



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD-
FISIOLOGÍA VEGETAL

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE ALCALOIDES DE *Erythrina americana* Miller

EMMANUEL IBARRA ESTRADA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2010

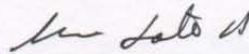
La presente tesis, titulada: "**Actividad antioxidante de alcaloides de *Erythrina americana Miller***", realizada por el alumno: **Emmanuel Ibarra Estrada**, bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD-FISIOLOGÍA VEGETAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



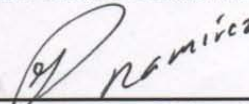
Dr. Ramón Marcos Soto Hernández

ASESOR:



Dra. María del Rosario García Mateos

ASESOR:



Dr. Gustavo Ramírez Valverde

ASESOR:



M.C. Rubén San Miguel Chávez

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Octubre de 2010

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su apoyo financiero en el período de Maestría en Ciencias.

Al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, por ser parte de mi formación profesional.

Al Dr. Ramón Marcos Soto Hernández, por sus conocimientos compartidos y su ayuda incondicional en el logro de los objetivos durante la realización de mi tesis de Licenciatura y de Maestría en Ciencias.

Al consejo particular: Dra. Rosario García Mateos, Dr. Gustavo Ramírez Valverde y M. C. Rubén San Miguel Chávez por su apoyo durante el proceso de investigación, sus correcciones y recomendaciones en la elaboración de la tesis.

A la Dra. Maribel Pacheco Sánchez por su ayuda y consejos en el proceso de experimentación.

Al personal que labora en los distintos laboratorios del edificio de Laboratorios Generales por su apoyo y amistad: Joaquina Tapia, Domingo González, Mercedes Alvarado, Ángeles Arenas, Mario García, Juan Buendía, Gonzalo Galván, Miguel Vega, Guadalupe González, Juan Carlos Zaragoza, Greta Rosas y Rubén Pérez.

Al Ing. Misael Jorge Ayala Villegas por su revisión y recomendaciones de la presente tesis.

DEDICATORIAS

A mis padres Martha Estrada Campos y Anselmo Ibarra Rentería, sin su apoyo nada de esto sería posible, siempre están presentes.

A mis hermanos Martha Elva, Marco Antonio y Adrián.

A mis sobrinas Yareli y Danna, todo lo que ha sido y lo que viene es para ellas.

A mis amigos y colegas del Colegio de Postgraduados y la Universidad Autónoma Chapingo: Misael Jorge Ayala Villegas, Iván Zamudio Valencia, Alejandro Guerrero Santana, Diego Montiel Oscura y Rodrigo Domínguez Velázquez.

A mis amigos: Fredi Bernal Guerrero, Omar Jiménez Márquez, Librado Torres Durán, Francisco Sandoval Domínguez y Yhair Salas González.

INDICE DE CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
RESUMEN	iv
SUMMARY	v
I.- INTRODUCCIÓN	1
II.- JUSTIFICACIÓN.....	3
III.- HIPÓTESIS	3
IV.- ANTECEDENTES	4
4.1 Alcaloide	4
4.2 Generalidades de <i>Erythrina americana</i> Miller	5
4.3 Usos de <i>Erythrina americana</i> Miller	7
4.4 Estudios químicos	8
4.5 Actividad biológica.....	10
4.6 Alcaloides del género <i>Erythrina</i>	13
4.7 Biosíntesis	19
4.8 Antioxidantes	25
4.9 Método DPPH.....	26
4.10 Metabolitos secundarios con actividad antioxidante	28
V.- MATERIALES Y MÉTODOS	34
5.1 Material vegetal	34
5.1.1 Semillas de <i>E. americana</i>	34
5.2 Fitoquímica	34
5.2.1 Extracción de alcaloides de <i>E. americana</i> Miller	34
5.3 Identificación preliminar por cromatografía en capa fina (CCF).	37
5.4 Separación y purificación de alcaloides liberados	37
5.5 Caracterización química de erisodina	38
5.6 Determinación de actividad antioxidante de alcaloides de <i>Erythrina americana</i> Miller	38
5.7 Diseño experimental	39

VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
6.1 Obtención de fracciones crudas de alcaloides	40
6.2 Separación y purificación de alcaloides por cromatografía en columna	45
6.3 Caracterización química de erisodina	49
6.4 Actividad antioxidante	50
VII.- CONCLUSIONES.....	59
VIII.- LITERATURA CITADA.....	61
IX.- ANEXOS	74

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Actividad biológica presentada por especies de <i>Erythrina</i>	12
Cuadro 2. Cantidad de fracciones crudas de alcaloides.....	40
Cuadro 3. Ocurrencia de fracciones crudas de alcaloides en semillas de diversas especies de <i>Erythrina</i>	43
Cuadro 4. Presencia de erisodina en fracciones crudas de alcaloides de especies mexicanas de <i>Erythrina</i> (García <i>et al.</i> , 1998).....	45
Cuadro 5. Desplazamientos químicos de erisodina.....	50
Cuadro 6. Tabla de ANOVA	51
Cuadro 7. Concentración Inhibitoria 50 de los tratamientos evaluados.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución mundial de <i>Erythrina</i> (Neill 1988 y 1993).....	6
Figura 2. Distribución de <i>Erythrina</i> en México (Neill 1988).....	7
Figura 3. Flores de <i>Erythrina americana</i> Miller	9
Figura 4. Semillas de <i>Erythrina americana</i> Miller.....	10
Figura 5. Esqueleto eritriano	14
Figura 6. Estructura de los alcaloides diénicos (Chawla <i>et al.</i> , 1985).....	14
Figura 7. Estructura de los alcaloides alquénicos (Chawla <i>et al.</i> , 1985).....	15
Figura 8. Estructura de los alcaloides lactónicos (Chawla <i>et al.</i> , 1985).....	15
Figura 9. Patrón de fragmentación de los alcaloides diénicos (Jackson, 1985; Dike y Quessy, 1981).....	16
Figura 10. Patrón de fragmentación de los alcaloides alquénicos (Boar y Widdowson, 1970; Dike y Quessy, 1981; Jackson, 1985).....	17
Figura 11. Formación de trimetilsililderivado de β -eritroidina, determinado por espectrometría de masas (Soto, 1989)	18
Figura 12. Ruta de biosíntesis de los alcaloides de <i>Erythrina</i> (Chawla y Kapoor, 1995)....	20
Figura 13. Ruta de biosíntesis de los alcaloides diénicos de <i>Erythrina</i> (Soto, 1989).	21
Figura 14. Ruta de biosíntesis de los alcaloides lactónicos de <i>Erythrina</i> (Soto, 1989).....	22
Figura 15. Biosíntesis de alcaloides eritrianos de acuerdo a Barton <i>et al.</i> (Citado por Reimann, 2007)	23
Figura 16. Nueva secuencia biosintética de alcaloides eritrianos propuesto por Zenk <i>et al.</i> (Citado por Reimann, 2007)	24
Figura 17. Estructura nuclear de los flavonoides. Los flavonoides alimenticios son diversos y varían de acuerdo con el modelo de hidroxilación, conjugación entre los anillos aromáticos, grupos glucosídicos y grupos metoxilo. La polimerización de esta estructura nuclear produce taninos y otras especies complejas presentes en vino rojo, uvas y té negro (Cook <i>et al.</i> , 1996; citado por Heim <i>et al.</i> , 2002).....	29
Figura 18. Metodología general para la extracción de alcaloides de <i>Erythrina americana</i> Miller (Millington <i>et al.</i> , 1974; Games <i>et al.</i> 1974).	36
Figura 19. CCF fracción de alcaloides libres hexánicos revelados con reactivo de Drangendorff	41
Figura 20. CCF fracción de alcaloides libres metanólicos revelados con reactivo de Drangendorff	41

Figura 21. CCF fracción de alcaloides liberados revelados con reactivo de Dragendorff .	41
Figura 22. Placa en luz UV. Comparación entre los dos tipos de alcaloides obtenidos en cromatografía en columna con el estándar erisodina (Las tres últimas muestras son fracciones crudas de alcaloides).	46
Figura 23. Placa revelada con reactivo de Dragendorff	47
Figura 24. Imagen de Microscopía Electrónica de Barrido del alcaloide obtenido por cromatografía en columna (a)	48
Figura 25. Imagen de Microscopía Electrónica de Barrido del alcaloide obtenido por cromatografía en columna (b)	48
Figura 26. Espectro de RMN- ¹ H y fórmula desarrollada de erisodina	49
Figura 27. Concentraciones Inhibitorias 50 de los tratamientos sobre el radical DPPH. Medias con letras diferentes son significativamente diferentes en el nivel P<0.05	53
Figura 28. CI ₅₀ ^{'s} de los tratamientos y sus valores máximos y mínimos	55
Figura 29. Porcentajes de inhibición de fracciones crudas de alcaloides y ácido ascórbico. Los valores se presentan como medias y desviación estándar.	56
Figura 30. Porcentajes de inhibición de erisodina y ácido ascórbico. Los valores se presentan como medias y desviación estándar.	57

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE ALCALOIDES DE *Erythrina americana* Miller

RESUMEN

Los alcaloides son compuestos que presentan efectos fisiológicos y propiedades farmacológicas a bajas concentraciones. Los objetivos de este estudio fueron extraer y aislar fracciones crudas de alcaloides y el compuesto erisodina de semillas de *E. americana*, estimar sus rendimientos y evaluar la actividad antioxidante de fracciones crudas de alcaloides y del compuesto puro erisodina. La actividad antioxidante de las fracciones de alcaloides libres hexánicos, libres metanólicos, liberados metanólicos y de erisodina se evaluó mediante el método del radical estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) que al reaccionar con un antirradical sufre una decoloración de azul-violeta a amarillo; dicha reacción se midió espectrofotométricamente. Entre las fracciones crudas, la fracción de alcaloides liberados presentó mayor actividad antioxidante ($0.1593 \text{ mg mL}^{-1} \pm 0.0305$). Las tres fracciones crudas inhibieron más de 50% de la concentración del DPPH con diferente intensidad. Se aisló erisodina pura a partir de la fracción de alcaloides liberados por medio de cromatografía en columna preparativa utilizando como eluyentes diclorometano:metanol en distintas polaridades; dicho alcaloide se identificó a través de cromatografía en capa fina y RMN-¹H. Erisodina tuvo fuerte inhibición sobre el DPPH comparable estadísticamente con la presentada por el ácido ascórbico ($CI_{50} = 0.0211 \text{ mg mL}^{-1} \pm 0.008$ y $CI_{50} = 0.0067 \text{ mg mL}^{-1} \pm 0.0007$, respectivamente), además, inhibió hasta 94.23% del DPPH en la más alta concentración evaluada (0.5 mg mL^{-1}).

Palabras clave: radical libre; antirradical; erisodina; alcaloides; *Erythrina americana*

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Erythrina americana* Miller ALKALOIDS

SUMMARY

Alkaloids are compounds with physiologic effects and pharmacologic properties at low concentrations. The objectives of this study were to confirm the presence of alkaloids in seeds of *E. americana*, to compare yields of crude extracts and pure compound, and also to evaluate the antioxidant activity of crude fractions of alkaloids and erysodine. The antioxidant activity in hexane and methanol – free alkaloids fractions, liberated methanol and erysodine, all obtained from seeds of *Erythrina americana* Miller, was evaluated using the stable radical method 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH); which turns from blue-violet to yellow when reacting with an antiradical. This reaction was measured in a spectrophotometer. Among the crude alkaloid fractions, the fraction of liberated alkaloids showed the highest antioxidant activity ($0.1593 \text{ mg mL}^{-1} \pm 0.0305$). The all three crude fractions inhibited more than 50% of the DPPH concentration with different intensity. Pure erysodine was isolated from the fraction of liberated alkaloids by column chromatography, using dichloromethane:methanol with different polarities as eluents; this alkaloid was identified by thin-layer chromatography and $^1\text{H-NMR}$. Erysodine had strong DPPH inhibition which is statistically comparable with ascorbic acid inhibition ($\text{CI}_{50} = 0.0211 \text{ mg mL}^{-1} \pm 0.008$ and $\text{CI}_{50} = 0.0067 \text{ mg mL}^{-1} \pm 0.0007$, respectively). Also, inhibited up to 94.23% of DPPH with the highest tested concentration (0.5 mg mL^{-1}).

Key words: free radical; antiradical; erysodine; alkaloids; *Erythrina americana*

I.- INTRODUCCIÓN

La flora en México es vasta y diversa, de ella se han obtenido diferentes metabolitos secundarios como alcaloides, compuestos fenólicos y aceites esenciales, entre otros; y todos ellos, en forma de extracto crudo o puro, presentan propiedades biológicas. Hoy en día, las plantas son importantes en el desarrollo de la medicina moderna, dado que se utilizan como medio preventivo o curativo, esto gracias al efecto fisiológico que ejercen los metabolitos secundarios. Estas sustancias se conocen como principios activos y, generalmente, son producto del metabolismo secundario de la planta. Los principios activos tienen propiedades preventivas o curativas contra enfermedades. Algunos actúan como antibióticos o antisépticos, otros como sedantes o analgésicos, u operan como estimulantes sobre el sistema nervioso, o actúan sobre la actividad neuromuscular o muscular, entre otros efectos. Muchos de ellos se han aislado y purificado, además de elucidar su estructura química, otros son muy complejos y su estructura química no ha sido determinada aún. Es de resaltar el gran uso y aprovechamiento que se puede obtener de los compuestos secundarios vegetales, ya que hoy en día se han probado y demostrado sus interesantes propiedades farmacológicas.

La fitoquímica ayuda a detectar e identificar dichos compuestos secundarios, verificar las propiedades atribuidas a las plantas, posibles nuevas aplicaciones y permite hacer una elección más racional de las especies a estudiar. Es importante especificar si el efecto de las plantas en la evaluación de un problema se debe a un compuesto o si se trata de un efecto sinérgico con otros compuestos.

El consumo de alimentos que contengan compuestos con propiedad antioxidante es importante para ayudar al cuerpo en la lucha contra las especies reactivas de oxígeno excesivas y así prevenir diversas enfermedades degenerativas. Investigar la evaluación y descubrimiento de nuevas sustancias con propiedad antirradical, es primordial.

Los procesos oxidativos están involucrados en algunas enfermedades degenerativas como el cáncer, existen distintos compuestos secundarios en los que se ha evaluado su actividad antioxidante, encontrándose un gran número de metabolitos secundarios.

Se han aislado a partir del género *Erythrina* diversos alcaloides, flavonoides, lectinas y pterocarpanos, así como algunos extractos que presentan actividades biológicas importantes. Una fuente importante de alcaloides, y que ha sido objeto de numerosos estudios farmacológicos y antimicrobianos es la especie *Erythrina americana* Miller (Fabaceae), comúnmente llamada “colorín”. Las semillas de colorín presentan mayor cantidad de alcaloides, en comparación con las flores, las hojas y la corteza. Se ha estudiado el potencial antioxidante de alcaloides y flavonoides de especies de *Erythrina* y enormidad de compuestos secundarios de otras plantas.

En los últimos años se ha incrementado el estudio de nuevos productos o plantas, que, de acuerdo con informes etnobotánicos y pruebas preliminares, se cree que tienen potencial antioxidante. Se ha ofrecido un entendimiento básico de absorción, metabolismo y cinética de acción de los probables nuevos antioxidantes.

Existen diferentes métodos para determinar actividad antioxidante, pero el método del radical DPPH es sencillo, rápido, reproducible y de bajo costo. Este consiste de una evaluación espectrofotométrica de la reacción decolorativa entre la sustancia o compuesto en estudio y el radical mencionado, a determinada longitud de onda.

Debido a la enorme variedad de flora en México, se puede afirmar que se tiene un buen panorama, en cuanto a la búsqueda de nuevas sustancias de origen natural con propiedades farmacológicas, en este caso, con potencial antioxidante. Hoy en día, las plantas son la clave para el desarrollo de nuevos y potentes fármacos que no dañen ni al organismo que los producen ni al que los consume, mucho menos al medio ambiente en el momento de su extracción.

En la actualidad, debido a los efectos adversos de fármacos sintéticos, se ha incrementado el número de compuestos farmacológicos obtenidos del reino vegetal.

Los objetivos de este trabajo fueron extraer y aislar fracciones crudas de alcaloides, identificar el compuesto erisodina en la fracción de alcaloides liberados, ver sus rendimientos y evaluar el potencial antioxidante a través del radical estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.

II.- JUSTIFICACIÓN

Los alcaloides presentan una variedad de estructuras que sobresale a otros grupos de productos naturales, son fascinantes debido a su variedad y representan un reto continuo en términos de elucidación estructural, síntesis y biosíntesis que no muestra signos de disminuir.

Debido a esto la investigación de alcaloides debe continuarse. En algunas plantas se les ha designado como “curiosidad metabólica”. En medicina continúan como importantes fuentes de fármacos para curar enfermedades. De particular interés son aquellas plantas que pueden proporcionar grandes cantidades de energía (vía fotosíntesis y fijación de nitrógeno) que el hombre necesitará en el futuro para mantener y/o mejorar el crecimiento económico y el nivel de vida. Se sabe poco acerca de como los alcaloides y su producción pueden influir en los requerimientos de energía.

Este estudio se enfocó de manera particular sobre la actividad antioxidante de fracciones crudas de alcaloides, así como del alcaloide erisodina, lo cual podría ser base para estudios posteriores en relación a su actividad antiinflamatoria.

III.- HIPÓTESIS

- La fracción de alcaloides libres presentará el mayor rendimiento con respecto a la fracción de alcaloides liberados
- El alcaloide erisodina se haya presente en la fracción de alcaloides liberados como componente mayoritario junto con su isómero erisovina
- Debido a las propiedades farmacológicas de los alcaloides de las especies de *Erythrina* comprobadas en diversos estudios, así como de su complejidad y riqueza estructural de este tipo de compuestos, las fracciones crudas de alcaloides y erisodina inhibirán las propiedades de radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo en diferentes concentraciones.

IV.- ANTECEDENTES

4.1 Alcaloide

La palabra alcaloide fue utilizada por primera vez por W. Meissner en el primer cuarto del siglo XIX (1819) para designar algunos compuestos activos que se encontraban en los vegetales y que poseían carácter básico (Carretero, 2001).

También es una sustancia orgánica que contiene en su estructura nitrógeno, es de origen natural, de mayor o menor grado de basicidad, su distribución es restringida y puede tener actividad biológica, sus estructuras pueden ser desde muy simples hasta muy complejas (Hesse, 2002) y son encontrados en alrededor de 20% de las especies vegetales (Fachinni, 2001).

En cuanto a su estado natural, los alcaloides son esencialmente sustancias presentes en las angiospermas (plantas que tienen sus semillas recubiertas por un epicarpio), sobre todo en ciertas familias como Lauraceae, Magnoliaceae, Renunculaceae, Annonaceae, Menispermaceae, Papaveraceae, Fumariaceae, Rutaceae, Apocynaceae, Loganiaceae, Rubiaceae, y Solanaceae, se encuentran excepcionalmente en bacterias (piocianina de *Pseudomonas aeruginosa*); y en hongos (psilocina de los hongos alucinógenos mexicanos y ergopéptidos del ergot del centeno) (Arango, 2002). Los alcaloides constituyen un grupo de compuestos secundarios que son sintetizados en las plantas como mecanismo de defensa contra el ataque de herbívoros y patógenos entre otras funciones (Wink, 1999; Caporale, 1995). La potente actividad biológica de algunos alcaloides ha conducido a su explotación como farmacéuticos, estimulantes narcóticos, venenos, así como también por sus propiedades antibióticas. Magendie (1783-1855) fue el primero en estudiar la actividad farmacológica de algunos de estos compuestos en animales de experimentación. Sus trabajos se centraron principalmente en el alcaloide aislado de la nuez vómica (*Strychnos nux-vomica* L.), estricnina, este alcaloide es un estimulante neuronal muy tóxico y se utiliza todavía como raticida (Carretero, 2001).

Los alcaloides de acuerdo con su estructura molecular y ruta de biosíntesis pueden dividirse en:

1. **Alcaloides verdaderos.-** Se definen como aquellos compuestos que tienen nitrógeno fijado heterocíclicamente, tienen naturaleza básica, se encuentran normalmente como sales y proceden de aminoácidos.
2. **Protoalcaloides.-** Son aminas aromáticas, su nitrógeno es extracíclico, de carácter básico, pero pueden ser productos secundarios de los alcaloides verdaderos (como la colchicina).
3. **Pseudoalcaloides.-** Poseen todas las características de los alcaloides, salvo que se forman por posterior incorporación del nitrógeno en compuestos libres de este elemento; aquí se incluyen todos los alcaloides terpénicos, inclusive los alcaloides esteroídicos.
4. **Alcaloides imperfectos.-** Son derivados de bases púricas, no precipitan con los reactivos específicos para alcaloides.

4.2 Generalidades de *Erythrina americana* Miller

El género *Erythrina* pertenece a la familia Fabaceae (Leguminosae). El nombre alude al color prevaleciente de las flores y deriva del griego *erythros*= rojo. Se le designa también como “árbol de coral” debido a su color característico. El género está dividido en 5 subgéneros y 26 secciones. *E. americana* pertenece al género *Erythrina* y a la sección *Erythrina* (García *et al.*, 2001). Comúnmente se le conoce como zompantele o colorín.

Son cerca de 115 especies de éste género, comprendiendo un amplio rango de variaciones morfológicas y diversidad ecológica. Estas plantas se encuentran distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales del mundo además en algunas regiones cálidas y templadas (Fig. 1). La mayoría de las especies son árboles o matorrales, pero unos pocos son hierbas perennes con grandes raíces leñosas de reserva (Neill, 1988 y 1993). Muchas de estas especies han sido estudiadas por su morfología, distribución, cromosomas, farmacología, contenido de alcaloides y aminoácidos y su composición química (García *et*

al., 2001). Pocas especies son encontradas en zonas templadas: *E. herbacea* y *E. flabelliformis* son nativas del sur de Estados Unidos, *E. crista-galli* y *E. falcata* se dan en el norte de Argentina (Atchison, 1947).

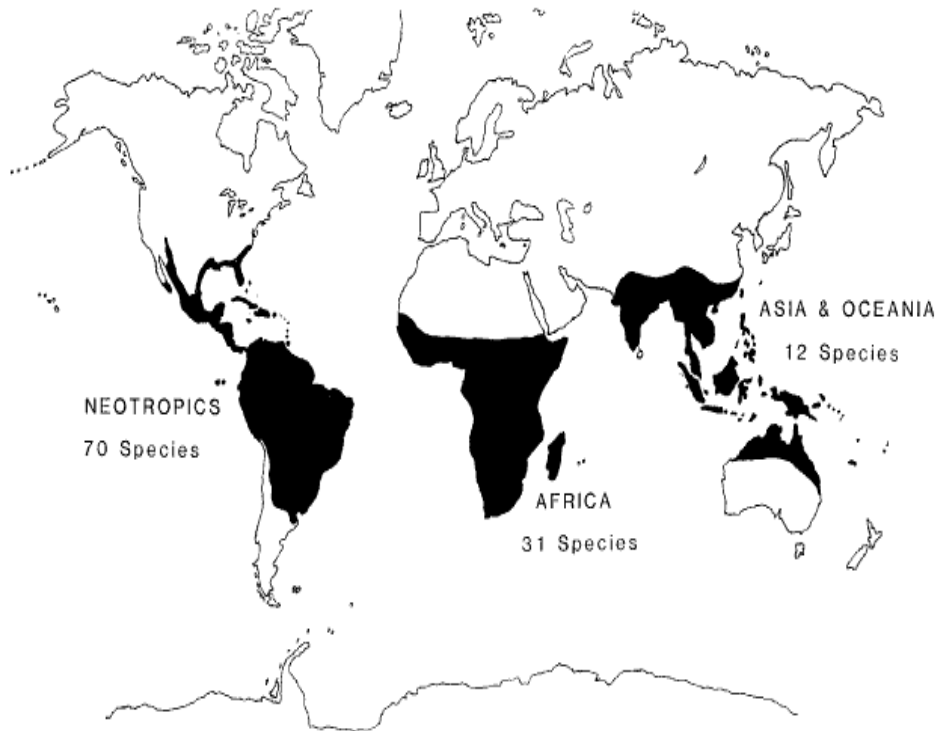


Figura 1. Distribución mundial de *Erythrina* (Neill 1988 y 1993)

E. americana es un árbol de 4-5 m, extendido, copa de ramas abundantes, corteza lisa y estaca café. Tiene espinas en las ramas y espinas cónicas y anchas en el tronco. Las hojas son alternadas y trifoliadas, con tres puntas, folíolos rómbico-ovalados, de 7-22 cm de largo y ancho (García *et al.*, 2001). Esta especie se encuentra en tierras bajas y en elevaciones moderadas (1000-2100 m) (Krukoff y Barneby, 1974). Neill (1988) consideró a *E. coralloides* como sinónimo de *E. americana*, aunque recientemente ambas especies fueron separadas.

La Figura 2 muestra la distribución de *Erythrina* y el número de especies conocidas que se encuentran en las regiones delimitadas. La más alta concentración de especies de *Erythrina* se encuentra en el sur de México y en América Central (Neill, 1988). *E.*

americana puede ser encontrada en el centro de México (Veracruz, Hidalgo, Estado de México, Morelos, Guerrero, Puebla y Oaxaca) (Krukoff y Barneby, 1974).

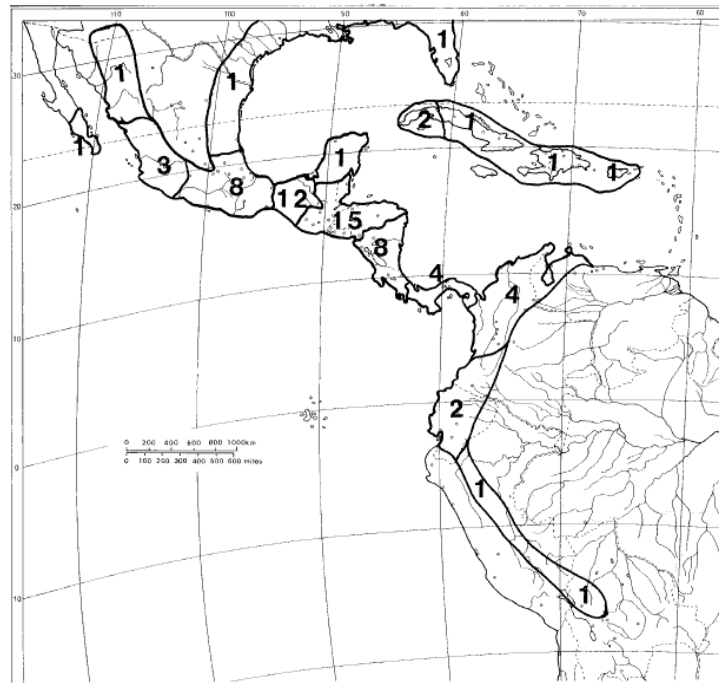


Figura 2. Distribución de *Erythrina* en México (Neill 1988)

4.3 Usos de *Erythrina americana* Miller

Las especies de este género se utilizan para el alivio de 60 trastornos diferentes (Pino *et al.*, 2004). Las flores, retoños jóvenes, corteza, raíces y semillas de las especies de *Erythrina* sirven en sus lugares de origen como alimento, tintes, fármacos y para ornamento (Atchison, 1947). *E. americana* se usa como árbol de sombra y soporte, además como cerca viva. Puede ser usada como abono verde y para alimentación animal, las flores son comidas y usadas para hacer infusiones, y las semillas se usan en joyería artesanal (García *et al.*, 2001). En la región Huasteca de San Luis Potosí, el grupo indígena Teenek usa las inflorescencias de *E. americana* como calmantes y relajantes (Garín *et al.*, 2000). Las semillas, corteza, hojas y flores son frecuentemente reportadas por tener efecto sedativo (Lozoya y Lozoya, 1982).

4.4 Estudios químicos

Con relación a la fitoquímica, se ha demostrado que los alcaloides de *Erythrina* están presentes en todas las partes de la planta (Barton *et al.*, 1968; Maier *et al.*, 1999); se han investigado más de 83 especies. Las familias químicas que se reportan con mayor frecuencia son los alcaloides, flavonoides y lectinas; para este propósito, los principales órganos vegetales analizados fueron las semillas, corteza del tallo, corteza y flores, aunque también existen reportes de la corteza e interior de la raíz y hojas (Pino *et al.*, 2004). Las semillas de algunas especies suministran drogas con efecto parecido a las del curaré (Atchison, 1947). Se ha evidenciado la presencia de alcaloides en cáliz y corola en flores de *E. americana* (Sánchez *et al.*, 2001), semillas (Abdullah, 1979 y García *et al.*, 2004), (Figs. 3 y 4) así como en callo y células en suspensión mediante técnicas de cultivo de tejidos vegetales (García *et al.*, 1999 y San Miguel *et al.*, 2007). *E. americana* ha sido extensamente estudiada debido a su alto contenido de alcaloides en las semillas y su actividad farmacológica (Aguilar *et al.*, 1981). Las semillas contienen de 0.05 a 0.1% de alcaloides, aunque también han sido aislados de hojas, tallo, corteza, raíces, vainas y flores de diversas especies de *Erythrina*; un tipo especial de compuestos en esta especie es una serie de alcaloides espirocíclicos-isoquinolínicos que son encontrados en todas las partes de la planta (García *et al.*, 1998; Sotelo *et al.*, 1993). Sotelo *et al.* (1993) mostraron que las semillas de *E. americana* contienen un alto contenido de proteínas y un perfil alcaloidal característico de las especies de este género.

Para contribuir al descubrimiento de nuevos herbicidas se evaluó el efecto de las fracciones de alcaloides de semillas de *E. americana* en la síntesis de ATP y la actividad de la bomba de protones de cloroplastos aislados de *Pisum sativum*, mostrando que los alcaloides libres y liberados afectan ligeramente la actividad fotoquímica de los cloroplastos aislados, conduciendo a alteraciones en el desarrollo de plantas (efecto herbicida), sin embargo, en pruebas de germinación no mostraron actividad alelopática en maíz y frijol (García y Soto, 2001).



Figura 3. Flores de *Erythrina americana* Miller

De acuerdo con Folkers y Koniuszy (1940) y Folkers y Major (1937), los alcaloides más abundantes en *E. americana* son α - y β -eritroidina y pequeñas cantidades de erisodina, erisovina y erisopina.

Erisodina (alcaloide objeto de este estudio) está presente en semillas de *E. crista-galli*, *E. falcata*, *E. dominguezzi*, *E. verna*, *E. suberosa*, *E. breviflora*, *E. herbacea*, *E. flabelliformis*, *E. amazonica*, *E. pallida*, *E. addisoniae*, *E. sacleuxxi*, *E. velutina* (Abdullah *et al.*, 1979). También se ha encontrado en hojas de *E. crista-galli* (Ito *et al.*, 1973) y *E. suberosa* (Sing y Chawla, 1969). Garín *et al.* (2005) reportan la presencia de erisodina en extractos crudos de semillas (fracción de alcaloides libres hexánicos, libres metanólicos y liberados metanólicos) de *E. herbacea*. Hojas de *E. berteroana* y *E. poeppigiana* contienen erisodina (Soto y Jackson, 1993b); así como en semillas de *E. fusca*, *E. costaricensis*, *E. leptorhiza*, *E. speciosa*, *E. variegata*, *E. melanacantha* y *E. berteroana* (Soto y Jackson, 1993a). Las semillas de *E. crista-galli* presentaron erisodina como principal constituyente con un contenido de 0.04% en base a peso seco (Maier *et al.*, 1999)

García *et al.* (1998) identificaron erisodina en diferentes estructuras de *E. americana*, *E. coralloides*, *E. leptorhiza*, *E. mexicana* y *E. oaxacana*. En estudios con ratones erisodina presentó una LD₅₀ de 62.93 mg kg⁻¹, por 25.23 mg kg⁻¹ de su isómero erisovina, administrados por vía intraperitoneal (Garín *et al.*, 2001); mientras que Craig (1981) reportó un valor de 100 mg kg⁻¹ cuando erisodina se administró por vía subcutánea y de 155 mg kg⁻¹ cuando se administró por vía oral; también encontró que el efecto paralizante (inyecciones intralinfáticas en rana) con erisovina se alcanzaba con dosis de 3 mg kg⁻¹ mientras que con erisodina se requerían entre 10-15 mg kg⁻¹.

Se evidenció que el bloqueo de los receptores nicotínicos $\alpha_4\beta_2$ y α_7 del hipocampo dorsal, con los antagonistas erisodina y dihidro- β -eritroidina, deterioró la consolidación de la memoria de la tarea aversiva, por lo que se destaca la importancia de la interacción entre los receptores nicotínicos en este proceso (Garín *et al.*, 2009).



Figura 4. Semillas de *Erythrina americana* Miller

4.5 Actividad biológica

Las acciones biológicas estudiadas experimentalmente con mayor frecuencia en el género *Erythrina* son: actividad antibacteriana (31%), efecto citotóxico (9%), actividad antiinflamatoria, analgésica y antipirética (7%), antifúngica (5%), entre otras (Pino *et al.*, 2004). Por lo general se obtienen tres distintas fracciones crudas de alcaloides de semillas de *E. americana*: alcaloides libres en hexano, alcaloides libres en metanol y alcaloides liberados. La evaluación farmacológica de estas fracciones en ratas mostró que, administradas en una dosis de 3 mg kg⁻¹, disminuyen el comportamiento agresivo, comparable con el control positivo diazepam (Garín *et al.*, 2000). García *et al.* (2000) observaron que el derivado dihidro es más potente que β -eritroidina sobre el comportamiento agresivo de ratas. Por otra parte, la fracción de alcaloides liberados resultó ser más tóxica que las fracciones de alcaloides libres y metanólicos sobre las especies *Daphnia magna* (crustáceo), *Artemia salina* (crustáceo), *Bacillus cereus* (bacteria) y *Panagrellus redivivus* (nematodo); principalmente por la presencia de los alcaloides erisopina, erisodina y erisovina (García *et al.*, 2000). En larvas de *Culex quinquefasciatus*, la fracción de alcaloides libres metanólicos mostró alta mortalidad por encima de la fracción de alcaloides liberados; también, el alcaloide lactónico β -eritroidina, aislado de la fracción de alcaloides libres) fue más tóxico que erisovina (alcaloide diénico de la fracción de alcaloides liberados) (García *et al.*, 2004). Sobre hongos fitopatógenos, erisovina posee un efecto inhibitorio en el crecimiento micelial de *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*,

Fusarium oxysporum, *Penillium sp.*, *Monilia fructicola* y *Trichoderma harzianum*, la dosis 0.8 mg mL⁻¹ presentó la actividad antimicótica más alta (Ibarra *et al.*, 2009). El extracto crudo alcaloidal de plántulas de *E. coralloides* mostró efecto antimicótico sobre las especies antes mencionadas, a excepción de *T. harzianum*, que no fue estudiada (Soto y San Miguel, 2006).

Se trató a carpas (*Cyprinus carpio*) con extracto liposoluble y extracto hidrosoluble de alcaloides de flores de colorín, obteniendo un efecto inmovilizador, pero con mortalidad alta en las dosis mayores (Vargas, 1988; citado por Auró de Ocampo y Jiménez, 1993).

Es importante encontrar la manera de incrementar la cantidad de alcaloides presentes en las estructuras vegetales de las especies de *Erythrina* para valorar su rendimiento. La falta de disponibilidad de material vegetal representa un obstáculo para su explotación comercial (San Miguel *et al.*, 2007). Algunas investigaciones han establecido que 25% de los principios activos empleados en preparaciones farmacéuticas usadas, son origen natural de plantas o derivados de éstas (Payne *et al.*, 1991).

García *et al.*, (1999) sugieren que la técnica de cultivo de tejidos representa una alternativa para la producción de alcaloides de importancia farmacológica; examinaron la presencia de alcaloides activos biológicamente en callos no diferenciados de semillas de *E. americana* y *E. coralloides* encontrando alcaloides tetracíclicos típicos de estas especies.

Se estudió la presencia de alcaloides en cotiledones, callos y cultivo de células en suspensión de *E. americana*; células en suspensión tratadas con medio MS adicionado con 3 mg L⁻¹ de ácido naftalenacético y 2 mg L⁻¹ de cinetina produjeron la más alta concentración de alcaloides α - y β -eritrodina (San Miguel *et al.*, 2003); también, plántulas de un mes de edad de *E. americana* y *E. coralloides*, mostraron presencia de gran variedad de alcaloides (San Miguel *et al.*, 2006). Para incrementar la presencia de alcaloides, se agregó ácido jasmónico al cultivo de células en suspensión de *E. americana* lo cual llevó a una disminución en la presencia de alcaloides en comparación a un grupo de células control, pero que condujo a un aumento en la cantidad de erisodina, eritridina y erisopina presentes en el medio de cultivo (San Miguel *et al.*, 2007).

En el Cuadro 1 se presenta la diversidad de propiedades biológicas y estudios realizados sobre el género *Erythrina*.

Cuadro 1. Actividad biológica presentada por especies de *Erythrina*

Especie	Extracto o compuesto	Actividad biológica	Referencia
<i>E. crista-galli</i> L.	Pterocarpanos	Antibacterial (<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella gallinarum</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>Candida albicans</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	Mitscher <i>et al.</i> , 1988
<i>E. crista-galli</i> L.	Extracto acuoso de hojas	Antiinflamatoria y antinociceptiva	Miño <i>et al.</i> , 2002
<i>E. fusca</i>	Alcaloides	Antibacterial (<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> y <i>S. typhimurium</i>), hongos (<i>Muccor spp.</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Aspergillus niger</i>) y ratas.	Calle <i>et al.</i> , 1997
<i>E. fusca</i>	Flavonoides prenilados y extracto de acetato de etilo	Antimalarial contra <i>Plasmodium falciparum</i>	Khaomek <i>et al.</i> , 2008
<i>E. indica</i>	Isoflavonas	Citotoxicidad	Nkengfack <i>et al.</i> , 2001
<i>E. latissima</i>	Flavonoides	Bacterias (<i>Escherichia coli</i> , <i>Sthapylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Candida mycoderma</i>)	Chacha <i>et al.</i> , 2005
<i>E. latissima</i>	Alcaloides	Antialimentaria contra <i>Spodoptera littoralis</i> (Lepidoptera: noctuidae)	Cornelius <i>et al.</i> , 2009
<i>E. mildbraedii</i>	Pterocarpanos	Bacterial (<i>S. aureus</i> y <i>Mycobacterium smegmatis</i>)	Mitscher <i>et al.</i> , 1988
<i>E. mildbraedii</i>	Pterocarpanos	Antiinflamatoria y antioxidante	Njamen <i>et al.</i> , 2003
<i>E. poeppigiana</i>	Flavonoides	Antibacterial (<i>S. aureus</i>)	Sato <i>et al.</i> , 2006
<i>E. senegalensis</i> DC	Extractos de raíz, corteza del tallo, hojas, semillas y flores.	Contra diversas enfermedades: malaria, amenorrea, infecciones, abortos, heridas, ictericia y dolores corporales.	Togola <i>et al.</i> , 2008
<i>E. senegalensis</i> DC	Extracto acuoso de corteza del tallo	Antiplasmodial, analgésico y antiinflamatoria	Saidu <i>et al.</i> , 2000
<i>E. senegalensis</i> DC	Flavonoides	Inhibición de diacilglicerol aciltransferasa	Oh <i>et al.</i> , 2009
<i>E. subumbrans</i> y <i>E. stricta</i>	Pterocarpanos, flavonoides, alcaloides, triterpenos y esteroides.	Antibacterial y antiplasmodial	Rukachaisirikul <i>et al.</i> , 2007
<i>E. subumbrans</i>	Pterocarpanos	Antibacterial (<i>Streptococcus</i> y <i>Staphylococcus</i>)	Rukachaisirikul <i>et al.</i> , 2007
<i>E. velutina</i>	Extracto acuoso	Evaluación toxicológica contra ratas	Santos <i>et al.</i> , 2008

4.6 Alcaloides del género *Erythrina*

Los alcaloides de *Erythrina* tal como eritralina en *E. crista-galli* son bencilisoquinolinas modificadas; la evidencia fue obtenida con la aparente identificación de (S)-norprotosinomenina como el intermediario bencilisoquinolínico clave (Herbert, 2001). La investigación sobre *Erythrina* comenzó a fines del siglo XIX. Durante las dos últimas décadas de ese tiempo, los extractos de las especies de *Erythrina* han exhibido actividad bloqueadora neuromuscular parecida a la del curaré, lo cual es causado por los alcaloides presentes en la especie (Reimann, 2007). El pionero en el estudio de los alcaloides en la década de 1930 fue el doctor Folkers. Posteriormente, poco antes de la década de 1970 el doctor Rinehart Jr. quien estaba a cargo del “Roger Adams Laboratory”, expresó gran interés en el género *Erythrina* debido a su gran contenido alcaloidal, y fue así que varios científicos de todo el mundo iniciaron el estudio de sus alcaloides (Barton *et al.*, 1973; Boar y Widdowson, 1970; Chawla y Jackson, 1989). Hargreaves *et al.* (1974) y Games *et al.* (1974) trabajaron con especies de África, América, Asia, Australia y Polinesia con lo que determinaron que todas las especies tenían un perfil diferente de alcaloides; estos perfiles podrían servir como posibles marcadores taxonómicos de las especies de *Erythrina*. Por otra parte, la elucidación de las diferentes estructuras de los alcaloides ha sido posible mediante el uso de técnicas como la espectrometría de masas, así como cromatografía de líquidos y de gases y cristalografía de rayos X, auxiliándose de reacciones químicas específicas. Abdullah *et al.* (1979) usaron la cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas para analizar el contenido de alcaloides de varias especies de *Erythrina*, caracterizaron los alcaloides totales presentes en forma “libre” y como sus glicósidos; los últimos fueron hidrolizados para activar los alcaloides “liberados” para ser analizados.

Los alcaloides de *Erythrina* son de tipo isoquinolínico, caracterizados por su única estructura espiroamina tetracíclica (Reimann, 2007), que es un esqueleto eritranano (Fig. 5)

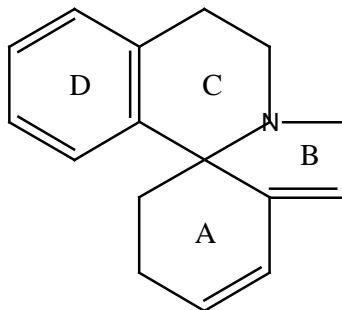
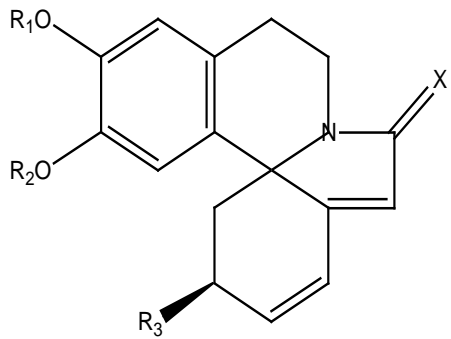


Figura 5. Esqueleto eritrinano

Se clasifican de acuerdo a su estructura en 3 grupos: diénicos, alquénicos y lactónicos.

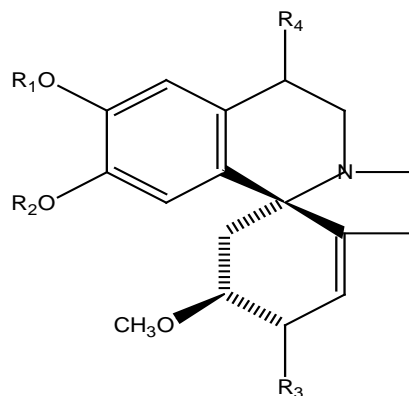
Los alcaloides diénicos contienen un sistema dieno conjugado en los anillos A y B (Fig. 6).



Alcaloide	R1	R2	R3
Erisodina	H	Me	Me
Erisopina	H	H	Me
Erisovina	Me	H	Me
Erisotrina	Me	Me	Me
Eritralina		-CH ₂ -	Me
Eritravina	Me	Me	H
Erisonina	H	Me	H
Erisolina	Me	H	H
Eritrocarina		-CH ₂ -	H

Figura 6. Estructura de los alcaloides diénicos (Chawla *et al.*, 1985)

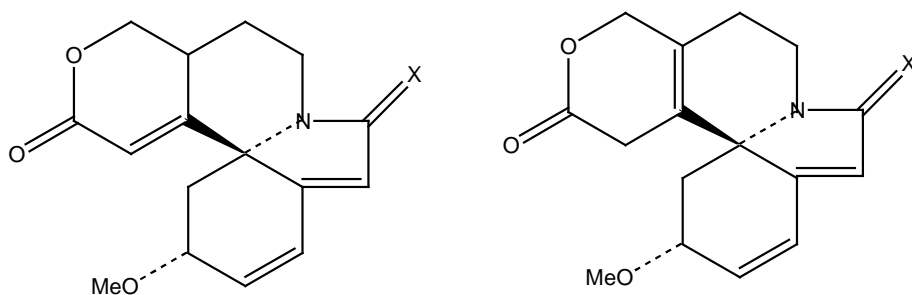
Los alcaloides alquénicos tienen una insaturación 1, 2 en el anillo A (Fig.7)



Alcaloide	R1	R2	R3	R4
Eritratidina	Me	Me	OH	H
Erisotina	H	Me	OH	H
11-metoxietitratidina	Me	Me	OH	OMe

Figura 7. Estructura de los alcaloides alquénicos (Chawla *et al.*, 1985)

Los alcaloides lactónicos tienen, como su nombre lo indica, una lactona en lugar del anillo aromático (Fig. 8)



α -eritroidina (X=H₂)

8-oxo- α -eritroidina

β -eritroidina (X=H₂)

8-oxo- β -eritroidina (X=O)

Figura 8. Estructura de los alcaloides lactónicos (Chawla *et al.*, 1985)

Las técnicas más empleadas para el análisis de los extractos de alcaloides son la cromatografía de gases (CG)/espectrometría de masas (EM), con la cual se han identificado un máximo de 8 alcaloides por especie, además de la separación de isómeros como erisodina y erisovina; y CLAR (cromatografía de líquidos de alta resolución)/EM con la que ha sido posible detectar alcaloides que no es posible identificarlos por CG/EM (Soto, 1989; Payne, 1991).

Boar y Widdowson (1970), determinaron las estructuras de varios alcaloides del género *Erythrina* mediante la técnica analítica de Espectrometría de Masas, se determinó el peso molecular y también el perfil de fragmentación de los diferentes tipos de alcaloides.

Los alcaloides diénicos presentan el patrón de fragmentación más simple. En la Figura 9 se muestra la pérdida de un sustituyente alílico (R_3O) en el carbono tres (C-3), de esta manera es posible diferenciar los isómeros en una mezcla como es el caso de erisolina que se diferencia de erisodina y erisovina; más no sucede así para estos dos últimos isómeros, en los que la única diferencia radica en la posición de los sustituyentes del anillo D, por lo que se requiere de la Resonancia Magnética Nuclear ($RMN-^1H$) para determinar los desplazamientos químicos de los hidrógenos de los radicales metóxilo ($-CH_3O$) e hidroxilo ($-OH$), sustituyentes del anillo aromático (Jackson, 1985; Dike y Quessy, 1981).

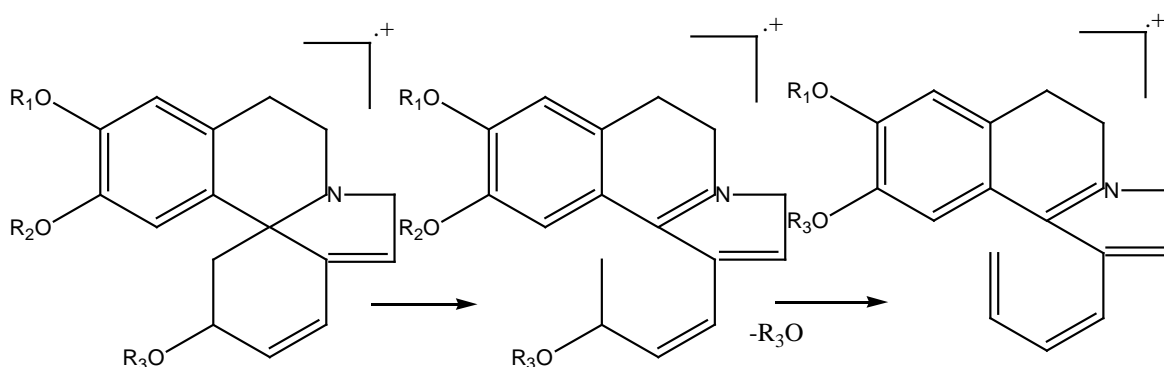


Figura 9. Patrón de fragmentación de los alcaloides diénicos (Jackson, 1985; Dike y Quessy, 1981)

En cuanto a los alcaloides alquénicos, se observa un patrón de fragmentación más complejo en los que se pueden apreciar dos tipos de fragmentación: a) en la que se puede

perder radicales como $-\text{CH}_3$, $-\text{OH}$ y $-\text{O}$ mediante una reacción retro Dies-Alder, y b) en la que se pierde la unidad de los carbonos dos (C-2) y tres (C-3) del anillo A (Fig. 10).

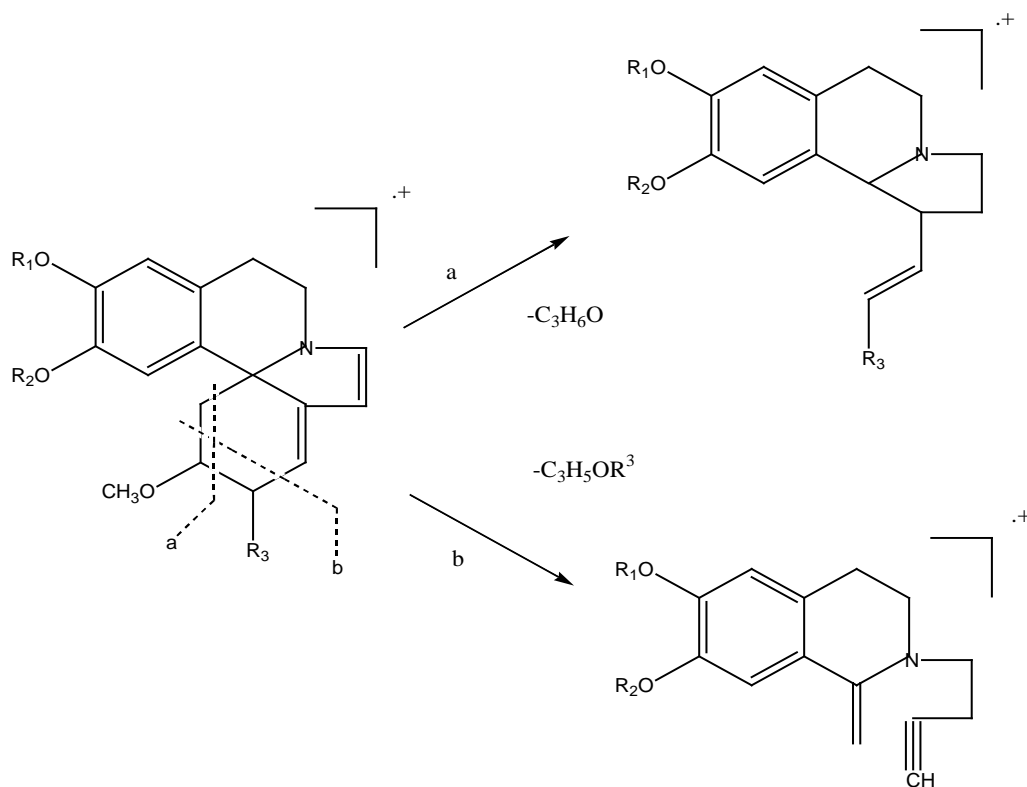


Figura 10. Patrón de fragmentación de los alcaloides alquénicos (Boar y Widdowson, 1970; Dike y Quessy, 1981; Jackson, 1985)

Los alcaloides lactónicos α - y β -eritroidina presentan un patrón de fragmentación similar a los alcaloides diénicos, aunque la α -eritroidina produce un trimetilsililderivado de su respectivo enol, lo cual permite la identificación de ambos isómeros (Fig. 11).

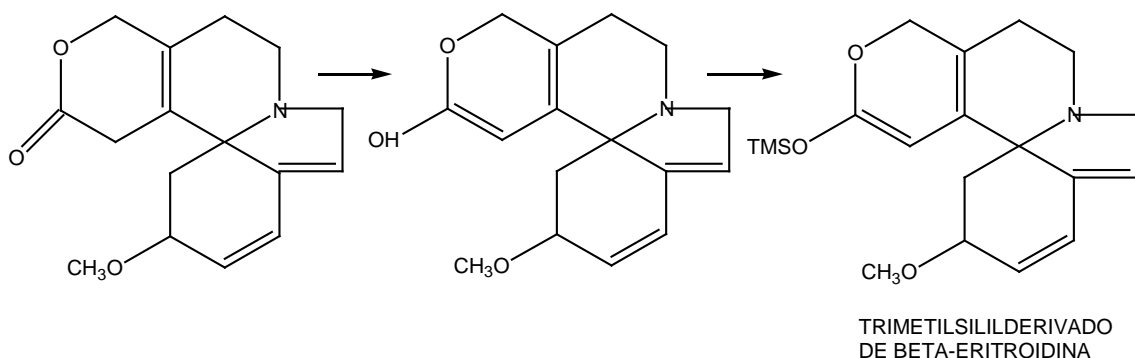


Figura 11. Formación de trimetilsililderivado de β -eritroidina, determinado por espectrometría de masas (Soto, 1989)

Carmack *et al.* (1951) determinaron por primera vez que el esqueleto de los alcaloides de *Erythrina* estaba formado por una espiroamina tetracíclica. Más tarde se determinó la presencia de dos tipos de alcaloides, los cuales se diferenciaban en el anillo D, unos con una lactona y otros con un anillo bencénico. Siete años después se confirmó la estructura de los alcaloides aromáticos de *Erythrina*, lo cual se determinó una vez que se había establecido la posición del radical metóxilo ($-\text{CH}_3\text{O}$) sustituyente del carbono 3 (C-3) y su configuración “cis” con respecto al átomo de N en la molécula de hidrobromuro de eritralina, gracias a la técnica analítica de difracción de Rayos X. Tal hallazgo fue de suma importancia, ya que se tomó la eritralina como modelo para elucidar la estructura de los demás alcaloides (Nowacki y Bonsma, 1958).

Hanson (1963) reveló la configuración 3R y 5S de la α - y β -eritroidina. A partir de este hallazgo se comenzó a determinar la estructura del resto de los alcaloides por comparación de sus constantes espectroscópicas y estereoquímica mediante la técnica de dispersión de rayos X con la de los estudios previos.

Soto (1989) reporta que la conformación de los alcaloides de *Erythrina* es la requerida para establecer una interacción entre los alcaloides de tipo antagonista nicotínico y el receptor nicotina-acetilcolina; tal conclusión se deriva de la estereoquímica de los alcaloides, determinada por el análisis por Cristalografía de Rayos X. Las técnicas analíticas posibilitan elucidar nuevas estructuras y de esta manera correlacionar la actividad biológica de tales compuestos.

4.7 Biosíntesis

Barton y Cohen (1957) propusieron la primera ruta biosintética para los alcaloides de *Erythrina*.

En la biosíntesis ocurre un acoplamiento fenólico-oxidativo del precursor (S)-N-norprotosinomenina conducente a la apertura del anillo, seguido de la reducción de la imina generada, produciéndose de esta manera el intermediario dibenzanonina. Posteriormente, se oxida la dibenzanonina a difenoquinona, seguido de un ataque intramolecular del nitrógeno que da lugar a la formación de erisodienona. Finalmente, la reducción del doble enlace y del radical cetona da origen a un compuesto alquénico, el cual por eliminación 1,4 de una molécula de agua produce un alcaloide tipo diénico (Fig. 12).

Por otro lado, se ha demostrado que únicamente la (-)-erisodienona, que contiene el centro quiral (5S) de los alcaloides naturales, es un precursor de la eritralina y de la α - y β -eritroidina (Chawla y Kapoor, 1995).

La ruta biosintética que da lugar a la formación de los alcaloides diénicos: erisodina, erisovina, erisopina, entre otros, así como, eritratina (VIII) y eritralina (VI) tienen como precursor a la erisotina (VII) que es un alcaloide alquénico, (Fig. 14) (Barton *et al.* 1966) (Fig. 13)

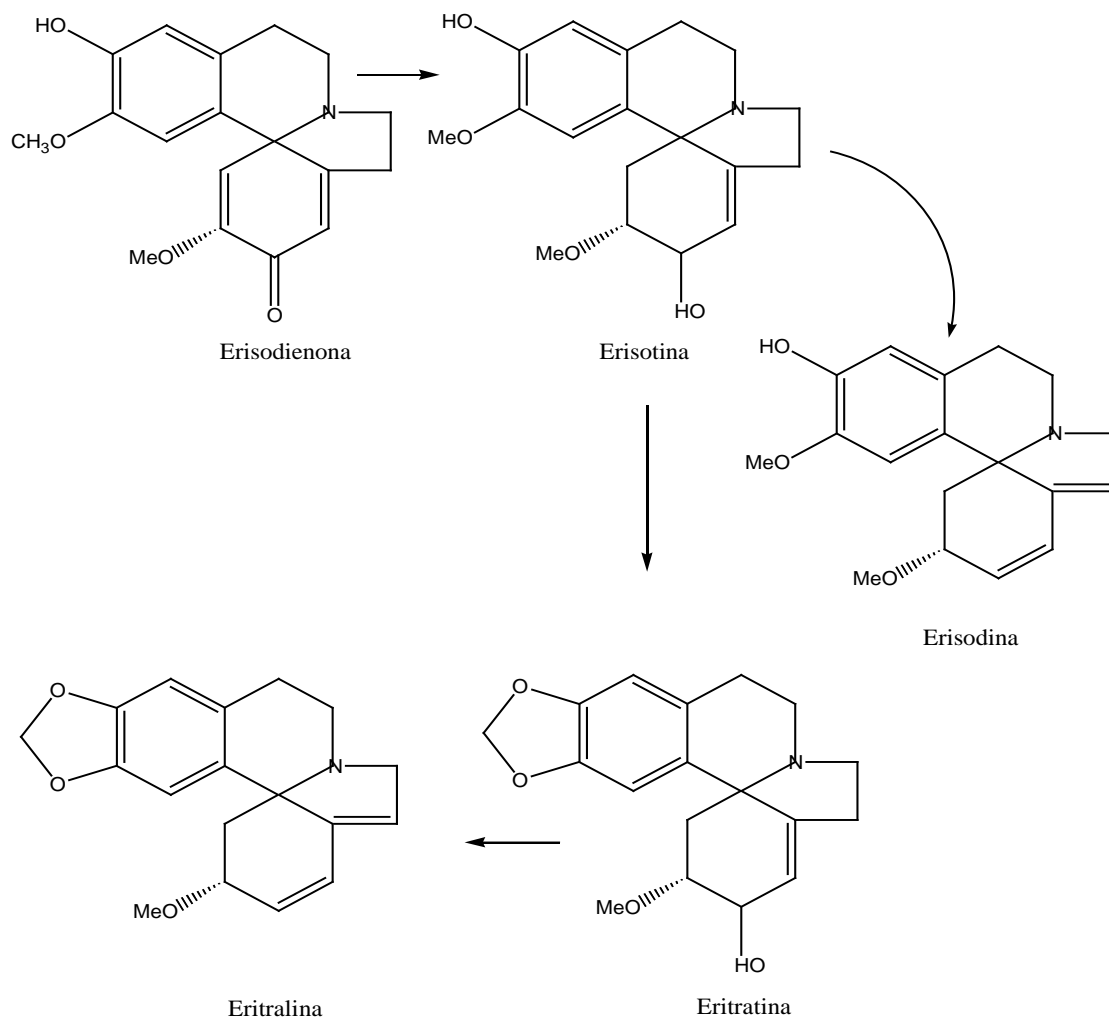


Figura 13. Ruta de biosíntesis de los alcaloides diénicos de *Erythrina* (Soto, 1989).

Otros estudios han determinado que los alcaloides aromáticos de *Erythrina* son los precursores de los alcaloides lactónicos (Fig. 14)

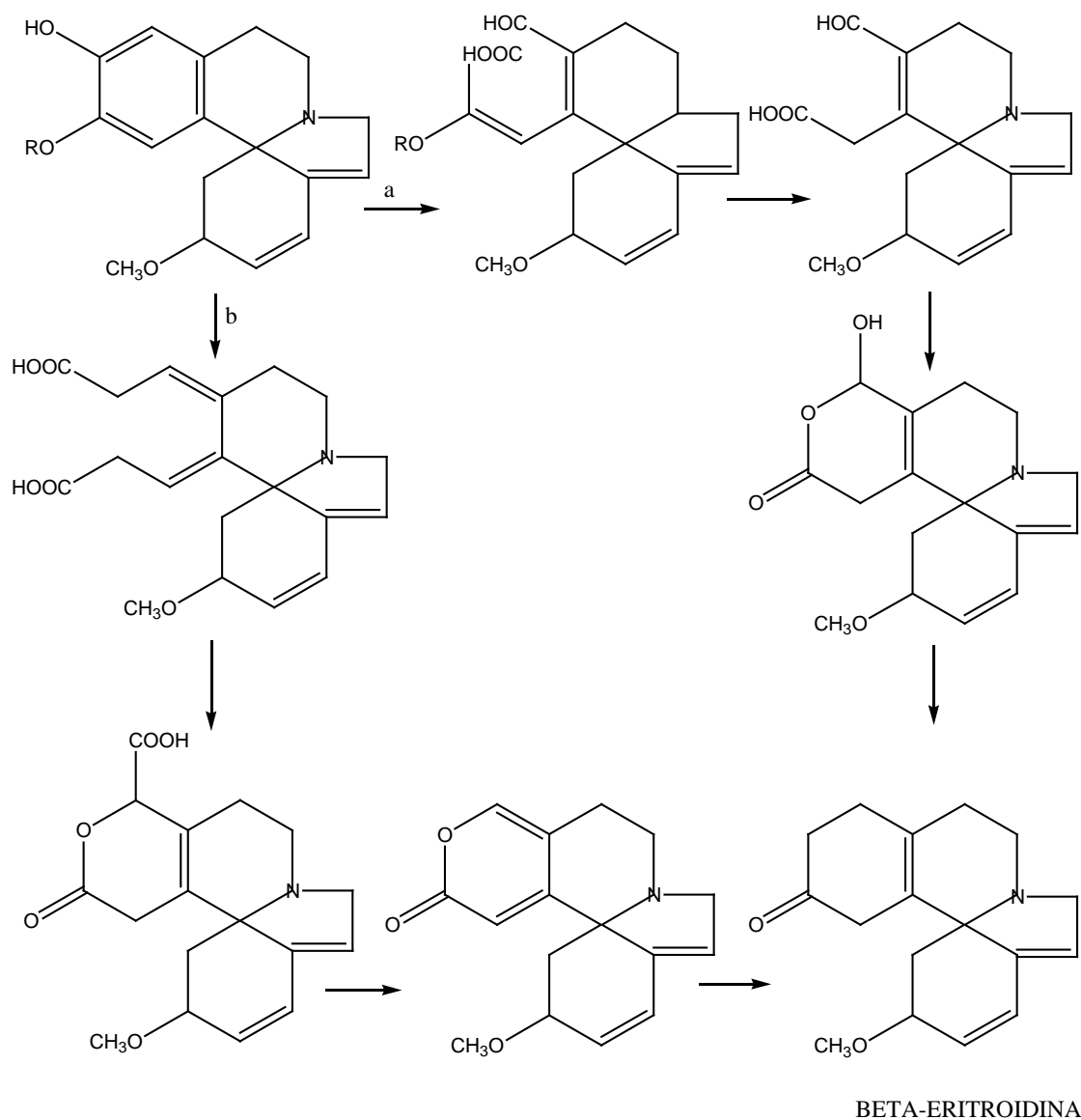


Figura 14. Ruta de biosíntesis de los alcaloides lactónicos de *Erythrina* (Soto, 1989)

Reimann (2007) menciona una reinvestigación llevada a cabo para la biosíntesis de alcaloides de *Erythrina*, debido al relativo pequeño índice de incorporación (0.1-0.25%) de norprotosinomenina (Fig 15) en el alcaloide eritralina, y principalmente, el hecho que la mayoría de los importantes alcaloides isoquinolínicos, por ejemplo, protoberberinas, aporfina, bisbenzylisoquinolinas, morfina, pavin, y benzofenantridina, son biosintéticamente derivados de (S)-reticulina (NCH₃ en lugar de NH). Así, en investigaciones detalladas se ha mostrado inequívocamente que (S)-norreticulina, de hecho, es también el más importante precursor biosintético de los alcaloides eritranos, y su

índice de incorporación excede por mucho al mostrado al isomérico (S)-norprotosinomenina previamente encontrado (7.9% contra 0.25% en el caso de eritralina). Además, el último no fue convertido en alguno de los alcaloides concernientes en la investigación.

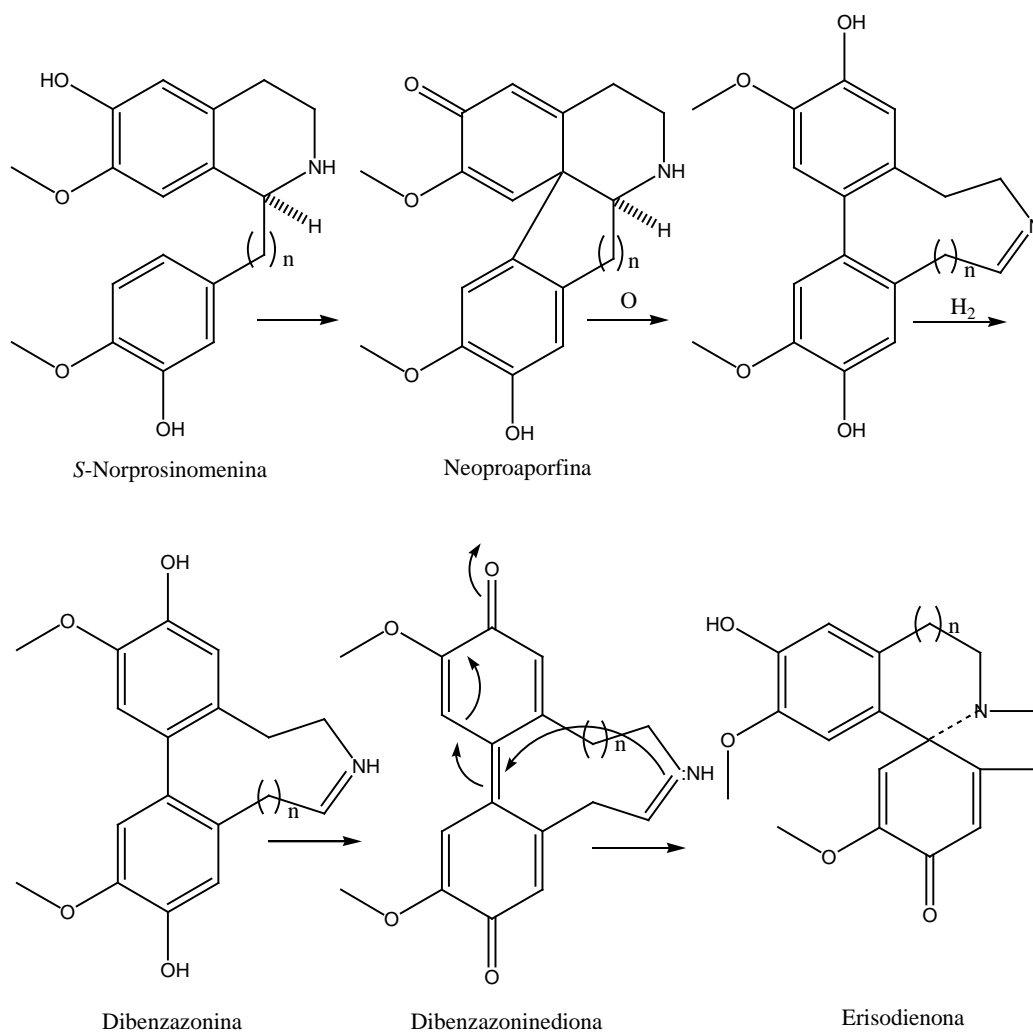


Figura 15. Biosíntesis de alcaloides eritranos de acuerdo a Barton *et al.* (Citado por Reimann, 2007)

Estos resultados requieren de una ruta alternativa y mecanismo para la biosíntesis de alcaloides eritranos descritos en la Figura 16.

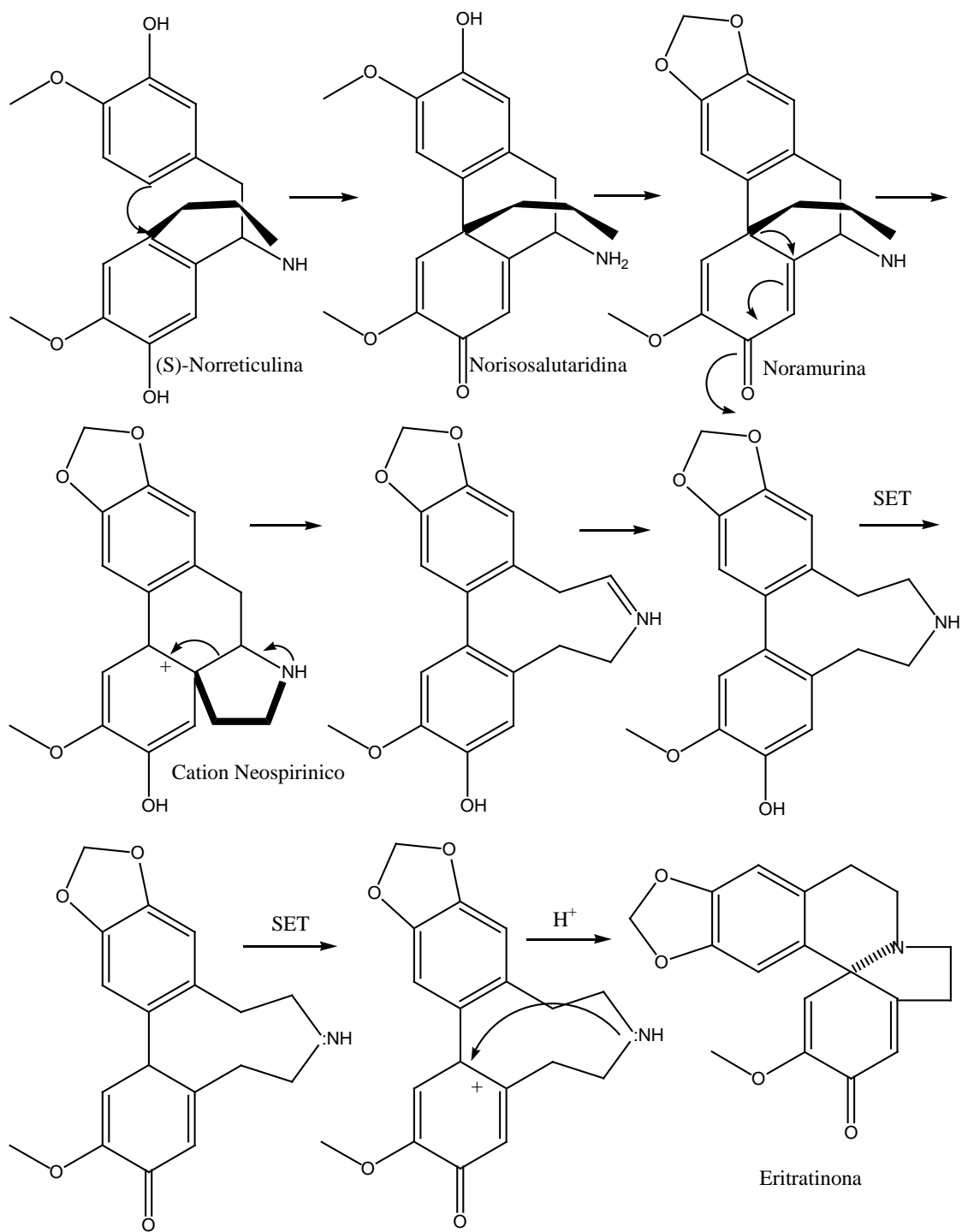


Figura 16. Nueva secuencia biosintética de alcaloides eritranos propuesto por Zenk *et al.* (Citado por Reimann, 2007)

De acuerdo al modelo de reacción en esta ruta, el acoplamiento inicial para-para fenol de (S)-norreticulina debe conducir en forma distinta de la ruta previa al derivado

morfínandienona norisosalutaridina en vez que al derivado neoproaporfina. El último, después de la generación de la función benzo[1,3]dioxol dando noramurina, puede reordenar vía el ion neospirínico al asimétrico dibenzazonina. La oxidación en la unidad libre fenólica procede a través de un mecanismo de transferencia individual de electrón (SET por sus siglas en inglés) puede proporcionar el catión dialílico, el cual se supone que reacciona con el átomo de nitrógeno para generar Δ^3 -eritratina. Un intermediario simétrico del tipo difenoquinona previamente postulado puede ser excluido basado en el uso de precursores isotópicos marcados con C^{13} . Así, por ejemplo usando (S)-[1- ^{13}C]-norreticulina enriquecido con C^{13} debería ocurrir en el C10 además en el C8 del alcaloide eritranano aislado. Sin embargo, el enriquecimiento ha sido observado exclusivamente en el C10. Los pasos subsecuentes conducentes a eritralina son similares a aquellos ya establecidos.

4.8 Antioxidantes

Son sustancias sintéticas o naturales añadidas a productos para prevenir o retardar su deterioro por acción del oxígeno del aire. En bioquímica y medicina, los antioxidantes son enzimas u otras sustancias orgánicas, tales como vitamina E y β -caroteno, que son capaces de contrarrestar el efecto dañino de oxidación en tejidos animales (Huang *et al.*, 2005). Halliwell (1990), define a un antioxidante como una sustancia que está presente en baja concentración, en comparación con la de un sustrato oxidable, y retrasa o previene su oxidación significativamente. Los antioxidantes juegan un papel importante como factores de protección de moléculas involucradas en la salud (Prakash, 2001). La oxidación también es uno de los más importantes procesos en el deterioro de alimentos porque pueden afectar su calidad, color, sabor y textura en alimentos (Sánchez *et al.*, 1998).

Actualmente hay un incremento en el interés sobre los antioxidantes, particularmente en aquellos que intentan prevenir el efecto nocivo de radicales libres en el cuerpo humano, y con ello prevenir el deterioro de grasas y otros constituyentes de alimentos (Molyneux, 2004). Los compuestos antioxidantes al retardar o inhibir la degradación oxidativa de las moléculas orgánicas, ayudan a prevenir la formación de colores y olores desagradables (Vásquez *et al.*, 2007), utilizando su principal característica, la habilidad para atrapar radicales libres (Prakash, 2001). Los antioxidantes alimentarios

pueden rebuscar y atrapar especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno para detener las reacciones en cadena de los radicales, o pueden prevenir que los oxidantes se formen (Huang *et al.*, 2005). Por estos aspectos se ha incrementado el interés en la función de los radicales libres como causa de enfermedades y daños en la industria alimentaria.

Los radicales libres inducen daño oxidativo a biomoléculas (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos) que causan arterioesclerosis, envejecimiento, cáncer y otras enfermedades en humanos (Soler *et al.*, 2000; Bafna y Mishra, 2005; Pineda *et al.*, 1999). Estudios actuales sugieren la existencia de seis especies reactivas de oxígeno (ROS) que causan daño oxidativo al cuerpo humano: anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales peróxilo (ROO^\cdot), radical hidróxilo (HO^\cdot), oxígeno (O_2) y peroxinitrito ($ONOO^\cdot$) (Huang *et al.*, 2005). Las ROS, formadas por el metabolismo como intermediarios parcialmente reducidos, son especies moleculares activadas, dotadas de un electrón desapareado (radical libre) en un nivel energético superior y, por lo tanto, dotadas de propiedades paramagnéticas que les confieren una alta e indiscriminada actividad (González y Muñiz, 2001; citado por Mosquera *et al.*, 2005). Para contrarrestar el ataque de las ROS, las células vivas tienen un sistema de defensa biológico compuesto de antioxidantes enzimáticos que convierten las ROS/RNS a especies inofensivas (Huang *et al.*, 2005; Pietta, 2000), pero también obtienen antioxidantes exógenos (de la dieta) (Pietta, 2000).

Para tratar de aumentar la protección en contra de las ROS, se han realizado estudios *in vitro* con resultados positivos, pero pocos han sido los experimentos sobre sistemas *in vivo*, los cuales arrojarían resultados más cercanos a los seres vivos. Alcaloides de *Bocconia arborea* (Papaveraceae) se evaluaron como protectores de la peroxidación de lípidos en microsomas de células de hígado de rata, el cual es un sistema modelo que simula mejor las condiciones *in vivo*; los alcaloides fueron eficaces en la producción de peróxido antilipídico (Pérez *et al.*, 2003).

4.9 Método DPPH

Un método sencillo, fácil y rápido de llevar a cabo, desarrollado para determinar actividad antioxidante de alimentos y compuestos secundarios utiliza al radical estable 2,2-

difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) (Brand-Williams *et al.*, 1995; Bondet *et al.*, 1997; Prakash, 2001). No obstante su sencillez se deben tomar en cuenta algunas precauciones cuando se utiliza dicho método y en la interpretación de datos (Brand-Williams *et al.*, 1995; Bondet *et al.*, 1997). En interacción con DPPH, los antioxidantes transfieren electrones o átomos de hidrógeno a este compuesto y así neutralizan su propiedad de radical libre (Naik *et al.*, 2003). Es evidente que la interacción de un antioxidante potencial con DPPH depende de su conformación estructural. La característica de la reacción es un efecto decolorante sobre el DPPH de azul-violeta a amarillo (Brand-Williams *et al.*, 1995). La concentración utilizada del DPPH varía de acuerdo con el método, ya que existen versiones modificadas. Con la técnica de Brands-Williams (base de varios métodos), la concentración inicial del DPPH en metanol se controla para cada repetición de una curva calibrada hecha por medición de la absorbancia a 515 nm de soluciones estándar de DPPH a diferentes concentraciones; se determina la ecuación de la curva, luego se mide la absorbancia de la reacción de los compuestos a evaluar como antioxidantes (a diferentes concentraciones) a la misma longitud de onda, después de 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Con la ecuación de la curva se determina el porcentaje de DPPH inhibido. Una inhibición de por lo menos 50% de la concentración de DPPH representa buena actividad antioxidante. Con el método del DPPH, la eficiencia antioxidante es medida a temperatura ambiente y así se elimina el riesgo de degradación termal de las moléculas examinadas (Lamaison *et al.*, 1990). En algunas modificaciones al método del DPPH de Brands-Williams, hay variación en la longitud de onda utilizada para medir la reacción y, en ocasiones, en la concentración inicial del radical libre; además, se evalúa el comportamiento cinético en diferentes intervalos de tiempo de la interacción del radical libre con la sustancia antioxidante. Jiménez *et al.* (2000) evaluaron la reacción a 580 nm e intervalos de tiempo de 15 segundos. Ciertos compuestos reaccionan muy rápido con el DPPH reduciendo el número de grupos hidroxilo disponibles (Brand-Williams *et al.*, 1995).

4.10 Metabolitos secundarios con actividad antioxidante

Se ha estudiado, a través del tiempo, el papel de metabolitos secundarios en aspectos farmacológicos y nutricionales; la actividad antioxidante es un asunto también importante. Flavonoides y algunos otros compuestos fenólicos, alcaloides, aceites esenciales, terpenos, etc. son ejemplo de compuestos con propiedad antirradical y son, por lo regular, objeto de estudio.

Los flavonoides, compuestos polifenólicos distribuidos en frutas y vegetales, pueden comportarse como antioxidantes y prooxidantes, dependiendo de las condiciones del ensayo, la concentración efectiva que se alcance en el sitio donde la ROS se forma, la estabilidad del radical del flavonoide formado al donar un átomo de hidrógeno al radical atacante, la lipofilidad para ser captados por la membrana y el pH del medio (Pérez, 2003). La mayoría de los efectos benéficos en la salud de los flavonoides son atribuidos a su habilidad antioxidante y quelante (Heim *et al.*, 2002). Los polifenoles son efectivos donadores de hidrógenos, particularmente los flavonoides; su potencial antioxidante es dependiente del número y de la posición de los grupos hidroxilos y su conjugación, así como de la presencia de electrones donadores en el anillo estructural (Miller and Evans, 1997). En los últimos años, se han publicado estudios sobre la actividad antioxidante *in vitro* de flavonoides, además de la correlación entre la capacidad antioxidante y su estructura química (Fig. 17) (Heim *et al.*, 2002; Pietta, 2000). Sin embargo, la eficacia antioxidante *in vivo* de flavonoides se ha estudiado menos a fondo, posiblemente debido al limitado conocimiento sobre su farmacocinética (Pietta, 2000).

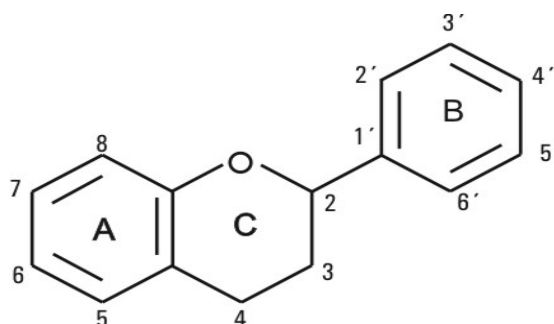


Figura 17. Estructura nuclear de los flavonoides. Los flavonoides alimenticios son diversos y varían de acuerdo con el modelo de hidroxilación, conjugación entre los anillos aromáticos, grupos glucosídicos y grupos metoxilo. La polimerización de esta estructura nuclear produce taninos y otras especies complejas presentes en vino rojo, uvas y té negro (Cook *et al.*, 1996; citado por Heim *et al.*, 2002).

Flavonoides del tallo de orégano (*Lippia graveolens* var. *Berlandieri* Schauer) presentaron efecto antioxidante; el extracto de acetato de etilo tuvo un efecto notable. Los compuestos identificados fueron el flavonol kaempferol y dos flavonas metoxiladas (isokaempféridol y pilosina), por lo que esta especie vegetal es una fuente potencial de flavonoides que podría contribuir al desarrollo de nuevos compuestos con aplicaciones en agronomía y medicina (Soto *et al.*, 2007).

Varios tipos de flavonoides mostraron actividad sobre el DPPH; entre las flavonas, la baicalina, obtenida de *Scutellaria baicalensis* mostró el mayor efecto (IC_{50} de 15.5 μM); el flavonol más potente fue la quercetina de *Sophora japonica* (IC_{50} de 8.9 μM), por arriba de rutina (IC_{50} de 11.1 μM); la mayoría de flavanoles mostraron fuerte actividad, la galocatequina fue la mejor con IC_{50} de 6.9 μM , seguido de la procianidina C-1 y la procianidina A-2 (7.3 y 8.8 μM , respectivamente); isoflavonas, isoflavanonas, isoflavanos y flavonolignanos tuvieron bajo efecto sobre el radical DPPH. En general, la reducción de la actividad del DPPH de isoflavonoides fue más débil que las otras clases de flavonoides (Okawa *et al.*, 2001).

Existe una correlación significativa entre la actividad antioxidante y el contenido de antocianinas, como lo mostraron estudios sobre granos de maíz (Ruiz *et al.*, 2008) y en muestras de pulpa de uva siciliana (Amico *et al.*, 2008). La cantidad de compuestos fenólicos presentes en las estructuras vegetales influye en la actividad antioxidante

(Vázquez *et al.*, 2007; Ennajar *et al.*, 2009; Mkaddem *et al.*, 2009). Extractos de *Ilex kudingcha* poseen potente actividad antioxidante, la cual esta relacionada con el contenido de compuestos fenólicos, especialmente derivados del ácido cafeoilquínico (Liu *et al.*, 2009).

Compuestos aislados de corteza de tallo de *Erythrina latissima* E. Meyer (Fabaceae) mostraron débil propiedad secuestradora del radical DPPH: una isoflavona, un pterocarpano y una chalcona fueron los más activos (daidzeina [IC₅₀ de 380 µg mL⁻¹], faseolidina [IC₅₀ de 135 µg mL⁻¹] y 4',2',4'-trihidroxi-3'-γ,γ-dimetilalilchalcona [IC₅₀ de 160 µg mL⁻¹], respectivamente) (Chacha *et al.*, 2005).

Extractos de hojas de *Vitex negundo* contienen compuestos antioxidantes, los cuales pueden ser efectivos atrapadores de especies oxigénicas reactivas; las hojas contienen compuestos polifenólicos, terpenoides, iridoides glicosídicos y alcaloides (Tiwari and Tripathi, 2007).

Extractos etanólicos de *Salvia aratocensis*, *Bidens reptans* y *S. sochensis* (EC₅₀ de 0.0011, 0.0016 y 0.0019 kg extracto/mmol DPPH, respectivamente) poseen capacidad análoga de capturar al radical DPPH y muy superior al extracto etanólico de *Montanoa ovalifolia* (EC₅₀ de 0.0073 kg extracto/mmol DPPH). El contenido total de fenoles de las plantas está relacionado con la capacidad antioxidante (0.31, 0.40, 0.17 y 0.13 mg fenoles/100 mg planta). Los extractos de *Salvia aratocensis* y *Bidens reptans* presentaron la mayor capacidad de capturar al radical DPPH y tuvieron el mayor contenido total de fenoles (Vásquez *et al.*, 2007).

Otro tipo de compuestos provenientes del metabolismo secundario vegetal son los aceites esenciales, fracciones líquidas volátiles, destilables por arrastre de vapor de agua, que contienen sustancias responsables del aroma de la plantas. Son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes: compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos. Tienen importancia en la industria cosmética, de alimentos y farmacéutica.

Se estudió la capacidad antioxidante de aceites esenciales de *Mentha longifolia* L. y *M. viridis*, a través de los métodos: catión radical 2,2-azinoBis-3-etilbenzotiazolina-6-

sulfonato (ABTS) y del radical DPPH. Se obtuvo una moderada actividad antioxidante para atrapar al catión radical ABTS. El aceite esencial de *M. longifolia* fue menos activo que *M. viridis*. Por otra parte, la actividad del aceite esencial de *M. viridis* sobre el DPPH fue más importante que para *M. longifolia*, aunque menor que la actividad presentada sobre ABTS. El aceite esencial de *M. viridis* contiene más antioxidantes que el de *M. longifolia*; el porcentaje de fenólicos en *M. viridis* fue de 0.45% (dihidroeugenol y eugenol), relativamente superior que el aceite de *M. longifolia*, que tuvo 0.18% (dihidroeugenol) (Mkaddem *et al.*, 2009).

Aceites esenciales y extractos de hojas y bayas de *Juniperus phoenicea* L. se evaluaron como antioxidantes, a través del método del DPPH y del catión radical ABTS. Hubo baja actividad por parte del aceite esencial de hojas y bayas, lo cual se debió a la alta concentración de terpenos hidrocarbonados. Para extractos, la actividad antioxidante de extracto metanólico de hojas fue superior que en todas las muestras examinadas, seguido por el extracto etanólico de hojas. Por otro lado, los extractos de acetato de etilo y diclorometano exhibieron moderada actividad. Para bayas, la mayor actividad se detectó en el extracto de etanol, seguido por acetato de etilo y metanol, por lo que se deduce que el efecto antioxidante de hojas de *J. phoenicea* (aceite esencial y extractos) es mejor que el de las bayas. El extracto de hojas de metanol mostró actividad comparable con la vitamina C. Sin embargo, de acuerdo con el ensayo con ABTS, el aceite esencial de bayas tiene una actividad antioxidante más importante que las hojas, lo cual es opuesto con el ensayo DPPH. Esta importante actividad, comparada con otras muestras, se debió a la especificidad del catión radical ABTS. (Ennajjar *et al.*, 2009).

Debido a su gran diversidad estructural y sus propiedades farmacológicas, los alcaloides, son uno de los grupos más importantes entre las sustancias naturales con interés terapéutico, ecológico y en agricultura. Son sustancias orgánicas de origen natural, con carácter más o menos básico y de distribución restringida.

La actividad captadora de radicales libres de alcaloides con gran cantidad de sustituciones, como grupos hidroxilo aromáticos, acompañados de grupos alquílicos donadores de protones, hacen de este tipo de estructuras, moléculas promisorias para su

estudio en relación con su actividad antioxidante (Montoya *et al.*, 2004). Los alcaloides pueden actuar como antioxidantes, antirradicales y prooxidantes (Pérez *et al.*, 2003).

Se realizaron diversos estudios sobre el potencial antioxidante de alcaloides de origen vegetal. Los alcaloides benzofenantridínicos del extracto de metanol de la corteza de *Bocconia arborea* (Papaveraceae) presentaron efecto de captura del radical DPPH. Los alcaloides 6-acetonildihidroqueleritrina, queleritrina y dihidroqueleritrina tuvieron un efecto de barrido sobre dicho radical, manifestando 84.3 ± 2.6 , 80.2 ± 4.1 y $77.5 \pm 0.7\%$ de inhibición, respectivamente; sin embargo, fueron menos potentes que el antioxidante - tocoferol ($95.1 \pm 0.9\%$) (Pérez *et al.*, 2003).

El tallo de *Rollinia pittieri* Saff. (Annonaceae) aporta alcaloides con propiedad antirradical, la O-metil-moschatolina con núcleo oxoaportínico y la melosmina con núcleo 7,7-dimetil-1,2,3,9-tetrahidroraporfinico. El primero presentó débil capacidad para decolorar al DPPH. El segundo tuvo fuerte efecto de decoloración del radical con IC_{50} de $3.037 \pm 0.18 \mu\text{g mL}^{-1}$, cercano a lo presentado por el ácido ascórbico (control positivo) con IC_{50} de $1.584 \pm 0.053 \mu\text{g mL}^{-1}$ y 70 veces mayor que la del BHT (2-terbutilhidroxitolueno), con IC_{50} de $207.4 \mu\text{g mL}^{-1}$. La melosmina presenta en su estructura dos grupos hidróxilos, los cuales pueden ser responsables de la donación de átomos de hidrógeno necesarios para la actividad antioxidante, por otro lado, la ausencia de tales grupos en el primero podría explicar la pobre actividad observada (Montoya *et al.*, 2004).

Diversos usos medicinales tradicionales de *Erythrina* tienen bases bioquímicas, particularmente el uso de flores como sedantes e hipnóticos (García *et al.*, 2001). Alcaloides eritrianos de flores y vainas de *E. lysistemon* Hutch (Fabaceae) mostraron habilidad para atrapar al radical DPPH; de forma específica, (+)-erisovina y (+)-11- α -hidroxierisodina fueron los más activos espectrofotométricamente con valores de IC_{50} de 150 y $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ después de 30 minutos y 90 y $170 \mu\text{g mL}^{-1}$ luego de 4 horas de reacción, respectivamente, lo cual indica que son antioxidantes cinéticos lentos (Juma *et al.*, 2004).

De raíces de *Delphinium linearilobum* (Trautv.) N. Busch se aislaron alcaloides norditerpénicos, los cuales tuvieron alta actividad antioxidante en DPPH; tal efecto se incrementó conforme se aumentaba la dosis, tanto de los alcaloides como de los estándares

utilizados; además, decreció en el siguiente orden: -tocoferol, BHT, cochlearenina, browniina, lycocónica, linearilobina, cammaconina, talatizamina y 14-acetiltalalatzamina. Solo cochlearenina tuvo considerable actividad antioxidante, con $75.52 \pm 0.01\%$ de inhibición del DPPH (Kolak *et al.*, 2006).

Dos compuestos (alcaloides del carbazol) de oleoresina de hojas curry de *Murraya koenigii* Spreng. mostraron potencial antirradical. La koenigina mostró una inhibición de 91.6% sobre el DPPH (BHA mostró 95.6%), mientras que mahaninbina mostró solo 18.8% de actividad, todos a una concentración de 50 ppm. Esta propiedad se debió, aparentemente, a la habilidad de los compuestos para donar átomos de hidrógeno (Rao *et al.*, 2007).

La uña de gato (*Uncaria tomentosa*) contiene un alcaloide tipo oxindol heterohimbina llamado pterodina, el cual, en el ensayo con DPPH, demostró fuerte capacidad para atrapar a tal radical, con un porcentaje de inhibición de 98% a una concentración de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$. Pterodina tiene capacidad para inhibir daño al ADN, lo cual se relaciona con su capacidad antioxidante (Paniagua *et al.*, 2009).

En *Coptis chinensis*, berberrubina mostró potente actividad rebuscadora de H, seguido por coptisina, berberina y palmatina; la característica estructural de los alcaloides tipo isoquinolina puede ser útil para el entendimiento y desarrollo de nuevos antioxidantes (Jang *et al.*, 2009).

V.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material vegetal

5.1.1 Semillas de *E. americana*

Se trabajó con semillas de *E. americana* Miller recolectadas en los jardines de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México en Octubre de 2008.

5.2 Fitoquímica

5.2.1 Extracción de alcaloides de *E. americana* Miller

5.2.1.1 Alcaloides libres

Para este fin se siguieron los métodos descritos por Millington *et al.* (1974) y Games *et al.* (1974) que a continuación se detallan:

Las semillas se trituraron mecánicamente en un molino tradicional, se obtuvo una muestra cuyo peso fue de 388 g. La muestra obtenida fue empacada en un cartucho hecho de papel filtro Whattman No. 42, el cual fue colocado en un extractor Soxhlet para llevar la muestra a reflujo en hexano por 32 horas a una temperatura de 68-70 °C. El extracto obtenido se procesó en el rotaevaporador BUCHI R-114 a presión reducida para separar y reciclar el hexano utilizado y obtener el extracto crudo hexánico. Posteriormente, el extracto crudo hexánico fue lavado con H₂SO₄ 1M (3x100) en un embudo de separación con el fin de solubilizar los alcaloides contenidos y a la vez separar la grasa la cual fue almacenada para posteriores estudios en alimentación animal. La fase ácida-acuosa obtenida se basificó con NaHCO₃ hasta alcanzar un pH de 8. Luego, se le dieron lavados consecutivos con diclorometano (3x50). Al extracto de diclorometano se le agregó Na₂SO₄ anhidro con el fin de absorber el agua presente. Luego con una decantación se separó el extracto y se procesó en el rotaevaporador con el fin de separar y reciclar el diclorometano utilizado y obtener la **fracción de alcaloides libres del extracto hexánico**.

Después de tratadas las semillas con hexano se dejaron a temperatura ambiente para eliminar residuos de hexano. Posteriormente fueron empacadas de nuevo y puestas a reflujo

en el equipo Soxhlet con metanol a una temperatura de 64 °C durante 48 horas. El extracto metanólico se puso en un rotaevaporador a presión reducida con el fin de obtener el extracto crudo en metanol. Al extracto se le agregó H₂SO₄ a 2% para acidificar. Posteriormente se hicieron lavados consecutivos con diclorometano (3x100). El extracto de diclorometano se desechó y la fase orgánica se basificó con NaHCO₃ hasta alcanzar un pH de 8. Se procedió enseguida a un segundo lavado con diclorometano (10x50) en un embudo de separación. Se obtuvieron dos extractos: la fase acuosa remanente del diclorometano y el extracto de diclorometano. Al extracto de diclorometano obtenido se le agregó Na₂SO₄ anhidro para absorber el agua presente, luego se decantó y se procesó en el rotaevaporador BUCHI a presión reducida para reciclar el diclorometano utilizado y obtener la *fracción de alcaloides libres del extracto en metanol*.

5.2.1.2 Alcaloides liberados

La fase acuosa remanente del diclorometano se llevó a pH 2 con HCl concentrado, luego ésta fase se llevó a reflujo durante 3 horas para que sufriera una hidrólisis a 60-70 °C. Luego de este proceso el extracto se basificó con NaHCO₃ a pH 8. Posteriormente, se le hicieron lavados consecutivos con diclorometano (9x50). El extracto de diclorometano obtenido se llevó al rotaevaporador para separar el diclorometano y obtener de esta manera la *fracción de alcaloides liberados del extracto en metanol*.

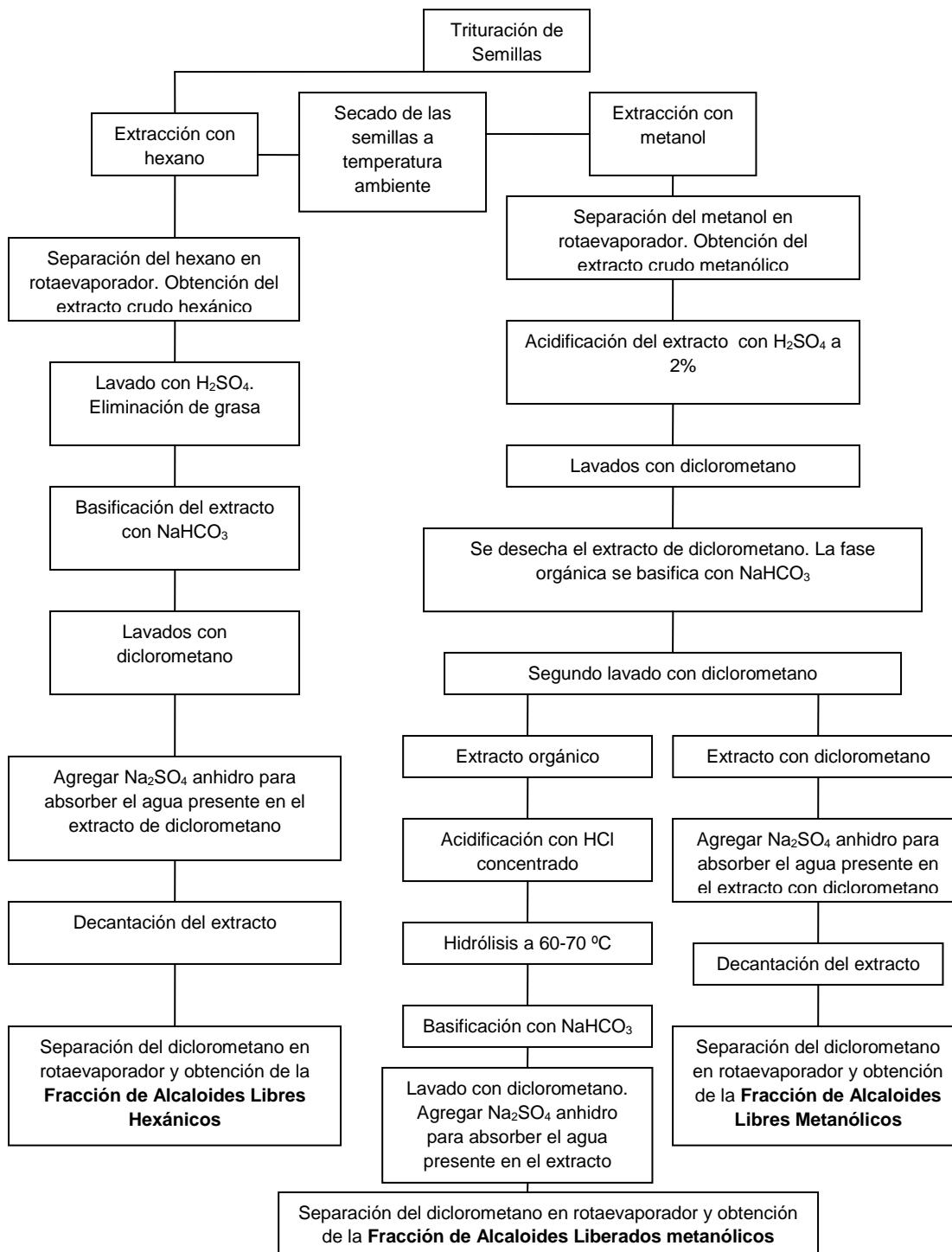


Figura 18. Metodología general para la extracción de alcaloides de *Erythrina americana* Miller (Millington *et al.*, 1974; Games *et al.* 1974).

5.3 Identificación preliminar por cromatografía en capa fina (CCF).

Los análisis cromatográficos cualitativos en capa fina (CCF) se desarrollaron siguiendo las técnicas convencionales, se emplearon placas de sílica-gel (Merck) de 2x5 cm, utilizando como eluyente una mezcla de diclorometano:etanol en una proporción 9:1, posteriormente, se observaron las placas con una lámpara de luz UV Cole-Parmer® 9818-series Darkrooms (254 nm onda corta y 365 nm onda larga), revelándolas después con el Reactivo de Dragendorff.

5.4 Separación y purificación de la fracción de alcaloides liberados

La fracción de alcaloides liberados del extracto metanólico se fraccionó por cromatografía en columna. Se utilizó una columna cromatográfica empacada con gel de sílice G 60 Merck; primero se preparó la muestra de alcaloides liberados diluyéndolos en diclorometano y se mezcló en 2 gramos de sílica gel hasta formar un polvo fino; como eluyente se utilizó una mezcla de diclorometano:metanol utilizando polaridades crecientes, desde 100:0 hasta 80:20. Se recolectaron fracciones de 5 mL cada una, las cuales se monitorearon por cromatografía de capa fina (CCF), de acuerdo con el método descrito anteriormente. Se combinaron aquellas fracciones cromatográficamente similares, se dejaron evaporar por unos días y se obtuvo su peso. Posteriormente, se determinó su punto de fusión con un aparato Electrothermal® y se le realizó una recristalización por par de disolventes: acetona caliente (mínimo volumen) y agregando éter de petróleo gota a gota (8), esto para aumentar su pureza.

Se realizó una segunda columna cromatográfica para la separación y mayor purificación de los alcaloides presentes en la fracción de alcaloides liberados, esto a través del fraccionamiento donde el eluyente inicial fue cloroformo, para terminar con una mezcla de cloroformo:metanol 95:5. Se recolectaron fracciones de 2 mL en tubos de fondo plano y se dejaron evaporar a temperatura ambiente, se iban monitoreando por CCF y combinando las similares. Luego se midió el punto de fusión en un aparato Electrothermal®. A los cristales del compuesto obtenido se les tomó una fotografía por microscopía electrónica de barrido para observar su aspecto superficial.

5.5 Caracterización química de erisodina

Una parte de los cristales obtenidos se caracterizó por medio de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN-¹H) en un espectrómetro Bruker-360 de 360 MHz.

5.6 Determinación de actividad antioxidante de alcaloides de *Erythrina americana* Miller

La actividad antioxidante de los diferentes alcaloides se evaluó mediante el método del radical libre DPPH, como se describe en Amico *et al.* (2006), Liu *et al.* (2008), Kubola y Siriamornpun (2008) y Brand-Williams *et al.* (1995). Dicho radical tiene un electrón desapareado y presenta un color azul-violeta el cual cambia a amarillo pálido en presencia de una sustancia antioxidante, se midió ésta reacción en un espectrofotómetro marca Pye Unicam SP 8-100 a 517 nm.

Ensayo DPPH. Se preparó una solución metanólica de DPPH 0.1 mM. La absorbancia inicial del DPPH en metanol se midió a 517 nm y no hubo cambios durante el ensayo con las muestras. Se construyó gráficamente una curva patrón a partir de la medición de la absorbancia del radical DPPH a diferentes concentraciones DPPH (0.1, 0.08, 0.06, 0.04, 0.02, 0.01 y 0 milimolar [mM]), después, una alícuota de 1 mL de cada tratamiento (en diferentes concentraciones utilizadas) se agregó a 3 mL de solución metanólica 0.1 mM de DPPH. La reacción fue medida a 517 nm después de una incubación por 30 minutos a 30°C en oscuridad. A partir de la ecuación de la curva se determinó la concentración a la cual se redujo el DPPH. Las mediciones fueron llevadas a cabo por triplicado. El porcentaje de DPPH inhibido (%DPPH) se calculó usando la ecuación:

$$\%DPPH_{\text{inhibido}} = (A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}) \times 100 / A_{\text{control}}$$

donde A_{control} es la absorbancia del control, y A_{muestra} es la absorbancia de la muestra. Los valores de CI_{50} se calcularon graficando el porcentaje de inhibición y las concentraciones de los tratamientos. Este valor denota la concentración requerida de un tratamiento para inhibir la concentración inicial del DPPH a 50% a una absorbancia de 517 nm.

5.7 Diseño experimental

Se construyó la ecuación de la curva a partir de la medición de la absorbancia del radical DPPH a diferentes concentraciones DPPH (0.1, 0.08, 0.06, 0.04, 0.02, 0.01 y 0 milimolar [mM]), después se midió la absorbancia de la reacción entre los tratamientos y el radical DPPH y a partir de la ecuación de la curva se determinó la concentración a la cual se redujo el DPPH. Se determinó el % de inhibición sobre el radical DPPH y gráficamente la Concentración Inhibitoria 50 (CI₅₀). Los resultados fueron expresados como media ± desviación estándar.

Se utilizó un diseño completamente al azar con las CI₅₀^s de los 5 tratamientos. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento.

Para determinar diferencias entre tratamientos se realizó un ANOVA con el sistema SAS para Windows 9.0, una transformación a rangos (Conover and Iman, 1981) para el cumplimiento de los supuestos, así como la comparación de medias Ryan-Einot-Gabriel-Welsh (REGWQ).

VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Obtención de fracciones crudas de alcaloides

Se trabajó con 388 g de semillas trituradas y pulverizadas de *E. americana*, esta especie ha sido una de las más estudiadas por su alto contenido de alcaloides en semillas y su actividad farmacológica (Aguilar *et al.*, 1981; Soto y Jackson, 1994).

Los extractos crudos hexánicos y metanólicos se obtuvieron por extracción en Soxhlet. De acuerdo a Téllez (2006) el extracto crudo metanólico es el que ofrece mayor rendimiento en comparación con el hexánico. Se obtuvieron 57.2 g de extracto crudo hexánico y 102.4 g de extracto crudo metanólico, lo cual representa el 14.4% y 26.4% con respecto al peso de las semillas, respectivamente; lo anterior es consistente con lo reportado por García *et al.* (2004), que obtuvieron 63.1 g de extracto crudo hexánico y 62.3 g de extracto crudo metanólico, lo que representa el 13.9% y 13.8% con respecto al peso de semillas que utilizaron (451g).

En el Cuadro 2 se presenta la cantidad de fracciones crudas obtenidas a partir de los extractos crudos de semillas de *E. americana*.

Cuadro 2. Cantidad de fracciones crudas de alcaloides

Fracción cruda de alcaloides	Peso (g)	Rendimiento con respecto a la muestra (%)
Libres hexánicos	0.026	0.006
Libres metanólicos	6.5424	1.68
Liberados	1.4418	0.37

Las cantidades y rendimientos anteriores de fracciones crudas son comparables con los obtenidos por Ibarra (2008) a partir de 1248 g de semillas, cuyos datos se presentan en el Anexo A.

Las distintas fracciones de alcaloides monitoreados por cromatografía en capa fina (CCF) se muestran en las Figuras 19, 20 y 21.

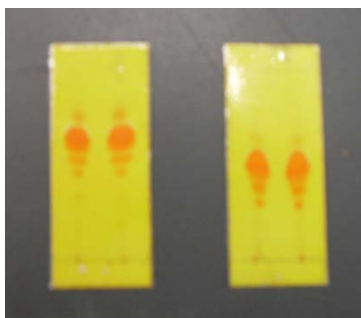


Figura 19. CCF fracción de alcaloides libres hexánicos revelados con reactivo de Drangendorff



Figura 20. CCF fracción de alcaloides libres metanólicos revelados con reactivo de Drangendorff



Figura 21. CCF fracción de alcaloides liberados revelados con reactivo de Drangendorff

Los alcaloides “libres” son aquellos que se encuentran en las semillas como bases libres, mientras que aquellos en la fracción de alcaloides “liberados” ocurren como glicósidos y fueron analizados después de una hidrólisis ácida (Chawla *et al.*, 1985). Para *E. americana*, Sotelo *et al.* (1993), reportan 0.13% de fracción de alcaloides liberados y 0.4% de alcaloides libres, en este caso se presentó un rendimiento superior con respecto a la cantidad de muestra utilizada (Cuadro 3). Por otra parte, Garín *et al.* (2000) reportaron un rendimiento de 0.224% de fracción de alcaloides liberados de semillas de *E. americana*, lo cual corresponde con lo obtenido en este estudio. El rendimiento total de fracciones libres de los extractos que se obtuvo fue de 1.686% (libres hexánicos y libres metanólicos), lo cual es superior a lo reportado por Garín *et al.* (2001) con un rendimiento de 0.2235% para la fracción de alcaloides libres de semillas de *E. herbacea*. Analizando la fracción de alcaloides libres hexánicos individualmente, Garín *et al.* (2000) obtuvieron un rendimiento de 0.068%, lo cual es mayor a lo obtenido en esta extracción, 0.006%, cabe mencionar que esta fracción es la que generalmente presenta menos rendimiento en comparación con la fracción de alcaloides libres metanólicos y liberados.

Cuadro 3. Ocurrencia de fracciones crudas de alcaloides en semillas de diversas especies de *Erythrina*

Especie	Fracción alcaloides libres (%)	Fracción alcaloides liberados (%)	Referencia
<i>E. brucei</i>	0.19	0.78	Chawla <i>et al.</i> (1985)
<i>E. cochleata</i>	0.21	0.41	
<i>E. tholloniana</i>	0.67	0.21	
<i>E. caribea</i>	0.33	0.55	
<i>E. fusca</i>	0.4	0.35	
<i>E. costaricensis</i>	0.56	0.67	Soto y Jackson (1994)
<i>E. leptorhiza</i>	0.18	0.35	
<i>E. speciosa</i>	0.20	0.84	
<i>E. variegata</i>	0.11	0.33	
<i>E. melanacantha</i>	0.19	0.24	
<i>E. berteroana</i>	0.24	0.55	
<i>E. breviflora</i>	0.54	0.23	Sotelo <i>et al.</i> (1993)
<i>E. americana</i>	0.4	0.13	
<i>E. abyssinica</i>		2.65	Folkers y Koniuszy (1940)
<i>E. americana</i>	0.11	0.31	
<i>E. flabelliformis</i>		2.50	
<i>E. sandwicensis</i>		2.12 y 1.60	
<i>E. americana</i>	0.068	0.279	Garín <i>et al.</i> (2000)
		0.224	

Las variaciones en los rendimientos de fracciones crudas presentados en las distintas especies puede deberse a diversos factores tales como el tipo de especie, variedad (Krukoff y Barneby, 1974), inicio de la floración, desarrollo y maduración del fruto (Robinson, 1979), el método de extracción empleado (Folkers y Koniuszy, 1940), así como el tiempo de cosecha de la semilla.

Como se puede observar en el Cuadro 3 la variación en el rendimiento de fracciones de alcaloides liberados en diversas especies es considerable, van desde 0.13% en *E. americana* (Sotelo *et al.*, 1993) hasta 2.65% en *E. abyssinica* (Folkers y Koniuszy, 1940), en el presente estudio se obtuvo un rendimiento de 0.37% de fracción de alcaloides liberados, lo cual se encuentra dentro de las variaciones mencionadas. Sin embargo, el rendimiento de la fracción libre (hexánica y metanólica=1.686%) difiere de todas las referencias mencionadas, siendo la fracción de *E. tholloniana* la que más se acerca con 0.67%.

García *et al.* (2004) obtuvieron 0.30 g por 100 g de muestra (peso seco) de la fracción de alcaloides libres del extracto crudo metanólico, que fue mayor al de las fracciones de alcaloides libres del extracto crudo hexánico y al de la fracción de alcaloides liberados del extracto metanólico: 0.04 y 0.05 g por 100 g de muestra (materia seca), respectivamente.

De acuerdo con García *et al.* (1998) las especies endémicas de México presentan alcaloides en diversas estructuras vegetales, presentándose la mayor cantidad en semillas y flores; erisodina se encontró en fracciones crudas de 5 especies estudiadas (Cuadro 4). En nuestro estudio erisodina se halló presente en la fracción de alcaloides liberados de semillas.

Cuadro 4. Presencia de erisodina en fracciones crudas de alcaloides de especies mexicanas de *Erythrina* (García *et al.*, 1998)

Especie	Estructura Vegetal	Concentración de alcaloides (mg/100 g de peso seco)
<i>E. americana</i>	Semillas	1.27
<i>E. coralloides</i>	Semillas	0.10
	Flores	0.61
	Corteza	0.24
<i>E. leptorhiza</i>	Semillas	0.44
<i>E. mexicana</i>	Semillas	0.13
	Hojas	0.40
<i>E. oaxacana</i>	-	-
<i>E. sousae</i>	Hojas	0.21

6.2 Separación y purificación de alcaloides por cromatografía en columna

Después de la realización de la primer columna cromatográfica se obtuvieron 34.9 mg de un compuesto con aspecto de polvo café y amorfo, se le midió el punto de fusión dando 148 °C, lo que no correspondió con lo reportado por la literatura para erisodina, que es de 204-206 °C (Amer, 1991). Se procedió a purificar por medio de recristalización con acetona caliente y éter de petróleo y se le midió el punto de fusión nuevamente dando como resultado 150 °C.

Se realizó una segunda columna cromatográfica a los 34.9 mg del compuesto obtenido en la primer columna en la que se utilizó cloroformo:metanol como eluyentes, se obtuvo un compuesto con dos aspectos diferentes, el primero con forma de agujas adheridas al tubo (2.2 mg) y el segundo era un polvo café amorfo (6.2 mg). Se les midió el punto de fusión a ambos tipos de compuestos, dando 152 °C y 150 °C, respectivamente, lo cual fue diferente a lo reportado en la literatura, como se mencionó anteriormente. La identidad del

compuesto se elucidó a través de un estudio de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN- H^1) de 360 MHz.

Al compuesto aislado y purificado se le realizó una placa de cromatografía para compararlo con un estándar de erisodina y con fracciones crudas de alcaloides. El compuesto aislado mostró un Rf similar al estándar y una intensidad de mancha prácticamente igual al del estándar, como se muestra en las siguientes figuras.

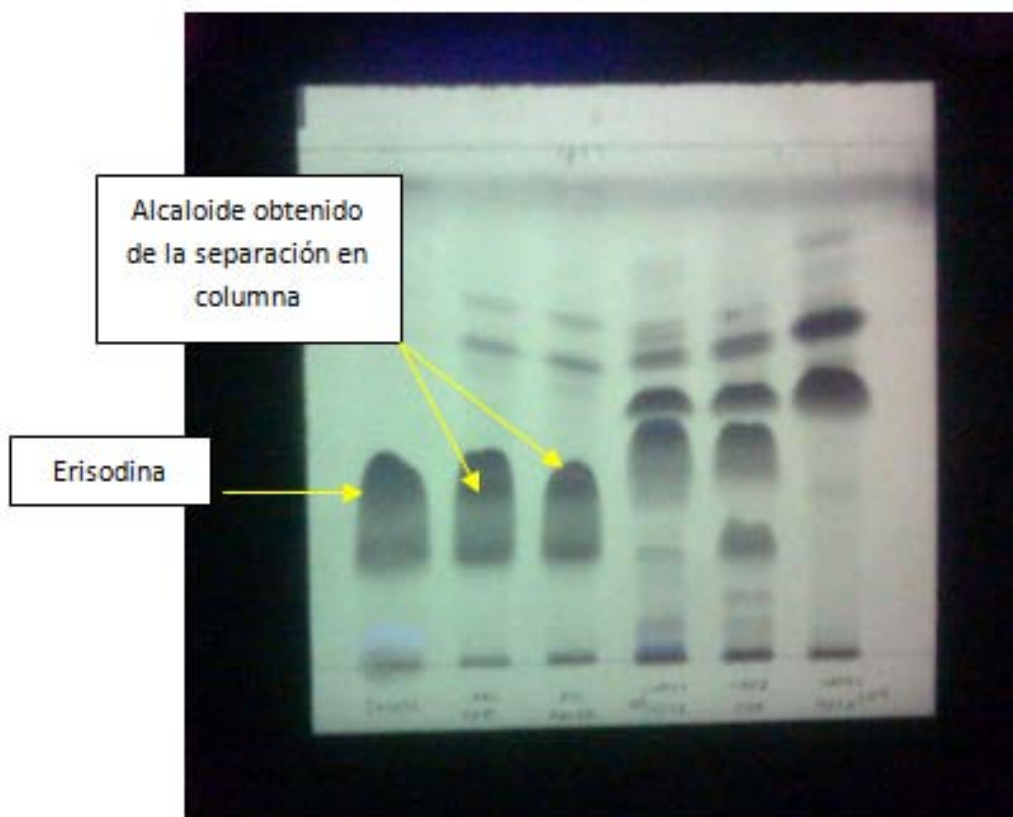


Figura 22. Placa en luz UV. Comparación entre los dos tipos de alcaloides obtenidos en cromatografía en columna con el estándar erisodina (Las tres últimas muestras son fracciones crudas de alcaloides).

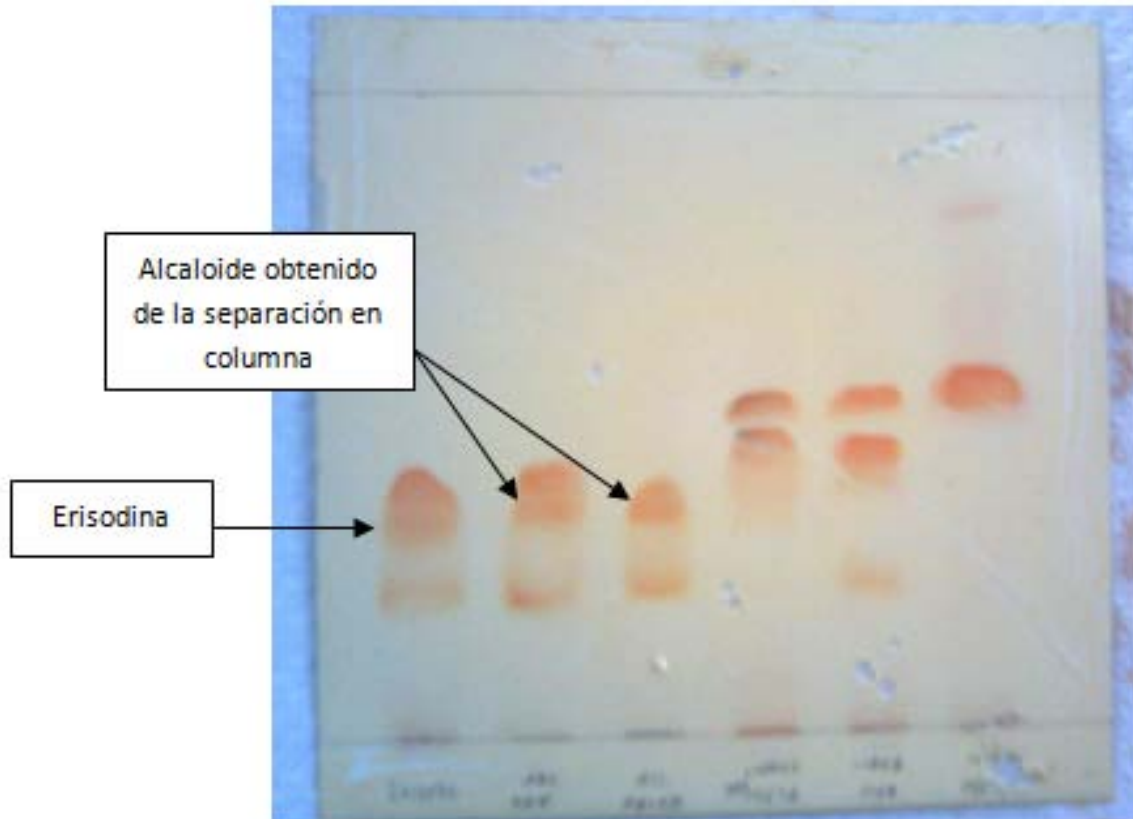


Figura 23. Placa revelada con reactivo de Dragendorff

En las imágenes 24 y 25 se observa el aspecto superficial del alcaloide obtenido, con este tipo de imágenes podemos apreciar la morfología y topografía de la muestra, la cual tiene aspecto de agujas sobrepuestas. También podemos observar las impurezas aun que contenía el alcaloide.

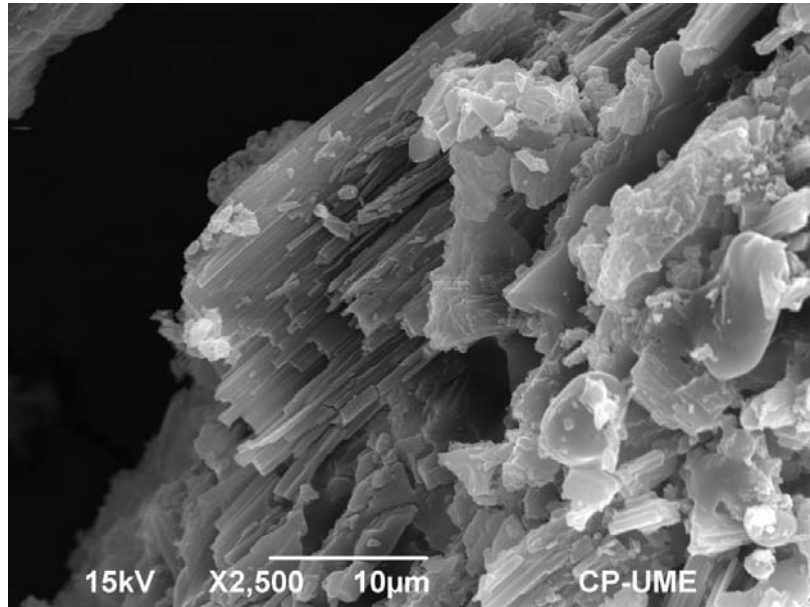


Figura 24. Imagen de Microscopía Electrónica de Barrido del alcaloide obtenido por cromatografía en columna (a)

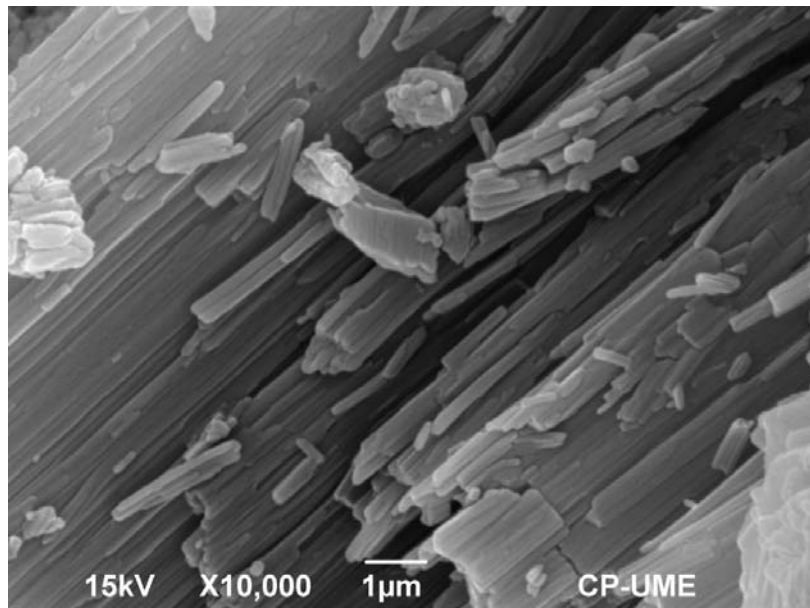


Figura 25. Imagen de Microscopía Electrónica de Barrido del alcaloide obtenido por cromatografía en columna (b)

6.3 Caracterización química de erisodina

El espectro de RMN-¹H ofrece una valiosa información sobre la conformación estructural y estereoquímica de erisodina, ya que da una amplia información del ambiente protónico. Para erisodina (Figura 26) se pueden distinguir los protones de los C-14 y C-17 de los anillos aromáticos. Dos dobletes desplazados a campo bajo que corresponden a los protones olefinicos 1-H y 2-H, en un δ de 6.04 y 6.58 respectivamente. El 7-H olefínico se observa como un singulete en un δ de 5.73. Los tres protones anteriores (1H, 2H y 7H) muestran el típico patrón de señales (llamado sistema ABX) en las regiones de campo bajo del espectro, característico de los alcaloides diénicos. La señal de 3-OCH₃ se localiza en la región de un δ =3.31 mientras que la de los protones del metoxilo arómatico 15 -OCH₃ se encuentran desplazados a campos más bajo. En el Cuadro 5 se presentan los desplazamientos químicos para erisodina.

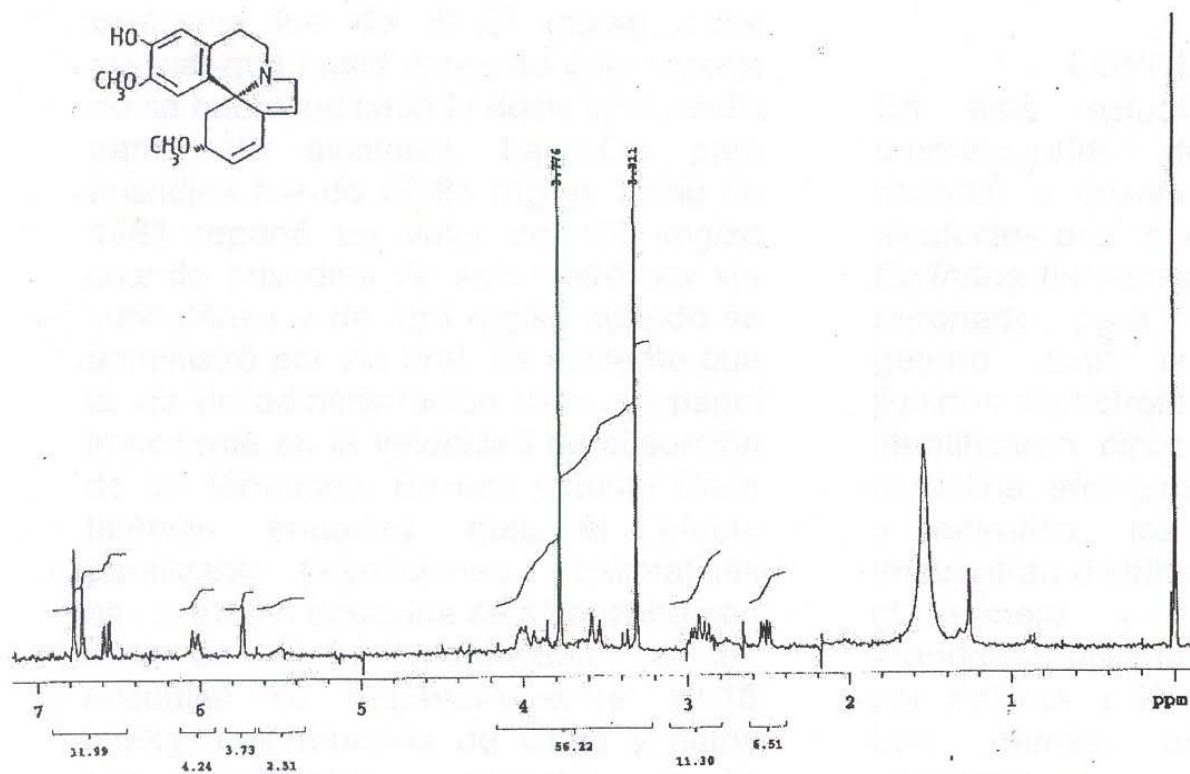


Figura 26. Espectro de RMN-¹H y fórmula desarrollada de erisodina

Cuadro 5. Desplazamientos químicos de erisodina

PROTONES	DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS (δ)
1H	6.04
2H	6.58
3Ha	4.01
4Ha	1.6
4He	2.5
7H	5.73
8H	3.38
8H	3.58
10Ha	2.93
10He	3.39
11Ha	2.89
11He	2.35
14H	6.77
17H	6.72
15OCH3	3.77
3OCH3	3.31

6.4 Actividad antioxidante

La actividad captadora de radicales libres de alcaloides con gran cantidad de sustituciones, tales como grupos hidroxilos aromáticos, acompañados de grupos alquílicos donadores de protones, hacen de este tipo de estructuras, moléculas promisorias para su estudio en relación a dicha actividad (Montoya *et al.*, 2004).

Se usó una solución metanólica del radical estable DPPH para determinar la actividad secuestradora de radicales de las fracciones crudas de alcaloides y del alcaloide erisodina. Este método presenta la ventaja de ser inalterado por ciertas reacciones como la quelación de iones metálicos y la inhibición enzimática provocadas por algunas sustancias

presentes en matrices complejas (Amarowicz *et al.*, 2004). En interacción con DPPH, los antioxidantes transfieren electrones o átomos de hidrógeno a dicho radical y así neutralizan su carácter de radical libre (Naik *et al.*, 2008 y Montoya *et al.*, 2004) y lo convierten al producto incoloro 2,2-difenil-1-hidrazina o análogos de hidrazina sustituidos (Montoya *et al.*, 2004). Cada vez más, la evidencia de una gran variedad de fuentes nos indica que los compuestos nitrogenados de plantas superiores incluyen diversos compuestos que son potentes inhibidores de varios procesos oxidativos, ya sea *in vivo* o *in vitro*, tal como los alcaloides (Larson, 1988). Los secuestradores de radicales son inhibidores de radicales libres y antioxidantes primarios (Rao *et al.*, 2007).

En el análisis de la varianza realizado para determinar diferencia entre los tratamientos evaluados (fracción de alcaloide libres hexánicos, fracción de alcaloides libres metanólicos, fracción de alcaloides liberados, erisodina y ácido ascórbico) se obtuvo un valor de $P < 0.0001$ (Cuadro 6) con lo cual se rechaza la $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5$ con un $\alpha = 0.05$ y se concluyó que existió diferencia entre tratamientos.

Cuadro 6. Tabla de ANOVA

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr > F
Tratamientos	4	1.0339	0.2585	25.93	<0.0001
Error	10	0.0997	0.0099		
Total	14	1.1337			

Se realizó la comparación de medias de REGWQ y en el Cuadro 7 se presentan las Concentraciones Inhibitorias 50 (CI₅₀) de fracciones crudas de alcaloides y del compuesto erisodina obtenidos de semillas de *E. americana*, además del control positivo ácido ascórbico, el cual es conocido por ser un potente antioxidante. Gráficamente se obtuvo la Concentración Inhibitoria 50 y sus porcentajes de inhibición sobre el DPPH para cada tratamiento.

Cuadro 7. Concentración Inhibitoria 50 de los tratamientos evaluados

Tratamiento	Concentración Inhibitoria 50 [CI₅₀] (mg mL⁻¹)	Desviación Estándar
Ácido Ascórbico	0.0068 a	0.0008
Erisodina	0.0212 a	0.0080
Fracción de alcaloides liberados	0.1593 b	0.0305
Fracción de alcaloides libres hexánicos	0.1791 b	0.0960
Fracción de alcaloides libres metanólicos	0.7243 c	0.1991

- Los valores son expresados como medias y desviación estándar. Medias con letras iguales no son significativamente diferentes (REGWQ, 0.05).

Erisodina, obtenida de la fracción de alcaloides liberados, mostró potencial antioxidante significativamente parecido al del control positivo ácido ascórbico. Las fracciones de alcaloides libres hexánicos y liberados mostraron similar inhibición sobre el radical DPPH, sin embargo, son significativamente diferentes al ácido ascórbico y a erisodina. La fracción de alcaloides libres metanólicos mostró una CI₅₀ alta para inhibir al radical estable DPPH (Fig. 27).

El alcaloide erisodina presentó alta inhibición sobre DPPH, ya que para reducir la concentración de este radical en por lo menos 50% (al reducir este porcentaje o más, se dice que es un buena sustancia antioxidante) se requiere una concentración de 0.0211 mg mL⁻¹ (21.1 µg mL⁻¹); este valor, es comparable estadísticamente con el control positivo ácido ascórbico 0.0067 mg mL⁻¹ (6.7 µg mL⁻¹), ambos mostraron potente actividad inhibitoria sobre el radical estable DPPH.

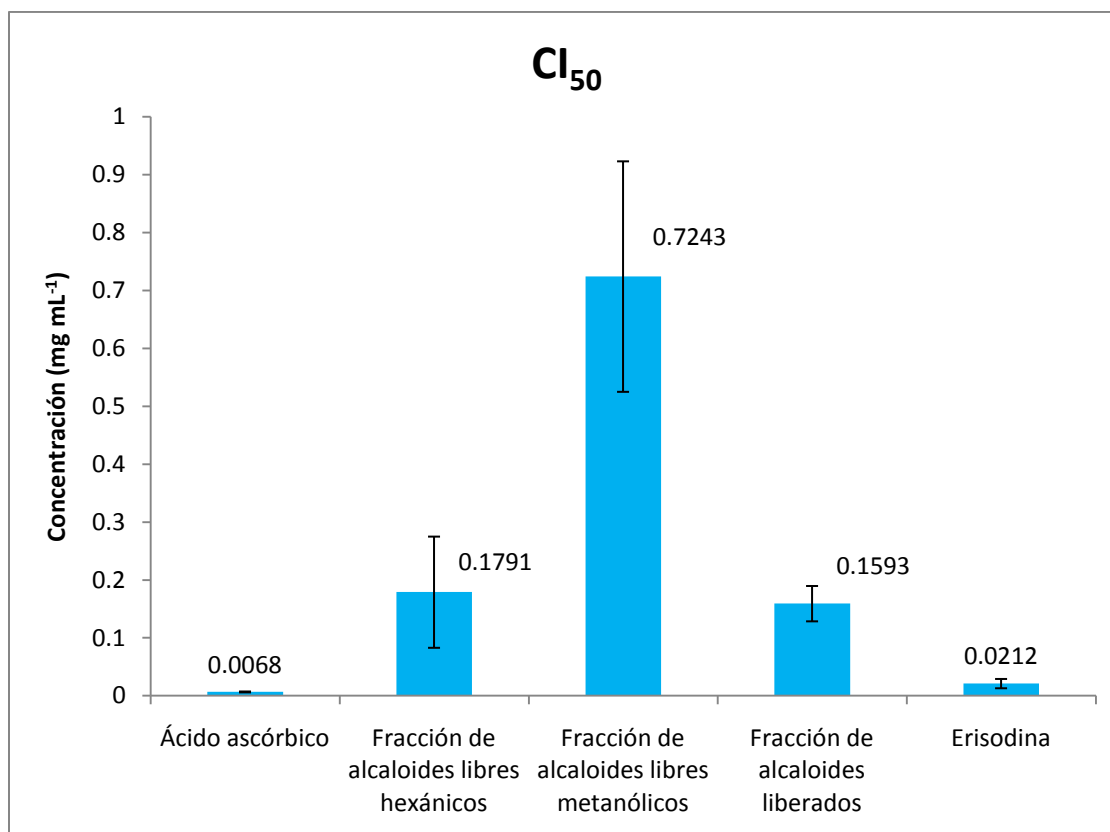


Figura 27. Concentraciones Inhibitorias 50 de los tratamientos sobre el radical DPPH. Medias con letras diferentes son significativamente diferentes en el nivel $P < 0.05$

La CI_{50} obtenida para erisodina en este estudio es menor a la reportada para este mismo compuesto pero extraído de *E. lysistemon*, con ésta última especie (+)-erisodina presentó una CI_{50} de $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ después de 30 minutos de reacción y $90 \mu\text{g mL}^{-1}$ después de 4 horas; así mismo, (+)-11 α -hidroxierisodina presentó una CI_{50} de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ a los 30 minutos de reacción y de $170 \mu\text{g mL}^{-1}$ a las 4 horas, sobre DPPH 0.5 mM (Juma and Majinda, 2004), a lo cual podría deberse la diferencia entre concentraciones inhibitorias entre ambos estudios con erisodina. De acuerdo a Brand Williams *et al.* (1995) estos alcaloides podrían clasificarse como antioxidantes cinéticos lentos, debido al cambio de valores de CI_{50} presentados hasta las 4 horas de reacción en comparación con la reacción dada a los 30 minutos.

Montoya *et al.* (2004) aislaron el alcaloide melosmina de *Rollinia pittieri* del cual se obtuvo una CI_{50} de $3.037 \pm 0.18 \mu\text{g mL}^{-1}$, lo cual es superior al resultado con erisodina ($21.1 \mu\text{g mL}^{-1}$), que a su vez es superior a O-metil-moschatolina de la misma especie, que no

mostró efecto significativo sobre DPPH. La melosmina presenta en su estructura dos grupos hidroxilos, los cuales pueden ser responsables de la donación de átomos de hidrógeno necesarios para la actividad antioxidante, así como erisodina presenta un grupo hidroxilo en su estructura, por otro lado, la ausencia de tales grupos en O-metil-moschatolina podría explicar su pobre actividad.

Las fracciones crudas de alcaloides también presentaron potencial antioxidante, aunque significativamente diferente a la presentada por erisodina y ácido ascórbico. La fracción de alcaloides liberados presentó la menor concentración para inhibir al radical DPPH ($0.1593 \text{ mg mL}^{-1}$ ó $159.3 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) y es significativamente parecida a la que presentó la fracción de alcaloides libres hexánicos ($0.1791 \text{ mg mL}^{-1}$ ó $179.1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$). La fracción de alcaloides libres metanólicos presentó una CI_{50} de $0.7243 \text{ mg mL}^{-1}$ ($724.3 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), la cual es la más alta para inhibir por lo menos el 50% la concentración original del DPPH, es estadísticamente diferente a la presentada por los demás tratamientos.

Comparando con otra especie de *Erythrina*, Chacha *et al.* (2005) estudiaron en *E. latissima* las propiedades antioxidantes de flavonoides extraídos de madera del tallo de esta especie, los mejores compuestos con potencial antioxidante fueron un pterocarpano ($135 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), una chalcona ($160 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) y una flavanona ($380 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), todos los anteriores con menor actividad antirradical que erisodina, pero similar a la presentada por las fracciones de alcaloides liberados y libres hexánicos en este estudio.

En la Figura 28 se muestra el valor de CI_{50} para cada uno de los tratamientos y los valores máximos y mínimos presentados en cada repetición. Se aprecia la poca variación que presentó el ácido ascórbico en sus valores; sin embargo, la fracción de alcaloides libres metanólicos presentó la mayor variación en sus valores de CI_{50} 's (Valor Máximo de $0.9442 \text{ mg mL}^{-1}$ -Valor Mínimo de $0.5563 \text{ mg mL}^{-1}$); también, la fracción de alcaloides libres hexánicos mostró alta variación entre las CI_{50} 's (Valor Máximo de 0.277 mg mL^{-1} - Valor mínimo de 0.085 mg mL^{-1}). Tales variaciones podrían deberse a la presencia de varios alcaloides en las fracciones crudas, García *et al.* (2000 y 2004) identificaron en la fracción de alcaloides libres hexánicos a los alcaloides lactónicos α - y β - eritroidina y al diénico erisovina, mientras que para la fracción de alcaloides libres metanólicos identificaron a los lactónicos α - y β - eritroidina.

Estas dos fracciones de alcaloides mencionados presentan CI_{50} significativamente diferentes a pesar de que ambas contienen a los alcaloides lactónicos, sin embargo, la fracción hexánica también contiene erisovina, al cual podría deberse la mayor actividad antioxidante, ya que este alcaloide, de acuerdo a García *et al.* (2000; 2004) e Ibarra *et al.* (2009), también está presente en la fracción de alcaloides liberados, ésta última fue la que presentó la mejor actividad antioxidante entre las fracciones crudas, significativamente parecida a la de la fracción de alcaloides libres hexánicos.

La fracción de alcaloides liberados presentó menor variación entre sus CI_{50} 's, en comparación con las otras fracciones, debido quizá a la presencia, principalmente de los dos alcaloides isómeros erisovina y erisodina, los cuáles pueden presentar un comportamiento similar; aunque en menor cantidad también se encuentra el alcaloide erisopina en esta fracción (García *et al.*, 2000 y 2004). El alcaloide erisodina presenta una ligera variación en sus concentraciones inhibitorias 50.

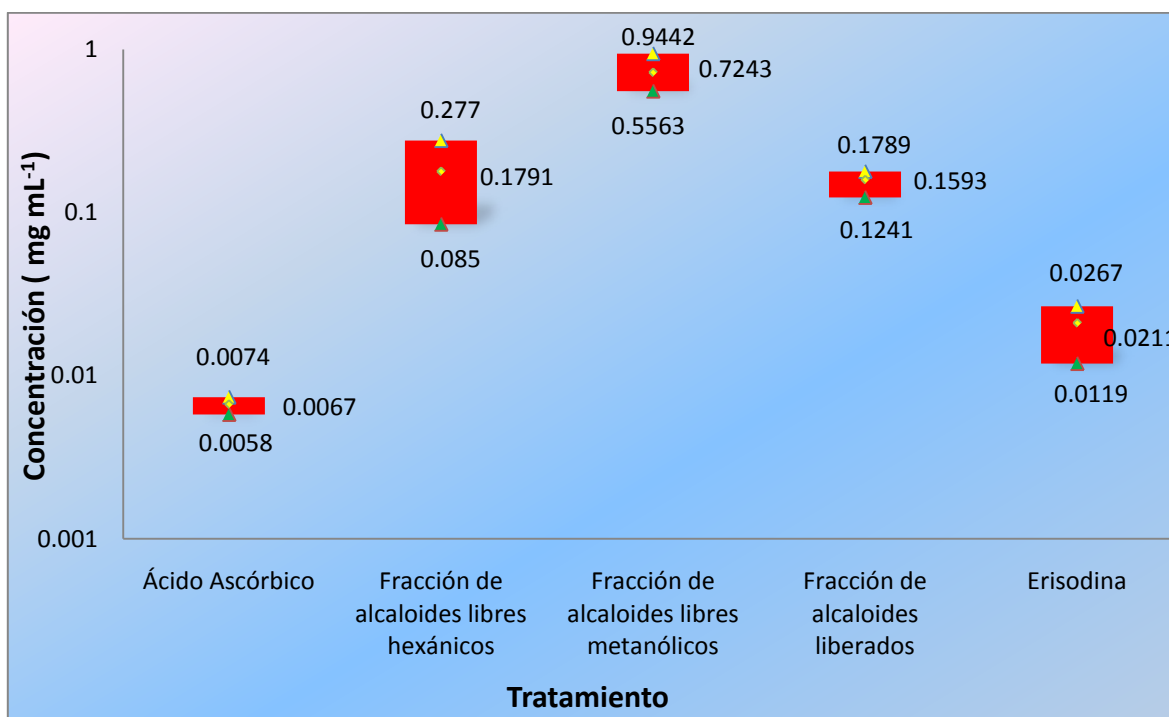


Figura 28. CI_{50} 's de los tratamientos y sus valores máximos y mínimos

Comparando los porcentajes de inhibición entre las fracciones crudas y el ácido ascórbico se aprecia que las fracciones de alcaloides libres hexánicos y liberados presentan

altos porcentajes de inhibición sobre el radical DPPH, sin embargo, las concentraciones de las fracciones crudas son mayores en comparación con las utilizadas con el ácido ascórbico. Con las tres fracciones crudas evaluadas se logró una inhibición de por lo menos 50% sobre el radical estable, aunque su potencial es diferente; esto nos indica que las fracciones crudas tienen propiedades antioxidantes, debido quizá a un efecto sinérgico entre los alcaloides presentes y algunos otros compuestos diferentes de las fracciones crudas, pero no comparables con el control positivo. Extracto de oleorresina de hojas del árbol del curry (*Murraya koenigii* Spreng.), el cual contiene alcaloides del carbazol, mostró una inhibición de 83.4 y 83.2% a 200 y 100 ppm, respectivamente (Rao *et al.*, 2007); en este estudio solo la fracción de alcaloides liberados presentó 82.19% de inhibición sobre DPPH a una concentración de 1 mg mL⁻¹ (1000 µg mL⁻¹), las demás fracciones presentaron niveles de inhibición más bajos en la mayor concentración evaluada, sin embargo, las tres fracciones tiene potencial antioxidante al superar el 50% de inhibición del radical DPPH (Figura 29).

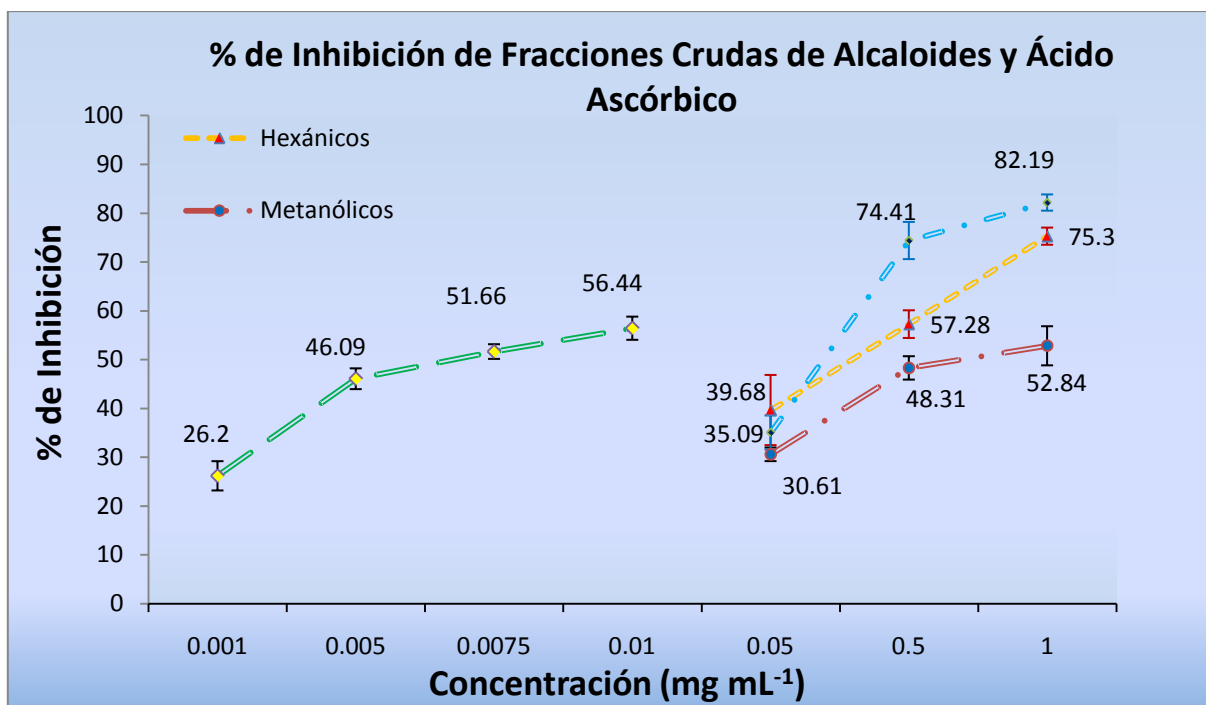


Figura 29. Porcentajes de inhibición de fracciones crudas de alcaloides y ácido ascórbico. Los valores se presentan como medias y desviación estándar.

La fracción alcaloidal del extracto metanólico de raíces de *Cissampelos pareria* Linn. presentó una CI_{50} de $63.44 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $66.39 \pm 2.05\%$ de inhibición sobre DPPH con una concentración de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, tal extracto contiene los alcaloides tetrandrina y berberina (Bafna y Mishra, 2010); las fracciones crudas de *E. americana* presentaron niveles de inhibición semejantes pero a una concentración de 0.5 mg mL^{-1} ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$).

En la Figura 30 se aprecia que erisodina, en la mínima concentración evaluada (0.05 mg mL^{-1}), logró inhibir más del 50% (54.91%) de la concentración del radical DPPH. En las demás concentraciones, alcanzó porcentajes de inhibición muy altos, y por lo tanto, su potencial antioxidante es elevado; con 0.5 mg mL^{-1} inhibió hasta $94.23\% \pm 1.4$ de la concentración de DPPH, incluso comparable con el alcaloide pterodina, alcaloide tipo oxindol aislado de uña de gato (*Uncaria tomentosa*), el cual presentó una inhibición el 98.26% con una concentración de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Paniagua *et al.*, 2009); erisodina a esta concentración inhibe alrededor el 90% del radical DPPH.

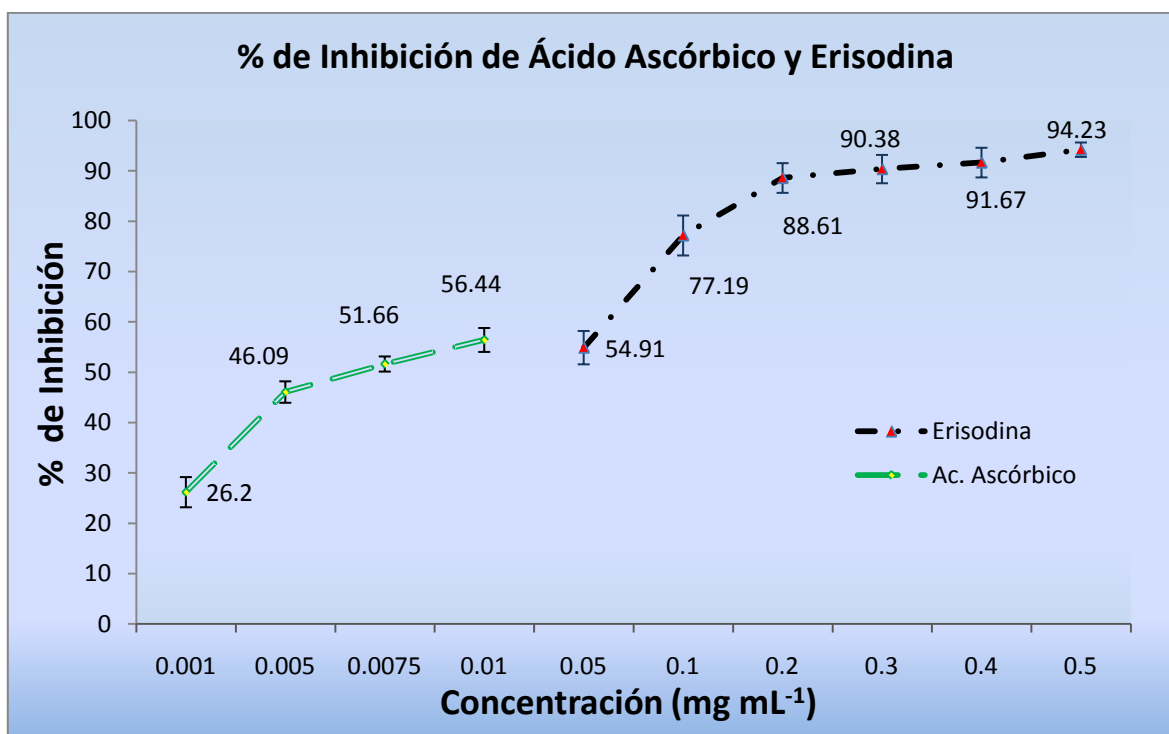


Figura 30. Porcentajes de inhibición de erisodina y ácido ascórbico. Los valores se presentan como medias y desviación estándar.

A una concentración de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ los alcaloides 6-acetonildihidroqueleritrina, queleritrina y dihidroqueleritrina, aislados del extracto de metanol de la corteza de *Bocconia arborea*, presentaron un porcentaje de barrido sobre DPPH de 84.3 ± 2.6 , 80.2 ± 4.1 y 77.5 ± 0.7 respectivamente (Pérez *et al.*, 2004) lo cual es similar a lo presentado por erisodina a esa concentración con $77.19\% \pm 3.9$; este último valor es ligeramente superior al que presentó el alcaloide tipo norditerpeno cochlearenina de raíces de *Delphinium linearilobum* que mostró un efecto inhibitorio de $75.52\% \pm 0.04$ sobre el radical DPPH a una concentración de $100 \mu\text{g}$, ligeramente inferior al presentado por erisodina a la misma concentración ($77.19\% \pm 3.9$); cochlearenina presenta en su estructura varios grupos hidroxilo, quizá, los responsables de la donación de átomos de hidrógeno hacia el DPPH (Kolak *et al.*, 2006).

Los alcaloides koenigina y mahinimbina extraídos de hojas del árbol del curry mostraron actividad antioxidante sobre DPPH, koenigina inhibió 91.6%, mientras que mahanimbina solo 18.8% a 50 ppm, el primero presenta en su estructura un grupo hidroxilo, al cual puede deberse el efecto antirradical, mientras que mahahimbina no presenta dicho grupo en su estructura, lo que parece indicar que la actividad secuestradora sobre el radical es debido a la habilidad para donar átomos de hidrógeno (Rao *et al.*, 2007); a una concentración similar erisodina inhibió 54.91% del radical.

Los resultados de este estudio sugieren que la eficiente habilidad para atrapar al radical DPPH por parte de erisodina podría relacionarse con la capacidad para inhibir daños al ADN, como lo demuestra el alcaloide pterodina en el ensayo con DPPH (Paniagua *et al.*, 2009).

Algunas especies de leguminosas (Fabaceae) usadas en medicina tradicional como *Acacia pennata*, *Bauhinia purpurea*, *Caesalpinia mimosoides*, *Cassia siamea*, *Leucanea leucocephala*, *Neptunia oleracea*, *Pueraria mirifica* y *Tamarindus indica* a partir de sus raíces, hojas y tallos, presentaron actividad antioxidante (Chanwitheesuk *et al.*, 2005), tal como en este estudio lo revela *E. americana*.

VII.- CONCLUSIONES

- La fracción de alcaloides libres metanólicos presentó mayor rendimiento con respecto a las fracciones de alcaloides libres hexánicos y liberados. Se confirma la presencia de alcaloides en semillas de *Erythrina americana*, que es la estructura vegetal que mayor concentración de alcaloides contiene de acuerdo a estudios anteriores.
- La fracción de alcaloides liberados presentó actividad antioxidante con una CI_{50} de $0.1593 \text{ mg mL}^{-1}$, significativamente parecida a la que presentó la fracción de alcaloides libres hexánicos con una CI_{50} de $0.1791 \text{ mg mL}^{-1}$, mientras que la fracción de alcaloides libres metanólicos fue la que menor actividad secuestradora del radical DPPH presentó con una CI_{50} de $0.7243 \text{ mg mL}^{-1}$, todas las fracciones fueron significativamente diferentes al ácido ascórbico y a erisodina.
- La fracción de alcaloides liberados inhibió 89.19% del radical DPPH con 1 mg mL^{-1} , la fracción de alcaloides libres hexánicos inhibió 75.3% a la misma concentración, con 52.84% los alcaloides libres metanólicos presentaron menor porcentaje de inhibición entre fracciones crudas.
- Erisodina presentó actividad antioxidante con una CI_{50} de $0.02119 \text{ mg mL}^{-1}$ significativamente parecida a la del ácido ascórbico con CI_{50} de $0.00676 \text{ mg mL}^{-1}$, por lo que se considera fuerte inhibidor del radical estable DPPH.
- Erisodina inhibió más de 50% de la concentración del radical DPPH en todas la concentraciones evaluadas, 54.91% con 0.05 mg mL^{-1} , 77.19% con 0.1 mg mL^{-1} , 88.61% con 0.2 mg mL^{-1} , 90.38% con 0.3 mg mL^{-1} , 91.67% con 0.4 mg mL^{-1} hasta 94.23% con 0.5 mg mL^{-1} .

- El uso del radical DPPH provee un método sencillo y rápido para evaluar la actividad antioxidante de compuestos bioactivos, principalmente con aquellos que tienen en su estructura grupos –OH.
- El presente estudio contribuye al conocimiento de la actividad antioxidante de los alcaloides del tipo eritriano y en particular del alcaloide erisodina.
- Los alcaloides presentes en semillas de *E. americana* presentaron efectos fisiológicos y propiedades farmacológicas a concentraciones bajas.

VIII.- LITERATURA CITADA

- Abdullah, M. I., I. E. Barakat, D. E. Games., P. Ludgate, V. G. Mavraganis, V. U. Ratnayake and A. H. Jackson. 1979. Studies of *Erythrina* alkaloids. Part III. G. C./M. S. Investigations of alkaloids in the seeds of a further fourteen species. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 66 (3):533-540.
- Aguilar, M. I., F. Giral, and O. Espejo. 1981. Alkaloids from the flowers of *Erythrina americana*. *Phytochemistry* 20:2061-2062.
- Amarowicz, R., R. B. Pegg, P. Rahimi M., B. Barl and J. A. Weil. 2004. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plants species from the Canadian prairies. *Food Chemistry* 84:551-562.
- Amer, M. E. 1991. The tetracyclic *Erythrina* alkaloids. *Journal of Natural Products* 54(2):329-363.
- Amico, V., R. Chillemi, S. Mangiafico, C. Spatafora and C. Tringali. 2008. Polyphenol-enriched fractions from Sicilian grape pomace: HPLC-DAD analysis and antioxidant activity. *Bioresource Technology* 99:5960-5966.
- Arango A., G. J. 2002. Alcaloides y compuestos nitrogenados. Tesis Doctoral. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquía, Medellín, Colombia. pp. 88.
- Atchison, E. 1947. Studies in the Leguminosae. I. Chromosome numbers in *Erythrina* L. *American Journal of Botany* 34 (8):407-414.
- Auró de Ocampo, A. y M. Jiménez. 1993. La herbolaria medicinal en el tratamiento de las enfermedades de los peces en México. *Vet. Méx.* 24 (4):291-295.
- Bafna, A. R. and S. H. Mishra. 2005. Actividad antioxidante *in vitro* del extracto de metanol de los rizomas de *Curculigo orchioides* Gaertn. *Ars. Pharmaceutica* 46:125-138.
- Bafna, A. and S. Mishra. 2010. Antioxidant and immunomodulatory activity of the alkaloidal fraction of *Cissampelos pareira* Linn. *Scientia Pharmaceutica* 78:21-31.

- Barton, D. H. R. and T. Cohen. 1957. Some biogenetic aspects of phenol oxidation. In: Festschrift Professor Dr. Arthur Stoll. Basel: Birkhäuser. pp. 117.
- Barton, D. H. R., R. James, G. W. Kirby, D. W. Turner, and D. A. Widdowson. 1966. The constitutions of erythraline and erysodine and biosynthesis of the *Erythrina* alkaloids. Chemical Communications:294-295.
- Barton, D. H. R., R. James, G. W. Kirby, D. W. Turner and D. A. Widdowson. 1968. Phenol oxidation and biosynthesis. Part XVIII. The structure and biosynthesis of *Erythrina* alkaloids. Journal of the Chemical Society C:1529-1537.
- Barton, D. H. R., C. J. Potter and D. A. Widdowson. 1973. Phenol oxidation and biosynthesis. Part XXIII. On the benzyltetrahydroisoquinoline origins of the *Erythrina* alkaloids Journal Chemical Society Perkin Trans I:346-348.
- Boar, R. B., and D. A. Widdowson. 1970. Mass Spectra of the *Erythrina* alkaloids. A novel fragmentation of the spiran system. J. Chem. Soc. B:1591-1595.
- Bondet, V., W. Brand-Williams and C. Berset. 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. Lebensm.- Wiss. u.- Technol. 30:609-615.
- Brand-Williams, W., M. E. Cuvelier and C. Berset. 1995. Use of a free radical method to Evaluate antioxidant activity. Lebensm.- Wiss. u.- Technol. 28:25-30.
- Calle A., J., R. Pinzón S., L. F. Ospina, N. C. Medina, A. Carrión y E. Bautista. 1997. Alcaloides isoquinolínicos de la corteza y flores de *Erythrina fusca* Loureiro. Rev. Col. Quím. Farm. 26:39-42.
- Caporale L. H. 1995. Chemical Ecology: a View from the Farmaceutical Industry. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:75-82.

- Carmack, M., B. C. Mckusick and V. Prelog. 1951. *Erythrina* alkaloids. Uber das apo-erysodin und das apo-erythralin. *Helvetica Chimica Acta* 34:1601-1609.
- Carretero A., M. E. 2001. Alcaloides: aspectos generales (I). *Panorame Actual Med.* 25 (241):222-227.
- Chacha, M., G. Bojase M., and R. R. T. Majinda. 2005. Antimicrobial and radical scavenging flavonoides from the stem wood of *Erythrina latissima*. *Phytochemistry* 66:99-104.
- Chanwitheesuk, A., A. Teerawutgulrag and N. Rakariyatham. 2005. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. *Food Chemistry* 92:491-497.
- Chawla, A. S., F. M. J. Redha and A. H. Jackson. 1985. Alkaloids in seeds of four *Erythrina* species. *Phytochemistry* 24(8):1821-2823.
- Chawla, A. S., and A. H. Jackson. 1989. *Erythrina* and related alkaloids. *Natural Products Reports* 6:55-66.
- Chawla, A. S. y V. K. Kappor. 1995. *Erythrina* alkaloids. In: D`melo F. (ed) *Handbook of plant and fungal toxicants*. CRC, Orlando, pp. 37-49.
- Conover, W. J. and Ronal L. Iman. 1981. Rank transformations as a bridge between parametric and nonparametric statistics. *The American Statistician* 35(3):124-129.
- Cornelius, W. W., T. Akeng'a, G. O. Obiero, and K. P. Lutta. 2009. Antifeedant activities of the erythrinaline alkaloids from *Erythrina latissima* against *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera noctuidae). *Rec. Nat. Prod.* 3(2):96-103.
- Craig, L. 1981. Curare-like effects. In: *The alkaloids chemistry and physiology*. Manske, F. H. R. and Holmes, H. L. (Eds.) pp. 265-292. Academic Press.
- Dike, S. F., and S. N. Quessy. 1981. *Erythrina* and related alkaloids. In: *the alkaloids*. Vol. 18. Manske, R. F. H. (ed). Academia Press. New Cork, USA. 2-98.

- Ennajar, M., J. Bouajila, A. Lebrihi, F. Mathieu, M. Abderraba, A. Raies, and M. Romdhane. 2009. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of essential oils and various extracts of *Juniperus phoenicea* L. *Journal of Food Science* 74:364-71.
- Facchini P. J. 2001. Alkaloid Biosynthesis in Plants: Biochemistry, Cell Biology, Molecular Regulation, and Metabolic Engineering Applications. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:29-66.
- Folkers, K. and F. Koniuszy. 1940. *Erythrina* alkaloids IX. Isolation and characterization of erysodine, erysopine, erysocine and erysovine. *Journal American Chemical Society* 62:1677-1683.
- Folkers, K. and R. T. Major. 1937. Isolation of erythroidine, an alkaloid of curare action, from *Erythrina americana* Mill. *Journal American Chemical Society* 59:1580-1581.
- Games, D. E., A. H. Jackson, N. A. Khan and O. S. Millington 1974. Alkaloids of some African, Asian, Polynesian and Australian species of *Erythrina*. *Lloydia* 37:581-588.
- García M., R., M. Soto H. and D. Kelly. 1998. Alkaloids from six *Erythrina* species endemic to Mexico. *Biochemical Systematics and Ecology* 26:545-551.
- García M., R., M. Soto H., M. Martínez Vázquez and A. Villegas M. 1999. Isolation of alkaloids of *Erythrina* from tissue cultura. *Phytochemical Analysis* 10:12-16.
- García M., R., M. Soto H. and M. Martínez. 2000. Toxicidad de los extractos de las semillas de *Erythrina americana*. *Ciencia Ergo Sum* 7 (2):166-170.
- García M., R. y M. Soto H. 2001. Alcaloides como una alternativa en la obtención de principios activos. *Productos Naturales, Perspectivas Biotecnológicas* 6:1-9
- García M., R., M. Soto H. and H. Vibrans H. 2001. *Erythrina americana* Miller (“Colorín”; Fabaceae), a versatile resource from Mexico: a review. *Economic Botany* 55(3):391-400.

- García M., R., R. Pérez P., C. Rodríguez H. y M. Soto H. 2004. Toxicidad de alcaloides de *Erythrina americana* en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus*. Rev. Fitotecnia Mexicana 27 (4):297-303.
- Garín A., M. E., J.E. Ramírez L., M. Soto H., G. Valencia del T. y M. Martínez V. 2000. Effect of crude extracts of *Erythrina americana* Mill. On aggressive behavior in rats. Journal of Ethnopharmacology 69:189-196.
- Garín A., M. E., G. Valencia del T., S. G. Sánchez H., M. Soto H. y J. García A. 2001. Alcaloides de *Erythrina herbacea*. Productos Naturales, Perspectivas Biotecnológicas 6:10-19
- Garín A., M. E., G. Valencia del T., M. Soto H. and G. Kite. 2005. High-performance liquid chromatography-mass spectrometric analysis of alkaloids extracted from seeds of *Erythrina herbacea*. Phytochemical analysis 16:302-306.
- Garín A., M. E., S. López V., C. L. Martínez V., G. Valencia del T., M. Soto H. y R. A. Prado A. 2009. Erisodina y receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ del hipocampo dorsal en la consolidación de la memoria. Rev. Latinoamer. Quím. 37(3):206-217.
- Halliwell, B. 1990. How to characterize a biological antioxidant. Free Radical Research Communications 9:1-32.
- Hanson, A. W. 1963. The crystal structure of dihidro- β -erythroidine hydrobromide. Acta Crystallographica 16:939-942.
- Hargreaves, R. T., R. D. Johnson, D. S. Millington, M. H. Mondal, W. Breavers, L. Becker, C. Young, and K. L. Rinehart. 1974. Alkaloids of American species of *Erythrina*. Lloydia 37:569-580.
- Heim, K. E., A. R. Tagliaferro and D. J. Bobilya. 2002. Flavonoids antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship. Journal of Nutritional Biochemistry 13:572-84.
- Herbert, R. B. 2001. The biosynthesis of plant alkaloids and nitrogenous microbial metabolites. Nat. Prod. Rep. 18:50-65.

- Hesse M. 2002. Nature's Curse or Blessing. Verlag Helvetica Chemical acta. Zurich, Suiza. pp. 413.
- Huang, D., B. Ou and R. L. Prior. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:1841-56.
- Ibarra E., E. 2008. Estudios químico-biológicos y estructurales de alcaloides de *Erythrina*. Tesis de Licenciatura. Tepic, México. pp. 109.
- Ibarra E., E., R. Téllez M., M. Soto H., M. Martínez V., R. García M. y R. San Miguel Ch. 2009. Actividad antimicótica *in vitro* de erisovina. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32 (4):327-330.
- Ito, K., H. Furukawa, M. Haruna, and M. Ito. 1973. *Erythrina* alkaloids V. Alkaloids of *Erythrina crista-galli*. *Yakugaku Zasshi* 93:1674-1678.
- Jackson A. H. 1985. *Erythrina* alkaloids. In: Phillipson J., Roberts M. y M. Zenk (eds). *The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 68-79.
- Jang, M. H., H. Y. Kim, K. S. Kang, T. Yokozawa, and J. H. Park. 2009. Hydroxyl radical scavenging activities of isoquinoline alkaloids isolated from *Coptis chinensis*. *Arch. Pharm. Res.* 32(3):341-345.
- Jiménez E., A., I. Jiménez J., C. Sánchez M. and F. Saura C. 2000. Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:1686-1690.
- Juma, B. F. and R. R. T. Majinda. 2004. Erythraline alkaloids from the flowers and pods of *Erythrina lysistemon* and their DPPH radical scavenging properties. *Phytochemistry* 65:1397-1404.
- Khaomek, P., C. Ichino, A. Ishiyama, H. Sekiguchi, M. Namatame, N. Ruangrunsi, E. Saifah, H. Kiyohara, K. Otaguro, S. Omura, and H. Yamada. 2008. *In vitro* antimalarial activity of prenylated flavonoids from *Erythrina fusca*. *J. Nat. Med* 62:217-220.

- Kolak, U., M. Öztürk, F. Özgök and A. Ulubelen. 2006. Norditerpene alkaloids from *Delphinium linearilobum* and antioxidant activity. *Phytochemistry* 67:2170-2175.
- Krukoff B. A. and R. C. Barneby. 1974. Conspectus of the species of the genus *Erythrina*. *Lloydia* 37: 332-459.
- Kubola, J. and S. Siriamornpun. 2008. Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts *in vitro*. *Food Chemistry* 110:881-890.
- Lamaison, J. L., C. Petitjean-Freytet and A. Carnat. 1990. Teneurs en acide rosmarinique, en dérivés hydroxycinnamiques totaux et activité antioxidante chez les Apiacées, les Borraginacées et les Lamiacées médicinales. *Annales Pharmaceutiques Francaises*. 48:103-108.
- Larson, R. A. 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* 27(4):969-978.
- Liu, L., Y. Sun, T. Laura, X. Liang, H. Ye and X. Zeng. 2009. Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of kudingcha made from *Ilex kudingcha* C. J. Tseng. *Food Chemistry* 112: 35-41.
- Lozoya, X. y M. Lozoya. 1982. Flora medicinal de México. En: Instituto Mexicano del Seguro Social (ed). *Plantas indígenas*. Instituto Mexicano del Seguro Social, México. pp. 64-67.
- Maier, U. H., W. Rödl, B. Deus-Neumann and M. H. Zenk. 1999. Biosynthesis of *Erythrina* alkaloids in *Erythrina crista-galli*. *Phytochemistry* 52:373-382.
- Miller, N. J. and C. A. Rice-Evans. (1997). The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chemistry* 60 (3):331-337.
- Millington, S., H. Steinman, and K. L. Rinehart Jr. 1974. Isolation, gas chromatography, mass spectrometry and structures of new alkaloids from *Erythrina folkersii* Krukoff and Moldenke and *Erythrina salviflora* Krukoff and Barneby. *J. Amer. Chem. Soc.*

96:1909-1914.

- Miño, J., S. Gorzalczany, V. Moscatelli, G. Ferraro, C. Acevedo and O. Hnatyszyn. 2002. Actividad antinociceptiva y antiinflamatoria de *Erythrina crista-galli* L. (“Ceibo”). Acta Farm. Bonaerense 21(2):93-98.
- Mitscher, L. A., S. K. Okwute, S. R. Gollapudi, S. Drake, and E. Avona. 1988. Antimicrobial pterocarpanes of Nigerian *Erythrina Mildbraedii*. Phytochemistry 27(11):3449-3452.
- Mitscher, L. A., S. R. Gollapudi, D. C. Gerlach, S. D. Drake, E. A. Véliz, and J. A. Ward. 1988. Erycristin, a new antimicrobial pterocarpano from *Erythrina crista-galli*. Phytochemistry 27(2):381-385.
- Mkaddem, M., J. Bouajila, M. Ennajar, A. Lebrihi, F. Mathieu and M. Romdhane. 2009. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of *Mentha (longifolia* L. and *viridis*) essential oils. Journal of Food Science 74:358-363.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanalarin J. Sci. Technol. 26(2):211-219.
- Montoya P., G. L., E. J. Osorio D., N. S. Jiménez U. y G. J. Arango A. 2004. Actividad captadora de radicales libres de alcaloides de *Rollinia pittieri* (Annonaceae) por el método del DPPH. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquía 11:51-57.
- Mosquera M., O. M., J. Niño O., Y. M. Correa y D. C. Buitrago B. 2005. Estandarización del método de captura de radicales libres para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos vegetales. Scientia et Technica 27:231-234.
- Naik, G. H., K. I. Priyadarsini, J. G. Satav, M. M. Banavalikar, D. P. Sohoni, M. K. Biyani and H. Mohan. 2003. Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in Ayurvedic medicin. Phytochemistry 63:97-104.

- Neill D. A. 1988. Experimental studies on species relationships in *Erythrina* (Leguminosae: Papilionoidae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75: 886-969.
- Neill D. A. 1993. The genus *Erythrina*: taxonomy, distribution and ecological differentiation. In: Westley SB, Powell MH (Eds) Nitrogen fixing tree association. *Erythrina* in the new and old worlds. NFTA, Hawaii.
- Njamen, D., E. Talla, J. R. Mbafor, Z. T. Fomum, A. Kamanyi, J. C. Mbanya, M. Cerdá N., R. M. Giner, M. C. Recio and J. L. Ríos. 2003. Anti-inflammatory activity of erycristagallin, a pterocarpene from *Erythrina mildbraedii*. *European Journal of Pharmacology* 468:67-74.
- Nkengfack, A. E., A. G. B. Azebaze, A. K. Waffo, Z. T. Fomum, M. Meyer, and F. R. van Heerden. 2001. Cytotoxic isoflavones from *Erythrina indica*. *Phytochemistry*. 58:1113-1120.
- Nowacki, W. and G. F. Bonsma. 1958. The crystal and molecular structure of erythraline hydrobromide. *Zeitschrift Kristallographie* 110:89-93.
- Oh, W. K., C. H. Lee, J. H. Seo, M. Y. Chung, L. Cui, Z. T. Fomum, J. S. Kang, and H. S. Lee. 2009. Diacylglycerol acyltransferase-inhibitory compounds from *Erythrina senegalensis*. *Arch. Pharm. Res.* 32(1):43-47.
- Okawa, M., J. Kinjo, T. Nohara and M. Ono. 2001. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoides obtained from some medicinal plants. *Biol. Pharm. Bull.* 24:1202-1205.
- Paniagua P., R., E. Madrigal B., D. Molina J., S. Reyes C., I. Álvarez G., L. Sánchez C. and J. Pérez G. 2009. Antigenotoxic, antioxidant and lymphocyte induction effects produced by pterodine. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 104:222-227.
- Payne L. G. 1991. The alkaloids of *Erythrina*: Clonal evaluation and metabolic fate. Ph. D. thesis. Department of Chemistry. Louisiana State University. USA.

- Pino, R., S., S. Prieto G., M. E. Pérez R. y J. Molina T. 2004. Género *Erythrina*: Fuente de metabolitos secundarios con actividad biológica. *Acta Farm. Bonaerense* 23(2):252-258.
- Pérez, R. M., R. Vargas, F. J. Martínez, E. V. García y B. Hernández. 2003. Actividad antioxidante de los alcaloides de *Bocconia arborea*. Estudio sobre seis métodos de análisis. *Ars. Pharmaceutica* 44:5-21.
- Pérez T., G. 2003. Los flavonoides: antioxidante o prooxidantes. *Revista Cubana Investigación Biomédica*. 22:48-57.
- Pietta, P. G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*. 63:1035-1042.
- Pineda A., D., M. Salucci, R. Lázaro, G. Maiani y A. Ferro-Luzzi. 1999. Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. *Rev. Cubana Aliment. Nutr.* 13(2):104-111.
- Prakash, A. 2001. Activity antioxidant. *Heart of a Giant Resource* 19:1-6.
- Rao, L. J. M., K. Ramalaksmi, B. B. Borse and B. Raghavan. 2007. Antioxidant and radical-scavenging carbazole alkaloids from the oleoresin of curry leaf (*Murraya koenigii* Spreng.). *Food Chemistry* 100:742-747.
- Reimann, E. 2007. Synthesis pathways to *Erythrina* alkaloids and *Erythrina* type compounds. *Fortschr Chem. Org. Naturst.* 88:1-62.
- Robinson, T. 1979. The evolutionary ecology of alkaloid. In: *Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites*. G. A. Rosenthal, D. H. Janzen (Eds). Academic Press, New York, USA. pp: 413-448.
- Ruiz T., N. A., F. Rincón S., V. M. Hernández L., J. de D. Figueroa C. y M. G. Loarca P. 2008. Determinación de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante en granos de maíz. *Revista Fitotecnia Mexicana* 31:29-34.

- Rukachaisirikul, T., A. Saekee, C. Tharibun, S. Watkuolham, and A. Suksamrarn. 2007. Biological activities of the chemical constituents of *Erythrina stricta* and *Erythrina Subumbrans*. Arch. Pharm. Res. 30(11):1398-1403.
- Rukachaisirikul, T., P. Innok, N. Aroonrerk, W. Boonamnuaylap, S. Limrangsun, C. Boonyon, U. Woonjina, and A. Suksamrarn. 2007. Antibacterial pterocarpanes from *Erythrina subumbrans*. Journal of Ethnopharmacology 110(1):171-175.
- Saidu, K., J. Onah, A. Orisadipe, A. Olusola, C. Wambebe and K. Gamaliel. 2000. Antiplasmodial, analgesic, and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of the stem bark of *Erythrina senegalensis*. Journal of Ethnopharmacology 71:275-280.
- San Miguel C., R., M. Soto H., A. C. Ramos V., G. Kite, M. Martínez V., M. R. García M. y T. Terrazas S. 2003. Production of alkaloids by *in vitro* culture of *Erythrina americana* Miller. Biotechnology Letters 25:1055-1059.
- San Miguel C., R., M. Soto H., T. Terrazas S. and G. Kite. 2006. Morphology and alkaloidal profile of the seedlings of *Erythrina americana* Mill. and *E. coralloides* A.DC. Feddes Repertorium 117:232-239.
- San Miguel C., R., M. Soto H., A. C. Ramos V. and G. Kite. 2007. Alkaloid production in elicited cell suspension cultures of *Erythrina americana* Miller. Phytochem Rev. 6:167-173.
- Sánchez H., S., R. M. Soto H., G. Kite, and M. R. García M. 2001. Identificación de alcaloides en las inflorescencias de *Erythrina americana* Miller. Rev. Chap. Serie Hort. 7(1):37-48.
- Sánchez M., C., J. A. Larrauri and F. Saura C. 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. J. Sci. Food Agric. 76:270-276.

- Santos C., A. C., D. M. Monteiro C., R. de Souza N., R. Fakhouri, S. A. Rodríguez, and F. Texeira S. 2008. Toxicidade aguda do extrato aquoso de folhas de *Erythrina velutina* em animais experimentais. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 18:739-743.
- Sato, M., H. Tanaka, N. Tani, M. Nagayama, and R. Yamaguchi. 2006. Different antibacterial actions of isoflavonas isolated from *Erythrina poeppigiana* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology* 43:243-248.
- Sing, H. and A. S. Chawla. 1969. Isolation of erysodine, erysotrine, and hypaphorine from *Erythrina suberosa* seeds. *Experientia* 25:785.
- Soler R., C., J. C. Espín and H. J. Wichers. 2000. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemical Analysis* 11:330-338.
- Sotelo, A., M. Soto, B. Lucas and F. Giral. 1993. Comparative studies of the alkaloidal composition of two Mexican species and nutritive value of the detoxified seeds. *J. Agric. Food Chem.* 41:2340-2343.
- Soto H., M. 1989. Chemical and structural studies of *Erythrina* alkaloids. Ph. D. Thesis doctoral. University of Wales. Cardiff, U. K. pp. 203.
- Soto H., M. and A. H. Jackson. 1993. Studies of alkaloids in foliage of *Erythrina berteriana* and *E. poeppigiana*: detection of β -erythroidina in goats milk. *Phytochemical analysis* 4:97-99.
- Soto H., M. and A. H. Jackson. 1994. *Erythrina* alkaloids: isolation and characterization of alkaloids from seven *Erythrina* species. *Planta Medica* 60:175-177.
- Soto H., M. and R. San Miguel C. 2006. Antifungal activity of alkaloid extract of *Erythrina coralloides* A. DC. against five phyto pathogen fungi. *Planta Med.* 72: 961-1089.
- Soto H., M., M. C. González Güereca, G. Kite y M. Martínez V. 2007. Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK var. *berlandieri* Schauer). *Rev. Fitotecnia Mex.* 30:43-49.

- Téllez M., R. 2006. Actividad antimicótica de erisovina en seis especies de hongos fitopatógenos. Tesis de Maestría en Ciencias. Texcoco, México. pp. 112.
- Tiwari, O. P. and Y. B. Tripathi. 2007. Antioxidant properties of different fractions of *Vitex negundo* Linn. Food Chemistry 100:1170-1176.
- Togola, A., I. Austarheim, A. Theis, D. Diallo and B. S. Paulsen. 2008. Ethnopharmacological uses of *Erythrina senegalensis*: a comparison of three areas in Mali, and a link between traditional knowledge and modern biological science. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine 4:1-9.
- Vásquez C., A., M. Cala M., I. Miranda., G. Tafurt G., J. Martínez M. y E. E. Stashenko. 2007. Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos etanólicos de *Salvia aratocensis*, *Salvia sochensis*, *Bidens reptans* y *Montanoa ovalifolia*. Scientia et Technica 33:205-207.
- Wink, M. 1999. Plant secondary metabolites from higher plants: biochemistry, function and biotechnology. In Biochemistry of plant secondary metabolism. Annual Plant Reviews, Ed. M. Wink 2:1-16.

IX.- ANEXOS

ANEXO A

Cantidad de fracciones crudas de alcaloides (Ibarra, 2008).

Fracción cruda de alcaloides	Peso (g)	Rendimiento con respecto a la muestra (%)
Libres hexánicos	0.2413	0.019
Libres metanólicos	10.6035	0.85
Liberados	0.69057	0.059