimiento de las raíces de *A. cepa* del grupo de control y de las diferentes concentraciones de EETR.

En general, se observa que a mayor concentración de los extractos, el crecimiento de las raíces de las cebollas es menor, por lo que a la concentración de 250 mg/L el efecto de inhibición del crecimiento es mayor del 70%. El efecto de inhibición observado de los extractos sobre las raíces de *A. cepa* se empleó para determinar la  $CI_{50}$ .

En la **Tabla 10** se muestran los resultados de fitotoxicidad de los extractos sobre la raíz de las cebollas, expresados como  $CI_{50}$ , concentración que inhibe el 50% del crecimiento de las raíces de *A. cepa* respecto al grupo de control.

**Tabla 9.** Porcentaje de crecimiento de la raíces de *A. cepa* expuestas a diferentes concentraciones de EET.

Concentración (mg/L)	Crecimiento (%)	
	EETH	EETR
Control	100,00	100,00
31	63,03	75,59
62	46,94	53,42
125	36,66	43,96
250	29,17	28,47

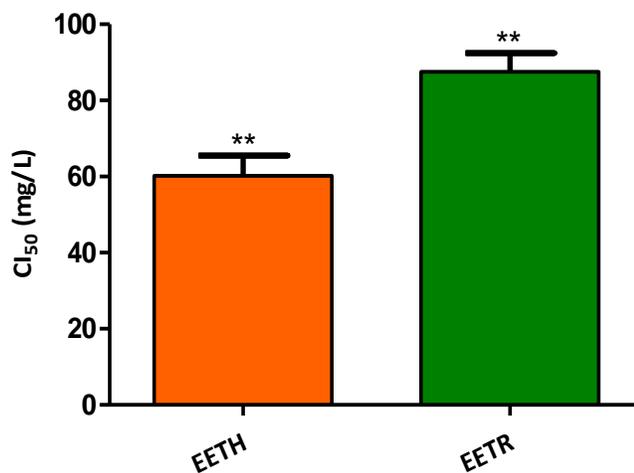
El extracto que presentó mayor fitotoxicidad a las 72 horas fue EETH, con un valor de  $CI_{50}$  de  $60,23 \pm 5,33$  mg/L, mientras que el EETR fue menos tóxico  $CI_{50}$   $88,00 \pm 5,71$ , por lo que en este caso, los compuestos presentes en el EETH ejercieron un efecto más dañino sobre las células meristemáticas de las cebollas, disminuyendo o evitando el desarrollo de la raíz.

**Tabla 10.** Fitotoxicidad de los extractos etanólicos totales de hojas y raíces sobre *A. cepa* ( $CI_{50}$ , mg/L).

Muestra	$CI_{50}$ (mg/L) $\pm$ SD, n=3
Extracto etanólico total de hojas	$60,23 \pm 5,33$
Extracto etanólico total de raíces	$88,00 \pm 5,71$

Empleando el test de t-Student se determinó que hay diferencias significativas (**Figura 24**) entre los valores de  $CI_{50}$  de EETH y EETR, ya que el P-valor fue 0,0029, menor de 0,05.

De acuerdo a lo anterior, la toxicidad se puede atribuir a la presencia de los diferentes grupos de metabolitos encontrados en los extractos, sin embargo, se debe hacer la identificación y cuantificación de éstos para poder explicar un posible mecanismo de inhibición del crecimiento de las células meristemáticas de *A. cepa*. El empleo de éste bioensayo para evaluar la fitotoxicidad de los extractos de hojas y raíces, es un paso inicial para caracterizar la planta y determinar sus posibles aplicaciones en el tratamiento de enfermedades.



**Figura 24.** Concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ) de los extractos etanólicos totales de hojas y raíces de *P. lehmannii* (\*\* $p < 0,01$ ).

### **6.7 Evaluación de la actividad anticoagulante de los extractos etanólicos totales sobre plasma sanguíneo**

De acuerdo al procedimiento descrito por Gené et al. (1989) para determinar este tipo de actividad, el tiempo de coagulación del plasma con la mezcla veneno/antiveneno (EET) debe ser tres veces mayor al tiempo de coagulación del plasma sólo con el veneno (control positivo), que en éste ensayo se observó a los  $11,89 \pm 0,78$  s.

Los resultados registrados en la **Tabla 11**, muestran que al usar la CL<sub>50</sub> de los EET (determinada con el ensayo de *A. salina*), el tiempo de coagulación del plasma fueron 25,00 ±2,04 s y 15,08 ±0,46 s de EETH y EETR, respectivamente, no fue tres veces mayor al tiempo que presentó el control positivo, sin embargo al usar una concentración mayor de los extractos casi dos veces la CL<sub>50</sub>, el tiempo de coagulación es mucho mayor, y se puede asumir que los EET inhibieron la actividad coagulante sobre el plasma ejercida por el veneno de serpiente de *B. asper*.

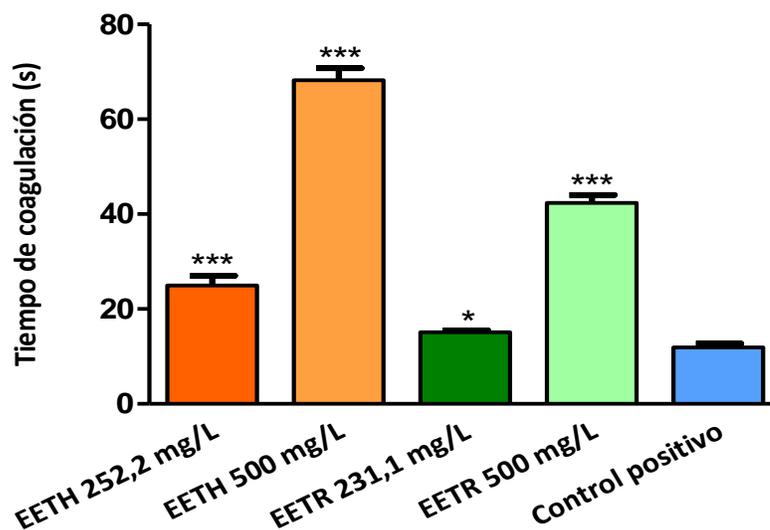
**Tabla 11.** Actividad anticoagulante de los extractos etanólicos totales de hojas y raíces *P. lehmannii* sobre de plasma sanguíneo.

<b>Muestra</b>	<b>Concentración (mg/L)</b>	<b>Tiempo de coagulación (s) ±SD, n=3</b>
Extracto etanólico total de hojas	252,2	25,00 ±2,04
	500	68,26 ±2,49
Extracto etanólico total de raíces	231,1	15,08 ±0,46
	500	42,36 ±1,66
Control positivo		11,89 ±0,78

Se realizó un análisis estadístico de la actividad anticoagulante, mediante un análisis de varianza ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Dunnett para determinar diferencias significativas entre el control positivo y las diferentes mezclas veneno/extracto.

De acuerdo al análisis estadístico realizado, se observa que hay diferencias significativas del tiempo de coagulación (**Figura 25**) entre el control positivo y las mezclas de veneno/extracto, a todas las concentraciones utilizadas de los EET. Además, se observa que el EETH inhibe significativamente la coagulación del plasma a las dos concentraciones evaluadas, con un tiempo de coagulación de 68,26 ±2,49 s a la

concentración más alta. Por otro lado, se encontró que el mayor tiempo de coagulación presentado por el EETR fue  $42,36 \pm 1,66$  s.



**Figura 25.** Inhibición de la actividad coagulante inducida por el veneno de *B. asper* por los EET. (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,0001$ ).

Las toxinas presentes en los venenos de serpiente causan entre otros efectos, la formación *in vitro* de coágulos, sin embargo, *in vivo* causan un severo consumo de factores de coagulación conduciendo a un riesgo de sangrado (Figueiredo et al., 2019). Particularmente, las enzimas del veneno de *B. asper* permiten la hidrólisis del fibrinógeno a fibrina al activar las plaquetas y los factores necesarios para que se inicie la coagulación de la sangre (Gómez et al., 2014).

Algunos metabolitos presentes en los EET podrían interactuar con las enzimas presentes en el veneno o con los factores implicados en la coagulación, causando la inhibición de la actividad coagulante observada en este estudio, sin embargo, el mecanismo de acción es incierto. En varios estudios reportados sobre la inhibición de los efectos producidos por venenos de serpiente, se ha atribuido dicha actividad a compuestos fenólicos, debido a que éstos junto a los taninos, inhiben la actividad de metaloproteinasas, serina proteinasas y fosfolipasas  $A_2$  mediante la quelatación de los cofactores (Zn o Ca) de la

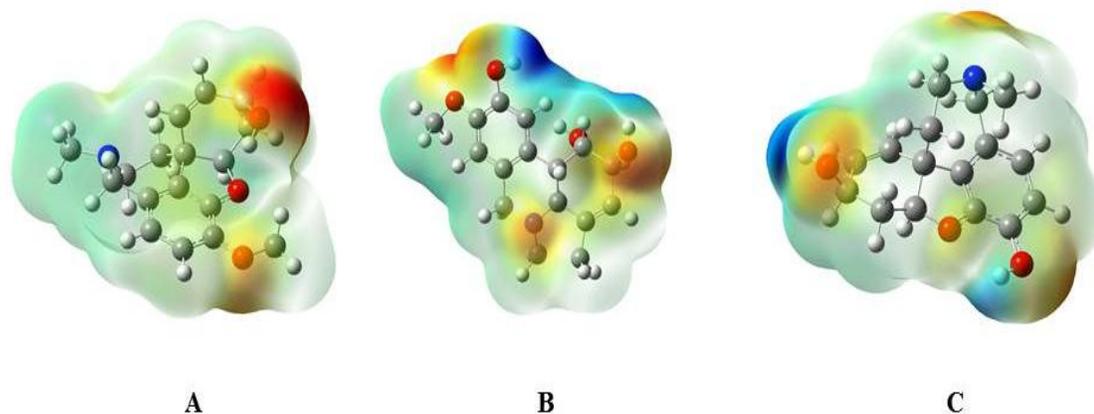
actividad enzimática que promueven la formación de edema y sangrado (Caro et al., 2017). Gómez et al. (2014), empleando extractos de *Renealmia alpinia* y un flavanona aislada a partir de ésta planta, determinaron que hubo inhibición significativa de las actividades evaluadas *in vitro* de *B. asper*.

Por otro lado, Mack-Wen et al. (2011), evaluaron la inhibición *in vitro* del veneno de *B. asper* de los extractos etanólicos de *Brownea ariza* y encontraron una buena respuesta de inhibición anticoagulante por parte de los extractos, atribuida a metabolitos como triterpenos, flavonoides y taninos presentes en la muestra.

Los resultados obtenidos en este estudio deberían servir como una herramienta para estudios posteriores sobre la neutralización de diferentes actividades ejercidas por venenos de serpiente, siendo necesario el fraccionamiento de los extractos, que permita obtener e identificar los compuestos que interactúan con las enzimas del veneno y factores de coagulación planteando un posible mecanismo de inhibición ejercida por los metabolitos.

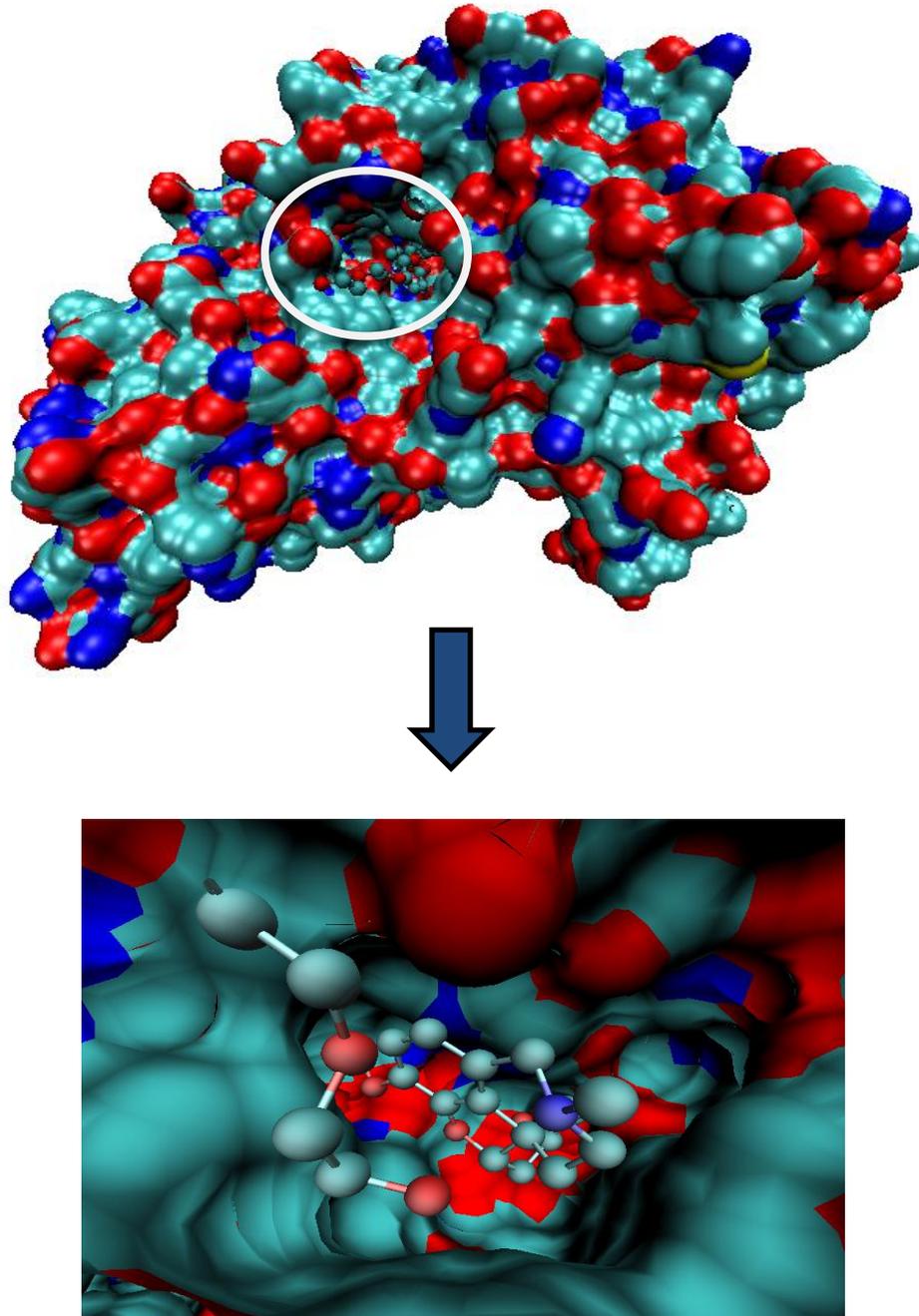
## 6.8 Obtención de los MESP de las moléculas identificadas

El mapeo MESP Explica la reactividad del sistema químico al predecir los sitios electrofílicos y nucleofílicos dentro de la molécula, representados por los colores azul y rojo, respectivamente (Ahmed et al., 2016).



**Figura 26.** MESP de los alcaloides A) galantamina, B) Pseudolicorina y C) Sanguinina.

En la **Figura 26** se observan los MESP obtenidos para los tres alcaloides a nivel DFT con el funcional B3LYP y el conjunto de bases 6-31G que a pesar de ser pequeña genera resultados confiables para los objetivos trazados en el presente trabajo.



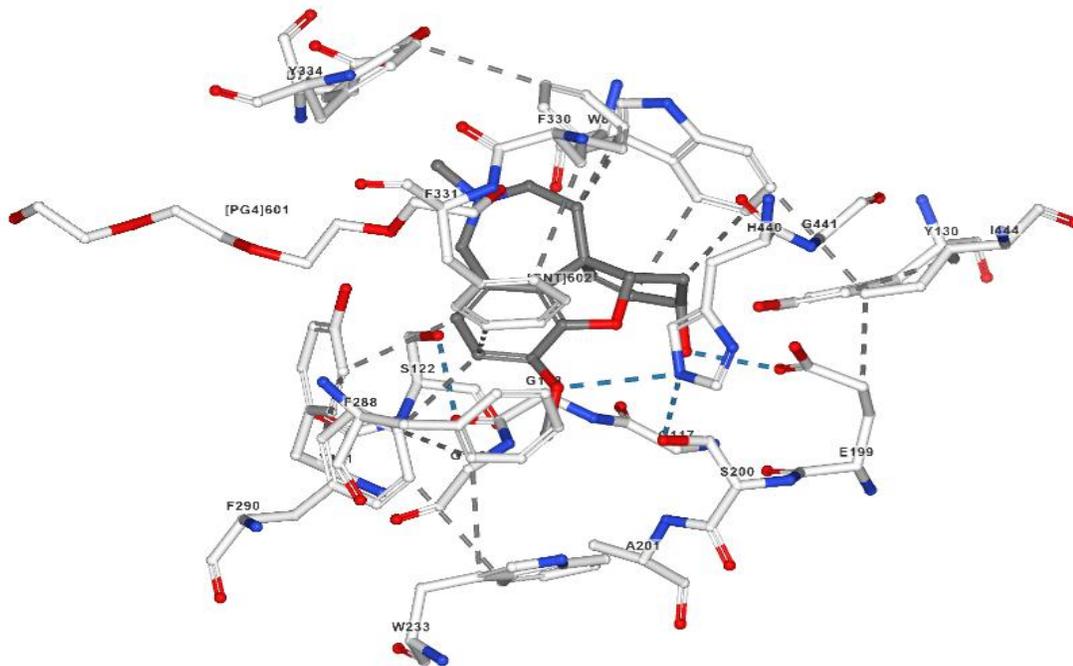
**Figura 27.** Visualización molecular de la interacción electrostática de AChE con galantamina generada en VMD.

Los mapas se analizaron en términos de las posibles interacciones como los enlaces de hidrógeno que podrían formar con la enzima AChE. Como se aprecia en la **Figura 26-A** correspondiente al mapa de la galantamina, se observa una alta densidad de carga negativa sobre el átomo de oxígeno del anillo C, y una ligera carga negativa sobre el oxígeno del anillo A. En las figuras **26-B y C**, se observan regiones con alta densidad electrónica, cuyas cargas negativas están sobre los oxígenos y sobre el átomo de nitrógeno, y una región con una notable baja densidad electrónica, que corresponde a los átomos de hidrógeno de los grupos hidroxilo, por lo que se podría pensar que éstos actúan como donadores en enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares. La presencia de los grupos OH polarizan más las moléculas **B y C**, lo que las hace más reactivas. **A y C** se diferencian estructuralmente por los sustituyentes OCH<sub>3</sub> y OH en el anillo A, respectivamente, lo cual influye directamente en la reactividad, ya que el oxígeno del grupo hidroxilo ejerce mayor poder electroatrayente.

Los resultados obtenidos en este estudio de los potenciales electrostáticos moleculares se asociaron a la posible interacción de los alcaloides identificados con la enzima acetilcolinesterasa AChE, comparados con el MESP de galantamina.

La enzima AChE es la encargada de la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina ACh a acetato y colina, además juega un papel importante en la inducción de agregación de la proteína  $\beta$ -amiloide (Baldissera et al., 2018). AChE consta de dos subsitios activos de unión que están conectados por un canal estrecho de casi 20 Å de profundidad: un sitio aniónico catalítico cerca de la entrada del canal y un sitio aniónico periférico en la parte inferior del canal (He et al., 2018). Además, posee un sitio activo denominado “triada catalítica” que está constituido por tres residuos serina, histidina y ácido glutámico y un subsitio denominado cavidad aromática (Castellanos, 2014). La galantamina interactúa con el sitio activo de AChE, con la cavidad aromática y con el subsitio aniónico para inhibir reversiblemente su actividad (Castellanos, 2014).

En la **Figura 27** se visualiza la macromolécula AChE con el ligando galantamina obtenidos de PDB (Greenblatt et al., 1999), la cual se representó con el software VMD. Se observa que hay un espacio adecuado por el que entra la molécula de galantamina y se generan interacciones no enlazantes como enlaces de hidrógeno entre el hidrógeno unido al oxígeno del anillo C con un átomo de oxígeno o de nitrógeno de un aminoácido. Sin embargo, en la **Figura 28** se observa que el enlace de hidrógeno se da entre el H del grupo OH de la galantamina y el O del ácido glutámico. En la **Figura 28** se observan tanto los enlaces de hidrógeno, como las interacciones hidrofóbicas inter e intramoleculares.



**Figura 28.** Representación de las interacciones no enlazantes de galantamina con los residuos aminoácidos que conforman la enzima acetilcolinesterasa (---, enlaces de hidrógeno; ···, interacciones hidrofóbicas).

## 7 CONCLUSIONES

Mediante el tamizaje fitoquímico realizado a los EET, se determinó la presencia de los grupos de metabolitos: alcaloides, taninos, triterpenos, esteroides y flavonoides.

En la fracción alcaloídica de hojas y raíces de *P. lehmannii* se identificó tres alcaloides galantamina, pseudolicorina y sanguinina mediante espectrometría de masas/masas.

Los EET presentaron toxicidad moderada frente a *Artemia salina* y frente a *Allium cepa*, cuya actividad se atribuye a la diversidad de grupos de metabolitos secundarios encontrados.

Los EET inhibieron la actividad coagulante ejercida por el veneno de serpiente de *B. asper* sobre el plasma a una concentración de 500,0 mg/L, sin embargo, al emplear la concentración  $CL_{50}$  de los extractos se extendió el tiempo de coagulación del plasma, observándose diferencias significativas entre el control positivo y los extractos.

Los cálculos computacionales, permiten conocer con antelación la actividad biológica de una molécula o metabolito secundario frente a una enzima, por lo que se ahorrarían costos económicos y en tiempo.

## 8 RECOMENDACIONES

Los extractos etanólicos de esta planta podrían ser empleados en ensayos sobre líneas celulares debido a que presentaron actividad citotóxica sobre las larvas de *A. salina* y fitotóxica sobre *A. cepa*.

Debido a que hay poca información reportada en la literatura sobre la identificación de alcaloides de Amaryllidaceae mediante HPLC/MS, la información recolectada en éste estudio sobre la identificación de alcaloides de hojas y raíces *P. lehmannii* es un gran aporte para la caracterización de esta especie Colombiana, sin embargo, el análisis se debería corroborar y complementar con la técnica de cromatografía de gases acoplada a masas para hacer la cuantificación e identificación de otros alcaloides presentes en la muestra.

Se recomienda aislar y purificar los compuestos detectados con las técnicas mencionadas y evaluar su posible actividad biológica.

Sería interesante indagar sobre otras actividades antiofídicas de la planta, para potenciar el uso de esta especie, ya que de acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, los extractos presentaron actividad anticoagulante a una concentración de 500,0 mg/L

Emplear las diversas estructuras de los alcaloides de tipo Amaryllidaceae, someterlas a modificaciones, ya sea adicionando, eliminando o cambiando sus sustituyentes a través de la química computacional y determinar si es biológicamente activa frente a determinadas enzimas de interés terapéutico mediante Docking molecular.

## 9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahmed, M., Yasin, K., Ayub, K., Mahmood, T., Tahir, M., Khan, B., Hafeez, M., Ahmed, M., ul- Haq, I. (2016). Click one pot synthesis, spectral analyses, crystal structures, DFT studies and brine shrimp cytotoxicity assay of two newly synthesized 1,4,5-trisubstituted 1,2,3-triazoles. *Journal of Molecular Structure*, 1106, 430-439.
2. Al-Saeedi, A., Al-Ghafri, M., Hossain, M. (2017). Brine shrimp toxicity of various polarities leaves and fruits crude fractions of *Ziziphus jujuba* native to Oman and their antimicrobial potency. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 5, 122-126.
3. Alsaleh, M., Barbera, T., Andrews, R., Sithithaworn, P., Khuntikeo, N., Loilome, W., Puangrat, Y., Cox, J., Syms, R., Holmes, E., Taylor, S. (2019). Mass Spectrometry: A Guide For The Clinician. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*.
4. Baldissera, M., Souza, C., De Matos, A., Doleski, P., Baldisserotto, B., Da silva, A., Monteiro, S. (2018). Blood-brain barrier breakdown, memory impairment and neurotoxicity caused in mice submitted to orally treatment with thymol. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 62, 114-119.
5. Bastida, J., Berkov, S., Torras, L., Pigni, N., Andrade, J., Martínez, V., Codina, C., Viladomat, F. (2011). Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids, Kerala, India: Transworld Research Network.
6. Berkov, S., Bastida, J., Sidjimova, B., Viladomat, F., Codina, C. (2008). Phytochemical differentiation of *Galanthus nivalis* and *Galanthus elwesii* (Amaryllidaceae): A case study. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36, 638-645.
7. Bondonno, N., Lewis, J., Blekkenhorst, L., Bondonno, C., Shin, J., Croft, K., Woodman, R., Wong, G., Lim, W., Gopinath, B., Flood, V., Russell, J., Mitchell, P., Hodgson, J. (2019). Association of flavonoids and flavonoid-

rich foods with all-cause mortality: The Blue Mountains Eye Study. *Clinical Nutrition*.

8. Cabezas, F. (2016). Biogénesis, Obtención y caracterización de alcaloides de Amaryllidaceae, Popayán, Colombia: Universidad del Cauca.
9. Caro, D., Ocampo, Y., Castro, J., Barrios, L., Salas, R., Franco, L. (2017). Protective effect of *Dracontium dubium* against *Bothrops asper* venom. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 89, 1105-1114.
10. Castellanos, F. (2014). Estudio de la inhibición de la acetilcolinesterasa y la relación estructura actividad de terpenoides aislados de organismos marinos del caribe colombiano (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
11. Castillo, W., Aristizabal, A., Sakamoto, E., Gasca, C., Cabezas, F., Takahashi, C. (2018). *Caliphurria subedentata* (Amaryllidaceae) decreases genotoxicity and cell death induced by  $\beta$ -amyloid peptide in SH-SY5Y cell line. *Mutat Res Gen Tox En*, 836, 54-61.
12. Csuk, R., Deigner, H. (2019). The potential of Click reactions for the synthesis of bioactive triterpenes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 29(8), 949-958.
13. Chetwani, N., Cassou, C., Go, D., Chang, H. (2010). High-frequency AC electrospray ionization source for mass spectrometry of biomolecules. *Journal of American Society for Mass Spectrometry*, 21, 1852-1856.
14. Cortes, N., Castañeda, C., Osorio, E. H., Cardona, G., Osorio, E. (2018). Amaryllidaceae alkaloids as agents with protective effects against oxidative neural cell injury. *Life Sciences*, 203, 54-65.
15. Demarque, D., Callejon, D., Oliveira, G., Silva, D., Carollo, C., Lopes, N. (2018). The role of tannins as antiulcer agents: a fluorescence-imaging based study. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 28(4), 425-432.
16. Dey, T., Praveena, K., Pal, S., Mukherjee, A. (2017). Three oxime ether derivatives: Synthesis, crystallographic study, electronic structure and

- molecular electrostatic potential calculation. *Journal of Molecular Structure*, 1137, 615-625.
17. Fernández, M., Ortiz, W., Pereáñez, J., Martínez, D. (2010). Evaluación de las Propiedades Antiofídicas del Extracto Etanólico y Fracciones Obtenidas de *Renealmia alpinia* (Rottb) Mass (Zingiberaceae) Cultivada *in vitro*. *VITAE*, 17, 75-82.
18. Figueiredo, R., Alves, D., Mendonça, P., Alves, L., barroso, H., Carvalho, M. (2019). Thrombin generation test for evaluating hemostatic effects of Brazilian snake venoms. *Toxicon*, DOI: 10.1016/j.toxicon.2019.03.012.
19. Fiskesjö, G. (1985). The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 102, 99-112.
20. Frisch, M., Trucks, G., Schlegel, H., Scuseria, G., Robb, M., Cheeseman, J., Scalmani, G., Barone, V. , Petersson, G., Nakatsuji, H., Li, X., Caricato, M., Marenich, A., Bloino, J., Janesko, B., Gomperts, R., Mennucci, B., Hratchian, H., Ortiz, J., Izmaylov, A., Sonnenberg, J., Williams-Young, D., Ding, F., Lipparini, F., Egidi, F., Goings, J., Peng, B., Petrone, A., Henderson, T., Ranasinghe, D., Zakrzewski, V., Gao, J., Rega, N., Zheng, G., Liang, W., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K. Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Throssell, K., Montgomery, J., Peralta, Jr., J., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J., Brothers, E., Kudin, K., Staroverov, V., Keith, T., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J., Iyengar, S., Tomasi, J., Cossi, M., Millam, J., Klene, M., Adamo, C., Cammi, R., Ochterski, J., Martin, R., Morokuma, K., Farkas, O., Foresman, J., Fox, D. (2009). Gaussian 09 (Revisión A.02) [Windows]. Wallingford CT, Inglaterra: Gaussian, Inc.
21. Gandhi, A., Sathiyaraj, S., Vizhi, D., Supraja, N., Babujanathanam, R. (2019). Panchagavya mediated copper nanoparticles synthesis, characterization and evaluating cytotoxicity in brine shrimp. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 19.

22. Gené, J. A., Roy, A., Rojas, G., Gutiérrez, J. M., Cerdas, L. (1989) Comparative study on the coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon*, 27, 841-8848.
23. Gómez, I., Benjumea, D., Patiño, A., Jiménez, N., Osorio, E. (2014). Inhibition of the toxic effects of *Bothrops asper* venom by pinostrobin, a flavanone isolated from *Renealmia alpinia* (Rottb.) MAAS. *Journal of Ethnopharmacology*, 155, 1609-1615.
24. Gong, H., Gao, J., Soil and climatic drivers of plant SLA (specific leaf area). *Global Ecology and Conservation*. DOI: 10.1016/j.gecco.2019.e00696
25. PDB ID: 1DX6  
Greenblatt, H., Kryger, G., Lewis, T., Silman, I., Sussman, J. (1999). Structure of acetylcholinesterase complexed with (-)-galanthamine at 2.3Å resolution. *FEBS LET*, 463(3), 321-326.
26. He, Qi., Liu, J., Lan, J., Ding, J., Sun, Y., Fang, Y., Jiang, N., Yang, Z., Sun L., Jin, Y., Xie, S. (2018). Coumarin-dithiocarbamate hybrids as novel multitarget AChE and MAO-B inhibitors against Alzheimer's disease: Design, synthesis and biological evaluation. *Bioorganic chemistry*, 81, 512-528.
27. Hsu, C., Fang, S., Huang, H., Yen, G. (2015). Anti-inflammatory effects of triterpenes and steroid compounds isolated from the stem bark of *Hiptage benghalensis*. *Journal of Functional Foods*, 12, 420-427.
28. Huang, Q., Liu, X., Zhao, G., Hu, T., Wang, Y. (2018). Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production. *Animal Nutrition*, 4(2), 137-150.
29. Ibrahim, A., El-Newary, S., Ibrahim, G. (2019). Antioxidant, cytotoxicity and anti-tumor activity of *Cordia dichotoma* fruits accompanied with its volatile and sugar composition. *Annals of Agricultural Sciences*, 64(1), 29-37.
30. Instituto Nacional de Salud. (2017). Informe de Evento Accidente Ofídico. Recuperado de <https://www.ins.gov.co/buscador->

eventos/Informesdeevento/ACCIDENTE%20OF%C3%8DDICO%202017.pdf

31. Ivanov, I., Georgiev, V., Berkov, S., Pavlov, A. (2012). Alkaloid patterns in *Leucojum aestivum* shoot culture cultivated at temporary immersion conditions. *Journal of Plant Physiology*, 169, 206-211.
32. Jamwal, K., Bhattacharya, S., Puri, S. (2018). Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 9, 26-38.
33. Johnson, M., Maharaja, P., Janakiraman, N., Adaikala, G., Menezes, I., da Costa, J., Verde, L., Coutinho, H. (2018). *Pancreatium triflorum* Roxb. (Amaryllidaceae) and *Molineria trichocarpa* (Wight) N.P. Balakr (Hypoxidaceae): Cytotoxic and antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology*, 119, 290-295.
34. Karak, P. (2018). Biological activities of flavonoids: an overview. *International Journal of Farmaceutical Sciences and Research*, 10(4), 1567-1574.
35. Katoch, D., Kumar, S., Kumar, N., Singh, B. (2012). Simultaneous quantification of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by UPLC–DAD/ESI-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 71, 187– 192.
36. Katoch, D., Sharma, U. (2019). Title: Simultaneous quantification and identification of Amaryllidaceae alkaloids in *Narcissus tazetta* by ultra-performance liquid chromatography-diode array detector-electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical*, DOI: 10.1016/j.jpba.2019.06.047
37. Khan, I., Ahmad, K., Khalil, A., Khan, J., Khan, Y., Saqib, M., Umar, M., Ahmad, H. (2015). Evaluation of antileishmanial, antibacterial and brine shrimp cytotoxic potential of crude methanolic extract of Herb *Ocimum basilicum* (Lamiaceae). *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 35(3), 316-322

38. Kilgore, M., Kutchan, T. (2015). The Amaryllidaceae alkaloids: biosynthesis and methods for enzyme discovery. *Phytochem Rev*, 15(3), 317-337.
39. Kimura, H., Kawai, T., Hamashima, Y., Kawashima, H., Miura, K., Nakaya, Y., Saji, H. (2014). Synthesis and evaluation of (-)-and (+)-[<sup>11</sup>C] galanthamine as PET tracers for cerebral acetylcholinesterase imaging. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22, 285-291.
40. Liman, R., Ciğerci, İ., Gökçe, S. (2018). Cytogenetic and genotoxic effects of Rosmaniric Acid on *Allium cepa* L. root meristem cells. *Food and Chemical Toxicology*, 121, 444-449.
41. López, D., Segura, C. (2003). Contribución al estudio químico del contenido de alcaloides en *Caliphurria subedentata* (Amaryllidaceae) (Tesis de pregrado). Universidad del Cauca, Popayán, Colombia.
42. López, S. (2016). Pruebas de coagulación. *Acta Pediátrica de México*, 37(4), 241-245).
43. Mack-Wen, V., Rico, L., Alarcón, J., Pereañez, J. (2011). Inhibición *in vitro* del veneno de *Bothrops asper* con extractos etanólicos de *brownea ariza* b. (Caesalpinaceae). *VITAE*, 18(1), 43-48.
44. Majors, R. (2019). Liquid Chromatography | Column Technology. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, 38-54.
45. March, R. (2010). Ion Trap Mass Spectrometers. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, 1165-1173.
46. Marchetti, L., Pellati, F., Graziosi, R., Brighenti, V., Pinetti, D., Bertelli, D. (2019). Identification and determination of bioactive phenylpropanoid glycosides of *Aloysia polystachya* (Griseb. et Moldenke) by HPLC-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 166, 364-370.
47. Martinuzzo, M. (2017). Blood Coagulation System Physiology. *Hematología*, 21, 31-42.
48. Martínez, I., Quintero, G., Márquez, L., González, J., Álvarez, A., Zarragoitía, A. (2006). Determinación de la Citotoxicidad de Extractos de

*Erythroxyllum confusum* Britt. mediante el Método de la *Artemia salina*. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 25(3), 429-431.

49. Masi, M., van der Westhuyzen, A., Tabanca, N., Evidente, M., Cimmino, A., Green, I., Bernier, U., Becnel, J., Bloomquist, J., van Otterlo, W., Evidente, A. (2017). Sarniensine, a mesembrine-type alkaloid isolated from *Nerine sarniensis*, an indigenous South African Amaryllidaceae, with larvicidal and adulticidal activities against *Aedes aegypti*. *Fitoterapia*, 116, 34-38.
50. Masi, M., Mubaiwa, B., Mabank, T., karakoyun, Ç., Cimmino, A., Van Otterlo, W.A.L., Green, I.R., Evidente, A. (2018). Alkaloids isolated from indigenous South African Amaryllidaceae: *Crinum buphanoides* (Welw. ex Baker), *Crinum graminicola* (I. Verd.), *Cyrtanthus mackenii* (Hook. f) and *Brunsvigia grandiflora* (Lindl). *South African Journal of Botany*, 118, 188-191.
51. Minga, D., Ulloa, C., Oleas, N., Verdugo, A. (2015). A new species of *Phaedranassa* (Amaryllidaceae) from Ecuador. *Phytotaxa*, 192(1), 050-053.
52. Ministerio de Salud y Protección Social. (2011). 33 mil personas al año mueren de Cáncer en Colombia. Recuperado de <https://www.minsalud.gov.co/salud/publica/Paginas/salud-publica.aspx>
53. Morales, L., García, C. (2000). Metodología para la evaluación del potencial insecticida de especies forestales. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 53(1), 787-800.
54. Mroczek, T. (2016). Qualitative and quantitative two-dimensional thin-layer chromatography/high performance liquid chromatography/diode-array/electrospray-ionization-time-off light mass spectrometry cholinesterase inhibitors. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 129, 155-162.
55. Muñoz, D., Guerrero, N. (2013). *Allium test* para evaluar el efecto citotóxico y genotóxico de extractos naturales en células meristemáticas de *Allium cepa*. *Memorias*, 11(19), 83-86.

56. Muthukrishnan, S., Senthil, T., Rao, M. (2017). Anticancer activity of biogenic nanosilver and its toxicity assessment on *Artemia salina*- evaluation of mortality, accumulation and elimination: An experimental report. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5, 1685-1695.
57. Nair, J., van Staden, J. (2013). Pharmacological and toxicological insights to the South African Amaryllidaceae. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 262-275.
58. Nair, J., Wilhelm, A., Bonnet, S., van Staden, J. (2017). Antibacterial constituents of the plant family Amaryllidaceae. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27, 4943-4951.
59. Osorio, E. J., Berkov, S., Brun, R., Codina, C., Viladomat, F., Cabezas, F., Bastida, J. (2010). *In vitro* antiprotozoal activity of alkaloids from *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae). *Phytochemistry Letters*, 3, 161-163.
60. Pereañez, J., Jiménez, S., Quintana, J., Nuñez, V., Fernández, M., Restrepo, Y. (2008). Inhibición de las actividades proteolítica, coagulante y hemolítica indirecta inducidas por el veneno de *Bothrops asper* por extractos etanólicos de tres especies de heliconias. *VITAE*, 15(1), 157-164.
61. Pérez, N., Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología vegetal*, 11(4), 195-211.
62. Petruczynik, A., Misiurek, J., Tuzimski, T., Uszyński, R., Szymczak, G., Chernetsky, M., Waksmundzka-Hajnos, M. (2016). Comparison of different HPLC systems for analysis of galanthamine and lycorine in various species of Amaryllidaceae family. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 39(12), 574-579.
63. Pino, O., Lazzo, F. (2010). Ensayo de *Artemia*: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de protección vegetal*, 25(1), 34-43.
64. *Phaedranassa*. (2017). n/a. Recuperado de <https://www.pacificbulbsociety.org/pbswiki/index.php/Phaedranassa>

65. Pramanik, S., Dey, T., Mukherjee, A. (2019). Five benzoic acid derivatives: Crystallographic study using X-ray powder diffraction, electronic structure and molecular electrostatic potential calculation. *Journal of Molecular Structure*, 1175, 185-194.
66. Raghi, K., Sherin, D., Saumya, M., Arun, P., Sobha, V., Manojkumar, T. (2018). Computational Study of Molecular Electrostatic Potential, Docking and Dynamics Simulations of Gallic acid derivatives as ABL inhibitors. *Computational Biology and Chemistry*, 74, 239-246.
67. Rathore, A., Joshi, S. (2019). Liquid Chromatography | Historical Development. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, 86-92.
68. Regel, E. (s.f.). *Phaedranassa lehmannii* Regel. Recuperado de <http://www.tropicos.org/Name/1202421>
69. Ren, Z., Guo, M., Cheng, Y., Wang, Y., Sun, W., Zhang, H., Dong, M., Li, G. (2018). A review of the development and application of space miniature mass spectrometers. *Vacuum*, 155, 108-117.
70. Rondón, M., Moncayo, S., Cornejo, X., Santos, J., Villalta, D., Siguencia, R., Duche, J. (2018). Preliminary phytochemical screening, total phenolic content and antibacterial activity of thirteen native species from Guayas province Ecuador. *Journal of King Saud University – Science*, 30, 500-505.
71. Roy, M., Liang, L., Xiao, X., Feng, P., Ye, M., Liu, J. (2018). Lycorine: A prospective natural lead for anticancer drug discovery. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 107, 615-624.
72. Salama, W., Abdel, A., Fahmy, A. (2018). Rosemary leaves extract: Anti-snake action against Egyptian *Cerastes cerastes* venom. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 8(4), 465-475.
73. Saldarriaga, M., Otero, R., Núñez, V., Toro, F., Díaz, A., Gutiérrez, J. (2003). Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. *Toxicon*, 42, 405-411.

74. Sanabria, A., López, S., Gualdrón, R. (1997). Estudio Fitoquímico Preliminar y Letalidad sobre *Artemia salina* de Plantas Colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 26, 15-19.
75. Sánchez, L., Neira, A. (2005). Bioensayo general de letalidad en *artemia salina*, a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava*. L y *Psidium guineense*. Sw. *Cultura Científica*, 40-45.
76. Sandjo, L., Kuete, V. (2013). Triterpenes and Steroids from the Medicinal Plants of Africa. *Medicinal Plant Research in Africa*, 135-202.
77. Scherer, M., Sposito, J., Falco, W., Grisolia, A., Andrade, L., Lima, S., Machado, G., Nascimento, V., Gonçalves, D., Wender, H., Oliveira, S., Caires, A. (2019). Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles on meristematic cells of *Allium cepa* roots: A close analysis of particle size dependence. *Science of the Total Environment*, 660, 459-467.
78. Sepúlveda, G., Porta, H., Rocha, M. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 355-363.
79. Shirmohammadli, Y., Efhamisisi, D., Pizzi, A. (2018). Tannins as a sustainable raw material for green chemistry: A review. *Industrial Crops & Products*, 126, 316-332.
80. Sistema de Información ambiental de Colombia. (s.f). Biodiversidad en Colombia. Recuperado de <http://www.siac.gov.co/biodiversidad>
81. Sorgeloos, P., Lavens, P., Lè, P., Tackaert, w., Versichele, D. (1986). Manual para el cultivo y uso de *Artemia* en acuicultura. Recuperado de: <http://www.fao.org/tempref/FI/CDrom/aquaculture/a0845t/volume2/docrep/field/003/ab474s/AB474S00.htm#TOC>
82. Thakur, M., Bhattacharya, S., Khosla, P., Puri, S. (2019). Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 12, 1-12.

83. Timité, G., Mitaine, A., Miyamoto, T., Tanaka, C., Mirjolet, J., Duchamp, O., Lacaille, M. (2013). Structure and cytotoxicity of steroidal glycosides from *Allium schoenoprasum*. *Phytochemistry*, 88, 61-66.
84. Trujillo, L. M. (2015). Evaluación de la Actividad Antioxidante y Citotóxica del Extracto Etanólico, de las hojas y bulbos de *Phaedranassa dubia*, (amaryllidaceae) colectada en el Departamento del Cauca (Tesis de pregrado). Universidad del Cauca, Popayán, Colombia.
85. Universitat de les Illes Balears. (s.f.). Amaryllidaceae. Herbario Virtual del Mediterraneo Occidental. Recuperado de: <http://herbarivirtual.uib.es/casuv/familia/2602.html>
86. Vélez, S., Salazar, M., Acosta, H., Gómez, L., Rodríguez, A., Correa, D., Saldaña, J., Navarro, D., Lomonte, B., Otero, R., Gutiérrez, J. (2017). Geographical variability of the venoms of four populations of *Bothrops asper* from Panama: Toxicological analysis and neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon*, 132, 55-61.
87. Verhaeghe, T., Diels, L., de Vries, R., De Meulder, M., de Jong, J. (2003). Development and validation of a liquid chromatographic–tandem mass spectrometric method for the determination of galanthamine in human heparinised plasma. *Journal of Chromatography B*, 789, 337-346.
88. QIAN, X., ZHANG, Q., LU, X., YU, Q., NI, K., ZHANG, C., WANG, X. (2017). Development of Electrospray/Photoionization Miniature Ion Trap Mass Spectrometer. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 45(7), 1096-1101.
89. Yadav, A., Raj, A., Purchase, D., Ferreira, L., Saratale, G., Bharagava, R. (2019). Phytotoxicity, cytotoxicity and genotoxicity evaluation of organic and inorganic pollutants rich tannery wastewater from a Common Effluent Treatment Plant (CETP) in Unnao district, India using *Vigna radiata* and *Allium cepa*. *Chemosphere*, 224, 324-332.

90. Zhan, G., Zhou, J., Liu, T., Zheng, G., Aisa, H., Yao, G. (2016). Flavans with potential anti-inflammatory activities from *Zephyranthes candida*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26, 5967-5970.
91. Zhang, X., Huang, H., Liang, X., Huang, H., Dai, W., Shen, Y., Yan, S., Zhang, W. (2009). Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Crinum* by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23, 2903-2916.