

# Actividad antioxidante *in vitro* del extracto de metanol de los rizomas de *Curculigo orchioides* Gaertn

*In vitro antioxidant activity of methanol extract of rhizomes of Curculigo orchioides Gaertn*

BAFNA AR Y MISHRA SH\*

Departamento de Farmacia, Facultad de Tecnología e Ingeniería,  
The M.S.University of Baroda, Vadodara-390002, Gujarat, India

\*Dirección para correspondencia: Dr.S.H.Mishra. Pharmacy department, Faculty of Technology and Engineering, The M.S.University of Baroda, Vadodara-390002. Gujarat, India.  
Correo electrónico:shmishra48@rediffmail.com

## RESUMEN

Se analizó la actividad antioxidante *in vitro* del extracto de metanol de *Curculigo orchioides* mediante ensayo DPPH, barrido de superóxido, barrido de óxido nítrico, determinación del poder reductor y peroxidación lipídica *in vitro*.

El extracto de metanol resultó ser extremadamente eficaz en el barrido del radical superóxido ( $IC_{50}$  29.28  $\mu$ g/ml), mientras que la actividad fue moderada en el barrido del radical DPPH ( $IC_{50}$  105.94  $\mu$ g/ml), el radical de óxido nítrico ( $IC_{50}$  90.96  $\mu$ g/ml) y la inhibición de la peroxidación lipídica ( $IC_{50}$  94.78  $\mu$ g/ml). El extracto de metanol presentó distintos niveles de actividad antioxidante en los modelos analizados. También apoyó la actividad antioxidante al presentar un poder reductor significativo. Para facilitar su identificación y caracterización, se estableció un perfil de huella de cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPTLC) adicional del extracto de metanol.

El presente estudio ha demostrado la actividad antioxidante *in vitro* del extracto de metanol de *Curculigo orchioides*.

PALABRAS CLAVE: Actividad antioxidante. DPPH. Superóxido. Poder reductor.

## ABSTRACT

*Methanol extract of Curculigo orchioides was screened for in-vitro antioxidant activity using DPPH assay, superoxide scavenging, nitric oxide scavenging, determination of reducing power and in-vitro lipid peroxidation.*

*Methanol extract was found to be extremely effective in scavenging superoxide radical ( $IC_{50}$  29.28  $\mu$ g/ml) whereas activity was moderate in scavenging DPPH radical ( $IC_{50}$  105.94  $\mu$ g/ml), nitric oxide radical ( $IC_{50}$  90.96  $\mu$ g/ml) and in inhibition of lipid peroxidation ( $IC_{50}$  94.78  $\mu$ g/ml). Methanol extract showed different levels of antioxidant activities in tested models. It also supported anti oxidant activity by showing significant reducing power. Further HPTLC finger print profile of the methanol extract was established to facilitate its identification and characterization.*

*Present study demonstrated antioxidant activity of methanol extract of Curculigo orchioides in-vitro.*

KEY WORDS: Antioxidant activity. DPPH. Superoxide. Reducing power.

## INTRODUCCIÓN

Las evidencias experimentales sugieren que los radicales libres (RL) y las especies reactivas de oxígeno (ERO) pueden estar relacionadas con un gran número de enfermedades<sup>1</sup>. Como las plantas producen gran cantidad de fracciones químicas que actúan como antioxidantes para controlar el estrés oxidativo causado por la radiación solar y el oxígeno, pueden servir de fuente para la obtención de nuevos compuestos antioxidantes. En la medicina *ayurveda*, un antiguo sistema medicinal indio, se utilizan, como una de las especialidades clínicas para la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades, un gran número de plantas medicinales que se consideran activas debido a su composición química y que se denominan '*Rasayana*'. *Rasayana* no es sólo una terapia farmacológica, sino un procedimiento especializado que se practica en forma de recetas rejuvenecedoras y regímenes dietéticos que promueven buenos hábitos. La finalidad de *rasayana* es doble: prevenir la enfermedad y contrarrestar el proceso de envejecimiento resultante de la optimización de la homeostasis<sup>2</sup>. Sharma et al. han publicado la fuerte actividad antioxidante que presentan los fármacos *rasayana*<sup>3</sup>. En el sistema de medicina ayurvédica se han identificado como *rasayanas* unas 34 plantas<sup>4</sup>. Se han descrito diversas propiedades farmacológicas de estas plantas, inmunoestimulantes, tonificantes, neuroestimulantes, anti-envejecimiento, antibacterianas, antivirales, anti-reumáticas, anticancerígenas, adaptogénicas, anti-estrés, etc. Algunas de estas plantas se han investigado específicamente por su bien demostrada actividad antioxidante.

*Curculigo orchioides* Gaertn (familia: Amaryllidaceae) es una pequeña hierba que crece en India en el Himalaya subtropical desde Kumaon hacia el este y en las montañas Ghats occidentales desde Konkan hacia el sur. Sus raíces tuberosas se consideran tónicas, curativas, emolientes, diuréticas y reconstituyentes<sup>5</sup>. En la medicina tradicional china se utilizan rizomas secos de *C. orchioides* como agente tonificante para el tratamiento del deterioro de la fuerza física<sup>6</sup>. Se ha publicado que tienen numerosos usos medicinales, y sus rizomas son un componente de varias preparacio-

## INTRODUCTION

Experimental evidence suggests that free radicals (FR) and reactive oxygen species (ROS) can be involved in high number of diseases<sup>1</sup>. As plant produce lot of chemical moieties as antioxidants to control oxidative stress caused by sunbeams and oxygen, these can serve as source of new antioxidant compounds. *Ayurveda*, an ancient Indian system of medicine, follow in prevention and treatment of various diseases a group of large number of medicinal plants which are considered active due to chemical constituents and are designated as '*Rasayana*' as one of the clinical specialties. *Rasayana* is not only a drug therapy but is a specialized procedure practiced in the form of rejuvenating recipes, dietary regimen promoting good habits. The purpose of *rasayana* is two-fold: prevention of disease and counteracting aging process, which result from optimization of homeostasis<sup>2</sup>. Sharma et al. reported the strong antioxidant activity shown by *rasayana* drugs<sup>3</sup>. Around 34 plants are identified as *Rasayanas* in the *Ayurvedic* system of medicine<sup>4</sup>. These plants are described to possess various pharmacological properties such as Immunostimulant, Tonic, Neurostimulant, Anti-ageing, Anti-bacterial, Anti-viral, Anti-rheumatic, Anti-cancer, Adaptogenic, Anti-stress etc. Among these plants enlisted, some have been specifically investigated for their well demonstrated antioxidant activity.

*Curculigo orchioides* Gaertn. (Family: Amaryllidaceae) is small herb found in India in the sub tropical Himalayas from Kumaon eastwards and in the western ghats from konkan southwards. Its tuberous roots are considered tonic, alterative, demulcent, diuretic and restorative<sup>5</sup>. Dried rhizomes of *C. orchioides* are used in Chinese traditional medicine as a tonic agent for treatment of decline in physical strength<sup>6</sup>. It has been reported to have many medicinal uses, and rhizomes are a component of several *Ayurvedic* preparations<sup>7</sup>. It is claimed to be a medical cure for piles, asthma, jaundice, diarrhoea, colic, gonorrhoea and to be a aphrodisiac<sup>8</sup>.

There is paucity of data available on *in-vitro* antioxidant activity of methanol extract of *C. orchioides*. Therefore present work aims

nes ayurvédicas<sup>7</sup>. Se cree que es una cura médica para las hemorroides, el asma, la ictericia, la diarrea, los cólicos y la gonorrea, y se cree que es afrodisíaca<sup>8</sup>.

Los datos disponibles sobre la actividad antioxidante *in vitro* del extracto de metanol de *C. orchioides* son escasos. Por ello, el objeto del presente trabajo es el estudio del efecto del extracto de metanol de *C. orchioides* en distintos modelos antioxidantes *in vitro*.

## MÉTODOS

### *Material de la planta*

Se recolectaron rizomas secos de *C. orchioides* en el mercado local de la ciudad de Baroda, Gujarat, India, y se autenticaron en el Departamento de Botánica de la Universidad M.S. University de Baroda, India. La maceración de rizomas secos molidos de *C. orchioides* a temperatura ambiente durante 72 horas permitió obtener el extracto de metanol con un rendimiento del 6.65% (p/p). El análisis fitoquímico reveló la presencia de alcaloides, fenoles y taninos, saponinas y esteroides en el extracto de metanol.

### *Perfil de huella de cromatografía de capa fina (TLC) del extracto de metanol*

El perfil de huella de TLC del extracto de metanol de *C. orchioides* se estableció mediante cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPTLC). Se preparó una solución de almacenamiento (1 mg/ml) de extracto en metanol. Unas gotas de la solución de almacenamiento, diluida adecuadamente, se colocaron sobre placas de TLC G60 F254 previamente recubiertas de gel de sílice utilizando un detector CAMAG Linomat V Automatic Sample Spotter, y las placas se desarrollaron en sistemas de disolventes de distintas polaridades para resolver los componentes polares y no polares del extracto. Las placas se analizaron en un escáner TLC Scanner 3 (CAMAG) a 254 nm (modo de absorbancia/reflectancia) y a 366 nm (modo de fluorescencia/reflectancia), y se registraron los valores de R<sub>f</sub>, espectros,  $\lambda_{\text{máx}}$  y picos de las bandas re-

at studying effect of methanol extract of *C. orchioides* in different *in-vitro* antioxidant models.

## METHODS

### *Plant material*

Dried rhizomes of *C. orchioides* were collected from local market of Baroda city, Gujarat and authenticated in Botany Department of M.S. University, Baroda. Maceration of dried, powdered rhizomes of *C. orchioides* at room temperature for 72 hours afforded methanol extract in 6.65% (w/w) yield. Methanol extract showed presence of alkaloids, phenolics and tannins, saponins, steroids on phytochemical screening.

### *TLC finger print profile of methanol extract*

TLC finger print profile was established for methanol extract of *C. orchioides* using HPTLC. A stock solution (1mg/ml) of extract was prepared in methanol. Suitably diluted stock solution was spotted on pre-coated Silica gel G60 F254 TLC plates using CAMAG Linomat V Automatic Sample Spotter and the plates were developed in solvent systems of different polarities to resolve polar and non-polar components of the extract. The plates were scanned using TLC Scanner 3 (CAMAG) at 254 nm (absorbance/reflectance mode) and 366 nm (fluorescence/reflectance mode) and R<sub>f</sub> values, spectra,  $\lambda_{\text{max}}$  and peak areas of resolved bands were recorded. Relative percentage area of each of bands was calculated from peak areas. Developed chromatograms in different solvent systems were then sprayed with phosphomolybdic acid reagent to detect phenolic compounds.

### *In-vitro antioxidant activity:*

#### Assay for antiradical activity with DPPH

Antiradical activity was measured by a decrease in absorbance at 516 nm of a methanolic solution of colored 1, 1, diphenyl picryl

sueñas. El área porcentual relativa de cada una de las bandas se calculó a partir de las áreas pico. A continuación, los cromatogramas desarrollados en distintos sistemas de disolventes se pulverizaron con reactivo de ácido fosfomolibdico, para detectar compuestos fenólicos.

#### *Actividad antioxidante in vitro:*

##### Estudio de la actividad antirradical con DPPH

La actividad antirradical se midió mediante el descenso en la absorbancia a 516 nm de una solución metanólica de 1, 1, difenil picril hidracina provocado por la muestra. Se preparó una solución de almacenamiento de DPPH disolviendo 4.4 mg en 3.3 ml de metanol. El medio de análisis incluye 150 ml de solución DPPH junto con distintas concentraciones de muestras en 3 ml de metanol. El blanco se realizó de la misma manera, sin añadir ninguna muestra. Después de 15 minutos, se registró el descenso en la absorbancia en presencia de la muestra. El  $IC_{50}$  se calculó como una reducción del 50% en la absorbancia ocasionada por la muestra en comparación con el blanco<sup>9</sup>. Como estándar se utilizó curcumina.

##### Estudio de la actividad de barrido de radicales de superóxido

El estudio se basó en la capacidad de la muestra para inhibir la formación de formazon azul mediante el barrido de los radicales superóxido generados en el sistema riboflavina-luz-azul de nitrotetrazolio (NBT). El medio de reacción contenía 2.5 ml de tampón fosfato (pH 7.6), 100  $\mu$ l de riboflavina (20  $\mu$ g), 200  $\mu$ l de EDTA (12 mM), 100  $\mu$ l de NBT (0.1 mg) y distintas concentraciones de muestra en 100  $\mu$ l de metanol. Para iniciar la reacción, se iluminó la mezcla de reacción durante 5 minutos. La absorbancia se midió a 590 nm. El blanco se realizó de la misma manera, pero con 100 l de metanol en lugar de la sustancia de análisis. El  $IC_{50}$  se calculó como una reducción del 50% en la absorbancia ocasionada por la muestra en comparación con el blanco<sup>10</sup>. Como estándar se utilizó ácido ascórbico.

hydrazine brought about by sample. A stock solution of DPPH was prepared by dissolving 4.4 mg in 3.3 ml methanol. Test medium includes 150ml of DPPH solution along with different concentration of samples in 3 ml methanol. Blank was performed in the same way with no sample added. Decrease in absorbance, in presence of sample was noted after 15 minutes.  $IC_{50}$  was calculated as 50% reduction in absorbance brought about by sample compared with blank<sup>9</sup>. Curcumin was used as standard.

##### Assay for superoxide radical scavenging activity

The assay was based on capacity of the sample to inhibit blue formazon formation by scavenging the superoxide radicals generated in riboflavin-light-nitro blue tetrazolium (NBT) system. The reaction medium contains phosphate buffer (pH 7.6) 2.5 ml, 100 $\mu$ l riboflavin (20 $\mu$ g), 200 $\mu$ l EDTA (12mM), 100 $\mu$ l NBT (0.1 mg) and different concentration of sample contained in 100ml of methanol. The reaction was started by illuminating the reaction mixture for 5 minutes. The absorbance was measured at 590 nm. Blank was performed in the same way with 100ml of methanol instead of test substance.  $IC_{50}$  was calculated as 50% reduction in absorbance brought about by sample compared with blank<sup>10</sup>. Ascorbic acid was used as standard.

##### Assay for nitric oxide scavenging activity

Nitric oxide was generated from sodium nitroprusside and measured by Griess reaction. Sodium nitroprusside in aqueous solution at physiological pH spontaneously generates nitric oxide which interacts with oxygen to produce nitrite ions which can be estimated by use of Griess reagent. Scavengers of nitric oxide compete with oxygen leading to reduced production of nitric oxide. Sodium nitroprusside (5mM) in phosphate buffered saline was mixed with different concentrations of test extracts dissolved in methanol and incubated at room temperature for 150 minutes. Blank without test extract but equivalent amount of

### Estudio de la actividad de barrido del óxido nítrico

El óxido nítrico se generó a partir de nitroprusiato de sodio y se midió mediante la reacción de Griess. El nitroprusiato de sodio en solución acuosa con pH fisiológico genera espontáneamente óxido nítrico, que reacciona con el oxígeno produciendo iones de nitrito que se pueden estimar mediante el reactivo de Griess. Los barredores de óxido nítrico compiten con el oxígeno, ocasionando una reducción en la producción de óxido nítrico. El nitroprusiato de sodio (5 mM) en solución salina de tampón fosfato se mezcló con distintas concentraciones de extractos de análisis disueltos en metanol e incubadas a temperatura ambiente durante 150 minutos. Se realizó el mismo proceso con el blanco sin muestra pero con la cantidad equivalente de metanol. Después se retiraron las soluciones de incubación y una cantidad igual de reactivo Griess (1% sulfanilamida, 2% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y 0.1% naftiletildiamida). La lectura de absorbencia del cromóforo formado se realizó a 546 nm. El IC<sub>50</sub> se calculó como una reducción del 50% en la absorbencia ocasionada por la muestra en comparación con el blanco<sup>11</sup>. El estándar utilizado fue curcumina.

### Determinación del poder reductor

El poder reductor del ME se determinó por el método de Oyaizu<sup>12</sup>. Se mezclaron las muestras con 5 ml de tampón fosfato (2 M, pH 6.6) y 5 ml de ferrocianuro potásico (1%); a continuación, se incubó la mezcla a 50 °C durante 20 minutos, se añadieron 5 ml de ácido tricloroacético (10%) y se centrifugó la mezcla a 4000 r. p. m. Seguidamente, se mezclaron 5 ml de solución superior con 5 ml de agua destilada y 1 ml de cloruro férrico (0.1%). La absorbencia se midió a 700 nm. El aumento de absorbencia de la mezcla de reacción indicó un aumento de poder reductor. Como estándar se utilizó ácido ascórbico (0.3 mg).

methanol was conducted in an identical manner. After incubation solutions were removed and equal amount of Griess reagent (1% sulfanilamide, 2% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride). The absorbance of the chromophore formed was read at 546nm. IC<sub>50</sub> was calculated as 50% reduction in absorbance brought about by sample compared with blank<sup>11</sup>. Standard used was Curcumin.

### Determination of reducing power

The reducing power of ME was determined according to the method of Oyaizu<sup>12</sup>. Samples were mixed with 5 ml phosphate buffer (2M, pH 6.6) and 5 ml potassium ferricyanide (1%), the mixture was then incubated at 50° C for 20 minutes, 5 ml trichloroacetic acid (10%) was added and the mixture was centrifuged at 4000 rev./ min. The upper 5 ml solution was then mixed with 5 ml distilled water and 1 ml ferric chloride (0.1%). The absorbance was measured at 700 nm. Increased absorbance of the reaction mixture indicated increased reducing power. Ascorbic acid (0.3 mg) was used as standard.

### Measurement of effect on lipid peroxidation on rat liver homogenate

Rat liver homogenate was prepared by homogenizing the tissue in chilled Tris buffer (10mM, pH 7.4) at a concentration of 10% w/v; peroxidation was induced in liver tissue by Iron-ADP complex in the presence of ascorbic acid. The incubation medium constituted 0.5 ml of the liver homogenate (10% w/v), 100 μM FeCl<sub>3</sub>, 1.7 μM ADP, 500 μM of ascorbate and different concentrations of samples in 2 ml of total incubation medium. The medium was incubated for 20 min. at 37°C. Extent of lipid peroxidation was measured by estimation of malondialdehyde (MDA) content<sup>13</sup>. Results were expressed in terms of decrease in MDA formation by the sample extract. Ascorbic acid was used as positive control.

### Medición del efecto en la peroxidación lipídica en homogeneizado de hígado de rata

El homogeneizado de hígado de rata se preparó homogeneizando el tejido en tampón Tris frío (10 mM, pH 7.4) en una concentración al 10% p/v; la peroxidación del tejido hepático se indujo mediante complejo hierro-ADP en presencia de ácido ascórbico. El medio de incubación constituía 0.5 ml del homogeneizado de hígado (10% p/v), 100  $\mu$ M de FeCl<sub>3</sub>, 1.7  $\mu$ M de ADP, 500  $\mu$ M de ascorbato y distintas concentraciones de muestras en 2 ml de medio de incubación total. El medio se incubó durante 20 min. a 37 °C. El grado de peroxidación lipídica se midió mediante la estimación del contenido de malondialdehído (MDA)<sup>13</sup>. Los resultados se expresaron en términos de descenso en la formación de MDA en el extracto de la muestra. Como control positivo se utilizó ácido ascórbico.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La participación de especies de oxígeno reactivas en la etiología y fisiopatología de enfermedades humanas tales como trastornos neurodegenerativos, inflamación, infección viral, patologías autoinmunes y trastornos del sistema digestivo tales como inflamación gastrointestinal y úlcera gástrica, es ya evidente. Para comprender el papel de estas especies de oxígeno reactivas en diversos trastornos y el posible efecto protector antioxidante de los compuestos naturales en los tejidos afectados son cuestiones de gran interés en la actualidad. Inicialmente, es necesario investigar *in vitro* las propiedades antioxidantes de cualquier fármaco o producto natural antes de considerarlo una sustancia antioxidante, y realizar a continuación una evaluación de su función antioxidante en sistemas biológicos<sup>14</sup>.

Por tanto, en el presente estudio se ha evaluado primero la actividad antioxidante *in vitro* del extracto de metanol de rizomas de *C.orchioides*.

### RESULTS AND DISCUSSION

The participation of reactive oxygen species in etiology and physiopathology of human disease, such as neurodegenerative disorders, inflammation, viral infection, autoimmune pathologies and digestive system disorders such as gastrointestinal inflammation and gastric ulcers is already evident. To understand role of these reactive oxygen species in several disorders and potential antioxidant protective effect of natural compounds on affected tissues are topics of high current interest. Initially it is necessary to investigate *in-vitro* antioxidant properties of any natural product or drug to consider it as an antioxidant substance, followed by evaluation of its antioxidant function in biological systems<sup>14</sup>.

In the present attempt therefore antioxidant activity of the methanol extract of rhizomes of *C.orchioides* was first evaluated *in-vitro*.

#### *In-vitro antioxidant activity:*

DPPH is a stable free radical in aqueous or ethanol solution and accepts an electron or hydrogen radical to become a stable diamagnetic molecule<sup>15</sup>. In order to evaluate antioxidant potency through free radical scavenging with the test samples, the change in the optical density of DPPH radicals is monitored. Hence, DPPH $\cdot$  is usually used as a substrate to evaluate antioxidative activity of antioxidants<sup>16</sup>. Methanol extract showed a concentration dependent antiradical activity by inhibiting DPPH radical with an IC<sub>50</sub> value of 105.99  $\mu$ g/ml (Table 1). It showed two times less inhibitory activity on DPPH stable radical than standard Curcumin which showed IC<sub>50</sub> at 52.71  $\mu$ g/ml.

*Actividad antioxidante in vitro:*

El DPPH es un radical libre estable en solución acuosa o de etanol y acepta un electrón o un radical hidrógeno para convertirse en una molécula diamagnética estable<sup>15</sup>. Para evaluar la potencia antioxidante mediante el barrido de radicales en las muestras del análisis, se registra la densidad óptica de los radicales DPPH. Por ello, el DPPH se utiliza habitualmente como sustrato para evaluar la actividad antioxidante de los antioxidantes<sup>16</sup>. El extracto de metanol presentó una actividad antirradical dependiente de la concentración inhibiendo el radical DPPH con un valor IC<sub>50</sub> de 105.99 µg/ml (Tabla 1). Su actividad inhibitoria fue dos veces menor en el radical DPPH estable que el estándar de curcumina, que presentó un IC<sub>50</sub> de 52.71 µg/ml.

**TABLA 1:** Actividad antirradical del extracto de metanol de *C.orchioides* observada con DPPH.

**TABLE 1.** Antiradical activity of methanol extract of *C.orchioides* observed with DPPH.

| Muestras<br>Samples                            | Concentración (µm/ml)<br>Concentration (µg/ml) | % de inhibición<br>% inhibition | IC <sub>50</sub> (µm/ml)<br>IC <sub>50</sub> (µg/ml) |
|--|--|---------------------------------|--|
| Extracto de metanol<br><i>Methanol extract</i> | 25   | 4.503 ± 1.353                   | 105.99   |
|  | 50   | 15.613 ± 3.447                  |  |
|  | 75   | 41.963 ± 2.153                  |  |
|  | 100  | 67.563 ± 1.032                  |  |
|  | 200  | 83.780 ± 0.341                  |  |
| Curcumina<br><i>Curcumin</i>                   |  |                                 | 52.71  |

Los valores son la media ± E.S.M. de tres análisis replicados.

Values are mean ± S.E.M. of three replicate analyses.

Se sabe que el radical superóxido es muy perjudicial para los componentes celulares, como precursor de especies de oxígeno más reactivas<sup>17</sup>. El extracto de metanol demostró ser un barredor del radical superóxido generado en el sistema riboflavina-NBT-luz *in vitro*. El valor de IC<sub>50</sub> registrado fue de 29.28 µg/ml. La actividad barridora del superóxido del extracto fue comparable a la del estándar de ácido ascórbico, que presentó un valor de IC<sub>50</sub> de 23.52 µg/ml (Tabla 2).

Superoxide radical is known to be very harmful to cellular components as precursor of more reactive oxygen species<sup>17</sup>. Methanol extract was found as scavenger of superoxide radical generated in riboflavin-NBT-light system *in-vitro*. IC<sub>50</sub> value was found 29.28 µg/ml. Superoxide scavenging activity of extract was comparable with standard ascorbic acid which showed IC<sub>50</sub> value 23.52 µg/ml (Table 2).

**TABLA 2:** Actividad de barrido del aniones superóxido del extracto de metanol de *C.orchioides* observada con un sistema de riboflavina-luz-NTB.

**TABLE 2.** Superoxide anion scavenging activity of methanol extract of *C.orchioides* observed with a riboflavin-light-NBT system.

| Muestras<br>Samples                            | Concentración (µm/ml)<br>Concentration (µg/ml) | % de inhibición<br>% inhibition | IC <sub>50</sub> (µm/ml)<br>IC <sub>50</sub> (µg/ml) |
|--|--|---------------------------------|--|
| Extracto de metanol<br><i>Methanol extract</i> | 10   | 23.13 ± 0.680                   | 29.28  |
|  | 20   | 47.93 ± 0.527                   |  |
|  | 30   | 50.61 ± 0.236                   |  |
|  | 40   | 60.82 ± 1.244                   |  |
|  | 50   | 71.43 ± 1.178                   |  |
| Ácido ascórbico<br><i>Ascorbic acid</i>        |  |                                 | 23.52  |

Los valores son la media ± E.S.M. de tres análisis replicados.

Values are mean ± S.E.M. of three replicate analyses.

Además de las especies de oxígeno reactivas, el óxido nítrico también está implicado en condiciones de inflamación, cáncer y otras patologías<sup>18</sup>. El extracto de metanol presentó una actividad moderada en el barrido del óxido nítrico, en comparación con el estándar de curcumina (Tabla 3).

In addition to reactive oxygen species, nitric oxide is also implicated in inflammation, cancer and other pathological conditions<sup>18</sup>. Methanol extract showed moderate activity in scavenging nitric oxide compared to standard Curcumin (Table 3).

**TABLA 3:** Actividad de barrido del óxido nítrico del extracto de metanol de *C.orchioides*.

**TABLE 3.** Nitric oxide scavenging activity of methanol extract of *C.orchioides*.

| Muestras<br>Samples                            | Concentración (µm/ml)<br>Concentration (µg/ml) | % de inhibición<br>% inhibition | IC <sub>50</sub> (µm/ml)<br>IC <sub>50</sub> (µg/ml) |
|--|--|---------------------------------|--|
| Extracto de metanol<br><i>Methanol extract</i> | 60   | 43.28 ± 2.21                    | 90.96  |
|  | 80   | 47.40 ± 2.56                    |  |
|  | 100  | 50.69 ± 1.00                    |  |
|  | 120  | 56.68 ± 1.09                    |  |
|  | 140  | 65.82 ± 1.20                    |  |
| Curcumina<br><i>Curcumin</i>                   |  |                                 | 21.59  |

Los valores son la media ± E.S.M. de tres análisis replicados.

Values are mean ± S.E.M. of three replicate analyses.



La medición de la capacidad reductiva se realizó mediante transformación de Fe<sup>3+</sup>-Fe<sup>2+</sup> en presencia de extracto de metanol y de estándar antioxidante, ácido ascórbico<sup>12</sup>. El poder reductor se asocia a la actividad antioxidante. Como se indica en la Tabla 4, el extracto de metanol presentó un poder reductor comparable al estándar a una concentración más elevada, de 15 mg/ml.

The measurement of reductive ability was done by Fe<sup>3+</sup>-Fe<sup>2+</sup> transformation in the presence of methanol extract and standard antioxidant, ascorbic acid<sup>12</sup>. The reducing power is associated with antioxidant activity. As shown in Table 4, methanol extract showed reducing power comparable with standard at higher concentration i.e. at 15 mg/ml.

**TABLA 4:** Determinación del poder reductor de distintas concentraciones de extracto de metanol de *C.orchioides*

**TABLE 4.** Reducing power determination of different concentrations of methanol extract of *C.orchioides*

| Muestra<br>Sample                              | Poder reductor de distintas concentraciones (mg/ml)<br>Reducing powers of different concentrations (mg/ml). |              |              |              |
|--|---|--------------|--------------|--------------|
| Extracto de metanol<br><i>Methanol extract</i> | 0.0   | 5.0          | 10.0         | 15.0         |
|  | 0.028 ± 0.01  | 0.105 ± 0.13 | 0.258 ± 0.26 | 0.363 ± 0.10 |

Los valores son la media ± E.S.M. de tres análisis replicados.

Como estándar se utilizó ácido ascórbico (0.3 mg), con una lectura de 0.430 a 700 nm.

Values are mean ± S.E.M. of three replicate analyses.

Ascorbic acid (0.3 mg) was used as standard, giving a reading of 0.430 at 700 nm.

La peroxidación lipídica se inicia con el ataque de los radicales libres a los ácidos grasos insaturados, y se propaga mediante un ciclo de reacción en cadena<sup>19</sup>. Como los ácidos grasos insaturados son los componentes más importantes de las membranas biológicas y aportan propiedades deseables a la fluidez de la estructura de la membrana celular, la peroxidación de los ácidos grasos insaturados en las membranas biológicas lleva a la aparición de trastornos en la estructura y el funcionamiento de la membrana<sup>20</sup>. En concreto, el O<sub>2</sub><sup>-</sup> y el ·OH inducen diversos daños en los órganos circundantes y desempeñan una papel esencial en algunos trastornos clínicos. Por tanto, la eliminación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y ·OH es la defensa más eficaz del organismo vivo contra la enfermedad<sup>21</sup>. Todos los compuestos, naturales o sintéticos, que tengan propiedades antioxidantes pueden aliviar total o parcialmente estos daños. En el presente estudio, el extracto de metanol demostró una fuerte inhibición de la peroxidación lipídica inducida por el complejo hierro/ADP/ascorbato en homogeneizado de hígado de rata. El valor de IC<sub>50</sub> fue 94.78 µg/

Lipid peroxidation is initiated by radicals attacking unsaturated fatty acids, and propagated by a chain reaction cycle<sup>19</sup>. Since unsaturated fatty acids are most important components of biological membranes and impart desirable properties upon the fluidity of cellular membrane structure, the peroxidation of unsaturated fatty acids in biological membranes leads to disruption of membrane structure and function<sup>20</sup>. In particular O<sub>2</sub><sup>-</sup> and ·OH induce various injuries to the surrounding organs and play a vital role in some clinical disorders. Therefore removal of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and ·OH is the most effective defense of the living body against disease<sup>21</sup>. Any compound —natural or synthetic— with antioxidant properties might totally or partially alleviate this damage. In the present study methanol extract showed potent inhibition of lipid peroxidation induced by Iron/ADP/Ascorbate complex in rat liver homogenate, IC<sub>50</sub> value was 94.78 µg/ml. It showed dose dependent inhibition of lipid peroxidation. Standard ascorbic acid showed IC<sub>50</sub> value 30.05 µg/ml (Table 5).

ml. La inhibición de la peroxidación lipídica era dosisdependiente. El estándar de ácido ascórbico presentó un valor de  $IC_{50}$  de 30.05  $\mu\text{g/ml}$  (Tabla 5).

**TABLA 5:** Inhibición con extracto de metanol de *C.orchioides* de la peroxidación lipídica inducida por un sistema de hierro/ADP/ascorbato en homogeneizado de hígado de rata.

**TABLE 5.** Inhibition of lipid peroxidation induced by iron/ADP/ascorbate system in rat liver homogenate by methanol extract of *C.orchioides*

| <b>Muestras<br/>Samples</b>                    | <b>Concentración (<math>\mu\text{m/ml}</math>)<br/>Concentration (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b> | <b>% de inhibición<br/>% inhibition</b> | <b><math>IC_{50}</math> (<math>\mu\text{m/ml}</math>)<br/><math>IC_{50}</math> (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b> |
|--|--|---|--|
| Extracto de metanol<br><i>Methanol extract</i> | 25   | 14.24 $\pm$ 0.77                        | 94.78  |
|  | 50   | 24.33 $\pm$ 0.75                        |  |
|  | 75   | 39.93 $\pm$ 0.42                        |  |
|  | 100  | 51.14 $\pm$ 1.06                        |  |
|  | 125  | 67.57 $\pm$ 1.08                        |  |
| Ácido ascórbico<br><i>Ascorbic acid</i>        |  |   | 30.05  |

Los valores son la media  $\pm$  E.S.M. de tres análisis replicados.

Values are mean  $\pm$  S.E.M. of three replicate analyses.

En los últimos años, la cromatografía de capa fina de alto rendimiento se ha revelado como una herramienta potencial para una evaluación fitoquímica rápida y útil de los fármacos herbales<sup>22,23,24</sup>. Para caracterizar el extracto de metanol se ha utilizado el perfil de huella de TLC. Para resolver todos los componentes presentes en la fracción se han utilizado tres sistemas de disolventes de distintas polaridades (Tabla 6 y Fig. 1).

In the past few years high performance thin layer chromatography has emerged as a potential tool for rapid and useful phytochemical evaluation of herbal drugs<sup>22, 23, 24</sup>. TLC fingerprint profile established for methanol extract to characterize it. Three solvent systems of different polarities are used to resolve all components present in fraction (Table 6 and Fig. 1).

**TABLA 6:** Perfil de huella de TLC del extracto de metanol de *C. orchioides*.

**TABLE 6.** TLC finger printing profile of methanol extract of *C. orchioides*.

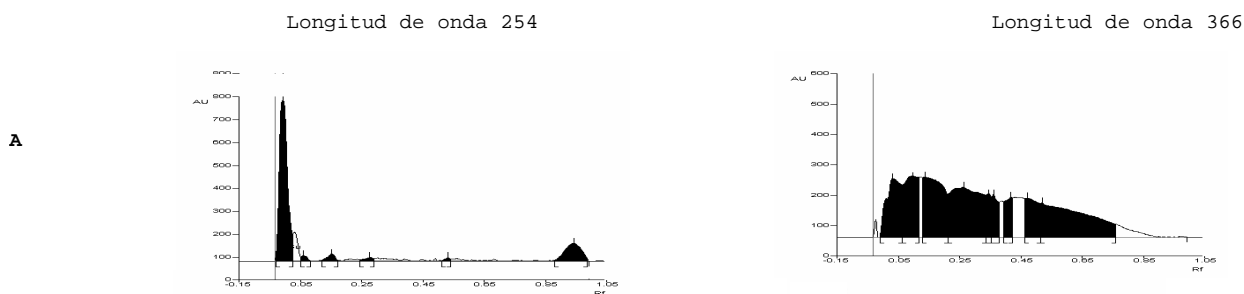
| Analizado a<br>Scanned at | Sistema de disolvente 1<br>Solvent system 1 |                 |                                 | Sistema de disolvente 2<br>Solvent system 2 |                 |                                 | Sistema de disolvente 3<br>Solvent system 3 |                 |                                 |
|---------------------------|---|-----------------|---------------------------------|---|-----------------|---------------------------------|---|-----------------|---------------------------------|
|                           | Rf  | $\lambda_{max}$ | Porcentaje Relativo<br>Relative | Rf  | $\lambda_{max}$ | Porcentaje Relativo<br>Relative | Rf  | $\lambda_{max}$ | Porcentaje Relativo<br>Relative |
| 254 nm                    | 0.03*                                       | 297             | 76.18                           | 0.13  | 289             | 51.32                           | 0.12  | 700             | 2.16                            |
|                           | 0.09  | 409             | 1.63                            | 0.16  | 200             | 2.75                            | 0.20*                                       | 200             | 1.47                            |
|                           | 0.17  | 700             | 3.02                            | 0.24*                                       | 290             | 12.24                           | 0.41*                                       | 286             | 68.46                           |
|                           | 0.29  | 700             | 1.68                            | 0.31*                                       | 286             | 10.47                           | 0.69  | 200             | 7.40                            |
|                           | 0.54  | 700             | 0.95                            | 0.39*                                       | 288             | 11.74                           | 0.74  | 200             | 9.56                            |
|                           | 0.99*                                       | 263             | 16.55                           | 0.44*                                       | 200             | 3.60                            | 0.82  | 200             | 6.02                            |
|                           |   |                 |                                 | 0.49  | 700             | 2.23                            | 0.91*                                       | 200             | 2.28                            |
|                           |   |                 |                                 | 0.58  | 200             | 2.70                            | 0.94  | 263             | 2.64                            |
| 366 nm                    |   |                 |                                 | 0.88  | 700             | 2.93                            |   |                 |                                 |
|                           | 0.06  | 289             | 11.70                           | 0.05*                                       | 700             | 4.75                            | 0.05*                                       | 700             | 4.75                            |
|                           | 0.12*                                       | 306             | 11.52                           | 0.16*                                       | 200             | 11.30                           | 0.16  | 200             | 11.30                           |
|                           | 0.21  | 200             | 16.42                           | 0.30  | 200             | 21.99                           | 0.30  | 200             | 21.99                           |
|                           | 0.34  | 292             | 20.93                           | 0.42  | 200             | 6.43                            | 0.42  | 286             | 6.43                            |
|                           | 0.36  | 290             | 2.70                            | 0.59  | 200             | 3.59                            | 0.59  | 200             | 3.59                            |
|                           | 0.38  | 288             | 3.91                            | 0.74*                                       | 200             | 2.12                            | 0.74  | 200             | 2.12                            |
|                           | 0.43*                                       | 200             | 4.42                            | 0.95  | 200             | 49.82                           | 0.95  | 200             | 49.82                           |
| 0.51*                     | 288   | 6.86            |                                 |   |                 |                                 |   |                 |                                 |
| 0.76*                     | 700   | 21.55           |                                 |   |                 |                                 |   |                 |                                 |

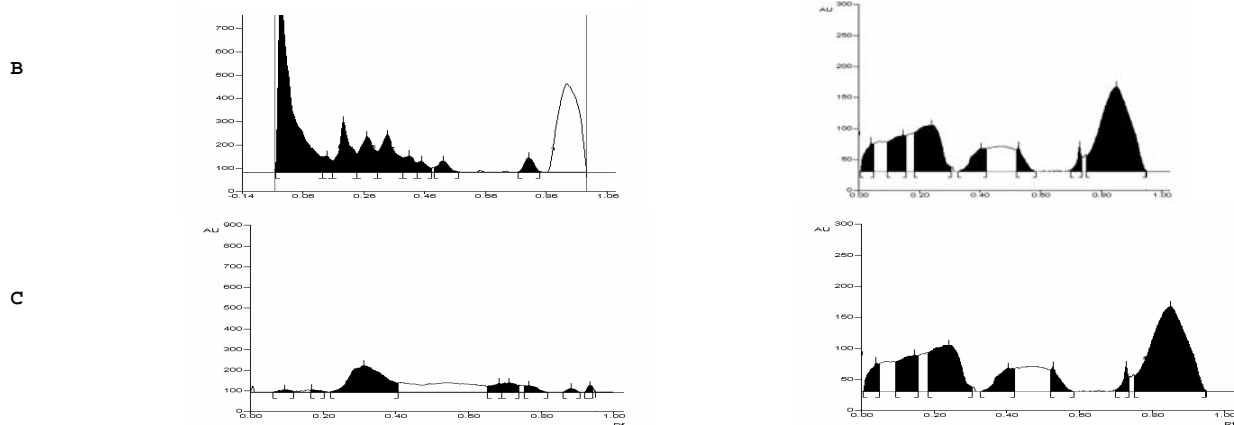
Sistema de disolvente 1. Acetato de etilo/tolueno (7:3 v/v); Sistema de disolvente 2. Acetato de etilo/metanol/agua (10:1.35:1.00 v/v); Sistema de disolvente 3. n-butanol/ácido acético glacial/agua (6:2:2 v/v). \* bandas que mostraron una reacción positiva al componente fenólico con reactivo ácido fosfomolibdico.

Solvent system 1. Toluene/Ethyl acetate (7:3 v/v); Solvent system 2. Ethyl acetate/Methanol/Water (10:1.35:1.00 v/v); Solvent system 3. n-butanol/glacial acetic acid/water (6:2:2 v/v). \* bands that showed positive reaction for phenolic compound with phosphomolybdic acid reagent.

**FIGURA 1.** Cromatograma TLC del extracto de metanol de *C. orchioides* en tres sistemas distintos de disolvente analizados a 254 y 366 nm (sistemas de disolventes indicados en la Tabla VI) **A:** Sistema de disolvente 1, **B:** Sistema de disolvente 2, **C:** Sistema de disolvente 3.

**FIGURE 1.** TLC chromatogram of methanol extract of *C. orchioides* run in three different solvent system and scanned at 254 and 366 nm (solvent systems as in Table VI) **A-** Solvent system 1, **B-** Solvent system 2, **C-** Solvent system 3.





Las investigaciones fitoquímicas de *C. orchiooides* revelaron la presencia de un nuevo triterpenoide pentacíclico<sup>25</sup>. Se ha comunicado la presencia de cuatro glucósidos fenólicos, identificados como curculigósido, glucósido de orcinol, curculigina A y corchiosido<sup>26,27</sup>. Además de estos constituyentes, se han detectado también glucósidos de tipo cicloartano y sus glucósidos<sup>28</sup>. Estudios recientes demuestran que ciertos productos de las plantas incluyen sustancias fenólicas, como flavonoides y taninos. Estas sustancias antioxidantes naturales tienen normalmente una fracción fenólica en su estructura molecular. Se han detectado entre flavonoides, tocoferoles y catequinas. Los ácidos orgánicos, carotenoides, hidrolizados de proteínas y taninos pueden actuar como antioxidantes o tener efectos sinérgicos cuando se utilizan conjuntamente con antioxidantes fenólicos. Los antioxidantes fenólicos tienen un gran poder destructor de radicales libres<sup>29</sup>. Los compuestos fenólicos, componentes biológicamente activos, son los principales agentes que pueden donar oxígeno a los radicales libres y de esta forma romper la cadena de la oxidación lipídica en el primer paso de iniciación. Este elevado potencial de los compuestos fenólicos para el barrido de radicales se puede deber a sus grupos hidroxilo fenólicos<sup>30</sup>. La actividad del extracto de metanol puede deberse a la presencia de glucósidos fenólicos. Sin embargo, el mecanismo exacto de actuación sólo se puede determinar tras la caracterización detallada de las fracciones activas del extracto.

Se puede concluir que la actividad de barrido de los radicales libres del extracto de

Phytochemical investigations on *C. orchiooides* revealed the presence of a novel pentacyclic triterpenoid<sup>25</sup>. Four phenol glycosides have been reported and identified as curculigoside, orcinol glucoside, curculigine A and corchioside<sup>26,27</sup>. Along with these constituents cycloartane type glycosides and their glycosides also reported<sup>28</sup>. Recent studies showed that a number of plants products include polyphenolic substances such as flavonoids and tannins. Those natural antioxidative substances usually have a phenolic moiety in their molecular structure. They have been found among flavonoids, tocopherols and catechines. Organic acids, carotenoids, protein hydrolysates and tannins can act as antioxidants or have synergistic effects when used together with phenolic antioxidants. Phenolic antioxidants are potent free radical terminators<sup>29</sup>. Phenolic compounds, biologically active components, are the main agents that can donate hydrogen to free radicals and thus break the chain reaction of lipid oxidation at the first initiation step. This high potential of phenolic compounds to scavenge radicals may be explained by their phenolic hydroxyl groups<sup>30</sup>. The activity of methanol extract may be due to presence of phenolic glycosides. The exact mechanism of action, however, could only be unfolded after detailed characterization of active moieties from extract.

It may be concluded that the free radical scavenging activity of methanol extract of *C. orchiooides* may follow one of the above mechanisms in exhibiting its effectiveness in traditional medicine. Further *in-vivo* studies on evaluation of drug are warranted. Studies

metanol de *C.orchioides* puede desarrollarse según uno de los mecanismos anteriores al demostrar su eficacia en la medicina tradicional. Se deben realizar estudios adicionales *in vivo* del fármaco. Ya se han iniciado estudios en estas líneas, cuyos resultados seguirán apareciendo en nuestras comunicaciones futuras.

## AGRADECIMIENTOS

A.R.Bafna desea dar las gracias a CSIR, New Delhi, India por su ayuda financiera (SRF) para el desarrollo de este trabajo.

on these lines have already been taken up and shall follow in our future communications.

## ACKNOWLEDGEMENT

A.R.Bafna wishes to thank to The CSIR, New Delhi, India for providing financial assistance (SRF) for carrying out this work.

## BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Richards RT, Sharma HM. Free radicals in health and disease. *Ind.J.Clinical Practice*. 1991; 2 (7): 15-26.
2. Scartezzini P, Speroni E. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. *J.Ethnopharmacol*. 2000; 71: 23-43.
3. Sharma HM, Hanna AN, Kauffman EM, Newman HAI. Inhibition of human low density lipo-protein oxidation in vitro by Maharishi Ayurveda herbal mixtures. *Pharmacol. Biochem. and Behavior*. 1992; 43: 1175-1182.
4. Sharma PV. Translation: Charka Samhita, Chikitsothana. 1981; Vol. II, 1<sup>st</sup> edition. Chaukhambha Orientalia, Varanasi.
5. Anonymous. Wealth of India. 1950; Vol.2. CSIR. New Delhi, India. 400.
6. Jiangsu College of New Medicine. Dictionary of China Traditional Medicine. 1979; People's Press. Shanghai. 1363.
7. Venkateshwarly J, Bhairavmurthy Rao PN. Flora of Vishakhapatnam. 1973; 191.
8. Kirtikar KR, Basu BD. Indian medicinal plants. 1935; Vol II. Leader Press. Allahabad, India. 2469.
9. Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 26: 1199-1200.
10. Beuchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Anal.Biochem*. 1971; 44: 276-277.
11. Sreejayan, Rao MNA. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J.Pharm.Pharmacol*. 1997; 49: 105-107.
12. Oyaizu M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn J. Nutr*. 1986; 44: 307-315.
13. Slater TF, Sawyer BC. The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other halosenoalkanes on peroxidative reactions in rat liver fractions in vitro. *Bin-Item. J*. 1971; 123:805-814.
14. Repetto MG, Llesuy SF. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcer. *Braz.J.med.Biol.Res*. 2002; 35(5):523-534.
15. Soares JR, Dinis TCP, Cunha AP, Ameida LM. Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Rad. Res*. 1997; 26: 469-478.
16. Duh PD, Tu YY, Yen GC. Antioxidant activity of water extract of harn g jwur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebensm.-Wiss.u-Technol*. 1999; 32: 269-277.
17. Halliwell B, Gutteridge JMC. In: Free radicals, ageing and disease. *Free radicals in Biology and Medicine*. 1985; 2<sup>nd</sup> edition. Clarendon Press. Oxford. 279-315.
18. Marletta MA. Nitric oxide: Biosynthesis and biological significance. *Trends Biol.Sci*. 1989; 14: 488-492.
19. Shimazaki H. Antioxidants. In: Niki E, Shimazaki, H, Mino, M (eds), *Free radicals and biological defense*. 1994; Japanese Science Societies Press. Tokyo. 45-57.
20. Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage: Protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J*. 1987; 1: 441-445.
21. Lin JM, Lin CC, Chen MF. Scavenging effects of *Mallotus repandus* on active oxygen species. *J. Ethnopharmacol*. 1995; 46:175-181.
22. Indian Herbal Pharmacopoeia. 1998; Vol. I and II. RRL Jammu Tawi and IDMA Mumbai, India.
23. Houghton PJ. Pharmacognosy: the basis for quality herbal medicinal products. *Pharm. News*. 1999; 6(4): 21-27.
24. Shah SA, Ravishankara MN, Nirmal A, Shishoo CJ, Rathod IS, Suhagia BN. Estimation of individual sennosides in plant materials and marketed formulations by HPTLC method. *J. Pharm. Pharmacol*.2000; 52: 445-449.
25. Mehta BK, Gawarikar R. Characterization of novel triterpenoid from *Curculigo orchioides* Gaertn. *Ind.J.Chem*. 1991; 30(B): 986-988.
26. Kubo M, Nagamoto M, Nagao T, Nakanishi J, Uno, Nishimura H. A new phenolic glycoside, curculigoside from rhizomes of *Curculigo orchioides*. *Planta medica*. 1983; 47: 52-55.

27. Garg SN, Misra LN, Agarwal SK. Corchioside A, an orcinol glycoside from *Curculigo orchioides*. *Phytochem.* 1989; 28(6): 1771-1772.
28. Xu JP, Xu RS. Cycloartane-type saponins and their glycosides from *Curculigo orchioides*. *Phytochem.* 1992; 31(7): 2455-2458.
29. Shahidi F, Wanasundara PKJPD. Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutrit.* 1992; 32: 67-103.
30. Sawa T, Nakao M, Akaike T, Ono K, Maeda H. Alkylperoxyl radical scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: Implications for the antitumor promoter effect of vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47: 397- 492.