

CUANTIFICACIÓN DE GALANTAMINA EN HOJAS Y BULBOS DE *Caliphruria subedentata* (Amaryllidaceae) FERTILIZADA CON MACRO- Y MICRONUTRIENTES MEDIANTE LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR) Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICA Y ANTIFÚNGICA



Universidad  
del Cauca

MARY EDILMA LÓPEZ GUZMÁN  
NORMA OLIVA GALÍNDEZ FERNÁNDEZ

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  
2016

CUANTIFICACIÓN DE GALANTAMINA EN HOJAS Y BULBOS DE  
*Caliphruria subedentata* (Amaryllidaceae) FERTILIZADA CON MACRO-  
Y MICRONUTRIENTES MEDIANTE LA TÉCNICA DE  
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR) Y  
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICA Y  
ANTIFÚNGICA

MARY EDILMA LÓPEZ GUZMÁN  
NORMA OLIVA GALINDEZ FERNANDEZ

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

Director

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

Asesor

FABIO ANTONIO CABEZAS FAJARDO. 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  
2016

## Nota de Aceptación

---

---

---

---

---

Director \_\_\_\_\_

Juan Carlos Argoti Burbano. Ph.D

Jurado \_\_\_\_\_

Tania Milena Gutiérrez Valencia. Ph. D

Jurado \_\_\_\_\_

Alfonso Ramírez Sanabria. Ph.D

Lugar y fecha de sustentación: Popayán, 21 de junio de 2016

### *Dedicatoria*

*A Dios por haberme enviado al seno de mi hogar, pues allí forjaron en mí valores grandiosos por los cuales mis metas son constantes pasos en el viaje de la vida. Deseo dedicar esta meta especialmente a mis padres: mi ejemplo de grandeza, trabajo y empeño en construir sueños, y a mi padrino quien siempre ha sido mi defensor y más grande apoyo.*

*En mi vida universitaria encontré grandes personas por las cuales este pedacito de felicidad se hizo una realidad es por ello que este acierto también es de ustedes: Dr. Fabio Antonio Cabezas, Dr. Juan Carlos Argoti y Mg. Óscar Darío Bermúdez*

*Mary López*

*Dedico este gran logro de mi vida a mis padres los cuales me han brindado la libertad y la confianza suficiente para definir mi senda y con su esfuerzo, trabajo y superación me han dado un gran ejemplo. Inevitablemente a mis tres motores de acción a mi hermana mayor Milena por su apoyo incondicional, mi hermana Rocio quien a librado a mi lado muchas de las batallas habidas en mi vida y mi hermanita Paola quien con su dulzura siempre me ha recordado luchar hasta llegar a la meta.*

*Norma Galindez*

## Agradecimientos

En la academia se aprende relacionarse con personas de mucho valor personal y científico por ende Agradecemos:

Al grupo de investigación de Química de Compuestos Bioactivos (QCB) de la universidad del Cauca, donde la investigación es la unión de maestros y estudiantes grupo donde no sólo se aprende de ciencia sino también de crear lazos importantes de fraternidad, a nuestro director de tesis el Dr. Juan Carlos Argoti quien nos aceptó como sus pupilas en esta investigación y ha brindado mucho de su saber científico para la realización de nuestra tesis y nos ha llevado por un camino de trabajo riguroso para encontrar resultados acorde a la investigación; al director de QCB Dr. Fabio Cabezas por su gran apoyo, por su comprensión, su ejemplo para el trabajo investigativo y su empeño en este trabajo, por sus palabras de apoyo, por su amistad; al profesor M.Sc. Oscar Darío Bermúdez quien proveyó todo el material vegetal y nos aportó de su conocimiento en muchos aspectos de este trabajo, y por ultimo a nuestros compañeros de laboratorio Vanessa Bastidas, Anuar Caldón, Diana Correa, Ximena Prieto, Hamilton Martínez, Alejandra Muñoz compañeros de investigación, trabajo y risas, un apoyo sin condición y Lina Trujillo por medio de la cual llegamos al grupo de investigación, nos presentó e hizo que este trabajo fuera parte importante de nuestras vidas, muchas gracias amigos por cada una de las aventuras vividas a su lado.

A la unidad de Análisis industrial de la Universidad del Cauca, por abrir las puertas al desarrollo de este trabajo, a sus monitores y al director de la misma el Dr German Cuervo, gracias por su paciencia y tiempo. De igual manera a los tecnólogos de química Claudia, Jenny, doña Melida, don Oscar, Juan Pablo y Geovanny por su ayuda durante nuestra carrera y en lo que requerimos en nuestra investigación y por ultimo a toda la planta docente del departamento de química.

Al grupo de investigación GB-PN de la universidad Tecnológica de Pereira donde nos acogieron y abrieron las puertas para realizar la cuantificación de los alcaloides de interés, al profesor Dr. Oscar Marino Mosquera director del grupo GB-PN quien dirigió el proceso de cuantificación en su laboratorio, al profesor Dr. Jaime Niño por sus recomendaciones y a los investigadores Lina, Cesar y Juliana. Así mismo al grupo CEMPA de la universidad del Cauca, en especial a la profesora M. Sc. Fabiola Gonzales por su tiempo y aportes ante esta investigación.

*Mary y Norma*

Cuando paso a paso construyes una vida, seguro los tropiezos no se han hecho esperar sin embargo hay personas que te han apoyado para enfrentar el obstáculo y llegar al éxito: la felicidad; por eso es preciso agradecer a quienes hicieron posible esta; mi realidad:

Agradezco a mi Dios el ser supremo que moldea mi vida y con señales me lleva en la vida desarrollando de su mano uno a uno mis propósitos y metas.

A mis padres: Socorro Guzmán y Tulio López quienes me educaron y apoyaron para hacer una realidad mi profesión. A mi Padrino: mi defensor por dar su vida entera por la mía y a mis hermanos Harold, Gustavo y Diana; quienes son mí bendición. Muchas gracias

A la Alma Mater por el conjunto de docentes del departamento de química, su elocuencia y rigurosidad en el saber brindado, por los espacios donde desarrolle toda mi carrera y todos aquellos que hacen parte de nuestra Universidad del Cauca

A ti Lina Folleco: mi apoyo, mi cómplice, mi amiga de años quien hoy se hizo mi hermana, gracias por tanto apoyo cuando creí que no podía más, por tener el tiempo de escuchar en silencio, quien dijo tu puedes cuando pocos creían en mí, gracias amiguita, gracias hermana eres una de las protagonista de mi meta.

A mi amiga y compañera de tesis con quien nos dimos la mano desde el principio, confrontamos nuestro conocimiento, confrontamos nuestros genios, confrontamos nuestra genialidad, pusimos al límite nuestra paciencia para al final ser la unión que hizo posible nuestra meta, gracias Normi (Norma Galíndez Fernández) por realizar este trabajo conmigo, por reeducarme en muchos aspectos. Así mismo agradezco a la Familia de Normi que me acogió en el proceso de escritura en su casa, en especial a Paola gracias por las risas, por el apoyo muchas gracias.

*Mary López*

Quisiera expresar mi mas sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que de una u otra forma han contribuido en la culminacion de esta importante etapa de mi vida.

A la Universidad del Cauca, en especial a la planta de docentes del departamento de quimica por contribuir en mi formacion academica y personal.

A mi amiga y compañera Mary Edilma Guzman por permitirme hacer parte de este proyecto, por el tiempo compartido su apoyo y entusiasmo en la solucion de los diferentes obstaculos que se presentaron durante el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros y amigos a Cenayda Lopez, Lina trujillo, Diana Prado, Caterine Daza, Katherine Alegria y los demás LMG por todos los momentos compartidos durante la carrera y a todas aquellas personas que conocí y contribuyeron en la culminacion de esta etapa.

A mi familia en especial a mis padres Oliva fernandez y Faustin Galindez, a mis hermanos Leider, Milena, Rocio y Pahola por ser mi motivacion y brindarme todo el cariño, comprension y apoyo constante constante entodos los ambitos de mi vida.

*Norma Galindez*

# Tabla de contenido

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. OBJETIVOS .....	1
3. JUSTIFICACIÓN .....	1
4. MARCO TEÓRICO .....	1
4.1. Descripción Botánica.....	1
4.2. Clasificación Taxonómica.....	1
4.3. Ubicación geográfica .....	2
4.3.1. <i>Caliphuria subedentata</i> en Colombia.....	2
4.4. Estudios de composición química de las Amaryllidaceae .....	2
4.5. Actividad antioxidante .....	4
4.5.1. Radicales Libres.....	4
4.5.2. Estrés Oxidativo .....	5
4.5.3. Antioxidante: .....	6
4.5.4. Antioxidantes Fenólicos .....	7
4.5.5. Métodos para determinar la capacidad antioxidante .....	9
4.6. Aspectos Agroquímicos del suelo de Amaryllidaceae .....	11
4.7. Cuantificación de alcaloides de las Amaryllidaceae .....	12
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
6.1. Material Vegetal .....	15
6.2. Establecimiento del ensayo .....	15
6.3. Recolección de material vegetal y secado .....	16
6.4. Preparación de extractos mediante el método Soxhlet.....	17
6.4.1. Reactivos para la preparación de la muestra y sus respectivas etapas de estudio.....	17
6.4.2. Extracción del material vegetal por medio del método Soxhlet....	17
6.5. Ensayo de tamizaje fitoquímico .....	19
6.6. Cuantificación de Gal y Ly mediante CLAR .....	19
6.6.1. Preparación de la muestra.....	19
6.6.2. Condiciones de cuantificación por CLAR/UV-DAD para Gal y Ly	19



6.6.3.	Validación del método .....	20
6.6.4.	Determinación del Test estadístico de la pendiente y el intercepto.....	20
6.7.	Fraccionamiento de los extractos etanólicos totales .....	21
6.8.	Evaluación de la actividad antioxidante mediante el ensayo DPPH: ...	21
6.9.	Determinación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo ABTS .....	22
6.10.	Determinación del contenido total de fenoles: .....	23
6.11.	Actividad Citotóxica preliminar .....	23
6.12.	Determinación de la actividad antifúngica .....	24
6.13.	Actividad Enzimatica.....	25
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	26
7.1.	Extracción y Tamizaje fitoquímico .....	26
7.1.1.	Determinación de alcaloides.....	27
7.1.2.	Cardiotónicos.....	27
7.1.3.	Cumarinas.....	27
7.1.4.	Taninos .....	28
7.1.5.	Saponinas .....	28
7.1.6.	Triterpenos.....	28
7.2.	Cuantificación de Gal y Ly.....	30
7.2.1.	Condiciones del método cromatográfico .....	30
7.2.2.	Validación en el laboratorio del método analítico.....	31
7.3.	Actividad biológica de los EET de hojas, bulbos y raíces de <i>C. subedentata</i> .....	42
7.3.1.	Actividad antioxidante .....	42
7.3.2.	Actividad citotóxica.....	50
7.3.3.	Actividad Antifúngica.....	52
7.3.4.	Actividad de inhibición enzimática .....	56
8.	CONCLUSIONES .....	61
9.	RECOMENDACIONES.....	62
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	63
10.	ANEXOS.....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

<b>A</b>	Absorbancia
<b>AA</b>	Ácido ascórbico
<b>ABTS</b>	2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato
<b>Ac</b>	Acuosa
<b>AcOEt</b>	Acetato de etilo
<b>ADN</b>	Ácido desirribonucleico
<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>APG</b>	Grupo filogenético de angiospermas
<b>B</b>	Boro
<b>BHT</b>	Butilhidroxitolueno
<b>BuOH</b>	Butanol
<b>CL<sub>50</sub></b>	Concentración letal 50
<b>CLAR</b>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b>CLSI</b>	Instituto de normas clínicas y del laboratorio
<b>CG</b>	Cromatografía de gases
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>CV</b>	Coeficiente de variación
<b>Cu</b>	Cobre
<b>CYTED</b>	Ciencia y tecnología para el desarrollo
<b>DAD</b>	Detector de arreglo de diodos
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfoxido
<b>DMPD</b>	N,N-dimetil- <i>p</i> -fenilendiamina
<b>DNS</b>	Ácido dinitrosalicílico
<b>DPPH</b>	1,1-difenil-2-picrilhidracilo
<b>DTNB</b>	Ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico
<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer
<b>EAG</b>	Equivalentes de ácido gálico
<b>EC<sub>50</sub></b>	Concentración necesaria para inhibir el 50%
<b>ELL</b>	Extracción Líquido-Líquido
<b>Eq</b>	Equivalente
<b>ERN</b>	Especies reactivas de nitrógeno
<b>ERO</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>EAT</b>	Extracto alcalóidico total
<b>EET</b>	Extracto etanólico total
<b>ES</b>	Extracto seco
<b>Esa</b>	Eserina
<b>FC</b>	Folin Ciocalteu
<b>Fe</b>	Hierro
<b>FRAP</b>	Análisis del poder reductor férrico/antioxidante
<b>g</b>	Gramos
<b>Gal</b>	Galantamina

<b>Hex</b>	Hexano
<b>HIV</b>	Virus de inmunodeficiencia humana
<b>HSV</b>	Virus del herpes simple
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración capaz de inhibir 50% de la actividad máxima
<b>kg</b>	Kilogramo
<b>LOD</b>	Límite de detección
<b>LOQ</b>	Límite de cuantificación
<b>Ly</b>	Licorina
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mg</b>	Miligramo
<b>Mn</b>	Manganeso
<b>m.s.n.m</b>	Metros sobre el nivel del mar
<b>N</b>	Nitrógeno
<b>NC</b>	Nivel de concentración
<b>ND</b>	No detectado
<b>ORAC</b>	actividad de absorbanza de los radicales libres de oxígeno
<b>OH</b>	Radical hidroxilo
<b>p</b>	Significancia
<b>P</b>	Fósforo
<b>PBS</b>	Solución de buffer fosfatos
<b>PI</b>	Porcentaje de inhibición
<b>QCB</b>	Química de compuestos bioactivos
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>RL</b>	radical libre
<b>r<sup>2</sup></b>	Coefficiente de correlación
<b>SD</b>	desviación estandar
<b>TEAC</b>	Capacidad antioxidante en equivalentes trolox
<b>TCA</b>	Coefficiente de acción tóxica
<b>Trólox</b>	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman.2.carboxílico
<b>TPC</b>	Contenido de fenoles totales
<b>UFC</b>	Unidades formadores de colonias
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>UV-vis</b>	Ultravioleta visible
<b>Zn</b>	Zinc
<b>%AA</b>	Porcentaje de actividad antioxidante
<b>α-T</b>	Tocoferol
<b>μL</b>	Microlitro

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
<b>Figura 1.</b> Distribución geográfica mundial de la familia Amaryllidaceae.....	7
<b>Figura 2.</b> Estructuras representativas de Alcaloides de Amaryllidaceae.....	8
<b>Figura 3.</b> Estructuras químicas de las principales clases de compuestos fenólicos. ....	13
<b>Figura 4.</b> (A). Curva de calibrado de Gal; (B). Curva de calibrado de Lyc.....	36
<b>Figura 5</b> Histogramas de las concentraciones de Gal en muestras de <i>C. subedentata</i> . Dónde: A; testigo, B; tratamiento con macronutrientes, C; tratamiento con micronutrientes, D; tratamiento con macro y micronutrientes.....	42
<b>Figura 6.</b> Histogramas de las concentraciones de Ly en muestras de <i>C. subedentata</i> . Dónde: A; testigo, B; tratamiento con macronutrientes, C; tratamiento con micronutrientes, D; tratamiento con macro y micronutrientes.....	43
<b>Figura 7.</b> Comparación del aumento de Gal y Ly en hojas, bulbos y raíces con tratamientos agroquímicos en color anaranjado muestra de hojas, en color amarillo muestra de bulbos y en color verde muestra de raíces(A) y en color azul muestras de bulbos y en color anaranjado raíces (B).....	46
<b>Figura 8.</b> comparación de TPC de las fracciones evaluadas para los EET de hojas, bulbos y raíces.....	47
<b>Figura 9.</b> Actividad antioxidante de los EET de hojas y raíces y sus fracciones frente al radical DPPH.....	51
<b>Figura 10.</b> Actividad antioxidante de los EET de hojas y raíces y sus fracciones frente al radica ABTS.....	53
<b>Figura 11.</b> Bioensayo de <i>Artemia salina</i> expresado en EC <sub>50</sub> en EET de hojas, bulbos y raíces de <i>C. subedentata</i> .....	55
<b>Figura 12.</b> Inhibición del patrón fluconazol frente a la cepas <i>C. albicans</i> y <i>C. parapsilosis</i> , A) Cepa <i>C. albicans</i> B) Cepa <i>C. parapsilosis</i> .....	57
<b>Figura 13.</b> Inhibición de crecimiento de la cepa <i>C. albicans</i> por el efecto del patrón fluconazol y EET de hojas, bulbos y raíces de <i>C. subedentata</i> .....	59
<b>Figura 14.</b> Comportamiento de la inhibición enzimática de los EET hojas, bulbos y raíces <i>C. subedentata</i> .....	62
<b>Figura 15.</b> Determinación de la concentración efectiva para inhibir el 50 % de la enzima acetilcolinesterasa en los EET de hojas, bulbos y raíces de <i>C. Subedentata</i> .....	63

## LISTA DE TABLAS

TABLA	Página
TABLA 1. Clasificación taxonómica <i>C. subdentata</i> .....	6
TABLA 2. Principales especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (ERN).....	10
TABLA 3. Descripción de algunos métodos para cuantificar la actividad antioxidante, sus ventajas y desventajas .....	15
TABLA 4. Cantidad de macro y micronutrientes requeridos y aplicados en los tratamientos la fertilización en <i>C. subdentata</i> .....	21
TABLA 5. Reactivos utilizados en cada proceso de la investigación con su casa comercial y el país de donde proviene .....	23
TABLA 6. Datos preliminares al establecimiento del método cromatográfico .....	24
TABLA 7. Porcentajes de extracción para la obtención del EET y EAT de las muestras de hojas, bulbos y raíces.....	31
TABLA 8. Resultados cualitativos del tamizaje fitoquímico de hojas, bulbos y raíces de <i>C. subdentata</i> .....	34
TABLA 9. Parámetros del método Cromatográfico para cuantificar Gal en <i>C. Subdentata</i> .....	35
TABLA 10. Parámetros para la evaluación de la linealidad de Gal y Ly.....	37
TABLA 11. Parámetros estadísticos de la linealidad.....	37
TABLA 12. Evaluación del parámetro de repetitividad del método cromatográfico.....	38
TABLA 13. Curva de calibración para la determinación de LOD y LOQ	39
TABLA 14. Evaluación de la linealidad para LOD y LOQ.....	39
TABLA 15. LOD y LOQ para la determinación de Gal en <i>C. subdentata</i>	40
TABLA 16. Porcentaje de recuperación de Gal en EAT de <i>C. Subdentata</i> .....	41
TABLA 17. Concentración de Gal y Ly cuantificada por CLAR en las muestras de <i>C. subdentata</i> sometidas a tratamiento agroquímicos.....	41
TABLA 18. Resultados de la evaluación de la actividad antioxidante mediante el método DPPH, ABTS <sup>+</sup> y Folin Ciocalteu en EET y sus diferentes fracciones de hojas y raíces de <i>C. Subdentata</i> .....	48
TABLA 19. CL <sub>50</sub> y Coeficientes de acción tóxica (TCA) para EET de hojas, bulbos y raíces de <i>C. subdentata</i> .....	55
TABLA 20. Concentración mínima inhibitoria (CMI) para los EET de hojas, bulbos y raíces de <i>C. subdentata</i> frente a <i>C. albicans</i> y <i>C. parapsilosis</i> .....	57

TABLA 21. Evaluación de la inhibición de los EET de hojas, bulbos y 60  
raíces frente a la enzima acetilcolinesterasa.....

## RESUMEN

En Colombia la familia Amaryllidaceae está ampliamente representada, posee especies endémicas como *Caliphruria subedentata* (*C. subedentata*), la cual se encuentra a lo largo de la cordillera central y la zona pacífica del país, esta planta posee metabolitos secundarios como galantamina (Gal) y licorina (Ly). En esta investigación se determinó la concentración de Gal y Ly en plantas de *C. subedentata* sometidas a cuatro tratamientos agroquímicos (macronutrientes, micronutrientes y la mezcla de éstos), también se evaluó la actividad antioxidante en fracciones, citotóxica, antifúngica y la inhibición enzimática sobre la enzima acetilcolinesterasa en EET. La cuantificación de Gal se realizó mediante la técnica cromatográfica CLAR, encontrando que las muestras con mejor respuesta fueron las muestras tratadas con el tratamiento agroquímico de micronutrientes, donde los extractos de raíces presentaron la mayor concentración de Gal (59 ppm) y Ly (163 ppm).

En la evaluación de las actividades biológicas se encontró una alta actividad antioxidante frente al radical DPPH de la fracción But en muestras de hojas, fracción AcOEt en muestras de raíces; en tanto a los resultados consignados de la actividad antioxidante frente al radical ABTS<sup>+</sup> se evidenció una alta actividad en la fracción AcOEt en muestras de hojas y raíces. Respecto a la actividad citotóxica hallada en los EET de hojas, bulbos y raíces se determinó una moderada toxicidad, clasificación dada de acuerdo al CYTED (100 a 500 µg/mL), por otro lado en la actividad antifúngica se encontró un CMI 15.62 µg/mL en EET de raíces, concentración por la cual la *Cándida albicans* fue sensible al extracto, inhibiéndose de esta manera su crecimiento. Finalmente la inhibición enzimática sobrepasó el 50 % en bulbos y raíces, siendo el EET de raíces el de mayor porcentaje de inhibición.

## ABSTRAC

In Colombia the Amaryllidaceae family is widely represented, has endemic species like *Caliphruria subedentata* (*C. subedentata*), which is located along the central mountain range and the Pacific region of the country, this plant has secondary metabolites such as galantamine (Gal) and licorine (Ly). In this investigation the concentration of Gal and Lyc in plants *subedentata* C. under four agrochemical treatments (macronutrients, micronutrients and mixture thereof) was determined in fractions antioxidant activity, cytotoxic, antifungal and enzyme inhibition was also assessed on EET enzyme acetylcholinesterase. Quantification of Gal was performed by chromatographic technique HPLC, and found that samples with better response were samples treated with the agrochemical treatment micronutrient where root extracts had the highest concentration of Gal (59 ppm) and Ly (163 ppm).

In the evaluation of the biological activities was found a high antioxidant activity opposite to the radical DPPH of the fraction But in leaf samples fraction AcOEt in samples of roots; while to the results recorded of the antioxidant activity opposite to the radical ABTS<sup>+</sup> a high activity was demonstrated in the fraction AcOEt in samples of leaves and roots. With regard to the cytotoxic activity found in the EEt of leaves, bulbs and roots there decided a moderate toxicity, given classification of agreement to the CYTED (100 to 500 µg/mL), on the other hand in the antifungic activity was found a CMI 15.62 µg/mL in EET of roots, concentration for wich the *candid albicans* was sensitive to the extract, keeping out hereby its growth. Finally the enzymatical inhibition exceeded 50 % in bulbs and roots, the EET being the highest percentage inhibition.



## 1. INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional en todas las culturas alrededor del mundo ha estado presente desde tiempos inmemoriales, siendo vigente debido a su eficaz acción para controlar y en algunos casos eliminar diferentes enfermedades<sup>1</sup>. Ésta es usada para mejorar o tratar enfermedades tóxicas, respiratorias, alérgicas, fúngicas, neurodegenerativas, etc. La investigación acerca de productos naturales conserva los principios de la medicina tradicional, aportando al conocimiento ancestral, el conocimiento científico de las plantas y sus componentes, evidenciando el o los efectos de los metabolitos de dichas plantas, llegando a descubrir los principios activos de la acción terapéutica.

La familia Amaryllidaceae posee 85 géneros y más de 1100 especies a nivel mundial, en Colombia las Amaryllidaceae están bien distribuidas teniendo representación de diferentes géneros tales como: *Phaedranassa*, *Sprekelia*, *Hymenocallis*, *Zephyrantes*, *Crinum* entre otras, encontrándose endemismo en la especie *C. subdentata*<sup>1</sup>, los géneros y la especie mencionada poseen alcaloides propios de la familia tales como: galantamina, licorina, hemantamina, hamayna, homolicorina<sup>2</sup>, entre otros; los cuales tienen una actividad farmacológica reconocida como inhibidores de la acetilcolinesterasa, enzima relacionada con la enfermedad de Alzheimer<sup>3</sup>, anticancerígenos<sup>4</sup>, antibacteriales<sup>5</sup>, antifúngicos<sup>6</sup>, antitumorales<sup>7</sup>.

El tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA) hoy día es una prioridad de la salud pública; se estima que más de 46.8 millones de personas en el mundo padecieron esta enfermedad; teniendo un costo aproximado de 818 billones de dólares en 2015<sup>8</sup>; en Colombia, Takeuchiemail y colaboradores<sup>9</sup> encontraron que en 2015 más de 221.000 individuos habían desarrollado EA, teniendo un costo del tratamiento por individuo cercano a los \$33.3 millones de pesos colombianos por año; valor estimado para personas con sintomatología moderado a severo, por lo anterior, se buscan estrategias que garanticen la disminución de costos de estos tratamientos. Con el desarrollo de este trabajo se busca potenciar la concentración de Gal en plantas de *C. subdentata* por medio de tratamientos agroquímicos, adicionalmente se evaluará la actividad biológica (antioxidante, citotóxica, antifúngica y la inhibición enzimática) de los EET y fracciones de *C. subdentata* las cuales podrían evidenciar el potencial farmacológico de esta especie.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

Cuantificar Galantamina mediante la técnica analítica CLAR en extractos de hojas y bulbos de muestras de plantas de *Caliphruria subedentata* sometidas a tratamiento con micro y macro-nutrientes.

### 2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Cuantificar la concentración de galantamina por CLAR en los extractos totales de hojas y bulbos de *C. subedentata*.

2.2.2. Determinar la actividad antioxidante de los extractos totales de hojas y bulbos de *C. subedentata* utilizando los métodos del DPPH y ABTS.

2.2.3. Determinar cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios de *Caliphruria subedentata* mediante tamizaje fitoquímico.

2.2.4. Cuantificar el contenido de fenoles totales por medio del ensayo de Folin-Ciocalteu.

2.2.5. Evaluar la actividad antifúngica del extracto etanólico de hojas y bulbos de *Caliphruria subedentata* con *Cándida albicans*.

2.2.6. Evaluar actividad citotóxica del extracto etanólico mediante el bioensayo con *Artemia salina*.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La fitoquímica permite conocer compuestos de interés terapéutico o compuestos bioactivos extraídos de plantas medicinales, los cuales han sido ampliamente estudiados para comprender su eficacia en contrarrestar enfermedades y/o patógenos; actualmente se está investigando a diferentes extractos vegetales con el fin de encontrar metabolitos secundarios capaces de proporcionar beneficios preventivos (como el uso de antioxidantes para prevenir el cáncer o el envejecimiento prematuro), curativos o de tratamiento, para ello el conocimiento ancestral es de suma importancia, ya que de este se parte para conocer los posibles efectos biológicos de la planta, que con estudios complementario brinden conocimiento global de la muestra vegetal y promover su consumo.

Las plantas de la familia Amaryllidaceae han sido utilizadas para diferentes tratamientos, debido a esto, están siendo estudiadas por su alto contenido de metabolitos secundarios principalmente alcaloides compuestos de alto valor biológico, en consecuencia se están desarrollando estrategias para lograr un aumento en el contenido de este tipo de compuestos, para lo cual se ha considerado estudiar las condiciones óptimas de la especie *C. subdentata*, en cuanto al tipo y cantidad de nutrientes que requiere para su desarrollo y lograr potenciar la ruta biosintética de los alcaloides, en especial la de Gal y Ly, determinando los niveles óptimos tanto de los macro como micronutrientes. Los resultados se complementan con la utilización de técnicas cromatográficas, las cuales aportan análisis eficientes en la cuantificación de estos metabolitos.

El mejoramiento en el rendimiento de los alcaloides ayudaría a potenciar su aplicación farmacológica, además contribuiría a la obtención de compuestos activos que mejorarían la calidad de vida de pacientes con la enfermedad de Alzheimer, ya que se podría lograr una disminución en el costo de los fármacos que contienen estos alcaloides, pues éstos son bastante elevados debido a la escases de las fuentes vegetales y los bajos rendimientos en la síntesis.

Un efecto negativo en este tipo de estudios se debe a la poca conservación de una gran parte del material vegetal, ya que muchas especies se encuentran en vía de extinción y que son de alto valor farmacológico, Entre las plantas en vía de extinción se encuentran algunos géneros de la familia Amaryllidaceae que como se mencionó anteriormente son una fuente importante de alcaloides con una amplia actividad biológica, utilizados en diferentes tratamientos de la enfermedad del Alzheimer.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1. Descripción Botánica

Las Amaryllidaceae son monocotiledóneas, ordenadas en la clasificación Asparagales según la APG; bajo este orden la familia Amaryllidaceae tiene 3 subfamilias a saber: Alliaceae, Agapanthaceae, Amaryllidoidea<sup>10</sup>. La familia Amaryllidaceae es de plantas herbáceas, vivaces, casi todas bulbosas, con flores de colores vistosos en su mayoría; con bulbos subterráneos, se han reconocido alrededor de 85 géneros y aproximadamente 1100 especies (APG III, 2009)<sup>11</sup>. Estudios filogenéticos de esta familia muestran que Sudáfrica y América del Sur son fuentes importantes de ésta, en cada uno de estos puntos geográficos hay prototipos endémicos, desafortunadamente algunos están vulnerados o en vía de extinción<sup>12</sup>.

Colombia al ser un país ecuatorial posee amplia diversidad botánica, en Amaryllidaceae se encuentran algunos géneros tales como *Phaedranassa*, *Sprekelia*, *Hymenocallis*, *Zephyrantes*, *Hippeastrum* y *Crinum*. Se presenta distribución restringida de *Eucharis* y endemismo de *C. subedentata*<sup>1</sup>. *Caliphruria* de la tribu *Eucharideae*, Amaryllidaceae, es un género encontrado en el territorio Colombiano, incluyendo en él cuatro especies: *C. Hartwegiana* Herb, *C. Korsakoffii* Meerow, *C. tenera* Baker, *C. subedentata* Baker, de las cuales las tres últimas son especies extinta, excepto *C. subedentata* Baker endémica del país y especie en peligro de extinción. La especie colombiana *C. subedentata* tiene un crecimiento dependiente de las condiciones ambientales del clima, el suelo y sus nutrientes, se sabe que ésta es afín a un medio húmedo, sombrío ya que la planta es umbrófila y crece a unos 1000 m.s.n.m.

### 4.2. Clasificación Taxonómica

En la siguiente tabla se encuentra la clasificación taxonómica de la especie *C. subedentata*.

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica *C. subedentata*

<b>Familia</b>	Amaryllidaceae J. St.-Hil.
<b>Clase:</b>	Liliopsida
<b>Subclase:</b>	Liliidae
<b>Orden:</b>	Asparagales Link
<b>Género:</b>	Caliphruria
<b>Especie:</b>	<i>C. subedentata</i>

### 4.3. Ubicación geográfica

Las Amaryllidaceae son una diversa y amplia familia que se halla distribuida por todo el mundo. Se localizan principalmente en los trópicos, siendo distribuida en mayor proporción en: América del Sur, Sur de África, pudiéndose encontrar en parte del mediterráneo, Asia y parte de Australia. En la siguiente figura se muestra la ubicación geográfica de la familia Amaryllidaceae a lo largo y ancho del planeta demarcada en color verde.



**Figura 1.** Distribución geográfica mundial de la familia Amaryllidaceae (Pigini et Al <sup>14</sup>)

#### 4.3.1. *Caliphruria subedentata* en Colombia

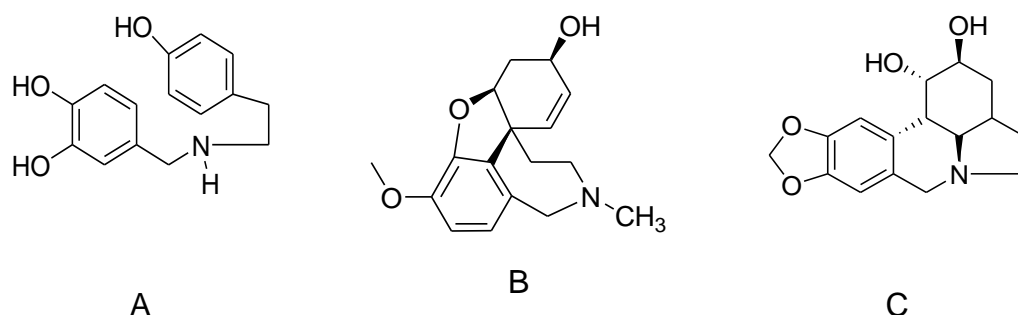
*C. subedentata* se encuentra distribuida en el suroccidente de Colombia, se ha observado esta especie en los departamentos de Caldas, Chocó, Valle, Nariño, Cauca. En éste departamento ha sido hallada en el municipio del Tambo, sin embargo al ser una planta ornamental se halla en diversos puntos del departamento, una muestra importante es conservada *in vivo* en el Jardín Botánico Álvaro José Negret de la Universidad del Cauca; ubicado en la vereda La Rejoya, al noroccidente del municipio de Popayán (Cauca, este lote de plantas es conservado por el Grupo de Investigación Química de Compuestos Bioactivos).

### 4.4. Estudios de composición química de las Amaryllidaceae

Las Amaryllidaceae poseen un grupo de alcaloides característico y exclusivo de estas plantas, los cuales se originan como consecuencia de una sobreproducción del aminoácido tirosina, componente base en la biosíntesis de estos compuestos. Su biosíntesis posee un patrón bioquímico dentro de la familia, el cual puede ser considerado marcador químico<sup>13</sup>. Estos alcaloides han mostrado interesante actividad biológica siendo atractivos por su importancia farmacológica; en el siglo IV a. C., el aceite de *Narcissus*

*poeticus* se utilizaba para tratamientos antitumorales<sup>14</sup>. Actualmente las Amaryllidaceae son usadas para extraer un intermediario y por medio de éste poder obtener Gal, uno de los alcaloides de Amaryllidaceae potente inhibidor de la acetilcolinesterasa<sup>12</sup>.

Los alcaloides de esta familia botánica provienen de un mismo precursor biogenético la norbelladina, producto con una estructura base C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>-N-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, donde el nitrógeno dependiendo del tipo de alcaloide puede estar sustituido de forma secundaria, terciaria e incluso cuaternaria, estos alcaloides son débilmente básicos teniendo un pKa entre 6 y 9, de este tipo de alcaloides se sabe que poseen de 16 a 20 carbonos dependiendo del esqueleto policíclico<sup>12-13</sup>, la figura 3 muestra algunos alcaloides con la anterior descripción.



**Figura 2.** Estructuras representativas de Alcaloides de Amaryllidaceae; A. Norbelladina, B Gal, C. Ly

En la familia Amaryllidaceae se han reportado alcaloides de tipo norbelladina entre los que se encuentran Ly, homolicorina, crinina, hemantamina, narciclasina, tazetina, montanina y Gal<sup>15</sup>. *C. subedentata* posee diferentes alcaloides tales como: ismina, trisferidina, 5,6-dihidrobicolorina, Gal, clidantina, narwedina, kirkina, galantindol, maritidina, anhidrolicorina, deoxitazetina, 6-metoxipretazetina, tazetina, hemantamina, deshidroanhidrolicorina, Ly, homolicorina, epimacronina<sup>1, 16</sup>.

Torras-Claveria, L. *et al*<sup>17</sup> en su investigación sobre los *Narcissus* y su contenido de Gal, mostró la eficiencia de este metabolito en el tratamiento de la enfermedad Alzheimer, así mismo *C. subedentata* estudiada por Cabezas, F. *et al*<sup>16</sup>., demostró poseer entre los metabolitos secundarios Gal, Ly, etc, los cuales son importantes por su actividad biológica. En esta investigación se encontró inhibición de la acetilcolinesterasa siendo responsable de la misma Gal y Ly<sup>18</sup>, los cuales han sido ampliamente estudiados por su buena

actividad. Debido a lo promisorios de los alcaloides de Amaryllidaceae han sido investigados, éstos son sintetizados por *C. subedentata*, encontrándose hemantamina investigada por Havelek, Radim *et al*<sup>4</sup>, quien muestra la buena actividad citotóxica ante cepas de cáncer con leucemia p53, el efecto generando fue apoptosis; en otra investigación liderada por Ivo Doskočil *et al*<sup>19</sup>, se muestra citotoxicidad contra las células de cáncer gastrointestinal p53 mutado hallando una respuesta contundente de los alcaloides hemantamina y Ly, Respecto a las actividades antibacterial se halla a Ly como la responsable de la inhibición del crecimiento de la levadura *C. albicans*<sup>12</sup>. Debido al amplio efecto biológico que pueden ofrecer los alcaloides de Amaryllidaceae, las investigaciones acerca de éstos deben continuar en la búsqueda nuevos metabolitos y nuevos efectos farmacológicos de los mismos.

#### **4.5. Actividad antioxidante**

##### **4.5.1. Radicales Libres**

Los radicales libres (RL) son especies químicas atómicas o moleculares, las cuales presentan en su estructura uno o más electrones desapareados en su nivel más externo, lo que les confiere una alta reactividad debido a su inestabilidad y su capacidad de ceder o captar electrones, en consecuencia reaccionan con otras moléculas, causando una serie de reacciones que pueden ser nocivas a nivel celular. Los RL se encuentran dentro de un término colectivo que también incluye a especies no radicalárias y que participan en reacciones que llevan a la elevación de los agentes pro-oxidantes y son las especies reactivas de oxígeno (ERO)<sup>20,21</sup>.

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) es un término colectivo que involucra no solo los RL derivados de oxígeno, sino también a los no radicales derivados de la reducción molecular del oxígeno, y que además son muy reactivos, como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el ácido hipocloroso (HClO). Además de la generación de ERO, el daño oxidativo puede agravarse o inhibirse para las especies reactivas de nitrógeno (RNS) (ver tabla 2) entre los que incluye el óxido nítrico (NO<sup>·</sup>) y peroxidonitrico (ONOO<sup>-</sup>) capaces de inducir daño o combinarse con las ERO, aumentando el daño oxidativo<sup>20</sup>.

**Tabla 2** Principales especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN)

<b>Especies radicalarias ERO</b>	<b>No radicalarias ERO</b>
<b>Superoxido <math>O_2^-</math></b>	Peróxido de nitrógeno, $N_2O_2$
<b>Hidroxil, <math>OH^\cdot</math></b>	Ácido hipobromoso, HOBr
<b>Hidroperoxil, <math>HO_2^\cdot</math></b>	Acido hipocloroso, HOCl
<b>Peroxil <math>RO_2^\cdot</math></b>	Ozono, $O_3$
<b>Alcoxi <math>RO^\cdot</math></b>	Peróxidos orgánicos, ROOH
<b>Singulete, <math>O_2^1\Sigma g^+</math></b>	
<b>ERN</b>	ERN
<b>Óxido nítrico, <math>NO^\cdot</math></b>	Acido nitroso, $HNO_2$
<b>Dióxido de nitrógeno <math>NO_2</math></b>	Catión nitrosil $NO^+$
<b>Radical libre <math>NO_3^-</math></b>	Anion nitrosil $NO^-$
	Tetra oxido di nitrógeno, $NO_2O_4$
	Tri oxido di nitrógeno, $NO_2O_3$
	Peroxinitrito, ONOO
	Peroxinitrato, $O_2NOO$
	Ácido peroxinitroso, ONOOH
	Alquil peroxinitrito, ROONO
	Alquil peroxinitrato, $RO_2ONO$

#### 4.5.2. Estrés Oxidativo

El oxígeno ( $O_2$ ) es una molécula indispensable para los seres humanos, ya que hace parte fundamental en la producción de energía, dando vitalidad a las células para que realicen todas sus funciones. Sin embargo se puede presentar un exceso de ERO donde los sistemas antioxidantes con los que cuenta la célula no los logra contrarrestar y se presenta un desequilibrio entre estas especies, por lo tanto la célula se enfrenta a un estrés oxidativo. Este fenómeno tiene consecuencias citoplasmáticas que incluyen modificaciones en las proteínas, lípidos y ADN, produciendo lipoperoxidación, oxidación de los grupos sulfhidrilos de las proteínas y fragmentación o formación de enlaces covalentes cruzado en las riboproteínas<sup>22</sup>.



Sin embargo estos efectos negativos que se presentan por efecto de los ERO se pueden inhibir con el consumo de antioxidantes, estos compuestos ayudan a minimizar los efectos negativos de las reacciones en cadena que pueden terminar en graves enfermedades.

#### 4.5.3. Antioxidante

Un antioxidante es una molécula que tiene la propiedad de neutralizar los radicales libres de otras moléculas, inhibiendo o retardando la oxidación, terminando la cadena oxidativa. Independiente de que su concentración sea menor que el sustrato oxidable. Estos sustratos son biomoléculas como: proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Su capacidad antioxidante radica en que cuando interacciona con un RL le cede un electrón, oxidándose a su vez y transformándolo en un RL débil no tóxico y que en algunos casos como la vitamina E puede regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes<sup>23</sup>.

Existen diferentes formas de clasificación de los antioxidantes, una de ellas es de acuerdo a su origen, esta incluye:

Los antioxidantes endógenos, son fabricados por la propia célula, mientras que los exógenos son sistemas enzimáticos y antioxidantes que ingresan al organismo a través de la dieta o de suplementos con formulaciones antioxidantes<sup>24</sup>; éstos antioxidantes exógenos se subdividen en dos grupos, según su origen en naturales y sintéticos. Los antioxidantes naturales son sustancias que se encuentran en los tejidos de las plantas o animales. Estos compuestos son capaces de prevenir o inhibir el proceso de oxidación en el cuerpo humano o así como en productos alimenticios, la mayoría de estos compuestos son derivados fenólicos como tocoferoles, flavonoides, ácidos fenólicos, gálicos, en algunos casos carotenoides y terpenos que también han demostrado actividad antioxidante<sup>25</sup>; los antioxidantes sintéticos en muchos casos se derivan de las estructuras fenólicas, algunos ejemplos corresponden a 2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol (BHT), *terc*-butil-4-hidroxianisol (BHA), *terc*-butil-hidroquinona (TBHQ), y 6-etoxi-1,2-dihidro-2, 4-trimetilquinolina.

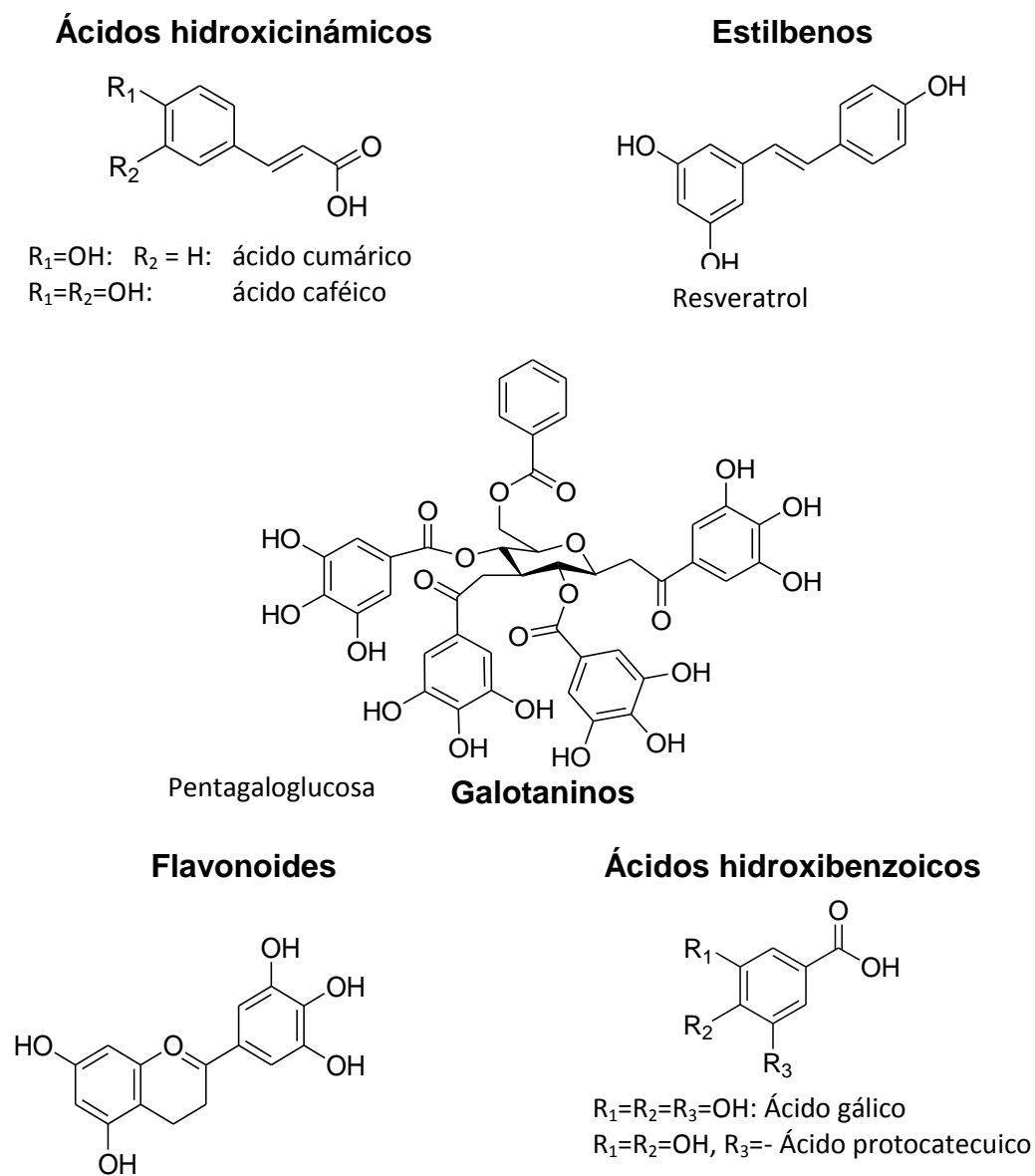
En la actualidad los antioxidantes han sido de mucho interés y son ampliamente estudiados, los antioxidantes naturales contribuyen al mantenimiento de salud humana, por otro lado algunos antioxidantes sintéticos han presentado efectos negativos en la salud. Los compuestos fenólicos actúan como antioxidantes naturales debido a su propiedad de neutralizar los RL e inhibir o retardar la oxidación, se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas, y su actividad está relacionada con

su papel protector contra diversas patologías y el envejecimiento que aqueja al ser humano.

#### **4.5.4. Antioxidantes Fenólicos**

Son compuestos sintetizados por las plantas y ciertos animales inferiores que se caracterizan por poseer un anillo aromático con al menos un grupo hidroxilo, la mayoría son derivados de la fenilalanina y en menor cantidad de la tirosina<sup>26</sup>, estos compuestos son importantes debido a que en muchos casos confieren coloración a las diferentes plantas, actúan como sustancias de defensa<sup>27</sup>, reguladoras<sup>28</sup>, protectoras<sup>29</sup> y de estructura<sup>30</sup> como es el caso de las ligninas y suberinas, además actúan en estrategias de defensa en condiciones de estrés tales como heridas, infección, la luz ultravioleta o luz excesiva<sup>31</sup>.

Desde el punto de vista de la estructura química, son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina. En el grupo también se encuentran pigmentos y flavonoides, en la figura 3 se presentan los compuestos fenólicos más representativos. Estos compuestos actúan como antioxidantes naturales esta actividad puede variar significativamente dependiendo de ciertas variables como su concentración, la estructura química de la molécula y su grado de oxidación, en cuanto a la concentración se ha encontrado que aún con cantidades pequeñas algunos antioxidantes fenólicos entran a la circulación sistémica y causan un aumento significativo en el estado antioxidante del plasma<sup>32</sup>.



**Figura 3.** Estructuras químicas de los principales clases de compuestos fenólicos<sup>32</sup>

Los compuestos fenólicos poseen diversas propiedades biológicas<sup>33</sup> dentro de las que se encuentran actividad antioxidante<sup>34,35,36</sup>, anticancerígeno<sup>37</sup>

citotóxico<sup>38,39</sup>, antimicrobiano<sup>40</sup>, antibacteriano<sup>41</sup>, antifúngico<sup>42,43</sup>, antiviral<sup>44</sup>, antiinflamatorio<sup>45</sup>, efecto apoptótico<sup>46</sup> y antiapoptótico<sup>47</sup>, molusquicidas<sup>48</sup>, inhibición de las glucosil transferasas del *Streptococcus mutans*<sup>49</sup> (caries dental), virus del herpes simple (HSV)<sup>50</sup>, inhibición en la replicación del virus de la inmunodeficiencia Humana (HIV)<sup>51</sup>, el virus del moquillo canino<sup>52</sup>, presenta efectos como el antidiarreico<sup>53</sup> y antidiabético<sup>54</sup>.

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos se basa principalmente en su capacidad de quelatar metales, inhibir la lipoxigenasa y captar radicales libres, aunque en ocasiones también puede promover reacciones de oxidación *in vitro*, el mecanismo más estudiado ha sido la captura de radicales libres. Esta propiedad depende de la estructura química de la molécula; ya que el principal determinante es el número y la localización de los grupos hidroxilos donadores de electrones<sup>55,56</sup>.

#### **4.5.5. Métodos para determinar la capacidad antioxidante**

Debido al gran interés de contrarrestar los efectos negativos de los radicales libres, se han implementado una serie de ensayos para determinar la capacidad antioxidante tanto en alimentos, muestras biológicas y extractos vegetales. Aunque no se cuenta con un método estándar que cumpla con todas las características adecuadas para obtener un resultado concreto, se recomienda la combinación de diferentes métodos para poder comparar y obtener un resultado más aproximado.

Existen diferentes metodologías para estas mediciones, algunos de estos métodos consisten en acelerar la oxidación en un sistema lipídico, usualmente por calentamiento, y monitoreando a continuación el consumo de oxígeno, la pérdida de sustrato o bien la formación del producto. En este tipo de reacciones entre los antioxidantes con los radicales libres se pueden llevar a cabo mediante dos posibles vías de reacción de transferencia de un átomo de H (Hydrogen Atom Transfer, HAT) o de transferencia de un electrón (Single Electron Transfer, SET).

En la tabla 3, se presentan los métodos *in vitro* más comúnmente utilizados para determinar la capacidad antioxidante total.

**Tabla 3.** Descripción de algunos métodos para cuantificar la actividad antioxidante sus ventajas y desventajas

<b>Ensayo</b>	<b>Método</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
<b>Ensayos que involucran reacciones de transferencia de electrones SET</b>	DPPH•	El DPPH es un radical libre estable La prueba es simple y rápida y sólo necesita un espectrofotómetro UV-vis	Limitado por su reproducibilidad inter-ensayos. Presenta efectos de impedimento estérico
	ABTS	Soluble en solventes acuosos y orgánicos, y no es afectado por la fuerza iónica.  Las muestras reaccionan rápidamente con ABTS en solución buffer estabilizándose rápidamente.	La velocidad de reacción entre antioxidante y el patrón cinético – es totalmente desconocido  La capacidad de captura de radicales libres en este método no es un reflejo de su verdadera actividad antioxidante
	FRAP	Es simple, rápido, económico, y no requiere equipo especializado	Mide sólo la capacidad reductora basado en el ion férrico, que no es relevantes para la actividad antioxidante de manera mecánica y fisiológicamente
<b>Ensayos que involucran reacciones de transferencia de átomos hidrógeno HAT</b>	ORAC	Puede ser adaptado para detectar antioxidantes tanto hidrófilos como hidrófobos	Cada antioxidante analizado presenta comportamientos muy dispares

Los métodos para la evaluación de la capacidad antioxidante son ampliamente utilizados en diferentes tipos de muestras, entre los que se encuentran los extractos de plantas, fuentes importantes de una gran variedad de compuestos bioactivos con acción antioxidante, por esta razón se han evaluado diversas familias, para obtener fuentes vegetales para tratar o prevenir enfermedades causadas por la generación de ERO. Entre las familias evaluadas se encuentran las Amaryllidaceae, plantas promisorias en el contenido de estos metabolitos, entre los que se destacan los alcaloides y los compuestos fenólicos, con alto potencial antioxidante.

Este tipo de estudios se han incrementado debido al potencial farmacológico de las especies de esta familia, y se refleja en el gran número de publicaciones referentes a este tema, entre los que se encuentran: la evaluación de la actividad antioxidante de las especies: *S. candida*, *S. clusiana*, *S. lutea lutea*<sup>57</sup>, *Hippeastrum*<sup>58</sup>, *G. multifolia*<sup>59</sup>, *scadoxus multiflorus*<sup>60</sup>, *A. cepa*<sup>61</sup>, *A. sativum*<sup>62</sup>. En cuanto a la especie *C. subdentata* no se han encontrado reportes referentes a la evaluación de sus propiedades farmacológicas.

En el grupo de investigación QCB de la Universidad del Cauca, se han desarrollado varios estudios de evaluación de la actividad antioxidante con especies de la familia Amaryllidaceae; en el trabajo de Trujillo *et al*<sup>63</sup>., se evaluó la planta *P. dubia* encontrando un mayor % AA para la fracción de BuOH de 81.66 % (DPPH) y de 71.54 % (ABTS), Caldon *et al*<sup>64</sup>. evaluó la especie *C. jagus*, determinando mayor actividad en la fracción AcOET 69.3 mgrólox/ g extracto para DPPH y 122.7 mg trolox/ g extracto en la fracción de But para el método ABT; Mera *et al*<sup>65</sup>., evaluó la actividad antioxidante de la especie *E. formosa*., donde la fracción más activa fue Hex 218.40±0.3 µg/mL para el método DPPH y 495.27±0.3 µg/mL para el método ABTS.

#### **4.6. Aspectos Agroquímicos del suelo de Amaryllidaceae**

En la búsqueda de disminuir costos para facilitar la elaboración de medicamentos, la industria farmacéutica se ha inclinado por intermediarios extraídos de plantas, por consiguiente se han disminuido procesos en la obtención de fármacos sin tener un largo proceso de síntesis, ni inversión excesiva, para así no repercutir en los precios del fármaco en el mercado. De esta manera nacen estrategias que buscan aumentar la concentración de los metabolitos secundarios de interés (alcaloides) en la planta bajo estudio, garantizando mejores resultados en las extracciones ya sea de intermediarios o del metabolito deseado (Gal).

Para determinar el requerimiento agroquímico que necesita la planta para desarrollarse, es necesario conocer la cantidad de macro o micro-elementos apropiada para la especie y así mismo las condiciones óptimas del suelo donde crezca la planta estudiadas; esta estrategia se ha aplicado en algunas especies de la familia Amaryllidaceae, en donde se ha realizado el análisis del suelo o sustrato que las sostienen, con el diseñar tratamientos que incidan en el incremento de las concentraciones de alcaloides importantes como Gal y Ly.

Las condiciones del suelo de las especies *P. dubia*, *C. subedentata*, han sido estudiados en su hábitat original, encontrándose que estas plantas requieren de un suelo en condiciones de textura franco-arenoso permitiendo una mayor aireación, una humedad mayor o igual a 11%, suficiente materia orgánica para tener disponibilidad de microelementos, altos niveles de calcio para regular el pH hasta niveles adecuados para el óptimo funcionamiento de la planta, dicha investigación realizada por Yanza *et al*<sup>66</sup>; evidencia que los microelementos del suelo afectan positivamente en el incremento de la concentración de Gal en la parte aérea (hojas), esto fue atribuido a una alta concentración en manganeso de (323.78 ppm), hierro (10 ppm) y de zinc (14.80 ppm), reportando una concentración de 43.70 ppm de Gal en hojas. Por otro lado Lubbe *et al*<sup>67</sup>, reporta un aumento de la concentración de Gal en *Narcissus* realizando fertilización con 14.4 % de nitrógeno y 30% potasio como K<sub>2</sub>O.

En el trabajo de Yanza *et al*<sup>66</sup>, se determinaron las condiciones de nutrición requeridas para algunas Amaryllidaceae, lo cual podría provocar un aumento en la concentración de Gal, posiblemente causado por el aumento en nitrógeno y potasio en el suelo; por tal motivo, esta investigación procura obtener resultados significativos ante el aumento de la concentración de Gal y Lyc en plantas de *C. subedentata* fertilizadas con tres tipos tratamiento (B, C y D descritos en materiales y métodos, y un testigo absoluto A). Se ha encontrado que la presencia de los micronutrientes puede contribuir al crecimiento de la planta así mismo en la síntesis de metabolitos nitrogenados como las proteínas y los alcaloides<sup>68</sup> por esta razón se espera una mejor respuesta en el tratamiento con micronutrientes.

#### **4.7. Cuantificación de alcaloides de las Amaryllidaceae**

Los estudios fitoquímicos son de gran importancia en el aislamiento de nuevos compuestos bioactivos de interés. Estos procesos se llevan a cabo en diferentes etapas, entre las que se encuentran: extracción, separación y cuantificación. Las técnicas más utilizadas para este tipo de estudios fitoquímicos son las técnicas cromatográficas debido a que son eficientes y

brindan la posibilidad de la identificación y cuantificación de estos compuestos de interés.

Una de las técnicas cromatográficas mas empleadas para cuantificar las concentraciones de los metabolitos de interés es la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), esta técnica se ha utilizado para cuantificar alcaloides en Amaryllidaceae; en el trabajo de López L *et al*<sup>69</sup>., en el que se llevó a cabo la cuantificación de: Gal, 11-hidroxygalantamina, epinorgalantamina y sanguinina en el género *Narcissus*. Jagtap U *et al*<sup>71</sup>., determinaron Gal en el género *Crinum Kaya*, G.I *et al*<sup>70</sup>., determinaron Gal y Ly en plantas del genero *Galanthus elwesii*.

En cuanto a la especie *C. subedentata* no se han encontrado reportes de la cuantificación de sus alcaloides por CLAR, los datos que se encuentran reportados corresponden a la identificación de varios alcaloides de esta planta utilizando cromatografía de gases (CG), por este motivo, se pretende cuantificar por medio de CLAR la concentración de Gal de *C. subedentata* en cada uno de los tratamientos con macro y micro nutrientes y muestras de plantas sin fertilizar.



## 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Gal es un metabolito secundario que es utilizado medicamente para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, debido a su importante actividad inhibitoria sobre la enzima acetilcolinesterasa. Gal es sintetizado naturalmente por la especie *C. subedentata*, de acuerdo a esto se pretende aumentar la concentración de Gal haciendo cambios en las condiciones de nutrición de la planta (tratamiento A: testigo sin ningún cambio en el suelo, tratamiento B: macronutrientes, utilizando triple 15: NPK; tratamiento C: micronutrientes utilizando Zn, Cu, Fe, B, Mn; tratamiento D: mezcla donde se utilizarán macro y micronutrientes), obteniendo de esta manera el tratamiento agroquímico adecuado para este fin, así influir en los porcentajes de rendimiento en la extracción del alcaloide de interés y disminuir costos en la adquisición del fármaco (Gal: Reminyl) y en el tratamiento de la enfermedad antes mencionada. Por otro lado la acción antioxidante de algunos metabolitos secundarios también contribuye a retrasar el avance de la EA, por consiguiente se hace necesario evaluar los EET de hojas, bulbos y raíces, y las fracciones (Hexano (Hex), Diclorometano (DCM), Acetato de Etilo (AcOEt), Butanol (But) y Agua (Ac)) de *C. subedentata* en su evaluación de la capacidad atrapadora de radicales libres mediante los métodos de DPPH y ABTS, con el fin de observar si esta especie puede ser una buena fuente natural de antioxidantes. Por último en el contenido de metabolitos secundarios y su potencial farmacológico se busca determinar la evaluación preliminar de la actividad citotóxica mediante el método de *Artemia salina*, la actividad antifúngica y la inhibición sobre la enzima acetilcolinesterasa y mediante estas actividades establecer el potencial farmacológico de la especie.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Material Vegetal

El material vegetal correspondiente a *C. subedentata* proviene del trabajo de grado realizado por los estudiantes del programa de Biología William Alberto Lubo Gómez y Carlos Andrés Valencia Benavides, quienes lo reprodujeron a partir de bulbos obtenidos de la colección de plantas de la familia Amaryllidaceae, custodiada por el grupo de investigación Química de Compuestos Bioactivos (QCB) y establecida en el Jardín Botánico Álvaro José Negret vereda La Rejoja, municipio de Popayán (Cauca), con coordenadas 2° 31' 23" Norte y 76° 35' 73" Oeste, a una altitud de 1800 m.s.n.m.

### 6.2. Establecimiento del ensayo

Las plantas de *C. subedentata* se sembraron en materas plásticas que contenían 1 kg de suelo y fueron colocados durante su desarrollo en un área boscosa. Los tratamientos de fertilización se realizaron una vez iniciada la emergencia de la primera hoja, siendo macronutrientes aplicados al suelo y los micronutrientes mediante aplicación foliar y en la base de la parte aérea de planta. Los tratamientos que se aplicaron en esta investigación fueron: Testigo absoluto (tratamiento A), es decir una muestra de suelo proveniente de un lote en el que no se han realizado manejos agronómicos. Tratamiento consistente en fertilización con macronutrientes: se usó una fuente comercial de nitrógeno, fósforo y potasio (Abono triple 15) (tratamiento B). Fertilización con micronutrientes; tratamiento consistente en una solución nutritiva elaborada a base de B, Cu, Fe, Mn y Zn (tratamiento C). Combinación de fertilizantes, consistió en la suma de macronutrientes más micronutrientes (tratamiento D) (Tabla 4).

Los tratamientos se aplicaron a las unidades experimentales mediante un diseño completamente aleatorio, asignándose a cada tratamiento 16 unidades experimentales e iniciando la aplicación de cada uno de los tratamientos con el brote de la primera hoja. En la tabla 4 se indica la cantidad de macro y micronutrientes suministrados en los diferentes tratamientos de fertilización y los requerimientos nutricionales establecidos para *A. cepa* (cebolla), especie que se tomó como referencia ya que pertenece a la familia Amaryllidaceae, y aún se desconoce los requerimientos nutricionales de manera específica para *C. subedentata*.

**Tabla 4.** Cantidad de macro y micronutrientes requeridos y aplicados en los tratamientos la fertilización en *C subedentata*.

<b>Nutriente</b>	<b>Cantidad contenida en suelo<sup>a</sup></b>	<b>Cantidad requerida por la planta<sup>a</sup></b>	<b>Cantidad a aplicar<sup>a</sup></b>
<b>Tratamiento B</b>			
<b>Nitrógeno</b>		0.11	0.09
<b>Fósforo</b>		3.5	0.9
<b>Potasio</b>	1.86*10 <sup>-5</sup>	3.04*10 <sup>-5</sup>	1.18*10 <sup>-5</sup>
<b>Tratamiento C</b>			
<b>Zinc</b>	0.517	1.08	0.0020
<b>Boro</b>		15.06	0.0151
<b>Cobre</b>	< 1	13.56	0.014
<b>Manganeso</b>	1,10	3	0,118
<b>Hierro</b>	< 2	37.5	0.200
<b>Tratamiento D</b>			
<b>Nitrógeno</b>		0.11	0.09
<b>Fósforo</b>		3.5	0.9
<b>Potasio</b>	1.86*10 <sup>-5</sup>	3.04*10 <sup>-5</sup>	1.18*10 <sup>-5</sup>
<b>Zinc</b>	0.517	1.08	0.0020
<b>Boro</b>		15,06	0.0151
<b>Cobre</b>	< 1	13.56	0.014
<b>Manganeso</b>	1.10	3	0.118
<b>Hierro</b>	< 2	37.5	0.200

<sup>a</sup> Cantidades expresadas como kg de nutrientes /kg suelo seco

Para los análisis se tomarán como muestra vegetales las hojas, bulbos y raíces, teniendo así cuatro muestras de hojas, bulbos y raíces, por lo tanto tamaño del ensayo en total es de doce muestras.

### 6.3. Recolección de material vegetal y secado

Después de siete meses se recolectó el material vegetal, el cual fue depositado en bolsas negras para evitar daños físicos y químicos, y de este modo fue trasladado al laboratorio del grupo de investigación QCB, adscrito al Departamento de Química de la Universidad del Cauca, donde se realizó la limpieza de cada muestra (hojas, bulbos y raíces). Se tomaron individualmente, se retiraron las partes dañadas y se lavaron con abundante agua hasta retirar todos los residuos de suelo y restos orgánicos, se colocaron sobre papel periódico, se dejó evaporar los residuos de agua de

lavado y se pesaron para la determinación de humedad; luego los bulbos fueron cortados finamente para evitar la aparición de agentes fúngicos, así mismo son cortadas manualmente las raíces, las hojas no se manipulan.

El secado de las muestras vegetales también se realizó utilizando papel periódico a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo de aproximadamente dos meses. Las muestras de hojas secas se cortaron en trozos pequeños y se procedió a pesarlas para utilizarlos en la extracción.

#### **6.4. Preparación de extractos mediante el método Soxhlet**

##### **6.4.1. Reactivos para la preparación de la muestra y sus respectivas etapas de estudio**

A continuación en la tabla 5 se indican los reactivos utilizados en cada etapa de la investigación, encontrando en ella la descripción desde donde se obtiene el reactivo es decir lo referente a la casa comercial, el país desde donde proviene

##### **6.4.2. Extracción del material vegetal por medio del método Soxhlet**

Los extractos obtenidos a partir de las muestras vegetales fueron extraídos mediante un equipo Soxhlet utilizando como solvente etanol al 96%, durante un periodo de 48 horas; los extractos etanólicos totales obtenidos para el testigo absoluto (A), y los tratamientos B, C y D (hojas, bulbos y raíces), se llevaron a sequedad mediante concentración a presión reducida en un rotaevaporador Laborota 4000-Efficient Heidolph (Schwabach, Alemania). Los extractos obtenidos se almacenaron en frascos ámbar, recubiertos con papel aluminio y se guardaron en nevera a 4 °C hasta el momento de su uso.

**Tabla 5.** Reactivos utilizados en cada proceso de la investigación con su casa comercial y el país de donde proviene

Reactivo	Casa comercial	Reactivo	Casa comercial	
Etanol al 96%	J.T. Baker	1,1-difenil-2-picrilhidracilo	Sigma-Aldrich	
Éter etílico	Xalostoc	2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato	St. Louis, USA	
Hexano	México	Butilhidroxitolueno		
Diclorometano		$\alpha$ -Tocoferol		
Acetato de etilo		Trolox		
Cloroformo		Acetilcolinesterasa de <i>Electrophorus electricus</i>		
Butanol		Iodato de acetiltiocolina		
Ácido sulfúrico		Albumina de suero bovino		
Ácido fosfórico		Eserina		
Dimetilsulfóxido		Ácido ascórbico	Mol Labs Bogotá, Colombia	
Acetonitrilo		Carbonato de sodio	Carlo Erba	
Ácido (+)-tartárico,		Merck Darmstadt Alemania	Cloruro de sodio	Val de Reuil Francia
Ácido clorhídrico (37%)			Fosfato dihidrógeno de potasio	
Ácido acético glacial			Fosfato de sodio dibásico	
Ácido pícrico			Cloruro de potasio	
Tricloruro de antimonio	Persulfato potásico			
Vainillina	Reactivo de Folin-Ciocalteu		Panreac Barcelona, España	
Nitrato de bismuto III pentahidratado	Carlo Erba Val de Reuil (Francia)	Ácido gálico		
Persulfato de potasio		Huevos de <i>Artemia salina</i>	Quimpo Popayán, Colombia	
Hidróxido de sodio,		Sal marina		
Ácido cítrico,		Ácido 3,5-dinitrosalicílico	Vetec Barcelona	
Hidróxido de potasio,		Tris hidroximetilamino metano		
Hidróxido de amonio		Cloruro de magnesio	España	
Yoduro de potasio	Ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico			
Ácido bórico		Acetato de sodio		
Ácido sulfúrico concentrado	Fisher Scientific	Cloruro de calcio		
Cloruro férrico anhidro	(Nueva York, USA)	Tetra borato de sodio anhidrido		
Sulfato ferroso Heptahidratado		Dimetilsulfóxido		
Ácido 3,5-dinitrobenzoico	Alfa Aesar (Nueva York, USA)	Ácido tánico		
Acetato de plomo (II)	Laboratorios Biocroma Cali, Colombia	Fosfato de sodio monobásico		
Polietilenglicol	Sigma-Aldrich St. Louis, USA	Fosfato de sodiodibásico		
Ácido fórmico		Bicarbonato de sodio		
Ácido acético		Tartrato de sodio y potasio		
Anisaldehído		Bisulfito de sodio		
Ácido acético		Brain Heart Infusión (BHI)	Scharlab Barcelona España	
Metanol		Agar dextrosa sabouraud	Dickinson and company USA	

## 6.5. Ensayo de tamizaje fitoquímico

La determinación de los metabolitos secundarios presentes en hojas, bulbos y raíces de *C. subdentata*, se llevaron a cabo mediante tamizaje fitoquímico, utilizando EET, siguiendo la metodología clásica de Sanabria Al *et al*<sup>71</sup>., en anexo 2 tabla1 se detallan cada uno de los ensayos realizados.

## 6.6. Cuantificación de Gal y Lyc mediante CLAR

La cuantificación de los alcaloides Gal y Lyc se realizó mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) de los extractos alcaloídicos para cada una de las 15 muestras, siguiendo el procedimiento descrito a continuación.

### 6.6.1. Preparación de la muestra

Se pesaron 10 mg de cada EET, los cuales fueron disueltos en 10 mL de agua desionizada y se colocaron en el ultrasonido por espacio de 4 minutos, luego se procedió a acidificar con ácido acético glacial 2.5%, hasta un pH en un rango entre 3-4, posteriormente se lavó con 6 mL de éter etílico cuatro veces; la fase orgánica se basificó con amoníaco al 50% hasta un pH entre 8-9, por último se extrajo con cloroformo, esta fase orgánica, se neutralizó y llevó a sequedad. El extracto alcaloídico de cada una de las muestras se redisolvió en metanol para su posterior inyección en el cromatógrafo líquido de alta resolución.

### 6.6.2. Condiciones de cuantificación por CLAR/UV-DAD para Gal y Ly

En la siguiente tabla se describen las condiciones probadas para el establecimiento

**Tabla 6.** Datos preliminares al establecimiento del método cromatográfico

Ensayo preliminar	Parámetros	Resultado
Elección de la Fase móvil	Metanol 100% Acetonitrilo 100% Metanol:acetonitrilo 50:50; 80:20 Acetonitrilo: agua, ácido fórmico 30:70,0.1% Metanol: agua: acetonitrilo (78:20:2)	Se evaluaron cinco fases móviles, encontrándose que la daba mejor resolución de pico era Metanol: agua: acetonitrilo (MeOH:H <sub>2</sub> O: ACN)
Elección de temperatura de la columna C18	24 °C 26 °C 27 °C 30 °C	En un principio se trabajó a temperatura ambiente, debido a esto se afectaba el área del pico así mismo aumentaba el ruido en los cromatogramas, por tanto se estableció como la mejor temperatura la de 30 °C, usándose el termostato de la columna

### 6.6.3. Validación del método

La cuantificación de los alcaloides Gal y Ly se realizó por CLAR utilizando un sistema de cromatografía líquida capilar Hewlett Packard 1100 (California USA) en fase reversa, con un detector UV-DAD, a una longitud de onda de 215 nm, se utilizó una columna C18, esta parte experimental se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales de la Universidad Tecnológica de Pereira. Inicialmente se realizó una curva de calibración patrón externo tanto de Gal como de Ly, como técnica de cuantificación

En primera instancia fue necesario validar el método cromatográfico en el laboratorio, el cual ya había sido estandarizado por Yanza Al *et al.*<sup>66</sup>., Se evaluaron los parámetros de linealidad, sensibilidad, reproducibilidad, exactitud, establecidos para determinar si se ajustaban al nuevo equipo y a la columna. Se determinó el flujo evaluando diferentes solventes y volúmenes hasta obtener una mayor resolución de pico, el volumen de inyección fue de 50  $\mu$ l, una elusión isocrática a una temperatura de 30 °C, fase móvil MeOH: H<sub>2</sub>O: ACN (78:20:2). Estos parámetros se obtuvieron inyectando muestras A es decir provenientes de las plantas desarrolladas en suelo al que no se aplicó fertilizante, se les realizó diferentes perfiles cromatográficos usando cinco diferentes eluyentes a saber: MeOH 100%, ACN 100%, MeOH: ACN1:1, ACN: H<sub>2</sub>O HCOOH 0.1% (30:70), ACN: H<sub>2</sub>O HCOOH 0.1 (30:70).

### 6.6.4. Determinación del Test estadístico de la pendiente y el intercepto

Se realizó el test estadístico calculando la pendiente y del intercepto lo que permite confirmar la linealidad del método. Como primera medida se debió evaluar por medio de un test estadístico de la t de student la  $t_{calculada}$  para el intercepto y la pendiente, para así establecer errores sistemáticos y si existen diferencias significativas en estos dos parámetros.

Para el intercepto se planteó las siguientes hipótesis:

$H_{0a}$ : a es menor o igual a cero

$H_{0alternativa}$ : a es significativamente diferente de cero

$t_a$  calculada=5.687 >  $t_a$  tabulada=2.57 y en lyc  $t_a$  calculada=-2.142 <  $t_a$  tabulada=2.57, donde se rechaza la hipótesis nula en Gal encontrándose que el intercepto es significativamente diferente de cero y en Ly se acepta la hipótesis nula

Para la pendiente se tiene las siguientes hipótesis:

$H_{0b}$ : b es igual a cero

$H_{a_b}$ : b es significativamente diferente de cero con nivel de significancia del 95%

$T_b$  calculada= 251.644 Gal, 51.348 Ly >  $t_b$  tabulada= 2.57, por lo tanto la hipótesis nula se rechaza, tomándose la hipótesis alternativa, comprobándose la linealidad con un límite de confianza del 95%

### 6.7. Fraccionamiento de los extractos etanólicos totales

El extracto etanólico total (EET) seco de las muestras hojas, bulbos y raíces, fue fraccionado mediante extracción líquido-líquido (L-L) utilizando cuatro solventes de diferente polaridad: Hex, DCM, AcOEt, But y Ac, para dicha extracción se requirió de 0.8 g en promedio de EET de cada una de las muestras, se le adicionaron 30 mL de agua destilada, se sometieron a baño ultrasónico por 5 minutos, a continuación se realizó la extracción L-L poniendo en un embudo de decantación la mezcla de EET y agua para el proceso de fraccionamiento. Se realizaron tres extracciones sucesivas con 10 mL de hexano, la fase orgánica obtenida se concentró a presión reducida. Para obtener las fracciones de acetato de etilo AcOEt, DCM y de But se repitió el procedimiento extractivo descrito para Hex. Las muestras obtenidas se almacenaron a una temperatura de 4°C. Los porcentajes de extracción para cada una de las fracciones se muestran en el anexo 1 tabla 2.

### 6.8. Evaluación de la actividad antioxidante mediante el ensayo DPPH

Este ensayo se llevó a cabo mediante el protocolo colorimétrico descrito por Brand-Williams *et al*<sup>72</sup>., En este ensayo se empleó el radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) disuelto en solución metanólica<sup>73</sup>, evaluando la actividad antioxidante total por la disminución de la absorbancia del radical a 515 nm, longitud de onda en la que emiten los compuesto antioxidantes evaluados de los extractos etanólicos empleado un equipo UV-vis Thermo Scientific GENESYS 6 (Texas, USA).

Inicialmente se disolvieron 2.9 mg de DPPH en 100 mL de metanol, se determinó la absorbancia y se ajustó el valor en  $0.80 \pm 0.03$  ( $\lambda = 515$  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  $2 \times 10^{-2}$  M a  $8 \times 10^{-2}$  M. El análisis de las muestras se realizó de la siguiente manera: 2 mL de solución metanólica de DPPH se mezcló en una cubeta de plástico con 1 mL de disolución metanólica de las muestras evaluadas (por triplicado) en un rango de concentraciones entre 10-1000  $\mu\text{g/mL}$ , 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.

La capacidad captadora de radicales libres se evaluó para los extractos totales de hojas, bulbos y raíces, las fracciones provenientes de los EET, tomando las medias de las tres repeticiones, así mismo se evaluó la actividad antioxidante frente a tres patrones: ácido ascórbico, BHT,  $\alpha$ -tocoferol, esto con el fin de poder hacer las comparaciones respectivas después del tratamiento matemático de éste procedimiento.

$$\%AA = \frac{A_c - [(A_{fe} - A_{be}) - (A_{ie} - A_{be})]}{A_c} \times 100 \quad (1)$$

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

Para la determinación de los TEAC fue necesario realizar una curva de calibración con Trolox, este proceso se describe en el anexo 4 numeral 2.

### 6.9. Determinación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo ABTS

Este ensayo se llevó a cabo mediante el protocolo colorimétrico descrito por Daniels C. W. *et al*<sup>74,75</sup>, 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 fue decolorado en presencia de compuestos antioxidantes. Para realizar la solución del radical se preparó una solución de buffer fosfato salino (PBS a pH 7.4, obtenido al disolver 820 mg de NaCl, 26 mg de  $KH_2PO_4$ , 140 mg de  $Na_2HPO_4$  y 14 mg de KCl en 1 L de agua ultrapura, de donde se tomó 50 mL de ésta para disolver el catión radical  $ABTS^+$ , posteriormente se puso en reacción con 200  $\mu$ L de disolución de  $K_2S_2O_8$  (persulfato potásico 2 mM en PBS), 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  $0.80 \pm 0.03$  ( $\lambda=734$  nm).

El análisis de las muestras bajo esta metodología se realizó de la siguiente manera: se tomaron 950  $\mu$ L de una solución en PBS del catión radical  $ABTS^+$ , más 50  $\mu$ L de una solución metanólica de las muestras evaluadas en un rango de concentración entre 10-500  $\mu$ g/mL de cada fracción, se mezcló, se incubó en una celda de plástico a temperatura ambiente, se mantuvo en la oscuridad durante 5 minutos y se registró el valor de la absorbancia en el espectrofotómetro UV-ThermoScientific GENESYS 6 a 734 nm<sup>76</sup>. Para la determinación de los TEAC en el método de ABTS se realizó

una curva de calibración con Trolox, este proceso se describe en el anexo 4 numeral 3.

#### **6.10. Determinación del contenido total de fenoles**

El contenido de fenoles totales en los extractos de *C. subedentata* fue determinado espectrofotométricamente utilizando el método de Folin-Ciocalteu (F-C), descrito por Suh S-S *et al*<sup>77</sup>., para los análisis de las muestras se tomaron 2 mL de solución acuosa del reactivo de Folin-Ciocalteu (0.2 eq/L), posteriormente se disolvió la fracción a evaluar en 0.4 mL de solución metanólica en un rango de concentración de muestra que va desde 100-1000 µg/mL, se mezclaron las soluciones anteriormente descritas y se procedió a incubar por cinco minutos en la oscuridad, a continuación se adicionaron 0.8 mL de carbonato de sodio, se agitó, luego se incubó en la oscuridad durante una hora y se realizó la respectiva lectura de la absorbancia en un equipo ThermoScientific GENESYS 6 a una longitud de onda de 760 nm. La cuantificación de los fenoles totales se realizó por medio de una curva de calibración de ácido gálico en un rango de concentración de 15-75 µg/mL, la preparación de ésta se describe en el anexo 4 numeral 1.

#### **6.11. Actividad Citotóxica preliminar**

La evaluación de la actividad citotóxica preliminar mediante el bioensayo de *Artemia Salina* se realizó siguiendo los protocolos de Sharififar, F *et al*<sup>71,78</sup>., Se tomaron los EET de hojas, bulbos y raíces de *C Subedentata*. Para llevar a cabo el ensayo, se prepararon 1000 mL de solución salina, utilizando 30 g de sal marina a un pH de 8, la cual se utilizó posteriormente para la eclosión de los nauplios de *A. Salina* y para la dilución de los extractos a evaluar.

En la primera etapa del ensayo para obtener las larvas de *A. Salina* se pesaron 250 mg de los huevos y se adicionaron en 250 mL de la solución salina posteriormente se incubaron en una cámara ambiental Biotronette lab line 846 (Virginia USA), a temperatura ambiente y luz blanca durante 48 horas, finalizado este tiempo, se procedió a preparar cada una de las soluciones de los extractos de hojas, bulbos y raíces de *C subedentata*, para la preparación de estas diluciones se adicionó un volumen equivalente de dimetilsulfoxido (DMSO) en mL, para obtener concentraciones de 200,100, 50 y 10 ppm.

Para realizar el bioensayo, a un balón aforado de 5 mL se transfirieron 10 nauplios de *A. Salina* y se adicionó la cantidad correspondiente de las diferentes concentraciones de los EET y se aforó con solución salina, se realizó un control positivo y un negativo, finalizado este proceso se

introdujeron en la cámara ambiental. Se realizaron dos conteos a las 6 y 24 horas, de las larvas muertas para determinar la toxicidad de los extractos etanólicos. Los valores obtenidos se procesaron empleando el software Graph PadPrism 5.0 (California USA) y se determinó el valor de  $CL_{50}$

### 6.12. Determinación de la actividad antifúngica

Para la evaluación de la actividad antifúngica de los extractos etanólicos de *C subedentata* se siguió el protocolo estandarizado por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI) (USA)<sup>79</sup>, realizando algunas modificaciones.

Inicialmente se prepararon los medios de cultivo que se utilizaron en el ensayo, que fueron el medio de cultivo BHI con 4.7g en 100 mL agua y agar dextrosa Sabouraud se preparó pesando 6.5 g del medio y se adicionó en 100 mL de agua destilada hasta dilución total, luego se procedió a realizar la esterilización, se colocaron en la nevera hasta su posterior utilización.

Para las muestras se tomaron 50 mg de cada uno de los EET de hojas bulbos, y raíces y se esterilizaron, posteriormente se disolvieron en 2 mL de DMSO, a partir de esta solución patrón se prepararon 9 muestras a diferentes concentraciones, de cada una de estas soluciones se tomaron 20  $\mu$ L, y se transfirieron a tubos de ensayo donde se les adicionó 980  $\mu$ L de BHI, obteniendo concentraciones finales de (20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156, 0.078, 0.039 ppm), estas soluciones se utilizaron para el llenado de las placas.

Para los inóculos se tomó con una asa 5 colonias de un cultivo fresco de 24 horas de *C albicans* preparada en agar dextrosa Sabouraud y se suspendió en una solución salina esteril, se ajustó la densidad óptica a 0.5 en la escala de McFarland, se tomaron 3 mL de esta solución y se mezclaron con 22 mL del medio BHI, solución que se utilizó para el llenado de las microplacas de 96 pozos.

Las placas se llenaron de la siguiente manera, en la columna número 1 se adicionaron 300  $\mu$ L del medio BHI, el cual actuó como control de esterilidad, de igual manera se llenó la columna 12, adicionando 150  $\mu$ L del medio BHI y 150  $\mu$ L del inóculo de *C. albicans* (control de crecimiento). Para los demás pozos (columnas 2-11) se adicionaron 150  $\mu$ L cada una de las soluciones de los extractos y 150  $\mu$ L del inóculo de *C. albicans*. Un procedimiento muy similar se realizó con la cepa control *C. parapsilosis* (ATTC 22019) y fluconazol, al finalizar el llenado de las placas se taparon y se incubaron a una temperatura de 37°C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se

procedió a la determinación de las absorbancia que se realizó en un lector de microplacas Stat Fax 2100 (Rosario Argentina) y se utilizaron dos filtros a 492 y 630 nm, el análisis de datos se realizó empleando el software Graph PadPrism versión 5.

### 6.13. Actividad Enzimatica

La inhibición de los extractos de hojas, bulbos y raíces de *C. subedentata*, sobre la enzima acetilcolinesterasa se determinó mediante ensayos colorimétricos *in vitro*. En una microplaca de 96 pozos se adicionaron los siguientes reactivos en este orden: 25  $\mu$ L de ATCI (Ioduro de acetiltiocolina) 15 mmol/L en agua destilada, 125  $\mu$ 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  $\mu$ L de tampón B (50 mmol/L, pH 8, conteniendo 0.1 % albúmina de suero bovino) y 25  $\mu$ L de extracto vegetal en solución tampón Tris 50 mM, pH 8, conteniendo 10% de metanol (15.625  $\mu$ g/mL, 31.25  $\mu$ g/mL, 62.5  $\mu$ g/mL, 125  $\mu$ g/mL, 250  $\mu$ g/mL, 500  $\mu$ g/mL y 1000  $\mu$ g/mL). La absorbancia fue determinada espectrofotométricamente mediante un lector de microplacas-Go Thermo scientific (waltham, USA) a 405 nm, en seguida, fueron adicionados 25  $\mu$ L de solución de acetilcolinesterasa y se midió la absorbancia nuevamente. Un aumento en absorbancia, se debe 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 fueron utilizados el inhibidor eserina (Esa) y Gal. La curva de respuesta para estos patrones fué construida a concentraciones variando entre 7.81 y 1000,00  $\mu$ g/mL, estos valores se expresan como la media de cada triplicado. Las curvas de inhibición fueron obtenidas graficando el porcentaje de inhibición versus el logaritmo de concentración de Esa. 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.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Extracción y tamizaje fitoquímico

Los porcentajes de extracción de las muestras trabajadas por el método Soxhlet para la obtención de los EET de las muestras vegetales y la obtención del EAT de los extractos totales de las muestras con y sin tratamiento se muestran en la tabla 7; en estos se halla que el porcentaje de extracción del EET de hojas fue 30%, valor de que resultó ser el más bajo de todo el proceso extractivo, sin embargo los EET de las muestras restantes tuvieron un porcentaje de extracción mayor al 70 % observándose que el método-sólido líquido utilizado fue notablemente efectivo para la obtención de los EET de las muestras vegetales. Respecto a la extracción de EAT de las muestras se encontró una respuesta buena pues los porcentajes de extracción de alcaloides superaron el 70 % en todos los casos mostrando que el proceso extractivo líquido-líquido es efectivo para la obtención de los EAT.

**Tabla 7.** Porcentajes de extracción para la obtención del EET y EAT de las muestras de hojas, bulbos y raíces

Muestra	Extracción EET (%)	Extracción EAT (%)
Hojas A	66.03	97
Hojas B	80.90	74
Hojas C	85.33	91
Hojas D	79.87	90
Bulbo A	92.93	92
Bulbo B	85.98	90
Bulbo C	89.57	97
Bulbo D	89.37	84
Raíz A	88.45	93
Raíz B	98.88	90
Raíz C	89.87	93
Raíz D	91.45	83
Hojas	30.13	95
Bulbos	85.63	80
Raíces	80.71	84

**Nota:** Los valores consignados están expresados en (g Extracto seco/ g de muestra seca)\*100

El tamizaje fitoquímico permitió determinar mediante pruebas cualitativas metabolitos secundarios de gran importancia en el estudio de las propiedades farmacológicas de los extractos vegetales. El tamizaje fitoquímico se desarrolló siguiendo los protocolos planteados por Lock de Ugas O *et al*<sup>80</sup>. El tamizaje se realizó sobre los EET de las muestras de *C. subedentata* trabajadas (hojas, bulbos y raíces). El tamizaje incluyó ensayos para la determinación de: alcaloides, cardiotónicos, cumarinas volátiles, taninos, saponinas, triterpenos y/o esteroides. Los resultados obtenidos se presentan en tabla 8.

#### **7.1.1. Determinación de alcaloides**

Las pruebas realizadas para determinar los alcaloides fueron Dragendorff, Mayer, Wagner, son pruebas cualitativas colorimétricas, respecto al reactivo de Dragendorff el resultado positivo de esta prueba presenta un precipitado de color anaranjado; La prueba de Wagner muestra un precipitado de color café y la prueba de Mayer es positiva mostrando un precipitado crema o de color blanco, las tres muestras evaluadas fueron positivas para los reactivos mencionados, encontrándose una respuesta marcada en raíces, luego en bulbos. Este resultado es mostrado en la investigación de Cabezas *et al*<sup>16</sup>., quien por medio de cromatografía de gases determinó el contenido de diferentes alcaloides en los bulbos y en las hojas de *C. subedentata*<sup>81</sup>.

#### **7.1.2. Cardiotónicos**

Cada una de las pruebas realizadas para identificar cardiotónicos tiene en común resultado positivo con coloraciones intensas, Salkowski produce color rojo, Keller kiliani color rojo, Baljet precipitado de color anaranjado. Se lograron determinar cardiotónicos: cardenólidos bufadienólidos con la prueba de Salkowski, ya que el color fue rojo-intenso, por otro lado se encuentra que los cardenólidos bufadienólidos están enlazados con desoxiazúcares dando positivo con la prueba de Keller Kiliana, la prueba de Raymond-Marthoud fue positiva para hojas, raíces y negativa para bulbos.

#### **7.1.3. Cumarinas**

Cumarinas volátiles dieron positivo para las tres muestras evaluadas con la prueba de hidróxido de sodio, siendo hojas la de mejor resultado observado con lámpara UV y con menor intensidad para raíces y bulbos; éstos importantes metabolitos secundarios poseen actividad biológicas tales como antihipertensivos, anticancerígenos, antifúngicos<sup>82</sup>, etc.

#### 7.1.4. Taninos

Respecto a taninos se encontró una respuesta positiva ante cloruro férrico; sin embargo con las soluciones de gelatina dio un resultado negativo esto se atribuye a la coloración verdosa observada en la reacción de los extractos con el  $\text{FeCl}_3$  (observar tabla de anexos 2), este resultado muestra que los taninos presentes en los EET de *C. subedentata* son posiblemente taninos condensados pues el  $\text{FeCl}_3$  se reduce de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , como resultado la solución evaluada se torna verdosa<sup>83</sup>; por consiguiente cuando se realizan los ensayos con gelatina el resultado es negativo debido a que la prueba es positiva para taninos hidrolizables.

#### 7.1.5. Saponinas

El resultado de saponinas para hojas y raíces presentó formación de espuma poco abundante y constante, lo que mostró la evidencia de poseer saponinas pero en baja proporción (+), la muestra evaluada de bulbos tuvo un resultado negativo, al observar los resultados posiblemente las saponinas en las Amaryllidaceae son de tipo esteroidal, las saponinas de este tipo poseen un núcleo esteroidal atado a un azúcar por medio de un enlace covalente de tipo C-O-C, tipo éster. Lo cual posiblemente provoque poca espuma<sup>84</sup> en la prueba con agua en ebullición.

#### 7.1.6. Triterpenos

Al analizar cualitativamente el resultado de triterpenos con las pruebas de Salkowski y Lieberman Burchard estas son positivas posiblemente a la oxidación de un carbono.

De acuerdo al tamizaje fitoquímico se espera encontrar una actividad biológica buena, respecto a los metabolitos hallados para cada una de las muestras evaluadas bajo las pruebas correspondientes. Los resultados de estas pruebas se detallan en la tabla 8. (En el anexo 2 tabla 2 se encuentran los registros fotográficos de cada una de las pruebas realizadas)

**Tabla 8.** Resultados del tamizaje fitoquímico de hojas, bulbos y raíces de *C. subedentata*

Prueba	Reactivo	Resultado		
		Hojas	Bulbos	Raíces
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)	+++	+	+
Taninos	Cloruro férrico	+++	++	++
	Solución de gelatina	-	-	-
	Solución de gelatina y sal	-	-	-
	Solución salina	-	-	-
Saponinas	Formación de espuma	+	-	+
Triterpenos	Liebermann- Burchard	++	+++	++
	Salkowski	+++	+++	+++
Derivados antracénicos libres	Reacción Bomtraeger	-	-	-

Reacción leve: + Reacción moderada: ++ Reacción marcada: +++ Ausencia: -



## 7.2. Cuantificación de Gal y Ly

### 7.2.1. Condiciones del método cromatográfico

La cuantificación de Gal y Ly se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución CLAR en las muestras de *C. subdentata* de los extractos totales y los EET de las plantas sometidas a tratamientos con macronutrientes: B, micronutrientes: C y macro-micronutrientes: D y el testigo absoluto: A, descritos en la parte de materiales y métodos. Para iniciar el proceso de validación se tomó como referencia los trabajos de Yanza C. *et al*<sup>66</sup>., en éste trabajo se cuantificó Gal en extractos etanólicos de *P. dubia*, *E. amazónica*, *E. grandiflora* y *C. subdentata* en estado natural, por otro lado López B. D *et al*<sup>65</sup>., muestra en su trabajo el contenido alcaloídico de *C. subdentata* con sus porcentajes de rendimiento. Antes de iniciar el proceso de validación fue necesario tener una fase de establecimiento de los parámetros adecuados del método (los cuales se detallan en el anexo 3). Con los resultados de los análisis preliminares se determinaron las mejores condiciones para la separación y cuantificación de los alcaloides Gal y Ly, estas condiciones se muestran a continuación.

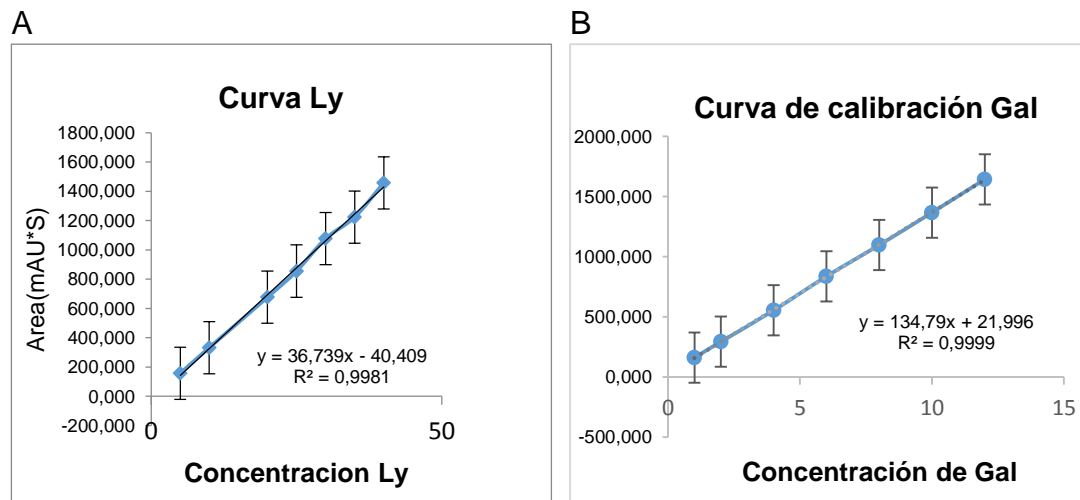
**Tabla 9.** Parámetros del método Cromatográfico para cuantificar Gal en *C. subdentata*

Parámetro	Característica
Detección	Visible $\lambda = 215$
Elución	Isocrático
Temperatura	30 °C
Flujo	0.8 mL/min
Volumen de inyección	60 $\mu$ L
Columna	Restek C18; 5 $\mu$ m X 4.6 mm X 150 mm
Fase móvil	Metanol: agua: acetonitrilo (78:20:2)
Tiempo de retención	3- 4 min
Tiempo de corrida	10 min

## 7.2.2. Validación en el laboratorio del método analítico

### 7.2.2.1. Evaluación de la linealidad del sistema

Para la validación de este método de cuantificación, se elaboró una curva de calibración para evaluar la linealidad. Siendo de suma importancia observar la proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta en el cromatógrafo de CLAR, para lo cual se realiza una validación retrospectiva<sup>86</sup>, estableciendo nuevos parámetros al método, como primer componente de linealidad se evaluó el coeficiente de regresión o de linealidad ( $r$ ) de la curva; todos los datos se analizan sabiendo que provienen de un triplicado de cada inyección de analito Gal y/o Ly.



**Figura 4.** Curvas de Calibración para Gal y Ly (A). Curva de Gal; (B). Curva de Ly

Los datos de las curvas de calibración fueron tabulados por medio de los programas estadísticos Excell y GraphPad Prism 5 (Microsoft Corporation). Para iniciar con la valoración del método se establece por la forma de experimentación se evalúa el sistema bomba, columna y detector, debido a la utilización de los estándares de Gal y Ly.

### 7.2.2.2. Cuantificación por CLAR-UV/DAD de Gal y Ly

Con la validación del método se logró cuantificar los alcaloides Gal y Ly en las muestras de *C. subedentata* en hojas, bulbos y raíces, estos alcaloides fueron extraídos de los extractos etanólicos mediante el proceso ácido-base que se describió en la sección de materiales y métodos, cuantificación de Gal y Ly. En la tabla 10 se indican los parámetros de linealidad evaluados con su

respectiva estadística con el fin de obtener certeza del 95% en los datos evaluados.

**Tabla 10.** Parámetros para la evaluación de la linealidad de Gal y Ly

Parámetro	símbolo	Valor
Coeficiente de correlación Gal	R	0.999
Pendiente	B	134.793
Intercepto	A	21.996
Desviación estándar para el intercepto	Sa	0.016
Desviación estándar para la pendiente	Sb	0.0009
Test estadístico para el intercepto	t <sub>a</sub>	5.687
Test estadístico para la pendiente	t <sub>b</sub>	251.644
Coeficiente de correlación de Ly	R	0.998
Pendiente	B	36.739
Intercepto	A	-40.409
Desviación estándar para el intercepto	Sa	0.068
Desviación estándar para la pendiente	Sb	0.001
Test estadístico para el intercepto	t <sub>a</sub>	-2.142
Test estadístico para la pendiente	t <sub>b</sub>	51.384

### 7.2.2.3. Límite de confianza de la pendiente y el intercepto

Los límites de confianza (LC) calculados con base en un nivel de confianza del 95% ( $p > 0,05$ ); estos aplican tanto para el intercepto (a) como para la pendiente (b).

**Tabla 11.** Parámetros estadísticos de la linealidad

Metabolito	$b \pm LCb_{\alpha=0.05}$	$a \pm LCa_{\alpha=0.05}$
<b>Galantamina (Gal)</b>	134.793 $\pm$ (1.377)	21.996 $\pm$ (26.30)
<b>Licorina (Ly)</b>	36,739 $\pm$ (1.838)	-40.409 $\pm$ (128.3)

LC para (n-2) grados de libertad y un nivel de confianza de 95%=2.57

El proceso estadístico para obtener el límite de confianza para el intercepto y la pendiente se describe en el anexo 3 numeral 2 determinación del límite de confianza

#### 7.2.2.4. Repetitividad

En la tabla 12 se registran los valores de concentración para evaluar la repetitividad del método valorado.

**Tabla 12.** Evaluación del parámetro de repetitividad del método cromatográfico

*Muestra	Día 1	Día 5	Día 10	Día 15	P	S	CV
	(mUA)	(mUA)	(mUA)	(mUA)			(%)
<b>R(Gal)</b>	1372.32	1386.26	1378.66	1397.57	1383.70	10.86	0.78
<b>B(Ly)</b>	457.83	470.39	449.85	447.58	456.41	10.30	2.26

P: promedio; S: desviación estándar; %CV: porcentaje del coeficiente de variación;

R: raíces; B: Bulbos; \* La concentración de cada muestra fue 100ppm

Para la determinación de este parámetro se evaluaron EET de raíces y bulbos de *C. subdentata* sin tratamiento agroquímico, durante un periodo de tiempo de 15 días. Se encontró coeficientes de variación menores al 5% por lo tanto estadísticamente son aceptados mostrando la homogeneidad de los datos estudiados, de acuerdo esto es claro que por cada día de evaluación de los datos registrados de las muestras no se hallan desviados, como se observa Gal y Ly en las muestras analizadas de raíz y bulbos tienen una buena repetitividad teniendo un coeficiente de variación 0.78% y 2.26% respectivamente; por lo tanto con estos resultados se comprueba la sensibilidad a los análisis estudiados, selectividad y la robustez del método a validar.

#### 7.2.2.5. Sensibilidad

La sensibilidad del equipo se determinó realizando una curva de calibración de Gal en un rango de concentración de 0.1 ppm hasta 0.5 ppm para observar su comportamiento lineal. A continuación en la tabla de datos 13 se muestra los parámetros sensibilidad: límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ).

**Tabla 13.** Curva de calibración para la determinación de LOD y LOQ

<b>Nivel de Concentración</b>	<b>Concentración ppm</b>	<b>Promedio Área (mAU)</b>	<b>S</b>	<b>CV%</b>
<b>1</b>	0.1	25.465	0.014	0.056
<b>2</b>	0.2	36.490	0.007	0.019
<b>3</b>	0.3	48.931	0.014	0.029
<b>4</b>	0.4	62.993	0.006	0.009
<b>5</b>	0.5	76.875	0.151	0.197

S: desviación estándar; CV: coeficiente de variación

**Tabla 14.** Evaluación de la linealidad para LOD y LOQ

<b>Parámetro</b>	<b>Símbolo</b>	<b>Valor</b>
<b>Coeficiente de correlación Gal</b>	R	0.997
<b>Pendiente</b>	B	129.323
<b>Intercepto</b>	A	11.354
<b>Desviación estándar para el intercepto</b>	Sa	2.760
<b>Desviación estándar para la pendiente</b>	Sb	3.722
<b>Test estadístico para el intercepto</b>	t <sub>a</sub>	9.198
<b>Test estadístico para la pendiente</b>	t <sub>b</sub>	34.749

$$b=129,323\pm(11.835) \quad a=11,354\pm(8.777)$$

Ho: b es estadísticamente diferente de cero a un nivel de confianza de 95 %

Ha: b<sub>j</sub> es diferente de cero

Con el test estadístico para el intercepto y para la pendiente se determina que ambas t son mayores a la t tabulada= 3.18, teniendo así un criterio de aceptación para la hipótesis nula, lo cual muestra un comportamiento lineal de las concentraciones evaluadas y sus señales.

**Tabla 15.** LOD y LOQ para la determinación de Gal en *C. subdentata*

Metabolito	Ya	LOD (ppm)	LOQ(ppm)
Gal	11.354	0.115	0.179
Metanol (S <sub>o</sub> )	1.1784		

So: desviación estándar del blanco, Ya: es el intercepto con el eje y

LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación

La determinación de la sensibilidad se trabajó con las ecuaciones de Quattrocchi<sup>86</sup> expuestas en el anexo 3 numeral 2, los resultados del límite de detección muestran que la sensibilidad del método es buena para detectar Gal, encontrándose este límite sobre el primer dato de concentración (0.1 ppm), en paralelo el límite de cuantificación se acerca a la segunda concentración de la regresión (0.2 ppm), los límites de detección y cuantificación comprueban la sensibilidad del método, debido a las concentraciones bajas detectadas y cuantificadas, por ende teniendo el método validado se podrían detectar trazas de Gal en cualquier especie de Amaryllidaceae.

#### 7.2.2.6. Exactitud

En la determinación de la exactitud se toman niveles de concentración en muestras de Ly y Gal, observándose que la mayor parte de los porcentajes de recuperación superan al 90%, demostrando la adecuada metodología de extracción de alcaloides, siendo ésta eficiente. De acuerdo al análisis estadístico: prueba t de dos colas con una probabilidad del 95 % se encontró que la t experimental es mucho más pequeña que la tabulada ( $t_{\text{tabulada}}=3.18$ ), por lo tanto se demuestra la seguridad estadística del método de extracción de alcaloides, de otro modo el coeficiente de variación al registrar valores menores a 5 le da un valor de confianza elevado a los datos estudiados, es decir la extracción alcaloídica, la cuantificación y la detección son estadísticamente validadas en el método.

**Tabla 16.** Porcentaje de recuperación de Gal en EAT de *C. subedentata*

NC	%R	S	%CV
1	82.155	0.002	1.289
2	72.286	0.001	0.147
3	91.825	0.001	0.062
4	97.386	0.000	0.001
5	79.003	0.001	0.116

NC: nivel de concentración    %R: porcentaje de recuperación    S: desviación estándar.  
CV: coeficiente de variación

La ecuación por la cual se determinó el porcentaje de recuperación se muestra en anexo 3 numeral 4.

#### 7.2.2.7. Cuantificación de Gal y Ly

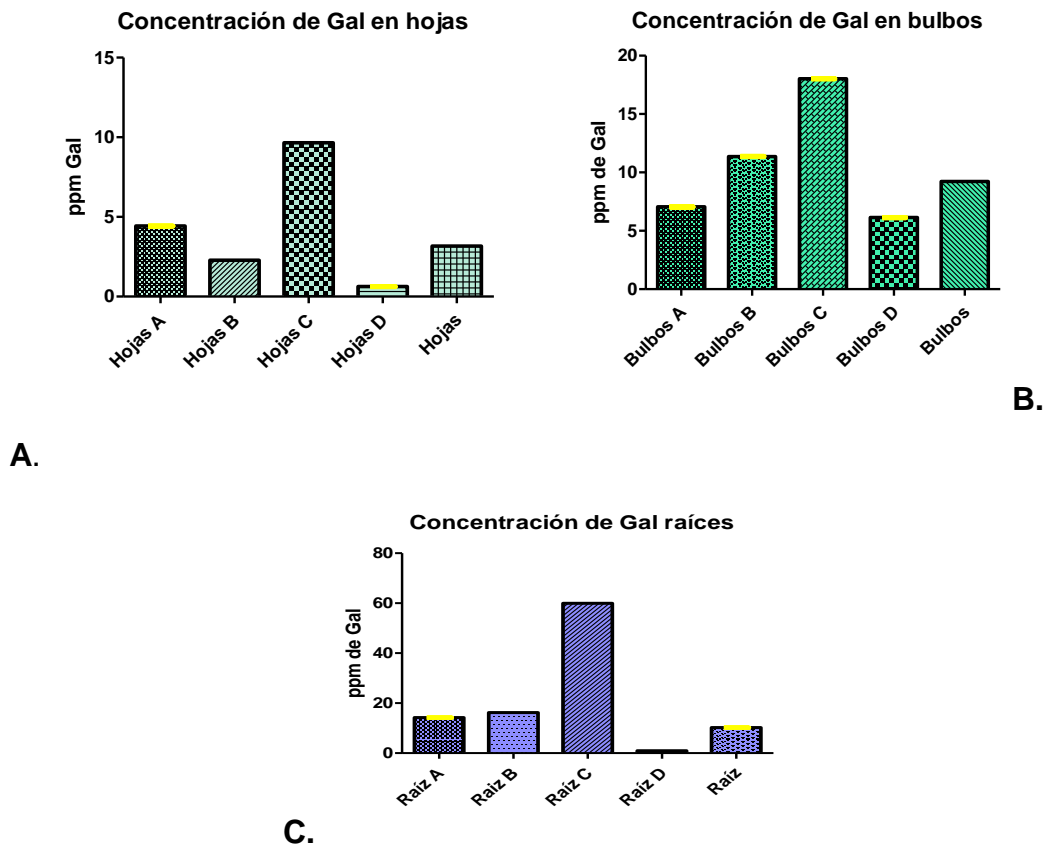
Con el método validado y los tiempos de retención definidos se determinó el contenido de Gal y Ly en cada una de las muestras de *C. subedentata*, obteniéndose como resultado que la parte de la planta que presenta un mayor contenido de los alcaloides son las raíces, seguido de los bulbos y finalmente las hojas. Estos resultados se presentan en la tabla 17.

**Tabla 17.** Concentración de Gal y Ly cuantificada por CLAR en las muestras de *C. subedentata* sometidas a tratamientos agroquímicos.

Muestras	Gal MS (ppm)	% p/p	Ly MS (ppm)	% p/p
Hojas A	4.42	0.10	ND	ND
Hojas B	2.84	0.07	ND	ND
Hojas C	9.65	0.19	ND	ND
Hojas D	0.62	0.02	ND	ND
Bulbos A	7.03	0.05	4.18	0.03
Bulbos B	11.34	0.07	4.94	0.03
Bulbos C	18.01	0.11	46.34	0.28
Bulbos D	6.11	0.04	1.10	0.01
Raíz A	14.19	0.51	27.44	0.98
Raíz B	16.20	0.70	9.18	0.40
Raíz C	59.93	1.86	163.25	5.07
Raíz D	0.95	0.05	6.13	0.31
Hojas	3.17	0.01	ND	ND
Bulbos	9.23	0.30	4.83	0.23
Raíces	10.19	0.34	22.36	3.88

MS= muestra seca dirigirse al anexo 3; %p/p= porcentaje peso a peso; ND= no determinado

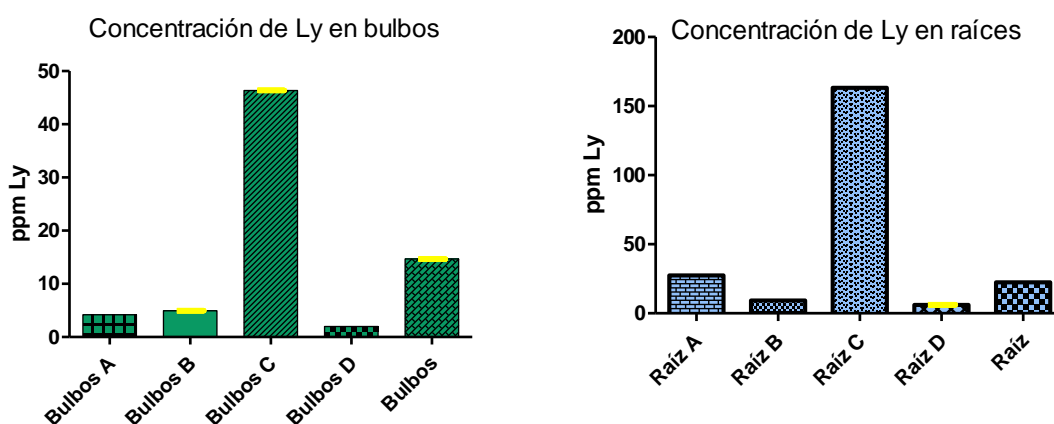
En la figura 5 se presentan los resultados de la cantidad de Gal en ppm que posee la planta, en cada una de sus partes (hojas, bulbos y raíces). En la figura 5 A. se muestran los resultados referentes a las muestras de hojas sometidas a cada uno de los tratamientos, donde la mayor cantidad la presentaron las hojas C 9.65 ppm de Gal y la menor las hojas D 0.62 ppm, La figura 5 B. presenta los resultados para los valores de Gal en bulbos donde la mayor concentración se presentó en bulbos C 18.01 ppm, el menor contenido lo presentaron los bulbos D 6.11 ppm, la figura 5 C. muestra la cantidad de Gal obtenida en raíces al igual que las muestras de hojas y bulbos el ensayo C 59,93 ppm fue el mayor .y la menor cantidad en raíces D 0.95 ppm. Determinando finalmente que el tratamiento con mayor contenido de Gal fue el de la fertilización con micronutrientes, tratamiento C.



**Figura 5:** Histogramas de las concentraciones de Gal en muestras de *C. subedentata*. Dónde: A; testigo, B; tratamiento con macronutrientes, C; tratamiento con micronutrientes, D; tratamiento con macro y micronutrientes en EAT de: A) Hojas, B) Bulbos, C) Raíces.



En la figura 6 se presenta la comparación de los resultados en la cuantificación de Ly, la figura 6 (A) muestra que los bulbos con tratamiento C. presentan el mayor contenido de Ly 46.34 ppm y el menor contenido para los bulbos D 1.10 ppm, la gráfica 6 (B) muestra una tendencia similar, donde las raíces C presentaron el mayor valor de Ly 163.25 ppm y la menor concentración las raíces D 6.13 ppm. Como ya se mencionó anteriormente en las hojas no fue posible realizar la cuantificación.



A.

B.

**Figura 6.** Histogramas de la concentración de Ly en muestras de *C. subedentata*. Dónde: A; testigo, B: tratamiento con macronutrientes, C; tratamiento con micronutrientes, D; tratamiento con macro y micronutrientes. A.) bulbos, B) raíces.

Realizando una comparación entre cada una de las muestras de *C. subedentata* (hojas, bulbos y raíces), se determinó que las tres muestras presentan un mayor contenido de Gal y Ly en los tratamientos de fertilización con micronutrientes (tratamiento C) mientras que la menor cantidad de estos alcaloides se presentó para los tratamientos D (macro y micronutrientes). Para los tratamientos A y B se presentaron resultados muy similares en un intermedio entre los ensayos mencionados anteriormente. En cuanto a la parte de la planta que presentó un mayor contenido de alcaloides fueron las raíces, obteniendo un valor en el contenido de Gal (59.93 ppm) tres veces mayor que para los bulbos (18.01 ppm) y seis veces más que las hojas (9.65 ppm). Para Ly el contenido de este alcaloide fue tres veces mayor para las raíces (163.25 ppm) en comparación con los bulbos (46.34 ppm), en las hojas no fue posible su cuantificación debido a que las áreas no alcanzaron

la mínima concentración cuantificable. Con lo anterior se determina que las raíces son la parte de la planta que posee el mayor contenido de Gal y Ly, y las hojas las de menor contenido.

También se llevó a cabo la cuantificación de los alcaloides en muestras de *C. subedentata* diferentes a las obtenidas en el ensayo planteado descrito en la sección de materiales y métodos (Diseño experimental), para las cuales se encontraron: hojas (3.17 y ND) ppm, bulbos (9.23y 4.83) ppm y raíces (10.19 y 22.36 ppm) de Gal y Ly respectivamente. Estos valores son menores a los reportados por Yanza *et al*<sup>66</sup>, quienes cuantificaron el contenido de Gal en hojas y bulbos de *C. subedentata*, encontrando valores de 29.2 y 23.7 ppm de Gal respectivamente, las hojas presentan nueve veces mayor contenido de Gal que las muestras evaluadas, en los bulbos tres veces mayor contenido, para las raíces no fue posible esta comparación ya que esta parte de la planta no ha sido evaluada pero su contenido de Gal es mayor que para hojas y bulbos.

Otro autor que ha reportado el contenido de Gal y Ly en especies de la familia Amarillydaceae es Gulen K *et al*<sup>70</sup>, quienes reportaron para hojas 0.35% y bulbos 0.04% en la especie *G. elwesii* de Gal, mientras que Ly no fue detectada, estos resultados son similares a los determinados en *C. subedentata*. Encontrando para hojas 0.01 % y bulbos 0.30 % de Gal, y en Ly 0.23% y 0.42 % respectivamente, también se ha reportado el contenido de estos alcaloides en *G. elwesii* de otra localidad obteniendo para hojas 0,29% y bulbos 0.09% donde hojas siguen presentando valores similares mientras que bulbos presentaron nueve veces mayor porcentaje de Gal, para Ly 0.005% en bulbos, en hojas no fue detectada. Con estos resultados se puede determinar que *G. elwesii* y *C. subedentata* presentan un contenido de Gal muy similar, pero en cuanto a Ly *C. subedentata* presenta un mayor contenido, además teniendo en cuenta lo reportado por Gulen el contenido alcaloídico varía dependiendo las condiciones medio ambientales.

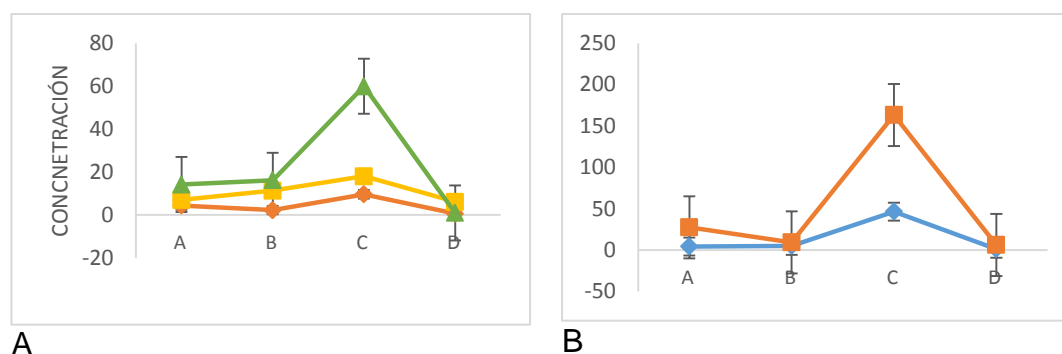
En relación a los resultados para las muestras del ensayo, se determinó que la mayor concentración de los alcaloides la presentaron los ensayos fertilizados con micronutrientes, estos resultados probablemente están relacionados con las funciones que cumplen estos nutrientes en el metabolismo de la planta, ya que son indispensables en el desarrollo biosintético de la planta, aunque sus requerimientos son mínimos su deficiencia puede afectar significativamente el desarrollo normal de la planta. En estudios previos se ha demostrado la influencia directa de los microelementos; se ha determinado que los niveles óptimos de Fe ayudan a que algunas enzimas hemo como las catalasas y peroxidasas presenten una

actividad normal o mayor para así aumentar la biosíntesis de algunos metabolitos secundarios como los alcaloides, además de contribuir en la fijación de Nitrógeno, así mismo es indispensable en la síntesis de este tipo de metabolitos. Del mismo modo el Mn y el Cu, también participan como activadores de diversas enzimas; el Mn es un cofactor de la fenilalanina amoniaco-liasa involucrada en la producción del ácido cinámico compuesto presente en la ruta biosintética de los alcaloides de las Amarillydacea<sup>87</sup>. Tal como lo reportan Poutaraud A *et al*<sup>88</sup>., donde la aplicación de Fe y Mn a *Lupinus hartwegii*, y Cu, Mn y Zn a *C. autumnale* aumento el contenido alcaoidico, de acuerdo a lo anterior es claro que el Fe, Mn y el Cu juegan un papel crucial en metabolismo de síntesis de alcaloides en las plantas, por lo tanto es posible que estos influyan en el aumento de concentración de Gal y Ly<sup>89</sup>.

En cuanto a los resultados al tratamiento con macronutrientes (NPK) se encontró que el contenido de Gal es mayor con respecto al testigo absoluto, pero menor al tratamiento con micronutrientes, por lo tanto se podría determinar que el suelo presentaba una deficiencia de macronutrientes, lo cual se atribuiría al aumento de Gal por efecto de fortalecimiento de nitrógeno dentro de la planta y activación de las vías biosintéticas del metabolitos secundarios<sup>67</sup>, este resultado se apoyaría con la teoría de la fertilización con macronutrientes, la cual muestra que es efectiva para el crecimiento de las plantas y el aumento de compuestos nitrogenados como aminoácidos proteínas y alcaloides<sup>90</sup>.

Por lo anterior y sabiendo que los tratamientos de fertilización se hicieron en base a *A. cepa*, especie de las lilliaceae (Amaryllidaceae), se observó un efecto negativo bajo los tratamientos B y D, donde se evidenció las consecuencias de este tipo de nutrición, disminuyendo la concentración de alcaloides; siendo evidente el antagonismo entre algunos de los macro y micronutrientes que interaccionan en el suelo tratado, observándose que los niveles de macronutrientes no fueron los adecuados para *C. subedentata*. Si se considera un exceso de nitrógeno el cual pudo haber influenciado en la absorción de Ca, Mg y K, en cuanto de fosforo el cual posiblemente interactúo negativamente afectando la absorción de Fe, Mg, Cu, Zn y K, minerales indispensables en el crecimiento y desarrollo metabólico de la planta, en especial en la síntesis de metabolitos como los alcaloides Estos resultados se puede comparar con los resultados obtenidos por Yaber M. quien determinó que la disminución en la biodisponibilidad N y P aumento significativamente el contenido alcaloidico en *Senecio grisebachii*<sup>91</sup> al igual que Badwin I., quien reporto acumulación de nicotina en respuesta a la deficiencia de N<sup>92</sup>

Teniendo en cuenta estos resultados *C. subedentata* requiere fertilización tanto de macro como micronutrientes para su adecuado desarrollo, en especial para la síntesis de alcaloides. Ya que la mayor cantidad de alcaloides lo presentaron los ensayos de fertilización con micronutrientes, por lo tanto esta planta podría requerir el mismo contenido de micronutrientes que requiere *A. cepa*.



**Figura 7.** Comparación del aumento de Gal y Ly en hojas, bulbos y raíces con tratamientos agroquímicos en color anaranjado muestra de hojas, en color amarillo muestra de bulbos y en color verde muestra de raíces(A) y en color azul muestras de bulbos y en color anaranjado raíces (B).En el eje de las ordenadas los tratamientos agroquímicos A, B, C, D.

Respecto a los resultados en ANOVA se hallan diferencias significativas en la concentración de Gal en muestras de hojas, bulbos y raíces, pues se presentó un  $p < 0.05$ , se evidencia en la figura 7A encontrando la menor concentración de Gal en todos los tratamientos es en la muestra de hojas y una mayor concentración de este metabolito sobre las muestras de raíces en los tratamientos. En tanto a la concentración determinada de Ly en las muestras en hojas no fue posible cuantificarla, ni realizar el tratamiento estadístico debido al poco contenido de este metabolito en esta muestra vegetal, sin embargo en bulbos y raíces se determinaron diferencias significativas en la concentración de Ly; por lo tanto de acuerdo al  $p < 0.05$  del ANOVA la concentración de Gal en las tres muestras es diferente siendo hojas la de menor concentración con un 95% de confiabilidad, por lo tanto se evidenció que la parte de *C. subedentata* de mayor biosíntesis de estos metabolitos son las raíces, además que el tratamiento con mayor incidencia fue el tratamiento con micronutrientes, lo cual es evidente en las figuras 7A-B donde el mayor contenido de Gal lo poseen las raíces en el tratamiento agroquímico C.(en el anexo 3 tabla 2 y 3 se muestra el análisis de varianza

realizado para obtener el análisis estadísticos de la cuantificación de Gal y Ly)

### **7.3. Actividad biológica de los EET de hojas, bulbos y raíces de *C. subdentata***

#### **7.3.1. Actividad antioxidante**

##### **7.3.1.1. Contenido de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu.**

El contenido de fenoles totales (TPC) se evaluó por el método de Folin-Ciocalteu, las muestras evaluadas fueron: extractos etanólicos totales de hojas, bulbos, raíces y cinco fracciones de cada muestra con diferente polaridad, los resultados obtenidos en los ensayos realizados se expresan como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco (mg EAG/ g ES), (Tabla 18). El TPC en hojas se encontró en un rango entre  $64.41 \pm 0.39$  a  $213.85 \pm 0.89$  mg EAG/ g; la fracción de acetato de etilo ( $213.851 \pm 0.894$  mg EAG/ g) contiene aproximadamente tres veces más TPC comparado con la fracción de hexano  $64.41 \pm 0.390$  mg EAG/ g.

Los valores de TPC de las muestras de bulbos se encuentra en el rango de  $31.53 \pm 0.70$  a  $123.54 \pm 0.70$  mg EAG/ g ES, donde la fracción que presentó el mayor valor fue la fracción de acetato de etilo  $123.54 \pm 0.70$  mg EAG/ g (al igual que en el caso de las hojas); este valor es aproximadamente cuatro veces mayor que el contenido de estos compuestos en la fracción acuosa  $31.53 \pm 0.70$  mg EAG/ g. Los valores de TPC de las muestras de raíces se encontró en el rango de  $146.62 \pm 0.59$  hasta  $48.42 \pm 0.70$  mg EAG/ g, donde el mayor contenido de compuestos fenólicos lo presentó la fracción de AcOEt  $146.622 \pm 0.58$  mg EAG/g, este valor fué aproximadamente tres veces mayor que la fracción de EET  $48.42 \pm 0.70$  mg EAG/g, y por lo tanto que presentó el menor contenido. Las fracciones de alta polaridad, como son las fracciones de AcOEt, But y EET de los extractos de hojas presentan el mayor contenido de TPC (Figura8).

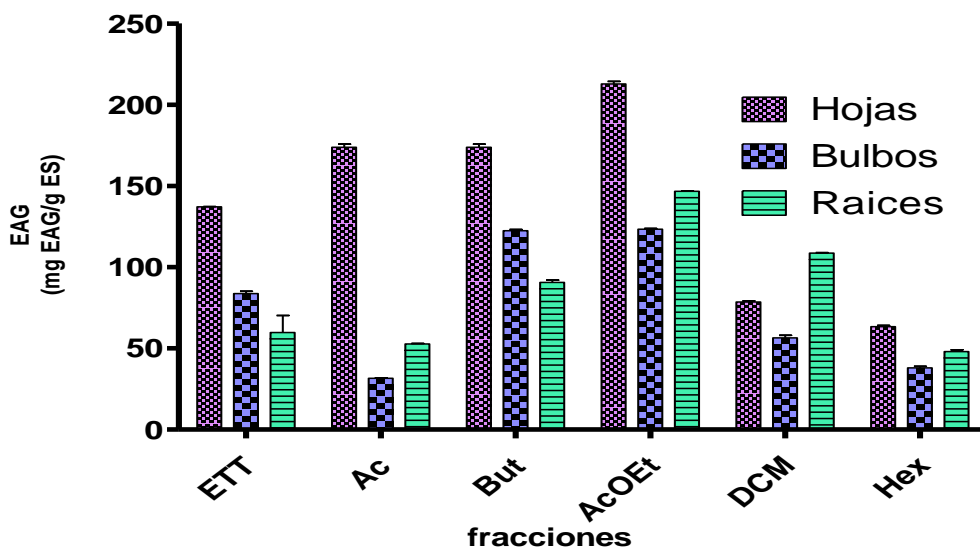
Con respecto a las fracciones de bulbos y raíces, para la fracción de AcOEt ( $213.85 \pm 0.89$  mg EAG/g) fué aproximadamente dos veces mayor tanto para bulbos ( $123.53 \pm 0.70$  mg EAG/g) como para raíces ( $146.62 \pm 0.58$  mg EAG/g), la fracción de But ( $173.31 \pm 0.89$  mg EAG/g) es muy similar con la de bulbos ( $121.96 \pm 0.58$  mg EAG/g) y aproximadamente dos veces mayor que para raíces ( $91.78 \pm 0.52$  mg EAG/g), en cuanto a EET ( $137.16 \pm 0.34$  mg EAG/g) es dos veces mayor que para bulbos ( $82.43 \pm 0.89$  mg EAG/g) y tres veces mayor que raíces ( $48.42 \pm 0.70$  mg EAG/g). Estos valores son mayores a los previamente reportados en el trabajo de Trujillo L. M *et al*<sup>63</sup>., donde obtuvo valores para la fracciones de: AcOEt  $146.76 \pm 0.65$  mg EAG/g y  $52.26 \pm 0.34$

**Tabla 18.** Resultados de la evaluación de la actividad antioxidante mediante el método DPPH, ABTS<sup>+</sup> y Folin Ciocalteu en EET y sus diferentes fracciones de hojas y raíces de *C. subedentata*

Fracción	Folin-Ciocalteu			DPPH				ABTS			
	HOJAS	BULBOS	RAICES	HOJAS		RAICES		HOJAS		RAICES	
	EAG			TEAC**	IC <sub>50</sub>	TEAC**	IC <sub>50</sub>	TEAC**	IC <sub>50</sub>	TEAC**	IC <sub>50</sub>
ETT	137.1±0.34	82.43±0.89	48.42±0.70	94.81±0.30	175.2	80.19±1.88	325.4	218.70±9.82	314.6	217.95±9.82	391.2
Ac	125.90±0.52	31.53±0.70	52.70±0.58	83.64±1.48	381.6	29.46±4.52	587.5	148.74±3.69	416.8	160.15±5.97	977.8
But	173.31±0.89	121.96±0.58	91.78±0.52	101.65±1.30	174.8	55.44±0.87	435.5	213.28±3.89	390.9	353.56±0.75	730.6
AcOEt	213.85±0.89	123.54±0.70	146.62±0.58	69.39±0.43	257.2	96.03±0.24	325.2	470.01±2.37	271.9	410.89±4.05	604.9
DCM	78.60±0.97	59.12±0.34	108.56±0.70	35.83±0.59	420.5	78.72±0.28	354.7	285.56±5.33	318.0	339.23±3.95	879.1
Hex	64.41±0.39	38.63±0.85	48.42±0.85	38.53±3.07	476.5	34.37±5.61	514.3	105.86±0.32	459.8	261.38±1.78	972.5
AA	-	-	-	104.78±0.21	14.6	104.78±0.22	12	513.16±4.46	83.95	513.16±4.47	83.95
α-T	-	-	-	103.88±6.74	14.0	103.88±6.74	14	590.65±5.37	33.44	590.65±5.37	33.44
BHT	-	-	-	91.87±0.00	52.0	91.87±0.00	52	721.80±1.46	29.74	721.80±1.46	29.74

\*= mg EAG/g ES, \*\*= μmol trolox/g ES, EAG: equivalentes de ácido gálico, TEAC: capacidad antioxidante equivalente a trolox, ES: extracto seco, ETT: extracto etanólico total, Ac: acuosa, But: butanol, AcOEt: acetato de etilo, DCM: diclorometano, Hex: hexano, AA: ácido ascórbico, α-T: tocoferol, BHT: butilhidroxitolueno, trolox: ácido-6- hidroxil- 2, 5, 7, 8 tetrametilcromano- 2-carboxílico, g: gramos, DPPH: 1,1-difenil-2-picril

mg EAG/g, But  $152.00 \pm 0.45$  mg EAG/g y  $56.24 \pm 0.35$  mg EAG/g y EET  $104.67 \pm 0.54$  mg EAG/g y  $22.88 \pm 0,20$  mg EAG/g para bulbos y hojas respectivamente.



**Figura 8.** Comparación de TPC de las fracciones evaluadas para los extractos etanólicos de hojas, bulbos y raíces.

Otros trabajos donde se determinó el TPC, se encuentran Carvajal de Pabón L *et al*<sup>93</sup>, quienes evaluaron la actividad antioxidante del extracto etanólico de hojas en el género *P. quadrangularis* obteniendo valores de 125.21 mg EAG/g, este valor es menor para el encontrado tanto en hojas como raíces y mayor para los bulbos de *C. subedentata*. Los resultados anteriores muestran que la mayor cantidad de fenoles la presentan las fracciones polares. Tal como lo reporta Pérez V.C *et al*<sup>94</sup>, donde los compuestos fenólicos son extraídos dependiendo de los tipos de compuestos fenólicos y el disolvente. Por lo tanto las hojas y bulbos presentan un mayor contenido de compuestos polares, mientras que las raíces presentan un mayor contenido de compuestos de menor polaridad

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

La capacidad captadora de radicales libres fue determinada por el método colorimétrico DPPH descrito por Daniels C.W *et al*<sup>74, 95,75</sup>, en los EET de hojas, bulbos y raíces de *C. subedentata*, y en cada una de las fracciones de diferente polaridad (Hex, DCM, AcOET, But, Ac), los resultados se expresaron en TEAC ( $\mu\text{mol trolox} / \text{g ES}$ ) (tabla 18), utilizando una curva de

calibración trolox (Anexo 4 numeral 2). Los resultados de la actividad antioxidante fueron comparados con los patrones ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol y BHT.

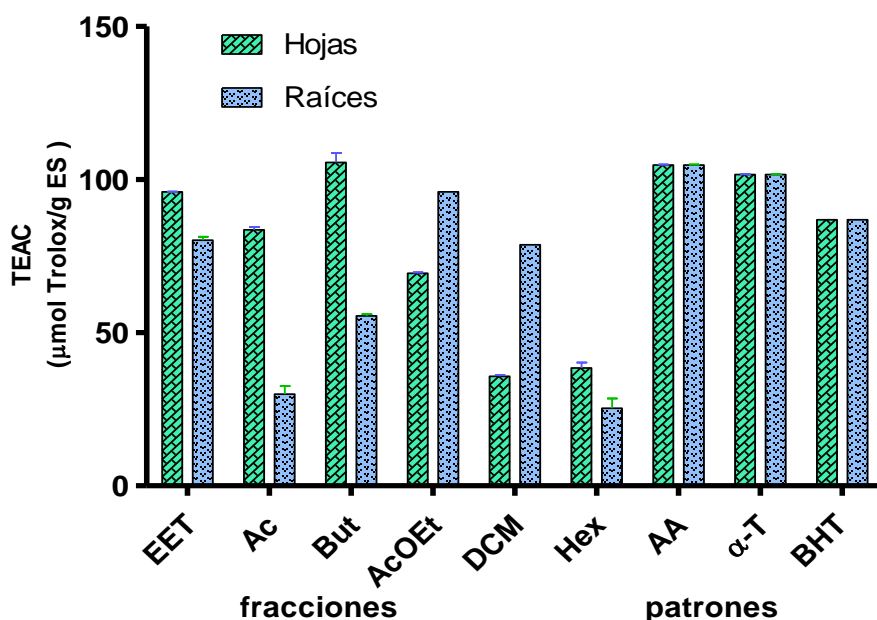
Los valores de TEAC para las fracciones de hojas se encuentran en un rango que varía desde  $101.65 \pm 1.30$  hasta  $35.83 \pm 0.59$   $\mu\text{mol trolox/g}$ , siendo la fracción de But la que presentó el mayor valor de TEAC ( $101.65 \pm 1.30$   $\mu\text{mol trolox/g}$ ), aproximadamente tres veces mayor que DCM ( $35.83 \pm 0.59$   $\mu\text{mol trolox/g}$ ) y Hex ( $38.53 \pm 3.07$   $\mu\text{mol trolox/g}$ ) que fueron las fracciones con menor valor, las fracciones EET y Ac también presentaron altos valores ( $94.81 \pm 0.30$   $\mu\text{mol trolox/g}$  y  $83.64 \pm 1.48$   $\mu\text{mol trolox/g}$  respectivamente).

El valor de TEAC para las raíces varía dentro del rango comprendido entre  $96.03 \pm 0.24$  hasta  $29.46 \pm 4.52$   $\mu\text{mol trolox/g}$ ; la fracción que presentó la mayor actividad fue la AcOEt  $96.03 \pm 0.24$   $\mu\text{mol trolox/g}$ , tres veces mayor que la fracción DCM con una actividad de  $29.46 \pm 4.52$   $\mu\text{mol trolox/g}$ , en cuanto a las muestra de bulbos no fue posible su evaluación ya que el rango de concentración se encuentra fuera de los rangos considerados para este tipo de actividad (anexo 4 tabla 4).

Para las muestras de hojas, las fracciones que presentaron mayor actividad antirradicalaria fueron las polares: But ( $101.65 \pm 1.30$ ) y EET ( $94.81 \pm 0.30$ ), mientras que para raíces fueron AcOEt ( $96.03 \pm 0.24$ ) y EET ( $80.19 \pm 1.88$ ) (figura 9). El análisis de varianzas indicó que existe diferencias significativas entre cada una de las fracciones con  $p < 0.05$ , mediante la prueba de contrastes de Tukey se encontró que no existe una diferencia significativa entre los patrones AA y  $\alpha$ -tocoferol y la fracción de But; siendo esta fracción la de mayor actividad antioxidante a un 95% de confianza, por otro lado la fracción Ac y el patrón BHT no presentan una diferencia significativa, por lo anterior estadísticamente se demuestra que para estas fracciones de la muestra de hojas pueden ser un buen antioxidante natural (anexo 4 figura 4 Tabla 5-figura6 tabla7).

En el análisis de varianzas entre las fracciones de raíces, se determinó que existen diferencias significativas con  $p < 0.05$ , y según la prueba de contrastes no existe una diferencia significativa entre  $\alpha$ -tocoferol y la fracción de AcOEt y entre el patrón BHT y el EET. Por lo tanto las muestras de hojas y raíces presentan una buena actividad antioxidante frente a los patrones evaluados.





**Figura 9.** Actividad antioxidante de los EET de hojas y raíces y sus fracciones frente al radical DPPH

Estos valores de actividad antioxidante en hojas son mayores a los reportados por Trujillo L. *et al*<sup>63</sup>, en extractos de *P. dubia* donde obtuvo la mejor actividad para las fracciones: But  $84.58 \pm 0.19$  y EET  $72.28 \pm 0.29$   $\mu\text{mol}$  trolox/g. Estos resultados están directamente relacionados con los de *C. subedentata* presentando la mayor actividad en estas dos fracciones, hecho posiblemente relacionado con que ambas plantas pertenecen a la familia Amaryllidaceae.

Carbajal L.M. *et al*<sup>63</sup>, reportó para el extracto de hojas en el género badea (*P. quadrangularis*),  $57,69$   $\mu\text{mol}$  trolox/g, este valor es menor a los encontrados en las fracciones de But, AcOEt, Ac y EET analizados en esta investigación. Los resultados de la actividad antioxidante de las hojas y raíces, presentaron un comportamiento muy similar a los obtenidos en la determinación del TPC, tal como lo reporta Alvarez E. *et al*<sup>66</sup>, donde encontró que la fracción con mayor TPC resultó ser la de mayor actividad inhibitoria del radical DPPH, en el trabajo de Kuppusamy S. *et al*<sup>67</sup>, también reportaron esta tendencia en extractos de diferentes plantas. Por lo anterior como ya se describió anteriormente, las hojas presentaron un mayor TPC y la mejor actividad antioxidante, en las fracciones polares, esta misma relación la presentaron las raíces donde el mayor TPC lo presentaron las fracciones medianamente polares al igual que la actividad antioxidante, esto

se puede observar específicamente con la fracciones de But más activa en hojas es dos veces mayor frente a la fracción de raíces, y la fracción de DCM más activa en raíces es tres veces mayor que la fracción de hojas. Por lo tanto los compuestos responsables de la actividad antioxidante en las hojas son de carácter polar, mientras que para raíces son los de baja polaridad.

Las muestras de bulbos como se mencionó anteriormente no presentaron actividad antioxidante, ya que para su evaluación se requirió una concentración de los EET de las muestras y sus fracciones por encima de los 1000 ppm, concentración nueve veces mayor que la utilizada para las hojas y ocho veces más que para las de raíces, por lo tanto no se considera este extracto como potencial antioxidante, esto se reflejó en los resultados de IC<sub>50</sub> que fueron mayores a los otros extractos evaluados y a los patrones, sin embargo relacionándolo con el contenido de fenoles el cual fue mayor que para las raíces; se deduce que posiblemente se debe a que los bulbos poseen compuestos fenólicos monoméricos simples<sup>98</sup> que poseen baja actividad antirradicalaria .

Probablemente, la baja actividad antioxidante en los extractos de bulbos pueda ser justificada debido a que en algunos compuestos fenólicos como flavonoides los grupos hidroxilo se encuentran glicosilados disminuyendo la capacidad para formar radicales, además la ausencia del doble enlace del anillo C también afecta negativamente esta actividad<sup>99</sup>, otro factor del cual depende el comportamiento antioxidante de los compuestos fenólicos depende de la posición relativa de los grupos funcionales sobre el anillo aromático, tanto en número como ubicación de los grupos hidroxilo donantes de H, esta es una de las principales características estructurales requeridas para potenciar la capacidad antioxidante de estos compuestos<sup>100</sup>; como en el caso de los flavonoides la presencia de grupos sustituyentes en el anillo A, en las posiciones 6 y 7 presentan una menor actividad, así como en el anillo B en la posición (4' y 5'). Guohua C *et al*<sup>101</sup> reportó la influencia del número de grupos OH, determinando que las flavonas y flavanonas con un solo OH presentaban una baja actividad mientras que las flavanonas con tres a cinco sustituyentes de OH presentaban una mayor actividad, por lo tanto es de vital importancia la posición de los grupos OH y del número de estos presentes sobre las estructuras de los fenoles y flavonoides, así como la presencia de sustituyentes en la estructura, pues cada uno de estos factores afecta la actividad antioxidante las sustancia.

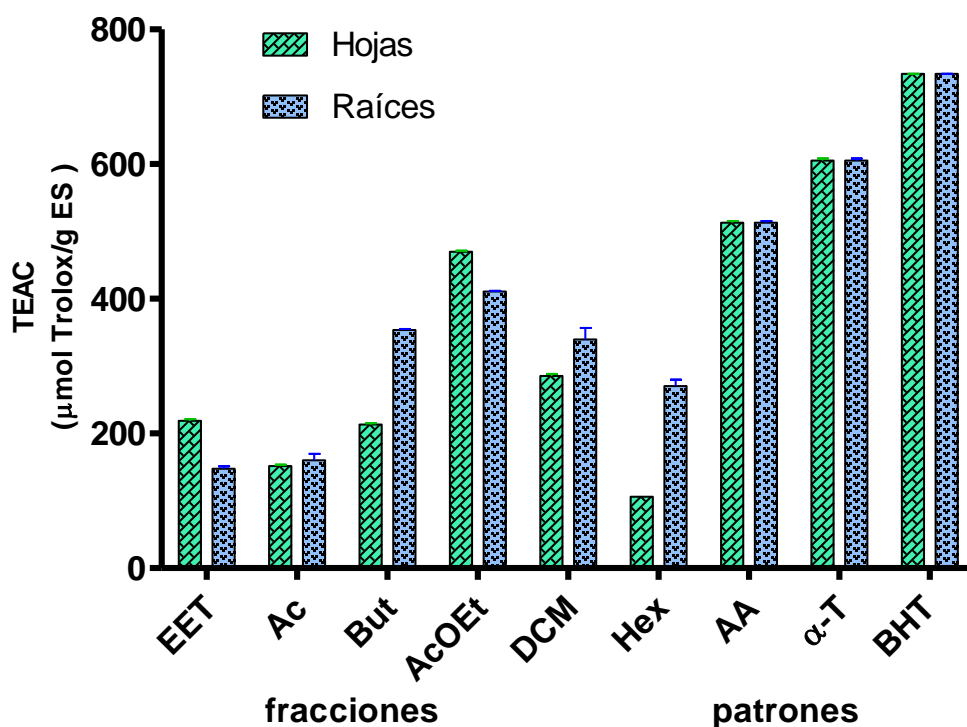
### 7.3.1.3. Actividad antioxidante determinada por el método del 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (ABTS<sup>•+</sup>)

La capacidad captadora de radicales libres de los EET de hojas, bulbos, raíces, con sus respectivas fracciones de Hex, DCM, AcOEt, But, Ac; también fueron evaluadas por medio del radical ABTS siguiendo la metodología propuesta por Repetto *et al*<sup>102</sup>., Los resultados obtenidos en los ensayos realizados se expresan como TEAC ( $\mu\text{mol trolox / g ES}$ ), utilizando una curva de calibración trolox (anexo tabla3).

Los valores de TEAC obtenidos de la evaluación de la capacidad captadora de radicales libres ABTS (Tabla 18) de las fracciones de los EET de hojas mostraron un rango de  $470.01 \pm 2.38$  hasta  $105.86 \pm 0.32 \mu\text{mol trolox/gES}$ , la mayor actividad la presentó la fracción de AcOEt  $470.01 \pm 2.38 \mu\text{mol trolox/g ES}$  la cual es aproximadamente cinco veces mayor que la fracción de Hex con  $105.856 \pm 0.32 \mu\text{mol trolox/g ES}$ . Del mismo modo en las muestras de raíces se obtuvo un rango de actividad antioxidante de  $410.89 \pm 4.05$  hasta  $160.15 \pm 5.97 \mu\text{mol trolox/gES}$ , donde la fracción que presentó mayor actividad antioxidante fue la fracción de AcOEt  $410.887 \pm 4.048$  tres veces mayor que la fracción Ac  $160.15 \pm 5.97 \mu\text{mol trolox/g ES}$ , fracción de menor actividad. Respecto a la actividad evaluada para el EET de bulbos y sus respectivas fracciones se encontró que éstas no entraron en un rango óptimo de actividad antioxidante, es decir las concentraciones evaluadas de éstas sobrepasaron los 1000 ppm (Ver anexo 4 tabla 3).

Según la prueba de contraste de Tukey para las fracciones de hojas, AcOEt presenta diferencias significativas frente a los patrones, presentando una menor actividad frente a estos, sin embargo su actividad antioxidante es mayor a las otras fracciones evaluadas con un 95% de confiabilidad. Las fracciones de raíces presentaron el mismo comportamiento que para las hojas. (anexo 4 figura 5 Tabla 6-figura7 tabla8).

Al comparar el comportamiento de las muestras evaluadas frente a estudios previos sobre actividad antioxidante de algunas especies de Amaryllidaceae, se observa, que en el trabajo de Trujillo *et al*<sup>63</sup>., los valores de capacidad captadora de radicales libres ABTS en extractos vegetales de *P. dubia* (Amaryllidaceae), la fracción But del EET de hojas presenta un valor de



**Figura 10.** Actividad antioxidante de los EET de hojas y raíces y sus fracciones frente al radica ABTS<sup>+</sup>

723.210  $\mu\text{mol trolox/gES}$ , siendo este resultado aproximadamente dos veces al valor de mayor actividad de la fracción de AcOEt de la muestra evaluada de EET de hojas de *C. subedentata*, (218.70  $\mu\text{mol trolox/gES}$ ). Por otro lado en el trabajo de Caldón *et al*<sup>64</sup>, se evaluó la capacidad antioxidante del extracto de hojas de *Crinum jagus* (Amaryllidaceae) por medio del radical ABTS encontrándose 122.7  $\mu\text{mol trolox/gES}$ , valor cuatro veces menor al valor determinado en *C. subedentata*. Por otro lado Carvajal de Pabón L. *et al*<sup>63</sup>, estudió las hojas pertenecientes a badea (*P. quadrangularis*) la cual se reporta un valor de TEAC de 418.409  $\mu\text{mol trolox/gES}$ , siendo este un valor menor frente al encontrado *C. subedentata*, mostrando la mayor actividad de la muestra evaluada.

La actividad antioxidante evaluada con el radical ABTS mostró que las fracciones evaluadas de EET de hojas tuvieron un comportamiento desde los metabolitos medianamente polares hacia los polares, comportamiento observado en la figura 10; determinando que la actividad antioxidante está relacionada con los compuestos fenólicos, teniendo en cuenta que el TPC fue mayor en hojas que en raíces. Así mismo el comportamiento de raíces se mueve en el rango de los metabolitos medianamente polares, aunque se

observó una leve variación ante el comportamiento de las fracciones pues éste se presenta desde los metabolitos polares a medianamente polares. Los resultados previos indican que los EET de hojas y raíces de *C. subedentata* tienen una buena actividad antioxidante, siendo la fracción de mayor actividad la muestra de AcOEt; esta fracción presenta compuestos medianamente polares como las cumarinas, quinoles, fenoles de estructura compleja, a los cuales se les puede atribuir la alta actividad antioxidante<sup>103</sup>.

#### **7.3.1.4. Correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales**

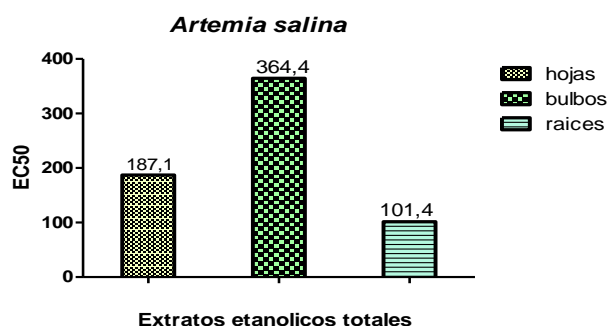
La determinación de la actividad antioxidante de hojas y raíces de *C. subedentata* permitió establecer que las fracciones de But y AcOEt presentaron la mayor actividad antioxidante mediante los métodos DPPH y ABTS, estos resultados se relacionan con la polaridad tanto de los compuestos que presentan esta actividad y los solventes de cada una de las fracciones.

En el análisis de correlación mediante la prueba de Pearson entre los métodos DPPH y ABTS con el contenido de fenoles totales, para los extractos evaluados fue positiva y significativa. En las fracciones de hojas se presentó una correlación positiva y significativa entre el contenido de fenoles totales y el método DPPH, con un coeficiente de correlación de 64%, para ABTS esta correlación fue de 68%. Respecto a raíces esta correlación también fue positiva y significativa con un 77% para el método DPPH, y del 82% para el método ABTS. Estos resultados sugieren que a medida que aumenta el contenido de fenoles totales aumenta la actividad antioxidante corroborando los resultados obtenidos respecto al TPC los cuales fueron mayores para las fracciones de AcOEt y But. Esta correlación entre actividad antioxidante y TPC no es totalmente lineal debido a que esta actividad no se atribuye totalmente a los compuestos fenólicos ya que existen otro tipo de compuestos que presentan este tipo de actividad (anexo 4 f Tabla 9-10).

#### **7.3.2. Actividad citotóxica**

La evaluación preliminar de la actividad citotóxica por medio del bioensayo de *A. salina* permite analizar el comportamiento de las larvas de *Artemia* bajo el efecto de diferentes extractos, para así clasificarlos estimando su toxicidad y letalidad para un potencial uso en tratamientos farmacológicos. Los resultados se expresan como CL<sub>50</sub> en µg/mL, donde “la concentración letal media o CL<sub>50</sub>: es la concentración de un compuesto que ocasiona la muerte de la mitad de los organismos durante un periodo de prueba”. Los valores de CL<sub>50</sub> se encontraron en un rango que varía entre 101.4 a 364.4 µg/mL, en donde el EET de raíces presentó un CL<sub>50</sub> de 101.4 µg/mL, el de bulbos 364.4

$\mu\text{g/mL}$  y hojas de  $187.1 \mu\text{g/mL}$ , evidenciándose una toxicidad moderada según la clasificación del CYTED<sup>104</sup>, (Anexo 5). Con base en estos resultados se observa que el EET de raíces es aproximadamente tres veces más tóxico que el EET de bulbos y respecto al EET de hojas que tiene una actividad citotóxica similar al de raíces. En la figura 11 se indica el comportamiento mencionando anteriormente.



**Figura 11.** Bioensayo de *Artemia salina* expresado en EC<sub>50</sub> en EET de hojas, bulbos y raíces de *C. subedentata*

La clasificación del CYTED (Anexo 5) muestra un rango de 100-500  $\mu\text{g/mL}$  para sustancias moderadamente tóxicas, según ésta los resultados estarían sobre el nivel tres que corresponde moderadamente tóxico, sin embargo existe otra clasificación ante los resultados de citotoxicidad la realizada por Manuel Repetto J *et al*<sup>1</sup>, quien en su libro clasifica la citotoxicidad por medio de coeficientes de acción tóxica (TCA), forma de analizar la toxicidad de una muestra frente a la dosis umbral refiriéndose a la clasificación de toxicidad crónica, aguda y moderada; así en el anexo 5 tabla 2 se encuentran dichos valores para clasificar toxicidad aguda y crónica, de acuerdo a ellos en la tabla 19 se observan los TCA para hojas, bulbos y raíces, teniendo un TCA de 10.14 en raíces estas se clasifican en TCA- crónicos donde las raíces son sumamente tóxicas ( $>10$ ), los EET de las muestras de hojas y bulbos se clasifican en sustancias con TCA-crónicos pero si en TCA-agudos, los extractos de hojas y los extractos de bulbos son moderadamente tóxico ( $<50$ ).

**Tabla 19.** CL<sub>50</sub> y Coeficientes de acción tóxica (TCA) para EET de hojas, bulbos y raíces de *C. subedentata*

Muestras	CL <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	%CV	TCA
Hojas	187.100	1.182	18.710
Bulbos	364.400	0.930	36.440
Raíces	101.400	1.155	10.140

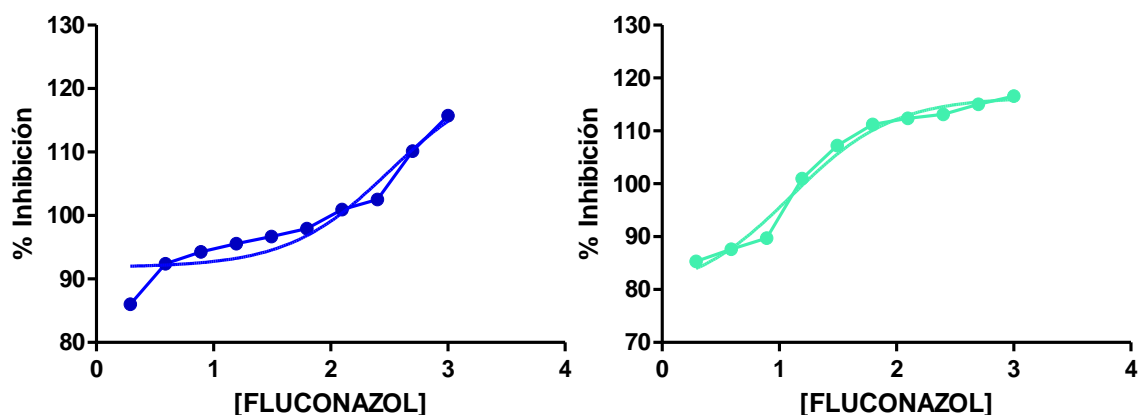
TCA: coeficiente de acción tóxica, suponiendo como dosis letal 10  $\mu\text{g/mL}$

Datos concluyentes reportados por Trujillo *et al*<sup>63</sup>, acerca de los EET de hojas y bulbos de *P. dubia* muestran la citotoxicidad de esta Amaryllidaceae, en el nivel de altamente tóxicos, teniendo una CL<sub>50</sub> para hojas de 34.42 y bulbos de 25.21 µg/mL, ésta especie de Amaryllidaceae frente a *C. subedentata* muestra un comportamiento de mayor actividad citotoxicidad, sin embargo *C. subedentata* está en nivel moderadamente tóxico (moderadamente tóxico según el CYTED, muy tóxico para hojas y raíces, bulbos moderadamente tóxico según la clasificación TCA) por los metabolitos secundarios que posee. Los resultados de toxicidad encontrados en EET de las muestras de *C. subedentata* fueron comparados con muestras vegetales diferentes por mencionar el autor Fernández. A. *et al*<sup>105</sup>, muestra en su trabajo la evaluación de la citotoxicidad de algunos ejemplares de plantas de diferentes especies taxonómicas, obteniendo como resultado que *A. cepa* no tiene una toxicidad relevante pues sobrepasa los 1000 ppm para ser activo, por lo tanto *C. subedentata* tendría mayor actividad encontrándose en el rango entre 101.4 a 364.4 µg/mL

Por lo anterior se observa la alta actividad citotóxica de las muestras evaluadas de *C. subedentata*, la cual es atribuida a los metabolitos secundarios determinados por medio del tamizaje fitoquímico, posiblemente siendo los responsables los alcaloides en especial Gal y Ly, , esto es justificado bajo la investigación de Doskočil, I. *et al*<sup>19</sup>, el cual comprobó la acción citotóxica de estos metabolitos, así mismo Nair, J.J *et al*<sup>106</sup>, reporta la alta actividad citotóxica de EET de diferentes Amaryllidaceae Sudafricanas, atribuida a los alcaloides mencionados. A pesar de que el ensayo de *Artemia salina* ha sido eficiente es apropiado realizar diferentes ensayos complementarios para definir su toxicidad *in vivo*.

### 7.3.3. Actividad antifúngica

La actividad antifúngica fue evaluada por medio del protocolo CLSI<sup>79</sup>, de éste se eligió el método de microdilución para el análisis de la sensibilidad e inhibición de las cepas *C. albicans* y *C. parapsilosis* por efecto de los EET de hojas, bulbos y raíces de *C. subedentata*. Para efectos comparativos se evaluó el antifúngico fluconazol.



A.

B.

**Figura 12.** Inhibición del patrón fluconazol frente a la cepas *C. albicans* y *C. parapsilosis*, A) Cepa *C. albicans* B) Cepa *C. parapsilosis*

La actividad antifúngica de EET de hojas, bulbos, raíces de *C. subedentata* sobre *C. albicans* fue evaluada por medio de una comparación de acción de la cepa control ATCC 22019: *C. parapsilosis*, la cual fue sometida los mismos tratamientos que *C. albicans*. Para las muestras evaluadas se encontró un CMI (Tabla 20) en un rango de 15.62 (raíces) y 250 mg/L (hojas), teniendo raíces un porcentaje de inhibición de 64.135 %, superior a las muestras restantes, por lo tanto raíces posee una mayor inhibición a una baja concentración de EET siendo aproximadamente 16 veces superior en actividad al EET de hojas y 4 veces superior al extracto de bulbos.

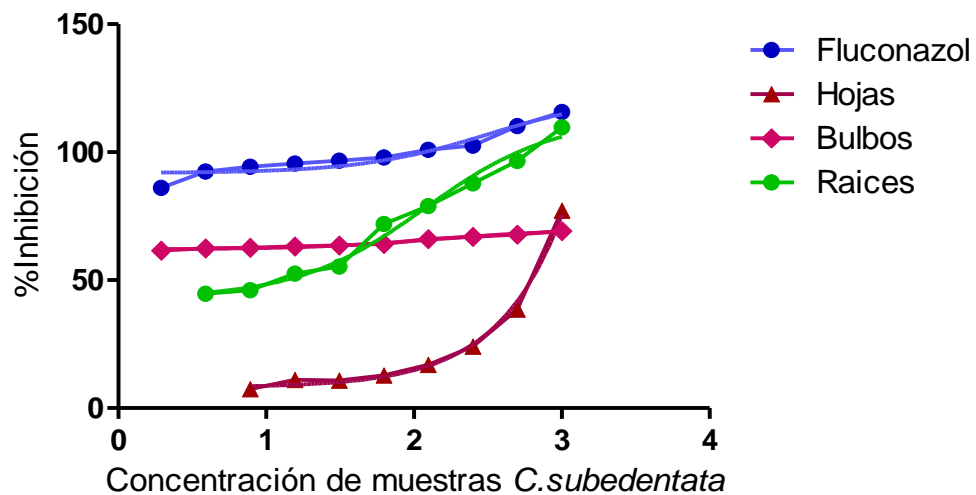
**Tabla 20.** Concentración mínima inhibitoria (CMI) para los EET de hojas, bulbos y raíces de *C. subedentata* frente a *C. albicans* y *C. parapsilosis*

<b><i>C. albicans</i></b>				
Muestra	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )	%Inhibición	CS	EC <sub>50</sub> (ppm)
Hojas	250.00	24.11	resistente	404.20
Bulbos	62.50	52.50	intermedio	86.15
Raíces	15.62	64.14	sensible	30.78
<b><i>C. parapsilosis</i></b>				
Muestra	CMI( $\mu\text{g/mL}$ )	%Inhibición	CS	EC50(ppm)
Hojas	125,00	22.29	resistente	298.90
Bulbos	15.60	85.08	sensible	55.68
Raíces	62.50	34.10	intermedio	142.90

CS: Clasificación de susceptibilidad



El patrón de comparación de los EET fue fluconazol, sustancia conocida en la farmacopea para tratamientos antimicóticos para la eliminación de *C. albicans*, en esta investigación se comparó su actividad antifúngica con los EET de las tres muestras vegetales de *C. subedentata*. El fluconazol mostró un porcentaje de inhibición de 100 % en una concentración de 62.5 mg/L; en la figura 12 se muestra el comportamiento del fluconazol tanto para *C. albicans* y *C. parapsilosis*, en éstas se observa mayor inhibición de las dos cepas de levaduras donde a la menor concentración de antifúngico se presenta un porcentaje de inhibición mayor a 80%. La actividad antifúngica de las muestras evaluadas de *C. subedentata* respecto a la actividad de fluconazol, presentan un relevante comportamiento donde es evidente (la figura 13) que las hojas son aproximadamente 4 veces menor frente a la inhibición del patrón, respecto a bulbos se encontró una mejor respuesta ante el patrón su comportamiento es aproximadamente 2 veces menor, teniendo un porcentaje de inhibición de 52%, mostrando una buena respuesta y por último la muestra de raíces presentó una mayor inhibición de las cepas evaluadas, es decir el porcentaje de inhibición es cercano al patrón teniendo 78 % de inhibición a una misma concentración del patrón, por lo tanto su actividad es similar al fluconazol.



**Figura 13.** Inhibición de crecimiento de la cepa *C. albicans* por el efecto del patrón fluconazol y EET de hojas, bulbos y raíces de *C. subedentata*

La *C. parapsilosis* usada como cepa control comparativo fue más inhibida que la misma *C. albicans*, ésta empezó a ser inhibida 100% con una concentración de fluconazol de 15.62  $\mu\text{g/mL}$ , donde hojas frente al CMI de fluconazol fue 8 veces menor, raíces fue 3 veces menor y respecto al

porcentaje de inhibición de bulbos, éstos presentaron un 86.126 % de inhibición muy cercano al fluconazol evaluando la cepa *C. parapsilosis*, lo cual es relevante ante la evaluación de EET de las muestras de *C. subedentata*, pues no se conocen estudios de esta planta y su actividad antifúngica usando levaduras del género *Cándida*.

Los reportes hasta hoy encontrados acerca de la actividad antifúngica de plantas de la familia Amaryllidaceae muestra una notoria inhibición de la cepa *C. albicans*, Evidente A. et al<sup>107</sup>., reportó que alcaloides encontrados en *Amaryllis belladonna* tenían actividad antifúngica, entre estos se encuentran Ly. Amarbellsina, vitatina los cuales presentan un CMI de 39 µg/mL para el alcaloide Ly, siendo ésta aproximadamente 2 veces mayor al EET de raíces de *C. subedentata*, 2 veces menor al extracto de bulbos y alrededor de 7 veces menor al EET de hojas. Por otro lado, Fernández C. et al<sup>105</sup>., reportó la inhibición de *C. albicans* utilizando como antifúngico anfotericina B; obteniéndose un CMI de 16 µg/mL relativamente similar al resultado para la muestra de raíces, siendo raíces un poco menor, respecto a hojas y bulbos estas fueron 16 y 4 veces mayores tanto a la anfotericina B como al EET de raíces.

Lo anteriormente mencionado muestra una baja respuesta de inhibición en hojas frente a *C. albicans* y *C. parapsilosis*, es decir la concentración de hojas debe superar los 250 ppm para inhibir a *C. albicans*, respecto a los EET de bulbos y raíces evaluados en la acción antifúngica, en la tabla 20 se registraron los valores tanto para la cepa *C. albicans* como para *C. parapsilosis* mostrando lo promisorios que resultan ser estos extractos para inhibir el crecimiento de estas levaduras, allí los EC<sub>50</sub> registrados muestran concentraciones bajas (86.15 y 30.78 µg/mL respectivamente) para dichas muestras, es decir con esa concentración se inhibe la mitad de las levaduras existentes en el pozo evaluado, así mismo CMI es baja, en este caso la concentración de los EET de las muestras vegetales de *C. subedentata* fueron bajas e inhibieron el crecimiento de ambas cepas evaluadas.

Pigni N. et al<sup>12</sup>., en su investigación acerca de la biodiversidad de las Amaryllidaceae reportó que la Lyc y la homolicorina pueden inhibir el crecimiento de *C. albicans*, por lo tanto los resultados obtenidos con una buena respuesta de inhibición de las muestras de bulbos y raíces es atribuida al alcaloide Ly; por otro lado se ha encontrado que el EET de *A. sativum* (Amaryllidaceae)<sup>108</sup> produce alteración de las hifas y blastoconidias, las cuales presentaron hinchamiento a lo largo de toda la estructura fúngica, en consecuencia se advierte que posiblemente el efecto ante las levaduras *C. albicans* y *C. parapsilosis* haya sido el mismo en *C. subedentata* de ahí su inhibición en el crecimiento de la levadura. Es evidente que *C. subedentata*

tiene una buena respuesta de inhibición del crecimiento de las levaduras mencionadas, lo cual le da a esta especie un carácter promisorio en el área de la farmacopea.

#### 7.3.4. Actividad de inhibición enzimática

Se evaluó la inhibición de los EET de *C. subdentata* (hojas, bulbos y raíces) sobre la enzima acetilcolinesterasa, mediante ensayos colorimétricos *in vitro* para los que se elaboró una curva con concentración de 8 a 1000 ppm, y fue posible determinar el porcentaje de inhibición y el  $EC_{50}$  (tabla 21), estos resultados fueron comparados con los patrones de Gal y Esa.

**Tabla 21.** Evaluación de la inhibición de los EET de hojas, bulbos y raíces frente a la enzima acetilcolinesterasa.

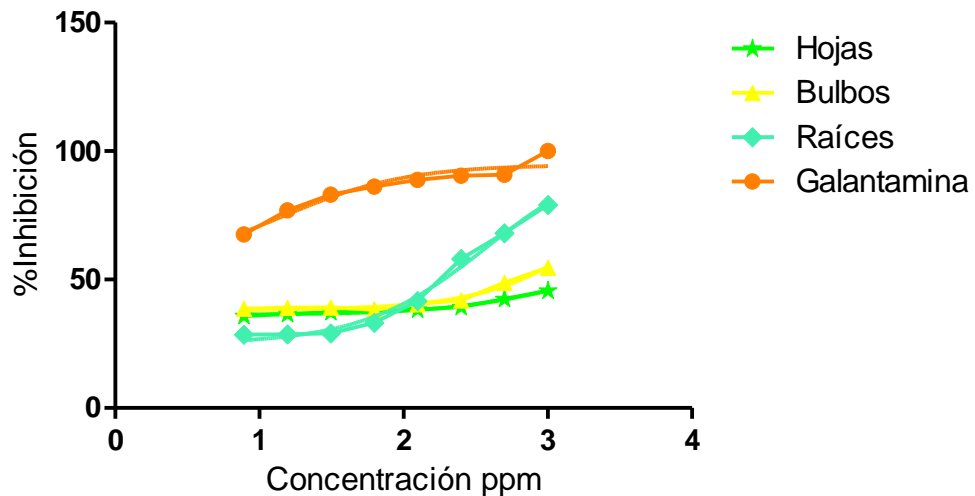
Muestra	Acetilcolinesterasa	
	% Inhibición	IC <sub>50</sub>
Hojas	45.63±0.78	19.12
Bulbos	54.75±0.35	17.59
Raíces	79.10±0.14	2.23
Esa	95.83±0.18	0.39
Gal	90.83±1.39	1.66

Las hojas presentaron un porcentaje de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa en un rango entre 35.84±0.06 a 45.63±0.78, para los bulbos varía desde 38.73±0.66 hasta 54.75±0.35, y las raíces de 28.57±0.07 a 79.10±0.14, siendo evidente que las raíces presentan un aumento en el porcentaje de inhibición, muy similar a los patrones Gal (90.83±1.39) y Esa (95.83±0.18) (figura 14), los bulbos y las raíces presentaron un porcentaje de inhibición dos veces menor que los patrones.

Comparando estos resultados con la clasificación realizada por Vinutha B *et al*<sup>109</sup>., y Adewusi E.A *et al*<sup>110</sup>., quienes consideraron, que un porcentaje mayor al 50% es un inhibidor potente, porcentajes entre 30-50% presentan una inhibición moderada y menor al 30% es considerada como inhibición

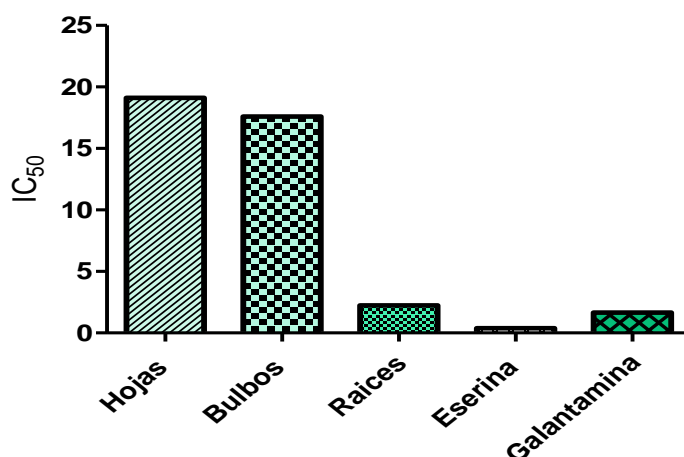
baja, teniendo en cuenta esta categorización las raíces y bulbos presentarían una inhibición potente mientras que las hojas inhibición moderada.

Los resultados expresados en  $IC_{50}$ , 19.12 para hojas y 17.59 para bulbos, estos valores fueron nueve y ocho veces mayores que para las raíces (2.23) respectivamente, siendo las raíces las que necesitan menor cantidad de extracto para inhibir el 50% de la enzima, ratificando así, que las raíces presentan mayor actividad frente a bulbos y hojas, además que su valor de  $IC_{50}$  es muy similar al patrón Gal (1.66) (figura 15)



**Figura 14.** Comportamiento de la inhibición enzimática de los EET hojas, bulbos y raíces *C. subdentata*

Relacionando estos resultados de porcentaje de inhibición con los reportados previamente por Trujillo *et al*<sup>63</sup>, en *P. dubia*, se puede establecer que los EET de hojas inhiben la enzima un  $64.09 \pm 0.01$  % y los EET de bulbos un  $63.67 \pm 0.04$  %, estos valores son mayores a los encontrados en los EET de *C. subdentata*, por lo tanto según estos datos *P. dubia* sería mejor inhibidor de la acetilcolinesterasa entre estas dos plantas pertenecientes a la familia Amaryllidaceae, sin embargo para las raíces no se puede realizar esta comparación debido a que esta parte de la planta no fue evaluada, aunque cabe resaltar que el porcentaje de inhibición fue mayor tanto para las hojas como para bulbos de las dos plantas.



**Figura 15.** Determinación de la concentración efectiva para inhibir el 50 % de la enzima acetilcolinesterasa en los EET de hojas, bulbos y raíces de *C. subedentata*.

En el trabajo de Erdogan, O. *et al*<sup>18</sup>., se reportaron los porcentajes de inhibición para algunas especies de la familia Amaryllidacea entre las que se encuentran *S. candida* (57.30±1.09%), *S. clusiana* (94.94±0.03%) y *S. fischeriana* (32.58±0.60 %). Los porcentajes de inhibición de *S. candida* y *S. clusiana* son mayores a los obtenidos en los extractos de hojas y bulbos de *C. subedentata* y estos a su vez son mayores que *S. fischeriana* la cual presentó un porcentaje de inhibición por debajo del 50%, en cuanto a la inhibición de los EET de raíces el valor fue mayor a *S. candida* y *S. fischeriana* y menor a *S. clusiana*, especie que presentó la mayor inhibición de la enzima acetilcolinesterasa.

Esta actividad enzimática se la atribuyen a diferentes alcaloides presentes en este tipo de especies como son Gal, Ly y Hemantamina entre otras ampliamente reportadas en esta familia. Cortes, N. *et al*<sup>11</sup>., reporta la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa en IC<sub>50</sub> de *C. jagus*, *H. barbatum*, *C. bulbispermum*, *Z. carinata*, *H. puniceum*, (18.28, 28.13, 107.90, 17.96, 25.73 respectivamente), valores mayores a los de *C. subedentata* por lo tanto necesitan una mayor concentración de extracto alcaloídico para inhibir el 50% de la enzima.

*C. subedentata* es conocida por poseer una amplia variedad de alcaloides, como lo reportaron previamente en los trabajos de Cabezas F. *et al*<sup>16</sup>., y

López B. *et al*<sup>85</sup>., entre los que se destacan Gal, Ly, homolicorina, narwedina entre otros, además de la cuantificación realizada en este trabajo. Por lo tanto los porcentajes de inhibición frente a la enzima acetilcolinesterasa determinados en las muestras de *C. subedentata* son atribuidos a los alcaloides (Gal y Lyc)<sup>(112,113,111)</sup>. Relación que se ve reflejada con los resultados obtenidos, ya que en las raíces y bulbos que presentaron el mayor contenido alcaloídico, la inhibición fue mayor, contrario a las hojas donde fue menor.

Teniendo en cuenta que los rangos de inhibición de los EET de los bulbos y raíces estaban por encima del 50% muy similar a otras especies citadas anteriormente, se puede considerar que los resultados obtenidos para la especie *C. subedentata* es una fuente potencial en la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa relacionada con el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Otra de las causas de la enfermedad Alzheimer son los daños neuronales producidos por el exceso de especies radicalarias las cuales oxidan los lípidos, proteínas y ADN<sup>(16, 114-117)</sup>. De acuerdo con estos efectos negativos de los ROS se ha demostrado que la actividad antioxidante puede contribuir a la disminución del daño neuronal, es decir *C. subedentata* de acuerdo a su potencial antioxidante podría inhibir o reducir la aparición de estos radicales, por lo tanto sería capaz de frenar o retrasar el desarrollo de la enfermedad, además; los alcaloides de esta especie como Gal han sido ampliamente estudiados, encontrándose que el efecto inhibitorio de Gal es reversible, selectivo y competitivo sobre la enzima acetilcolinesterasa<sup>21, 69, 113</sup>.

Por lo anterior esta especie de la familia Amarillydacea presenta tanto actividad antioxidante como inhibitoria de la acetilcolinesterasa, dos actividades que por sí solas son beneficiosas pero juntas como se ha encontrado en *C. subedentata* son relevantes, ya que los dos efectos son muy importantes para el control de la enfermedad de Alzheimer. Como ya se mencionó estos dos efectos biológicos logran mostrar el potencial farmacológico de la especie, incrementando el interés para realizar más estudios para su aplicación como fármaco para el tratamiento de dicha enfermedad.

Mediante los análisis realizados a *C. Subedentata*, se pudo determinar que esta planta posee una buena actividad biológica debida principalmente a la

presencia de diversos metabolitos secundarios, quienes poseen diferentes grupos funcionales los cuales les confieren una amplia actividad biológica. Algunos de estos metabolitos fueron determinados por tamizaje fitoquímico, entre los más destacados se encontraron los alcaloides y algunos compuestos fenólicos, a los cuales se atribuye actividad: antioxidante, citotóxica, antifúngica e inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa. Los alcaloides además de ser identificados mediante reacciones colorimétricas, se cuantificó Gal y Ly por CLAR, y los compuestos fenólicos se evaluaron por el método de Folin-Ciocolteau, estos análisis se realizaron en diferentes partes de la planta (hojas, bulbos y raíces). Teniendo en cuenta la presencia de estos compuestos, se evaluó la actividad antioxidante, la cual se relacionó con el TPC, ya que donde hubo mayor TPC se presentó la mejor actividad frente a los radicales DPPH y ABTS<sup>+</sup>, tanto para las muestras de hojas como para las raíces, en cuanto a los bulbos no se presentó esta relación y esta actividad fue baja debido a que los compuestos fenólicos que posee no presentan actividad antirradicalaria.

En cuanto a las otras actividades evaluadas se relacionan más exactamente con el contenido de alcaloides como ya se ha discutido anteriormente, se obtuvo que las raíces presentaron el mayor contenido, seguido de los bulbos y finalmente de las hojas, los resultados presentaron esta misma relación, mayor actividad citotóxica y antifúngica, atribuidas principalmente a Ly y la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa atribuida a Gal para las raíces, luego para bulbos y finalmente para hojas que presentaron la menor actividad, por lo tanto estos resultados están directamente relacionados con el contenido de estos alcaloides, ratificando que estas propiedades en las plantas se atribuyen a este tipo de metabolitos, resultados que han sido ampliamente reportados por otros autores como se describió en cada una de las secciones.

## 8. CONCLUSIONES

8.1. Se determinó mediante el ensayo de fertilización a *C. subedentata*, que esta planta presentó una mayor biosíntesis de los alcaloides Gal y Ly bajo el tratamiento con micronutrientes (B: 0.0151; Cu 0.014; Mn: 0.118; Fe: 0.200; Zn: 0.0020 kg de nutrientes /kg suelo seco), incrementando la concentración de estos alcaloides, los cuales fueron potentes inhibidores de la enzima acetilcoinesterasa relacionada con la enfermedad de Alzheimer.

8.2. El tamizaje fitoquímico del EET de *C. subedentata* de hojas, bulbos y raíces demostró la presencia de metabolitos secundarios como alcaloides, cardiotónicos, cumarinas, taninos y triterpenos, estos metabolitos garantizaron la alta actividad antioxidante de la fracción AcOEt y But usando los radicales DPPH y ABTS, por lo cual ésta es un planta promisoría para la elaboración de antioxidantes de origen natural.

8.3. Debido al alto contenido de Ly en las muestras evaluadas se comprobó una moderada citotoxicidad de los EET de la planta y sensibilidad a los mismos en cepas de *C. albicans* y *C. parapsilosis*, por lo tanto *C. subedentata* podría ser un buen antimicótico.

8.4. Al poseer una alta actividad antioxidante e inhibición enzimática, los extractos de *C. subedentata* demuestran el potencial farmacológico para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, pues las dos actividades podrían retrasar notoriamente el desarrollo de la enfermedad.



## 9. RECOMENDACIONES

9.1. Debido a los buenos resultados frente al ensayo de fertilización con micronutrientes, sería necesario realizar nuevos ensayos prolongando las etapas de crecimiento, para determinar si este factor puede influir positivamente en un mayor incremento en el contenido de Gal, ya que las plantas evaluadas tenían siete meses de crecimiento.

9.2. Por la moderada citotoxicidad de las muestras es necesario evaluar la presencia de nuevos metabolitos secundarios por medio de técnicas cromatográficas de alta resolución en los EET, así como realizar pruebas preclínicas y clínicas en tanto a la toxicidad *in vivo* con el fin de garantizar su posible utilización en humanos y de esta forma aprovechar estos compuestos que presentan actividad biológica.

9.3. La alta actividad antioxidante registrada por medio de los ensayos DPPH, ABTS y Folin Cicolteau demostró que existen metabolitos con este carácter por lo cual se hace necesario efectuar la cuantificación e identificación de flavonoides por medio de CLAR y UV.

9.4. De acuerdo a las actividades biológicas evaluadas se propone realizar la propagación del material vegetal de *C. subdentata*, con el fin de obtener materia prima suficiente para obtener un fitofármaco que aporte a la medicina social, impactando a las familias de enfermos de Alzheimer debido a su alta concentración de Gal, Ly y antioxidantes.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Cabezas, F.; Ramirez, A.; Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J., Alcaloides y actividad biológica en *Eucharis amazonica*, *E. grandiflora*, *Caliphurria subedentata* y *Crinum kunthianum*, especies colombianas de Amaryllidaceae. *Scientia et Technica* **2002**, 51, 3.
2. Cortes, N.; Alvarez, R.; Osorio, E. H.; Alzate, F.; Berkov, S.; Osorio, E., Alkaloid metabolite profiles by GC/MS and acetylcholinesterase inhibitory activities with binding-mode predictions of five Amaryllidaceae plants. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2014**, 34.
3. Ortiz, D.; Valdez, A.; López, L.; Gaitán, I.; Paz, M.; Cruz, S.; Álvarez, L.; Cáceres, A., Actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa por extractos de 18 especies vegetales nativas de Guatemala usadas en el tratamiento de afecciones nerviosas. *Revista científica Universidad de San Carlos* **2013**, 23, 9.
4. Havelek, R.; Seifrtova, M.; Kralovec, K.; Bruckova, L.; Cahlikova, L.; Dalecka, M.; Vavrova, J.; Rezacova, M.; Opletal, L.; Bilkova, Z., The effect of Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine and haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in p53-negative human leukemic Jurkat cells. *Phytomedicine* **2014**, 21 (4), 479-490.
5. Ločárek, M.; Nováková, J.; Klouček, P.; Hošťálkoviá, A.; Kokoška, L.; Gábrlová, L.; Šafratová, M.; Opletal, L.; Cahliková, L., Antifungal and Antibacterial Activity of Extracts and Alkaloids of Selected Amaryllidaceae Species. *Natural Product Communications* **2015**.
6. Amoo, S. O.; Ndhlala, A. R.; Finnie, J. F.; Van Staden, J., Antifungal, acetylcholinesterase inhibition, antioxidant and phytochemical properties of three *Barleria* species. *South African Journal of Botany* **2011**, 77 (2), 435-445.
7. Ingrassia, L.; Lefranc, F.; Mathieu, V.; Darro, F.; Kiss, R., Amaryllidaceae Isocarbostryl Alkaloids and Their Derivatives as Promising Antitumor Agents. *Translational Oncology* **2008**, 1, 13.
8. Prince, M.; Wimo, A.; Guerchet, M.; Gemma-Claire, A.; International., A. s. D. *Informe Mundial sobre el Alzheimer 2015, el Impacto Global de la Demencia. Un análisis de la prevalencia, incidencia, costos y tendencias*; 2015; p 84.
9. Takeuchiemail, Y.; Ariza-Araujo, Y.; Prada, S., Prevalence estimates of dementia in Colombia (2005-2020): Transitions and stage of disease. *Alzheimer's & Dementia* **2014**, 10, 4.
10. group, T. A. p. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II *Botanical Journal of the Linnean Society* [Online], 2003, p. 37.
11. (UNNE)., F. Monocotiledoneas –Asparagales: Amaryllidaceae <http://exa.unne.edu.ar/biologia/diversidadv/documentos/ANGIOSPERMAS/Monocotiled%F3neas/7-Asparagales/3-Amaryllidaceae.pdf>.
12. Pigni, N. Biodiversidad y conservación de recursos fitogenéticos. Las Amaryllidaceae como fuente de productos bioactivos Investigativa, Universidad de Barcelona, 2013.
13. Osorio, E. Búsqueda de sustancias bioactivas a partir de dos especies de la flora Colombiana: Alcaloides de *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae) y biflavonoides de *Garcinia madruno* (Clusiaceae). Investigación, Barcelona, Barcelona, 2008.

14. Pigni, N., Biodiversidad y conservación de recursos fitogenéticos. Las Amarillidáceas como fuente de productos bioactivos. **2013**, 217.
15. Vinueza, R. Tamizaje fitoquímico e identificación de alcaloides de *Phaedranassa schizantha* Baker. Investigativa Escuela Superior Politecnica de Chimborazo, Río bamba-Ecuador, 2014.
16. Cabezas, F.; Pigni, N.; Bastida, J.; Codina, C.; Viladomat, F., Analisis del contenido alcaloidico de *Caliphuria subedentata baker* (Amaryllidaceae) por el método CG-EM. *Revista Latinoamericana de Química* **2013**, 41, 68-63.
17. Torras, C.; Berkov, S.; Codina, C.; Viladomat, F.; Bastida, J., Daffodils as potential crops of galanthamine. Assessment of more than 100 ornamental varieties for their alkaloid content and acetylcholinesterase inhibitory activity. *Industrial Crops and Products* **2013**, 43 (0), 237-244.
18. Erdogan O; Sever Yilmaz B. M; Altun L; Saltan G; B., S., Anti-Acetylcholinesterase and Antioxidant Appraisal of the Bulb Extracts of Five Sternbergia Species. *Rec. Nat. Prod.* **2011**, 15, 193-201.
19. Doskočil, I.; Hošťálková, A.; Šafratová, M.; Benešová, N.; Havlík, J.; Havelek, R.; Kuneš, J.; Královec, K.; Chlebek, J.; Cahlíková, L., Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells. *Phytochemistry Letters* **2015**, 13, 394-398.
20. Diaz, S., Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes *Revista Cubana de Medicina Militar* **2002**, 31, 126-33.
21. Jagtap, U. B.; Lekhak, M. M.; Fulzele, D. P.; Yadav, S. R.; Bapat, V. A., Analysis of selected Crinum species for galanthamine alkaloid: an anti-Alzheimer drug. *Current Science* **2014**, 107, 12-25.
22. Suárez, C. Actividad captadora de radicales libres y efecto antioxidante de metabolitos secundarios del extracto acuoso del *Allium sativum* var. Huaralino (Ajo) en modelos in vitro. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú, 2014.
23. Díaz, S. L., Radicales libres en la biomedicina y estres oxidativo *Revista Cubana de Medicina Militar* **2001**, 30, 36-44.
24. Quintanar , E. M.; Calderón, S. J., La capacidad antioxidante total bases y aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica* **2009**, 28, 89-101.
25. Arias, M. Estudio de la composición química y la actividad antioxidante de aceites esenciales y extractos aislados de *salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* y *Lippia citriodora*, cultivadas en en municipio sucre (Santander). Universidad Industrial De Santander, 2012.
26. Porras, L.; Lopez, M., Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos* **2009**, 3, 121-134.
27. Jorge M; Vivanco E; Loyola V; H., F., Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *INVESTIGACIÓN Y CIENCIA*, **2005**, (68-75).
28. Igmtat, I.; Stingu, A.; Volf, I., Natural bioactive compounds as plant growth regulators. *Lucrări Științifice-seria Agronomie* **52**, 187-192.
29. Lattanzio V; Lattanzio V; A., C., Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in Research*, **2006**, 37, 23-67.
30. Khoddami A; Wilkes M; T., R., Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules* **2013**, 18, 2328-2375.
31. Carvalho, C. D.; Costa, H. S.; Gonçalves, A. T.; Ramos, F.; Castilho, M. C.; Sanches, S. A., Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and

- their potential applications. *Trends in Food Science & Technology* **2015**, *45*, 336–354.
32. Navarro, A. A. Nuevas metodologías analíticas para la determinación de antioxidante alimentarios. Doctoral-Investigativa, Universidad de Cordoba, Cordoba, 2011.
33. Thiruvengadama, M.; Rekhav, K.; Chunga, I.-M., Induction of hairy roots by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of spine gourd (*Momordica dioica* Roxb. ex. willd) for the assessment of phenolic compounds and biological activities. *Scientia Horticulturae* **2016**, *198*, 132–141.
34. Nunes, J. C.; Lago, M. G.; Castelo-Branco, V.; Oliveira, F.; Guedes, A.; Perrone, D.; Monteiro, M., Effect of drying method on volatile compounds, phenolic profile and antioxidant capacity of guava powders. *Food Chemistry* **2016**, *197*, 881–890.
35. López, C. A.; Gómez, C. A. M.; Švarc, G. J.; Segura, C. A.; Fernández, G. A., Determination of phenolic compounds and antioxidant activity of a Mediterranean plant: The case of *Satureja montana* subsp. *kitaibelii*. *Journal of functional foods* **2015**, *18*, 1167–1178.
36. Mizgier, P.; Kucharska, A.; Sokół-Łe, t. A.; Kolniak-Ostek, J.; Kidon, M.; Fecka, I., Characterization of phenolic compounds and antioxidant and anti-inflammatory properties of red cabbage and purple carrot extracts. *Journal of Functional Foods* **2016**, *21*, 133–146.
37. Gawlik, D. U.; Jeżyna, M.; Świeca, M.; Dziki, D.; Baraniak, B.; Czyż, J., Effect of bioaccessibility of phenolic compounds on in vitro anticancer activity of broccoli sprouts. *Food Research International* **2012**, *49*, 469–476.
38. Kchaou, W.; Abbès, F.; Ben, M. R.; Blecker, C.; Attia, H.; Besbes, S., Phenolic profile, antibacterial and cytotoxic properties of second grade date extract from Tunisian cultivars (*Phoenix dactylifera* L.). *Food Chemistry* **2016**, *194*, 1048–1055.
39. Bogucka-Kocka, A.; Zidorn, C.; Kasprzycka, M.; Szymczak, G.; Szewczyk, K., Phenolic acids content, antioxidant and cytotoxic activities of four *Kalanchoë* species. *Saudi Journal of Biological Sciences* **2016**, (1-22).
40. Mulaudzi, R. B.; Ndhala, A. R.; Kulkarni, M. G.; Finnie, J. F.; Van, S. J., Antimicrobial properties and phenolic contents of medicinal plants used by the Venda people for conditions related to venereal diseases. *Journal of Ethnopharmacology* **2011**, *135*, 330–337.
41. Yessoufoua, K.; Elansary, H. O.; Mahmoud, A.; Skalicka, W. K., Antifungal, antibacterial and anticancer activities of *Ficus drupacea* L. stem bark extract and biologically active isolated compounds. *Industrial Crops and Products* **2015**, *74*, 752–758.
42. Bound, D. J.; Murthy, P. S.; Srinivas, P., Synthesis and antibacterial properties of 2,3-dideoxyglucosides of terpene alcohols and phenols. *Food Chemistry* **2015**, *185*, 192–199.
43. Zabka, M.; Pavela, R., Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. *Chemosphere* **2013**, *93*, 1051–1056.
44. Chiang, L. C.; Chiang, W.; Chang, M. Y.; Ng, L. T.; Lin, C. C., Antiviral activity of plantago major extracts and related compounds in vitro. *Antiviral Research* **2002**, *55*, 53–62.

45. Kyung, H. T.; Ko, Y.-J.; Kim, E.-H.; Chung, I.-M.; Kim, J.-S., Anti-inflammatory activity and phenolic composition of dendropanax morbifera leaf extracts. *Industrial Crops and Products* **2015**, *74*, 263–270.
46. Forbes Hernández, T. Y.; Giampieri, F.; Gasparrini, M.; Mazzoni, L.; Quiles, J. L.; Alvarez, S. J.; Battino, M., The effects of bioactive compounds from plant foods on mitochondrial function: A focus on apoptotic mechanisms. *Food and Chemical Toxicology* **2014**, *68*, 154–182.
47. Chieh, J. L.; Jin-Yuarn, L., Anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of strawberry and mulberry fruit polysaccharides on lipopolysaccharide-stimulated macrophages through modulating pro-/anti-inflammatory cytokines secretion and Bcl-2/Bak protein ratio. *Food and Chemical Toxicology* **2012**, *50*, 3032–3039.
48. Hill, C.; London, R., Medicinal plants and the control of parasites. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene* **1996**, *90*, 596–600.
49. Kooltheat, N.; Kamuthachad, L.; Anthapanya, M.; Samakchan, M.; Pankla, S. R. D.; Potup, P.; Ferrante, A.; Usuwanthim, K., Kaffir lime leaves extract inhibits biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Nutrition* **2015**, 1–5.
50. Kenneth, D. T., Herbal extracts and compounds active against herpes simplex virus. *Lead molecules from natural products* **2006**, 65–83.
51. Ng, T. B.; Huang, B.; Fong, W. P.; Yeung, H. W., Anti-human immunodeficiency virus (anti-HIV) natural products with special emphasis on HIV reverse transcriptase inhibitors. *Life Sciences* **1997**, *61*, 933–949,.
52. Carvalho, O. V.; Botelho, C. V.; Ferreira, C. G.; Ferreira, H. C.; Santos, M. R.; Díaz, M. A.; Oliveira, T. T.; Soares-Martins, J. A.; Almeida, M. R.; Silva, J. A., In vitro inhibition of canine distemper virus by flavonoids and phenolic acids: Implications of structural differences for antiviral design. *Research in Veterinary Science* **2013**, *95*, 717–724.
53. Khatun, H.; Luthfun, N.; Rafikul, I.; Farhana, A. R.; mamum, A.; Shahin, K., Antidiabetic and antidiarrheal effects of the methanolic extract of *Phyllanthus reticulatus* leaves in mice. *Asian Pacific Journal of Reproduction* **2014**, *3*, 121–127.
54. Mahendrana, G.; Manojb, M.; Rajendra, P. K.; Narmatha, B. V., Antioxidants, anti-proliferative, anti-inflammatory, anti-diabetic and anti-microbial effects of isolated compounds from *Swertia corymbosa*(Grieb.) Wight ex C.B. Clark – An in vitro approach. *Food Science and Human Wellness* **2015**, *4*, 169–179.
55. Alonso, C. N. Actividad antioxidante de *Satureja macrostema*. Instituto Politécnico Nacional, 2009.
56. Escobar, B. M. Extracción de compuestos fenólicos de las cáscaras de cítricos producidos en México. Instituto Politécnico Nacional, 2010.
57. Orhanl, E.; Yilmaz, B.; Altun, L.; Saltan, G.; Sener, B., Anti-Acetylcholinesterase and Antioxidant Appraisal of the Bulb Extracts of Five *Sternbergia* Species. *Records of Natural Products* **2011**, *15*, 193–201.
58. Brandt, G. R.; Balvedi, P. L.; Henriques, A. T.; Angelo, S. J., Investigaçãõ do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (amaryllidaceae). *Quimica Nova* **2008**, *2042-2046*, 2042–2046.
59. Daniels, C. W.; Rautenbach, F.; Marnewick, J. L.; Valentine, A. J.; Babajide, O. J.; Mabusela, W. T., Environmental stress effect on the phytochemistry and antioxidant activity of a South African bulbous geophyte, *Gethyllis multifolia* L. Bolus. *South African Journal of Botany* **2015**, *96*, 29–36.

60. Ngankeu, P.; Jean-de-Dieu, T.; Lateef, K.; Imran, A.; Abdul, H.; David, N.; Azefack, T.; Jules-Roger, K.; Shaiq, A., Antimicrobial, antioxidant and butyrylcholinesterase inhibition activities of extracts and isolated compounds from *Scadoxus pseudocaulus* and semi-synthetic farrerol derivatives. *South African Journal of Botany* **2016**, *102*, 166–174.
61. Odukoya, A.; Ilori, O.; S., O.; Oluwatoyin, M.; Aniunoh, O.; Lawal, B.; Tade, I., Antioxidant activity of nigerian dietary spices. *Electronic journal of environmental, agricultural and food chemistry* **2005**, *4*, 1086-1093].
62. Fratianni, F.; Neve, O.; Cozzolino, A.; Riccardi, R.; Spigno, P.; Tremonte, P.; Coppola, R.; Nazzaro, F., Phenolic constituents, antioxidant, antimicrobial and anti-proliferative activities of different endemic Italian varieties of garlic (*Allium sativum* L.). *Journal of Functional Foods* **2016**, *21*, 240–248.
63. Trujillo, C. L. 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 Investigativa, universidad del Cauca, Popayán, 2015.
64. Caldón, Q. A. Evaluación de la actividad antioxidante y farmacológica del extracto etanólico de hojas de *Crinum jagus* (Amaryllidaceae). investigativa Universidad del Cauca, Popayán, 2015.
65. Mera, M. Evaluación de la actividad antioxidante, determinación del contenido de fenoles totales y reconocimiento fitoquímico de extractos provenientes de la planta *Eucharis formosa*. Universidad del Cauca, 2013.
66. Yanza, A. Determinación y cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de galantamina en *Phaedranassa dubia*, (Amarillidaceae) en la zona de la Sierra y Rosas(CAUCA) y su relación con macro y micronutrientes del suelo. Analítica-Agroquímica, Universidad del Cauca Popayán Cauca, 2009.
67. Lubbe, A.; Choi, Y. H.; Vreeburg, P.; Verpoorte, R., Effect of Fertilizers on Galanthamine and Metabolite Profiles in *Narcissus* Bulbs by <sup>1</sup>H NMR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59* (7), 3155-3161.
68. Ernest, K.; Volker, R., Micronutrientes en la fisiología de las plantas: funciones, absorción y movilidad. *Informaciones Agronómicas* **2008**, *68*, 16.
69. López, S.; Bastida, J.; Viladomat, F.; Codina, C., Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sciences* **2002**, *71*, 2521–2529.
70. Kaya, G. I.; Cicek, P. D.; Emir, A.; Bozkurt, S. B.; Ali, O. M.; Unver, S. N., Quantitative determination of galanthamine and lycorine in *galanthus elwesii* by HPLC-DAD. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences* **2014**, *11*, 107-112.
71. Sanabria, L. S.; López, S., Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*. **1997**, No 26, Pag. 15-19.
72. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* **1995**, *28*.
73. Parejo, I. V., 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*, 1667-1681.
74. Daniels, C.; Rautenbach, F.; Mabusela, T.; Valentine, A.; Marnewick, J., Comparative antioxidant-capacity and -content of leaves, bulbs, roots, flowers and

- fruit of *Gethyllis multifolia* L. Bolus and *G. villosa* Thunb. species. *South African Journal of Botany* **2011**, 77 (3), 711-717.
75. 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, 1231-1237.
76. 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, 215-223.
77. Suh, S.-S.; Hwang, J.; Park, M.; Park, H.-S.; Lee, T.-K., Phenol content, antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of mangrove plants in Micronesia. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **2014**, 7 (7), 531-535.
78. Sharififar, F.; Moshafi, M. H.; Shafazand, E.; Koochpayeh, A., Acetyl cholinesterase inhibitory, antioxidant and cytotoxic activity of three dietary medicinal plants. *Food Chemistry* **2012**, 130, 20-3.
79. Cantón, L. E.; Martín, M. E.; Espinel-Ingroff, A., Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). *Asociación Española de Micología*, 1-24.
80. Lock de Ugas, O., Analisis fitoquímico y Metabolitos secundarios. In *Manual de Fitoterapia* 1994; p 24.
81. Repetto, J. M.; Repetto, K. G., *Toxicología fundamental*. Sevilla, 2009; p 545.
82. Osorio, E., *Farmacognosia*. Medellin 2014; Vol. 1.
83. Alvarez, A. C.; Lock de Ugaz, O., Taninos. *Revista de Química* **1992**, VI, 17.
84. Anaya, L., *Ecología Química*. Ciudad de Mexico, 2003.
85. López, B. D.; Segura, B. C. Contribución al estudio químico del contenido de alcaloides en *Caliphuria subdentata* (Amaryllidaceae). *Organica*, Universidad del Cauca, Popayán Cauca 2003.
86. Quattrocchi, A.; Albeira de Andrizzi, S.; Laba, F. R., *Introducción al HPLC, aplicación y practica* 1ed.; Buenos Aires 1992; p 405.
87. Broadley M; Brown P; Cakmak I; Rengel Z; F., Z., Function of Nutrients: Micronutrients. *Mineral Nutrition of Higher Plants* **2012**, 3, 191-248.
88. Poutaraud A; P., G., Influence of chemical characteristics of soil on mineral and alkaloid seed contents of *Colchicum autumnale*. *Environmental and Experimental Botany* **2005**, 54, 101-108.
89. M, H. D. Aproximación bioinformática y molecular de la ruta de síntesis de los alcaloides mayoritarios en las especies locales *zephyranthes carinata* y *zephyranthes rosea*. Universidad ICESI, 2014.
90. Zabala, M.; Angarita, M.; Cardona, A. M.; Flórez, J. M.; Vallejo, C., Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales *Revista Facultad Nacional de Agronomía* **2009**, 62, 4881-4895.
91. M., Y.; Ciancia M; S., L., Variación en la producción de alcaloides en inflorescencias de *senecio grisebachii* por deficiencia de nutrientes. *Ciencia del Suelo* **2009**, 27, 31-39.
92. Baldwin I; Oesch R; Merhige P; Hayes., K., Damage-induced root nitrogen metabolism in *Nicotiana sylvestris*: Testing C/N predictions for alkaloid production. *Journal of Chemical Ecology* **1993**, 19, 3029-3043.

93. Carvajal de Pabón, L.; Turbay, I. S.; Rojano, I. B.; Álvarez, I. L.; Restrepo, I. S.; Álvarez, I. J.; Bonillal, K.; Ochoa, I. O.; Sánchez, I., Algunas especies de *Passiflora* y su capacidad antioxidante. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* **2011**, *16*, 9.
94. Pérez, N. V.; Lugo, C. E.; Gutiérrez, L.; Del-Toro, S. C., Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de lima (*Citrus limetta* Risso) y determinación de su actividad antioxidante *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud* **2013**, *15*, 18-22.
95. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; C, R.-E., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* **1999**, *26*, 1231-1237.
96. Alvarez, E.; Jimenez, O.; Posada, C. M.; Rojano, B. A.; García, C.; Durango, R., Actividad antioxidante y contenido fenólico de los extractos provenientes de las bayas de dos especies del género *Vismia* (*Guttiferae*). *VITAE* **2008**, *15*, 165-172.
97. Kuppusamy S; Thavamanic P; Megharajb M; Nirolab R; Leea Y; Naidub R, Assessment of antioxidant activity, minerals, phenols and flavonoid contents of common plant/tree waste extracts. *Industrial Crops and Products* **2016**, *83*, 630–634.
98. Paladino, S. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la Vid (*Vitis vinifera* L.). Investigación, Universidades Nacionales de Cuyo, La Rioja.
99. Rice, C.; Miller, N.; Paganga, G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine* **1996** *20*, 933-956.
100. Soobrattee, M.; Neergheen, V.; Luximon-Ramma, A.; Aruomab, O.; Bahorun, T., Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research* **2005**, 200–213.
101. Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R., Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure- Activity relationships *Free Radical Biology & Medicine* **1997**, *22*, 749–760.
102. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* **1999**, *26*, 6.
103. Orbe, S. P.; Tuesta, P. G. Evaluación de la actividad antioxidante y alelopática de las hojas de *Piper tenuistylum* C.DC y *Piper lagenaebaccum* Trel. Investigativa Universidad de la Amazonía Peruana, San Juan Bautista-Perú, 2013.
104. Fernández-Calienes, V. A.; Martínez, J. M.; Fidalgo, L. M.; Parra, M. G.; Ramos, I. S.; Rodríguez, D. A.; Lizama, R. S.; Gaitén, Y. G., Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Revista Cubana de Medicina Tropical* **2009**, *61*, (3).
105. Fernández, A. C.; González, M. M.; Illnait, Z. M.; Martínez, M. G., Determinación de la concentración mínima inhibitoria de anfotericina B en levaduras de interés médico. *Revista Cubana de Medicina Tropical* **1998**, *50*, 5.
106. Nair, J. J.; van, S. J., Pharmacological and toxicological insights to the South African Amaryllidaceae. *Food and Chemical Toxicology* **2013**, *62* 13.
107. Evidente, A.; Andolfi, A.; Abou-Donia, A.; Touema, S.; Hammada, H.; Shawky, E.; Motta, A., ()-Amarbellisine, a lycorine-type alkaloid from *Amaryllis belladonna* L. growing in Egypt. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 6.



108. Vargas, L. D. Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de *Allium sativum* (ajo) y su efecto sobre algunas propiedades de fotografía en blanco y negro. Investigación, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia, 2001.
109. Vinutha B; Prashanth D; Salma K; Sreeja S.L; Pratiti D; Padmaja R.; Radhika S; Amita A; Venkateshwarlu K; M., D., Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology* **2007**, *109*, 359–363.
110. Adewusi E.A; V., S., In vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from southern Africa. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **2011**, 829-835.
111. Cortes N; Posada-Duque R. A; Fernando Alzate R.A; Berkov R; Cardona-Gómez G.P; E., O., Neuroprotective activity and acetylcholinesterase inhibition of five Amaryllidaceae species: A comparative study. *Life Sciences* **2015**, *122*, 42–50.
112. Rhee K; van de Meent M; Ingkaninan; R., V., Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography* **2001**, *215*, 217–223.
113. Pong Y; Cho Tsun T; N., Y. I., Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease. *Neurochemistry International* **2015**, *89*, 260-270.
114. Mohamed, S. M.; Hamed, A.; Hetta, M. H.; Hussein, A., Egyptian *Pancratium maritimum* L. flowers as a source of anti-Alzheimer's agents. *Bulletin of Faculty of Pharmacy* **2015**, *53*, 3.

## 10. ANEXOS

Anexo 1. Porcentaje de extracción de EET, EAT y las fracciones evaluadas

**Tabla 1.** Porcentaje de extracción de los EAT de muestras con tratamientos agroquímicos

<b>Muestra</b>	<b>Peso EET (mg)</b>	<b>Peso EA (mg)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
Hojas A	10.0	0.3	97
Hojas B	10.0	2.6	74
Hojas C	10.0	0.9	91
Hojas D	10.0	1.0	90
Bulbo A	10.6	0.8	92
Bulbo B	6.1	0.6	90
Bulbo C	2.9	0.1	97
Bulbo D	5.6	0.9	84
Raíz A	10.7	0.7	93
Raíz B	10.6	1.1	90
Raíz C	10.7	0.7	93
Raíz D	10.9	1.9	83
Hojas	10.4	0.5	95
Bulbos	10.4	2.1	80
Raíces	10.6	1.7	84


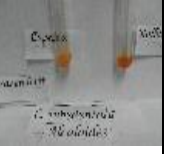






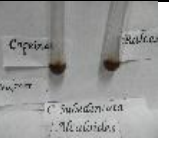

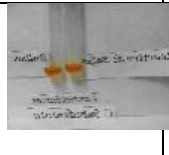
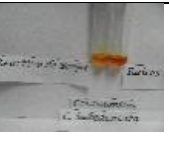

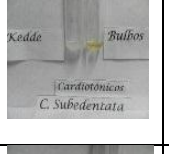
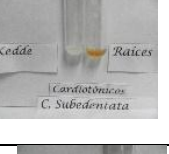
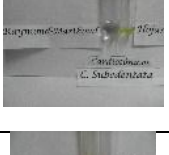

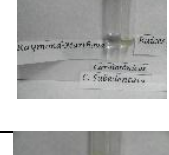



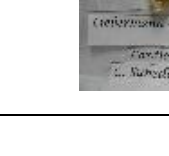
**Tabla 2.** Porcentaje de extracción de las fracciones obtenidas del EET de las muestras hojas, bulbos y raíces




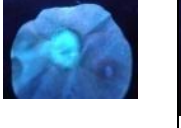
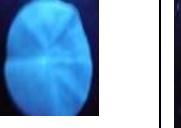


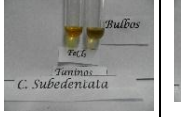
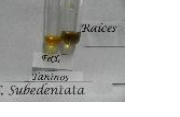










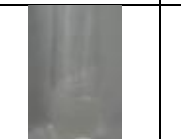


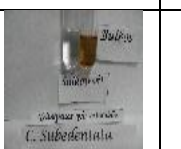


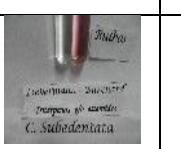

<b>Fracciones</b>	<b>Raíces 731,9 mg EET</b>		<b>Bulbos 1000mg EET</b>		<b>Hojas 981,3 mg EET</b>	
	<b>wFr(mg)</b>	<b>Porcentaje (%)</b>	<b>wFr (mg)</b>	<b>Porcentaje (%)</b>	<b>wFr (mg)</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
<b>Acuosa</b>	360,8	50,704	761,00	23,90	295,00	69,94
<b>But</b>	52,4	92,841	68,00	93,20	248,00	74,73
<b>AcOEt</b>	20,2	97,240	10,00	99,00	24,30	97,52
<b>DCM</b>	56,1	92,335	7,00	99,30	47,00	95,21
<b>Hex</b>	95,4	86,965	45,00	95,50	219,00	77,68

Anexo 2. Tamizaje fitoquímico  
 Tabla 1. Pruebas de tamizaje con posible resultado previsto

Prueba	Reactivo	Resultado
Alcaloides	Dragendorff	+ precipitado anaranjado
	Mayer	+precipitado crema
	Wagner	+precipitado café
Cardiotónicos	Reactivo de Baljet	+ rojo, naranja, violeta
	Reactivo de Kedde	+roja-azul, violeta
	Reactivo de Raymond-Marthoud	+anillo lactónico
	Reactivo de Keller-Kiliani	+colores intensos
	Reactivo de Liebermann-Burchard	+verde, azul-verdoso, rojo
	Reactivo de Salkowski	+rojo sangre, amarillo
Cumarinas volátiles	Volátiles en papel impregnado con NaOH (observación UV)	+Verde en UV
Flavonoides	Ensayo con Mg y HCl	
	Ensayo con cloruro férrico	
Taninos	Cloruro férrico	+ color café, rojizos
	Solución de gelatina	+precipitado blanco
	Solución de gelatina y sal	+precipitado blanco
	Solución salina	+precipitado blanco
Saponinas	Agua tibia	+ Formación de espuma
Triterpenos	Liebermann- Burchard	+Verde intenso
	Salkowski	+rojo
Derivados antracénicos libres	Reacción Bomtraeger	+coloración roja
	Acetato de magnesio	+ coloración roja

Tabla 2. Resultados del tamizaje fitoquímico con evidencias fotográficas

M	metabolito	Prueba	Imágenes		
			H	B	R
1	alcaloides	Dragendorff			
		Mayer			
		Wagner			
2	Cardiotónicos	Baljet			
		Kedde			
		Raymond-Marthoud			
		Keller Kiliani			
		Lieberman burchard			

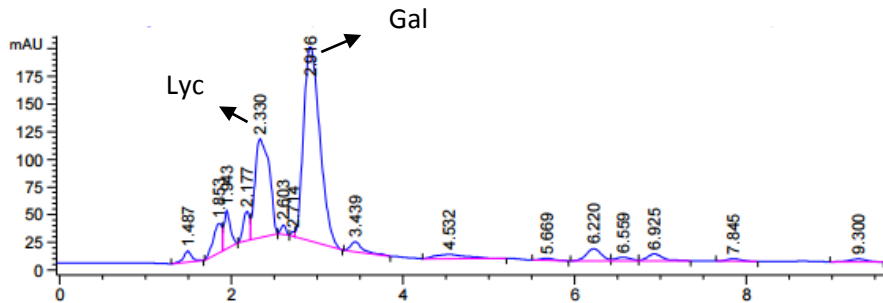
		Salkowski			
3	Cumarinas volátiles	NaOH			
4	Taninos	FeCl <sub>3</sub>			
		Gelatina			
		Gelatina+sal			
		Sln salina			
5	saponinas	Espuma			
6	Triterpenos	Salkowski			
		Lieberman burchard			

## ANEXO 3. Cuantificación de Gal por el método CLAR

Tabla 1. Datos preliminares al establecimiento del método cromatográfico

Ensayo preliminar	Parámetros	Resultado
Elección de la Fase móvil	Metanol 100% Acetonitrilo 100% Metanol:acetonitrilo 50:50 ; 80:20 Acetonitrilo: agua, ácido fórmico 30:70,0.1% <b>Metanol: agua:</b> <b>acetonitrilo (78:20:2)</b>	Se evaluaron cinco fases móviles, encontrándose que la daba mejor resolución de pico era MeOH:H <sub>2</sub> O: ACN
Elección de temperatura de la columna C18	24 °C 26 °C 27 °C 30 °C	En un principio se trabajó a temperatura ambiente, debido a esto se afectaba el área del pico así mismo aumentaba el ruido en los cromatogramas, por tanto se estableció como la mejor temperatura la de 30 °C, usándose el termostato de la columna

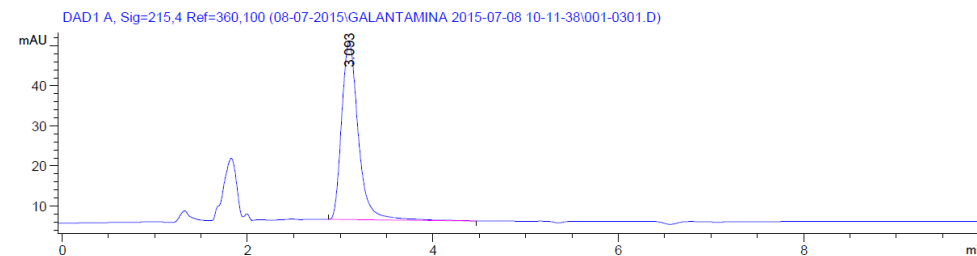
Para la determinación de los tiempos de retención Inicialmente se realizó una adición estándar de los extractos etanólicos totales dopados con los patrones de los alcaloides Gal y Ly, tanto en una mezcla como por separado. Esto se observa en la siguiente figura 1 siguiente:



**Figura 1.** Cromatograma de muestra de hojas sin ningún tratamiento agroquímico, se observa los picos de galantamina y licorina

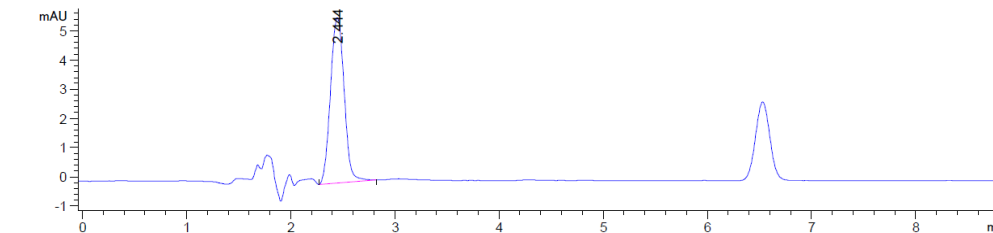
Para la determinación de los tiempos de retención Inicialmente se realizó una adición estándar de los extractos etanólicos totales dopados con los patrones de los alcaloides Gal y Ly, tanto en una mezcla como por separado.

En la siguiente figura se halla el tiempo de retención del alcaloide Gal en una corrida de diez minutos con el eluyente escogido



**Figura 2.** Cromatograma de Gal a una concentración de 4 ppm en un tiempo de corrida de 10 min.

En la siguiente figura se muestra el tiempo de retención del metabolito Ly en un tiempo de corrida de diez minutos.



**Figura 3.** Cromatograma de Ly a una concentración de 5 ppm en un tiempo de corrida de 10 min.

Las muestras de hojas, bulbos y raíces analizadas presentaron los siguientes cromatogramas, en los cuales se encontró una mejor separación de los picos de los metabolitos cuantificados:

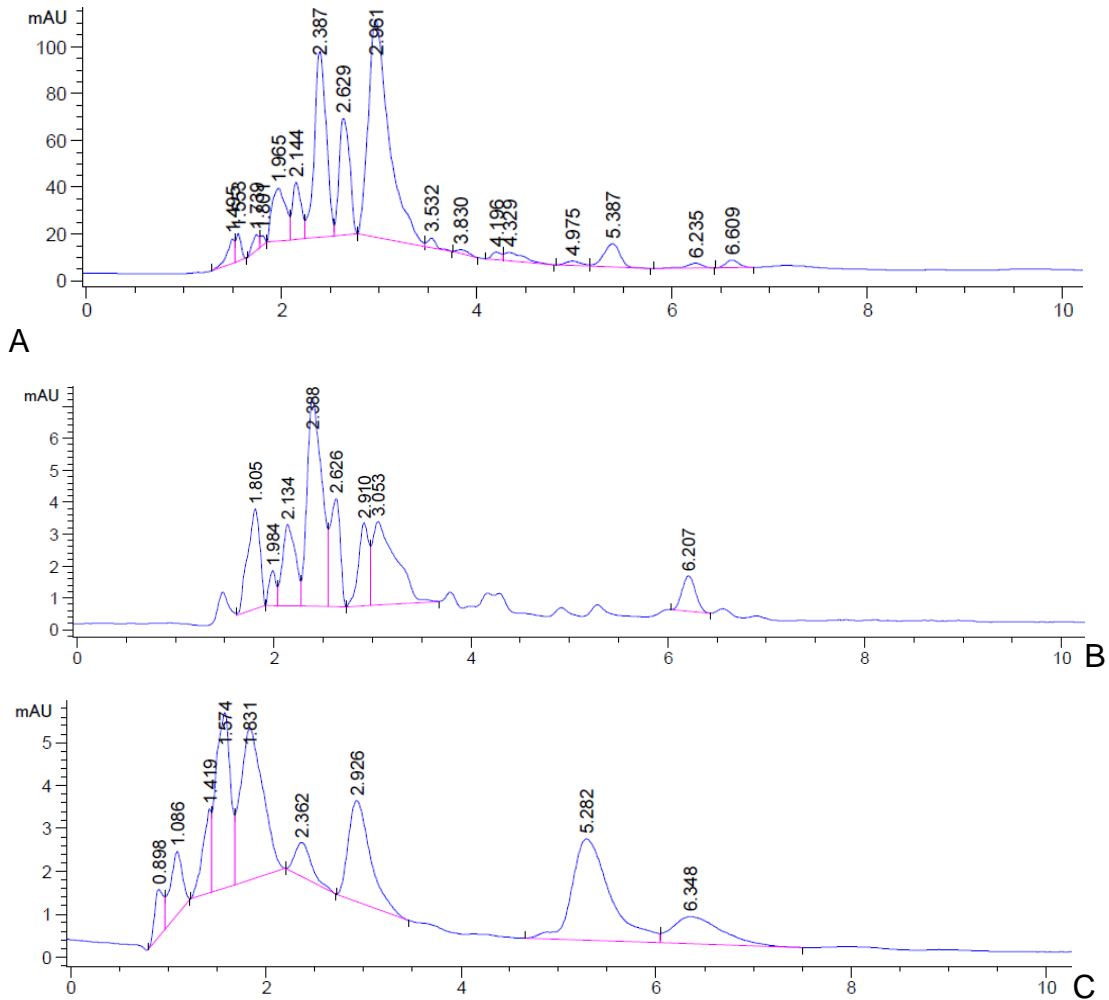


Figura 4. Cromatogramas de los EAT de raíces (**A.** tiempo de retención de Gal (2.961), Ly (2.387)), bulbos (**B.** tiempo de retención de Gal (3.053), Lyc (2.388), hojas (**C.** tiempo de retención de Gal (2.926), Lyc (2.362)).

## 2. Determinación de los parámetros de linealidad : Límite de confianza

$$s\left(\frac{y}{x}\right) = \sqrt{\frac{Y-i - y^{\Delta}}{n-2}}$$

$$Sa = s\left(\frac{y}{x}\right) * \sqrt{\frac{\sum X^2}{\sum (Xi - \bar{X})^2}}$$



$$S_b = \frac{s\left(\frac{y}{x}\right)}{\sqrt{\sum(X_i - \bar{X})^2}}$$

***S<sub>a</sub>: desviación estandar del intercepto***

***S<sub>b</sub>: desviación estandar de la pendiente***

***S*** $\left(\frac{y}{x}\right)$  = ***desviación de linealidad***

Con los anteriores parámetros se encuentran estos valores para determinar el límite de confianza a un 95 % de confianza se multiplica el valor de la t para este valor de significancia, el cual en este caso es de 2.57.

### 3. Determinación del LOD y LOQ

Los parámetros de linealidad se determinaron por medio de las ecuaciones propuestas en el libro de Quattrochi, mencionado en la sección de análisis acerca de la cuantificación

$$LOD = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b}$$

$$LOQ = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b}$$

### 4. Determinación de exactitud

El porcentaje de recuperación fue determinado por medio de la siguiente ecuación:

$$\%R = \frac{(EET - EAT)}{EET} * 100$$

## Análisis de varianza del contenido de Gal por tratamiento agroquímico

Tabla 2. Análisis de varianza entre las muestras de hojas, bulbos y raíces y su contenido de Gal

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Fila 1	2	8.85	4.4265	0.00008		
Fila 2	2	14.10	7.05	0.0008		
Fila 3	2	28.39	14.1965	0.001		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	102.27	2	51.14	77128.26	0.00000008	0.88
Dentro de los grupos	0.001989	3	0.0007			
Total	102.27	5				

Hipótesis: existen diferencias significativas en la concentración de Gal entre las muestras hojas, bulbos y raíces con un 95% de confiabilidad

Ho: la concentración de galantamina en las tres muestras es diferente, siendo hojas la de menor concentración con un 95% de confiabilidad

H alterna: en al menos en una de las muestras analizadas la concentración de Lyc es mayor, con un 95% de confiabilidad

Tabla 3. Análisis de varianza de la concentración de Ly en muestras de bulbos y raíces

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Fila 1	2	8.366	4.183	5E-05		
Fila 2	2	54.896	27.448	0.0002		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	541.260	1	541.260	4330081.8	2.309E-07	0.666
Dentro de los grupos	0.00025	2	0.000125			
Total	541.260	3				

Hipótesis: existen diferencias significativas en la concentración de Ly entre las muestras hojas, bulbos y raíces con un 95% de confiabilidad.

H<sub>0</sub>: la concentración de Ly en las dos muestras es diferente, siendo bulbos de menor concentración con un 95% de confiabilidad.

H alterna: en al menos en una de las muestras analizadas la concentración de Ly es mayor con un 95% de confiabilidad.

## ANEXO 4. Actividad antioxidante

## 1. Construcción de curva de calibración de ácido gálico

La curva de calibración de ácido gálico la cual se realizó en un rango de concentración de 15-75  $\mu\text{g/mL}$ . Su respectiva lectura fue realizada en un espectrofotómetro ThermoScientific GENESYS 6.

Para la expresión de los resultados se utiliza la ecuación 5.

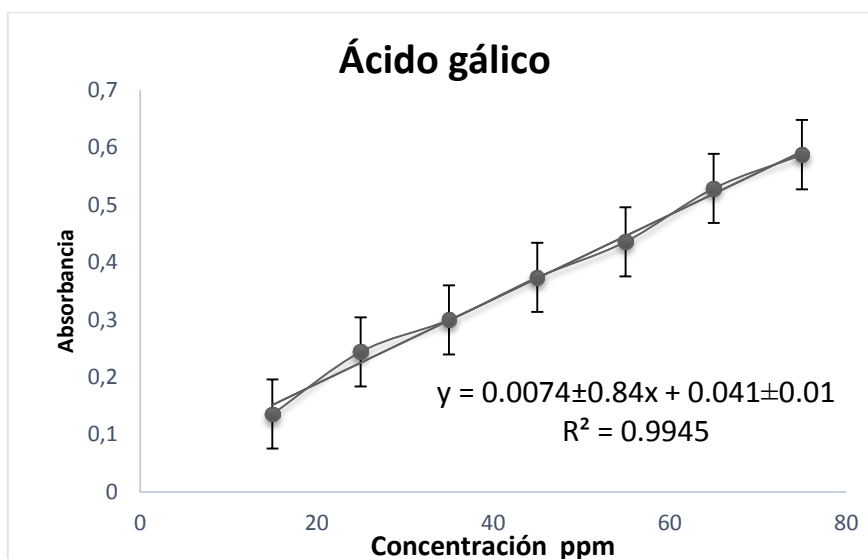
$$2. C = cV / m \quad (5)$$

Donde  $c$  ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) es la concentración de ácido gálico establecida a partir de la curva estándar y de la regresión lineal,  $V$  (mL) es el volumen de extracto de solución ensayada y  $m$  (mg) es el peso del extracto etanólico de la planta seca.

**Tabla 1.** Curva de calibración de ácido gálico a diferentes concentraciones utilizada para la determinación de fenoles totales en los extractos etanólicos totales de hojas bulbos y raíces de *C. subedentata baker* por el método Folin-Ciocalteu

Concentración ppm	A1	A2	A3	Abs promedio	SD	CV (%)
75	0.584	0.588	0.590	0.587	0.0030	0.52
65	0.530	0.534	0.522	0.529	0.0061	1.16
55	0.431	0.438	0.438	0.436	0.0040	0.93
45	0.370	0.379	0.372	0.374	0.0047	1.27
35	0.303	0.297	0.299	0.300	0.0031	1.02
25	0.241	0.247	0.244	0.244	0.0030	1.23
15	0.137	0.135	0.135	0.136	0.0011	0.85

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



**Figura 1.** Curva de ácido gálico

## 2. Preparación de la curva de calibración Trolox para el radical DPPH

Se realizó un gráfico representando el valor de absorbancia del estándar versus concentración del mismo en partes por millón (ppm) y se continuó con el análisis empleando el método de regresión lineal, aplicando las ecuaciones 1 y 2:

$$A_{\text{trolox}} = m \times [\text{trolox}] \quad (1)$$

$$\text{TEAC}_{\text{extracto}} = \frac{A_{\text{extracto}}}{m} \times d \quad (2)$$

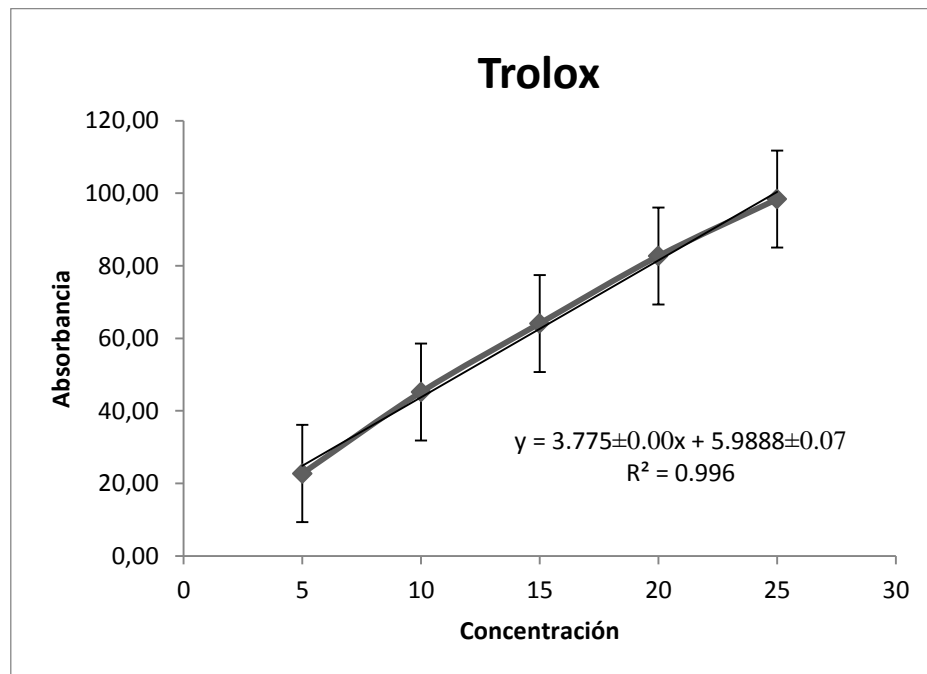
$m$  = pendiente de la curva estándar;  $[\text{trolox}]$  = concentración de trolox y  $d$  = factor de dilución.

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 fueron de 0.00, 0.25, 0.50, 1.00, 1.50  $\mu\text{M}$ , se tomó 2 mL de la solución del reactivo radical DPPH y se adicionó 1 mL de las soluciones preparadas, se agitó, se incubó a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 15 minutos, posteriormente se midió la absorbancia a 515 nm en un espectrofotómetro Thermo Scientific GENESYS 6. Los resultados obtenidos a partir del análisis por el método de DPPH se expresaron en término del valor TEAC la capacidad captadora de radicales libres se calculó mediante la ecuación

**Tabla 2.** Curva de calibración trolox a diferentes concentraciones utilizada para la determinación TEAC en los extractos etanólicos totales de hojas, bulbos y raíces de *C. subedentata baker* por el método DPPH

Concentración (ppm)	R1	R2	R3	Abs promedio	SD	CV(%)
0	0.527	0.544	0.533	0.535	0.0086	1.61
5	0.416	0.409	0.415	0.413	0.0038	0.92
10	0.291	0.296	0.293	0.293	0.0025	0.86
15	0.192	0.190	0.194	0.192	0.0020	1.04
20	0.093	0.090	0.095	0.093	0.0025	2.72
25	0.009	0.009	0.009	0.009	0.0003	2.87

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



**Figura 2.** Curva de calibración de trolox para DPPH

### 3. Preparación de la curva Trolox para el radical ABTS

Se preparó una curva de calibración tomando como base una solución estándar de trolox con concentración de 5 mM y las concentraciones para la curva de 0.00, 0.25, 0.50, 1.00, 1.50  $\mu\text{M}$ , se tomó 950  $\mu\text{L}$  de la solución del reactivo catión radical  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  y se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de las soluciones preparadas, se agitó e incubó a temperatura ambiente y en la oscuridad

durante 5 minutos, posteriormente se midió la absorbancia a 734 nm. Los resultados fueron convertidos a porcentaje de actividad antioxidante (%AA ecuación 3<sup>114</sup>) y expresados como capacidad antioxidante en  $\mu\text{mol}$  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 y se calcularon utilizando la siguiente ecuación:

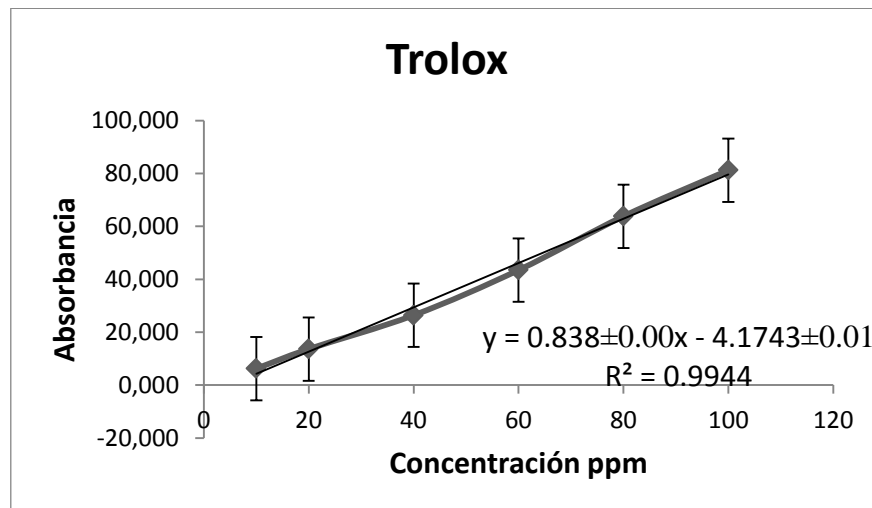
$$\%AA = \left( \frac{B - Abs_M}{B} \right) * 100 \quad (4)$$

B=Abs Blanco; Abs<sub>M</sub>= Abs de muestra

**Tabla 3.** Curva de calibración trolox a diferentes concentraciones utilizada para la determinación de TEAC en los extractos etanólicos totales de hojas bulbos y raíces de *C. subdentata baker* por el método ABTS<sup>+</sup>.

Concentración (ppm)	R1	R2	R3	Abs promedio	SD	CV (%)
100	0.147	0.146	0.148	0.147	0.001	0.7
80	0.285	0.284	0.281	0.283	0.002	0.7
60	0.443	0.444	0.441	0.443	0.002	0.3
40	0.577	0.576	0.576	0.576	0.001	0.1
20	0.678	0.676	0.675	0.676	0.002	0.2
10	0.733	0.734	0.736	0.734	0.002	0.2
0	0.789	0.783	0.778	0.783	0.006	0.7

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



**Figura 3.** Curva de calibración de Trolox ABTS

**Tabla 4.** Datos de la actividad antioxidante registrada por bulbos a una concentración de 4500 ppm por fracción

Fracción	TEAC	
	DPPH	ABTS
ETT	7.35±0.11	3.73± 0.07
Ac	1.93±0.062	57.18± 24.39
But	125.27±0.83	99.82± 0.34
AcOEt	46.90±0.08	148.53± 0.09
DCM	53.11±0.25	121.29± 0.40
Hex	20.91± 0.13	71.73± 0.20

Análisis estadístico de las fracciones en los ensayos de antioxidante y su correlación de estos con los fenoles totales determinados. A continuación se presentan las tablas y graficas relacionados en EET y fracciones de hojas.

Ensayos de antioxidante DPPH con la muestra de hojas

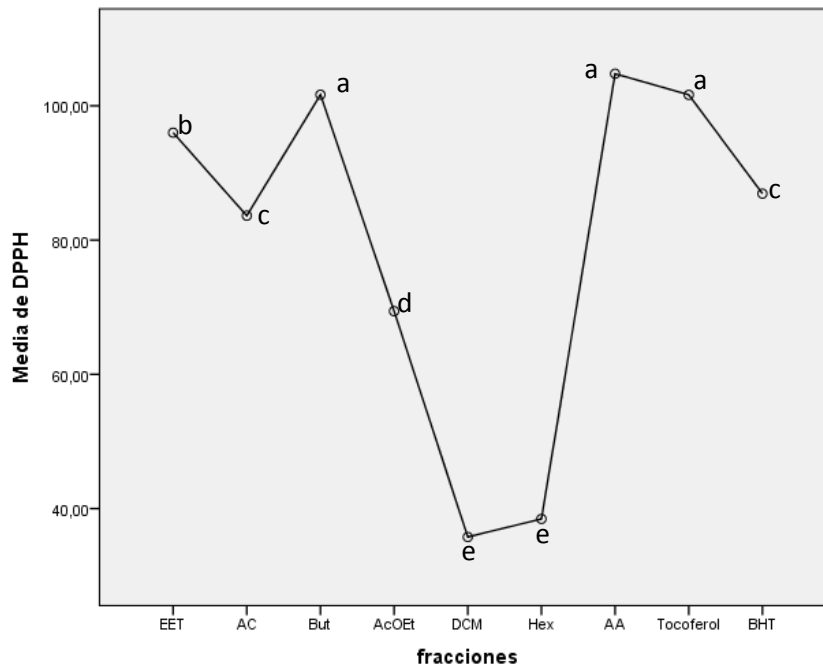


Figura 4. Determinación de mayor actividad de las fracciones de hojas por medio del radical ABTS, señalando a las fracciones con mayor actividad con coeficientes designados con letras desde la letra "a" hasta "e" en orden decreciente en actividad antioxidante, prueba de ANOVA, presentación de medias



Tabla 5. Prueba de contraste de Tukey en la actividad presentada con el radical DPPH, muestra de hojas

fracciones	Subconjunto para alfa = 0.05				
	1	2	3	4	5
DCM	35.764				
Hex	38.463				
AcOEt		69.407			
AC			83.638		
BHT			86.918		
EET				95.992	
Tocoferol					101.633
But					101.657
AA					104.780
Sig.	0.210	1.000	0.074	1.000	0.095

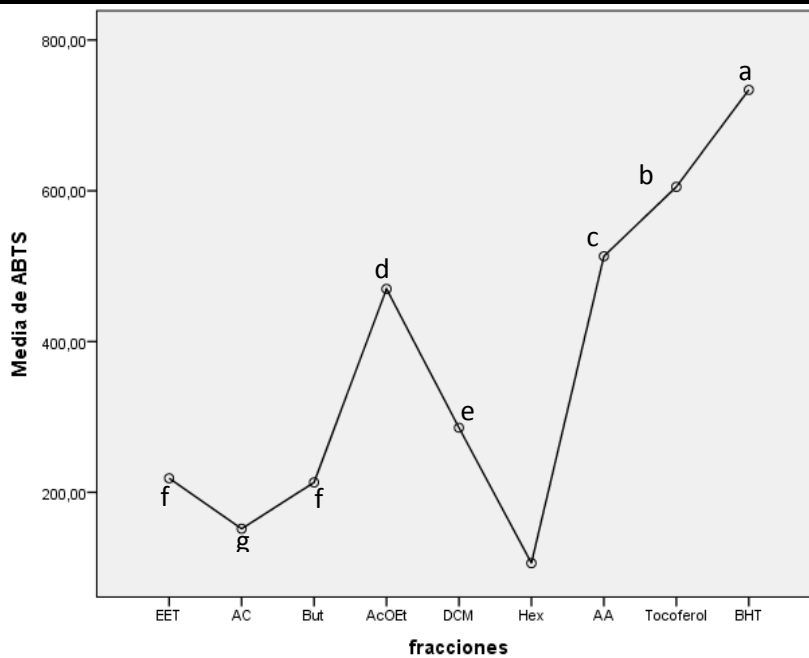


Figura 5. Determinación de mayor actividad de las fracciones de hojas por medio del radical ABTS, señalando a las fracciones con mayor actividad con coeficientes designados con letras desde la letra "a" hasta "e" en orden decreciente en actividad antioxidante

Tabla 6. Prueba de contraste de Tukey en la actividad presentada con el radical ABTS

fracciones	Subconjunto para alfa = 0.05							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Hex	106,016							
AC		151,644						
But			213,129					
EET			218,666					
DCM				285,644				
AcOEt					469,864			
AA						513,136		
Tocoferol							605,218	
BHT								733,914
Sig.	1,000	1,000	,710	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

A continuación se presentan las tablas y graficas relacionados en EET y fracciones de raíces respecto a la estadística de la sección antioxidante:

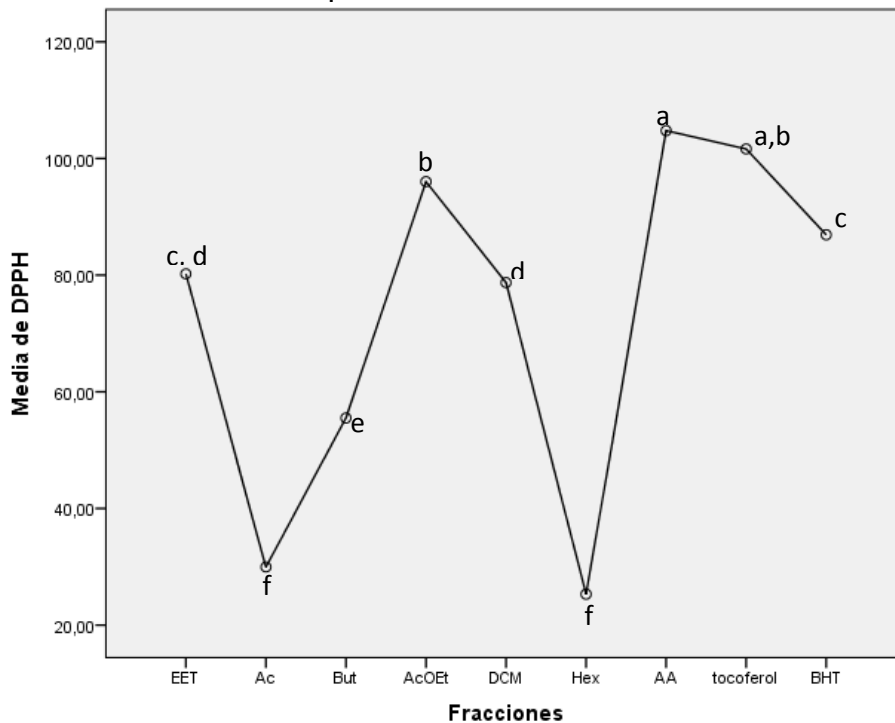


Figura 6. Determinación de mayor actividad de las fracciones de raíces por medio del radical DPPH, señalando a las fracciones con mayor actividad con coeficientes designados con letras desde la letra "a" hasta "e" en orden decreciente en actividad antioxidante

**Tabla 7.** Prueba de contraste de Tukey en la actividad presentada con el radical DPPH

Fracciones	Subconjunto para alfa = 0.05					
	1	2	3	4	5	6
Hex	25.310					
Ac	29.971					
But		55.517				
DCM			78.720			
EET			80.217	80.217		
BHT				86.918		
AcOEt					96.029	
tocoferol					101.633	101.633
AA						104.780
Sig.	0.400	1.000	0.997	0.077	0.200	0.822

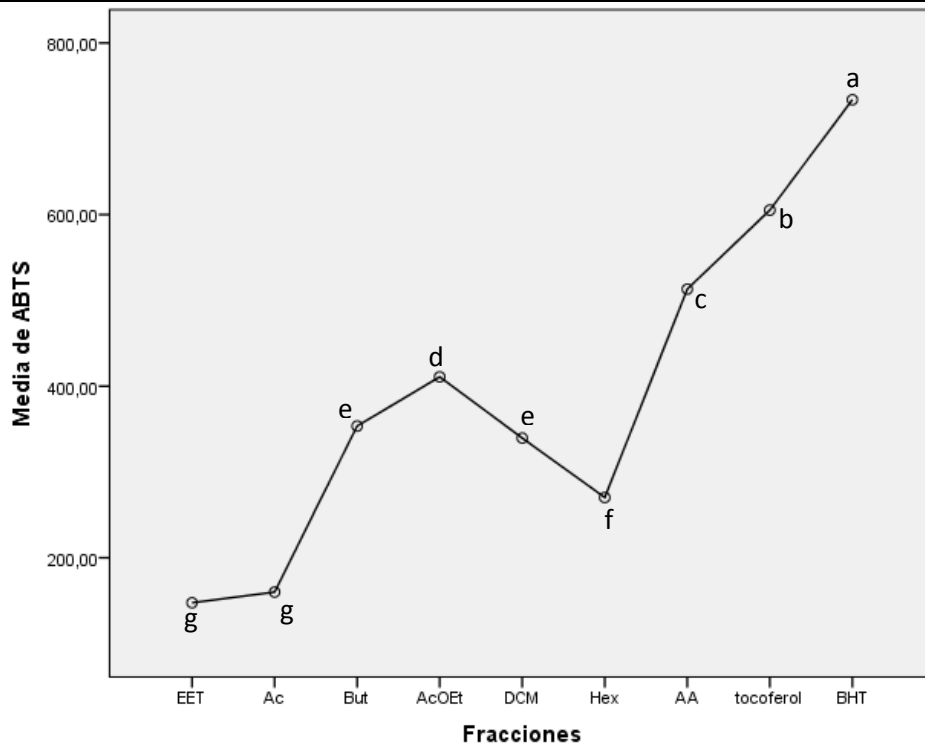


Figura 7. Determinación de mayor actividad de las fracciones de raíces por medio del radical ABTS, señalando a las fracciones con mayor actividad con coeficientes designados con letras desde la letra "a" hasta "e" en orden decreciente en actividad antioxidante

Tabla 8. Prueba de contraste de Tukey en la actividad presentada con el radical ABTS

Fracciones	Subconjunto para alfa = 0.05						
	1	2	3	4	5	6	7
EET	147.555						
Ac	160.055						
Hex		270.267					
DCM			339.537				
But			353.521				
AcOEt				410.871			
AA					513.136		
tocoferol						605.218	
BHT							733.914
Sig.	0.954	1.000	0.918	1.000	1.000	1.000	1.000

Correlación de Pearson para hojas y raíces en los métodos DPPH, ABTS y Folin- Cicolteau

Tabla 9 correlación de Pearson para las muestras de hojas entre los métodos de antioxidante y el contenido de fenoles totales

### Correlaciones

	DPPH	ABTS	Folin
DPPH Correlación de Pearson	1	-0.038	0.640**
Sig. (bilateral)		0.880	0.004
N	18	18	18
ABTS Correlación de Pearson	-0.038	1	0.685**
Sig. (bilateral)	0.880		0.002
N	18	18	18
Folin Correlación de Pearson	0.640**	0.685**	1
Sig. (bilateral)	0.004	0.002	
N	18	18	18

\*\* La correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas).

Tabla 10. Correlación de Pearson para las muestras de raíces entre los métodos de antioxidante y el contenido de fenoles totales

<b>Correlaciones</b>			
	DPPH	ABTS	Folin
DPPH	Correlación de Pearson	1	0.433
	Sig. (bilateral)		0.773**
	N	0.073	,000
		18	18
ABTS	Correlación de Pearson	0.433	1
	Sig. (bilateral)		0.820**
	N	0.073	,000
		18	18
Folin	Correlación de Pearson	0.773**	0.820**
	Sig. (bilateral)		1
	N	,000	,000
		18	18

\*\* . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas) al 99%.

## Anexo 5. Actividad citotóxica

Para relacionar los resultados con un referente es posible encontrar que diferentes autores toman como muy tóxico a los que poseen un  $CL_{50}$  menor a  $100 \mu\text{g/mL}$  y que no poseen toxicidad cuando superan a los  $1000 \mu\text{g/mL}$ , según el programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo de Latinoamérica esta clasificación es aceptada sin embargo expone que su clasificación se suma a los datos consignados en la tabla 1.

**Tabla 1.** Clasificación de toxicidad CYTED

Nº	Categoría	$CL_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
I	Extremadamente tóxico	1-10
II	Altamente tóxico	10-100
III	Moderadamente tóxico	100-500
IV	Ligeramente tóxico	500-1000
V	Prácticamente no tóxico	1000-1500
VI	Relativamente inocuo	>1500

**Tabla 2.** Clasificación de toxicidad por medio de coeficientes de acción tóxica

Clase de sustancia	TCA	
	Aguda	Crónica
1. Sumamente tóxica	< 6	> 10
2. Muy tóxica	< 18	> 5
3. Moderadamente tóxica	< 50	> 2,5
4. Ligeramente tóxica	> 50	< 2,5

Para determinar los TCA se realiza una división del  $CL_{50}$  determinado entre  $CL_{50}$  umbral de 10 ppm.