

**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**

LINA MARCELA TRUJILLO CHACÓN

**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
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**

LINA MARCELA TRUJILLO CHACÓN

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

Director

FABIO ANTONIO CABEZAS FAJARDO. Ph.D.
PROFESOR TITULAR DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Asesor

JUAN CARLOS ARGOTI BURBANO. Ph.D.
PROFESOR TITULAR DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Asesor

OSCAR DARÍO BERMÚDEZ ZAMBRANO. M.Sc.
PROFESOR DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

**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
2015**

Nota de aceptación

Director

Fabio Antonio Cabezas Fajardo Ph. D.

Jurado

Edier Humberto Pérez Ph. D.

Jurado

René Zúñiga MS.c.

Popayán, 21 de Abril de 2015

Dedicatoria

A Dios.

Por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida. Por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorarte cada día más.

A mi Madre.

Quien día a día me ha enseñado que con esfuerzo y responsabilidad todo se puede lograr, y que en la vida los obstáculos que se presentan hay que superarlos.

A mi Padre

Que desde el cielo siempre ilumina mi camino y quien hoy sería el hombre más feliz del mundo en verme triunfar.

A mi director

Quien me enseñó que cuando se cierra una puerta es porque se van abrir dos.

“Hay que disparar bien arriba para que en caso de fallar podamos quedar entre las estrellas”. (Raúl Cuero)

Agradecimientos

En primer lugar, hoy doy gracias a Dios y a mi director, quien ha sido la persona que me ha impulsado para poder cumplir con este propósito.

Al M.Sc. Oscar Darío Bermúdez Zambrano, por su inmensa colaboración y disposición para el cuidado del material vegetal.

Al Dr. Juan Carlos Argoti Burbano, por su tiempo y disposición en la asesoría sobre los métodos de actividad antioxidante.

Al Dr. Víctor Campo, por su asesoría en cuanto a los ensayos de actividad citotóxica, y por siempre estar dispuesto a colaborar en el desarrollo de estos.

A la M.Sc. Isabel Bravo Realpe, por contribuir en mi formación profesional y personal, además de su incondicional apoyo y sus buenos consejos.

Al Dr. Germán Cuervo Ochoa por facilitarme la Unidad de Análisis Industriales, para el análisis UV-vis de algunos de los ensayos.

Al Dr. Bernardo Ramírez, por clasificar la especie estudiada.

A la Universidad del Cauca por la formación profesional.

A los profesores del departamento de Química de la Universidad del Cauca, por contribuir en mi formación personal y profesionalmente.

Al grupo del Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos de la Facultad Salud, Departamento de Farmacia, Universidad de Brasilia, especialmente a la Dra. Damaris Silveira por recibirme en su laboratorio siendo estudiante de pregrado y abrirme las puertas en el mundo de las Enzimas.

Al grupo del laboratorio de Productos Naturales, Biología Vegetal y Edafología, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, especialmente a la Doctora Laura Torras Clavería, y a los Doctores Jaume Bastida, Carles Codina y Francesc Viladomat, Por realizar el análisis de la metabolómica en su laboratorio.

A la Universidad del Cauca a través de la Vicerrectoría de Investigaciones, por la financiación aportada para realizar parte de este proyecto.

A mis compañeros del laboratorio de Química en Compuestos Bioactivos por todos los momentos compartidos, incluyendo Risas, Tortas, Almuerzos, etc. Anuar Ferney Caldón Quirá, Edwin Rolando Valencia Angulo, Diana Isabel Correa, Ximena Prieto, Daira Ipaz, Mary Edilma López, Norma Galindez, Elizabeth Flor de María Betancur, Alejandra Muñoz, Julieth Vanesa Bastidas, especialmente a Cristian Gasca Silva por recibirme en su casa durante mi estadía en Brasilia.

A los LMG (La Misma Gente) quienes fueron mis amigos de toda la carrera y aun lo siguen siendo; Cenayda López por todos los buenos consejos y por ser mi madre adoptiva, Norma Oliva Galíndez, Lucy Catherine Daza, Diana Katherine Prado, Omar Miguel Portilla, Misael Córdoba, Edwin Rolando Valencia, Sebastián Elvira y Katherine Alegría, Por todas esas locuras, congresos y paseos, risas, rumbas, y sobre todo por siempre estar en las buenas y las malas.

Finalmente, uno de los agradecimientos más especiales es el que va dirigido a mi familia, mi madre Oliva Chacón Acosta, mi tío Jaime Chacón Acosta, mi abuela Carmen Alicia Acosta, a mis hermanos Andrés Felipe Lima Chacón y José Luis Trujillo Chacón, Siempre presentes, por darme las raíces que me sostienen y los valores para caminar por la vida.

A todos ellos, a mis amigos, a los amigos de siempre, y también a aquellos que pasaron algún tiempo atrás siendo partícipes de que hoy esté aquí....**¡GRACIAS!**

CONTENIDO

RESUMEN.....	15
ABSTRACT	17
1. INTRODUCCIÓN	18
2. MARCO TEÓRICO	20
2.1. Familia Amaryllidaceae.....	20
2.2. Metabolitos de interés.....	21
2.2.1. Compuestos fenólicos.....	21
2.2.2. Antioxidantes.....	24
2.2.3. Radicales libres y especies reactivas de oxígeno.....	25
2.2.4. Métodos de evaluación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i>	26
2.2.5. Alcaloides	28
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
4. JUSTIFICACIÓN	36
5. OBJETIVOS.....	37
5.1. Objetivo general.....	37
5.2. Objetivos específicos	37
6. MATERIALES Y METODOS	38
6.1. Material vegetal.....	38
6.2. Propagación y conservación del material vegetal	38
6.3. Reactivos	39
6.4. Extracción por el método Soxhlet.....	40
6.5. Tamizaje fitoquímico	40
6.6. Fraccionamiento mediante extracción Líquido-Líquido.....	42
6.7. Actividad antioxidante.....	44
6.7.1. Determinación del contenido de fenoles totales mediante el método Folin-Ciocalteu (F-C).....	44
6.7.2. Evaluación de la actividad antioxidante mediante el ensayo del radical libre DPPH·.....	44
6.7.3. Evaluación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo del catión radical ABTS ⁺	45
6.8. Análisis estadístico	46
6.9. Actividad citotóxica	46
6.10. Actividad enzimática	47
6.10.1. Determinación de la actividad de inhibición sobre acetilcolinesterasa.....	47

6.10.2.	Determinación de la actividad de inhibición sobre hialuronidasa ...	48
6.10.3.	Determinación de la actividad de inhibición sobre tirosinasa	49
6.10.4.	Determinación de la actividad de inhibición sobre α -glucosidasa....	49
6.10.5.	Determinación de la actividad de inhibición sobre α -amilasa	50
6.11.	Perfil cromatográfico.....	51
6.11.1.	Determinación de compuestos nitrogenados por CG/EM.....	51
6.11.2.	Determinación de compuestos fenólicos por CLAR-DAD	51
6.11.3.	Determinación de azúcares libres por CLAR-IR.....	52
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
7.1.	Tamizaje fitoquímico y extracción	53
7.2.	Actividad antioxidante.....	55
7.2.1.	Contenido de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu.....	55
7.2.2.	Actividad antioxidante determinada por el método del 1,1-difenil-2- picril-hidrazilo (DPPH)	58
7.2.3.	Actividad antioxidante determinada por el método del 1,1-difenil-2- picril-hidrazilo (ABTS ⁺).	60
7.2.4.	Correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales.....	62
7.3.	Actividad citotóxica del extracto etanólico total proveniente de hojas y bulbos de <i>P. dubia</i> determinada mediante bioensayo con <i>Artemia salina</i> ...	62
7.4.	Actividad de inhibición enzimática	65
7.4.1.	Actividad de inhibición sobre la acetilcolinesterasa	65
7.4.2.	Actividad de inhibición sobre la hialuronidasa.....	67
7.4.3.	Actividad de inhibición sobre la tirosinasa.....	69
7.4.4.	Actividad de inhibición sobre la α -amilasa.....	69
7.4.5.	Actividad de inhibición sobre la α -glucosidasa	70
7.5.	Compuestos nitrogenados cuantificados por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM).....	70
7.6.	Cuantificación de azúcares libres por (CLAR/IR) y (CG/EM).	71
7.7.	Cuantificación de compuestos fenólicos en el extracto etanólico total de hojas y bulbos de <i>P. dubia</i> por CLAR-DAD.	73
8.	CONCLUSIONES	75
9.	RECOMENDACIONES	77
10.	BIBLIOGRAFÍA	89

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

A	Absorbancia
ÁA	Ácido ascórbico
ABTS	2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato
Ac	Acuosa
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AChE	Acetilcolinesterasa
ARN	Ácido Ribonucleico
BHT	Butilhidroxitolueno
BuOH	Butanol
CL₅₀	Concentración letal 50
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
CG	Cromatografía de gases
CG/EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CV	Coeficiente de variación
DAD	Detector de Arreglo de Diodos
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfoxido
DNS	Ácido dinitrosalicílico
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidracilo
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico
EA	Enfermedad de Alzheimer
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EC₅₀	Concentración necesaria para inhibir el 50 %
ELL	Extracción Líquido-Líquido
EM	Espectrometría de masas
eq	Equivalente
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ETT	Extracto etanólico total
ES	Extracto seco
FC	Folin Ciocalteu
FRAP	Análisis del poder reductor férrico/antioxidante
g	Gramos
Hex	Hexano
IC₅₀	Concentración capaz de inhibir 50 % de la actividad máxima
IR	Índice de refracción
MeOH	Metanol
Mo	Molibdeno
mL	mililitro
mg	miligramos
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
NR	No realizado
NI	No identificado
ORAC	Capacidad de Absorbancia de los Radicales Libres de Oxígeno
·OH	Radical hidroxilo

P	Significancia
PBS	Solución de buffer fosfatos
PI	Porcentaje de inhibición
QCB	Química de Compuestos Bioactivos
ppm	Partes por millón
RL	Radical libre
R_f	Retención de frente
r²	Coefficiente de correlación
SD	Desviación Estándar
TEAC	Capacidad antioxidante en equivalentes Trólox
Trólox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
TPC	Contenido de fenoles totales
UV	Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta-Visible
%AA	Porcentaje de actividad antioxidante
α-T	Tocoferol
pNP	p-nitrofenol
pNPG	p-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo
μL	microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotos de la especie <i>Phaedranassa dubia</i>	19
Figura 2. Flores de diferentes especies de la familia Amaryllidaceae	20
Figura 3. Geodistribución mundial de especies de Amaryllidaceae	21
Figura 4. Estructura química de compuestos fenólicos.....	22
Figura 5. Estructura química del ácido clorogénico.....	23
Figura 6. Estructura química de epicatequina.....	23
Figura 7. Proceso antiradicalario de las moléculas antioxidantes.....	24
Figura 8. Esqueleto de los tipos de alcaloides de Amaryllidaceae	29
Figura 9. Estructura química de Galantamina.....	30
Figura 10. Estructura química de Sanguinina	30
Figura 11. Estructura química de licorina (a) y pseudolicorina (b).....	31
Figura 12. Estructura del ácido hialurónico.....	32
Figura 13. Distribución geográfica de <i>P. dubia</i>	38
Figura 14. Propagación de la especie <i>P. dubia</i>	39
Figura 15. Fraccionamiento del extracto etanólico de hojas y bulbos de <i>P. dubia</i>	43
Figura 16. Porcentajes de extracción del extracto etanólico total (EET) y las subfracciones obtenidas de las hojas y bulbos de <i>P. dubia</i>	53
Figura 17. Valores de absorbancia determinados para ácido gálico en diferentes concentraciones.....	55
Figura 18. TPC (mg EAG/g ES) determinados a una concentración de 1000 ppm para el extracto etanólico total (ETT) de hojas y bulbos de <i>P. dubia</i> , obtenidos mediante el método Folin-Ciocalteu.....	57
Figura 19. Valores de absorbancia determinados para trólox en diferentes concentraciones para DPPH•.....	58
Figura 20. TEAC (μmol trolox/g ES) a una concentración de 730 ppm para el extracto etanólico total (ETT) y las fracciones de Hojas y Bulbos de <i>P. dubia</i> , obtenidos mediante el método DPPH•.....	59
Figura 21. Valores de absorbancia determinados para trólox en diferentes concentraciones para ABTS ⁺	60
Figura 22. TEAC (μmol trolox/g ES) a una concentración de 745 ppm para el extracto etanólico total (ETT) y las fracciones de Hojas y Bulbos de <i>P. dubia</i> , obtenidos mediante el método ABTS ⁺	61
Figura 23. Toxicidad aguda y crónica del extracto etanólico total de bulbos y hojas de <i>P. dubia</i> , obtenida mediante el bioensayo de <i>A. salina</i> ...	64
Figura 24. Porcentaje de inhibición enzimática del extracto etanólico total de hojas y bulbos de <i>P. dubia</i> evaluado a diferentes concentraciones, sobre la enzima acetilcolinesterasa asociada a la enfermedad de Alzheimer.	65
Figura 25. Inhibición enzimática sobre acetilcolinesterasa expresada como IC ₅₀ para el extracto etanólico total de hojas y bulbos de <i>P. dubia</i> , comparada con el estándar de eserina.....	67
Figura 26. Porcentaje de inhibición enzimática del extracto etanólico total de hojas y bulbos de <i>P. dubia</i> evaluado a diferentes concentraciones, sobre la enzima hialuronidasa asociada a problemas de envejecimiento....	68

Figura 27. Inhibición enzimática sobre hialuronidasa (HA) expresada como IC ₅₀ para el extracto etanólico total de hojas y bulbos de <i>P. dubia</i> , comparada con el estándar de ácido tánico.....	69
Figura 28. Espectros de absorción UV-VIS entre 200 y 400 nm de los compuestos fenolicos identificados preliminarmente por la técnica CLAR-DAD en hojas y bulbos de <i>P. dubia</i>	74

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de antioxidantes según el modo de acción.....	24
Tabla 2. Especies fisiológicas reactivas del oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERN).....	26
Tabla 3. Clasificación de los modelos de ensayo <i>in vitro</i> según su modo de reacción ET o HAT.....	27
Tabla 4. Estados clínicos de la enfermedad de Alzheimer.....	32
Tabla 5. Métodos empleados para la identificación de metabolitos secundarios en la especie <i>P. dubia</i>	41
Tabla 6. Gradiente de elución para el análisis por CLAR-DAD.....	52
Tabla 7. Compuestos presentes en el extracto etanólico proveniente de hojas y bulbos de <i>P. dubia</i> determinados por tamizaje fitoquímico de acuerdo a la metodología propuesta por Domínguez.....	54
Tabla 8. Contenido de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu y actividad antioxidante estimada mediante los métodos DPPH· y ABTS ⁺ en el extracto etanólico total y diferentes fracciones provenientes de hojas y bulbos de <i>P. dubia</i>	56
Tabla 9. Clasificación toxicidad según CYTED	63
Tabla 10. Actividad citotóxica del extracto etanólico total (ETT) de bulbos y hojas de <i>P. dubia</i> , obtenida por el método de <i>A. salina</i>	63
Tabla 11. Porcentaje de inhibición y concentración en el cual el porcentaje de inhibición es del 50% (CL ₅₀) del extracto etanólico total de hojas y bulbos de <i>P. dubia</i> sobre diferentes enzimas.....	66
Tabla 12. Compuestos nitrogenados (Alcaloides) obtenidos en el extracto metanólico total de hojas y bulbos de <i>P. dubia</i> mediante CG/EM.....	71
Tabla 13. Azúcares libres presentes en el extracto etanólico total de bulbos de <i>P. dubia</i> cuantificados por CLAR/IR y CG/EM.....	72
Tabla 14. Azúcares libres determinados en el extracto etanólico de hojas de <i>P. dubia</i> por CLAR/DAD y CG/EM.....	72
Tabla 15. Compuestos fenólicos en el extracto etanólico total de bulbos y hojas de <i>P. dubia</i> cuantificados por CLAR/DAD.....	73

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Tamizaje fitoquímico.....	78
Anexo 2. Actividad antioxidante.....	82
Anexo 3. Actividad enzimática.....	85
Anexo 4. Actividad citotóxica.....	87
Anexo 5. Perfil cromatográfico	88

RESUMEN

La familia **Amaryllidaceae** es un grupo de plantas poco estudiadas en Colombia. Debido a esto se han creado muchas expectativas, ya que estudios realizados como la actividad antiprotozoal ha mostrado una marcada actividad biológica de algunos de sus metabolitos secundarios, en especial los alcaloides, los cuales han mostrado actividad antiviral, antitumoral e inhibitoria de la acetilcolinesterasa, enzima asociada a la enfermedad de Alzheimer.

En este trabajo se evaluó la actividad antioxidante, enzimática y citotóxica *in vitro* de los extractos etanólicos totales de hojas y bulbos de *P. dubia*; además se caracterizó por medio de un perfil cromatográfico el tipo de compuestos nitrogenados, fenólicos y azúcares libres presentes en dichos extractos.

Las hojas y bulbos fueron recolectadas en el Departamento del Cauca; se les realizó una extracción Soxhlet y se evaluó su actividad antioxidante por medio de dos modelos *in vitro*, DPPH• y ABTS^{•+}; empleando como estándar o control positivo ácido ascórbico, tocoferol y BHT. La inhibición de la actividad enzimática se determinó para las enzimas acetilcolinesterasa, hialuronidasa, tirosinasa, α -glucosidasa y α -amilasa; utilizando como control positivo eserina, ácido tánico, ácido kojico y ascarbosa, respectivamente. La actividad citotóxica se determinó mediante bioensayo con *A. salina*. Además, se cuantificó mediante un perfil cromatográfico compuestos fenólicos por CLAR/DAD y contenido de compuestos nitrogenados por CG/EM.

Los extractos etanólicos totales y las subfracciones evaluadas por los métodos DPPH• y ABTS^{•+} presentaron un porcentaje de actividad antioxidante superior al 20%, encontrándose que para los dos métodos, en las hojas la fracción butanólica (81,675 % y 71,345 %) presentó un porcentaje de actividad antioxidante mayor comparada con la fracción de hexano, diclorometano, acetato de etilo, etanol y agua, esta actividad se corroboró con el contenido de fenoles totales, estableciendo que la fracción de butanol (152,00 mg ácido gálico/g extracto seco) es la que posee un mayor contenido de compuestos fenólicos totales y por tanto mayor actividad antioxidante. En el caso de los bulbos, existe alguna discrepancia entre los resultados obtenidos por los dos métodos, ya que la fracción que presentó mayor actividad antioxidante por el método DPPH•, fue la fracción de hexano (80,462 %) y por el método ABTS^{•+} la fracción butanólica (58,322%), empleando el método de Folin-Ciocalteu se confirmó que la fracción butanólica (121,43 mg ácido gálico/g extracto seco) es la que presenta mayor actividad antioxidante. En la actividad citotóxica se encontró que para las hojas y bulbos la toxicidad crónica (EC₅₀ 34,418 y 25,210) es altamente tóxica. En cuanto al perfil cromatográfico obtenido por CG/EM se encontraron varios tipos de alcaloides típicos de la familia **Amaryllidaceae**, en los bulbos se hallaron galantamina, y sanguinina, licorina, pseudolicorina, 8-*O*-dimetilmartidina y diacetylcantabricina, mientras que en las hojas solo se encontraron galantamina y sanguinina. Por CLAR/DAD se obtuvieron dos tipos compuestos fenólicos, en las hojas ácido clorogénico y en los bulbos epicatequina. En la inhibición de actividad enzimática, los resultados fueron muy favorables, ya que el extracto etanólico de

hojas y bulbos de *Phaedranassa dubia*, presento inhibición sobre Acetilcolinesterasa (64,091 % y 63,670 %), enzima asociada a la enfermedad de Alzheimer, además de presentar inhibición sobre Hialuronidasa (59,016 % y 33,115 %), enzima asociada a procesos de envejecimiento, en cuanto a Tirosinasa, α -Glucosidasa y α -Amilasa no se observó inhibición.

Palabras clave: *Amaryllidaceae*, *Phaedranassa dubia*, Alzheimer, Acetilcolinesterasa, Hialuronidasa, DPPH \cdot , ABTS $^{+\cdot}$, *Artemia salina*.

ABSTRACT

The Amaryllidaceae family is a little-studied group of plants in Colombia. Because of this it has created many expectations, since studies as antiprotozoal activity has shown a marked biological activity of some secondary metabolites, especially the alkaloids, which have shown antiviral, antitumor and inhibitory activity of acetylcholinesterase, an enzyme associated with Alzheimer's disease.

In this paper the antioxidant, enzymatic and in vitro cytotoxic activity of total ethanol extracts of leaves and bulbs of *P. dubia* was assessed; its type nitrogenous compounds, phenols and free sugars present in such extracts were also characterized by a chromatographic profile.

The leaves and bulbs were collected in the Department of Cauca; underwent Soxhlet extraction and antioxidant activity was evaluated using two in vitro models DPPH· and ABTS⁺; using standard positive control or ascorbic acid, tocopherol and BHT. Inhibition of the enzymatic activity was determined for enzymes acetylcholinesterase, hyaluronidase, tyrosinase, α -glucosidase and α -amylase; used as positive control eserine, tannic acid, kojic acid and ascarbosa, respectively. The cytotoxic activity was determined by bioassay *A. salina*. It was further quantified chromatographic fingerprint phenolic compounds by HPLC/ DAD and content of nitrogen compounds by GC/MS.

Total ethanol extracts and subfractions evaluated by DPPH· and ABTS⁺ methods showed a higher percentage of antioxidant activity by 20%, found that the two methods, leaves the butanol fraction (81.675% and 71.345%) presented a percent higher antioxidant activity compared to the fraction of hexane, dichloromethane, ethyl acetate, ethanol and water, this activity is corroborated with the content of total phenols, stating that the butanol fraction (152.00 mg gallic acid / g dry extract) is the one with a higher content of total phenolic compounds and therefore higher antioxidant activity. In the case of bulbs, there is a discrepancy between the results obtained by the two methods, since the fraction showed higher antioxidant activity by DPPH· method was the hexane fraction (80.462%) and by the method ABTS⁺ the butanol fraction (58.322%) using the Folin-Ciocalteu method was confirmed that the butanol fraction (121.43 mg gallic acid / g dry extract) is the one with the highest antioxidant activity. In the cytotoxic activity was found that for bulbs leaves and chronic toxicity (EC₅₀ 34.418 and 25.210) is highly toxic. As the chromatographic profile obtained by GC/MS various types of typical alkaloids Amaryllidaceae family, the bulbs met galanthamine sanguinine, lycorine, pseudolycorine, 8-O-dimethylmaritidine and diacetylcantabricine were found, while in the leaves only galanthamine and sanguinine found. HPLC/DAD two phenolic compound types in chlorogenic acid in the leaves and bulbs epicatechin were obtained. On the inhibition of enzyme activity, results were very favorable, since the ethanol extract of leaves and bulbs *Phaedranassa dubia*, presented on acetylcholinesterase inhibition (64.091% and 63.670%), an enzyme associated with Alzheimer's disease, besides presenting inhibition on Hyaluronidase (59.016% and 33.115%), enzyme associated with aging processes regarding Tyrosinase, α -glucosidase and α -amylase no inhibition was observed.

Keywords: Amaryllidaceae, *Phaedranassa dubia*, Alzheimer, acetylcholinesterase, hyaluronidase, DPPH·, ABTS⁺, *Artemia salina*.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales son una alternativa para el tratamiento de enfermedades en numerosos pueblos del mundo, siendo el conocimiento de las propiedades medicinales de dichas plantas patrimonio ancestral y cultural de estos pueblos. Este conocimiento ha sido transmitido de generación en generación y ha sido fortaleciendo a partir de observaciones y experimentación.

Por esto es importante la contribución en la validación del conocimiento sobre formulaciones que incorporen ingredientes activos provenientes de plantas medicinales, así como procesos y procedimientos de pre-tratamiento para emplear este material natural. Por otro lado, también es trascendental el poder proporcionar un valor agregado a las plantas utilizadas en la medicina tradicional, al obtener formulas efectivas y económicas que pueden ser comercializadas a nivel nacional e internacional, y que a su vez constituyan una alternativa de ingreso económico para la comunidad.

En los últimos años el interés por los antioxidantes naturales se ha incrementado dramáticamente, debido principalmente a tres razones(1):

- La baja seguridad que ofrece el consumo de antioxidantes sintéticos.
- La eficacia antioxidante de una variedad de agentes fitoquímicos.
- La idea generalizada de que el consumo de ciertos agentes fitoquímicos pueden atenuar la patología de las enfermedades crónicas y el proceso de envejecimiento; además, la creencia de que los compuestos naturales son más seguros que los compuestos sintéticos y por consiguiente son comercialmente más aceptados.

Amaryllidaceae constituye una familia botánica ampliamente distribuida, con poblaciones representativas en los géneros *Phaedranassa*, *Sprekelia*, *Hymenocallis*, *Zephyranthes*, *Hippeastrum* y *Crinum*. Se presenta distribución restringida de *Eucharis* y endemismo de *Caliphruria*, considerándose estos dos últimos géneros en vía de extinción(2), por lo cual es importante utilizar técnicas de propagación de plantas bulbosas, buscando la conservación de los géneros mencionados.

A nivel mundial, las especies del género *Phaedranassa* son importantes exponentes de la familia **Amaryllidaceae**, que incluye once especies, las cuales se encuentran en Ecuador (*P. brevifolia*, *P. cinerea*, *P. dubia*, *P. glauciflora*, *P. lehmanni*, *P. schizantha*, *P. tunguraguae*, *P. viridiflora*), Colombia (*P. carmiolii*, *P. dubia*, *P. schizantha* y *P. ventricosa*), Costa Rica (*P. carmiolii*), y Perú (*P. megistophylla*) (3). Son especies en gran parte de montaña, crecen en áreas perturbadas, con frecuencia colonizan cortes de carretera, y por lo general florecen después de la temporada de verano seco en sus países de origen. *P. dubia* (figura 1) puede cultivarse con éxito en una amplia gama de hábitats ya sea para fines ornamentales o para uso medicinal.



Bulbo



Hoja



Flor

Figura 1. Fotos de la especie *Phaedranassa dubia*

Fuente: Fotos tomadas por el Profesor Oscar Darío Bermúdez, Popayán, Cauca.

- **Clasificación taxonómica de la especie estudiada**

Información según el sistema de clasificación APG3, a la especie estudiada le corresponde la siguiente posición taxonómica:

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht

Superorden: Lillanae Takht

Orden: Asparagales Link

Familia: Amaryllidaceae J. St.-Hil.

Género: *Phaedranassa*

Especie: *P. dubia*

En la especie *P. dubia* se han identificado los alcaloides fenadramina, pseudolicorina, sanguinina, galantamina, epinorgalantamina, hemantamina, ungeremina y zefbetaina (4). Estas moléculas presentan actividad antimalárica, antitumoral, antiviral, citotóxica, antiinflamatoria e inmunoestimuladora; y además, inhiben la acetilcolinesterasa. De todas ellas, se destaca la actividad antimalárica correspondiente al alcaloide ungeremina. Por otro lado, la galantamina es usada en el tratamiento de la enfermedad Alzheimer mostrando una gran eficacia. Todo esto muestra la importancia del estudio de los alcaloides presentes en las Amaryllidaceae (5).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Familia Amaryllidaceae

Las plantas de la familia **Amaryllidaceae**, son hierbas perennes y bulbosas que suelen presentar flores llamativas (figura 2), lo que les proporciona valor ornamental. Se han reconocido 50 géneros, y alrededor de 800 especies que se hallan distribuidas por todo el mundo(6).

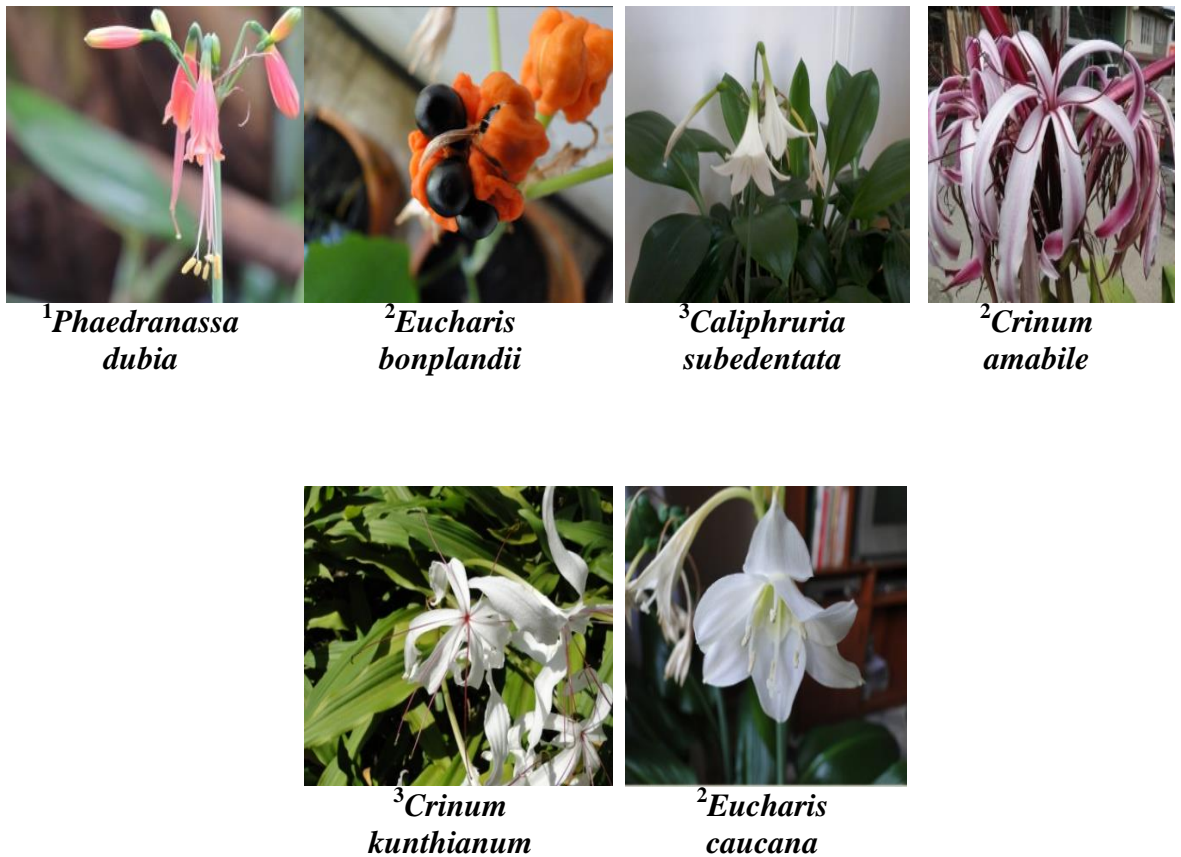


Figura 2. Flores de diferentes especies de la familia **Amaryllidaceae**.

Fuente: ¹Tomada por Oscar Darío Bermúdez Zambrano, Popayán, Cauca. ²Tomada por Philip Silverstone, Cali, Valle. ³Tomada por Fabio Antonio Cabezas Fajardo, Cali, Valle.

Su distribución geográfica es variada, localizándose principalmente en los trópicos, siendo los centros principales de distribución (figura 3): América del Sur, Sur de África, la región mediterránea y el Cáucaso. Además, se puede hallar algunas especies en Australia (7).

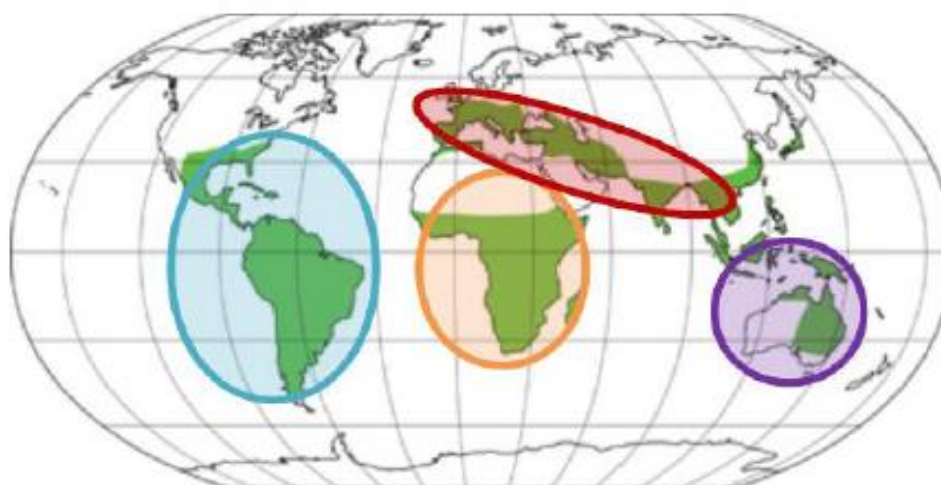


Figura 3. Geodistribución mundial de especies de **Amaryllidaceae** (8).

Dado que numerosas especies de este grupo son endémicas y muy vulnerables, existe la necesidad de promover su conservación y mejorar el conocimiento existente sobre las mismas.

El gran interés en el estudio de esta familia botánica (**Amaryllidaceae**), se debe al alto contenido de alcaloides que presentan diferentes especies de esta, además de su aplicabilidad que muchos de estos poseen, especialmente en el ámbito de la farmacología, debido a su amplio rango de actividades biológicas, que incluyen, entre otras, propiedades antivirales, antitumorales y antiparasitarias (9). De hecho, estas plantas han sido utilizadas como plantas medicinales durante miles de años.

En la actualidad, uno de los compuestos más interesantes del grupo de alcaloides es la galantamina, un inhibidor potente, reversible y competitivo de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), aprobado y comercializado para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Reminyl®, Razadyne®).

2.2. Metabolitos de interés

2.2.1. Compuestos fenólicos

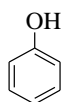
Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos de antioxidantes naturales más abundantes y ampliamente distribuidos del reino vegetal, con más de 8000 estructuras fenólicas conocidas (10). Son productos del metabolismo secundario de las plantas y se encuentran en raíces, tallos, hojas y frutos donde desarrollan funciones diversas que abarcan desde la protección frente a influencias externas (radiación UV, herbivoría, ataques fúngicos y víricos), mecanismos de polinización, olor, color y tolerancia al frío (11, 12). Los animales no son capaces de sintetizar este tipo de compuestos, así que dependen fundamentalmente de la ingesta de productos de origen vegetal para incorporar estas sustancias al organismo.

- **Estructura y clasificación**

Desde el punto de vista químico, los compuestos fenólicos se caracterizan por contener un anillo aromático unido a dos o más grupos hidroxilo (figura 4).

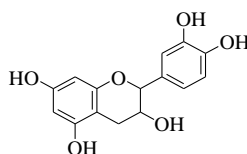
La estructura de los compuestos fenólicos varía de moléculas simples, como los ácidos fenólicos, a estructuras complejas, como los taninos condensados. Se clasifican en cuatro familias en función del número de anillos fenólicos y de los elementos estructurales unidos a esos anillos (13): flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos y lignanos (figura 4).

Compuesto fenólico



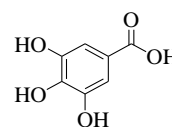
Grupo fenol

Flavonoides



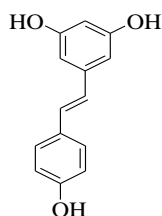
Catequina

Ácidos fenólicos



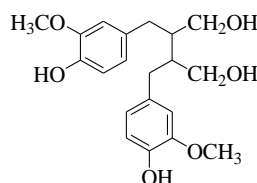
Ácido gálico

Estilbenos



Resveratrol

Lignanos



Secoisolariciresinol

Figura 4. Estructura química de compuestos fenólicos.

- **Actividad biológica de los compuestos fenólicos**

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se basa en su capacidad secuestradora de radicales libres y de quelación de metales (14). Su estructura química es la ideal para reaccionar con los radicales libres y formar un radical intermedio más estable y menos reactivo, ya que la presencia de anillos aromáticos y grupos hidroxilo permite que se deslocalicen los electrones (15).

Además de sus propiedades antioxidantes, los compuestos fenólicos poseen otras actividades biológicas como propiedades antimicrobianas y antimutagénicas (16), efectos antiinflamatorios (17); se ha descrito que poseen actividad anticarcinogénica (18, 19), actividad anti VIH y actúan como protectores frente a la peroxidación lipídica en los glóbulos rojos (14).

Especialmente a los flavonoides se les ha asociado con la acción antiinflamatoria, debido a sus efectos antioxidantes y a su capacidad de actuar contra las histaminas y otros mediadores de los procesos inflamatorios como son las prostaglandinas y los leucotrienos. Aunque los flavonoides tienen muchas propiedades comunes, algunos de ellos presentan propiedades específicas como inhibición al crecimiento de tumores (20).

Entre los metabolitos con potente acción antirradicalaria, se destacan los siguientes antioxidantes naturales:

- **Ácido clorogénico**

El ácido clorogénico (figura 5), también llamado ácido 3-cafeoil-D-quinico, es un éster entre el ácido quínico y el ácido cafeico y es uno de los compuestos fenólicos mayoritarios presentes en frutas y vegetales. Se encuentra mayoritariamente en las semillas de café y en las hojas de tabaco. Al igual que otros compuestos fenólicos dietarios el ácido clorogénico presenta propiedades antioxidantes y también presenta actividad anti-VIH, anticancerígena, antialérgica, entre otras. Los estudios in vitro sugieren que este compuesto elimina radicales generados en fase acuosa, e inhibe el daño al ADN (21).

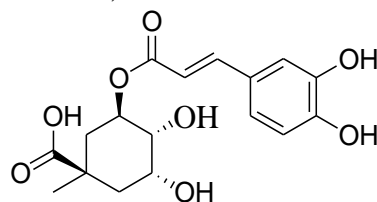


Figura 5. Estructura química del ácido clorogénico

- **Epicatequina**

Epicatequina (figura 6), nombrada como 2H-1-benzopirán-3,5,7-triol, 2 (3,4-dihidroxifenil) - 3,4-dihidro-, (2R, 3R), un flavanol que se encuentra abundantemente en el cacao, al que se le han demostrado efectos antioxidantes. En la actualidad la epicatequina no se le ha encontrado efectos adversos o algún problema que éste mismo ocasiona. Este flavanol lo podemos encontrar en varios alimentos aparte del chocolate como es el té, vino tinto, bayas, cebolla, entre otros.

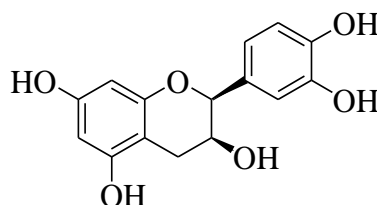


Figura 6. Estructura química de epicatequina

2.2.2. Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias capaces de prevenir, detener o retardar determinadas reacciones de oxidación, protegiendo las moléculas biológicas de las agresiones oxidativas.

- **Actividad antiradicalaria**

Los antioxidantes pueden actuar en los diferentes procesos de la secuencia oxidativa y tener más de un mecanismo de acción. Para que un antioxidante (AH) tenga actividad antiradicalaria debe cumplir una característica básica que es generar un radical más estable y menos dañino (RH) después de reaccionar con la especie radical (R·). Esta reacción se basa en una transición redox en la que está implicada la donación de un electrón (o un átomo de hidrógeno) a la especie radicalaria (figura 7). Como resultado de esta transferencia, se formará un radical derivado del antioxidante (A·) que puede tener carácter inerte, estable o presentar cierta reactividad (22).

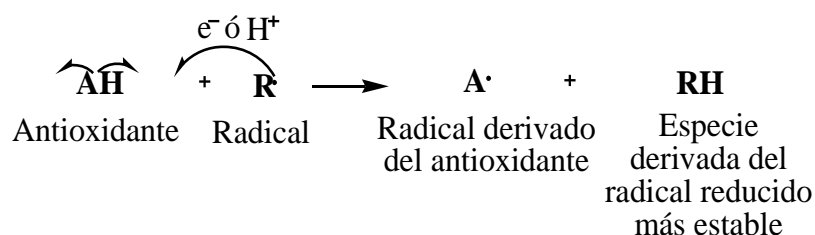


Figura 7. Proceso antiradicalario de las moléculas antioxidantes.

Los antioxidantes presentes en frutas y verduras protegen la salud del cuerpo disminuyendo los efectos de las ERO (23), mediante la prevención del ataque de los radicales libres a las macromoléculas ya que tienen capacidad preferencial de oxidación. Estos compuestos antioxidantes pueden inhibir o retardar la oxidación de dos formas (tabla 1): captando radicales libres primarios o por mecanismos que no estén relacionados con la captación de radicales libres secundarios (24).

Tabla 1. Clasificación de antioxidantes según el modo de acción.

Primarios	Impiden la formación de radicales libres, frenan la reacción en cadena de los radicales libres, especialmente de las especies reactivas del oxígeno (ERO) o son quelantes de metales de transición. Se comportan como captadores de estos ERO.
Secundarios	Interrumpen la reacción de propagación de los radicales libres o desplazan las especies reactivas del oxígeno (ácido ascórbico, carotenoides, glutatión y la mayoría de las enzimas antioxidantes).
Terciarios	Reparan el daño causado por los radicales libres a las moléculas

Los antioxidantes se caracterizan por ser muy heterogéneos, pueden ser hidrosolubles y liposolubles, localizarse intra y extracelularmente, y proceder de diferentes fuentes ya que algunos son nutrientes o proceden de éstos y otros son productos del metabolismo.

Entre los compuestos que pueden actuar como antioxidantes se encuentran vitaminas C y E, carotenoides, antocianinas, flavonoides y otros compuestos fenólicos (25-27). Muchos de estos antioxidantes son lipofílicos y particularmente importantes en la oxidación de lípidos en todos los sistemas, así como otros radicales que son muy activos fisiológicamente(28). A través de efectos aditivos y de sinergia, los compuestos con actividad antioxidante presentes en frutas y verduras pueden proporcionar mejor protección contra ERO que un solo compuesto (23).

- **Estrés oxidativo.**

En los seres vivos existe un equilibrio interno entre la producción de radicales libres y la acción de los antioxidantes. ¿Qué sucede si esta balanza se desequilibra? Cuando la agresión supera las defensas se habla de *estrés oxidativo*, es decir, el balance oxidativo entre la producción de radicales libres y las defensas antioxidantes se rompe. Este estrés oxidativo puede darse tanto por un exceso de producción de RL y ERO como por un problema o alteración en el sistema de defensa antioxidante (22).

Si esto ocurre las especies reactivas generadas pueden iniciar procesos patológicos graves como diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares y promoción del envejecimiento (asociado a la acumulación de componentes celulares oxidados como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos). Actualmente se consideran un factor clave en el desarrollo de diversas enfermedades crónicas y desórdenes neurodegenerativos como el Alzheimer o el Parkinson (22).

2.2.3. Radicales libres y especies reactivas de oxígeno

Los radicales libres (RL) se definen como especies químicas que poseen uno o más electrones desapareados, lo cual las hace altamente inestables y reactivas. Para estabilizarse reaccionan rápidamente con moléculas adyacentes mediante reacciones de óxido-reducción.

El término especies reactivas del oxígeno (ERO) es un término colectivo que incluye radicales libres y ciertas especies no radicales que son oxidantes y/o se convierten fácilmente en radicales libres (tabla 2) (29).

Tabla 2. Especies fisiológicas reactivas del oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERN)

	ERO	Símbolo	ERN	Símbolo
Radicales	Superóxido	$O_2^{\cdot-}$	Óxido nítrico	NO^{\cdot}
	Hidroxilo	$\cdot OH$	Dióxido de nitrógeno	NO_2^{\cdot}
	Alcoxilo	RO^{\cdot}		
	Hidroperoxilo	HOO^{\cdot}		
No radicales	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Peroxinitrito	$ONOO^-$
	Ácido hipocloroso	$HClO$	Ácido nitroso	HNO_2
	Ozono	O_3	Catión nitrilo	NO_2^+
	Oxígeno singlete	1O_2	Anión nitroxilo	NO^-
			Alquil peroxinitritos	$ROONO$

2.2.4. Métodos de evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro*

Los métodos de determinación de la actividad antioxidante se basan en distintos sistemas generadores de radicales libres. Dichos radicales reaccionan con la muestra y en virtud de la capacidad antioxidante de esta se inhibirá la generación de los primeros. Así, lo que se determina realmente es el efecto antioxidante ya que la actividad antioxidante no se puede medir de forma directa. Lo ideal sería medir la actividad antioxidante de cada componente de la muestra por separado, sin embargo, y sobre todo en el caso de muestras naturales, es muy difícil determinar el número y concentración de los compuestos antioxidantes presentes en la muestra.

En la actualidad, debido a la complejidad de los procesos de oxidación, no existe un método que refleje de forma completa el perfil antioxidante de una muestra, por tanto, es recomendable trabajar con varios métodos para facilitar la comparación e interpretación de los resultados. Las características “ideales” que debe reunir un método de determinación de capacidad antioxidante son: sencillez, mecanismo químico definido y punto final fijo, reproducibilidad, adaptabilidad a sustancias antioxidantes hidrofílicas y lipofílicas y elevado rendimiento de análisis.

Con base a las reacciones químicas, los ensayos para determinar la capacidad antioxidante se dividen en dos categorías (tabla 3): - Ensayos basados en la reacción por transferencia de átomos de hidrógeno y - ensayos basados en la reacción por transferencia de electrones. (30)

Tabla 3. Clasificación de los modelos de ensayo *in vitro* según su modo de reacción ET o HAT.

Ensayo	Categoría
Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS ^{•+}) 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH [•]) Poder de reducción antioxidante del hierro (FRAP) N,N- dimetil-p-fenilendiamina (DMPD) Capacidad de reducción antioxidante del cobre (CUPRAC)	Ensayos basados en la transferencia de electrones (ET)
Capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC) Parámetro antioxidante de captura de radicales (TRAP) Inhibición de la oxidación del ácido linoleico Inhibición de la oxidación de los lípido de baja densidad (LDL)	Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)

Los ensayos basados en la transferencia de electrones (ET) involucran una reacción redox con el oxidante como un indicador del punto final de reacción. La mayoría de los ensayos basados en HAT monitorean una reacción cinética competitiva, generalmente están compuestos de un generador de radical libre sintético, una prueba molecular oxidable y un antioxidante. Los ensayos basados en HAT y ET fueron desarrollados para medir la capacidad de atrapar radicales libres, en lugar de la capacidad preventiva antioxidante de una muestra (30).

Este trabajo tiene por objeto determinar la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos totales y de las subfracciones obtenidas de hojas y bulbos de *P. dubia*, así como comparar la relación entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante; se han aplicado con este fin los dos principales métodos químicos disponibles: ABTS^{•+} y DPPH[•].

2.2.5. Alcaloides

Los alcaloides son compuestos orgánicos nitrogenados de estructuras heterogéneas y complejas, principalmente con carácter básico y que tiene acciones fisiológicas diversas aun en dosis muy bajas, llegando incluso a ser tóxicas. Constituyen el grupo más grande de metabolitos secundarios en las plantas y se originan principalmente a partir de los aminoácidos.

Los alcaloides se pueden encontrar distribuidos sobre todo en los vegetales superiores en tejidos periféricos como cortezas, raíces, frutos, hojas y semillas. Las especies que contienen alcaloides rara vez contienen solo un alcaloide, habitualmente contiene varios, atribuyéndoles diversas acciones farmacológicas, como la acción antitumoral, estimulante, hipotensora, antibacteriana, analgésica y antiinflamatoria (31, 32).

- **Alcaloides de Amaryllidaceae**

La clasificación de los alcaloides de la familia **Amaryllidaceae** se define en función del conocimiento de sus relaciones biosintéticas. Aunque todos ellos provienen de fenilalanina y tirosina, su diversidad estructural es consecuencia de los diferentes tipos de acoplamiento fenol oxidativo. Con base al sistema heterocíclico que presentan, se pueden diferenciar los esqueletos tipo (figura 8): norbelladina, licorina, homolicorina, crinina, hemantamina, narciclasina, tazetina, montanina y Galantamina (33, 34).

Los alcaloides del tipo **Amaryllidaceae** se caracterizan por: (34-36)

1. Poseer una estructura base C6-C1-N-C2-C6, en la que la porción C6-C1 deriva del aminoácido L-fenilalanina y el fragmento N-C2-C6 proviene de L-tirosina.
2. Contener un átomo de nitrógeno secundario, terciario o incluso cuaternario.
3. Ser bases moderadamente débiles con pKa variable entre 6-9.
4. Oscilar el número de átomos de carbono de 16 a 20, dependiendo de los sustituyentes del sistema anillado. Por lo general, son compuestos monoméricos, aunque se han citado algunos dímeros.

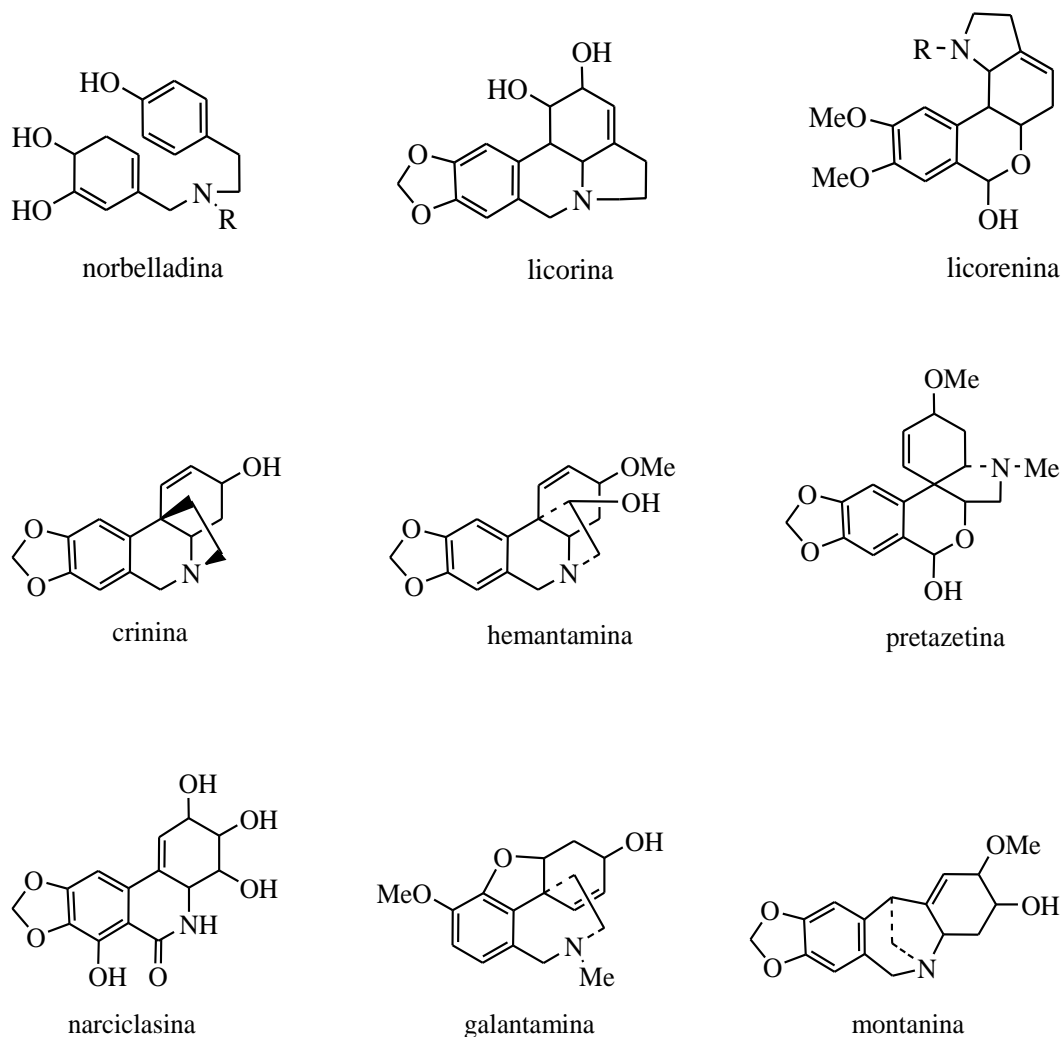


Figura 8. Esqueleto de los tipos de alcaloides de **Amaryllidaceae**

- **Galantamina**

La galantamina (figura 9) se descubrió durante la década de 1950 en especie *Galanthus woronowii*, atrayendo la atención de la industria farmacéutica (37). Este alcaloide fue aislado primeramente de la especie *Galanthus nivalis* (**Amaryllidaceae**), planta utilizada tradicionalmente en Bulgaria y Turquía para el tratamiento de afecciones neurológicas (38). Desde el punto de vista farmacológico, el alcaloide galantamina merece un capítulo exclusivo, dado que es el único del grupo de alcaloides de **Amaryllidaceae** que ha sido aprobado y que actualmente se comercializa para el tratamiento sintomático de la enfermedad de Alzheimer, un tipo de demencia con un enorme y creciente impacto sobre la población mundial.

En la actualidad, se comercializa en su forma salina como hidrobromuro de galantamina con la denominación de Razadyne® (o Reminyl®).

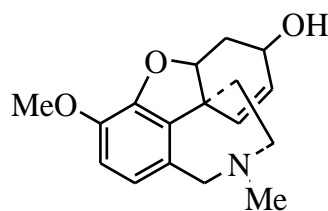


Figura 9. Estructura química de Galantamina

En 2001, el uso de la galantamina fue aprobado para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en diversos países (39), por ser un medicamento tolerado y con una significativa acción en el mejoramiento de las funciones cognitivas (38). Otros alcaloides aislados de especies de la familia **Amaryllidaceae**, tales como Assoanina, Epinorgalantamina, Oxoassoanina, Sanguinina, 1,1-Hidroxigalantamina, Licorina, también demostraron actividad de inhibición sobre la enzima AChE (40).

Las especies pertenecientes a las familias **AMARYLLIDACEAE**, **APIACEAE**, **ASTERACEAE**, **LEGUMINOSAE**, **FUMARACEAE**, **LAMIACEAE**, son las más estudiadas en cuanto a la actividad de inhibición sobre la AChE (38, 41). La alta actividad de estas especies puede estar relacionada a su rica composición en alcaloides, pues la mayoría de los inhibidores de AChE presentan nitrógeno en su estructura (42). Estudios realizados sobre la actividad de los metabolitos secundarios presentes en diferentes especies de la familia **Amaryllidaceae** han demostrado un amplio rango de aplicaciones farmacológicas.

Es interesante citar que se ha evaluado la actividad inhibidora de AChE de varios compuestos estructuralmente relacionados con el alcaloide galantamina, como algunos derivados N-alquilados y sanguinina (figura 10), y resultaron ser unas diez veces más activos que dicho compuesto(37).

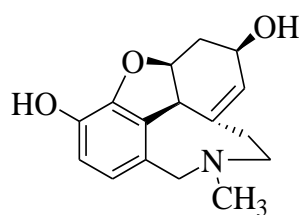


Figura 10. Estructura química de Sanguinina

A pesar de que la síntesis química de galantamina se ha logrado, ha presentado rendimientos muy bajos, por lo que las plantas continúan siendo la fuente principal de este producto. Mientras que en Europa Central y Occidental se obtiene mayoritariamente a partir de cultivares de *Narcissus*, en Europa del Este es obtenida a partir de *Leucojum estivum*, y en China se extrae de *Lycoris radiata*. Además, se ha descrito su presencia en plantas de diversos géneros, incluyendo *Eucharis*, *Caliphurria*, *Hippeastrum*, *Hymenocallis*, *Zephyranthes*, *Ungerniay Haemanthus* (37). Debido a la continua demanda de este alcaloide, existe un gran interés en la búsqueda de nuevas fuentes que sean altamente productoras de galantamina.

Por otro lado el alcaloide hallado con mas frecuencia dentro del grupo de alcaloides de **Amaryllidaceae** es licorina, el cual fue el primero en ser aislado. Se ha reportado su actividad como potente inhibidor de la biosíntesis de ácido ascórbico, del crecimiento y la division celular, y de la organogénesis en plantas superiores, algas y levaduras. En animales, ha demostrado una importante actividad antitumoral, siendo considerado un agente quimioterapéutico prometedor debido a su efecto antiproliferativo selectivo, mas marcado en células cancerosas que en células normales (43, 44).

Otra actividad destacable de los alcaloides de tipo licorina es su potente efecto inhibidor sobre parásitos, habiéndose reportado que su actividad frente a *Trichomonas vaginalis* transcurre a través de la muerte celular mediada por un mecanismo conocido como paraptosis (45).

Licorina y Pseudolicorina (figura 11) han demostrado, entre otras propiedades, efectos antivirales, inhibidores enzimáticos, así como la capacidad de interaccionar con el ADN. Al igual que otros tipos de alcaloides del grupo, licorina y sus derivados presentan efectos analgésicos e hipotensores(9). Además de presentar diferentes aplicaciones farmacológicas comprobadas científicamente.



Figura 11. Estructura química de licorina (a) y pseudolicorina (b).

- **Enfermedad de Alzheimer**

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa progresiva caracterizada por la pérdida de memoria, disfunción cognitiva, disturbios comportamentales, y dificultad en realizar actividades diarias (46). Esta enfermedad frecuentemente comienza con pérdida de la memoria a corto plazo, y continúa con disfunción emocional y cognitiva más generalizada (39).

El diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer está basado en características clínicas, que hoy en día se confirman por el examen histopatológico del cerebro (47). Existen tres estados clínicos de la enfermedad (tabla 4).

Tabla 4. Estados clínicos de la enfermedad de Alzheimer.

Estados clínicos	Patología
Leve	Esta la fase inicial dura generalmente entre 2 a 3 años y se caracteriza por la disminución de la memoria a corto plazo, muchas veces acompañada por síntomas de ansiedad y depresión.
Moderada	Estos síntomas aparecen como manifestaciones neuropsiquiátricas, tales como alucinaciones visuales y falsas creencias.
Grave	Esta fase final se caracteriza por signasis motoras, tales como la rigidez motora y declinio cognitivo.

La EA además viene acompañada por una pérdida gradual y progresiva de las funciones mentales. Ello es debido a que las regiones cerebrales del hipocampo y del parahipocampo, esenciales para el aprendizaje de nuevas informaciones, se ven afectadas severamente por dicha patología, siendo un signo prominente y primario de esta enfermedad.

La enfermedad de Alzheimer es la causa más común de demencia a nivel mundial entre las personas (48). Para el año 2005 se reportaron 24 millones de pacientes y para el año 2010 la cifra ha aumentado de manera preocupante a 35.6 millones calculándose que esta cifra se duplica aproximadamente cada 20 años. Según la OMS para 2050 se tiene previsto un número aproximado de 100 millones de pacientes (un incremento de 600%) (49, 50). Los países más afectados son: China, Estados Unidos, Canadá, India, Japón, Rusia, Indonesia y en general todo Europa.

Lo más preocupante de esta enfermedad, es el número de pacientes con Alzheimer que aumentan directamente con la expectativa de vida en el crecimiento de la población (39). En Colombia para el 2020 se calcula un número de pacientes entre 350.000 y 400.000, con un alto grado de incidencia negativa, a nivel familiar y económica (51).

Esta enfermedad fue descrita en 1907 por el médico alemán Alois Alzheimer y tanto en Europa como en el resto del mundo se constituye en un grave problema de Salud Pública con un alto costo económico. Es una enfermedad irreversible y sin cura, es de difícil detección ya que su curso es lento pero progresivo. Se caracteriza por desconexión en tiempo y en espacio, inicialmente imperceptibles pero de aumento progresivo, hasta desconexión total en etapas ya avanzadas. Posiblemente es de carácter genético con manifestación en la siguiente o posterior generación. Otra característica es la precocidad de su aparición y ello, explica, en parte, la identificación de pacientes menores de 50 años, tal y como sucede en Colombia, concretamente en algunos municipios de Antioquia, siendo una de las

principales causas, la influencia de la tecnología, campos eléctricos y magnéticos, radiación electromagnética y hereditaria de la EA (51).

- **Acetilcolinesterasa (AChE) y Enfermedad de Alzheimer**

Las opciones terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer están enfocadas en modificar los sistemas de neurotransmisores, en especial el sistema colinérgico, para maximizar la actividad de las neuronas restantes (47). Entre los diferentes tipos de medicamentos que pueden modificar la transmisión colinérgica, los fármacos inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE) son aquellos que presentan los mejores resultados clínicos en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. La inhibición de la enzima AChE parece promover el aumento de la cantidad de la acetilcolina en la sinapsis, disminuyendo o retardando la progresión de los síntomas asociados a la enfermedad (39).

Diversos estudios reportan la capacidad de plantas con actividad de inhibición sobre la enzima AChE, demostrando un potencial terapéutico para el tratamiento de procesos neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer (38, 41, 46, 52). Algunos avances etnofarmacológicos en estudios fitoquímicos contribuyen a la identificación de plantas y compuestos aislados como inhibidores de AChE, y consecuentemente conllevan al descubrimiento de medicamentos relevantes para el tratamiento de la enfermedad (38, 53).

Actualmente, los inhibidores de AChE aprobados para el tratamiento de pacientes con enfermedad de Alzheimer son: donipizil, rivastigmina y galantamina(54). Esta nueva generación de inhibidores de AChE es relativamente bien tolerada y posee un régimen de dosis riguroso (39). Estudios clínicos relatan algunos efectos adversos como náuseas, vómitos, diarrea, pérdida de peso, insomnio, alteraciones en el sueño, espasmos musculares, desmayo y fatiga (54). El donipizil y la galantamina son inhibidores selectivos de AChE, siendo indicados para pacientes con enfermedad de Alzheimer leve a moderada, mientras tanto algunos estudios sugieren un pequeño beneficio en pacientes en estado más avanzados de la enfermedad (47).

- **Hialuronidasa y Procesos inflamatorios**

Las hialuronidasas son enzimas que degradan ácido hialurónico (AH) (figura 12), polisacárido integrante de la matriz extracelular en tejidos animales; exhiben una elevada actividad en procesos inflamatorios crónicos tales como artritis reumatoidea, donde la degradación de AH está implicada en la progresión de la enfermedad, inhibidores selectivos de esta enzima podrían tener aplicación terapéutica(55).

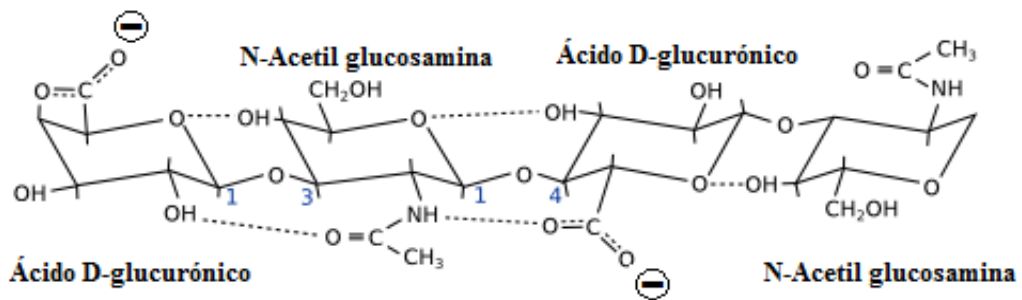


Figura 12. Estructura del ácido hialurónico

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Colombia no existen datos concretos sobre pacientes con Alzheimer, pero si datos aproximados muestran que para el **2005**: 220.000 Colombianos mayores de 60 años sufrían algún tipo de demencia y el 70% (150.000 pacientes), padecían de la enfermedad de Alzheimer. Y para el **2020** se calcula que: 350.000 colombianos mayores de 60 años sufrirán de algún tipo de demencia y el 74.28% (260.000 pacientes) padecerán de dicha enfermedad(56). Los enfermos de Alzheimer en Colombia normalmente son declarados con demencia, ya que tratar una persona que presente este tipo de enfermedad es sumamente costoso; ya que una dosis de 4 mg de hidrobromuro de galantamina cuesta alrededor de 2.3 dólares y una persona necesita 2 dosis de 4 mg al día, de por vida. Las personas con esta enfermedad no pueden ser curadas, pero si tratadas con este tipo de sustancia, con lo cual se mejora las condiciones de vida. En el Departamento del Cauca, existe una gran biodiversidad, encontrándose aquí la familia Amaryllidaceae que incluye entre sus miembros la especie *Phaedranassa dubia*, la que contiene una variedad de alcaloides como galantamina y sanguinina y licorina, los cuales son potentes inhibidores de la acetilcolinesterasa, enzima asociada a la enfermedad de Alzheimer.

En este contexto es transcendental contribuir en la búsqueda de nuevos medicamentos de origen natural, no solo como inhibidores enzimáticos, sino también como antioxidantes naturales que poseen diversos compuestos fenólicos y nitrogenados como péptidos, aminoácidos y alcaloides; estos reaccionan con los radicales libres evitando así la oxidación de biomoléculas (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos), y de esta manera previenen la arterioesclerosis, envejecimiento, cáncer y otras enfermedades en humanos como lo es el Alzheimer, la miastenia gravis y la miopatía.

En este contexto se plantea el estudio de la actividad antioxidante, enzimática y citotóxica del extracto etanólico de hojas y bulbos de *P. dubia* colectada en el Departamento del Cauca, mediante ensayos complementarios *in vitro*: atrapamiento del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH·) y atrapamiento del radical catión ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS⁺), además el contenido total de fenoles (TPC) mediante el método Folin-Ciocalteu; correlacionando estadísticamente el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante. Ensayos enzimáticos sobre acetilcolinesterasa, hialuronidasa, tirosinasa, α -glucosidasa y α -amilasa. Toxicidad por bioensayo con *Artemia salina*. Cuantificación de metabolitos secundarios responsables de dicha actividad por Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM) y Cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (CLAR/DAD).

4. JUSTIFICACIÓN

Las plantas siempre han sido de vital importancia para el hombre, supliendo necesidades básicas como alimento y medicina. Por tal razón, se han estudiado desde hace muchos años, demostrando sus grandes efectos biológicos en la salud humana; ya sea como reguladores, inhibidores enzimáticos, conservantes, entre otros. En Colombia existe una gran diversidad de plantas pertenecientes a diferentes familias, las cuales, pueden ser muy útiles como fuente de antioxidantes naturales.

Estudios recientes indican la implicación crucial del estrés oxidativo causado por el desequilibrio entre los sistemas antioxidantes y la producción de oxidantes, en varias etapas de la patogénesis de muchas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson además del cáncer, problemas cardiovasculares y desordenes inflamatorios. Muchas de estas enfermedades también son causadas por problemas genéticos, cargas eléctricas, contaminaciones electromagnéticas y radicales libres.

El ser humano necesita radicales libres para realizar procesos biológicos como lo es el transporte de electrones, la regulación de la presión sanguínea, el control de las infecciones; sin embargo, la acumulación excesiva de estos agentes en el organismo puede provocar daños en las células, originando degeneración de los tejidos, lo que conlleva al desarrollo de diferentes enfermedades. La manera más efectiva de evitar el daño producido por dichos radicales es su destrucción o estabilización por parte de antioxidantes.

Debido a esto en los últimos años, el estrés oxidativo y sus efectos adversos en la salud humana ha llegado a ser un problema que ha despertado, gran interés en los campos bilógico, médico, nutricional y agroquímico. De modo que para estas áreas del conocimiento, es prioritaria la búsqueda y obtención de antioxidantes de origen natural, como alternativa de sustitución de antioxidantes sintéticos, debido a sus efectos nocivos para el hombre y el medio ambiente.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antioxidante y citotóxica del extracto etanólico de hojas y bulbos de *P. dubia* (**Amaryllidaceae**).

5.2. Objetivos específicos

- Determinar cualitativamente metabolitos secundarios de *P. dubia* por tamizaje fitoquímico del extracto etanólico total.
- Cuantificar el contenido de fenoles totales mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu.
- Determinar la actividad antioxidante del extracto etanólico total de *P. dubia* por los métodos colorimétricos DPPH• y ABTS••.
- Determinar la actividad antioxidante de las subfracciones de *P. dubia* por los métodos colorimétricos del DPPH• y ABTS••.
- Determinar la actividad citotóxica del extracto etanólico de hojas y bulbos de *P. dubia* mediante el bioensayo con *Artemia salina*.

Los siguientes objetivos no estaban previstos, pero se lograron.

- Determinar la actividad de inhibición enzimática del extracto etanólico total de *P. dubia* sobre las enzimas acetilcolinesterasa, hialuronidasa, tirosinasa, α -amilasa y α -glucosidasa.
- Determinar el contenido de compuestos fenólicos en el extracto etanólico total de *P. dubia* por Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Arreglo de Diodos (CLAR/DAD)
- Determinar el contenido de compuestos nitrogenados en el extracto total de *P. dubia* por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM)
- Determinar el contenido de Azúcares libres en el extracto etanólico total de *P. dubia* por Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector de Índice de Refracción (CLAR/IR) y Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM)

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Material vegetal

Para este estudio la especie *P. dubia* fue colectada entre Rosas y la Sierra, Km. 7, en Junio de 2013, a 1.833 msnm, departamento del Cauca-Colombia (figura 13) con una temperatura que oscila entre los 12.3°C y 25.7°C, entre los 02°26'260'' de latitud norte y 076°36'01.7'' de longitud oeste, E: 16°. Presenta un régimen pluviométrico bimodal, con un nivel anual de lluvias medias de 2119.4 mm.

El ejemplar de esta especie (pliego número 17-169) se encuentran en el Museo de Historia Natural, Sección Herbario, Universidad del Cauca (Colombia).

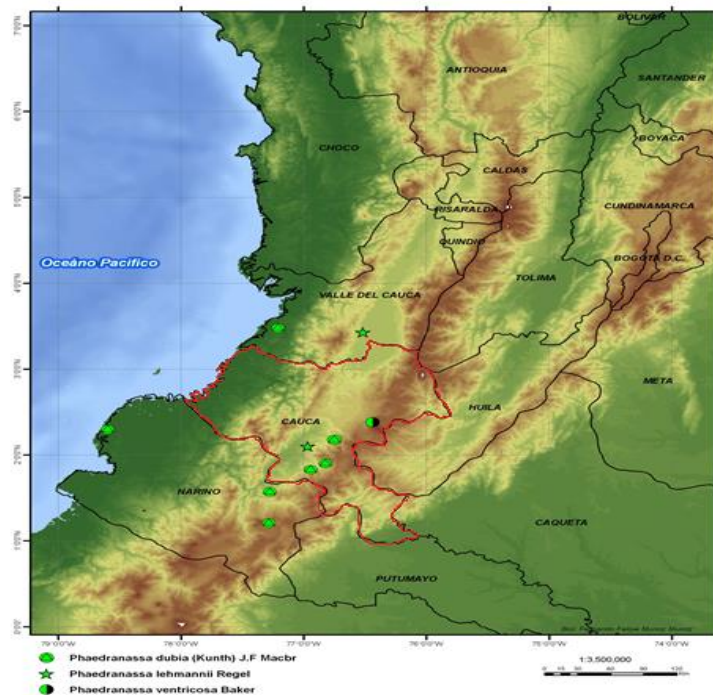


Figura 13. Distribución geográfica de *P. dubia*.

Fuente: Fernando Felipe Muñoz M. Unicauca. GEA. Popayán, Colombia (Junio 2012)

6.2. Propagación y conservación del material vegetal

Algunas de las especies de **Amaryllidaceae** se encuentran en vía de extinción, por lo tanto el grupo de Investigación en Química de Compuestos Bioactivos (QCB) está en proceso de construcción de un banco germoplasma, para propagación y conservación de plantas de esta familia botánica, incluida la especie estudiada. Los inicios de conservación (figura 14) se han realizado en el Departamento del Cauca, Vereda la Rejoja, Finca la Rejoja. Universidad del cauca.



Figura 14. Propagación de la especie *P. dubia*.

Fuente: Fotos tomadas por el Profesor Oscar Darío Bermúdez, Popayán, Cauca.

6.3. Reactivos

Etanol al 96%, hexano, Diclorometano, Acetato de etilo, Butanol, adquiridos de J.T. Baker (Xalostoc, México). Ácido (+)-tartárico, ácido clorhídrico (37%), ácido acético glacial, ácido pícrico, tricloruro de antimonio, vainillina fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania). Nitrato de bismuto III pentahidratado, persulfato de potasio, el hidróxido de sodio, ácido cítrico, hidróxido de potasio, yoduro de potasio, ácido bórico, adquiridos de Carlo Erba (Val de Reuil, Francia). Ácido sulfúrico concentrado, cloruro férrico anhidro, Sulfato ferroso Heptahidratado, adquirido de Fisher Scientific (Nueva York, USA). Cloroformo, adquirido de Mallinckrodt (Xalostoc, México). Gelatina, adquirida de Difco (Le Point de Claix, Francia). Ácido 3,5-dinitrobenzoico, adquirido de Alfa Aesar (Nueva York, USA). Acetato de plomo (II) fue adquirido de Laboratorios Biocroma (Cali, Colombia). Todos los reactivos de grado analítico. Polietilenglicol, adquirido de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Acetato de etilo, Ácido fórmico, Ácido acético, Anisaldehído, Ácido acético, Metanol, Ácido sulfúrico, adquiridos de Vetec. Sílicagel 60F254, adquirida de Merck (Darmstadt, Alemania). Agua Ultrapura (Popayán, Colombia). Helio, Metanol, Ácido fosfórico, Acetonitrilo. Todos los solventes grado HPLC. Adquiridos de J.T. Baker (Xalostoc, México). Agua Ultrapura (Brasilia, Brasil). DPPH[•] (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo), ABTS (sal diamónica del ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzo tiazolin-6-sulfónico), BHT (Butilhidroxitolueno), DL- α -Tocoferol, Trolox (ácido-6- hidroxil-2, 5, 7, 8 tetrametilcromano- 2-carboxílico), adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Ácido ascórbico, Carbonato de sodio, adquiridos de Mol Labs (Bogotá, Colombia). Metanol, adquirido de JT. Baker (Xalostoc, México). Cloruro de sodio, fosfato dihidrógeno de potasio, fosfato de sodio dibásico, Cloruro de potasio, persulfato potásico, adquiridos de Carlo Erba (Val de Reuil, Francia). Folin-Ciocalteu, Ácido gálico adquiridos por Panreac (Barcelona, España). Agua ultrapura (Popayán, Colombia). Dimetilsulfóxido, dicromato de potasio, adquiridos de JT Baker (Xalostoc, México). Huevos de *Artemia salina*, Sal marina sintética, adquirida de Quimpo (Popayán, Colombia). Agua ultrapura (Popayán, Colombia). Acetilcolinesterasa de *Electrophorus electricus* (500 U), Hialuronidasa (7900 Units/mL), Tirosinasa de cogumelo (25 KU/mL), α -Glucosidasa *Saccharomyces cerevisiae* (100U/mL), α -Amilasa de

páncreas porcino (Tipo VI-B), Iodato de acetiltiocolina (IATC), Albumina de suero bovino, Eserina, Ácido hialurónico, ρ -Dimetilamino benzaldehido, L-Tirosina, Ácido Kójico, p -nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo, Acarbosa, Almidón, Acido 3,5-dinitrosalicílico, adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Base Tris, Ácido clorhídrico, Cloruro de sodio, Cloruro de magnesio, Acido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzónico (DTNB), Acetato de sodio, Ácido acético glacial, Cloruro de calcio, Tetra borato de sodioanhídrido, Hidróxido de sodio, Ácido acético glacial, Ácido clorhídrico, dimetilsulfóxido, Ácido tánico, Fosfato de sodio monobásico, Fosfato de sodiodibásico, Bicarbonato de sodio, Tartrato de sodio y potasio, Bisulfito de sodio, adquiridos de Vetec. Metanol, adquirido de J.T. Baker (Xalostoc, México). Agua Ultrapura (Brasilia, Brasil).

6.4. Extracción por el método Soxhlet

Las hojas y bulbos se cortaron en pequeños trozos y posteriormente se sometieron a secado a temperatura ambiente. De este material seco, se pesaron aproximadamente 10 g y se sometieron a extracción Soxhlet durante 48 h usando como disolvente etanol al 96%. Culminada la extracción, se dejó enfriar el extracto etanólico total (ET) a temperatura ambiente y se filtró a través de papel filtro Whatman, con el propósito de eliminar restos de sólidos procedentes del material vegetal. Una vez obtenido el extracto etanólico de las hojas y bulbos, se llevó a sequedad mediante concentración a presión reducida y luego se almacenó en frascos ámbar, recubierto con papel aluminio y se guardó dentro de un desecador para evitar su hidratación. Con el extracto seco se realizaron los análisis pertinentes.

6.5. Tamizaje fitoquímico

El análisis fitoquímico se realizó en el extracto etanólico de hojas y bulbos con el fin de identificar los metabolitos secundarios de *P. dubia*. En este proceso se realizaron las pruebas para: alcaloides, cardiotónicos, cumarinas volátiles, flavonoides, taninos, saponinas, triterpenos y derivados antracénicos libres, por los métodos indicados en la tabla 5. La determinación de estos metabolitos se llevó a cabo por el método descrito por Domínguez (57).

Tabla 5. Métodos empleados para la identificación de metabolitos secundarios en la especie *P. dubia*.

Prueba	Ensayo en tubo	Ensayo por CCF
Alcaloides	Dragendorff, Mayer, Wagner	Revelada con dragendorff
Cardiotónicos	Reactivo de Baljet, Kedde, Raymond-Marthoud, Keller –Kiliani, Liebermann – Burchard, salkowski	NR
Cumarinas volátiles	Volátiles en papel impregnado con NaOH (Observación UV)	NR
Flavonoides	Ensayo con Mg y HCl	Revelada con NP-PEG
Taninos	Ensayo con cloruro férrico, Solución de gelatina, gelatina y sal, sal.	NR
Saponinas	Formación de espuma	NR
Triterpenos	Liebermann–Burchard, Salkowski	Revelada con solución de anisaldehído
Derivados antracénicos libres	Reacción Bomtraeger	NR

NR: ensayo no realizado, CCF: cromatografía en capa fina.

6.6. Fraccionamiento mediante extracción Líquido-Líquido

A partir del extracto etanólico total (EET), llevado a sequedad, se realizó el procedimiento de fraccionamiento y extracción según se muestra en la figura 15. Para ello, se tomó 1g de EET al cual se adicionaron 30 mL de agua destilada (EC1). Se empleó un equipo ultrasonido para su disolución y se depositó en un embudo de separación. Debido a que no hubo dilución total, se realizó la dilución del material no soluble con 10 mL de hexano, que se adicionaron posteriormente al embudo de separación. Se agitó suavemente la mezcla por 2 minutos y se dejó reposar por 5 minutos observándose la separación de dos fases. La fase orgánica se separó y se almacenó en un recipiente ámbar. El procedimiento se realizó dos veces más con 10 mL de hexano (método de extracciones sucesivas), se mezclaron las fracciones en hexano (Hex) y el extracto acuoso crudo (EC2), fue sucesivamente particionado con diclorometano y acetato de etilo (de igual forma a la partición con hexano), obteniéndose la fracción en diclorometano (DCM), la fracción en acetato de etilo (AcOEt), la fracción en butanol (BuOH) y la fracción acuosa (Ac) respectivamente. Cada una de las fracciones obtenidas se llevó a sequedad y se almacenó a una temperatura de 4°C. A partir de las fracciones obtenidas y el EET, se prepararon soluciones madre de 1000µg/mL para los análisis de actividad antioxidante y determinación del contenido de fenoles totales (TPC).

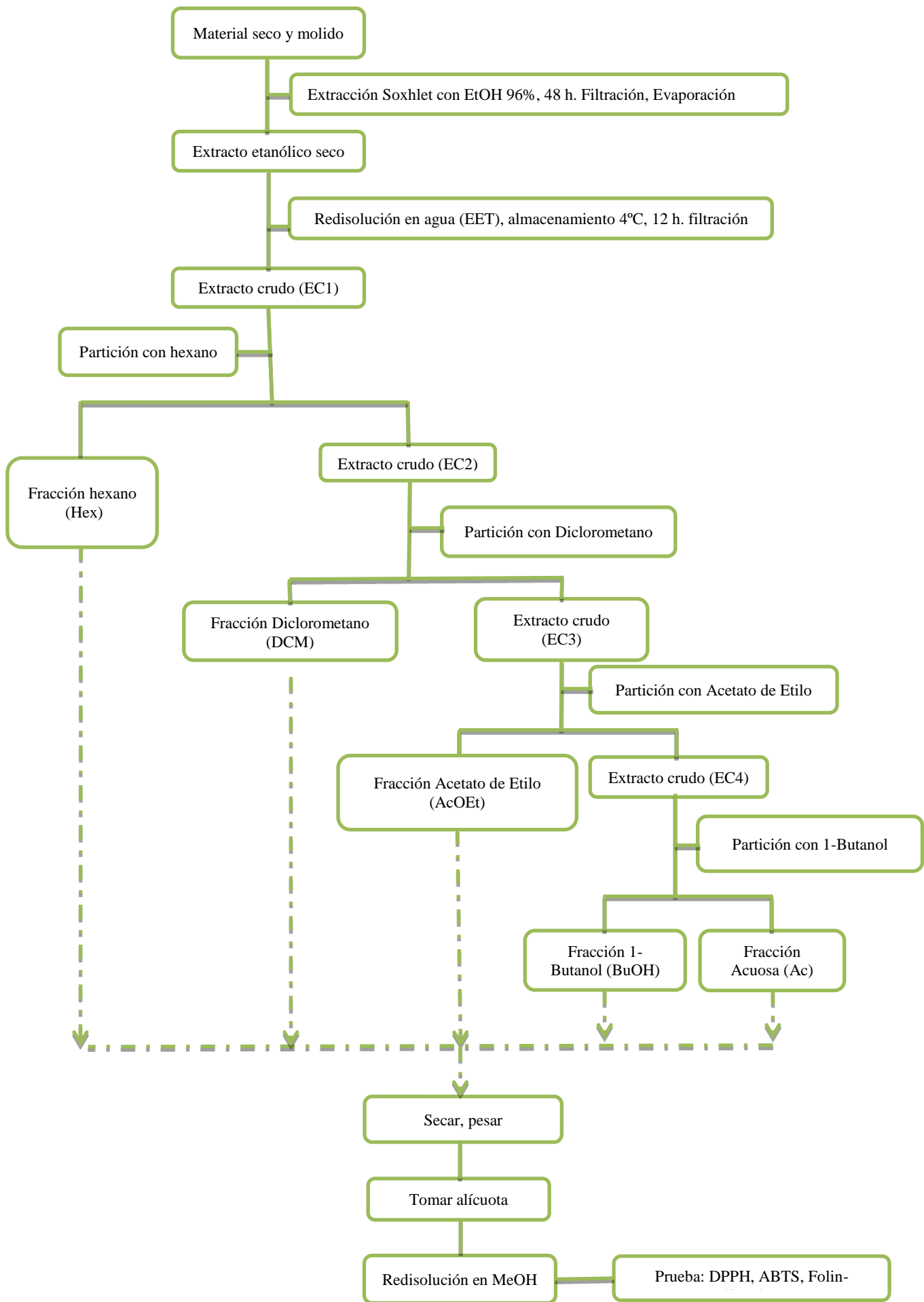


Figura 15. Fraccionamiento del extracto etanólico de hojas y bulbos de *P. dubia*.

6.7. Actividad antioxidante

6.7.1. Determinación del contenido de fenoles totales mediante el método Folin-Ciocalteu (F-C).

La determinación se llevó a cabo mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu (58). Este método se utiliza para determinar los compuestos fenólicos totales (TPC-Total Phenolic Compounds). Se fundamenta en una reacción de oxidación / reducción que es el mecanismo básico; gracias al carácter reductor del reactivo F-C. Se emplea como reactivo una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). La absorbancia del color azul desarrollado se mide a una λ de 765 nm. Para la determinación de compuestos fenólicos en *P. dubia* se empleó un estándar de ácido gálico y se construyó una curva de calibración con disoluciones metanólicas del estándar a diferente concentración en un rango de valores de 15-75 $\mu\text{g/mL}$, y el valor de absorbancia se registró en el espectrofotómetro UV-vis GENESIS 6 a una longitud de onda de 760 nm. Los análisis de las muestras se realizaron de la siguiente manera: 2 mL de solución acuosa del reactivo de Folin-Ciocalteu (0,2 eq/L) y 0,4 mL de solución etanólica del extracto, en un rango de concentración de 100 a 1000 $\mu\text{g/mL}$, se mezclaron y se incubaron por 5 minutos en la oscuridad. Posteriormente se adicionó un volumen de 1,6 mL de solución acuosa de carbonato de sodio (75 g/L), se agitó y se incubó en la oscuridad por una hora y se registró el valor de absorbancia a una longitud de onda de 760 nm (59). El contenido de componentes fenólicos presentes se expresó como miligramos de ácido gálico por gramos de extracto seco. El cálculo se realizó aplicando la ecuación 1:

$$C = \frac{cV}{m} \quad (1)$$

Donde c es la concentración de ácido gálico (mg/L) en el extracto establecido por la curva estándar y por regresión lineal, V es el volumen (mL) del extracto y m es el peso seco en gramos del extracto etanólico de la planta.

6.7.2. Evaluación de la actividad antioxidante mediante el ensayo del radical libre DPPH·

En este ensayo se empleó el radical coloreado DPPH· (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) disuelto en solución metanólica, (60) evaluando la actividad antioxidante total por la disminución de la absorbancia del radical a 515 nm, que es proporcional a los compuestos antioxidantes que contiene la muestra o patrón empleado. Se disolvieron 2.9 mg de DPPH· en 100 mL de metanol, se determinó la absorbancia y se ajustó el valor en 0.800 ± 0.03 ($\lambda = 515$ nm). La concentración exacta de la disolución se calculó por interpolación del valor de la absorbancia en una recta de calibración preparada con la disolución del radical DPPH·, en un rango de concentraciones de 2×10^{-5} M a 8×10^{-5} M. El análisis de las muestras se realizó de la siguiente manera: 2 mL de solución de DPPH· se mezcló en una

cubeta de plástico con 1 mL de disolución metanólica de las muestras evaluadas en un rango de concentraciones entre 10-1000 µg/mL, se agitó y se conservó a temperatura ambiente en la oscuridad hasta efectuar la medida de la absorbancia. Las medidas se realizaron transcurridos 15 minutos de reacción(61).

Se preparó una curva de calibración tomando como base una solución de estándar de Trolox con concentración de 5 mM y las concentraciones para la curva de 0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 µM, se tomó 2 mL de la solución del reactivo radical DPPH· y se adicionó 1 mL de las soluciones preparadas, se agitó y se incubó a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 15 minutos y se midió la absorbancia a 515 nm. Los resultados logrados a partir del análisis por el método de DPPH· se expresaron en término del valor TEAC “Trolox Equivalent Antioxidant Capacity”. La capacidad captadora de radicales libres se calculó mediante la ecuación 2:

$$\%AA = \frac{A_c - [(A_{fe} - A_{be}) - (A_{ie} - A_{be})]}{A_c} \times 100 \quad (2)$$

A_c : Absorbancia del control; A_{ie} : Absorbancia inicial; A_{fe} : Absorbancia final y A_{be} : Absorbancia del blanco de los extractos

El valor TEAC se determinó por medio de la curva de calibración Trolox previamente nombrada, para lo cual se procedió a la realización de un gráfico representando el valor de absorbancia de estándar contra concentración del mismo en partes por millón (ppm) y se continuó con el análisis empleando el método de regresión lineal, aplicando las ecuaciones 3 y 4:

$$A_{\text{trolox}} = m \times [\text{trolox}] \quad (3)$$

$$\text{TEAC}_{\text{extracto}} = \frac{A_{\text{extracto}}}{m} \times d \quad (4)$$

m = pendiente de la curva estándar; $[\text{trolox}]$ = Concentración de trolox y d = Factor de dilución.

6.7.3. Evaluación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo del catión radical ABTS⁺

Este ensayo se llevó a cabo por colorimetría. (62) En donde el radical catión (ABTS⁺) se produce por la reacción de ABTS^{•+} (2,2' ácido azinobis-3-etil-benzotiazolin-6- sulfónico) con persulfato de potasio formando un radical de color verde intenso, el cual es decolorado en presencia de compuestos antioxidantes. Se preparó la disolución en buffer fosfato (pH 7,4) del catión radical ABTS^{•+} por reacción de 50 mL de una disolución de ABTS^{•+} en persulfato potásico (2 mM) con 200 µL de disolución de K₂S₂O₈ en agua deionizada (70 mM), la mezcla se mantuvo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 16 horas. La disolución de ABTS^{•+} preparada se diluyó con buffer hasta ajustar el valor de la absorbancia

a 0.800 ± 0.03 ($\lambda=734$ nm). El análisis de las muestras se realizó de la siguiente manera: 950 μ L de una solución en PBS (tampón fosfato, pH = 7.4) del catión radical ABTS^{•+} se mezcló en una celda de plástico con 50 μ L de una solución metanólica de las muestras evaluadas en un rango de concentración entre 10-500 μ g/mL de cada fracción, se agitó y se incubó a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 5 minutos y se registró el valor de la absorbancia en el espectrofotómetro a 734 nm (61).

Se preparó una curva de calibración tomando como base una solución de estándar de Trolox con concentración de 5 mM y las concentraciones para la curva de 0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 μ M, se tomó 950 μ L de la solución del reactivo catión radical ABTS^{•+} y se adicionaron 50 μ L de las soluciones preparadas, se agitó y se incubó a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 5 minutos y se midió la absorbancia a 734 nm. Los resultados fueron convertidos a porcentaje de actividad antioxidante (%AA) y expresados como capacidad antioxidante en μ mol de equivalentes Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico)/g de extracto seco (TEAC). Los valores se expresaron como la media de tres réplicas.

6.8. Análisis estadístico

Los datos fueron obtenidos por triplicado, expresados como el promedio \pm desviación estándar, las diferencias estadísticas fueron establecidas por la prueba de comparaciones múltiples de Tukey en los diferentes niveles de cada uno de los factores con un nivel de confianza del 95%. Posteriormente se realizó un análisis de las correlaciones (r^2) de Spearman del TPC vs la capacidad antioxidante total medida por los ensayos DPPH[•] y ABTS^{•+}. Un test de ANOVA fue realizado, y las diferencias de $P < 0.05$ fueron consideradas significantes. Este análisis estadístico se desarrolló empleando el software SPSS 11.5.

6.9. Actividad citotóxica

- **Determinación de la letalidad mediante bioensayo con *Artemia salina***

Este ensayo se llevó a cabo mediante la metodología reportada en (63) complementada mediante las pruebas de toxicidad aguda y crónica con los protocolos de la Environmental Protection Agency (EPA) (64), del programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) (65).

Preparación de solución salina: Una solución de sal marina sintética (36 g/L) fue preparada y ajustada, con una solución de 0,1 M de NaOH, hasta pH 8-9. Esta solución fue utilizada para la eclosión de los huevos de *A. salina* y para la dilución de los extractos etanólicos de hojas y bulbos de *P. dubia*.

Eclosión de los huevos: Los huevos de *A. salina* fueron incubados en solución salina acuosa con exposición a luz diurna en una cámara ambiental (Biotronette Mark III, Environmental Chamber) por 48 horas para su eclosión.

Preparación de las disoluciones: Se pesaron por triplicado 10 mg de extracto completamente seco en un recipiente previamente lavado y seco, cada pesada correspondió a Repetición 1, Repetición 2, Repetición 3, a cada repetición se adicionó un volumen equivalente de DMSO en mL al peso en mg de extracto, ej. cuando se pesó 8,3 mg de extracto se adicionó 8,3 mL de DMSO, la solución en este caso fue de 1000 ppm, la cual se empleó como solución madre. A partir de esta se prepararon soluciones de: 1000, 200, 100, 50, 10 ppm.

Control positivo: se prepararon dos controles de 400 y 800 ppm con Dicromato de Potasio y fueron sometidos a las mismas condiciones de las muestras a ser analizadas.

Control negativo: Se realizó un blanco solo con DMSO y otro solo con los nauplios en agua de mar y se sometieron a las mismas condiciones de las muestras a ser analizadas.

Bioensayo: Se transfirieron 10 nauplios a beakers con aproximadamente 2 mL de agua de mar, posteriormente se agregó la cantidad correspondiente de las diferentes concentraciones de extracto etanólico e inmediatamente se completó con agua de mar a 5 mL y se procedió a tomar el tiempo, finalmente fueron llevados al sitio dispuesto para la observación, realizándose el conteo de larvas muertas a las 6 h y 24 h.

Los cálculos de CL_{50} se realizaron empleando el software Hans Dahnners.

6.10. Actividad enzimática

6.10.1. Determinación de la actividad de inhibición sobre acetilcolinesterasa

Los ensayos *in vitro* de actividad de acetilcolinesterasa fueron desarrollados mediante colorimetría (66). La enzima hidroliza el sustrato acetiltiocolina resultando tiocolina, que reacciona con DTNB para producir 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina y 5-tio-2-nitrobenzoato, el cual puede ser detectado a 405 nm (67). En una microplaca de 96 pozos se adicionaron los siguientes reactivos en este orden: 25 μ L de ATCI en agua destilada, 15 mmol/L, 125 μ L de DTNB en tampón A, 3 mmol/L (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8, conteniendo 0.1 mol/L NaCl y 0.02 mol/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$), 50 μ L de tampón B (50 mmol/L, pH 8, conteniendo 0.1 % albumina de suero bovino) y 25 μ L de extracto vegetal en solución tampón Tris 50mM, pH 8, conteniendo 10% de metanol (15,625 μ g/mL, 31,25 μ g/mL, 62,5 μ g/mL, 125 μ g/mL, 250 μ g/mL, 500 μ g/mL y 1000 μ g/mL). La absorbancia fue determinada espectrofotométricamente (Lector de microplacas-DTX 800 Multimode Detector BeckmanCoulter) a 405 nm, en seguida, fueron adicionados 25 μ L de solución de acetilcolinesterasa y la absorbancia nuevamente determinada. Un posible aumento en absorbancia, es debido a la hidrólisis espontánea del sustrato, por lo tanto la absorbancia fue corregida por la sustracción de absorbancia antes de la adición de la enzima por la absorbancia después de la adición de la enzima.

Como control positivo de inhibición de acetilcolinesterasa fue utilizado el inhibidor eserina también llamado fisostigmina. La curva de respuesta para eserina fue construida con concentraciones variando entre 7,81 y 1000,00 $\mu\text{g/mL}$. La curva de inhibición fue obtenida graficando el porcentaje de inhibición versus el logaritmo de concentración de eserina. Los parámetros de regresión no lineal fueron trazados para cada curva y los valores de IC_{50} fueron obtenidos utilizando el software Graph PadPrism 5.0.

6.10.2. Determinación de la actividad de inhibición sobre hialuronidasa

Los ensayos *in vitro* de actividad de hialuronidasa fueron desarrollados por colorimetría (25), donde la GlcNAc se reduce y se transforma sucesivamente en el cromógeno I y II bajo condiciones alcalinas a 100°C , posteriormente en cromógeno III por la acción de los ácidos, y finalmente este cromógeno III reacciona con DMAB para formar un complejo coloreado purpura, el cual se puede detectar a 585 nm. La inhibición de hialuronidasa se midió evaluando la cantidad de N-acetilglucosamina liberada por el ácido hialurónico (68, 69). Se tomó 50 μL La hialuronidasa bovina (7900 U/mL) disuelta en tampón de acetato 0.1 M (pH 3.6), y se mezcló con 50 μL de diferentes concentraciones (0.011 mg/mL a 1.428 mg/mL) de extracto vegetal solubilizado en solución de DMSO al 10% (DMSO: tampón de acetato 0.1 M (pH 3.6) (1:10)). Después de 20 minutos de incubación a 37°C en baño de agua, 100 μL de cloruro de calcio (12.5 mM) se adicionaron a esta mezcla y nuevamente se incubó por 20 minutos a 37°C en baño de agua. Se agregaron 250 μL de hialuronato de sodio (1.2 mg/mL) y se incubó por 40 minutos a 37°C en baño de agua. Después de la incubación la mezcla se trató con 50 μL de NaOH 0.4 M y 100 μL de borato de sodio 0.2 M, y se incubó por 3 minutos en baño de agua en ebullición. 1.5 mL de solución de p-dimetilaminobenzaldehído (2 g p-dimetilaminobenzaldehído, 55 mL ácido acético glacial, 6 mL ácido clorhídrico 12 N) se añadieron a la mezcla de reacción enfriada a temperatura ambiente, y posteriormente se incubó en baño de agua a 37°C por 20 minutos hasta la generación de color (amarillo-morado). Para el control positivo se sustituyó la muestra de extracto vegetal por la solución de DMSO al 10%. La absorbancia se midió a 585 nm en un equipo UV spectrophotometer SHIMADZU, UV 1800, JAPAN. (70) El porcentaje de inhibición fue calculado con la ecuación 5:

$$\% \text{ Inhibición} = \left[\frac{(\text{Ac}-\text{Am})}{\text{Ac}} \right] \times 100 \quad (5)$$

Donde Ac es la absorbancia a 585 de control, y Am es la absorbancia a 585 de la muestra.

Como control positivo de inhibición de hialuronidasa fue utilizado el inhibidor ácido tánico. La curva de respuesta para ácido tánico fue construida con concentraciones variando entre 2,8 y 90,0 $\mu\text{g/mL}$. La curva de inhibición fue obtenida graficando el porcentaje de inhibición versus el logaritmo de concentración de ácido tánico. Los parámetros de regresión no lineal fueron

trazados para cada curva y los valores de IC_{50} fueron obtenidos utilizando el software GraphPadPrism 5.0.

6.10.3. Determinación de la actividad de inhibición sobre tirosinasa

Los ensayos de actividad enzimática de tirosinasa fueron realizados mediante colorimetría. (71) En microplacas de 96 pozos fueron adicionados en el siguiente orden los siguientes reactivos: 30 μ L de solución de tirosinasa 25 U/mL, 60 μ L de solución tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 6,5 y 10 μ L de solución de extracto (31,25 μ g/mL, 62,5 μ g/mL, 125 μ g/mL, 250 μ g/mL, 500 μ g/mL, 1000 μ g/mL y 2000 μ g/mL). Esta mezcla fue incubada por 5 minutos a 25 °C. Posteriormente fueron adicionados 100 μ L de solución de L-tirosina, esta reacción fue incubada por 20 minutos a 25°C, la absorbancia fue medida en un Lector de microplacas a 475 nm. Para el blanco de extracto, fueron utilizadas las muestras de extracto vegetal y L-tirosina, eliminando variaciones relacionadas con la coloración característica del extracto vegetal.

Como control positivo de inhibición de tirosinasa fue utilizado el inhibidor ácido kójico. La curva de respuestas para ácido kójico fue construida con concentraciones variando entre 15,6 y 1000,0 μ g/mL. La solución utilizada como blanco de control fue preparada sustituyendo la enzima por tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 6,5. La curva de inhibición fue obtenida graficando el porcentaje de inhibición versus el logaritmo de concentración de ácido kójico. Los parámetros de regresión no lineal fueron trazados para cada curva y los valores de IC_{50} fueron obtenidos utilizando el software GraphPadPrism 5.0.

6.10.4. Determinación de la actividad de inhibición sobre α -glucosidasa

La actividad enzimática de α -glucosidasa fue determinada por colorimetría, (72) a través del p-nitrofenol (pNP) liberado a partir de p-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (pNPG). Este ensayo está basado en la determinación de la hidrólisis continua de p-NPG en p-NP. La formación de p-NP produce una coloración amarilla dependiente de Na_2CO_3 , que es medida en espectrofotómetro a 405 nm. El p-NPG es utilizado como sustrato para una mayor especificidad del método de determinación de la actividad de α -glucosidasa. En microplacas de 96 pozos, la enzima α -glucosidasa (10 μ L) fueron pre-incubados con 20 μ L de extracto vegetal durante 5 minutos a 25°C. Fueron adicionados 40 μ L de solución de p-NPG (1mM) en tampón fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8). La reacción fue incubada a 37°C durante 30 minutos en baño maría. Después de la incubación, la reacción fue interrumpida por la adición de 100 μ L de solución de bicarbonato de sodio al 10% y la absorbancia fue medida a 405 nm en un Lector de microplacas. Para el blanco de extracto, fueron utilizadas las muestras de extracto vegetal y pNPG, eliminando variaciones relacionadas a la coloración característica del extracto vegetal y posibles variaciones relacionadas a la absorbancia de coloración del pNPG.

Como control positivo de inhibición de α -glucosidasa fue utilizado el inhibidor acarbosa. La curva de respuestas para acarbosa fue construida con concentraciones variando entre 15,6 y 1000,0 $\mu\text{g/mL}$. La solución empleada como blanco de control fue preparada sustituyendo la enzima por tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 6,8. La curva de inhibición fue obtenida graficando el % de inhibición versus el logaritmo de concentración de acarbosa. Los parámetros de regresión no lineal fueron trazados para cada curva y los valores de IC_{50} fueron obtenidos utilizando el software GraphPadPrism 5.0.

6.10.5. Determinación de la actividad de inhibición sobre α -amilasa

La actividad de inhibición de la α -amilasa fue determinada mediante colorimetría. (73) La actividad de la α -amilasa está determinada por formación de maltosa resultante de la acción de esta enzima sobre el almidón presente en el medio. La maltosa, un disacárido formado por dos moléculas de glucosa, reduce el DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico) formando un producto de color naranja característico cuya absorbancia es determinada a 540 nm. La α -amilasa pancreática fue disuelta en tampón de fosfato de sodio 20mM (pH 6,9) conteniendo cloruro de sodio 6,7 mM para obtener una solución con concentración de 40U/mL. Un total de 40 μL de solución de extracto en solvente apropiado y 100 μL de solución de enzima fueron incubados en baño maría por 30 min a 25°C. Después de pre-incubado, 500 μL de pre-incubado fueron mezclados con 1 mL de almidón 1% en tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 6,9). La mezcla de reacción fue entonces incubada por 20 min a 40°C en baño maría. La reacción fue interrumpida con la adición de 1 mL de solución de DNS. Las muestras fueron entonces sometidas a ebullición por 5 min y enfriadas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue diluida adicionando 9 mL de agua destilada. La actividad de α -amilasa fue determinada por absorbancia en espectrofotómetro a 540 nm.

Fueron preparadas soluciones denominadas blanco de extracto, conteniendo solución de almidón, extracto vegetal y DNS, eliminando así variaciones relacionadas con la coloración característica del extracto vegetal, además soluciones que contenían DNS y tampón fueron utilizadas para ajustar el equipo antes de la determinación de absorbancia de las muestras.

Como controles positivos de inhibición de α -amilasa fue utilizado el inhibidor acarbosa. La acarbosa es un inhibidor de esta enzima actualmente comercializada como medicamento en diferentes concentraciones, recomendado como patrón de inhibición por Sigma Aldrich. La curva de calibración para acarbosa fue construida con concentraciones variando entre 3,9 y 125,0 $\mu\text{g/mL}$. La solución usada como blanco de control fue preparada sustituyendo la enzima por tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 6,9 con cloruro de sodio 6,7 mM). La curva de inhibición fue obtenida graficando el % de inhibición versus el logaritmo de concentración de acarbosa. Los parámetros de regresión no lineal fueron trazados para cada curva y los valores de IC_{50} fueron obtenidos utilizando el software GraphPadPrism 5.0.

6.11. Perfil cromatográfico

6.11.1. Determinación de compuestos nitrogenados por CG/EM.

Se empleó un Cromatógrafo de gases Agilent, modelo 6890, acoplado a un Espectrómetro de Masas de impacto electrónico (CG/EM) (modelo 5975) el cual opera a 70 eV a una temperatura de 230°C en la fuente iónica, Columna: DB-5 MS. Con una temperatura de 280°C en el inyector y el flujo de Helio fue de 0.8 mL/min. Adicionalmente se utilizó el modo de dilución (split) en una proporción 1:20. Para la obtención de los datos espectrales se utilizó el software AMDIS 2.64 (NIST), útil en la verificación de pureza de las señales y el cálculo de índices de retención de Kovats (IRK).

Rampa de temperatura programada:

- a) un aumento inicial desde 100°C hasta 180°C (15°C/min.)
- b) un minuto a 180°C
- c) un aumento desde 180°C hasta 300°C (5°C/min.)
- d) un minuto a 300°C.

Los resultados obtenidos fueron comparados con la base de datos existente en el Departamento de Productos Naturales, Fisiología Vegetal y Edafología, Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona(74, 75).

6.11.2. Determinación de compuestos fenólicos por CLAR-DAD

Se utilizó un Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución con Detector de Arreglo de Diodos (CLAR-DAD) modelo Hitachi, incluyendo horno, inyector automático, bomba e integrador, Columna LiChroCART 150-4,6 µmosphere STAR RP-18e (5µm) con una pre columna LiChroCART 4-4,6 µmosphere STAR RP-18e (5µm). Las muestras se disolvieron en metanol grado analítico (1mg/mL) previo a su análisis por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). Condiciones del análisis cromatográfico:

Flujo: 0.6 mL/min

Tiempo de análisis: 55 min

Fase móvil: Solución al 1% de ácido fosfórico (Bomba A) y acetonitrilo (Bomba B) y sistema de elución por gradiente (tabla 6).

Temperatura: 35°C

Volumen de inyección: 10 µL

Intervalos de análisis: 230 a 400 nm.

Los datos fueron cuantificados a 280 y 354 nm.

Tabla 6. Gradiente de elución para el análisis por CLAR-DAD

Tiempo (min)	Solución de ácido fosfórico al 1% (%)	Acetonitrilo (%)	Flujo (mL/min)
0	90	10	0.6
40	70	30	0.6
50	50	50	0.6
51	90	10	0.6
55	90	10	0.6

6.11.3. Determinación de azúcares libres por CLAR-IR

Para este análisis se empleó un Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución con Detector de índice de refracción (CLAR-IR) modelo Hitachi, incluyendo horno, inyector automático, bomba e integrador, Columna LiChroCART 250-4 LiChrospher 100 NH₂ (HP 5 µm) con una pre-columna LiChroCART 4-4,6 Purosher STAR RP 18e (5 µm).

Las muestras se disolvieron en solución de metanol grado analítico (1mg/mL) previo al análisis por CLAR. Condiciones del análisis cromatográfico:

Flujo: 1 mL/min

Fase móvil: Una mezcla de acetonitrilo: agua ultrapura en proporción 80:20 (bomba A) en sistema isocrático

Temperatura: 30°C

Volumen de inyección: 10 µL

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Tamizaje fitoquímico y extracción

Los rendimientos de la extracción provenientes de las hojas y bulbos de *P. dubia* se presentan en la anexo 1 (tabla 1).

El porcentaje de materia extractable obtenida de las hojas fue mayor con los diferentes solventes empleados, en comparación con la obtenida a partir de bulbos, siendo el extracto etanólico total (EET) y la fracción Ac, los que presentaron mayor porcentaje de extracción (figura 16). Para las hojas y bulbos los resultados se expresaron en porcentaje en peso con respecto al material vegetal seco.

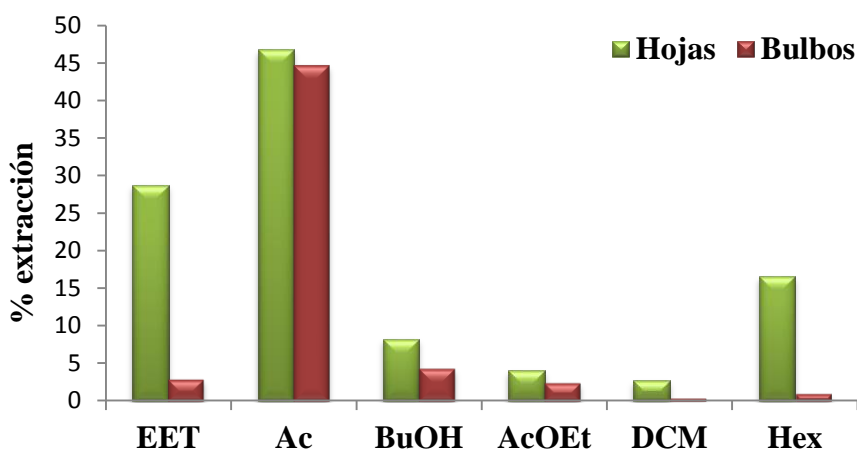


Figura 16. Porcentajes de extracción del extracto etanólico total (EET) y las subfracciones obtenidas de las hojas y bulbos de *P. dubia*.

El tamizaje fitoquímico se realizó con el fin de identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico total de hojas y bulbos de *P. dubia*, evidenciándose reacción positiva frente a las pruebas cualitativas para alcaloides, que en este caso, son aquellas que confirmaron lo mencionado por algunos autores, (76) donde realizaron un estudio sobre alcaloides presentes en *P. dubia*. Además, se corroboró así el hecho que por tratarse de una especie de **Amaryllidaceae** presenta alcaloides. Adicionalmente, se determinó la presencia de otro tipo de especies químicas como cardiotónicos, saponinas, triterpenos y flavonoides, siendo este último importante exponente en el campo de los antioxidantes de origen natural. Las pruebas colorimétricas para la identificación de dichos metabolitos se realizaron empleando diferentes métodos (anexo 1, tabla 2)

Algunos de los resultados anteriores se corroboraron mediante cromatografía en capa fina con revelación química, manifestando resultados positivos para alcaloides, compuestos fenólicos y triterpenos, tanto en hojas como en bulbos (tabla 7). En el análisis de alcaloides (anexo 1, grafica 1), se encontraron cuatro tipos de posibles alcaloides para los bulbos, y tres para las hojas. La determinación de compuestos fenólicos permitió establecer que los bulbos presentan cuatro tipos y las hojas tres (anexo 1, grafica 2). Para los triterpenos, en

las hojas se encontraron cuatro clases de compuestos y en los bulbos tres (anexo 1, grafica 3).

Tabla 7. Compuestos presentes en el extracto etanólico proveniente de hojas y bulbos de *P. dubia* determinados por tamizaje fitoquímico de acuerdo a la metodología propuesta por Domínguez (57).

Prueba	Ensayo en tubo		Numero de compuestos		Ensayo por CCF (Rf)	
	Hojas	Bulbos	Hojas	Bulbos	Hojas	Bulbos
Alcaloides	+++	+++	3	4	0,11 0,66 0,97	0,14 0,27 0,56 0,94
Cardiotónicos	++	++	NR	NR	NR	NR
Cumarinas volátiles	-	-			NR	NR
Flavonoides	+++	++	3	4	0,45 0,58 0,75	0,42 0,50 0,58 0,67
Taninos	-	-	NR	NR	NR	NR
Saponinas	+	+	NR	NR	NR	NR
Triterpenos	+	++	4	3	0,018 0,27 0,45 0,95	0,091 0,45 0,97
Derivados antracénicos libres	-	-	NR	NR	NR	NR

Interpretación de resultados: (-) ausencia del metabolito, (+) poca presencia del metabolito, (++) moderada presencia del metabolito, (+++) alta presencia del metabolito. NR: no realizado

Rf: $\frac{\text{distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación}}{\text{distancia que recorre el disolvente hasta el frente del eluyente.}}$

7.2. Actividad antioxidante

7.2.1. Contenido de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu.

Las sustancias fenólicas se han reconocido por su aporte a la actividad antioxidante de los materiales vegetales. Debido a lo anterior, se determinó el contenido de fenoles totales (TPC) en los extractos empleando el método de Folin-Ciocalteu. El contenido de compuesto fenólicos presentes en hojas y bulbos de *P. dubia* fue expresado como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco (mg EAG/ g ES), empleando la curva de calibración del estándar de ácido gálico (figura 17). El TPC para el extracto proveniente de las hojas de *P. dubia* estuvo en el rango de $69,524 \pm 0,300$ a $152 \pm 0,450$ mg EAG/g ES (tabla 8). Aunque en la fracción de Hex fue menor comparado con la fracción de BuOH, el TPC ($152,000 \pm 0,450$ mg EAG /g ES) fue casi dos veces mayor que la fracción de Hex ($69,524 \pm 0,300$ mg EAG/g ES). De acuerdo a los resultados obtenidos, los compuestos de origen fenólicos presentes en las hojas son de origen medianamente polar a polar, para las demás fracciones el TPC en orden descendente tiene el siguiente comportamiento: BuOH > AcOEt > Ac > EET > DCM > Hex.

Para los bulbos el TPC para la fracción de BuOH ($84,364 \pm 0,519$ mg EAG/g ES) fue aproximadamente dos veces mayor que la fracción Ac ($35,359 \pm 0,541$ mg EAG/g ES) y mayor que la fracción de Hex ($50,165 \pm 0,654$ mg EAG/g ES), indicando que los compuestos responsables de dicha actividad son de origen medianamente polar a apolar, para las demás fracciones se encontró que el TPC varía descendentemente de acuerdo a la polaridad de la siguiente manera: BuOH > AcOEt > DCM > Hex > Ac > EET.

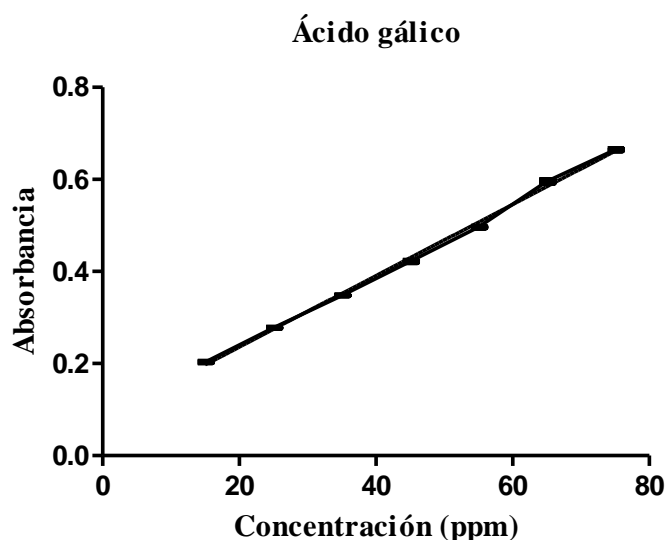


Figura 17. Valores de absorbancia determinados para ácido gálico en diferentes concentraciones, empleadas en la construcción de la curva de calibración para la determinación del TPC según el método Folin-Ciocalteu, donde $Y=0,0077x + 0,0812$, $r^2=0,9978$

Tabla 8. Contenido de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu y actividad antioxidante estimada mediante los métodos DPPH y ABTS en el extracto etanólico total y diferentes fracciones provenientes de hojas y bulbos de *P. dubia*, expresados como más o menos la desviación estándar (\pm DS).

Fracción	Folin-Ciocalteu		DPPH				ABTS			
	HOJAS	BULBOS	HOJAS	BULBOS	HOJAS	BULBOS	HOJAS	BULBOS		
	EAG*		TEAC**	%AA	TEAC**	%AA	TEAC**	%AA	TEAC**	%AA
ETT	104,670 \pm 0,541	22,880 \pm 0,200 23,573	72,281 \pm 0,287	66,233 \pm 0,990	34,230 \pm 0,049	20,868 \pm 0,850	386,520 \pm 4,530	36,314 \pm 0,474	130,860 \pm 1,100	23,240 \pm 0,231
Ac	132,670 \pm 0,794	\pm 0,360	65,827 \pm 0,197	57,511 \pm 2,264	45,940 \pm 0,303	33,608 \pm 1,675	302,250 \pm 1,580	27,487 \pm 0,166	181,790 \pm 1,24	33,911 \pm 0,259
BuOH	152,000 \pm 0,450	56,242 \pm 0,346	84,582 \pm 0,192	81,663 \pm 0,230	46,154 \pm 0,695	35,634 \pm 0,833	723,210 \pm 0,802	71,583 \pm 0,084	307,660 \pm 1,070	60,280 \pm 0,224
AcOEt	146,760 \pm 0,654	52,260 \pm 0,346	70,995 \pm 0,044	65,388 \pm 0,053	52,508 \pm 0,251	42,903 \pm 0,586	681,660 \pm 0,000	67,230 \pm 0,000	296,800 \pm 1,160	58,006 \pm 0,243
DCM	87,238 \pm 0,750	44,179 \pm 0,265	36,520 \pm 0,000	24,094 \pm 0,000	79,965 \pm 0,000	76,132 \pm 0,000	219,750 \pm 3,880	18,844 \pm 0,406	278,100 \pm 3,590	54,088 \pm 0,753
Hex	69,524 \pm 0,300	33,443 \pm 0,436	38,064 \pm 0,748	25,944 \pm 0,896	83,579 \pm 0,000	80,462 \pm 0,000	146,800 \pm 2,120	11,204 \pm 0,222	163,520 \pm 1,060	30,083 \pm 0,221
ÁA	NR	NR	100,700 \pm 0,010	97,887 \pm 0,105	100,700 \pm 0,010	97,887 \pm 0,105	513,140 \pm 4,460	49,577 \pm 0,468	513,140 \pm 4,460	49,577 \pm 0,468
α-T	NR	NR	99,969 \pm 0,184	95,386 \pm 0,283	99,969 \pm 0,184	95,386 \pm 0,283	605,220 \pm 5,270	59,223 \pm 0,552	605,220 \pm 5,270	59,223 \pm 0,552
BHT	NR	NR	63,810 \pm 0,274	50,304 \pm 2,992	63,810 \pm 0,274	50,304 \pm 2,992	733,91 \pm 0,270	72,703 \pm 0,024	733,910 \pm 0,270	72,703 \pm 0,024

*= mg EAG/g ES, **= μ mol trolox/g ES, EAG: equivalentes de ácido gálico, TEAC: capacidad antioxidante equivalente a trólox, ES: extracto seco, % AA: porcentaje de actividad antioxidante, μ mol: micromoles, ETT: extracto etanólico total, Ac: acuosa, BuOH: butanol, AcOEt: acetato de etilo, DCM: diclorometano, Hex: hexano, ÁA: ácido ascórbico, α -T: tocoferol, BHT: butilhidroxitolueno, trólox: ácido-6- hidroxil- 2, 5, 7, 8 tetrametilcromano- 2-carboxílico, g: gramos, DPPH: 1,1-difenil-2-picrilhidrazil), ABTS: 2,2' ácido azinobis-3-etil- benzotiazolin-6- sulfónico, NR: No realizado.

En las fracciones obtenidas a partir de hojas y bulbos a medida que aumenta la polaridad del solvente de Hex a BuOH, aumenta el TPC. Con relación al TPC, las fracciones provenientes de hojas mostraron una marcada diferencia respecto a las obtenidas de bulbos; ya que los valores de TPC para las fracciones extraídas de hojas fueron entre dos y cuatro veces mayores que los valores estimados para fracciones provenientes de bulbos (figura 18). Con base en esta observación, se podría esperar que las fracciones provenientes de hojas presenten mayor actividad antioxidante que las fracciones provenientes de bulbos.

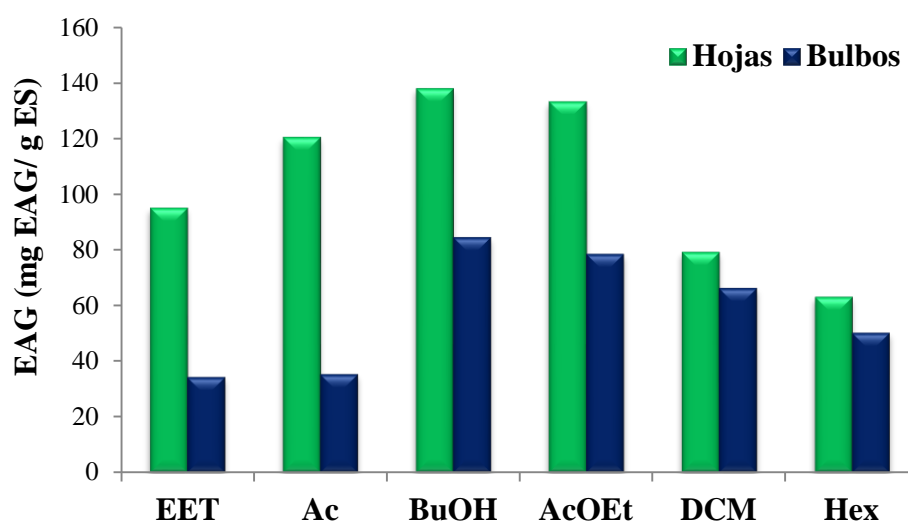


Figura 18. TPC (mg EAG/g ES) determinados a una concentración de 1000 ppm para el extracto etanólico total (ETT) y las fracciones de hojas y bulbos de *P. dubia*, obtenidos mediante el método Folin-Ciocalteu.

Los valores de TPC determinados para extractos provenientes de hojas y bulbos de *P. dubia*, no se pudieron comparar con los de otra especie de la familia **Amaryllidaceae**, dado que no se encontró en la literatura estudios similares con especies de esta familia, por lo que se realizó una comparación con el valor estimado para *Calophyllum genus*, donde emplearon el mismo método usado en el presente estudio. (77) Al comparar los resultados, se encontró que el TPC en el extracto etanólico total de hojas de *P. dubia* ($104,670 \pm 0,541$ mg EAG/g ES), es aproximadamente la mitad del TPC reportado para el extracto metanólico total de *C. genus* ($249,000 \pm 15,400$ mg EAG/g ES), el resultado obtenido para las hojas de *P. dubia* es medio, y el TPC depende de la especie investigada y de la polaridad del solvente de extracción. Al realizar la comparación respecto a los bulbos, este valor confirma que el TPC en el extracto etanólico total de bulbos de *P. dubia* es relativamente bajo ($34,320 \pm 0,300$ mg EAG/g ES).

7.2.2. Actividad antioxidante determinada por el método del 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH)

El DPPH· es usualmente empleado como sustrato para evaluar la actividad antioxidante de compuestos que tienen la capacidad de captar radicales libres. En este ensayo se determinó la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de hojas y bulbos de *P. dubia*. Los resultados fueron obtenidos empleando una curva de calibración trolox (figura 19), expresados como TEAC ($\mu\text{mol trolox} / \text{g ES}$), en donde los extractos mostraron una favorable actividad inhibitora del radical DPPH·.

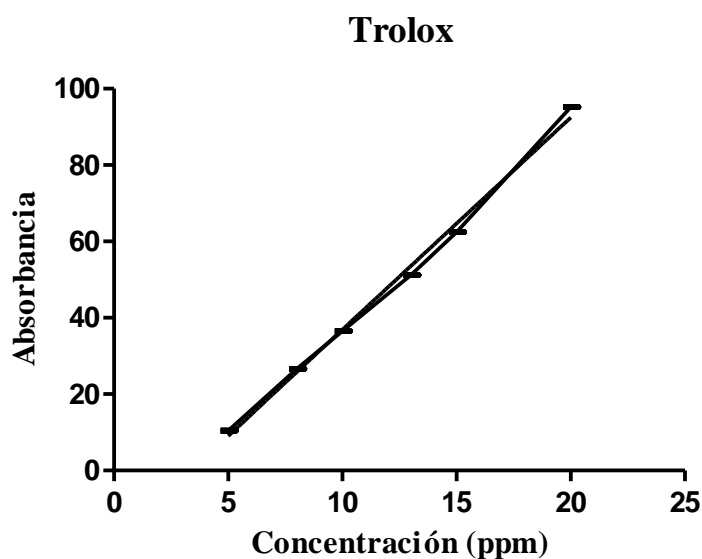


Figura 19. Valores de absorbancia determinados para trólox en diferentes concentraciones, empleadas en la construcción de la curva de calibración para la determinación del TEAC según el método DPPH·, donde ($Y = 5,5604x - 18,725$ $R^2 = 0,9953$)

En este estudio se emplearon antioxidantes sintéticos como BHT, AA y α -T, siendo estos dos últimos los que presentan mayor capacidad antirradicalaria con respecto al DPPH·. La capacidad antioxidante para las dos muestras estudiadas en solventes de diferente polaridad, se encontró en un rango de $84,582 \pm 0,192$ a $34,230 \pm 0,049$ $\mu\text{mol trolox} / \text{g ES}$. En las hojas las fracciones BuOH, EET, AcOEt y Ac fueron las que presentaron mayor actividad antioxidante (tabla 8), sobresaliendo la fracción de BuOH ($84,582 \pm 0,192$ $\mu\text{mol trolox} / \text{g ES}$) e indicando que los compuestos responsables de dicha actividad son polares a medianamente polares, estos podrían ser de naturaleza fenólica como flavonoides. El análisis de varianza realizado permitió establecer que existen diferencias significativas ($p \leq 0,05$) y correlación positiva entre las fracciones estudiadas ($r^2 = 0,501$). Al comparar estos resultados con los obtenidos para el AA se observa que las hojas son una buena fuente de compuestos antioxidantes, ya que los valores entre AA ($100,700 \pm 0,010$ $\mu\text{mol trolox} / \text{g ES}$) y la fracción con mayor actividad antioxidante difieren muy poco.

La actividad antioxidante del extracto etanólico y las subfracciones provenientes de bulbos, mostró que la fracción de Hex ($83,579 \pm 0,000 \mu\text{mol trolox} / \text{g ES}$) es la que presenta mayor capacidad antioxidativa comparada con las demás fracciones ($\text{Hex} > \text{DCM} > \text{AcOEt} > \text{BuOH} > \text{Ac} > \text{EET}$), indicando que los compuestos responsables de dicha actividad son de origen apolar a medianamente polar. El análisis de varianza aplicado indico que existen diferencias significativas ($p \leq 0.05$) y correlación negativa entre las fracciones estudiadas ($r^2 = -0,807$), indicando que a medida que aumenta la polaridad del solvente, disminuye el contenido de compuestos con actividad antirradicalaria. Al realizarse la comparación de los resultados obtenidos para la fracción con mayor actividad, respecto al $\alpha\text{-T}$ ($99,969 \pm 0,184 \mu\text{mol trolox} / \text{g ES}$) se observó que los resultados difieren muy poco y se encuentran directamente relacionados entre sí, debido a que los compuestos presentes en la fracción de Hex y el $\alpha\text{-T}$ son de origen apolar.

En las hojas se observó que para el extracto etanólico total (EET) y las fracciones Ac, BuOH y AcOEt, la actividad antirradicalaria fue mayor que en los bulbos, y las fracciones de DCM y Hex mostraron que dicha actividad se invierte, siendo la de los bulbos dos veces mayor (figura 20).

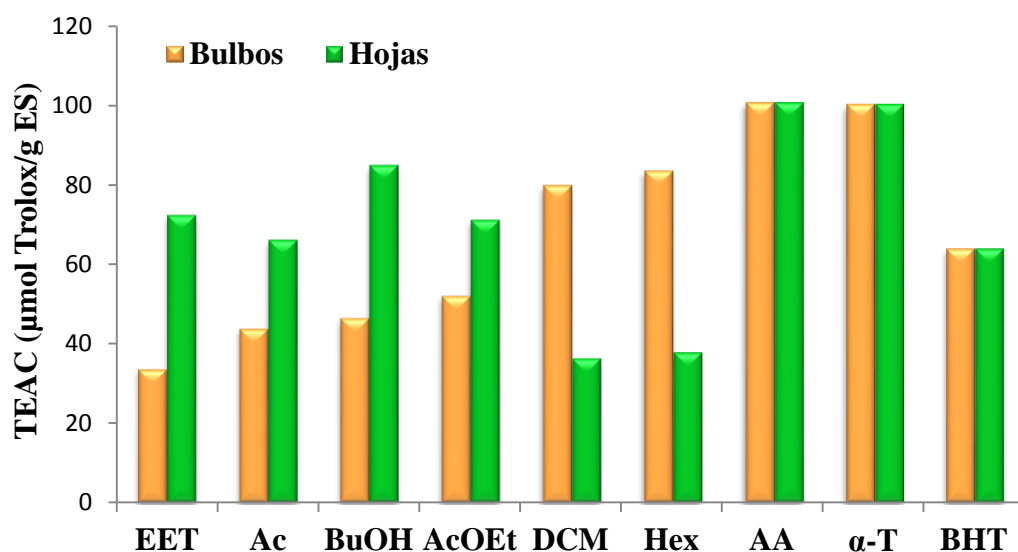


Figura 20. TEAC ($\mu\text{mol trolox/g ES}$) a una concentración de 730 ppm para el extracto etanólico total (ETT) y las fracciones de Hojas y Bulbos de *P. dubia*, obtenidos mediante el método DPPH \cdot .

En el estudio realizado sobre el contenido de fenoles y actividad antioxidante de *C. genus* (77), está directamente relacionado con los resultados obtenidos para las hojas de *P. dubia*, encontrándose que las fracciones de BuOH y AcOEt, muestran comportamientos análogos para ambas especies e indicando la fracción de BuOH como la más promisorio para la obtención de metabolitos con alta actividad antioxidante.

7.2.3. Actividad antioxidante determinada por el método del 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (ABTS⁺).

Otro de los métodos utilizados para determinar la capacidad de un antioxidante para captar radicales libres, y aplicable tanto a antioxidantes lipofílicos como hidrofílicos, es el protocolo de decoloración del catión radical ABTS⁺. Este método es uno de los más aplicados porque se considera un protocolo de elevada sensibilidad, práctico, rápido y muy estable (78). Los resultados obtenidos para las muestras estudiadas se expresaron en TEAC (μmol trólox/g ES) empleando una curva de calibración trolox (figura 21). Los extractos totales y fracciones procedentes de las hojas y bulbos revelaron una alta capacidad antirradicalaria, ante el catión radical ABTS, con valores de TEAC en el rango de $723,210 \pm 0,802$ a $146,800 \pm 2,120$ μmol trolox/g ES y $307,660 \pm 1,070$ a $163,520 \pm 1,060$ μmol trolox/g ES, respectivamente (tabla 9). La fracción de BuOH obtenida de hojas y bulbos es la que presentó mayor actividad, lo que está directamente relacionado con el TPC.

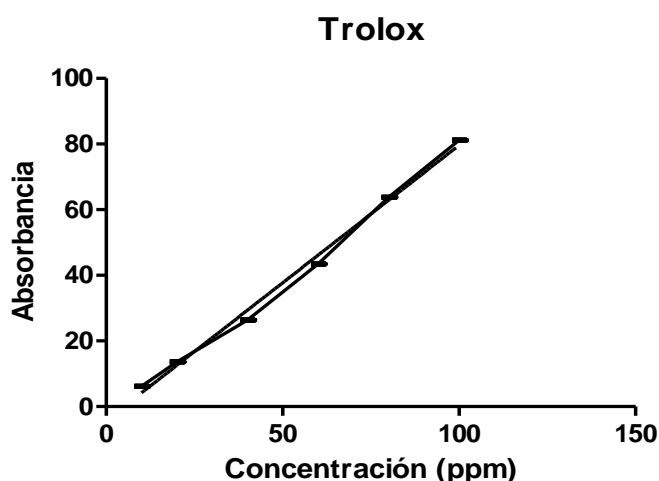


Figura 21. Valores de absorbancia determinados para trólox en diferentes concentraciones, empleadas en la construcción de la curva de calibración para la determinación del TEAC según el método ABTS⁺, donde $Y = 0,838x - 4,1743$ $R^2 = 0,9944$

Los extractos totales provenientes de hojas y bulbos de *P. dubia* y sus diferentes fracciones, presentaron un comportamiento similar al ser evaluada la actividad antioxidante por este método, siendo mayor la actividad en el extracto total y fracciones de hojas. Para las fracciones (Ac, BuOH y AcOEt) obtenidas a partir de las hojas, los valores son dos veces mayor con respecto a las fracciones (Ac, BuOH y AcOEt) provenientes de bulbos (figura 22). Estos resultados indican que los compuestos responsables de la actividad antioxidante son medianamente polares y las hojas presentan un mayor contenido de dichos compuestos.

En la figura 22 los estándares de control positivo utilizados en este método (AA, α -T y BHT), mostraron una alta capacidad antioxidante, siendo BHT el de mayor

actividad. Al realizar una comparación de estos estándares con los extractos totales y las diferentes fracciones provenientes de las muestras estudiadas, se observó que las fracciones obtenidas de los bulbos, presentan una capacidad antioxidante entre dos y cuatro veces menor a la de los estándares empleados, lo que indica que el contenido de compuestos fenólicos es bajo. En cuanto a las hojas, el EET y las subfracciones (Ac, DCM y Hex), exhibieron una capacidad antioxidante entre dos y tres veces menor que la determinada para los estándares utilizados, sobresaliendo las fracciones de BuOH y AcOEt, que como se observa en la figura 22 presentan una actividad muy cercana al BHT, indicando que la actividad antioxidante en estas fracciones es alta.

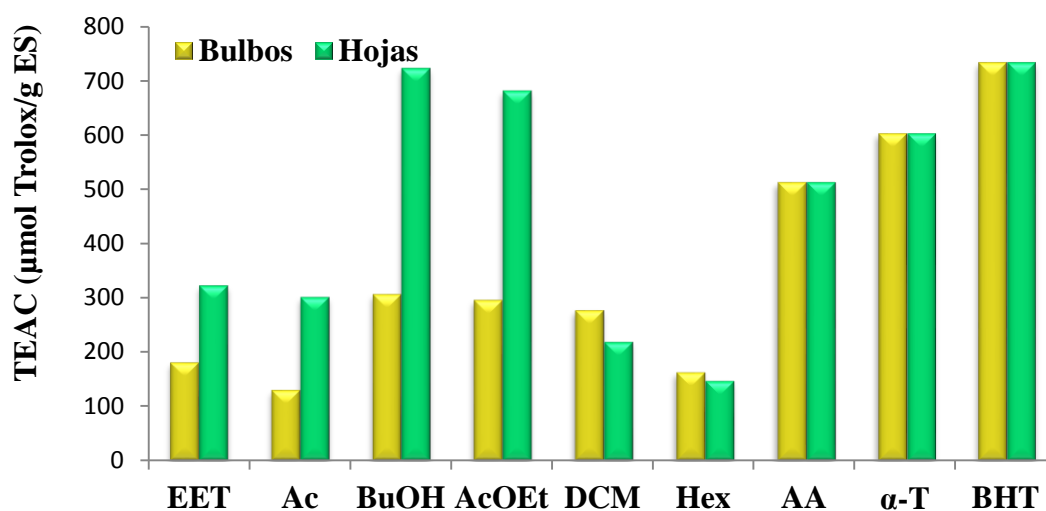


Figura 22. TEAC ($\mu\text{mol trolox/g ES}$) a una concentración de 745 ppm para el extracto etanólico total (ETT) y las fracciones de Hojas y Bulbos de *P. dubia*, obtenidos mediante el método ABTS⁺.

Al comparar los resultados obtenidos para *P. dubia* con los reportados para *C. genus* (77), se encontró que efectivamente los compuestos que presentan mayor capacidad antioxidante son de origen medianamente polar, indicando que la fracción apropiada para extraer dichos compuestos de interés es AcOEt y BuOH. Para estas dos especies coincidentalmente las fracciones que presentaron mayor actividad antioxidante fueron las anteriormente nombradas.

Los resultados muestran que para los extractos y las subfracciones provenientes tanto de hojas como de bulbos de *P. dubia*, los valores correspondientes a la actividad antioxidante determinada por el método ABTS⁺ son mayores a los obtenidos por el método DPPH[·], debido a la baja selectividad del ABTS⁺, que reacciona con cualquier compuesto aromático hidroxilado, independientemente de su potencial antioxidante real (79). Por otro lado, si la capacidad antioxidante de los extractos de hojas y bulbos se debe a la presencia de ácidos fenólicos, flavonoides y otro tipo de compuestos fenólicos, se debe tener en cuenta que el DPPH[·] es más selectivo que el ABTS⁺ y, a diferencia de este último, no reacciona con los flavonoides carentes de grupos hidroxilo en el anillo B, ni con ácidos aromáticos que contengan un solo grupo hidroxilo (79). Este hecho explica

los valores TEAC inferiores en el método DPPH· con respecto al ABTS⁺. Debe señalarse que, a pesar de las diferencias metodológicas, los resultados obtenidos con los métodos ABTS⁺ y DPPH· permiten obtener conclusiones prácticamente similares (tabla 98 en el caso de las hojas).

7.2.4. Correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales.

La determinación de la actividad antioxidante mediante los métodos DPPH· y ABTS⁺, permitió establecer que las fracciones evaluadas tanto para hojas como para bulbos de *P. dubia*, las más promisorias y con actividad antioxidante significativa fueron BuOH y AcOEt. Con base en esta observación y teniendo en cuenta que cada técnica tiene diferentes condiciones de reacción y solubilidad, es posible inferir que los extractos contienen diversos compuestos con potencial antioxidante.

El análisis de correlación entre la actividad captadora de radicales, DPPH· y ABTS⁺, y el contenido de fenoles totales, de los extractos de hojas y bulbos, muestra una correlación positiva media. Las correlaciones no son completamente lineales porque el método de Folin-Ciocalteu es específico para compuestos fenólicos, y la actividad antioxidante también puede ser exhibida por compuestos no fenólicos. Además es posible que se presenten interacciones antagonistas o sinergistas entre los compuestos fenólicos y otros metabolitos que pueden afectar la actividad. Para el extracto obtenido de hojas la relación entre el contenido de fenoles y la capacidad captadora de radicales DPPH· ($r^2 = 0,765$) y ABTS⁺ ($r^2 = 0,825$), sugiere que entre 76,500 y 82,500% de la actividad evaluada para las fracciones de hojas de *P. dubia* resulta de la contribución de los compuestos fenólicos. Para los bulbos la relación entre el contenido de fenoles y la capacidad captadora de radicales DPPH· ($r^2 = 0,043$) y ABTS⁺ ($r^2 = 0,882$), sugiere que el 4,320 % y 88,240 % de la actividad evaluada para el extracto etanólico total y las fracciones provenientes de bulbos de *P. dubia* resulta de la presencia de los compuestos fenólicos.

7.3. Actividad citotóxica del extracto etanólico total proveniente de hojas y bulbos de *P. dubia* determinada mediante bioensayo con *Artemia salina*

La actividad citotóxica permite vislumbrar un posible uso de extractos obtenidos de esta planta, en el tratamiento de enfermedades como la malaria o el cáncer, esta prueba necesariamente se debe complementar con los respectivos estudios preclínicos y clínicos para su uso.

Las muestras evaluadas se clasificaron según la toxicidad, tomando como referencia las recomendaciones del programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) 1995 (65).

Los resultados obtenidos de hojas y bulbos de *P. dubia* (tabla 10), expresados como CL₅₀ (µg/mL), lo cual se define como la concentración que inhibe el 50 % de la población, en lo que se refiere a actividad biológica preliminar, encontrándose valores de CL₅₀ de 34.418±0,934 y 25.210±0,481 µg/mL para la toxicidad

crónica, clasificándose como altamente tóxico (tabla 9), para los extractos etanólicos totales provenientes de hojas y bulbos de *P. dubia*, en cuanto a la toxicidad aguda se encontraron valores de CL₅₀ de 86.475 ±1,360 µg/mL para el extracto etanólico total proveniente de hojas, clasificándose como altamente tóxico y CL₅₀ de 255.739 ±3,040 µg/mL para el extracto etanólico total de los bulbos, siendo moderadamente tóxico.

Tabla 9. Clasificación toxicidad según CYTED

Nº	Categoría	CL ₅₀ (µg/mL)
I	Extremadamente tóxico	1-10
II	Altamente tóxico	10-100
III	Moderadamente tóxico	100-500
IV	Ligeramente tóxico	500-1000
V	Prácticamente no toxico	1000-1500
VI	Relativamente inocuo	>1500

De acuerdo con estos resultados se puede decir que los extractos procedentes de hojas y bulbos de *P. dubia* presentaron toxicidad para *A. salina*. Además, la actividad citotóxica de las muestras evaluadas se comparó empleando como control positivo dicromato de potasio, el cual presento un CL₅₀ de 8.124 µg/mL, por lo que se podría inferir que este organismo es muy sensible a este compuesto

Tabla 10. Actividad citotóxica del extracto etanólico total (ETT) de bulbos y hojas de *P. dubia*, obtenida por el método de *A. salina* (63).

	CL ₅₀ (µg/mL)	
	6 horas * (aguda)	24 horas * (crónica)
Bulbos	255.739±3,040	25.210±0,481
Hojas	86.475±1,360	34.418±0,934
Dicromato de potasio	8.124±0,132	8.124±0,132

*= resultados expresados CL₅₀ ± desviación estándar, CL₅₀: concentración letal 50

El extracto procedente de bulbos de *P. dubia* exhibe una toxicidad crónica mayor, comparada con la establecida para extracto proveniente de hojas (figura 23), debido a la diferencia en el contenido de metabolitos secundarios, responsables de dicha toxicidad.

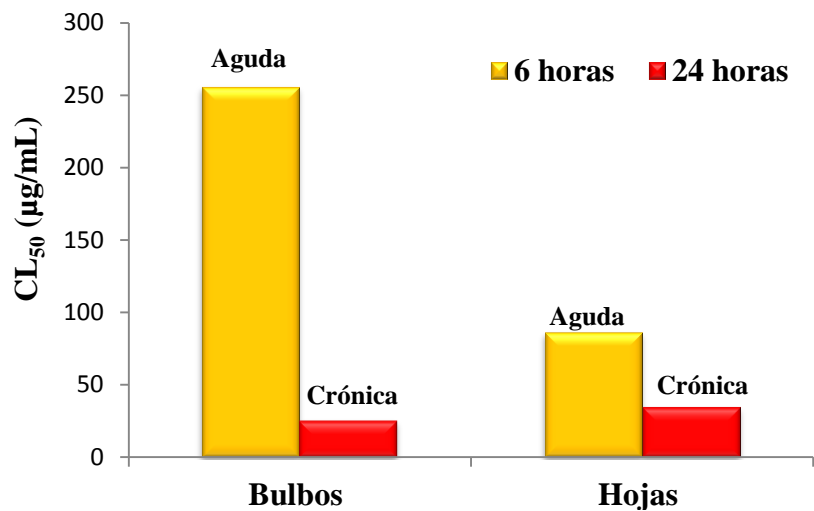


Figura 23. Toxicidad aguda y crónica del extracto etanólico total de bulbos y hojas de *P. dubia*, obtenida mediante el bioensayo de *A. salina*.

El valor de CL_{50} , determinado mediante este bioensayo, no muestra una actividad fisiológica o biológica en particular; es indicador de toxicidad a nivel celular, que puede orientar investigaciones futuras, en busca de nuevos fitofármacos.

7.4. Actividad de inhibición enzimática

Los extractos etanólicos totales de hojas y bulbos de *P. dubia* presentaron una inhibición favorable (tabla 11), sobre las enzimas acetilcolinesterasa, asociada a la enfermedad de Alzheimer y hialuronidasa, asociada a problemas de envejecimiento.

7.4.1. Actividad de inhibición sobre la acetilcolinesterasa

Los extractos etanólicos totales provenientes de hojas y bulbos de *P. dubia* fueron evaluados con respecto a su capacidad de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa. Los resultados mostraron que estos extractos fueron capaces de influenciar en la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa de manera importante a una concentración de 1 mg/mL. Los valores del porcentaje de inhibición fueron mayores al 50 % (tabla 11), observándose un comportamiento creciente para ambos extractos (figura 24).

Extractos vegetales que presentan actividad de inhibición mayor a 50% son descritos como potentes inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa, considerados con actividad de inhibición entre 15 y 50 % son descritos como de actividad baja a moderada; extractos con actividad inhibitoria de 15 % son consideradas como un resultado falso-positivo (41, 46).

El patrón de eserina empleado en este análisis, es un inhibidor reversible de corta duración en la actividad de la acetilcolinesterasa, utilizado como control positivo en los ensayos de inhibición enzimática. La eserina es un alcaloide indólico obtenido de la planta *Physostigma venenosum*. Una curva de respuesta fue diseñada con las concentraciones de eserina entre 7,812 y 1000,000 $\mu\text{g/mL}$, obteniéndose un intervalo de inhibición entre 34.416 % y 90.904 %, con un IC_{50} igual a $39,250 \pm 0,020 \mu\text{g/mL}$.

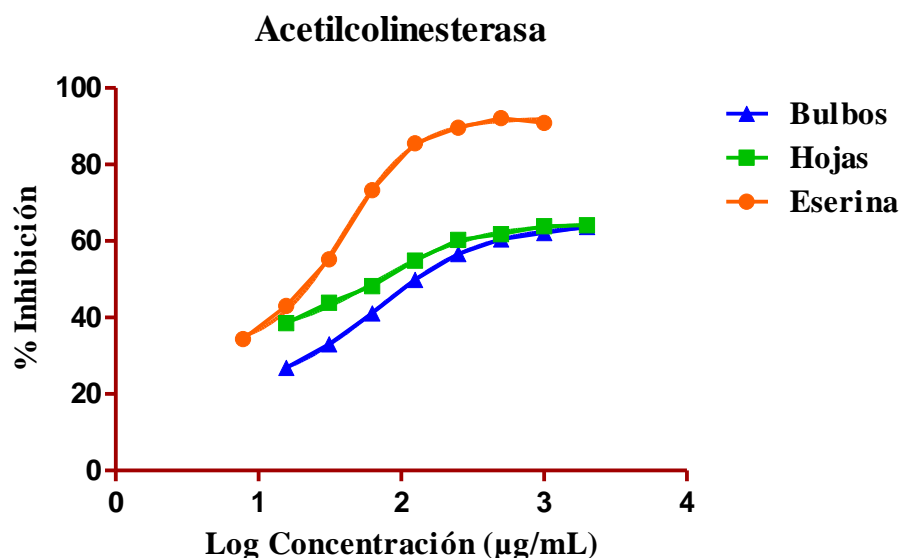


Figura 24. Porcentaje de inhibición enzimática del extracto etanólico total de hojas y bulbos de *P. dubia* evaluado a diferentes concentraciones, sobre la enzima acetilcolinesterasa asociada a la enfermedad de Alzheimer.

Tabla 11. Porcentaje de inhibición y concentración en el cual el porcentaje de inhibición es del 50% (CL₅₀) del extracto etanólico total de hojas y bulbos de *P. dubia* sobre diferentes enzimas.

ENZIMA	HOJAS		BULBOS		PATRON	
	% Inhibición	IC ₅₀ *	% Inhibición	IC ₅₀ *	% Inhibición	IC ₅₀ *
Acetilcolinesterasa	64,091±0,010	67,840±0,010	63.670±0,042	67,730±0,042	85,515±0,020 ^a	39,250±0,020 ^a
Hialuronidasa	59,016±0,026	78,330±0,026	53,115±0,017	84,380±0,017	86,042±0,010 ^b	16,290±0,010 ^b
Tirosinasa	NI	NI	NI	NI	79,615±0,013 ^c	47,750±0,013 ^c
α-Amilasa	NI	NI	NI	NI	99,956±0,010 ^d	7,869±0,010 ^d
α-Glucosidasa	NI	NI	NI	NI	60,848±0,021 ^d	149,500±0,021 ^d

*= μg/mL, (a). Eserina, (b). Acido tánico, (c). Ácido kójico,(d) Ascarbosa, NI (No presento inhibición), IC₅₀: concentración en la cual el porcentaje de inhibición es del 50%.

Para el extracto etanólico total procedente de hojas y bulbos de *P. dubia* se realizó una curva de respuesta con concentraciones entre 15.625 y 2000,000 $\mu\text{g/mL}$, encontrándose intervalos de inhibición para el extracto etanólico total de hojas de $38.513 \pm 0,013 \%$ y $64.091 \pm 0,010 \%$, con IC_{50} igual a $67.84 \pm 0,010 \mu\text{g/mL}$, y para el extracto etanólico total de bulbos de $26.879 \pm 0,012 \%$ y $63.670 \pm 0,042\%$, con IC_{50} igual a $67.730 \pm 0,042 \mu\text{g/mL}$ (tabla 11).

De acuerdo a estos resultados se puede evidenciar que la capacidad de inhibición enzimática sobre acetilcolinesterasa del extracto etanólico total de hojas y bulbos de *P. dubia*, presenta un valor IC_{50} dos veces mayor que el encontrado para la eserina, lo que indica una inhibición favorable para los dos extractos etanólicos de *P. dubia*, ya que a menor IC_{50} , mayor inhibición enzimática (figura 25), dicha inhibición puede ser debido a la presencia de metabolitos secundarios como alcaloides de tipo galantamina y licorina, los cuales por efectos de sinergia, actúan como potentes inhibidores de acetilcolinesterasa, además de resaltar que diferentes estudios han demostrado que varias especies de la familia **Amaryllidaceae** poseen distintos tipos de alcaloides como sanguinina, galantamina y licorina, los cuales son reconocidos como potentes inhibidores enzimáticos.

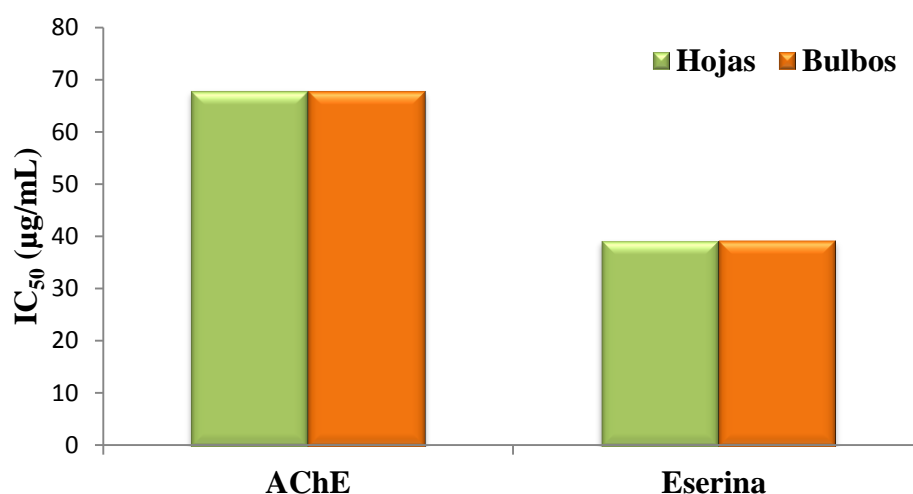


Figura 25. Inhibición enzimática sobre acetilcolinesterasa expresada como IC_{50} para el extracto etanólico total de hojas y bulbos de *P. dubia*, comparada con el estándar de eserina.

7.4.2. Actividad de inhibición sobre la hialuronidasa

Se observó un comportamiento creciente en la inhibición de la enzima hialuronidasa en extractos de *P. dubia* provenientes tanto de hojas como de bulbos (figura 26), el extracto etanólico obtenido a partir de las hojas, presentó mayor capacidad inhibitoria, alcanzando un porcentaje de $59,016 \pm 0,026 \%$ a una concentración de $1428 \mu\text{g/mL}$ (tabla 11). Esto puede deberse principalmente a las diferencias en el contenido de compuestos fenólicos presentes en los extractos.

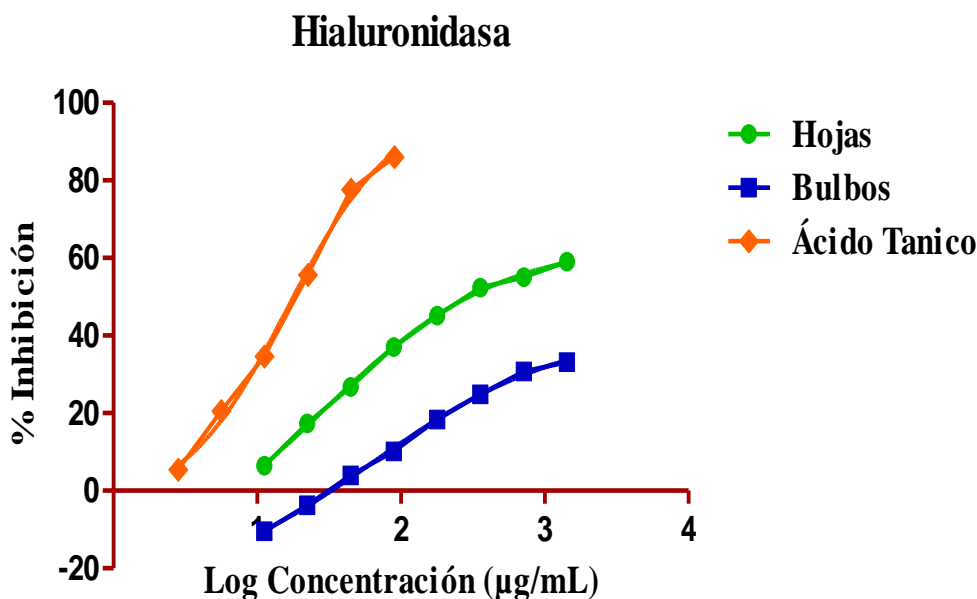


Figura 26. Porcentaje de inhibición enzimática del extracto etanólico total de hojas y bulbos de *P. dubia* evaluado a diferentes concentraciones, sobre la enzima hialuronidasa asociada a problemas de envejecimiento.

Los compuestos fenólicos, contribuyen mayoritariamente en la inhibición enzimática de hialuronidasa, pero en este caso no se podría decir exactamente qué tipo de compuestos están promoviendo dicha inhibición, debido a que el análisis realizado al extracto etanólico de hojas y bulbos por CLAR/DAD, indicando como resultado la presencia de un solo compuesto en cada extracto, pero mostrando un espectro con diferentes picos no identificados (anexo 5, figura 1 y 2), lo que indica que los extractos si poseen compuestos fenólicos, pero debido a que la base de datos empleada no es muy amplia, no se lograron identificar todos los compuestos de origen fenólico.

El extracto etanólico de las hojas presentó una inhibición superior al 50 %, lo que indica que posiblemente los picos que se observan en el espectro son de origen fenólico (anexo 5, figura1). En cuanto al extracto etanólico total de bulbos, se encontró una inhibición de $53,115 \pm 0,017$ % a una concentración de $1428 \mu\text{g/mL}$, indicando que los compuestos fenólicos causantes de la inhibición enzimática son pocos.

En cuanto a los valores de IC_{50} , se encontró que el estándar de ácido tánico es entre seis y siete veces menor comparado con los valores obtenidos para el extracto etanólico total de hojas y bulbo de *P. dubia* (figura 27), demostrando ser un potente inhibidor de hialuronidasa e indicando además que la capacidad de inhibición enzimática proveniente de los metabolitos presentes en dichos extractos es media, ya que a menor IC_{50} , mayor actividad.

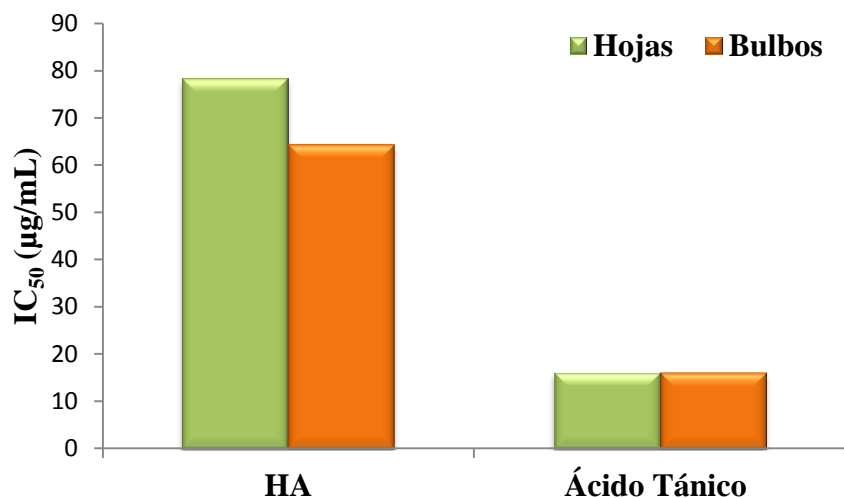


Figura 27. Inhibición enzimática sobre hialuronidasa (HA) expresada como IC_{50} para el extracto etanólico total de hojas y bulbos de *P. dubia*, comparada con el estándar de ácido tánico.

7.4.3. Actividad de inhibición sobre la tirosinasa

Se piensa que el uso de agentes reguladores de tirosinasa puede ser importante en el tratamiento de la enfermedad melanoma, ya que una de las principales características de estos tumores es la alta actividad de tirosinasa y el alto contenido de melanina. Entre los agentes reguladores de tirosinasa, los compuestos difenólicos se pueden usar como agentes despigmentadores, debido a su capacidad para actuar como sustrato alternativo de tirosinasa.

Los resultados de actividad inhibitoria de tirosinasa para el extracto etanólico de las hojas y bulbos de *P. dubia* fueron muy pequeños, comparados con el obtenido para el estándar de ácido kójico (anexo 3, figura 1), lo que indica que los compuestos presentes en los extractos etanólicos no presentan inhibición sobre dicha enzima (tabla 11). El ácido kójico empleado como control positivo presento como $IC_{50} 47,750 \pm 0,013 \mu\text{g/mL}$.

7.4.4. Actividad de inhibición sobre la α -amilasa

La α -amilasa, enzima salival o pancreática juega un papel importante en la hidrólisis del almidón, produciendo azúcares simples como glucosa y maltosa. Los extractos etanólicos totales de hojas y bulbos de *P. dubia*, no exhibieron capacidad de inhibir la actividad de esta enzima (1,915 – 9,308 %) a las concentraciones estandarizadas de 31,250 -1000,000 $\mu\text{g/mL}$ (anexo 3, figura 3), los cuales fueron menos efectivos comparados con el patrón de acarbosa (99,956 %, $IC_{50} 7,869 \mu\text{g/mL}$) (tabla 11). La inhibición de esta enzima puede retardar la digestión de carbohidratos y reducir la velocidad de absorción de glucosa, y consecuentemente podría disminuir los niveles de glucosa en sangre.

7.4.5. Actividad de inhibición sobre la α -glucosidasa

Las enzimas glucosidasas localizadas en los vellos de la superficie de la membrana intestinal son enzimas clave en la digestión de carbohidratos. La administración oral de inhibidores de glucosidasas retarda la digestión y absorción de carbohidratos regulando así, el incremento de la glucosa en sangre. Se utilizó acarbosa como inhibidor de referencia, mostrando una inhibición del 80,584 % con IC₅₀ de 145,000 $\mu\text{g/mL}$. Los extractos etanólicos totales de hojas y bulbos de *P. dubia* no exhibieron capacidad de inhibir la actividad de esta enzima (0,315 – 29,279 %) a las concentraciones estandarizada de 7,812-1000,000 $\mu\text{g/mL}$, ya que los compuestos presentes en estos no presentan inhibición sobre esta enzima, siendo menos efectivos comparados con el medicamento acarbosa (anexo 3, figura 2). Esta enzima es clave para metabolizar los oligosacáridos no absorbibles en monosacáridos absorbibles en el intestino delgado. La inhibición de estas enzimas retarda la digestión de oligosacáridos, disacáridos y monosacáridos, disminuyendo la absorción de la glucosa.

7.5. Compuestos nitrogenados cuantificados por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM)

En el análisis del extracto metanólico total de las hojas de *P. dubia* se pudo determinar la presencia de diversos alcaloides. De los alcaloides detectados, cabe destacar el pico con tiempo de retención (RT) de 21.8205, que corresponde al alcaloide mayoritario y el pico con RT de 21.5402, que corresponde al pico minutorio en hojas. Dichos picos se tratan de Sanguinina y Galantamina (tabla 14). En el extracto metanólico total proveniente de los bulbos se encontraron estos mismos alcaloides con tiempos de retención muy similares a los encontrados en las hojas, Sanguinina con un RT de 21.8180 y Galantamina con un RT de 21.5250. Cabe resaltar que estos resultados se obtuvieron comparando los espectros de masas obtenidos con los de la base de datos, del laboratorio de Productos Naturales, Biología Vegetal y Edafología, Facultad de Farmacia, de la universidad de Barcelona, existiendo coincidencia con los alcaloides mencionados.

La presencia de estos alcaloides es muy significativa, actualmente poseen gran importancia en el ámbito farmacológico, especialmente en tratamientos de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, siendo potentes inhibidores de la acetilcolinesterasa, enzima asociada a esta enfermedad. Además, anteriormente se mencionó algunos de los estudios ya realizados en el tratamiento de múltiples enfermedades.

En el extracto proveniente de bulbos, a diferencia del obtenido de las hojas, el segundo alcaloide más abundante es la licorina. Éste es el alcaloide más característico y común en la familia **Amarillydaceae** y se considera un fuerte inhibidor de la biosíntesis del ácido ascórbico (L-Asc) (80, 81).

Los alcaloides de origen natural como la galantamina, sanguinina y licorina comunes de la familia **Amaryllidaceae**, por efectos de sinergia presentan una inhibición potencial sobre la acetilcolinesterasa, incluso mucho mayor que los de origen sintético (82). En los bulbos de *P. dubia* se observó la presencia de estos tres alcaloides (tabla 12), lo que hace a esta especie muy promisorio desde el punto de vista terapéutico.

Tabla 12. Compuestos nitrogenados (Alcaloides) obtenidos en el extracto metanólico total de hojas y bulbos de *P. dubia* mediante CG/EM.

ALCALOIDE	BULBOS			HOJAS		
	TR	IK	% Área	TR	IK	% Área
Galantamina	21,5250	2406,00	0,059	21,5402	2406,00	0,017
Sanguinina	21,8180	2422,00	0,019	21,8205	2422,00	0,024
Narwedina	22,8032	2483,00	0,003	ND	ND	ND
8-O-demetilmaritidina	23,2278	2510,00	0,028	ND	ND	ND
Diacetilcantabricina	23,8652	2558,00	0,024	ND	ND	ND
Licorina	26,9102	2746,00	0,030	ND	ND	ND
Pseudolicorina	27,8971	2830,10	0,064	ND	ND	ND

TR: tiempo de retención, IK: índice de kovats

7.6. Cuantificación de azúcares libres por (CLAR/IR) y (CG/EM).

El análisis de azúcares libres presentes en los extractos etanólicos de hojas y bulbos de *P. dubia* se desarrolló por el método de patrón externo por CLAR/IR. La determinación de estos azúcares se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención de los azúcares presentes en el extracto y los patrones contenidos en la biblioteca del equipo CLAR del laboratorio de control de calidad de medicamentos de la Universidad de Brasilia. Y la determinación de azúcares libres por CG/EM se realizó en el extracto etanólico de hojas y bulbos de *P. dubia* en el Laboratorio de Productos Naturales, Biología Vegetal y Edafología, Facultad de Farmacia, de la universidad de Barcelona, existiendo coincidencia con los alcaloides mencionados.

En el extracto etanólico de hojas y bulbos se identificaron los mismo azúcares, a excepción de trealosa, que solo está presente en el extracto etanólico de bulbos (tabla 13 y 14). Además se encontró que el contenido de azúcares libres en los extractos está compuesto por monosacáridos (fructosa, manosa, arabinosa), disacáridos (maltosa, trealosa) y oligosacáridos (rafinosa), los cuales son carbohidratos de bajo peso molecular.

Tabla 13. Azúcares libres presentes en el extracto etanólico total de bulbos de *P. dubia* cuantificados por CLAR/IR y CG/EM

Azúcar	CLAR/IR		CG/EM	
	TR	Área	TR	Área
Manosa/Arabinosa	6,883	573747	ND	ND
Fructosa	7,923	229729	12,640	88883058
Sucrosa	ND	ND	25,783	31020443
Maltosa	11,690	492405	ND	ND
Trealosa	19,457	236977	ND	ND
Talosa	ND	ND	15,164	30838410
Rafinosa	21,977	246837	ND	ND
D-Glucosa	ND	ND	13,745	22319621

TR: tiempo de retención, CLAR/IR: cromatografía líquida de alta resolución con detector de índice de refracción, CG/EM: cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa.

Tabla 14. Azúcares libres determinados en el extracto etanólico de hojas de *P. dubia* por CLAR/DAD y CG/EM.

Azúcar	CLAR/IR		CG/EM		
	T.R.	Área	T.R.	R.I.	Área
Manosa/Arabinosa	6,877	102295	ND	ND	ND
Fructosa	7,807	168540	12,640	1900,3	58125179
Sucrosa	ND	ND	25,783	2766,2	90793627
Maltosa	11,693	202918	ND	ND	ND
Rafinosa	21,903	56307	ND	ND	ND
D-Glucosa	ND	ND	13,745	1975,0	18018512
Talosa	ND	ND	15,164	2066,2	24569650

TR: tiempo de retención, CLAR/IR: cromatografía líquida de alta resolución con detector de índice de refracción, CG/EM: cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa, Área: Unidades instrumentales de área.

7.7. Cuantificación de compuestos fenólicos en el extracto etanólico total de hojas y bulbos de *P. dubia* por CLAR-DAD.

En la detección por CLAR de compuestos fenólicos como flavonoides, generalmente se utilizan sistemas de elución binarios, con un solvente polar acuoso acidificado con: ácido acético, ácido fórmico, ácido fosfórico, ácido perclórico y un solvente orgánico menos polar como metanol o acetonitrilo posiblemente acidulado (83) variando las condiciones según el tipo de compuesto fenólico y en su gran mayoría las separación se logra con una columna de ODS (RP-18 o C18).

En gran parte su detección está basada en la absorción UV-Vis y una sola longitud de onda no es ideal para todas las clases de compuestos fenólicos, puesto que estos muestran máximos de absorción a diferentes longitudes de onda. Es muy común el uso de un detector de arreglo de diodos DAD (el cual permite la cuantificación simultánea a diferentes longitudes de onda (84).

En el análisis realizado se encontró que el espectro obtenido para las muestras estudiadas, indica una variedad de picos no identificados por la base de datos del CLAR (anexo 5), por lo tanto se infiere que el contenido de compuestos fenólicos en las muestras es mayor, pero debido a que el CLAR empleado en la investigación cuenta con una base de datos limitada, solo se lograron identificar dos compuestos. Los resultados se obtuvieron mediante la comparación de los tiempos de retención (tabla 15) de compuestos fenólicos disponibles en la biblioteca del CLAR del laboratorio de control de calidad de medicamentos de la Universidad de Brasilia.

Tabla 15. Compuestos fenólicos en el extracto etanólico total de bulbos y hojas de *P. dubia* cuantificados por CLAR/DAD

Componente	Bulbos		Canal
	TR (Min)	Similaridad	
Epicatequina ¹	18,6000	0,9301	DAD-CH2 280 nm
Hojas			
Ácido clorogénico ²	13,9667	0,9993	DAD-CH1 354nm

¹Librería:C:\EZChromElite\Enterprise\Projects\Erythroxyllum\espectrallibery\epicatequina.lib.

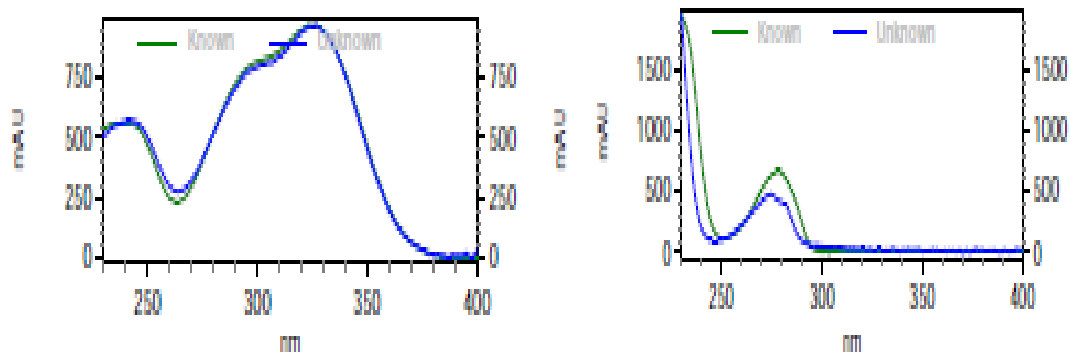
Fuente:C:\EZChromElite\Enterprise\Projects\Erythroxyllum\data\Paloma10012012\10012012\Epicatequinapadrão.dat

²Librería: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Erythroxyllum\espectral libery\Ácido Clorogénico.lib,

Fuente: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Erythroxyllum\data\19012012 Evelone\ácido clorogénico 1mg.dat

Los tiempos de retención obtenidos para estos compuestos fenólicos resultaron cercanos al tiempo de retención de los patrones, realizándose una confirmación de dichos compuestos mediante un análisis comparativo espectral UV-vis con los patrones de cada uno de los picos identificados. Tal como se observa en la figura 28 a y b. Se encontró que los picos de las muestras presentan los mismos máximos de absorción y la misma forma del espectro que los patrones correspondientes,

permitiendo confirmar la identidad de los picos de ácido clorogénico en hojas ($\lambda_{\max}=216,9$ nm y 325 nm) y epicatequina en bulbos ($\lambda_{\max}=276$ nm).



a).Espectro UV. Ácido clorogénico

b). Espectro UV. Epicatequina

Figura 28. Espectros de absorción UV-VIS entre 200 y 400 nm de los compuestos fenólicos identificados preliminarmente por la técnica CLAR-DAD en hojas y bulbos de *P. dubia*. Los compuestos fenólicos identificados fueron ácido clorogénico (a) y Epicatequina (b), donde la línea verde es el patrón, y la línea azul es el derivado presente en el extracto.

8. CONCLUSIONES

En la especie vegetal *P. dubia*, mediante tamizaje fitoquímico se estipuló la presencia de metabolitos secundarios pertenecientes a los grupos químicos siguientes: alcaloides, flavonoides, triterpenos y/o esteroides, saponinas y cardiotónicos.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran claramente que las hojas de *P. dubia* pueden ser una fuente natural de compuestos con actividad antioxidantes con potencial aplicación en la industria farmacéutica.

La alta actividad encontrada en los diferentes extractos bajo los dos modelos *in vitro* (DPPH, ABTS) evaluados. En particular, los extracto de butanol y acetato de etilo presentaron mayor contenido de fenoles y alta actividad captadora de radicales, superando inclusive al BHT, lo que constituye a esta fracción en una fuente potencial de sustancias antioxidantes de polaridad media, como compuestos de origen fenólicos.

El bioensayo con *Artemia Salina*, permitió establecer que la concentración letal 50 de los extractos etanólicos de bulbos y hojas presentaron valores de $25.210 \pm 0,481$ $\mu\text{g/mL}$ y $34.418 \pm 0,934$ $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, considerandos como altamente toxico, dicha toxicidad depende de la presencia de diversos metabolitos secundarios en alta cantidad.

La técnica cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector de arreglo de diodos, permitió detectar la presencia de compuestos derivados de ácido clorogénico en hojas y epicatequina en bulbos, siendo estos potentes antioxidantes de origen natural.

El análisis mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas del extracto etanólico de bulbos de *P. dubia*, permitió la identificación de alcaloides como galantamina, saguinina, licorina y pseudolicorina. Determinándose un posible nuevo alcaloide que podría estar relacionado con el alcaloide: 8-*O*-dimetilmaritidina.

El análisis mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas del extracto etanólico de hojas de *P. dubia*, permitió la identificación de alcaloides como galantamina y licorina.

Se determinó a través de un análisis espectrofotométrico, que los extractos etanólicos totales de hojas y bulbos de *P. dubia*, presentan actividad inhibitoria sobre la enzima acetilcolinesterasa, debido a la presencia de alcaloides como galantamina, sanguinina y licorina, los cuales son potentes inhibidores de dicha enzima.

El análisis de inhibición sobre hialuronidasa, para el extracto etanólico total de hojas y bulbos de *P. dubia*, manifestó una inhibición mayor al 50 %, lo que indica

que los metabolitos presentes en dichos extractos, especialmente compuestos de origen fenólico, protegen la degradación del ácido hialurónico ante la enzima hialuronidasa.

Se determinó que los extractos etanólicos de hojas y bulbos de *P. dubia*, no mostraron ningún tipo de inhibición sobre las enzimas α -glucosidasa, α -amilasa y tirosinasa, indicando que los metabolitos presentes en dichos extractos no poseen inhibición sobre dichas enzimas.

9. RECOMENDACIONES

Los metabolitos identificados en los diferentes extractos etanólicos de hojas y bulbos de *P. dubia* poseen características químicas que están asociadas con la capacidad captadora de radicales. Sin embargo, son necesarias futuras investigaciones respecto al mecanismo y la evaluación de la capacidad antioxidante de los compuestos individuales presentes en dichos extractos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el bioensayo de *A. salina*, se recomienda la realización de ensayos de toxicidad *in vivo*, ya que este bioensayo no muestra una actividad fisiológica o biológica en particular; es solo un indicador de toxicidad a nivel celular.

Debido a que la actividad de inhibición enzimática para acetilcolinesterasa de los extractos etanólicos provenientes de hojas y bulbos de *P. dubia* fue superior al 50%, se recomienda realizar estudios preclínicos y clínicos, que permitan establecer el efecto sinérgico de alcaloides inhibidores de esta enzima como galantamina, sanguinina, licorina y pseudolicorina; lo que permitiría en términos de bioprospección emplear extractos provenientes *P. dubia*, como alternativa terapéutica natural para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Anexo 1.
Extracción y tamizaje fitoquímico

Tabla 1. Porcentaje de humedad y de extracción del extracto etanólico total y de las fracciones de hojas y bulbos de *P. dubia*.

	Hojas	Bulbos
% Humedad		
	93,049±1,230	84,645±0,896
% extracción		
ETT	28,779±0,756	2,948±0,278
Ac	46,811±0,654	44,71±0,963
BuOH	8,198±1,245	4,392±0,401
AcOEt	3,999±0,345	2,490±0,578
DCM	2,699±0,189	0,415±0,126
Hex	16,577±0,743	1,027±0,254

*= ± desviación estándar, ETT: extracto etanólico total, Ac: acuosa, BuOH: butanol, AcOEt: acetato de etilo, DCM: diclorometano, Hex: hexano.

Cromatografía en capa fina

- **Identificación de alcaloides**

Se empleó un cromatofolio de sílica gel 60F254 (Merck) de 20 cm x 3 cm. Se aplicó 30 µL del extracto A 1 cm del borde inferior. Como fase móvil se utilizó una mezcla de metanol: acetato de etilo (1:1), y se saturó la cámara cromatográfica (diámetro: 8cm, altura: 28 cm), posteriormente se situó la placa cromatográfica en la cámara y se dejó hasta que la fase móvil alcanzó aproximadamente 18 cm del origen.

La placa desarrollada se secó con aire caliente (utilizando un secador de cabello) y se visualizó en la lámpara UV a una longitud de onda larga (365 nm) y se aspersó con el reactivo de Dragendorff, observándose la fluorescencia coloreada. El valor de R_f de cada componente fue determinado (figura 1).

El reactivo de Dragendorff, está conformado por (a) una solución acuosa de nitrato de bismuto (III), ácido tartárico y (b) una solución acuosa de yoduro de potasio. Se aspersó con (a) y (b) mezclados en iguales proporciones.

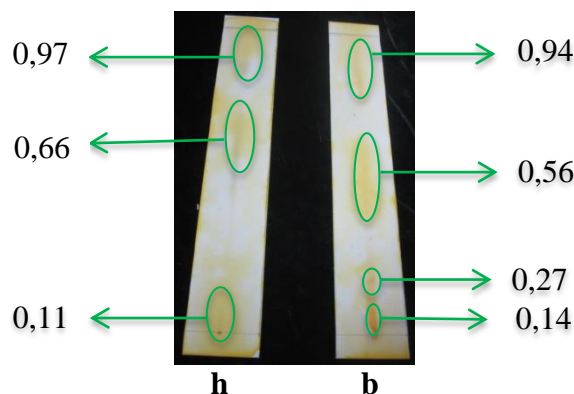


Figura 1. Placa cromatográfica revelada a 365 nm con polietilenglicol, para la identificación de compuestos fenólicos, donde **b**: extracto etanólico de bulbos y **h**: extracto etanólico de hojas.

- **Identificación de flavonoides**

Se empleó un cromatofolio de sílica gel 60F254 (Merck) de 10 cm x 3 cm. Se aplicó 30 µL del extracto A 1 cm del borde inferior. Como fase móvil se utilizó una mezcla de acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua (25:4:4:9), se dejó saturar la cámara cromatográfica (diámetro: 8cm, altura: 11cm), posteriormente se situó la placa cromatográfica en la cámara y se dejó hasta que la fase móvil alcanzó aproximadamente 8 cm del origen.

La placa obtenida se secó con aire caliente (utilizando un secador de cabello) y se visualizó en la lámpara UV a una longitud de onda larga (365nm) y se aspersó con una solución de NP-PEG, observándose la fluorescencia coloreada. El valor de Rf de cada componente fue determinado (figura 2).

El agente cromogénico NP-PEG, compuesto por (a) una solución metanólica al 1% de difenilboriloxietilamina (NP) y (b) una solución etanólica al 5% de polietilenglicol – 400 (PEG). Se aspersó primero con (a), seguido de (b).

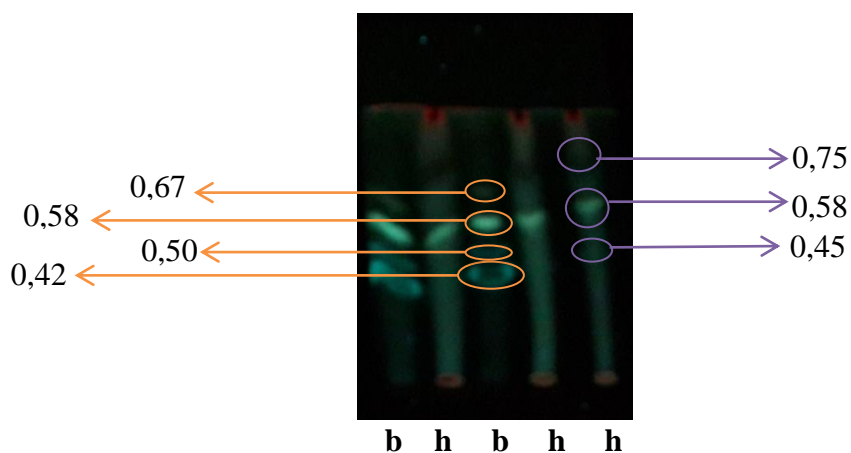


Figura 2. Placa cromatográfica revelada a 365 nm con polietilenglicol, para la identificación de compuestos fenólicos, donde **b**: extracto etanólico de bulbos y **h**: extracto etanólico de hojas.

- Identificación de triperpenos y esteroides

Se empleó un cromatofolio de sílica gel 60F254 (Merck) de 10 cm x 3 cm. Se aplicó 30 μ L del extracto A 1 cm del borde inferior. Como fase móvil se utilizó una mezcla de acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua (25:4:4:9), se dejó saturar la cámara cromatográfica (diámetro: 8cm, altura: 11cm), posteriormente se situó la placa cromatográfica en la cámara y se dejó hasta que la fase móvil alcanzó aproximadamente 8 cm del origen.

La placa obtenida se aspersó con una solución de Anisaldehído, y se calentó a 30 °C observándose manchas coloreadas. El valor de R_f de cada componente fue determinado (figura 3).

La solución de Anisaldehído, está constituida por (a) una solución de Anisaldehído en ácido acético 2% y (b) una solución metanólica de ácido sulfúrico 20%. Se mezcla (a) y (b) para aspersar la placa.

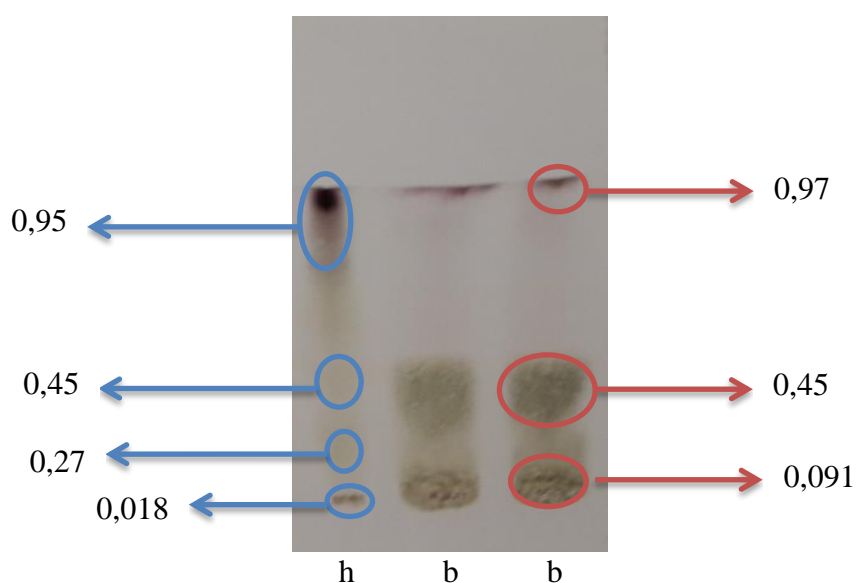


Figura 3. Placa cromatográfica revelada con anisaldehído, para la identificación de terpenos, donde **b**: extracto etanólico de bulbos y **h**: extracto etanólico de hojas.

Tabla 2. Identificación de metabolitos en el extracto etanólico total de hojas y bulbos de *P. dubia* por diferentes métodos colorimétricos según lo propuesto por Sanabria (63).

Prueba	Reactivo	Resultado	
		Hojas	Bulbos
Alcaloides	Dragendorff	+++	+++
	Mayer	++	++
	Wagner	++	++
Cardiotónicos	Reactivo de Baljet	++	++
	Reactivo de Kedde	-	+
	Reactivo de Raymond-Marthoud	-	-
	Reactivo de Keller - Kiliani	++	++
	Reactivo de Liebermann – Burchard	++	-
	Reactivo de salkowski	+	-
Cumarinas volátiles	Volátiles en papel impregnado con NaOH (Observación UV)	-	-
Flavonoides	Ensayo con Mg y HCl	+++	++
	Ensayo con cloruro férrico	-	-
Taninos	Solución de gelatina	-	-
	Solución de gelatina y sal	-	-
	Solución salina	-	-
Saponinas	Formación de espuma	+	+
Triterpenos y/o esteroides	Liebermann - Burchard	+	++
	Salkowski	+	++
Derivados antracénicos libres	Reacción Bomtraeger	-	-

Interpretación de resultados: (-) ausencia del metabolito, (+) poca presencia del metabolito, (++) moderada presencia del metabolito, (+++) alta presencia del metabolito.

Anexo 2.
Actividad antioxidante

Tabla 1. Curva de calibración de ácido gálico a diferentes concentraciones, utilizada para la determinación de compuestos fenólicos en el extracto etanólico total y fracciones de hojas y bulbos de *P. dubia*, por el método Folin- Ciocalteu.

Concentración (ppm)	A1	A2	A3	A prom.	SD	CV
75	0,665	0,661	0,667	0,6643	0,0031	0,4599
65	0,594	0,591	0,602	0,5957	0,0057	0,9546
55	0,495	0,499	0,495	0,4963	0,0023	0,4653
45	0,425	0,418	0,422	0,4217	0,0035	0,8329
35	0,347	0,349	0,348	0,3480	0,0010	0,2874
25	0,276	0,278	0,279	0,2777	0,0015	0,5501
15	0,203	0,205	0,202	0,2033	0,0015	0,7512

ppm: Concentración partes por millón, **A:** Absorbancia, **Aprom:** Absorbancia promedio, **SD:**Desviación estándar, **CV:** Coeficiente de variación.

Tabla 2. Curva de calibración trólox a diferentes concentraciones, empleada para la determinación de la actividad antioxidante del extracto etanólico total y fracciones de hojas y bulbos de *P. dubia*, por el método DPPH•.

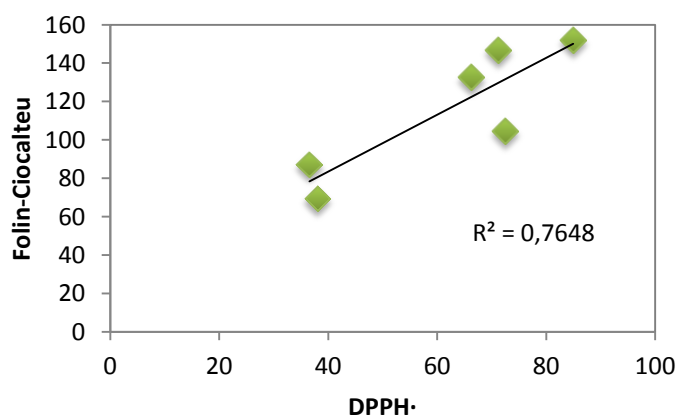
Concentración (ppm)	A1	A2	A3	A prom.	SD	CV
20	0,025	0,027	0,026	0,026	0,0010	3,8462
15	0,203	0,205	0,202	0,203	0,0015	0,7512
13	0,262	0,266	0,264	0,264	0,0020	0,7576
10	0,343	0,346	0,341	0,343	0,0025	0,7330
8	0,395	0,397	0,399	0,397	0,0020	0,5038
5	0,486	0,483	0,484	0,484	0,0015	0,3154
0	0,543	0,539	0,54	0,541	0,0021	0,3850

ppm: Concentración partes por millón, **A:** Absorbancia, **Aprom:** Absorbancia promedio, **SD:**Desviación estándar, **CV:** Coeficiente de variación.

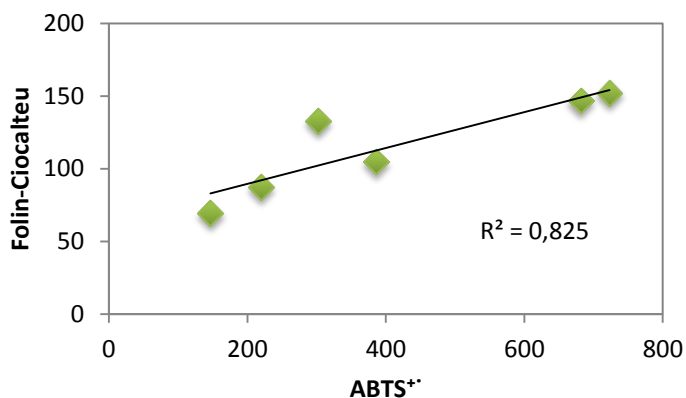
Tabla 3. Curva de calibración trólox a diferentes concentraciones, empleada para la determinación de la actividad antioxidante del extracto etanólico total y fracciones de hojas y bulbos de *P. dubia*, por el método ABTS⁺.

Concentración (ppm)	A1	A2	A3	A prom.	SD	CV
100	0,147	0,146	0,148	0,147	0,0010	0,6803
80	0,285	0,284	0,281	0,283	0,0021	0,7347
60	0,443	0,444	0,441	0,443	0,0015	0,3451
40	0,577	0,576	0,576	0,576	0,0006	0,1002
20	0,678	0,676	0,675	0,676	0,0015	0,2259
10	0,733	0,734	0,736	0,734	0,0015	0,2080
0	0,789	0,783	0,778	0,783	0,0055	0,7031

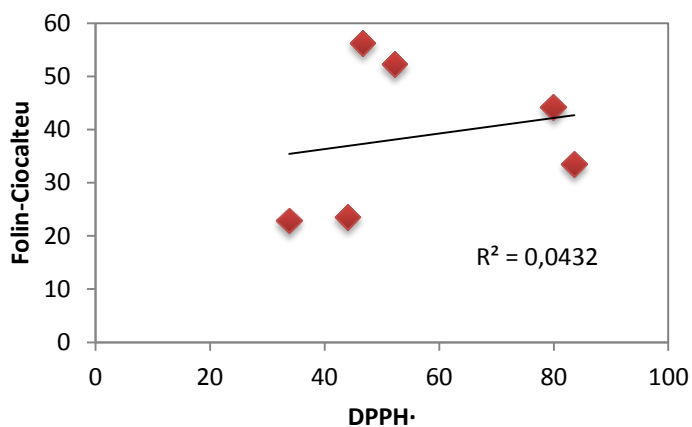
ppm: Concentración partes por millón, **A:** Absorbancia, **Aprom:** Absorbancia promedio, **SD:**Desviación estándar, **CV:** Coeficiente de variación.



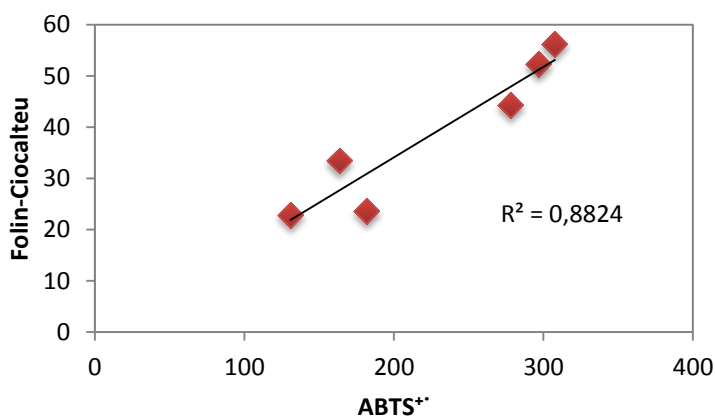
Grafica 1. Correlación entre el contenido de fenoles totales, obtenidos mediante el método Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante encontrada por el método DPPH•, para el extracto etanólico total y las fracciones de hojas de *P. dubia*.



Grafica 2. Correlación entre el contenido de fenoles totales, obtenidos mediante el método Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante encontrada por el método ABTS⁺⁺, para el extracto etanólico total y las fracciones de hojas de *P. dubia*.

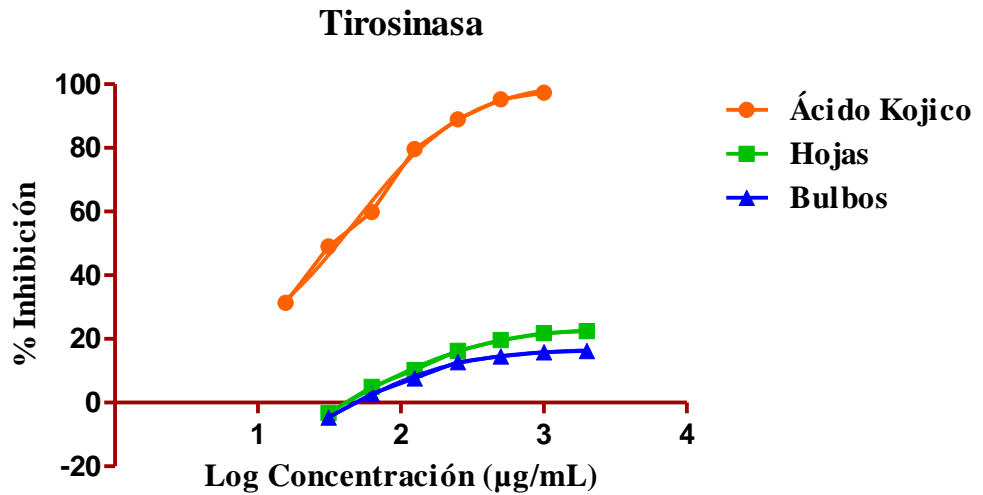


Grafica 3. Correlación entre el contenido de fenoles totales, obtenidos mediante el método Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante encontrada por el método DPPH•, para el extracto etanólico total y las fracciones de bulbos de *P. dubia*.

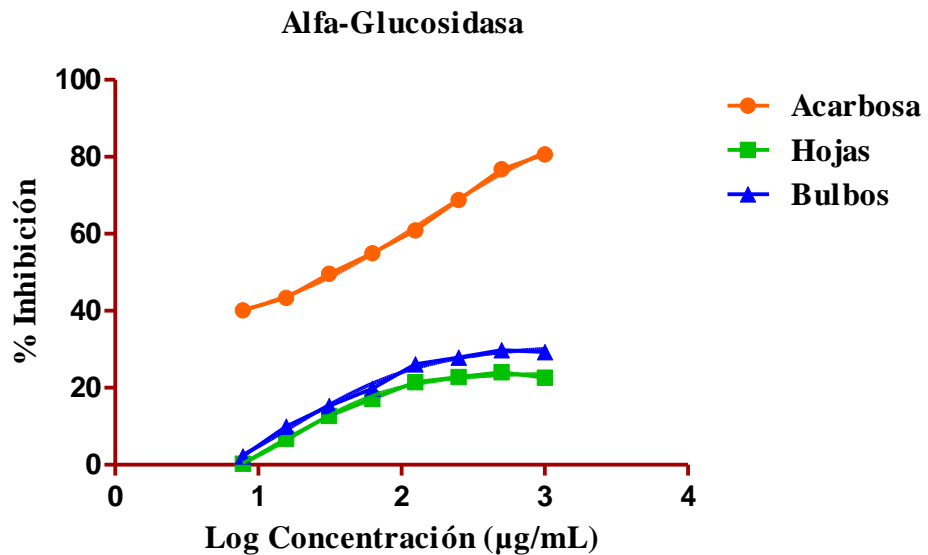


Grafica 4. Correlación entre el contenido de fenoles totales, obtenidos mediante el método Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante encontrada por el método ABTS•+, para el extracto etanólico total y las fracciones de bulbos de *P. dubia*.

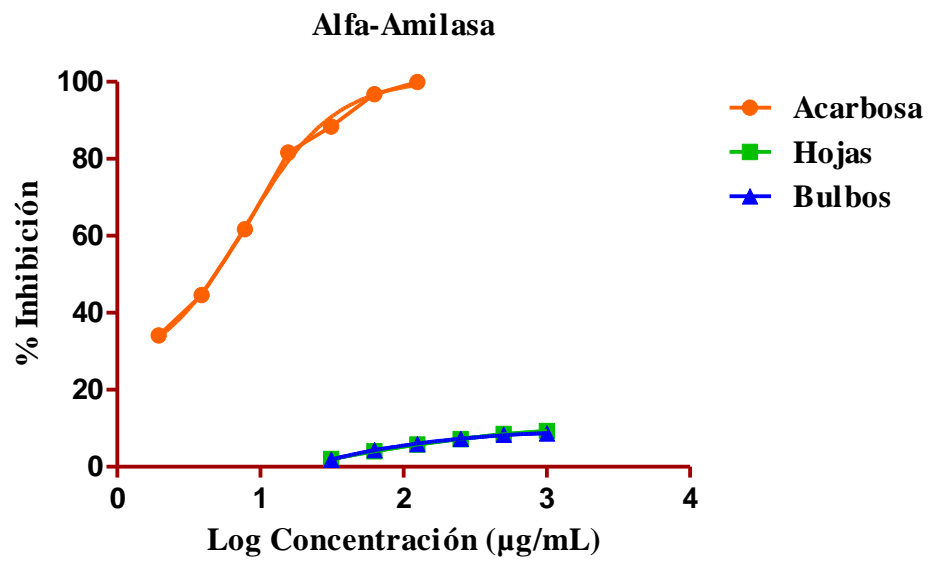
Anexo 3.
Actividad enzimática



Grafica 1. Porcentaje de inhibición enzimática del extracto etanólico total de hojas y bulbos de *P. dubia* evaluado a diferentes concentraciones, sobre la enzima tirosinasa.



Grafica 2. Porcentaje de inhibición enzimática del extracto etanólico total de hojas y bulbos de *P. dubia* evaluado a diferentes concentraciones, sobre la enzima α -glucosidasa.



Grafica 3. Porcentaje de inhibición enzimática del extracto etanólico total de hojas y bulbos de *P. dubia* evaluado a diferentes concentraciones, sobre la enzima α -amilasa.

ANEXO 4.
Actividad citotóxica

Tabla 1. Concentración letal 50, aguda (6 horas) y crónica (24 horas) para el extracto etanólico total de Hojas y Bulbos de *P. dubia*.

Numero	Bulbos		Hojas		Probabilidad*
	6 horas Dosis**	24 horas Dosis**	6 horas Dosis**	24 horas Dosis**	
1	17.621	3.246	9.720	5.802	0.000
2	27.520	4.568	13.992	7.806	0.006
3	42.981	6.429	20.141	10.503	0.023
4	67.129	9.047	28.992	14.13	0.067
5	104.843	12.731	41.734	19.013	0.159
6	163.745	17.915	60.074	25.581	0.308
7	255.739	25.210	86.475	34.418	0.500
8	399.416	35.476	124.479	46.309	0.692
9	623.814	49.923	179.184	62.306	0.841
10	974.281	70.253	257.930	83.831	0.933
11	1521.646	98.862	371.283	112.791	0.977
12	2376.527	139.121	534.452	151.756	0.994
13	3711.693	195.775	769.328	204.181	1.000

*Los resultados se obtuvieron empleando el programa Reed- Muench.**=µg/mL

Anexo 5. Perfil cromatográfico

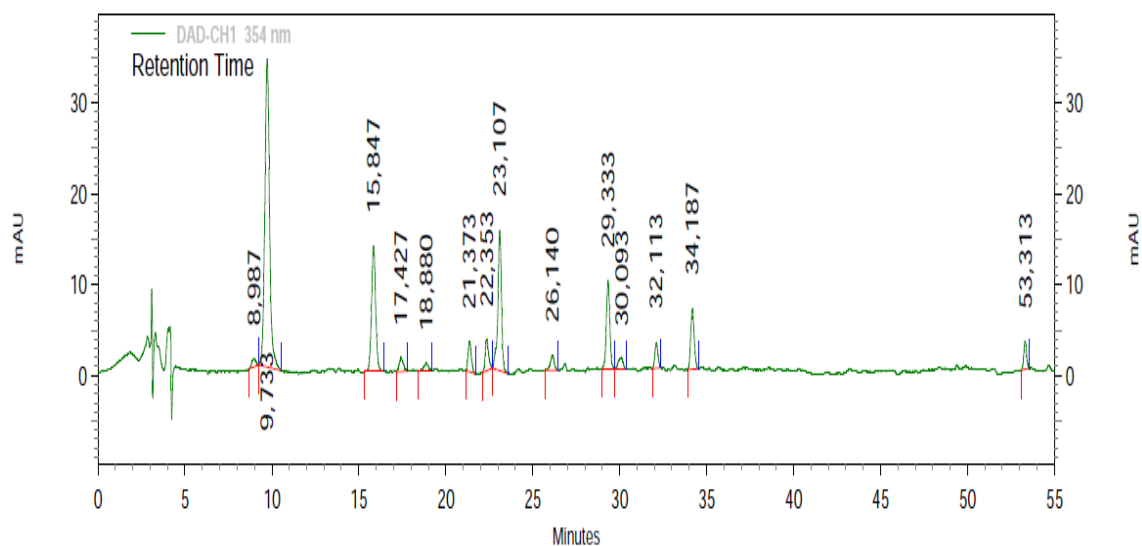


Figura 1. Cromatograma del análisis de compuestos fenólicos no identificados en el extracto etanólico total de hojas de *P. dubia* por CLAR/DAD a una longitud de onda de 354 nm.

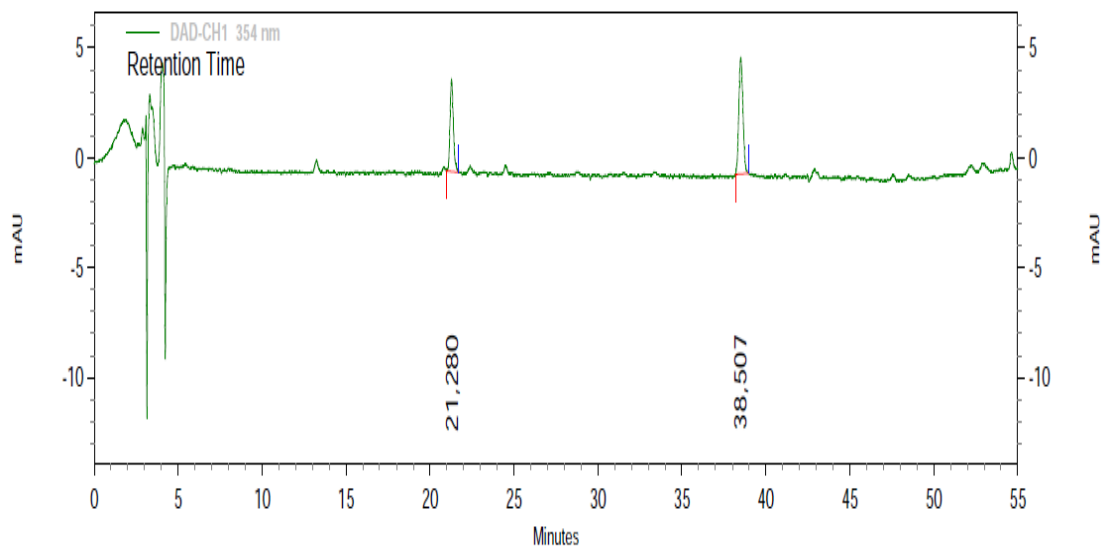


Figura 2. Cromatograma del análisis de compuestos fenólicos no identificados en el extracto etanólico total de bulbos de *P. dubia* por CLAR/DAD a una longitud de onda de 354 nm.

IBIBLIOGRAFÍA

1. Dorman HJ, Hiltunen, R. Fe(III) reductive and free radical scavenging properties of summer savory (*Satureja Hortensis* L.) extract and subfractions. *Food chemistry*. 2004;88:193-9.
2. Calderón SE. Proyecto flora amenazada. Lista roja de plantas fanerógamas de Colombia. Familia Amaryllidaceae. Instituto Alexander Von Humboldt. 2003.
3. Tropicos. W. Missouri Botanical Garden's VAST nomenclatural database. pagina web: <http://mobotmobotorg/W3T/Search/vasthtml> [Fecha de consulta Noviembre de 2013].
4. Meerow AW, Snijman, D.A. Amaryllidaceae. En "The families and genera of vascular plants. Flowering plants monocotyledons. Liliaceae (except Orchidaceae)" (Kubitzki, K.,ed.). Springer-Verlag, Berlin 1998;3:83-110.
5. Sener B, Orhan, I., Satayavivad, J. Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae. *Phytotherapy Research*. 2003;17:1220-3.
6. Stevens PF. Angiosperm Phylogeny Website. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> [Fecha de consulta: 12 de Junio de 2014].
7. Ito M, Kawamoto, A., Kita, Y., Yukawa, T., Kurita, S. Phylogenetic relationships of Amaryllidaceae based on matK sequence data. *Journal of Plant Research*. 1999;112:207-16.
8. St-Hil J. Laboratorio de Sistemática de plantas vasculares. **Amaryllidoideae** Burnett. http://www.thecompositahut.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/amaryllidaceae_amaryll [Fecha de consulta: 20 Julio 2014].
9. Bastida J, Berkov, S., Torras, L., Pigni, N.B., de Andrade, J.P., Martínez, V., Codina, C., Viladomat, F. Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. En D Muñoz-Torrero (Ed), *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences 2011*;Kerala, India: Transworld Research Network.:65-100.
10. Dreosti IE. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. *Nutrition*. 2000;16(7-8):692-4.
11. Cooper-Driver GA, Bhattacharya, M. Role of polyphenolics in plant evolution. *Phytochemistry*. 1998;49:1165-74.
12. Stevenson DE, Hurst, R.D. Polyphenolic phytochemicals- just antioxidant or much more? *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(22):2900-16.
13. Carratù B, Sanzini, E. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale. *Ann Ist Super Sanità*. 2005;41(1):7-16.
14. Urquiaga I, Leighton, F. Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biol Res*. 2000;33(2):55-64.
15. Sang S, Cheng, X., Stark, R.E., Rosen, R.T., Yang, C.S., Ho, C.T. Chemical Studies on Antioxidant Mechanism of Tea Catechins: Analysis of Radical Reaction Products of Catechin and Epicatechin with 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Bioorg Med Chem*. 2002;10:2233-7.
16. Halliwell B, Gutteridge, J.M.C. *Free radicals in Biology and Medicine*. ed Oxford: Oxford University Press, RU. 1999.

17. Middleton E, Kandaswami, C., Theoharides, T.C. The effect of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* 2000;52:673-751.
18. Yang CS, Landau, J.M., Huang, M.T., Newmark, H.L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Ann Rev Nutr.* 2001;21:381-406.
19. Hou Z, Lambert, J.D., Chin, K.V., Yang, A.S. Effects of tea polyphenols on signal transduction pathways related to cancer chemoprevention. *Mut Res.* 2004;555:3-19.
20. Rhee IK, Appels, N., Luijendijk, T., Irth, H., Verpoorte, R. Determining acetylcholinesterase inhibitory activity in plants extracts using a fluorometric flow assay. *Phytochemical Analysis.* 2003;14:145-9.
21. Rakshit S, Mandal, L., Chandra, Pal B., Bagchi J., Biswas N., Chaudhuri J., Acharya Chowdhury A., Manna A., Chaudhuri U., Konar A., Mukherjee T., Jaisankar P. Bandyopadhyay. *Biochem Pharmacol.* 2010;80:1662-75.
22. Ugartondo V. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. Facultad de Farmacia, Departamento de Fisiología, Universidad de Barcelona 2009.
23. Girish KS, Kemparaju K., Nagaraju, S. Vishwanath, Hyaluronidase Inhibitors: A Biological and Therapeutic Perspective. *Current Medicinal Chemistry.* 2010;16:2261-88.
24. Tokeshi I, Yoshimoto, T., Muto, N., Nakamura, S., Ashizawa, K., Nakada, T., Tatemoto, H. Antihyaluronidase Action of Ellagic Acid Effectively Prevents Polyspermy As a Result of Suppression of the Acrosome Reaction Induced by Sperm-Zona Interaction During In Vitro Fertilization of Porcine Oocytes. *J Reprod Dev.* 2007;53:755–64.
25. Elson LA, Morgan, W. A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine. *J Biochem* 1933;27:1824–8.
26. Takahashi T, Ikegami-Kawai, M., Okuda, R., Suzuki, K. A fluorimetric Morgan–Elson assay method for hyaluronidase activity. *Anal Biochem.* 2003;322:257–63.
27. Curto EV, Kwong, C., Hermersdorfer, H., Glatt, H., Santis, C., Virador, V., Hearing, V.J., Dooley, T.P. Inhibitors of Mammalian Melanocyte Tyrosinase: In Vitro Comparisons of Alkyl Esters of Gentisic Acid with Other Putative Inhibitors. *Biochemical Pharmacology.* 1999;57:663–72.
28. Huang K-F, Chen, Y-W., Chang, C-T., Chou, S-T. Studies on the inhibitory effect of *Graptopetalum paraguayense* E. Walther extracts on mushroom tyrosinase. *Food Chemistry.* 2005;89:583–7.
29. Halliwell B, Whiteman, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *J Pharmacol.* 2004;142:231-55.
30. Huang D, Ou, B., Prior, R.L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2005;53:1841–56.
31. Lock O. Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú Fondo Editorial Perú. 1988.
32. Kukliski C. Farmacognosia: Estudios de las Drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Omega Barcelona. 2000.

33. Osorio EJ, Berkov, S., Brun, R., Codina, C., Viladomat, F., Cabezas, F., et al. In vitro antiprotozoal activity of alkaloids from *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae). *Phytochemistry Letters*. 2010;3(3):161-3.
34. Bergoñón S, Díez, M., Codina, C. Congreso anual organizado por la Sociedad Fitoquímica de América del Norte. México DF. 1994:28.
35. Boit HG, Mehlis, B. Clivimin and Clivatin, Two New Alkaloids from *Clivia miniata* *Naturwissenschaften*. 1961;48:603.
36. Codina C, Viladomat, F., Bastida, J., Rubiralta, M. and Quirion, J.C. 9-O-Demethyl-2 α -hydroxyhomolycorine, an alkaloid from *Narcissus tortifolius*. *Phytochemistry*. 1990;29:2685.
37. Berkov S, Georgieva, L., Kondakova, V., Atanassov, A., Viladomat, F., Bastida, J., Codina, C. . Plant sources of galanthamine: phytochemical and biotechnological aspects. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 2009;23(2):1170-6.
38. Mukherjee PK, Kumar, V., Mal, M., Houghton, P.J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*. 2007;14(4):289-300.
39. Heinrich M, Lee Teoh, H. Galanthamine from snowdrop- the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *J Ethnopharmacol*. 2004;92(2-3):147-62.
40. Lopez S, Bastida, J., Viladomat, F., Codina, C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sci*. 2002;71(21):2521-9.
41. Adserse A, Gauguin, B., Gudiksen, L., Jager, A.K. Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. *J Ethnopharmacol*. 2006;104(3):418-22.
42. Filho JMB, Medeiros, K.C.P., Diniz, F.F.M., Bastida, L.M., Athayde-Filho, P.F., Silva, M.S., et al. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2006;16(2):258-85.
43. Lamoral-Theys D, Andolfi, A., Van Goietsenoven, G., Cimmino, A., Le Calvé, B., Wauthoz, N., Mégalizzi, V., Gras, T., Bruyère, C., Dubois, J., Mathieu, V., Kornienko, A., Kiss, R., Evidente, A. Lycorine, the main phenanthridine Amaryllidaceae alkaloid, exhibits significant antitumor activity in cancer cells that display resistance to proapoptotic stimuli: an investigation of tructure-activity relationship and mechanistic insight. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2009;52:6244-56.
44. McNulty J, Nair, J.J., Bastida, J., Pandey, S., Griffin, C. Structure-activity studies on the lycorine pharmacophore: a potent inducer of apoptosis in human leukemia cells. *Phytochemistry*. 2009;70:913-9.
45. Giordani RB, Vieira, P.B., Weizenmann, M., Rosember, D.B., Souza, A.P., Bonorino, C., de Carli, G.A., Bogo, M.R., Zuanazzi, J.A.S.,Tasca, T. Lycorine induces cell death in the amitochondriate parasite, *Trichomonas vaginalis*, via an alternative non-apoptotic death pathway. *Phytochemistry*. 2011;72:645-50.
46. Orhan I, Sener, B., Choudhary, M.I., Khalid, A. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2004;91(1):57-62.

47. Silvestrelli G, Lanari, A., Parnetti, L., Tomassoni, D., Amenta, F. Treatment of Alzheimer's disease: from pharmacology to a better understanding of disease pathophysiology. *Mech Ageing Dev.* 2006;127(2):148-57.
48. Jung M, Park, M. Acetylcholinesterase inhibition by flavonoids from *Agrimonia pilosa*. *Molecules.* 2007;12(9):2130-9.
49. Brookmeyer R, Johnson, E., Ziegler-Graham, K., Arrighi, H.M. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2007;3(3):186-91.
50. Small G, Bullock, R. Defining optimal treatment with cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2010;3:1-8.
51. Cabezas FA. Biogénesis, obtención y caracterización de alcaloides de *Amaryllidaceae*. 2014:74-7.
52. Ingkaninan K, Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T., Thongnoi, W. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *J Ethnopharmacol.* 2003;89(2-3):261-4.
53. Howes MJ, Houghton, P.J. Plants used in Chinese and Indian Traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. *Pharmacol Biochem Behav.* 2003;75(3):513-27.
54. Selkoe DJ. Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann Intern Med.* 2004;140(8):627-38.
55. Sgariglia MA, Soberón, J.R., Sampietro, D.A., Quiroga, E.N., Vattuone, M.A. Hyaluronidase inhibiting activity in *Caesalpinia paraguariensis* (D. Parodi) Burk. (Fabaceae) extracts. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromaticas.* 2007;6(5):274-5.
56. www.uniicesi.boletindepresnsa#229. Septiembre/2013.
57. Domínguez X. *Métodos de Investigación Fitoquímica México DF.* 1979.
58. Singleton VL, Rossi Jr, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult.* 1965;16:144-58.
59. An-Na L, Sha, Lia., Hua-Bin, Lia., Dong-Ping, Xua., Xiang-Rong, Xub., Feng, Chenc. Total phenolic contents and antioxidant capacities of 51 edible and wild flowers. *Journal of Functional Foods* 2014;6:319-30.
60. Parejo IV, F.; Bastida, J.; Romero, A.; Saavedra, G.; Murcia, A.; Jimenez, A.; Codina, C. Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. *Life Sciences.* 2003;73:1667-81.
61. Li H, Xiaofei, Zhang., Honggao, Xu., Chao, Xu., Fang, Yuan., Z' eliko, Knez., Zoran, Novak., Yanxiang, Gao. Subcritical water extraction of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum L.*) seed residues and investigation into their antioxidant activities with HPLC-ABTS•+ assay. *Food and Pioproducts Processing* 2012;90:215-23.
62. Re R, Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999;26:1231-7.
63. Sanabria A, López, S. Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas.* 1997;26:15-9.

64. EPA. United States Environmental protection Agency. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Cincinnati, Ohio. 2002;Fifth Edition 117-66.
65. CYTED. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Manual de Técnicas de Investigación 1995:61-2, 214-25.
66. Ellman GL, Courtney, K.D., Andres, Jr. V., Featherstone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 1961;7:88-95.
67. Seidl C. Pesquisa de Substâncias Naturais Inibidoras da Acetilcolinesterase, Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Curso de Pósgraduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná CURITIBA 2010.
68. Lee KK, Kim, J.H., Cho, J.J., Choi, J.D. Inhibitory effects of 150 plant extracts on elastase activity, and their anti-inflammatory effects. *International Journal of Cosmetic Science*. 1999;21:71-82.
69. Sahasrabudhe A, Deodhar, M. . Anti-hyaluronidase, anti-elastase activity of *Garcinia indica*. *International Journal of Botany*. 2010;6:299-303.
70. Suntar I, Akkol, E.K., Keles, H., Yesilada, E., Sarker, S.D., Arroo, R., Baykal, T. . Efficacy of *Daphne oleoides* subsp. *kurdica* used for wound healing: Identification of active compounds through bioassay guided isolation technique. *Journal of Ethnopharmacology*. 2012;141:1058-70.
71. Khatib S, Nerya, O., Musa, R., Shmuel, M., Tamir, S., Vaya, J. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the importance of a 2,4-substituted resorcinol moiety. *Bioorg Med Chem*. 2005;13(2):433-41.
72. Shinde J, Taldone, T., Barletta, M., Kunaparaju, N., Hu, B., Kumar, S., et al. Alpha-Glucosidase inhibitory activity of *Syzygiumcumini* (Linn.) Skeels seed kernel in vitro and in goto-kakizaki (GK) rats. *Carbohydr Res*. 2008;343(7):1278-81.
73. Bernfeld P. Amylases, α and β . *Methods in Enzymology*. 1955;1:149-58.
74. Torras-Clavería L, Berkov, S., Jáuregui, O., Caujapé, F., Viladomat, F., Codina, C. and Bastida, J. *Phytochem. Anal*. 2010;21:80-8.
75. Berkov S, Codina, C., Viladomat, F. and Bastida, J. Alkaloids from *Galathusnivalis*. *Phytochemistry*. 2007;68:13:1791-8.
76. Osorio EJ. Búsqueda de sustancias bioactivas a partir de dos especies de la flora colombiana: alcaloides de " *Phaedranassadubia*"(Amaryllidaceae) y biflavonoides de " *Garciniamadrano*"(Clusiaceae). Tesis para la obtención de Doctorado Universitat de Barcelona, Barcelona, España. 2008.
77. Mesa AM, Gaviria, C.A., Cardona, F., Sáez, J.A., Trujillo, S. T., Rojano, B. A. antioxidant activity and total phenols content from some species of *Calophyllum genus* Antioquia 2010.
78. Pérez RM, Vargas, R., Martínez, F.J., García, E.V., Hernández, B. Actividad antioxidante de los alcaloides de *Bocconia arborea*. Estudio sobre seis métodos de análisis. *Ars Pharmaceutica*. 2003;44(1):5-21.
79. Roginsky V, Lissi, E.A. Review of methods to determine chainbreaking antioxidant activity in food. *Food chemistry*. 2005;92(2):235-54.
80. Arrigoni O, Liso, R. A. & Calabrese, G. Lycorine as an inhibitor of ascorbic acid biosynthesis. *Nature*. 1975;256:513-4.

81. Evidente Aea. Lycorine structure-activity relationships. *Phytochemistry*. 1983;22:2193–6.
82. McNulty J, Nair, J.J., Little, J.R.L., Brennan, J.D., Bastida, J. Structure–activity studies on acetylcholinesterase inhibition in the lycorine series of Amaryllidaceae alkaloids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2010;20:5290–4.
83. Merken M, Beecher, R. Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: A review. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2000;48:577-99.
84. Matilla P, Astal, J., Kumpdanen, J. Determination of flavonoids in plant material by HPLC with diode-array and electro-array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000;48:5834-41.