

# TRABAJOS ORIGINALES

## ORIGINAL WORKS

---

# Actividad antioxidante de los alcaloides de *Bocconia arborea*. Estudio sobre seis métodos de análisis

*Antioxidant activity of alkaloids from Bocconia arborea. A study on six testing methods*

PÉREZ RM<sup>1</sup>, VARGAS R<sup>2</sup>, MARTÍNEZ FJ<sup>3</sup>, GARCÍA EV<sup>3</sup>, HERNÁNDEZ B.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Investigación de Productos Naturales. Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias extractivas IPN. Punto fijo 16, col. Torres Lindavista cp 07708, México D.F. México.

<sup>2</sup> Laboratorio de Investigación de Fitofarmacología .Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco A.P. 23-181 México D.F., México

<sup>3</sup> Departamento de Química. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. IPN. Av. Acueducto S/N, Barrio la laguna Ticomán, cp 07340, México D.F., México

### RESUMEN

El fraccionamiento de la actividad antioxidante dirigida por actividad, junto con el análisis químico, llevaron al aislamiento de tres alcaloides de benzofenantridina del extracto de metanol de la corteza de *Bocconia arborea*. La identificación se basó en métodos espectroscópicos. Se analizó la actividad antioxidante de los alcaloides aislados 6-acetonildihidroqueleritrina, queleritrina y dihidroqueleritrina en ensayos de tiocianato, la actividad de barrido de los radicales libres, el método de decoloración del  $\beta$ -caroteno y el ensayo de la desoxirribosa. Todos los alcaloides mostraron actividad antioxidante significativa en ácido linoleico y  $\beta$ -caroteno. Además de conceder protección frente a la desoxirribosa, la peroxidación liposómica y los lípidos microsómiales de la peroxidación, también presentaron efectos de barrido en los radicales de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil.

### ABSTRACT

*Antioxidative activity-guided fractionation together with chemical analysis led to the isolation of three benzophenanthridine alkaloids from methanol extract of the bark of Bocconia arborea. Identification was based on spectroscopic methods. The isolated alkaloids 6-acetyl-dihydrochelerythrine, chelerythrine and dihydrochelerythrine were tested for antioxidative activity on thiocyanate assays, free radical scavenging activity,  $\beta$ -carotene bleaching method, and deoxyribose assay. All alkaloids exhibited significant antioxidant activities in linoleic acid and  $\beta$ -carotene. Although afforded protection against the damage of deoxyribose, liposome peroxidation and microsomal lipid from peroxidation, also exhibited scavenging effects on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals.*

### INTRODUCCIÓN

La *Bocconia arborea* (Papaveraceae) se conoce comúnmente como “palo sagrado”. Es un árbol común que crece de forma salvaje y abunda en los campos de México en los estados de Durango, Jalisco, Nayarit, Michoacán, Morelos, Sinaloa, Oaxaca, Guerrero, Veracruz y San Luis

### INTRODUCTION

*Bocconia arborea* (Papaveraceae) is commonly known as “palo sagrado”. It is a common tree that grows wild and abundantly in the fields of Mexico in the states of Durango, Jalisco, Nayarit, Michoacán, Morelos, Sinaloa, Oaxaca, Guerrero, Veracruz, and San Luis Potosí. A water extract

de Potosí. En la medicina popular se utiliza un extracto acuoso de la corteza fresca para el tratamiento de diversas enfermedades. El extracto acuoso de corteza se ha utilizado durante mucho tiempo para el tratamiento de la diabetes, el cáncer, los problemas inflamatorios y las infecciones bacterianas, y la creencia generalizada es que tiene efectos benéficos. Un informe anterior sobre la *Bocconia arborea* indicó la presencia de los alcaloides siguientes:

6-acetonildihidroqueleritina, dihidroqueleritina, queleritina, queleritridimerina, sanguinarina, dihidrosanguinarina, oxisanguinarina<sup>1-3</sup>. La actividad antimicrobiana, citotóxica y antiinflamatoria de estos alcaloides ha sido confirmada por numerosos autores<sup>4-6</sup>. En el proceso descrito en este artículo aislamos y purificamos dihidroqueleritina, 6-acetonildihidroqueleritina y queleritina de extracto de metanol de *Bocconia arborea*. Debido a la complejidad de los procesos de oxidación y antioxidación, es obvio que no existe un único método de prueba que refleje de forma completa el perfil antioxidante de la muestra estudiada. El objetivo del presente estudio era emplear seis métodos ampliamente utilizados para la evaluación de la actividad antioxidante, llamados radical 2,2'-difenil-1-1-picrilhidrazil (DPPH), método de decoloración del  $\beta$ -caroteno, ensayos de tiocianato, ensayo de desoxirribosa, ensayo de peroxidación de lípidos biológicos y protección de liposomas de la peroxidación inducida por radicales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Procedimientos experimentales generales*

IR: KBr, MS: 70 eV, gel de sílice 60 (0,2-0,5 mm). Los espectros de RMN se midieron en  $\text{CDCl}_3$ . Las desviaciones químicas se remitieron al TMS como estándar interno; las constantes de acoplamiento se indican en Hz. Los espectros  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{CNMR}$  se ejecutaron en un DPX-300 MHz. Los espectros de masa se registraron en Jeol CC-Mate. UV: espectrofotómetro Beckman DU640.

### *Productos químicos*

$\alpha$ -tocoferol, ácido linoleico, 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) y  $\beta$ -caroteno, ácido tiobarbi-

of the fresh bark is used in folk medicine for the cure of different illnesses. Aqueous bark extract has long been used for treating diabetes, cancer, inflammatory afflictions, and bacterial infection and it is generally believed to produce beneficial effects. A previous report on *Bocconia arborea* the presence of the alkaloids:

6-acetyldihydrochelerythrine, dihydrochelerythrine, chelerythrine chelerythridimerine, sanguinarine, dihydrosanguinarine, oxysanguinarine<sup>1-3</sup>. Antimicrobial, cytotoxic and anti-inflammatory activities of these alkaloids has been reported by numerous authors<sup>3-5</sup>. In this paper, we isolate and purify dihydrochelerythrine, 6-acetyldihydrochelerythrine and chelerythrine from methanol extract of *Bocconia arborea*. Due to the complexity of the oxidation-antioxidation processes, it is obvious that no single testing method is capable of providing a comprehensive picture of the antioxidant profile of a studied sample. The aim of the present study was to use six methods widely employed for the evaluation of antioxidant activity, namely 2,2'-diphenyl-1-1-picrylhydrazyl radical (DPPH),  $\beta$ -carotene bleaching method, thiocyanate assays, deoxyribose Assay, protecting liposome from peroxy radical induced peroxidation and biological lipid peroxidation assay.

## MATERIALS AND METHODS

### *General Experimental Procedures*

IR: KBr, MS: 70 eV, Silica gel 60 (0.2-0.5mm). NMR spectra were measured in  $\text{CDCl}_3$ . Chemical shifts were referenced to TMS as the internal standard; coupling constants are given in Hz.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{CNMR}$  spectra were run on a DPX-300 MHz. Mass spectra were recorded on Jeol CC-Mate. UV: Beckman DU640 spectrophotometer.

### *Chemicals*

$\alpha$ -tocopherol, linoleic acid, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), and  $\beta$ -carotene, thiobarbituric acid (TBA), Trichloroacetic acid, 2-deoxy-2-ribose were purchased from Sigma Chemical Co., St Louis, MO.

túrico (ATB), ácido tricloroacético, 2-desoxi-2-ribose adquiridos a Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EE.UU.

### *Materiales*

Corteza de *Bocconia arborea* (Papaveraceae) recolectada en Noxtepec, Mpo. de Tetipac, estado de Guerrero, identificada en el Departamento de botánica de ENEP-Iztacala UNAM; un espécimen de comprobación de la planta (5268) está guardado en el herbario de este departamento para referencia.

### *Preparación de extracto crudo de corteza de B. Arborea y purificación de alcaloides*

Se extrajo corteza seca (6 kg.) de *B. arborea* dos veces con metanol bajo reflujo durante 6 horas. El extracto de metanol se concentró a presión reducida. El extracto de metanol se concentró a presión reducida para producir 85 gr. de una pasta viscosa de color rojo oscuro, que se sometió a cromatografía de gel de sílice. La columna se desarrolló con cloroformo para obtener siete bandas. Por último, se comprobó la actividad antioxidante de todas las fracciones. Las fracciones más activas fueron la 3, 5 y 7. La fracción 3 se purificó y se utilizó en la columna de preparación (cromatografía de capa fina) sobre gel de sílice mediante la elución con  $\text{CHCl}_3$ -éter 10:1, se cristalizó más del metanol y se obtuvieron 300 mg del alcaloide 1. La fracción 5 se separó mediante gel de sílice y elución con  $\text{CHCl}_2$ -acetona (25:1), obteniéndose la subfracción 4. La subfracción 3 se cristalizó aún más a partir del metanol, y se obtuvieron 200 mg del alcaloide 2. A continuación se purificó la fracción 7 en una columna Sephadex LH-20 y se elucionó con  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (25:3), obteniéndose 5 subfracciones. Seguidamente, se purificó la subfracción 2 mediante cromatografía de capa fina sobre gel de sílice en elución con  $\text{CHCl}_3$ -EtOAc (4:1) para obtener 150 mg del compuesto 3.

### *Evaluación de la actividad antioxidante*

Tamizado rápido para obtención de antioxidantes. Los compuestos (0,5  $\mu\text{L}$ , 1:10 en cloro-

### *Materials*

*Bocconia arborea* (Papaveraceae) bark was collected in Noxtepec, Mpo. De Tetipac, state of Guerrero, was identified in the Department of Botany of ENEP-Iztacala UNAM, and a voucher specimen of the plant (5268) is stored in the herbarium of this Department for reference.

### *Preparation of crude extract of B. Arborea bark and purification of alkaloids*

Dried bark (6 kg) of *B. arborea* was extracted twice with methanol under reflux for 6 h. The methanol extract was concentrated under reduced pressure. The methanol extract was concentrated under reduced pressure to produce 85 g of a dark red viscous mass, which was subjected to silica gel chromatography. The column was developed with chloroform to give seven bands. Finally, all fractions were tested for antioxidative activity. The most active fractions were 3, 5 and 7. Fraction 3 was the purified and used in the preparative column (tlc) over silica gel by eluting with  $\text{CHCl}_3$ -ether 10:1, it was further crystallized from methanol, and there obtained 300 mg of the alkaloid 1. Fraction 5 was separated by silica gel by eluting with  $\text{CHCl}_2$ -acetone (25:1), gave 4 subfraction. Subfraction 3 was further crystallized from methanol, and 200 mg of the alkaloid 2 were obtained. Fraction 7 was then purified on Sephadex LH-20 column eluting with  $\text{CHCl}_3$  - MeOH (25:3) gave 5 subfractions. Subfraction 2 was then purified by preparative tlc over silica gel eluting with  $\text{CHCl}_3$ -EtOAc (4:1) to give 150 mg of compound 3.

### *Antioxidant Activity Evaluation*

Rapid screening for antioxidants. The compounds (0.5  $\mu\text{L}$ , 1:10 in chloroform) were spotted on silica gel sheets and development in  $\text{CHCl}_2$ -acetone (25:1). Spraying with  $\beta$ -carotene-linoleic acid reagent and 0.2% solution of the stable radical diphenylpicrylhydrazyl, DPPH<sup>6,7</sup>.

formo) se distribuyeron en láminas de gel de sílice y se desarrollaron en  $\text{CHCl}_2$ -acetona (25:1). Posteriormente se pulverizaron con ácido linoleico  $\beta$ -caroteno como reactivo y una solución al 0,2% del radical estable difenilpicrilhidrazil, DPPH<sup>6,7</sup>.

#### Método de decoloración del $\beta$ -caroteno

La prueba se realizó siguiendo el método espectrofotométrico de Miller<sup>8</sup> que se basa en la capacidad de diversos extractos de disminuir la decoloración oxidativa del  $\beta$ -caroteno en una emulsión ácida de  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. Se disolvió una muestra de 2,0 mg de  $\beta$ -8caroteno cristalino en 10 ml de cloroformo, y 1 ml de esta solución se introdujo con una pipeta en un frasco de fondo redondo que contenía 20 mg de ácido linoleico y 200 mg de Tween 40. Tras retirar el cloroformo por evaporación, se añadieron 50 ml de agua destilada al frasco mientras se removía energicamente. Después se introdujeron con una pipeta 5 ml de la mezcla en tubos de ensayo que contenían 0,2 ml de muestra (100  $\mu\text{L}$ ) y se agitó. En una muestra se midió la absorbencia inmediatamente con el espectrofotómetro a 470 nm, y en las demás se midió la absorbencia tras 10, 20, 30 y 90 minutos de incubación al baño maría a 50°C. Cada una de las muestras se comparó con una emulsión preparada de la forma descrita pero sin  $\beta$ -caroteno (en blanco). Para corregir la influencia del color amarillo de los alcaloides en el cálculo de la velocidad de degradación del  $\beta$ -caroteno, se añadieron cuatro alícuotas (50  $\mu\text{L}$ ) de cada muestra a 5 ml de solución en blanco (muestra en blanco)<sup>9</sup>. La lectura de absorbencias de las mezclas en cada lapso de tiempo se realizó con un espectrofotómetro, y la absorbencia medida se restó a la de la mezcla correspondiente. La velocidad de degradación del  $\beta$ -caroteno se calculó mediante cinética de primer orden:

$[\ln(A_0/A_t)]/t = \text{velocidad de degradación (vd)}$   
de la muestra

Donde  $A_0$  = absorbencia de la muestra – la absorbencia de la muestra blanca en tiempo 0 (la lectura de la absorbencia se realizó inmediatamente después de añadir las disoluciones de alcaloides).

#### $\beta$ -carotene bleaching method

The test was carried out following the spectrophotometric method of Miller<sup>8</sup>, based on the ability of the different extracts to decrease the oxidative bleaching on  $\beta$ -carotene in a  $\beta$ -carotene/linoleic acid emulsion. A 2.0 mg sample of crystalline  $\beta$ -8carotene was dissolved in 10 mL of chloroform, and 1 mL of this solution was pipetted into a round-bottom flask containing 20 mg of linoleic acid and 200 mg of Tween 40. After the removal of chloroform by evaporation, 50 mL of distilled water was added to the flask under vigorous stirring. After, 5 mL of the mixture were pipetted into test tubes containing 0.2 mL of the sample (100  $\mu\text{L}$ ), and the mixture was mixed well. For one sample the absorbance at 470 nm was immediately measured using the spectrophotometer, and for the other samples absorbance was measured after 10, 20, 30 and 90 min of incubation in a water bath at 50 °C. Each sample was read against an emulsion prepared as described but without  $\beta$ -carotene (blank). To correct for the influence of the alkaloids yellow color in calculating  $\beta$ -carotene degradation rate, four aliquots (50  $\mu\text{L}$ ) of each sample were added to 5 mL of blank (blank sample)<sup>9</sup>. The absorbances of the mixtures for each time point were read with a spectrophotometer, and the absorbance measured was subtracted from that of the corresponding sample. The degradation rate of  $\beta$ -carotene was calculated by first-order kinetics:

$[\ln(A_0/A_t)]/t = \text{degradation rate (dr) of sample}$

Where  $A_0$  = absorbance of the sample – the absorbance of blank sample at time 0 (absorbance was read immediately after the addition of alkaloids solutions).

$A_t$  = absorbance of the sample- absorbance of blank sample at time t, and t=10 or 20 or 30 or 90 min of incubation at 50 °C.

$[\ln(A_0/A_t)]/t = \text{degradation rate (dr) of control sample}$

50  $\mu\text{L}$  of distilled water was added to 5 mL of  $\beta$ -carotene emulsion and treated as the corresponding sample,  $a_0$  = absorbance of the control sample at time 0, and  $a_t$  = absorbance of the control sample at time t. Antioxidant activity was

$A_t$  = absorbencia de la muestra - absorbencia de la muestra blanca en tiempo t, y  $t=10$  ó  $20$  ó  $30$  ó  $90$  minutos de incubación a  $50^\circ\text{C}$ .

$[\ln(A_0/A_t)]/t$  = velocidad de degradación (vd) de la muestra de control

Se añadieron  $50 \mu\text{L}$  de agua destilada a  $5 \text{ ml}$  de emulsión de  $\beta$ -caroteno y se trataron como la muestra correspondiente,  $a_0$  = absorbencia de la muestra de control en tiempo 0, y  $a_t$  = absorbencia de la muestra de control en tiempo t. La actividad antioxidante se expresó como porcentaje de inhibición relativo al control mediante la ecuación:

$$\text{AA\%} = \frac{\text{vd muestra de control} - \text{vd muestra}}{\text{vd muestra de control}} \times 100$$

#### Ensayos de tiocianato

Se añadieron diversas cantidades de muestra disueltas en  $120 \mu\text{L}$  de EtOH a una mezcla reactiva en un vial con tapón de rosca. Cada mezcla reactiva consistió en  $2,88 \text{ ml}$  de  $2,51\%$  de ácido linoleico en EtOH y  $9 \text{ ml}$  de tampón de fosfato  $40 \text{ mM}$  ( $\text{pH } 7.0$ ). El vial se colocó en un horno a  $40^\circ\text{C}$  en la oscuridad. A intervalos durante la incubación, se diluyó un alícuota de  $0,111 \text{ ml}$  de la mezcla con  $9,7 \text{ ml}$  de EtOH al  $75\%$ , y seguidamente se añadió  $0,1 \text{ ml}$  de tiocianato de amonio al  $30\%$ . Exactamente  $3$  minutos después de añadir  $0,1 \text{ ml}$  de cloruro ferroso  $20 \text{ mM}$  en ácido clorhídrico al  $3,5\%$  a la mezcla de reacción, se midió la absorbencia del color rojo a  $500 \text{ nm}$  cada  $24 \text{ h}$ . Todas las pruebas se realizaron por triplicado<sup>10</sup>. En el ensayo de antioxidación se comprobaron con  $\beta$ -tocoferol los antioxidantes siguientes.

#### Actividad de barrido de los radicales libres

El efecto de barrido de los alcaloides en el radical estable 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH) se realizó como se describió anteriormente<sup>11,12</sup>. Los alcaloides se mezclaron con  $0,1 \text{ mM}$  de radical DPPH en solución de etanol. Antes de la lectura de absorbencia a  $519 \text{ nm}$  se utilizó un período de incubación a temperatura ambiente. Todas las pruebas y análisis se realizaron por

expressed as the percent of inhibition relative to the control using the equation:

$$\text{AA\%} = \frac{\text{dr control sample} - \text{dr sample}}{\text{dr control sample}} \times 10$$

#### Thiocyanate Assays

Different amounts of samples dissolved in  $120 \mu\text{L}$  of EtOH were added to a reaction mixture in a screw cap vial. Each reaction mixture consisted of  $2.88 \text{ mL}$  of  $2.51\%$  linoleic acid in EtOH and  $9 \text{ ml}$  of  $40 \text{ mM}$  phosphate buffer ( $\text{pH } 7.0$ ). The vial was placed in a oven at  $40^\circ\text{C}$  in the dark. At intervals during incubation, a  $0.111 \text{ mL}$  aliquot of the mixture was diluted with  $9.7 \text{ mL}$  of  $75\%$  EtOH, which was followed by adding  $0.1 \text{ mL}$  of  $30\%$  ammonium thiocyanate. Precisely  $3 \text{ min}$  after the addition of  $0.1 \text{ mL}$  of  $20\text{mM}$  ferrous chloride in  $3.5\%$  hydrochloric acid to the reaction mixture, the absorbance of red color was measured at  $500 \text{ nm}$  every  $24 \text{ h}$ . All tests were run in triplicate<sup>10</sup>. In the antioxidation assay the following antioxidants were tested with  $\alpha$ -tocopherol.

#### Free Radical Scavenging Activity

The stable 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging effect of alkaloids were carried out as described before<sup>11,12</sup>. Alkaloids were mixed with  $0.1 \text{ mM}$  DPPH radical in ethanol solution. A  $20 \text{ min}$  incubation period at room temperature was used before reading the absorbance at  $519 \text{ nm}$ . All the test and analyses were performed in triplicate and average. The inhibitory percentage of DPPH was calculated according to the following equation:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{absorbance (control)} - \text{absorbance (sample)}}{\text{absorbance (control)}} \times 100$$

The ABTS radical cation model<sup>13</sup> was also used to evaluate the free radical scavenging effect of alkaloids by compared by determining the percentage of decolorization at  $734 \text{ nm}$  after  $8 \text{ min}$  of reaction at room temperature. The effect of alkaloids on scavenging ABTS radical was calculated from the following equation:

triplicado y se calculó la media. El porcentaje de inhibición de DPPH se calculó mediante la ecuación siguiente:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{absorbancia (control)} - \text{absorbancia (muestra)}}{\text{absorbancia (control)}} \times 100$$

También se utilizó el método de modelos de cationes de radicales ABTS<sup>13</sup> para evaluar el efecto de barrido de radicales libres de los alcaloides mediante la determinación del porcentaje de decoloración a 734 nm tras 8 minutos de reacción a temperatura ambiente. El efecto de los alcaloides sobre el barrido de radicales ABTS se calculó según la ecuación siguiente:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{absorbancia (control)} - \text{absorbancia (muestra)}}{\text{absorbancia (control)}} \times 100$$

#### *Ensayo de la desoxirribosa*

En este ensayo se utilizó un modelo basado en una reacción Fenton<sup>14,15</sup> que contenía 0,1 mM de Fe<sup>3+</sup> o Cu<sup>2+</sup>. Todas las disoluciones estaban recién preparadas, 1,0 ml de la reacción contenían 100 µM de 2-deoxi-2-ribose 28 mM (Fluka, disueltos en tampón de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> con pH 7.4), 500 µl de solución de diversas concentraciones de los alcaloides (en tampón), 200 µL de FeCl<sub>3</sub> de 200 µM y 1,04 mM EDTA (1:1 v/v), 100 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,0 mM) y 100 µl de ácido ascórbico (1,0 mM). Tras un período de incubación de 1 h a 37°C, se midió el grado de degradación de la desoxirribosa mediante la reacción de la TBA. Se añadieron a la mezcla de reacción 1,0 ml de TBA (1% en 50 mM de NaOH) y 1,0 ml de TCA y se calentaron los tubos a 100°C durante 20 minutos. Tras el enfriamiento se realizó la lectura de la absorción a 532 nm en contraste con blanco (que contenía sólo tampón y desoxirribosa). La lectura de absorbencia (A1) al final del experimento se utilizó para el cálculo del porcentaje de inhibición de la degradación de la desoxirribosa por el compuesto de prueba.

El cálculo se realizó como sigue:

$$I(\%) = 100 \times (A_0 - A_1/A_0)$$

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{absorbance (control)} - \text{absorbance (sample)}}{\text{absorbance (control)}} \times 100$$

#### *Deoxyribose Assay*

In this Assay, a Fenton reaction<sup>14,15</sup> based model containing 0.1 mM of Fe<sup>3+</sup> or Cu<sup>2+</sup>. All solutions were prepared freshly, 1.0 mL of the reaction contained 100 µM of 28 mM 2-deoxy-2-ribose (Fluka, dissolved in KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer pH 7.4), 500 µL solution of various concentrations of the alkaloids (in buffer), 200 µL of 200 µM FeCl<sub>3</sub> and 1.04 mM EDTA (1:1 v/v), 100 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.0 mM) and 100 µL ascorbic acid (1.0 mM). After an incubation period of 1 h at 37 °C the extent of deoxyribose degradation was measured by the TBA reaction. 1.0 mL of TBA (1% in 50 mM NaOH) and 1.0 mL of TCA were added to the reaction mixture and the tubes were heated at 100 °C for 20 min. After cooling the absorbance was read at 532 nm against a blank (containing only buffer and deoxyribose). The absorbance (A1) read at the end of the experiment was used for the calculation of the percentage inhibition of deoxyribose degradation by the test compound.

Calculation were done as:

$$I(\%) = 100 \times (A_0 - A_1/A_0)$$

A<sub>0</sub> = Was the absorbance of the control reaction (full reaction, containing no test compounds) and A<sub>1</sub> = was the absorbance in the presence of the inhibitor.

The IC<sub>50</sub> value represented the concentration of the compounds, that caused 50% inhibition. All experiments were carried out in triplicated.

#### *Effect of Alkaloids in protecting liposome from peroxy radical induced peroxidation*

Liposomes were made by sonicating soybean lecithin in an ice-water for 2 h in 10 mM phosphate buffer (pH 7.4). Peroxyl radical induced liposomal peroxidation was conducted at 37°C, briefly the reaction was initiated by adding 0.5 mM 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) to a mixture of 75 µg/mL of liposome in 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) whi-

$A_0$  = era la absorbencia de la reacción de control (reacción completa, que no contenía ninguno de los compuestos de prueba) y  $A_1$  = era la absorbencia en presencia del inhibidor.

El valor  $IC_{50}$  representaba la concentración de los compuestos, que causaba una inhibición de 50%. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

*Efecto de los alcaloides en la protección de los liposomas frente a la peroxidación inducida por el radical peroxil*

Los liposomas se obtuvieron mediante la sonicación de lecitina de soja en agua helada durante 2 horas en 10 mM de tampón de fosfato (pH 7.4). La peroxidación liposomática inducida por el radical de peroxil se realizó a 37°C; poco después se inició la reacción añadiendo 0,5 mM de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH) a una mezcla de 75 µg/ml de liposomas en 10 mM de tampón de fosfato (pH 7.4) que incluía alcaloides (0, 5 y 25 µg/ml). Se registró la absorbencia a 234 nm cada 5 minutos durante 2 h. Se obtuvo un proceso de reacción de la generación de hidroperóxido de dieno en el tiempo, basándose en un coeficiente de absorbencia de  $\epsilon^{16}$ . La potencia antioxidante de los alcaloides se determinó a partir del período de la fase del intervalo de peroxidación determinada por la interceptación en la abscisa en la concentración de dieno conjugada frente a la línea de tiempo<sup>17</sup>.

*Ensayo de peroxidación de lípidos biológicos (actividad protectora)*

Se aislaron micromas del hígado de ratas macho Wistar que pesaban entre 100 y 150 gr. Los hígados se retiraron con rapidez y se colocaron en 3 mM de tampón Tris-HCl (pH 7.4) helado que contenía 0,25 M de sacarosa y 0,1 mM de EDTA. Los microsomas se obtuvieron como resultado del centrifugado a 105.000 X g durante 60 minutos<sup>18</sup>. La bolita microsómica obtenida se suspendió en 0,1 M de tampón de fosfato sódico, pH 7.4 (muestra de control), o en solución de alcaloides hasta sumar un volumen total de 6 ml, respectivamente. Los microsomas de hígado de rata se incubaron a 37°C en 1 ml

ch included alkaloids (0, 5 and 25 µg/mL). The absorbance at 234 nm was recorded every 5 min for 2 h. A reaction process was obtained from the generation of conjugated diene hydroperoxide against time based on an absorbance<sup>16</sup> coefficient of  $\epsilon$ . The antioxidant potency of alkaloids were determined from the peroxidation lag phase period determined by the intercept at the abscissa in the conjugated diene concentration versus time plot<sup>17</sup>.

*Biological lipid peroxidation assay (protective activity)*

Microsomes were isolated from the livers of Wistar male rats weighing 100-150 g. Livers were removed quickly and dropped into ice-cold 3 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 0.25 M sucrose and 0.1 mM EDTA. Microsomes were obtained as the result of centrifugation at 105,000 X g for 60 min<sup>18</sup>. The microsomal pellet obtained were suspended either in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4 (control sample), or in alkaloids solution to make a total volume of 6 mL, respectively. Rat liver microsomes were incubated at 37 °C in 1 mL of reaction mixture containing 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5), 2mM ADP, 0.12 mM  $Fe(NO_3)_3$ , and 0.1 mM NADPH. The reaction was initiated by the addition of NADPH. After 5 min, 2mL of TCA-TBA-HCL reagent (15% w/v trichloroacetic acid; 0.375% thiobarbituric acid; 0.25 N HCl) and 10 µg/mL of each alkaloids were added to the reaction mixture. The solution was heated for 15 min in a boiling water bath. After cooling, the flocculent precipitate was removed by centrifugation at 1000 X g for 10 min. The absorbance of the supernatant was determined at 535 nm. Butylated hydroxytoluene (100 µM) served as a reference inhibitor of lipid peroxidation. The protective activity was expressed as the percentage decrease of TBA reacting substances relative to the control using the equation:

$$PA\% = (a-b)/a \times 100$$

Where  $a$  is the TBA reacting substances in control sample and  $b$  represents the TBA reacting substances in sample<sup>19</sup>.

de mezcla de reacción que contenía 0,05 M de Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM de ADP, 0,12 mM de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ , y 0,1 mM de NADPH. La reacción se inició mediante la adición de NADPH. Tras 5 minutos, se añadieron a la mezcla de reacción 2 ml de reactivo TCA-TBA-HCL (15% w/v de ácido tricloroacético; 0,375% de ácido tiobarbitúrico; 0,25 N de HCl) y 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de cada alcaloide. La disolución se calentó durante 15 minutos en un baño maría de agua hirviendo. Tras el enfriamiento, el precipitado floculento se eliminó mediante centrifugado a 1000 X g durante 10 minutos. La absorbencia de la parte flotante se determinó a 535 nm. El hidroxitolueno butilado (100  $\mu\text{M}$ ) sirvió como inhibidor de referencia de la peroxidación de los lípidos. La actividad protectora se expresó como la disminución porcentual de sustancias reactivas de TBA relativa al control mediante la ecuación:

$$\text{PA}\% = (a-b)/a \times 100$$

Donde *a* son las sustancias reactivas de TBA de la muestra de control y *b* representa las sustancias reactivas de TBA de la muestra<sup>19</sup>.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Identificación de los componentes aislados*

El espectro de compuestos 1-3 <sup>1</sup>HNMR y <sup>13</sup>CNMR presentó un desplazamiento químico de protones y carbonos similar al de los alcaloides de benzofenanthridina<sup>20-27</sup>. También se propusieron las estructuras basándose en los espectros de masa, mediante fragmentos típicos e iones moleculares, así como por comparación de su espectro de masa con los espectros de la literatura. En base al examen de espectros y a la comparación con los datos de la literatura, el compuesto 1 se identificó como 6-acetonildihidroquelerritrina<sup>20-27</sup>. El compuesto 2 se identificó como quelerritrina<sup>26</sup> y el compuesto 3 se identificó como dihidroquelerritrina<sup>1,25</sup>.

### *Tamizado de cromatografía de capa fina (TLC) para componentes antioxidantes*

Se comprobó la actividad antioxidante de los alcaloides comenzando con un tamizado TLC

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Identification of the isolated compounds*

<sup>1</sup>HNMR and <sup>13</sup>CNMR spectrum of compounds 1-3 showed chemical shift of the protons and carbons similar at benzophenanthridine alkaloids<sup>20-27</sup>. Also the structures were proposed on the basis of mass spectra, using typical fragments and molecular ions, and as well as by comparison of their mass spectra with literature spectra. On the basis of spectral examination and comparison with literature data the compound 1 was identified as 6-acetonildihydrochelerythrine<sup>20-27</sup>. The compound 2 was identified as chelerythrine<sup>26</sup> and the compound 3 was identified as dihydrochelerythrine<sup>1,25</sup>.

### *TLC-screening for antioxidant compounds*

The alkaloids were tested for its antioxidant activity starting with a rapid TLC screening. In the first test the TLC sheet with a solution of alkaloid were sprayed with  $\beta$ -carotene-linoleic acid reagent. The chromatogram was exposed to daylight until the background colors was bleached (45 min after spraying) zones in which a yellow colors persisted possessed antioxidant activity. With the DPPH reagent the compounds were detected as yellow spots on a violet background. Only zones where the color turned from purple to yellow within the first 30 min (after spraying) were taken as positive results. All three compounds were positive and were subjected to further testing.

### *$\beta$ -carotene bleaching method*

The Table I shows the decrease in absorbance during the coupled oxidation of  $\beta$ -carotene and linoleic acid. The 6-acetonildihydrochelerythrine, showed the most effective antioxidant activity among the alkaloids whereas the dihydrochelerythrine was less efficient. The  $\beta$ -carotene bleaching test was selected for antioxidant activity determination because it is carried out in an emulsion, a situation frequent in foods. On the other hand, it is generally agreed that the oxidation is initiated by free radical attack; therefore, assays to evaluate the radical scavenging activity are representative of the potential of a com-



rápido. En la primera prueba, la lámina de TLC con solución de alcaloide se pulverizó con reactivo de ácido linoleico de  $\beta$ -caroteno. El cromatograma se expuso a la luz del día hasta que los colores de fondo se convirtieron en zonas decoloradas (45 minutos después de la pulverización), en las que persistieron los colores amarillos que poseían actividad antioxidante. Con el reactivo DPPH los componentes se detectaron como puntos amarillos sobre un fondo violeta. Sólo se consideraron resultados positivos las zonas en las que el color pasó de púrpura a amarillo en los primeros 30 minutos (tras la pulverización). Los tres componentes fueron positivos y se sometieron a pruebas adicionales.

pound to retard oxidation. Among the radical scavenging assays, the one based on the utilization of DPPH was chosen due to its simplicity and worldwide acceptance for comparative purposes<sup>8</sup>.

#### *Método de decoloración del $\beta$ -caroteno*

La Tabla I muestra la disminución de la absorción durante la oxidación conjunta de  $\beta$ -caroteno y ácido linoleico. La 6-acetonildihidroqueleritrina presentó la acción antioxidante más eficaz entre los alcaloides, mientras que la eficacia de la dihidroqueleritrina fue menor. Para la determinación de la actividad antioxidante se seleccionó la prueba de decoloración del  $\beta$ -caroteno porque se realiza en emulsión, un estado frecuente en alimentos. Por otra parte, es algo generalmente aceptado que la oxidación se inicia con el ataque de los radicales libres; por tanto, los ensayos para evaluar la actividad de barrido de radicales son representativos del potencial de un compuesto para retrasar la oxidación. Entre los ensayos de barrido de radicales, se eligió el que se basa en la utilización de DPPH debido a su simplicidad y aceptación mundial para fines comparativos<sup>8</sup>.

**TABLA 1.** Actividad inhibidora de la decoloración del  $\beta$ -caroteno de la 6-acetonildihidroqueleritrina, queleritrina y dihidroqueleritrina.

Muestra	Absorbencia 470 nm				
	0,0 (min)	10 (min)	20(min)	30 (min)	90 (min)
Control	0,45	0,46	0,44	0,44	0,45
6-acetonildi-hidroqueleritrina	0,46	0,32	0,26	0,19	0,16
Queleritrina	0,45	0,35	0,30	0,23	0,18
Dihidroqueleritrina	0,44	0,37	0,33	0,26	0,20
$\alpha$ -tocoferol	0,46	0,28	0,22	0,14	0,10

**TABLE 1.**  $\beta$ -carotene bleaching inhibiting activity of 6-acetyldihydrochelerythrine chelerythrine and dihydrochelerythrine.

Sample	Absorbance 470 nm				
	0.0 (min)	10 (min)	20(min)	30 (min)	90 (min)
Control	0.45	0.46	0.44	0.44	0.45
6-acetyldi-hydrochelerythrine	0.46	0.32	0.26	0.19	0.16
Chelerythrine	0.45	0.35	0.30	0.23	0.18
Dihydrochelerythrine	0.44	0.37	0.33	0.26	0.20
$\alpha$ -tocoferol	0.46	0.28	0.22	0.14	0.10

#### *Efecto de los alcaloides en la oxidación de ácido linoleico*

El efecto de los alcaloides en la oxidación del ácido linoleico, determinado por el método del tiocianato, se muestra en la Tabla II. La autooxidación del ácido linoleico sin añadir alcaloides y antioxidante ( $\alpha$ -tocoferol) estuvo acompañada de un rápido aumento del valor de peróxido. Se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el valor de peróxido entre el control y el ácido linoleico que contenía alcaloides o antioxidante. La actividad antioxidante de los alcaloides aumento con la concentración hasta 12,5  $\mu\text{g/ml}$  y disminuyó a concentraciones más altas de alcaloide, es decir, de 200  $\mu\text{g/ml}$ . Esto se puede deber al hecho de que a mayores concentraciones los alcaloides actúan como agentes portadores de oxígeno<sup>28</sup> y sirven como pro-oxidantes en la cooxidación del ácido linoleico. La prueba del tiocianato mostró que con una concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$  la inhibición de la oxidación del ácido linoleico producida por 6-acetonildihidroqueleritrina, queleritrina y dihidroqueleritrina fueron del 73,1%, 77,9% y 70,8% respectivamente en comparación con el blanco. La queleritrina presentó la mayor actividad antioxidante entre los alcaloides, mientras que la dihidroqueleritrina fue menos eficaz, y la eficacia antioxidante del  $\alpha$ -tocoferol fue del 92,1 %.

#### *Effect of alkaloids on the oxidation of linoleic acid*

The effect of alkaloids on the oxidation of linoleic acid, determined by the thiocyanate method, are in Table II. The autoxidation of linoleic acid without adding alkaloids and antioxidant ( $\alpha$ -tocoferol) was accompanied by a rapid increase of peroxide value. Significant differences ( $P < 0.05$ ) in peroxide value were found between the control and the linoleic acid containing alkaloids or antioxidant. The antioxidative activity of the alkaloids increased with concentration up to 12.5  $\mu\text{g/mL}$  and decreased at higher concentrations of alkaloid, that is, 200  $\mu\text{g/mL}$ . This might be explained by the fact that at higher concentrations alkaloids acts as oxygen-carrying agent<sup>28</sup> and serves as a pro-oxidant in the co-oxidation of linoleic acid. The thiocyanate test showed that at a concentration of 50  $\mu\text{g/mL}$  the inhibition of oxidation of linoleic acid produced by 6-acetyldihydrochelerythrine, chelerythrine and dihydrochelerythrine were 73.1, 77.9, and 70.8% respectively as compared to the blank. Chelerythrine, showed the most effective antioxidant activity among the alkaloids whereas the dihydrochelerythrine was less efficient, whereas the antioxidant efficiency of  $\alpha$ -tocopherol was of 92.1 %.

**TABLE 2.** Inhibición de la peroxidación del ácido linoleico (IP%) 6-acetonildihidroqueleritrina, queleritrina y dihidroqueleritrina.

Compuesto	Inhibición de la peroxidación (%)			
	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	200µg/ml
Control	0,0	0,0	0,0	0,0
6-acetonildihidroqueleritrina	71,6 ± 0,9 <sup>a</sup>	72,6 ± 3,4 <sup>a</sup>	73,1 ± 2,5 <sup>a</sup>	75,4 ± 0,4 <sup>a</sup>
Queleritrina	74,5 ± 1,3 <sup>c</sup>	76,7 ± 0,7 <sup>c</sup>	77,9 ± 3,8 <sup>b</sup>	76,2 ± 1,7 <sup>a</sup>
Dihidroqueleritrina	69,1 ± 2,2 <sup>c</sup>	69,4 ± 4,6 <sup>b</sup>	70,8 ± 4,1 <sup>c</sup>	68,4 ± 0,6 <sup>a</sup>
α-tocoferol	90,2 ± 1,4 <sup>b</sup>	91,6 ± 5,3 <sup>b</sup>	92,1 ± 0,9 <sup>b</sup>	89,3 ± 2,8 <sup>b</sup>

Inhibición de la peroxidación (%) = [1-(absorbencia de la muestra a 500 nm/absorbencia del control a 500 nm)] X 100. Todos los valores son la media ± DS (n=3). Significación <sup>a</sup>p<0.05 ó <sup>b</sup>p<0.01, ó <sup>c</sup>p<0.001.

**TABLE 2.** Inhibition of linoleic acid peroxidation (IP%) 6-acetyl dihydrochelerythrine, chelerythrine and dihydrochelerythrine.

Compound	Inhibition of peroxidation (%)			
	12.5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	200µg/mL
Control	0.0	0.0	0.0	0.0
6-acetyl dihydrochelerythrine	71.6 ± 0.9 <sup>a</sup>	72.6 ± 3.4 <sup>a</sup>	73.1 ± 2.5 <sup>a</sup>	75.4 ± 0.4 <sup>a</sup>
Chelerythrine	74.5 ± 1.3 <sup>c</sup>	76.7 ± 0.7 <sup>c</sup>	77.9 ± 3.8 <sup>b</sup>	76.2 ± 1.7 <sup>a</sup>
Dihydrochelerythrine	69.1 ± 2.2 <sup>c</sup>	69.4 ± 4.6 <sup>b</sup>	70.8 ± 4.1 <sup>c</sup>	68.4 ± 0.6 <sup>a</sup>
α-tocoferol	90.2 ± 1.4 <sup>b</sup>	91.6 ± 5.3 <sup>b</sup>	92.1 ± 0.9 <sup>b</sup>	89.3 ± 2.8 <sup>b</sup>

Inhibition of peroxidation (%) = [1-(absorbance of sample at 500 nm/absorbance of control at 500 nm)] X 100. Each value is the mean ± SD (n=3). Significance <sup>a</sup>p<0.05 or <sup>b</sup>p<0.01, or <sup>c</sup>p<0.001.

### Ensayo de DPPH

El método del DPPH se considera un compuesto modelo de un radical lipofílico. La autoxidación inicia una reacción en cadena en el radical lipofílico. Los efectos de barrido de los alcaloides en el radical DPPH que se muestran en la Tabla III mostraron menor efecto de barrido (84,3%, 80,2% y 77,5% respectivamente). Estos compuestos mostraron actividad antioxidante frente a la peroxidación de lípidos y radicales peroxil. Puede deberse al grupo *orto*-metoxi del anillo aromático que estabiliza el radical arilo por donación de electrones, aumentando por tanto la eficacia antioxidante y antirradical. En la reacción modelo del ABTS (ácido ferrimioglobina/2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolono-6-sulfónico), la 6-acetonildihidroqueleritrina presentó la mayor actividad inhibitoria en el radical ABTS seguida de la queleritrina y la dihidroqueleritrina (Tabla IV).

### DPPH assay

The DPPH method is considered to be a model compound of a lipophilic radical. Lipid autoxidation initiates a chain reaction in lipophilic radical. The scavenging effects of alkaloids on DPPH radical are shown in Table III, were found to have lower scavenging effects (84.3, 80.2 and 77.5% respectively). These compounds exhibited antioxidative activities against lipid peroxidation and peroxy radical. It may be due to the *ortho*-methoxy group on the aromatic ring that stabilizes the aryloxy radical by electron donation, thereby increasing the antioxidant and antiradical efficiencies. In the ABTS (ferrimyoglobin/2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonic acid) model reaction, 6-acetyl dihydrochelerythrine exhibited the highest inhibitory activity in the ABTS radical followed by chelerythrine, dihydrochelerythrine (Table IV).

**TABLA 3.** Efectos de barrido de la 6-acetonildihidroqueleritrina, queleritrina y dihidroqueleritrina en DPPH.

Compuesto	Efecto de barrido (%)
Control	0,00
6-acetonildihidroqueleritrina	84,3 ± 2,6 <sup>b</sup>
Queleritrina	80,2 ± 4,1 <sup>c</sup>
Dihidroqueleritrina	77,5 ± 0,7 <sup>a</sup>
α-tocoferol	95,1 ± 0,9 <sup>a</sup>

La concentración de todos los compuestos es de 100 µg/ml. Efecto de barrido (%) = [1-(absorbancia de la muestra a 517 nm/absorbancia del control a 517 nm)] X 100. Todos los valores se presentan como media ± DS (n=3). Significación <sup>a</sup>p<0.05 ó <sup>b</sup>p<0.01, ó <sup>c</sup>p<0.001.

**TABLA 3.** Scavenging effects of 6-acetyldihydrochelerythrine, chelerythrine and dihydrochelerythrine on DPPH.

Compound	Scavenging effect (%)
Control	0.00
6-acetyldihydrochelerythrine	84.3 ± 2.6 <sup>b</sup>
Chelerythrine	80.2 ± 4.1 <sup>c</sup>
Dihydrochelerythrine	77.5 ± 0.7 <sup>a</sup>
α-tocoferol	95.1 ± 0.9 <sup>a</sup>

The concentration of all compounds is 100 µg/mL. Scavenging effect (%) = [1-(absorbance of sample at 517 nm)/absorbance of control at 517 nm] X 100. Each value is presented as mean ± SD (n=3). Significance <sup>a</sup>p<0.05 or <sup>b</sup>p<0.01, or <sup>c</sup>p<0.001.

**TABLA 4.** Actividad de barrido del radical ABTS de la 6-acetonil-dihidroqueleritrina, queleritrina y dihidroqueleritrina.

Muestra	Barrido ABTS
Control	0,0
6-acetonildihidroqueleritrina	56,2 ± 4,3 <sup>a</sup>
Queleritrina	51,3 ± 1,7 <sup>c</sup>
Dihidroqueleritrina	49,1 ± 3,9 <sup>b</sup>
α-tocoferol	70,5 ± 5,2 <sup>a</sup>

Las actividades de barrido de ABTS son iguales a la inhibición porcentual del radical ABTS. Las concentraciones fueron de 0,7 mg/ml. Todos los valores se presentan como media ± DS (n=3). Significación <sup>a</sup>p<0.05 ó <sup>b</sup>p<0.01, ó <sup>c</sup>p<0.001.

**TABLA 4.** ABTS radical scavenging activity of 6-acetyl-dihydrochelerythrine, chelerythrine and dihydrochelerythrine.

Sample	ABTS scavenging
Control	0.0
6-acetyldihydrochelerythrine	56.2 ± 4.3 <sup>a</sup>
Chelerythrine	51.3 ± 1.7 <sup>c</sup>
Dihydrochelerythrine	49.1 ± 3.9 <sup>b</sup>
α-tocoferol	70.5 ± 5.2 <sup>a</sup>

ABTS scavenging activities are equal to percentage inhibition of ABTS radical. Concentrations were 0.7 mg/mL. Each value is presented as mean ± SD (n=3). Significance <sup>a</sup>p<0.05 or <sup>b</sup>p<0.01, or <sup>c</sup>p<0.001.

*Efecto de los alcaloides en la oxidación de la desoxirribosa*

El efecto de los alcaloides en el daño de la desoxirribosa inducido por  $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$  se muestra en la Tabla V. La 6-acetonildihidroqueleritrina, queleritrina, dihidroqueleritrina a 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  mostraron 87,6%, 80,3% y 79,2% respectivamente. Si se incubaba un quelato de  $\text{Fe}^{2+}$ -EDTA con desoxirribosa en tampón de fosfato a pH 7.4, se forman radicales  $\text{OH}^{\cdot}$ . Cualquier radical de este tipo que escape al barrido por la EDTA en sí misma correacciona con desoxirribosa. La velocidad de la degradación de la desoxirribosa se puede aumentar con ácido ascórbico y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Los alcaloides, que pueden competir con la desoxirribosa por  $\text{OH}^{\cdot}$ , disminuirán la velocidad de degradación de la desoxirribosa<sup>30</sup>. Estos compuestos mostraron un efecto protector frente a los daños oxidativos de la desoxirribosa. La capacidad de reducir el  $\text{Fe}^{3+}$  y estimular la degradación de la desoxirribosa se ha adoptado como medida de las propiedades prooxidativas y se puede aplicar al estudio de diversos aditivos alimentarios<sup>31</sup>.

*Effect of alkaloid on the oxidation of deoxyribose*

The effect of alkaloids on deoxyribose damage induced by  $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$  is shown in Table V. The 6-acetyl-dihydrochelerythrine, chelerythrine, dihydrochelerythrine at 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  showed 87.6, 80.3 and 79.2% respectively. If a  $\text{Fe}^{2+}$ -EDTA chelate was incubated with deoxyribose in phosphate buffer at pH 7.4  $\cdot\text{OH}$  radicals are formed<sup>29</sup>. Any such radical that escaped scavenging by the EDTA itself can react with deoxyribose. The rate of deoxyribose degradation may be increased by ascorbic acid and  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The alkaloids are capable of competing with deoxyribose for  $\cdot\text{OH}$ , it will decrease the rate of deoxyribose degradation<sup>30</sup>. These compounds showed a protective effect from oxidative damage of deoxyribose. The ability to reduce  $\text{Fe}^{3+}$  and stimulate deoxyribose degradation has been adopted as one measure of prooxidant properties and can be applied to study a variety of food additives<sup>31</sup>.

**TABLA 5.** Inhibición de la degradación de radicales de la 2-desoxi-2-ribosa por la 6-acetonil-dihidroqueleritrina, queleritrina y dihidroqueleritrina.

Muestra (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Inhibición de la degradación de radicales de 2-desoxi-2-ribosa (%)
Control	0,0
6-acetonildihidroqueleritrina	87,6
Queleritrina	80,3
Dihidroqueleritrina	79,2
$\alpha$ -tocoferol	94,2

**TABLE 5.** Inhibition of the radical degradation of 2-deoxy-2-ribose by the 6-acetyl-dihydrochelerythrine, chelerythrine and dihydrochelerythrine.

Sample (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Inhibition of the radical degradation of 2-deoxy-2-ribose (%)
Control	0.0
6-acetyl-dihydrochelerythrine	87.6
Chelerythrine	80.3
Dihydrochelerythrine	79.2
$\alpha$ -tocoferol	94.2

*Efecto de los alcaloides en la protección de los liposomas frente a la peroxidación inducida por el radical peroxil*

La Tabla VI muestra la peroxidación liposómica iniciada por el radical peroxil generado por descomposición térmica de AAPH. Los alcaloides mostraron un efecto protector frente a la peroxidación liposómica inducida por AAPH, en comparación con las muestras de control sin alcaloides. Los intervalos de tiempo para la generación de hidroperóxidos de dieno conjugados a partir de materiales liposómicos oxidados fue de 27 minutos para el control y de 75, 71 y 80 minutos respectivamente para la queleritrina, dihidroqueleritrina y 6-acetonildihidroqueleritrina. Al aumentar la concentración hasta 25 µg/ml el resultado fue una inhibición casi completa de la peroxidación liposómica inducida por el radical peroxil en un período de tiempo de 100 minutos.

*Effect of Alkaloids in protecting liposome from peroxy radical induced peroxidation*

Table VI shows liposome peroxidation initiated by peroxy radical generated by thermal decomposition of AAPH. Alkaloids exhibited a protective effect against AAPH induced liposome peroxidation, compared to control samples without alkaloids. Lag phases for generation of conjugated diene hydroperoxides from oxidized liposome materials were 27 min for control and 75, 71, and 80 min, respectively chelerythrine, dihydrochelerythrine, and 6-acetyldihydrochelerythrine. Increasing the concentration to 25 µg/mL resulted in almost complete inhibition of peroxy radical induced liposome peroxidation over a time period of 100 min.

**TABLA 6.** Efecto de la 6-acetonil-dihidroqueleritrina, queleritrina y dihidroqueleritrina en la protección de liposomas de la peroxidación inducida por AAPH a 37°C

Muestra (5 µg/ml)	Conjugado dieno hidroperóxido (min)
Control	27
6-acetonildihidroqueleritrina	80
Queleritrina	75
Dihidroqueleritrina	71
α-tocoferol	84

**TABLE 6.** Effect of 6-acetyl-dihydrochelerythrine, chelerythrine and dihydrochelerythrine in protecting liposome from AAPH induced peroxidation at 37°C

Sample (5 µg/mL)	Conjugate diene hydroperoxide (min)
Control	27
6-acetyldihydrochelerythrine	80
Chelerythrine	75
Dihydrochelerythrine	71
α-tocoferol	84

*Ensayo de peroxidación de lípidos biológicos (actividad protectora)*

Este ensayo biológico de la actividad protectora mostró que los alcaloides protegían a los lípidos microsomiales de la peroxidación. La 6-acetonil-dihidroqueleritrina, queleritrina y dihidroqueleritrina mostraron una inhibición del 59%, 54% y 52% respectivamente frente a la peroxidación lipídica microsomal inducida por el sistema Fe(III)-ADP/NADPH a 10 µg/ml, como se muestra en la Tabla VII. Está claramente establecido que la peroxidación lipídica es una de las reacciones que se producen como consecuencia de la formación de radicales libres en células y tejidos. Los microsomas, especialmente las retículas endoplásmicas de superficie lisa, producen con facilidad peróxidos lípidos y se cree que suministran los productos de la peroxidación a otros tejidos. La NADPH-P-450 reductasa y el citocromo P-450 están involucrados en la peroxidación lipídica inducida por NADPH. La peroxidación lipídica, que se puede medir por el método TBA, se produce al incubar microsomas de hígado de rata con Fe (III)-ADP/NADPH<sup>32</sup>.

*Biological lipid peroxidation assay (protective activity)*

This biological assay of the protective activity showed that alkaloids protected microsomal lipid from peroxidation. 6-acetonil-dihydrochelerythrine, chelerythrine and dihydrochelerythrine exhibited 59, 54 and 52 % inhibition respectively against microsomal lipid peroxidation induced by Fe(III)-ADP/NADPH system at 10 µg/mL as shown in Table VII. It is well established that lipid peroxidation is one of the reactions set into motion as a consequence of the formation of free radicals in cell and tissues. Microsomes, especially smooth surfaced endoplasmic reticulum, easily produced lipid peroxides and are thought to supply the peroxidation products to other tissues. NADPH-P-450 reductase and cytochrome P-450 are involved in NADPH-induced microsomal lipid peroxidation. Lipid peroxidation, which can be measured by the TBA method occurs when rat liver microsomes are incubated with Fe (III)-ADP/NADPH<sup>32</sup>.

**TABLE 7.** Efecto de la 6-acetonil-dihidroqueleritrina, queleritrina y dihidroqueleritrina en la peroxidación de lípidos microsomiales de hígado de rata.

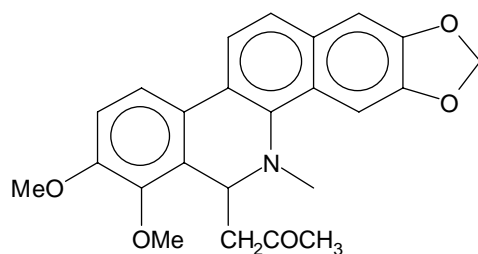
Muestra (10 µg/ml)	% de inhibición
Control	-----
6-acetonildihidroqueleritrina	59
Queleritrina	54
Dihidroqueleritrina	52
α-tocoferol	58

**TABLE 7.** Effect of 6-acetonil-dihydrochelerythrine, chelerythrine and dihydrochelerythrine on rat liver microsomal lipid peroxidation.

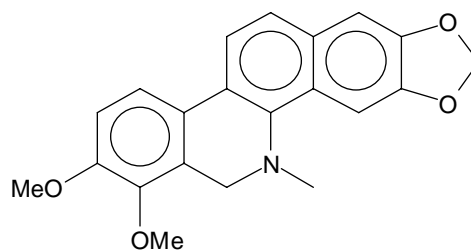
Sample (10 µg/mL)	% de inhibition
Control	-----
6-acetonildihydrochelerythrine	59
Chelerythrine	54
Dihydrochelerythrine	52
α-tocoferol	58

## CONCLUSIONES

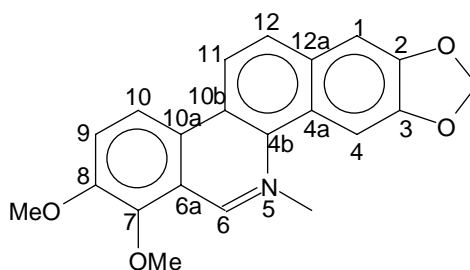
Los resultados obtenidos en este estudio demuestran claramente que los tres alcaloides aislados del extracto de metanos de *B. arborea* presentaron menor actividad antioxidante que los del  $\alpha$ -tocoferol respecto a la inhibición de la peroxidación del ácido linoleico, la prevención de los efectos de barrido en los radicales DPPH, la prueba de decoloración del  $\beta$ -caroteno y el efecto protector del daño oxidativo de la desoxirribosa. Además, dado que la capacidad de un componente o sistema para actuar como antioxidante in vitro no significa necesariamente que pueda actuar de la misma manera in vivo, las propiedades antioxidantes de los alcaloides también se evaluaron como actividad protectora en la peroxidación de los lípidos de microsomas de células de hígado de rata<sup>33</sup>, que es un sistema modelo que simula mejor las condiciones in vivo. Los resultados del presente estudio demuestran que los alcaloides fueron eficaces en la producción de peróxido antilipídico y actúan como antioxidantes, antirradicales y prooxidantes.



1



2



3

## CONCLUSIONS

Results obtained in this study clearly demonstrate that the three isolated alkaloids from methanol extract of *B. arborea* exhibited antioxidative activities less than those of  $\alpha$ -tocopherol with respect to the inhibition of linoleic acid peroxidation, prevention scavenging effects on DPPH radicals,  $\beta$ -carotene bleaching test, protective effect from oxidative damage of deoxyribose. Furthermore, given that the ability of a compound or a system to act as antioxidant in vitro does not necessarily mean that it can act in the same manner in vivo, the antioxidant properties of alkaloids were also evaluated as protective activity on lipid peroxidation of rat liver cell microsomes<sup>33</sup> which is a model system that better simulates the in vivo conditions. The results of the present study, which demonstrate that the alkaloids were effective in anti-lipid peroxide production and act as antioxidant, antiradical and pro-oxidant.



## BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHY

1. Djerassi C, Connolly JD, Faulkner DJ, Mori K, Nakanishi K, Ourisson G, Raphael RA, Shamma M, Tamm C. Dictionary of natural Products London: Chapman & Hall; 1994. p.117-124.
2. Manske RHF, Brossi A, eds. The alkaloids. New York: Wiley; 1985. p.253-286
3. Harbone JB, Baxter H. (1993). Phytochemical dictionary. A Handbook of bioactive compounds from plants. London: Taylor & Francis; 1993. p.203.
4. Roberts MF, Wink M. Alkaloids: biochemistry, ecology and medicinal applications. New York: Polonium Publishing; 1998. p.397-433.
5. Vavreckova C, Gawlik I, Muller K. Benzophenanthridine alkaloids of *Chelidonium majus*; 1. Inhibition of 5- and 12—lipoxygenase by a non-Redox mechanism. *Planta Med* 1996; 62: 397-401.
6. Cuendet M, Hostettmann K, Potterat O. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helv Chim Acta* 1997; 80: 1144-1152.
7. Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother Res* 2000; 14: 323-328.
8. Miller HEA. A simplified method for the evaluation of antioxidant. *J Am Oil Chem Soc* 1971; 45: 91-98.
9. Daglia M, Papetti A, Gregotti C, Berte F, Gazzani G. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 1449-1454.
10. Nakatani N, Kikuzaki H. A new antioxidative glucoside isolated from *Oregano* (*Origanum vulgare* L.). *Agric Biol Chem* 1987; 51: 2727-2732.
11. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 1958; 181: 1199-1200.
12. Yen G, Chang Y, Sheu F, Chiang H. Isolation and characterization of antioxidant compounds from *Aspergillus candidus* Broth filtrate. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 1426-1431.
13. Pellegrini N, Ying M, Rice-Evans C. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruits extract for antioxidant activities applying 2,2'-azobis(3-ethylbenzothione-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Methods Enzymol* 1999; 299: 379-389.
14. Aruoma OI. Assessment of potential prooxidant and antioxidant actions. *J Am Oil Chem Soc* 1996; 73: 1617-1625.
15. Halliwell B, Gutteridge MC, Aruoma OI. The deoxyribose method: A simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical Biochem* 1987; 165: 215-219.
16. Ratty AK, Sunamoto J, Das NP. Interaction of flavonoids with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical, liposomal membranes and soybean lipoxygenase-1. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 989-995.
17. Duh PD. Antioxidant activity of burdock (*Ardium lappa* Linne): its scavenging effects on free radical and active oxygen. *J Am Oil Chem Soc* 1998; 75: 455-461.
18. Gazzani HG, Papetti A, Daglia M, Berte F, Gregotti C. Protective activity of water soluble components of some common diet vegetables on rat liver microsome and the effect of thermal treatment. *J Agric Food Chem* 1998; 46: 4123-4127.
19. Ramos A, Piloto J, Visozo A, Garcia A, Lastra H, Ponce de Leon H. Mutagenicity and antioxidant assessment of *Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl. *Phytother Res* 2001; 15: 360-363.
20. Oechslin SM, König GM, Merkel KO, Wright AD, Kinghorn AD, Sticher O. An NMR study of four benzophenanthridine alkaloids. *J Nat Prod* 1991; 54 : 519-524.
21. Slavik J, Slavikova L. Alkaloide der monhgewachse (Papaveraceae) II. Trennung des chelerythins und sanguinarins und auffindung von zwei neuen alkaloiden im schollkraut (*Chelidonium majus* L.). *Colle Czecho Chem Commun* 1955; 20: 21-26.
22. Slavik J, Dolejs L, Hanus V, Cross AD. Alkaloids of Papaveraceae XL. Chelirubine, chelilutine, sanguinrubine, and sanguilutine, mass and nuclear magnetic resonance spectra of benzophenanthridine alkaloids. *Colle Czecho Chem Commun* 1968; 33: 1619-1623.
23. Stermitz FR, Chen L, White JJ. Alkaloids of the Papaveraceae. *Tetrahedron* 1966; 22: 1095-1102.
24. Sharma PN, Shoeb A, Kapil RS, Popli SP. Toddalidimerine, a dimeric benzophenanthridine alkaloids from *Toddalia asiatica*. *Phytochemistry* 1981; 20: 2781-2783.
25. MacLean DB, Gracey DEF, Saunders JK, Rodrigo R, Manske RHF. Some benzophenanthridine alkaloids from *Bocconia arborea*. *Can J Chem* 1969; 47: 1951-1956.
26. Manske RHF. Alkaloid from *Bocconia arborea*. *Can J Res B* 1943; 21:140-144.
27. Hanaoka M, Motonishi T, Mukai C. Chemical transformation of protoberberines. Part 9. A biomimetic synthesis of oxychelerythrine, dihydrochelerythrine, and chelerythrine from berberine. *Chem Soc Perkin Trans* 1986; 2253-2256.
28. Holloway GM, Gainer J. The carotenoids crocetin enhances pulmonary oxygenation. *J Appl Physiol* 1988; 65: 683-686.
29. Aruoma OI, Grootveld M, Halliwell B. The role of iron in ascorbate-dependent deoxyribose degradation. Evidence consistent with a site specific hydroxyl radical generation caused by iron bound to deoxyribose molecule. *J Inorganic Biochem* 1987; 29: 289-299.
30. Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Rad Res Comms* 1990; 9: 1-32.
31. Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Houlst JRS, Halliwell B. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclooxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. *Biochem Pharmacol* 1991; 42: 1673-1681.
32. Horie T, Murayama T, Mishima T, Itoh F, Minamide Y, Fuwa T, Awazu S. Identified diallyl polysulfides from an aged garlic extract which protects the membranes from lipid peroxidation. *Planta Med* 1989; 55: 506-508.
33. Plaa GL, Hewitt WR. Toxicology of the liver. In target organ toxicology series. New York: Raven Press; 1982. p.217-225.