



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Contribución a la fitoquímica, a la
evaluación de la actividad
antioxidante y el posible efecto
neuroprotector de la especie
*Polygala paniculata***

Miguel Oswaldo González Rodríguez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Maestría en Medicina Alternativa
Bogotá, Colombia
2022

Contribución a la fitoquímica, a la evaluación de la actividad antioxidante y el posible efecto neuroprotector de la especie *Polygala paniculata*

Miguel Oswaldo González Rodríguez

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Medicina Alternativa

Directora:

Maritza Adelina Rojas Cardozo Q.F., MSc, PhD
Profesora asociada - Facultad de Ciencias - Departamento de Farmacia

Codirector:

Médico, MSc, PhD(c) Carlos Alberto Vásquez Londoño
Docente Maestría en Medicina Alternativa Facultad de Medicina

Línea de Investigación:

Acupuntura y Medicina Tradicional China

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Maestría en Medicina Alternativa

Bogotá, Colombia

2022

A mis hijos y nietos

y

*A quienes permitieron que hombres nuevos
tuvieran conocimientos antiguos, aquellos que
vivieron sus días en búsqueda de una vida
armoniosa para sus congéneres.*

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Nombre Miguel Oswaldo Gonzalez Rodríguez

Fecha 16/06/2022

Fecha

Agradecimientos

A quien me permitió la conciencia, la curiosidad y el juicio y a quienes a través de ellos puedo gozar de la humanidad, a mis padres, que me guiaron y cuidaron.

A mis apreciados tutores, la Doctora Maritza Adelina Rojas Cardozo, profesora asociada del Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias y el Doctor Carlos Alberto Vásquez Londoño, docente de la Maestría de Medicina Alternativa, quienes además de ser mis directores, tomaron de su tiempo y en realidad me enseñaron con paciencia y dedicación los procesos y procedimientos necesarios para la realización de este Trabajo de Grado, lo cual se constituyó en una experiencia grata y enriquecedora para mi desarrollo personal. Valoro mucho sus aportes y consejos tanto en lo teórico como en lo práctico y en especial para llevar a cabo las pruebas de laboratorio y la elaboración general de este trabajo.

Resumen

Contribución a la fitoquímica, a la evaluación de la actividad antioxidante y el posible efecto neuroprotector de la especie *Polygala paniculata*

La herbolaria china ocupa un lugar muy importante dentro de las terapias que conforman la Medicina Tradicional China. En Colombia, por las limitaciones en la consecución de los medicamentos herbales de origen asiático es necesario encontrar especies medicinales similares en nuestra flora. Se escogió la especie *Polygala paniculata* por su cercanía taxonómica con la especie *Polygala tenuifolia* de la herbolaria en China, la cual cuenta con estudios previos sobre su efecto neuroprotector, constituyéndose en una especie promisorio para el tratamiento para enfermedades neurodegenerativas, que afectan la salud pública. Se estudió la fitoquímica de las raíces y de las partes aéreas de la especie *Polygala paniculata*, donde se detectaron metabolitos secundarios como flavonoides, terpenos/esteroides y cumarinas, además se evaluó su capacidad antioxidante y se analizó cualitativa y cuantitativamente la presencia de flavonoides. La comparación con la fitoquímica de *Polygala tenuifolia* mostró apreciables diferencias. La revisión bibliográfica realizada, vincula algunos flavonoides con el efecto neuroprotector, lo cual permite considerar los resultados preliminares como promisorios sobre el potencial neuroprotector de *Polygala paniculata* y se requerirá de investigaciones adicionales para su confirmación.

Palabras clave: *Polygala paniculata*, antioxidante, neuroprotector, fitoquímica, flavonoides, neurodegenerativo, herbolaria china

Abstract

Contribution to the phytochemistry, the evaluation of the antioxidant activity and the possible neuroprotective effect of the species *Polygala paniculata*

Chinese herbalism occupies a very important place within the therapies that make up Traditional Chinese Medicine. In Colombia, due to the limitations in obtaining herbal medicines of Asian origin, it is necessary to find similar medicinal species in our flora. The *Polygala paniculata* species was chosen due to its taxonomic closeness to the *Polygala tenuifolia* species of herbal medicine in China, which has previous studies on its neuroprotective effect, becoming a promising species for the treatment of neurodegenerative diseases that affect public health. The phytochemistry of the roots and aerial parts of the *Polygala paniculata* species was studied, where secondary metabolites such as flavonoids, terpenes/steroids and coumarins were detected, their antioxidant capacity was also evaluated and the presence of flavonoids was analyzed qualitatively and quantitatively. The comparison with the phytochemistry of *Polygala tenuifolia* showed appreciable differences. The bibliographic review carried out links some flavonoids with the neuroprotective effect, which allows us to consider the preliminary results as promising on the neuroprotective potential of *Polygala paniculata* and additional research will be required for confirmation.

Keywords: *Polygala paniculata*, antioxidant, neuroprotective, phytochemical, flavonoids, neurodegenerative, Chinese herbal medicine.

Contenido

	<u>Pág.</u>
Resumen	IX
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XIV
Lista de Símbolos y abreviaturas	XV
Introducción	1
1 Capítulo 1: Marco teórico	5
1.1 Género <i>Polygala</i>	5
1.1.1 Generalidades de <i>Polygala tenuifolia</i> o Radix.....	6
1.1.1.1 Farmacología de Polygalae Radix	8
1.1.1.2 Actividad biológica de <i>P tenuifolia</i> o Radix	10
1.1.2 Generalidades de <i>Polygala paniculata</i>	13
1.1.2.1 Etnobotánica de <i>Polygala paniculata</i>	13
1.1.2.2 Actividad farmacológica de <i>Polygala paniculata</i>	14
1.1.2.3 Fitoquímica de <i>Polygala paniculata</i>	15
1.2 Estrés oxidativo y flavonoides en enfermedades neurodegenerativas.....	15
1.2.1 Estrés oxidativo	15
1.2.2 Los flavonoides.....	17
2 Capítulo 2: Metodología.....	21
2.1 Recolección de Material Vegetal	21
2.2 Fitoquímica preliminar.....	22
2.2.1 Preparación de extractos	22
2.2.2 Caracterización de los extractos	24
2.2.3 Fraccionamiento líquido - líquido.....	25
2.3 Estimación de flavonoides totales	26
2.3.1 Materiales para la estimación de flavonoides totales	26
2.3.2 Preparación de los Extractos para la estimación de los flavonoides totales ..	27
2.3.3 Estimación de los flavonoides totales en los Extractos	27
2.4 Evaluación de actividad antioxidante.....	27
2.4.1 Materiales para la evaluación de efecto antioxidante.....	28
2.4.2 Preparación de los Extractos para la Actividad Antioxidante	28
2.4.3 Determinación de la Actividad Antioxidante de los Extractos	28
2.4.1 Cromatografía en columna.....	29
2.5 Búsqueda bibliográfica sobre las relaciones antioxidantes y neuroprotectores de los flavonoides.....	31

3	Capítulo 3: Resultados y discusión	33
3.1	Fitoquímica preliminar	33
3.1.1	Elaboración de extractos	33
3.1.2	Caracterización cualitativa	34
3.1.3	Resultado Fraccionamiento líquido-líquido	36
3.2	Resultados de la estimación de flavonoides totales	39
3.3	Evaluación de la actividad antioxidante	41
3.4	Cromatografía de columna	44
3.5	Resultado de la búsqueda bibliográfica	49
4	Capítulo 4: Papel de los antioxidantes y los flavonoides en las enfermedades neurodegenerativas	51
4.1	Generalidades sobre flavonoides y su relación con las enfermedades neurodegenerativas	51
4.2	Estrés oxidativo y las enfermedades neurodegenerativas	56
5	Conclusiones y recomendaciones	63
5.1	Conclusiones	63
5.2	Recomendaciones	64
A.	Anexo: Certificación del Herbario Nacional Colombiano	65
B.	Anexo: Resultado de Estimación de Flavonoides con $AlCl_3$	66
C.	Anexo: Resultado análisis DPPH	67
	Bibliografía	68

Lista de figuras

	<u>Pág.</u>
Figura 1-1: <i>Polygala tenuifolia</i>	7
Figura 1-2: Algunos de los Metabolitos de <i>Polygala tenuifolia</i>	9
Figura 1-3: Efecto del estrés oxidativo	12
Figura 1-4: Planta y Distribución de <i>Polygala paniculata</i> en Colombia	13
Figura 1-5: Esquema de flavonoide	17
Figura 1-6: Clasificación y estructura de principales flavonoides.....	18
Figura 2-1: Planta <i>Polygala paniculata</i>	21
Figura 2-2: Material recolectado de <i>P paniculata</i>	22
Figura 2-3: Raíces de <i>P paniculata</i>	23
Figura 2-4: Parte aéreas de <i>P paniculata</i>	24
Figura 2-5: Fraccionamiento de <i>P paniculata</i>	25
Figura 2-6: Placa de 96 pozos para muestras	28
Figura 2-7: Cromatografía en columna de <i>P paniculata</i>	30
Figura 3-1: Cromatografías de capa delgada (CCD) de extractos de <i>P paniculata</i> ...	34
Figura 3-2: CCD para comparación <i>P paniculata</i> VS <i>P tenuifolia</i>	36
Figura 3-3: CCD de las fracciones de <i>P paniculata</i> (30/70)	38
Figura 3-4: CCD de las fracciones de <i>P paniculata</i> (20/80)	38
Figura 3-5: Placa de 96 pozos con prueba estimación Flavonoides	39
Figura 3-6: Absorbancia de los flavonoides en raíces y partes aéreas vs quercetina	40
Figura 3-7: Curva patrón de Quercetina.....	42
Figura 3-8: Placa de 96 pozos con prueba de DPPH de <i>P paniculata</i>	42
Figura 3-9: Curva de % de inhibición de <i>P paniculata</i>	43
Figura 3-10: Cromatografía en columna	44
Figura 3-11: CCD de separaciones 1 a 11 obtenidas de Ax2 de <i>P paniculata</i>	46
Figura 3-12: CCD de separaciones 12 a 20 obtenidas de Ax2 de <i>P paniculata</i>	47
Figura 3-13: CCD de separaciones 21 a 32 obtenidas de Ax2 de <i>P paniculata</i>	48
Figura 4-1: Bioactividad de flavonoides en hierbas de MTCh	52
Figura 4-2: Biomarcadores que sufren consecuencias del estrés oxidativo	58

Lista de tablas

	<u>Pág.</u>
Tabla 2-1: Reveladores usados en placas de cromatografía de capa delgada.....	24
Tabla 2-2: Solventes empleados en el fraccionamiento de RxPP1	25
Tabla 2-3: Fraccionamiento por volúmenes de 50ml	30
Tabla 3-1: Rendimientos de los extractos de <i>P paniculata</i> y <i>P tenuifolia</i>	33
Tabla 3-2: Caracterización preliminar de los extractos de <i>P paniculata</i>	34
Tabla 3-3: Fraccionamiento liquido-liquido de extractos de <i>P paniculata</i>	37
Tabla 3-4: Resultados para estimación de Flavonoides en Extractos de <i>P paniculata</i>	39
Tabla 3-5: Estimación de flavonoides totales en los extractos de <i>P paniculata</i>	40
Tabla 3-6: Datos para el patrón de Quercetina	41
Tabla 3-7: Datos de % de inhibición de los extractos de <i>P paniculata</i>	42
Tabla 3-8: Comparación de concentración inhibitorias medias quercetina/extractos ..	43
Tabla 3-9: Resultados de la cromatografía de columna.....	44
Tabla 3-10: Cuadro de búsqueda de Artículos bibliográficos	50

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término	Abreviatura	Término
ACh	acetyl choline	AChE	acetylcholinesterase
AD	Alzheimer Disease	ADN	ácido desoxirribonucleico
AKI	acute kidney injury	ALT	alanine aminotransferase
ARN	ácido ribonucleico	AST	aspartate aminotransferase
AxPP1	Parte aéreas de <i>P paniculata</i> fresca	AxPP2	Parte aéreas de <i>P paniculata</i> seca
A β	amyloid β	Bcl-2 B	-cell lymphoma-2
BDNF	brain-derived neurotrophic factor	Br	bromide
BW	body weight	Ca	Calcio
CCD	Cromatografía de capa delgada	COX-2	cyclooxygenase-2
Cu	Cobre	CUMS	chronic unpredictable-mild stress
D-Gal-N	D-galactosamine	DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle
EA	Enfermedad de Alzheimer	EH	Enfermedad de Huntington
ELA	Esclerosis Lateral Amiotrófica	EM	Esclerosis Múltiple
EN	enfermedad neurodegenerativa	EP	Enfermedad de Parkinson
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase	Fe	Hierro
GABA	gamma-aminobutyric acid	GPX	glutathione peroxidase
GSH	reduced glutathione	HO-1	heme-oxygenase-1
IC50	Concentración inhibitoria media	IL-1 β	interleukine-1 β
IL-6	interleukine-6	iNOS	inducible nitrite oxide synthase

Abreviatura	Término	Abreviatura	Término
IR	infrarrojo	I- κ B α	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
K	Potasio	LD50	lethal dose 50%
LDH	lactate deshydrogenase	LPS	lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen activated protein kinase	MDA	malondialdehyde
MDA	malondialdehyde	MDR	multi-factorial drug-resistant
Mg	Magnesio	MMP	matrix metalloproteinase
Mn	Manganeso	MPO	myeloperoxidase
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine	MTCh	Medicina tradicional china herbal
MWM	Morris-water maze	MTC	Medicina tradicional china
NF- κ B	nuclear factor-kappa B	NA	noradrenaline
NO	monóxido de nitrógeno	NLRP-3	nod like receptor-3
NO	nitrite oxide	NP/PEG	Productos Naturales/Polietilenglicol.
Nrf2	nuclear factor erythroid-2-related factor 2	NT-3	neurotrophin-3
OGD	oxygen/glucose deprivation	PG E2	prostaglandin E2
PI3K	phosphoinositide 3-kinase	PP 2A	protein phosphatase 2A
PPT	pontomesencefálica	PTE	Extracto de <i>P tenuifolia</i>
RANKL	receptor activator of NF- κ B ligand	REM	Rapid eye movement
RMN	Resonancia magnética nuclear	ROS	especies reactivas de oxígeno
ROS	reactive oxygen species	RP	Radix Polygalae
RxPP1	Raíces de <i>P paniculata</i> fresca	RxPP2	Raíces de <i>P paniculata</i> seca
SNC	Sistema nervioso central	SOD	superoxide dismutase
STZ	streptozotocin	TCM	Traditional Chinese Medicine
TGN	tenuigenin	TNF- α	tumor necrosis factor alpha
TLR4/MyD88/NF- κ B	Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated myeloid differentiation primary response protein 88 (MyD88)-dependent nuclear factor-kappa B (NF- κ B) signaling		
TRIF	Toll-IL-1-resistance (TIR) domain-containing adaptor-inducing IFN- β		

Abreviatura	Término	Abreviatura	Término
TRPA1	transient receptor potential ankyrin 1	TRPV1	transient receptor potential vanilloid-1
UV	Ultravioleta	VLPO	preóptica ventrolateral
XO	xanthine oxidase	Zn	Zinc

Introducción

Algunas especies del género *Polygala* y sus compuestos químicos han mostrado tener propiedades medicinales para el tratamiento del dolor, la inflamación, trastornos intestinales, renales y del sistema nervioso central (SNC)(1). En Colombia existen cerca de 20 especies en el género,(2) siendo una de ellas *Polygala paniculata* que, recolectada en el país, es utilizada principalmente para aliviar resfriados y fiebre, sin embargo, poco se conoce de su fitoquímica, su actividad antioxidante y su posible efecto neuroprotector. Por esta razón se busca avanzar con su estudio y compararla con *Polygala tenuifolia* especie de origen asiático, utilizada por la Medicina tradicional china y usada por su acción protectora en enfermedades neurodegenerativas y trastornos del SNC (3), además, cuenta con estudios *in vivo* en murinos con resultados promisorios de su posible efecto neuroprotector (4).

Con el aumento de la población de adultos mayores, las enfermedades neurodegenerativas se han convertido en un problema de salud pública que causa daños en todas las dimensiones humanas: personales, familiares y sociales, tanto en el ámbito físico, psíquico y emocional de quien las padece, como en su familia y entorno. Las enfermedades neurodegenerativas, sean de etiologías hereditarias o adquiridas, se producen por una disfunción progresiva del SNC que además de acortar la esperanza de vida, deteriora el desarrollo personal, social y profesional. Existen más de 600 enfermedades neurodegenerativas de acuerdo con el National Institute of Neurological Disorder and Stroke Study (NINDSS)(5), siendo las de mayor prevalencia y mortalidad, la Demencia y la Enfermedad de Alzheimer (EA), la Enfermedad de Parkinson (EP), la Esclerosis Múltiple (EM), la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) y las Enfermedades Neuromusculares como la Enfermedad de Huntington (EH), se ha incluido la Esclerosis Múltiple (EM) al considerarse que en su abordaje, comparte elementos comunes con las enfermedades neurodegenerativas. Todas estas enfermedades son muy complejas y aún muchos aspectos se encuentran en estudio. Por lo anterior se hace necesario la búsqueda de alternativas de tratamiento con los menores efectos adversos.

Aún no está determinada claramente la etiología de las enfermedades neurodegenerativas, sin embargo, se ha observado que el aumento del estrés oxidativo es uno de los posibles factores comunes en estas enfermedades, al inducir daño celular, deterioro del sistema de reparación del ADN y disfunción mitocondrial, que conlleva a una aceleración del proceso de envejecimiento y el desarrollo de trastornos neuronales (6)(7). El resultado son las enfermedades neurodegenerativas que presentan una evolución lenta con daño progresivo en las células neuronales, la pérdida neuronal, y las consecuentes pérdidas en la función motora o cognitiva. Esto ha motivado la búsqueda de agentes que eviten el estrés oxidativo, como una alternativa interesante para la prevención y el tratamiento de estas condiciones(8)(9).

El uso de antioxidantes naturales que disminuyan el riesgo del estrés oxidativo, ya sea por medio de la ingesta de alimentos o por el consumo de productos naturales como las hierbas medicinales, se ha considerado como una alternativa viable considerando que se tratan en su mayoría de fuentes seguras, eficaces y sostenibles. Estas propiedades se han atribuido en particular a constituyentes denominados metabolitos secundarios, particularmente a compuestos fenólicos como taninos, estilbenos, antocianinas y flavonoides, encontrados principalmente en plantas (10). Estas moléculas pueden neutralizar los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno (ROS) así como tener efectos beneficiosos para la salud a través de varios mecanismos frente a la longevidad, el mantenimiento celular y la reparación del ADN (4)(11)(12).

Los flavonoides son compuestos de especial interés farmacológico, pues en diversos estudios e investigaciones se ha comprobado la capacidad neuroprotectora de éstos, efecto que podría también estar asociado a la actividad antioxidante. Además, es usual que en el tratamiento en MTCh se prescriban formulas con extractos de especies que contengan esta clase de compuestos para aliviar síntomas como el insomnio, los olvidos, la desorientación, la pérdida del conocimiento y los calambres, que son síntomas relativos de la enfermedad neurodegenerativa (EN) (13). Lamentablemente, por ahora no existe un tratamiento absoluto para ninguna de estas enfermedades (6)(8). Sin embargo, la creciente evidencia ha demostrado que compuestos hallados en prescripciones de la MTC herbal pueden mejorar los síntomas neurodegenerativos (9). Algunos de ellos al parecer ejercen efectos neuroprotectores a través de la regulación de la vía de autofagia y la apoptosis.

Los flavonoides son una familia de compuestos fenólicos, encontrados en una variedad de frutas, verduras, y en general en especies vegetales. Muchos de ellos funcionan como ingredientes activos de las hierbas medicinales chinas tradicionales y sus efectos secundarios son mínimos (14).

Existe evidencia y estudios que respaldan que los flavonoides producen beneficios en muchos otros aspectos de la salud humana, es así como se encuentran flavonoides con actividad antitumoral, antioxidante y antiinflamatoria (15). Actualmente, hay un gran auge de investigación alrededor de los efectos neuronales beneficiosos de los flavonoides, incluida la promoción del desarrollo del sistema nervioso en la etapa fetal, la promoción de la memoria, el aprendizaje y las funciones cognitivas en la infancia, como también, la neuro protección contra el estrés producida por neurotoxinas, las cuales usualmente inducen al estrés oxidativo (3)(16)(14). Adicionalmente, los flavonoides tienen efectos significativos en diferentes etapas del desarrollo de los sistemas nerviosos, incluida la diferenciación de células madre neuronales, el crecimiento de neuritas y la plasticidad neuronal, estos hallazgos implican que estos polifenoles son de interés como suplementos para la salud en la prevención de defectos congénitos y enfermedades neuronales (17)(14).

Con este panorama en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- Objetivo general
 - Realizar una evaluación de la fitoquímica, la actividad antioxidante y el posible efecto neuroprotector de la especie *Polygala paniculata*.

- Objetivos específicos
 - Estudiar la fitoquímica preliminar de raíces y material aéreo la especie *Polygala paniculata*.
 - Evaluar la actividad antioxidante de los extractos de la especie *P paniculata*.
 - Identificar los grupos de metabolitos con posible efecto neuroprotector de los extractos de la especie de *P paniculata*.
 - Comparar la fitoquímica preliminar del extracto de *Polygala tenuifolia* con el de *Polygala paniculata*.

Nota: El ensayo biológico *in vitro* previsto en el anteproyecto no pudo ser realizado por motivos asociados a la pandemia por Covid-19, se espera sea realizado en posteriores trabajos.

Los resultados del presente estudio aportarán en el conocimiento de la fitoquímica de la especie y su capacidad antioxidante, aspectos que podrían dar indicios de un posible efecto neuroprotector tras la comprobación de la existencia en los extractos de metabolitos con reconocida acción protectora y servirán de base para la realización de estudios posteriores.

1 Capítulo 1: Marco teórico

Aunque solo una pequeña parte de las especies de plantas tropicales han sido estudiadas como fuentes de compuestos medicinales, casi el 50% por ciento de los medicamentos de uso clínico aprobado de 1997 a 2007 estuvo relacionado de una u otra forma con productos naturales, ya sea porque provienen directamente de una fuente natural o porque su diseño o síntesis se basó en el conocimiento de compuestos de origen natural.

Desde la visión de la etnobotánica, las especies del género *Polygala* han sido utilizadas en el tratamiento de diferentes enfermedades en todos los continentes, a continuación, se presentan generalidades del género y las especies objeto de estudio (18)(19).

1.1 Género *Polygala*

La familia Polygalaceae pertenece al orden Fabales (18), cuenta con 20 géneros que agrupan más de 1000 especies pertenecientes a tres tribus: Polygalae, Moutabeae, y Xanthophylleae, con cubrimiento global a excepción de Nueva Zelanda, zonas árticas y antárticas. Las regiones templadas cálidas y tropicales son sus principales centros de diversidad, siendo el género *Polygala* el más representativo, con más de 600 especies registradas, encontrando 40 de ellas en China (3).

Polygala s.str. está conformado por dos clados bien definidos, es decir que hay acuerdo en cuales especies pertenecen a cada clado. Pero aún no hay acuerdo en la relación filogenética entre los dos clados, algunos investigadores no los consideran como grupos hermanos en sus análisis filogenéticos.(20), en un trabajo determinante al respecto se denominó como Clado del Nuevo Mundo a *Polygala* NWC que cuenta con 213 especies que pueden dividirse en tres secciones: *Clinclinia* DC., *Monniniopsis* A. Gray, y *Timutua* Timutua DC), y como el Clado del Viejo Mundo a *P. OWC*, que incluye 349 especies que

están repartidas en 11 secciones. La sección Ti mutua incluye 175 especies, la mayoría de ellas en las Américas, pero con 9 especies nativas de África y con *Polygala paniculata* L. naturalizada alrededor del Paleotrópico.(18)

El género *Polygala* cuenta con aproximadamente 600 especies con amplia distribución, principalmente en las regiones neotropicales, se han propuesto divisiones del género sustentadas en la morfología de flores, frutos, semillas e incluso en presencia de nectarios extra florales. Utilizando datos morfológicos y anatómicos se sugirió que el sentido amplio el género *Polygala* es polifilético (21) es decir, constituido por la unión artificial de ramas dispersas del árbol evolutivo, sin embargo, se destacó la necesidad de un estudio más amplio del género (3).

Entre algunas de las principales especies del género *Polygala* que se han estudiado en los últimos años encontramos, *P. altomontana*, *P. caudata*, *P. flavescens*, *P. glomerata*, *P. japónica*, *P. molluginifolia*, *P. sibirica*, *P. tenuifolia* en las cuales mediante análisis fitoquímicos se encontró que contienen saponinas triterpénicas, triterpenos, terpenoides, xantonas, flavonoides, cumarinas, ésteres de oligosacáridos, estirilpironas, benzofenonas y polisacáridos, que ya sea como constituyentes puros o como extractos de *Polygala spp* exhibieron importantes propiedades antiinflamatorias, neuroprotectoras, antiateroscleróticas, antiisquémicas, antidepresivas, sedantes, analgésicas, antitumorales e inhibidoras de enzimas, lo que las hace útiles principalmente contra inflamación, heridas, trastornos cardiovasculares y del sistema nervioso central (3). Hay otras especies menos mencionadas pero que también cuentan con investigaciones, como la especie *Polygala sabulosa* que exhibió efectos neuroprotectores y reparadores del SNC respecto a las secuelas dejadas por la isquemia cerebral a consecuencia de infarto del miocardio (22).

1.1.1 Generalidades de *Polygala tenuifolia* o Radix

Polygala tenuifolia es una especie, perenne, original de Asia del Este (Corea, Mongolia y Manchuria) puede llegar a alcanzar veinte centímetros de altura y veinte centímetros de anchura. *P. tenuifolia* cuenta con poca información fiable sobre sus flores usual mente azul a violeta, pero éstas están dotadas de unidades reproductivas hermafroditas (23).

Radix Polygalae o Polygala Radix (PR) ha sido ampliamente utilizada en la medicina tradicional asiática en China, Japón y Corea del Sur a lo largo de la historia por más de 2000 años, se deriva de la raíz seca de *Polygala tenuifolia* W. o *Polygala sibirica* L. La PR se describe en el Clásico de Materia de Shen Nong (Shen Nong Ben Cao Jing), primera monografía farmacéutica china, como una de las 50 plantas fundamentales y entre las principales opciones para utilizar e influir en el meridiano del corazón y el riñón, donde también se sugiere que es eficaz para calmar los nervios, disipar la flema y disipar el edema (24). Durante esos 2000 años, la medicina china ha utilizado a PR ampliamente para mejorar la memoria, la función cognitiva y para impulsar el desarrollo intelectual, su uso se remonta a las dinastías del Norte y del Sur, a partir de la dinastía Ming sólo las raíces se han utilizado con fines medicinales. Desde 1963, fue incluida oficialmente en la Farmacopea China y Japonesa. La Polygala Radix PR denominada, "*Yuanzhi*" en chino u "*Onji*" en japonés, se incluye en las recetas de la medicina *Kampo*, con funciones sedativas y se usa como agente anti neurótico, tónico y sedante (25).

Figura 1-1: *Polygala tenuifolia*.



Fuente: <https://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma06/plantaschinas/polygala.htm>

Hoy en día, PR se utiliza en el contexto de las condiciones neurológicas y los trastornos psicóticos. Mientras que, en la medicina occidental convencional, los medicamentos usualmente tienen principios activos y blancos terapéuticos únicos, en MTCh las prescripciones son del tipo multipropósito, multinivel, por lo cual PR aparece como componente en muchas fórmulas médicas chinas. Se han reportado efectos neuroprotectores, potenciadores de la memoria, antidepresivos, antiinflamatorios, antivirales y antioxidantes, lo que explica que se encuentre en prescripciones como *Kai Xin* en polvo, *Di Huang Yin Zi* y *Gu Yin Jian*, utilizadas comúnmente para tratar alteraciones

como la enfermedad de Alzheimer, depresión, la ansiedad, el insomnio, la menstruación irregular, el envejecimiento ovárico prematuro, el olvido y para mejorar la función cognitiva (25).

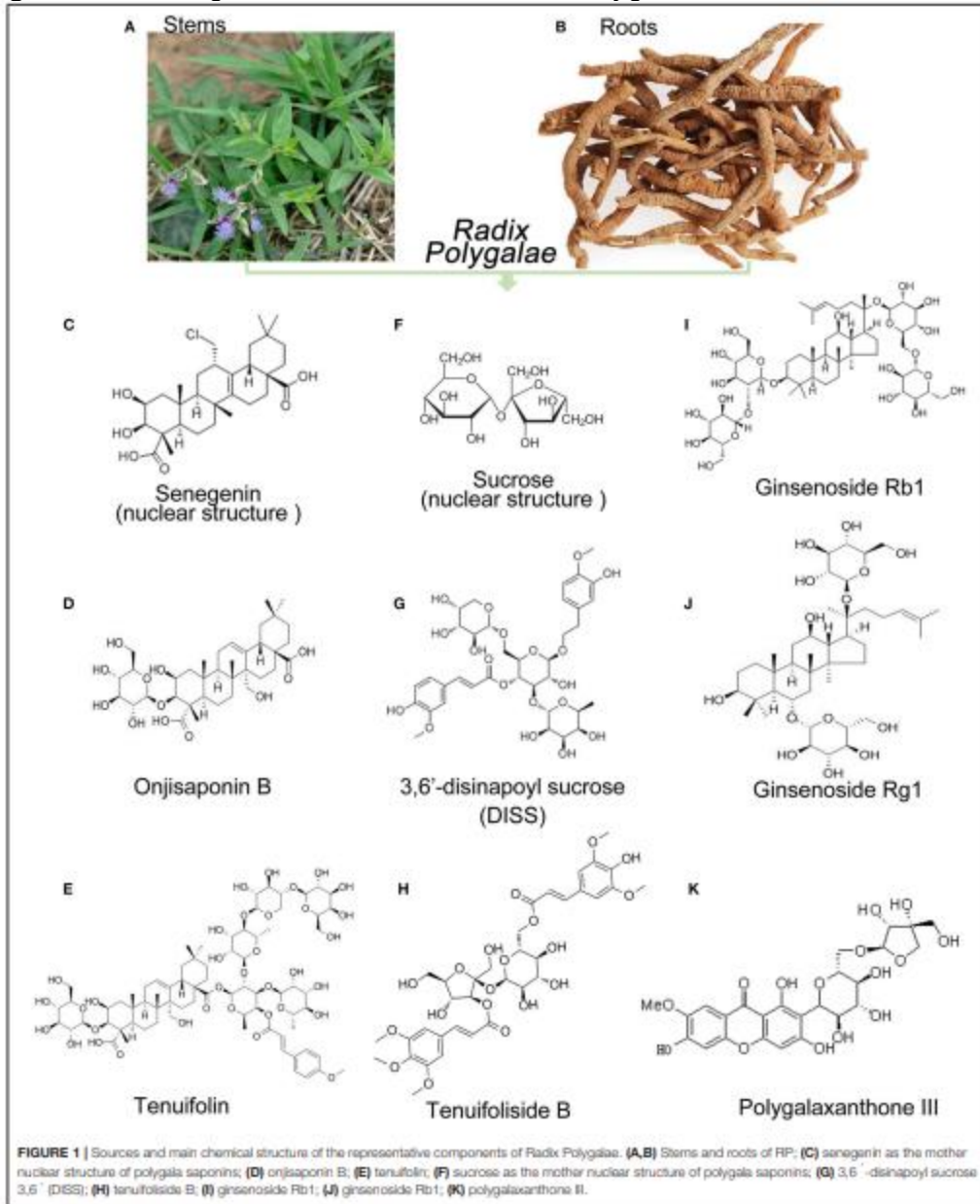
Puesto que los extractos y compuestos aislados de PR muestran efectos neuroprotectores, estos extractos solos o combinados son de uso frecuente en las prescripciones para los adultos mayores y pacientes con diagnósticos de síndromes mentales (26).

1.1.1.1 Farmacología de *Polygalae Radix*

En el extracto de PR se han identificado más de 140 compuestos, entre los cuales se encuentran flavonoides, saponinas triterpénicas, cetonas, ésteres de oligosacáridos, xantonas, ácidos orgánicos, alcaloides, aceites grasos, aminoácidos y resinas, a los cuales se le atribuye los efectos neuroprotectores, potenciadores de la memoria, antidepresivos, antiinflamatorios, antivirales y antioxidantes que han sido motivo de estudios farmacológicos. Las propiedades neuroprotectoras de PR podrían resultar de la mejora del sistema colinérgico y la restricción del estrés oxidativo (neutralización de radicales libres) (24), aunque también han sido identificados posibles efectos adversos, pues algunos estudios muestran que las saponinas de PR podrían estar relacionadas con toxicidad gastrointestinal, produciendo flatulencia y congestión (25).

Las raíces y tallos de PR son ricas en saponinas, algo más de 50 de ellas han sido identificadas en *P. tenuifolia*, algunas son utilizadas en el control de calidad de las PR. El contenido total de saponina de *P. tenuifolia* W. en las partes aéreas (tallo y hoja) es de hasta 2,46% y en raíz es de 3,29%. El contenido total de saponinas en tallos y hojas de *P. sibirica* L. es de 1,50 y 1,61%, respectivamente, y los ginsenósidos y saponinas se encuentran principalmente en las raíces (24). Es interesante anotar que entre las saponinas activas de la PR están las saponinas triterpénicas pentacíclicas oleanólicas, que contienen como azúcares: glucosa, galactosa, ramnosa o xilosa., las cuales son señaladas de ejercer las funciones de sedación, que logran aliviando la excitación, expulsando flemas, y calmando la tos.(25).

Figura 1-2: Algunos de los Metabolitos de *Polygala tenuifolia*.



Fuente: Jiang N, Wei S, (...), Liu X - Front Psychiatry Protective effects and mechanism of radix polygalae against neurological diseases as well as effective substance. 2021

El segundo grupo de componentes importantes de Polygala Radix son las xantonas, se han aislado e identificado 27 compuestos de este tipo, estando distribuidos por toda la planta, Polygala xantonas son una clase de compuestos fenólicos, representados por la Polygala xantona III con efectos diuréticos y antibacteriales. Además, se aisló una variedad

de alcaloides de *Polygala* que, sin embargo, se ha informado que la acción farmacológica de los alcaloides en el SNC es baja (24).

En algunos estudios encontraron, además, oligosacáridos que forman ésteres con ácidos orgánicos, como la sibiricosa A5, sibiricosa A6 y la 3,6-disinapoil sacarosa (26), estas presentan acciones antioxidantes y son de uso potencial en cáncer y como antivirales. Los ésteres de oligosacáridos tienen una actividad biológica significativa en algunos modelos de demencia y depresión. Compuestos como el ácido ferúlico, el ácido erúrico y el ácido 3,4,5-trimetoxicinámico han mostrado tener efectos anticonvulsivantes, antiinflamatorios, neuroprotectores y antiamnésicos (27). Actualmente, se han aislado cientos de ésteres de oligosacáridos de PR, como la tenuifoliosa y la tenuifolida. Además, la 3,6'-disinapoilsacarosa es exclusiva del género *Polygala*.(24).

Es importante resaltar que los alcaloides aislados en PR, todos son del tipo β -carbolina que tienen efectos antitrombóticos, antitumorales y para mejorar la memoria. Además, también contiene cumarinas, fenilpropanoides, esteroides y elementos metálicos inorgánicos como Zn, K, Ca, Cu, Fe, Mn, Mg, etc. (27).

En un artículo de revisión se estableció que *Polygala tenuifolia* y sus componentes activos tienen un potencial neuroprotector asociado con la EA, los principales mecanismos involucrados son la agregación anti- $A\beta$, proteína anti-Tau, antiinflamatoria, antioxidante, anti apoptótico neuronal y potenciador del sistema colinérgico central. (28). De otro lado, puesto que la PR cruda exhibe efectos secundarios como irritación de garganta y efectos gastrointestinales, requiere procesamiento antes de ser administrada, los métodos comunes de procesamiento de las PR incluyen descartar la corteza, para luego hervir u hornear. (25,26).

1.1.1.2 Actividad biológica de *P tenuifolia* o Radix

En una revisión de los estudios recientes sobre los efectos sedativos, ansiolíticos y anticonvulsivantes obtenidos con el extracto de RP y/o sus ingredientes activos, reportan que en las investigaciones encontradas, se utilizaron diferentes métodos y modelos experimentales, se observaron diversos efectos y apelaron a diferentes mecanismos para medir los efectos en el comportamiento que indiquen de ansiedad, entre ellos, los niveles de monoaminas y la calidad del tiempo de sueño, para evaluar el efecto tras la aplicación

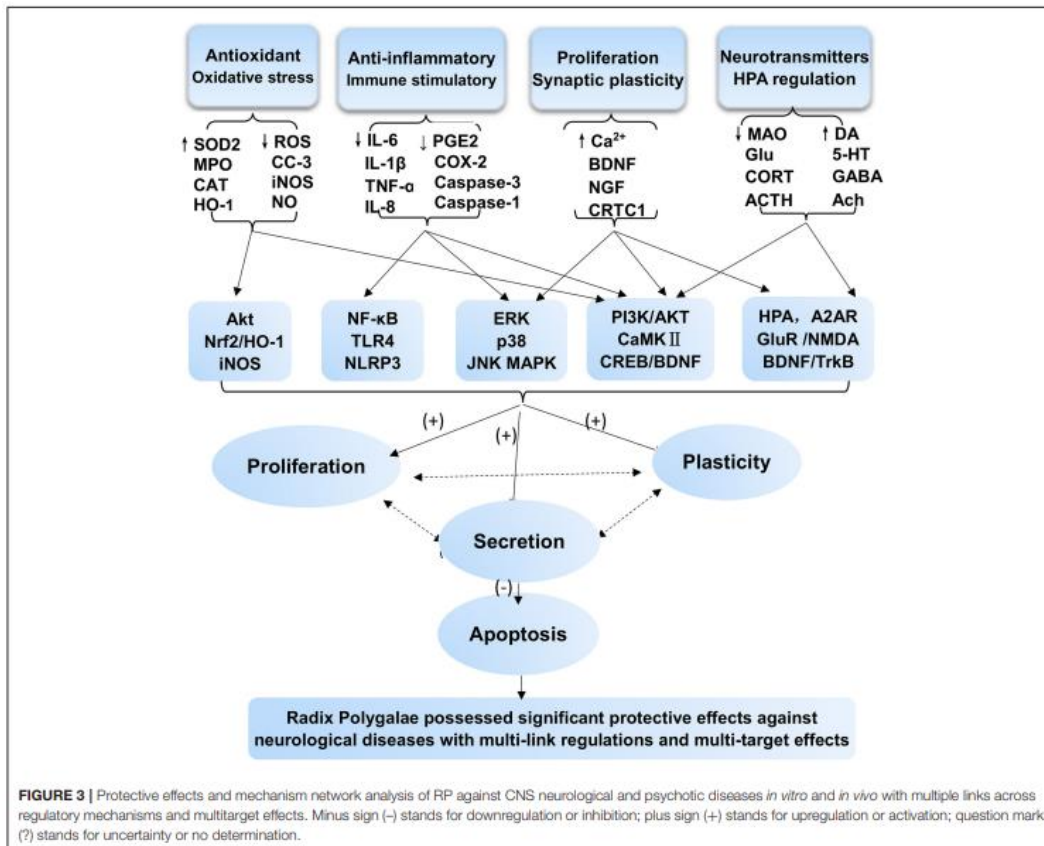
del extracto de raíz de *P. tenuifolia*, las poligalasaponinas y la tenuifolina. Todos los resultados fueron favorables. a la aplicación, sin embargo, los mecanismos potenciales de sus efectos ansiolíticos aún no están aclarados. Se reportó que con la administración de tenuifolina (40 y 80 mg/kg), el tiempo total de sueño y el sueño REM se prolongaron, Las correlaciones neuroquímicas incluyen proporciones positivas de c-Fos aumentadas; niveles reducidos de noradrenalina en el locus coeruleus (LC), área preóptica ventrolateral (VLPO), área tegmental pontomesencefálica (PPT) y área tegmental laterodorsal (LDT); niveles elevados de GABA en VLPO y LC; y aumento de los niveles de acetilcolina (ACh) en LDT y PPT. Además, se encontró que contiene los antagonistas del receptor de adenosina A1 8-ciclopentil-1,3-dimetilxantina y aloxazina, que están relacionados con el efecto de la PTE en la prevención de los efectos conductuales inducidos por la cocaína. Estos estudios confirman la correcta prescripción que se hace de la raíz de *P. tenuifolia* como fármaco ansiolítico e hipnosedante en la medicina tradicional china.(24).

Los trastornos del aprendizaje y la memoria son comunes con el envejecimiento, para su estudio se utilizan modelos animales. Por medio de investigaciones con murinos tratados con extractos de *P. tenuifolia* pudo demostrarse que poseía ingredientes activos que actúan sobre la memoria. En diferentes estudios se probó, independientemente, que el extracto crudo de *P. tenuifolia* (29), o una fracción precipitada de RP (30) o la senegenina pueden inhibir significativamente los niveles de expresión de ARNm y proteínas de varios pro-citocinas inflamatorias, que reducen los niveles de TNF- α , las interleucina IL 1 β , IL-6 e IL-8, en los tejidos del hipocampo. Además, una fracción rica en saponina obtenida por la purificación del extracto crudo de *P. tenuifolia* mejoró significativamente el aprendizaje y la memoria en ratones de edad normal en el laberinto acuático de Morris (MWM), las pruebas de evitación pasiva de reducción y las ocho tareas de laberinto radial de dos brazos en ratas y en ratones transgénicos 5xFAD (30). Todos estos efectos pueden estar implicados en la regulación de las vías de señalización TLR4/MyD88/NF- κ B y TLR4/TRIF/NF- κ B. Los informes demostraron que el extracto crudo de *P. tenuifolia* (100 y 200 mg/kg) mejoró significativamente la memoria espacial deteriorada en ratones envejecidos en las pruebas MWM y de reducción, un efecto que se relacionó con la interrupción de la superóxido dismutasa (SOD) y actividades de catalasa (CAT), la inhibición de las actividades de MAO y acetilcolinesterasa (AChE), y la disminución en los niveles de MDA en el tejido cerebral (29).

La senegenina, un componente activo de los extractos de la raíz de *P. tenuifolia*, inhibió también la expresión de ARNm al regular a la baja las mismas vías de señalización antes mencionadas en el estudio que utilizó un modelo de disfunción cognitiva posoperatoria de ratas ancianas que se han sometido a esplenectomía (31). Estos datos avalan el concepto sobre la acción de PR al ejercer un efecto neuroprotector significativo al mejorar el aprendizaje y la memoria, impulsado en parte por la modulación de la actividad colinérgica y la neuro inflamación como se menciona antes.(24).

Los mecanismos subyacentes y la base del material terapéutico se muestran en las Figuras 1-3. los principales mecanismos que permiten estos efectos protectores neurológicos son los siguientes: efectos antioxidantes y apoptosis asociada; efectos antiinflamatorios y apoptosis relacionada; y proliferación neurológica, diferenciación de regeneración y mejora de la plasticidad sináptica neuronal (24).

Figura 1-3: Efecto del estrés oxidativo.



Fuente: Jiang N, Wei S, (...), Liu X - Front Psychiatry Protective effects and mechanism of radix polygalae against neurological diseases as well as effective substance. 2021

1.1.2 Generalidades de *Polygala paniculata*

1.1.2.1 Etnobotánica de *Polygala paniculata*

Es una hierba de flores rosadas o blancas que crece en pastizales y al borde de caminos, en altitudes entre 350 y 3100 metros, en Colombia está distribuida principalmente en las tres cordilleras andinas, en especial en la occidental en los departamentos de Nariño y Cauca y en la oriental en los Santanderes, Boyacá y Cundinamarca (32). Esta especie se utiliza como planta medicinal contra mordeduras de serpientes y blenorragias y es la especie de mayor distribución en el país.

Es una especie referida en estudios etnobotánicos realizados en América Latina, se utiliza como antiinflamatorio, en Brasil es usada para el dolor de cabeza, de dientes e incluso dolor muscular, en Panamá se usa para la diarrea y la disentería (8), en Colombia ya hace varias décadas aparecía en libros de botánica como útil en fiebres intermitentes y como tema de algunas tesis de grado en farmacia con investigaciones farmacognósticas (10). En otros países como Vietnam se usa para el cansancio, pitiriasis versicolor, prurito, fiebre, trastornos urinario y estreñimiento (9).

Figura 1-4: Planta y Distribución de *Polygala paniculata* en Colombia.



1.1.2.2 Actividad farmacológica de *Polygala paniculata*

La actividad farmacológica de *P. paniculata* ha sido menos explorada que las especies de origen asiático, sin embargo los estudios realizados muestran resultados promisorios, por ejemplo un extracto de raíces a partir de material vegetal colectado en Brasil, mostró un efecto protector frente a la neurotoxicidad inducida por metilmercurio (MeHg) en ratones adultos, redujo el déficit de rendimiento motor causado por el MeHg, inhibió significativamente la glutatión peroxidasa y aumentó la actividad de la glutatión reductasa inducida por el tóxico en corteza del cerebro y cerebelo (4,11,33). Otro trabajo evidenció efectos protectores potenciales de tres compuestos de la especie *Polygala paniculata*, la (7-prenil-oxi-6-metoxicumarina, la quercetina y la 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxi xantona) frente a MeHg y cloruro de mercurio (HgCl_2). Solo la quercetina (100-300 μM) previno la disminución de la viabilidad mitocondrial y la mayor generación de peróxido de hidrógeno inducidas por MeHg en fracciones enriquecidas en mitocondrias de cerebro de ratón (12). Se ha evaluado también el efecto protector de tres flavonoides de *Polygala paniculata* (miricetina, miricitrina y rutina) contra MeHg. La miricetina y la miricitrina provocaron una disminución dependiente de la concentración de la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo inducidos por MeHg. Sin embargo, la rutina fue ineficaz para contrarrestar la toxicidad del MeHg (34)(4).

Además de los efectos protectores frente a la toxicidad por mercurio en células del sistema nervioso, *P. paniculata* ha mostrado también tener potenciales efectos antidepresivos, analgésicos, antiedematosos e hipotensores. La administración por vía oral del extracto hidroalcohólico de *P. paniculata* mostró un efecto de tipo antidepresivo, al reducir significativamente el tiempo de inmovilidad en la prueba de natación forzada FST (0.01-30 mg / kg) en comparación con el grupo control, sin alterar la actividad locomotora, lo que podría implicar que este extracto tenga una acción mediada por la interacción con receptores serotoninérgicos (receptores 5-HT_{2A}), noradrenérgicos (receptores α_2 y β) y dopaminérgicos (D₁ y receptores D₂) (35). Los extractos etanólicos de las partes aéreas de *Polygala paniculata* silvestre y cultivada por micropropagación presentaron actividad analgésica mediante la prueba de placa caliente, remoción de cola y formalina, y actividades anti edematogénica mediante la prueba de edema auricular inducido por aceite de croton (36). El extracto hidroalcohólico de *Polygala paniculata* mostró tener efectos hipotensores y vaso relajantes en ratas normotensas anestesiadas, posiblemente

dependientes de la vía óxido nítrico / guanilato ciclasa; se sugiere que estos efectos podrían estar relacionados con el contenido del flavonoide rutina en este extracto (37). En los extractos en éter de petróleo y cloroformo de *P. paniculata* L. (*Polygalaceae*), se encontró que posee propiedades tanto molusquicidas como antifúngicas (38).

1.1.2.3 Fitoquímica de *Polygala paniculata*

En Brasil, un estudio sobre la especie *P. paniculata* ha documentó la presencia de flavonoides en los extractos de sus raíces, tales como: quercetina (12), rutina, entre otros. Otras investigaciones han aislado en *P. paniculata*, varias cumarinas como la auraptena, febalosina, murrangatina, cumarina y diester de cumarinas (38). En muestras de *P. paniculata* recolectadas en el área de Santa Catarina, Brasil se identificaron por RMN compuestos como la 7-metoxi-8-(1',2'-epoxi-3'-metil-3'-butenil)-cumarina (17)(39,40). Algunos estudios han elucidado cumarinas por métodos espectroscópicos (EIMS, IR, RMN) en *Polygala paniculata* L. como la cumarina murrangatina, además, xantonas y el flavonoide rutina; y por cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HRGC-MS) se han caracterizado esteroides y xantonas (40). Además, se ha evidenciado que *Polygala paniculata* recolectada en Brasil es una fuente significativa de salicilato de metilo (41,42).

1.2 Estrés oxidativo y flavonoides en enfermedades neurodegenerativas

1.2.1 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es inducido por la pérdida del equilibrio de la oxido-reducción en los organismos, que puede ser causado por un exceso de oxidantes, ya sean de origen endógeno o exógeno o por un déficit en la producción de antioxidantes. Estos oxidantes son principalmente especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en ingles), radicales libres hidroxilos y monóxido de nitrógeno (NO). El estrés oxidativo se ha implicado como factor destacado en el origen de diversos trastornos neurológicos (43).

Es ampliamente conocido que, en la fosforilación oxidativa, parte de la respiración celular necesaria para la producción de ATP llevada a cabo en las mitocondrias, puede presentar

disfunciones con generación de moléculas reactivas de oxígeno y radicales libres, las cuales, aunque se requieren deben mantenerse en concentraciones bajas controladas y que al presentarse en niveles altos puede producir daños al ADN celular que puede llevarla a la apoptosis. De forma similar, sucede en otros procesos metabólicos de proteínas y fosfolípidos, estas disfunciones son considerados las principales causas del estrés oxidativo.

El cerebro presenta dos factores que lo hacen propenso al estrés oxidativo, por un lado, posee una alta cantidad de lípidos en las membranas neuronales, ricos en ácidos grasos poliinsaturados y por otro lado requiere de un gran consumo de oxígeno en la respiración celular, lo cual conduce a una producción excesiva de ROS, estas membranas neuronales sufrirán daños fácilmente que inducirán a la muerte celular, pues este tipo de lípidos es muy susceptible a las ROS (43).

El cuerpo humano puede contrarrestar el efecto de las especies reactivas del oxígeno, con antioxidantes endógenos o exógenos como el glutatión, la taurina, la creatina, el zinc, la vitamina E, la vitamina C, la vitamina A y los polifenoles. El efecto del antioxidante se ve reforzado y respaldado por enzimas antioxidantes como el superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión peroxidasa, etc.

En la actualidad se cree que las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Huntington (EH) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), entre y otros síndromes del sistema nervioso, pueden ser el resultado de una alteración bioquímica debido al estrés oxidativo en los componentes biomoleculares.(43) Por lo anterior es importante entender los mecanismos de producción y los procesos que interconectan el estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas, así como el papel fundamental que desempeña el sistema operativo en los trastornos neuronales.

Las ROS contribuyen significativamente al deterioro de las células neuronales mediante la modulación de la función elaboradora de biomoléculas como el ADN, ARN, lípidos y proteínas. Las ROS involucradas en la neurodegeneración incluyen el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido (O^{2-}) y el radical hidroxilo altamente reactivo ($HO\bullet$). También se ha descubierto que las especies de nitrógeno reactivo (RNS), como el óxido nítrico (NO), tienen un efecto nocivo sobre las neuronas, es una molécula que cumple la

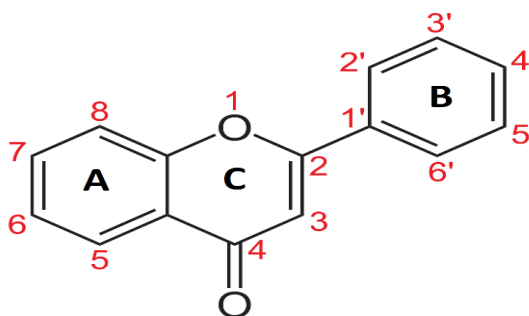
función reguladora de relajación, dilatación vascular y proliferación de células de músculo liso vascular y participa en la adhesión de leucocitos, angiogénesis, agregación de plaquetas, trombosis, tono vascular y hemodinámica, entre otras, sin embargo, en su forma libre es perjudicial para las biomoléculas.

Przedborski publicó una discusión exhaustiva donde se definió la neurodegeneración en general como “cualquier condición patológica que afecte principalmente a las neuronas”. En el mismo artículo se estableció la diferencia entre una serie de trastornos que no son enfermedades neuronales primarias o en los que las neuronas mueren por una causa conocida, por ejemplo, la hipoxia o el envenenamiento, las cuales no son enfermedades neurodegenerativas (44). Las enfermedades neurodegenerativas son un gran grupo heterogéneo de trastornos neurológicos que afectan distintos subconjuntos de neuronas en ubicaciones anatómicas específicas.

1.2.2 Los flavonoides

Los flavonoides son compuestos polifenólicos diaril-propánicos, su estructura es del tipo $C_6-C_3-C_6$, son dos anillos aromáticos (bencénicos) unidos entre sí por una cadena de 3 carbonos ciclada a través de un oxígeno. Se considera que su estructura deriva de la γ -cromona (o benzo- γ -pirona). Así pues, son 2-fenil- γ -cromonas Figura 1-5 (45). Algunos flavonoides existen en las plantas como una forma de glucósido, mientras que también existe la aglicona correspondiente, forma libre sin azúcares.

Figura 1-5: Esquema de flavonoide.

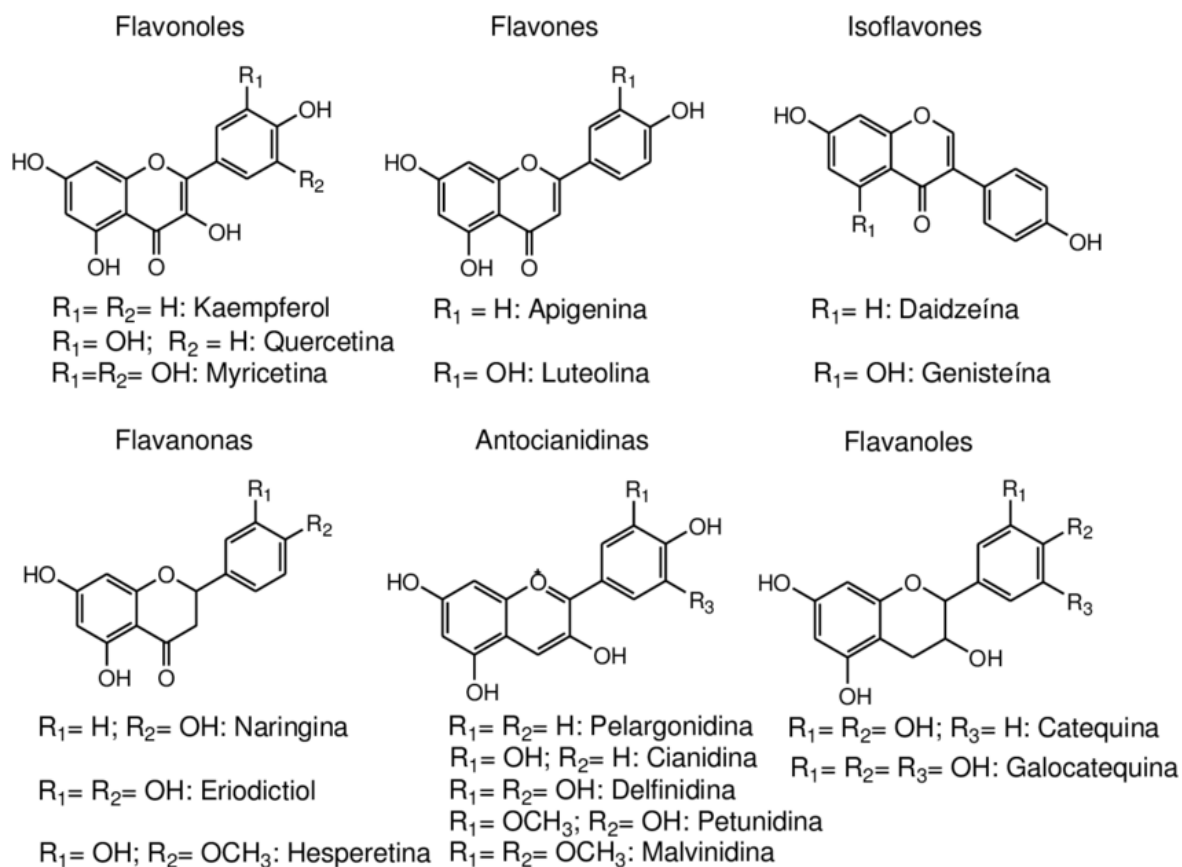


Varios estudios han respaldado el efecto protector de los flavonoides en la prevención de las enfermedades neurodegenerativas. Las plantas son grandes productoras de metabolitos secundarios entre ellos los flavonoides. Actualmente se cuentan con cerca de

6500 flavonoides que pueden ser divididos en seis grupos, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles, flavonoles, antocianidinas, antocianinas e isoflavonas, según el grado de oxidación del anillo C central, el patrón de hidroxilación de los anillos y la sustitución en la posición 3. Adicionalmente, dentro de cada grupo hay variaciones según la disposición de los grupos hidroxilo, la glicosilación o alquilación de la estructura (15). Es importante anotar que los flavonoides pueden ser clasificados también, por otros factores.

Una clasificación y la estructura de algunos los flavonoides se puede ver en la Figura 1-6.

Figura 1-6: Clasificación y estructura de principales flavonoides.



Fuente: https://www.researchgate.net/figure/Figura-4-Estructuras-quimicas-de-flavonoides_fig35_320673651

Los flavonoides se constituyen en los metabolitos activos presentes en la mayoría de las hierbas chinas, incluida en las hojas de *Ginkgo biloba*, cuyos productos derivados sirve de

base de formulaciones hierbas muy utilizadas y representa un caso exitoso de un extracto de la farmacopea china. En 1965, fue introducido en la práctica médica y en el año de 1976, se produjo un medicamento base, denominado Egb761, que fue ampliamente estudiado y utilizado en todo el mundo para tratar o prevenir muchas enfermedades, incluidos los síntomas de la enfermedad de Alzheimer en etapa temprana, la demencia vascular y el tinnitus de origen vascular. Egb761 consta de dos grupos principales de sustancias: glucósidos de flavona (fracción de flavonoides, 24 %, que incluye principalmente isorhamnetina, quercetina y kaempferol) y lactonas terpénicas (fracción de terpenoides, 6 %). Hoy en día, existen muchos estudios e investigación que evidencian y confirman los efectos antioxidantes y neuroprotectores de los flavonoides y este hecho es generalmente aceptado (14).

Por lo anterior resulta de interés conocer los metabolitos de la especie *P paniculata* que cuenta con indicios de ser posible fuente de sustancias con actividades biológicas que pueden ser usadas en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas.

2 Capítulo 2: Metodología

2.1 Recolección de Material Vegetal

Las plantas completas de *Polygala paniculata* fueron adquiridas en la Plaza del Samper Mendoza, recolectado como material fresco con procedencia la zona rural de La Mesa, Cundinamarca y en la plaza de Paloquemao donde se adquirieron plantas completas en estado seco, procedentes de la región rural de Facatativá, Cundinamarca, ambas plazas en la ciudad de Bogotá, en donde la especie vegetal se conoce con el nombre de Sarpoleta. Se separaron dos especímenes que fueron preparados y etiquetados para ser determinados por el Herbario Nacional Colombiano (COL) de la Universidad Nacional de Colombia. Para obtener el extracto de *Polygala tenuifolia* se adquirió un producto comercial en cápsulas de 100mg de concentración 20:1.

Figura 2-1: Planta *Polygala paniculata*



Figura 2-2: Material recolectado de *P paniculata*

2.2 Fitoquímica preliminar

2.2.1 Preparación de extractos

El material vegetal una vez hecha una inspección y limpieza, se sometió a un periodo de secado en estufa de aire circulante a temperatura de 40° centígrados, se separaron en cuatro muestras de trabajo, dos de plantas colectadas recientemente o denominado material fresco y dos de plantas que fueron colectadas hace un tiempo y que se denominó material seco y que fueron codificadas de la siguiente manera: RxPP1 (raíces de material fresco), AxPP1 (las partes aéreas de material fresco) , RxPP2 (las raíces de material seco) y AxPP2 (las partes aéreas del material seco). Posteriormente se procedió a triturar el material mecánicamente.

Cada muestra se sometió a extracción y concentración de la siguiente forma: el polvo de del material vegetal fue dispuesto en percoladores para extracción exhaustiva con etanol al 96% a temperatura ambiente durante 3 procedimientos hasta agotamiento, mientras las raíces fueron extraídas por el método de maceración estática con etanol al 96%, en este caso el material fue filtrado en tres ocasiones.

Figura 2-3: Raíces de *P paniculata*



Para concentrar los extractos, a los líquidos obtenidos se les redujo el volumen mediante presión reducida empleando un equipo de rotaevaporación, a una temperatura de 38°C y 60 rpm, posteriormente el extracto fue secado en estufa a 40°C hasta sequedad completa y se calculó el rendimiento.

Para el caso de *P tenuifolia*, se utilizaron 20 cápsulas de 100 mg con un extracto de concentración 20:1, el peso bruto de las cápsulas fue de 4,259 g las cuales fueron abiertas y se empleó el polvo que pesó 3,324 g y que fue extraído en etanol al 96% por 24 horas y pasado por un filtro, posteriormente el filtrado se concentrado utilizando evaporador rotatorio y secado para posterior uso.

De cada extracto se separaron dos porciones: una para el análisis fitoquímico preliminar y otra para las pruebas de actividad biológica.

Figura 2-4: Parte aéreas de *P paniculata*

2.2.2 Caracterización de los extractos

Una vez obtenidos los extractos de raíces y partes aéreas de *Polygala paniculata* RxPP1, RxPP2, AxPP1, AxPP2, así como el extracto de *Polygala tenuifolia*, se procedió a la caracterización de los extractos por la técnica de cromatografía en capa delgada (CCD) sobre sílica gel 60 GF₂₅₄, para tal efecto se seleccionó la fase móvil más conveniente que fue una mezcla de CHCl₃ : CH₃OH (cloroformo: metanol) en relaciones 70:30 y 80:20. Las placas eluidas se observaron bajo luz ultravioleta de longitudes de onda de 254 nm y 365 nm (46). Las placas fueron reveladas con los siguientes reactivos químicos, Tabla 2-1.

Tabla 2-1: Reveladores usados en placas de cromatografía de capa delgada

Revelador	Composición	Tipo de metabolitos observados
Godin	Vainillina en etanol, H ₂ SO ₄ en etanol, y calentamiento a 100°C	Revelador universal, Terpenos, esteroides, saponinas y flavonoides
NP-PEG	NP al 1% en metanol y PEG 4000 al 5% en etanol	para flavonoides
AlCl ₃	AlCl ₃ al 2% en etanol	Para flavonoides
Dragendorff	Nitrato de Bismuto/Yoduro de Potasio	Para alcaloides
Bontrager- Kraus	KOH al 10 % en etanol	Para antraquinonas

2.2.3 Fraccionamiento liquido - liquido

Una vez caracterizado el extracto, se decidió realizar un fraccionamiento líquido – líquido del extracto RxPP1 de raíces, para tal efecto se dispersó en una solución de agua destilada: metanol 80:20 y posteriormente se realizaron extracciones líquido-líquido con solventes de diferentes polaridades, Tabla 2-2.

Tabla 2-2: Solventes empleados en el fraccionamiento de RxPP1

Fase	Solvente	Fracción
1	Hexano	Fr Hexánica
2	Cloroformo	Fr Clorofórmica
3	Acetato de etilo	Fr Acetato de etilo

Figura 2-5: Fraccionamiento de *P paniculata*



A cada una de las fracciones se les retiro el solvente usando rotaevaporación y posterior secado hasta peso constante en estufa a 40°C y fueron caracterizadas a través de perfil cromatográfico. Como fase estacionaria se empleó sílica gel 60 F₂₅₄ en soporte de aluminio de 0,25 mm (Merck®) y como fase móvil mezclas 70:30, 80:20 de soluciones de Cloroformo: Metanol, las placas se revelaron con luz ultravioleta a longitudes de onda de 254 y 365 nm y posteriormente con reveladores químicos como Godin y NP/PEG para flavonoides.

2.3 Estimación de flavonoides totales

Los flavonoides totales se determinan mediante el método espectrofotométrico de Márghitas (47). Se elaboró una curva de calibración con quercetina en diferentes concentraciones, que fue utilizada para una valoración indirecta. Los resultados se expresan en equivalencia de patrón en este caso quercetina. Se emplearon placas de 96 cavidades, donde se surtieron diferentes diluciones de los extractos de raíces y partes aéreas, patrón quercetina y blanco o solvente puro, cada una de las muestras se analizó por triplicado para obtener el valor por promedio. Con los datos de la lectura hecha en el espectrómetro, se graficó y se obtuvo una curva de calibración que sirvió para comparar con la curva de las muestras, igualmente obtenida. El resultado se calculó en equivalentes de la muestra patrón como un porcentaje promedio en un rango determinado de concentración. promedio en porcentaje (%).

2.3.1 Materiales para la estimación de flavonoides totales

Todos los disolventes utilizados fueron grado reactivo analítico. Se preparó una solución de cloruro de aluminio AlCl₃ al 2% en etanol 96%. En este caso el patrón solución se prepara con quercetina cuya pureza reportada es 98 %. Se empleó como solvente CH₃OH: H₂O destilada en relación 80:20. Se preparó una solución base de quercetina/solvente base 10 mg/100 ml. Para los extractos se obtuvieron soluciones de 50 mg/100 ml con el mismo solvente.

2.3.2 Preparación de los Extractos para la estimación de los flavonoides totales

Para la estimación de los flavonoides totales de cada muestra, se prepararon 5 diluciones diferentes de cada extracto comprendidas entre 1/10, 2,5/10, 5/10, 7/10 y 10/10 de extractos con concentraciones de 49 125 250 350 y 500 ug/mL respectivamente y 7 diluciones del patrón 0,5/10, 1/10, 1,5/10, 2/10 y 2,5/10 5/10, 7/10 y 10/10 de solución de quercetina con concentraciones de 4,9 9,8 14,7 19,6, 24,5 68,6 y 98 ug/mL respectivamente en una disolución al 80% de metanol en agua.

2.3.3 Estimación de los flavonoides totales en los Extractos

En las placas de 96 pozos se dispuso 100 uL de cada una de las concentraciones de las muestras a evaluar y se le adicionaron 100 uL de AlCl₃ al 2%. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente la absorbancia fue medida a 420 nm. Se usó el patrón de quercetina en concentraciones entre 5 ug/ml a 25 ug/ml para construir la curva mencionada. El contenido de flavonoides totales se calculó con base o equivalentes de quercetina QE//g de EEP(48).

2.4 Evaluación de actividad antioxidante

Se determinó la actividad antioxidante de los extractos de las raíces y las partes aéreas de la especie *Polygala paniculata* mediante un método espectrofotométrico. La actividad antioxidante es referida al radical libre estable 1,1-difenil-2-picrilhidrazil, calculando la capacidad inhibitoria de cada muestra expresada en porcentaje, a partir de cambios en la absorbancia, de acuerdo al método reportado por Fukumoto y Mazza. Se emplearon placas de 96 cavidades, donde se surtieron con concentraciones de 49 125 250 350 y 500 ug/mL de extractos de raíces, y de partes aéreas igualmente con el patrón quercetina con concentraciones de 4,9 9,8 14,7 19,6, 24,5 68,6 y 98 ug/mL, y blanco o solvente puro, cada muestra se tomó

por triplicado para obtener el valor por promedio. Con los datos de lectura del espectrómetro se graficados y se obtuvo una curva que permitió calcular el IC50 o concentración inhibitoria media o sea aquella que inhibe el 50% de radicales DPPH de las muestras y de la quercetina.

2.4.1 Materiales para la evaluación de efecto antioxidante

Todos los disolventes utilizados fueron grado reactivo analítico. El compuesto, 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), se disolvió (4 mg) en 50 ml de MeOH al 80% en H₂O destilada. En este caso la solución patrón se prepara con quercetina cuya pureza reportada es del 98% %. Todas las muestras se solubilizaron en Metanol: H₂O destilada. Se obtiene una solución madre de quercetina de 10 mg/100ml. Para los extractos se obtuvieron soluciones de 50 mg/100ml con el mismo solvente base(49).

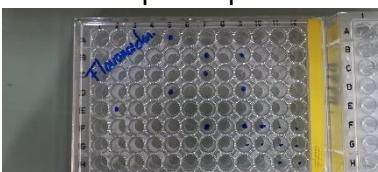
2.4.2 Preparación de los Extractos para la Actividad Antioxidante

Para la determinación de la actividad antioxidante, se prepararon 5 diluciones diferentes de cada extracto comprendidas entre 1/10, 2,5/10, 5/10, 7/10 y 10/10 de extractos con concentraciones de 49 125 250 350 y 500 ug/mL respectivamente y 7 diluciones del patrón, 1/10, 1,5/10, 2/10 y 2,5/10 5/10, 7/10 y 10/10 de solución de quercetina con concentraciones de 4,9 9,8 14,7 19,6, 24,5 68,6 y 98 ug/mL respectivamente en una disolución al 80% de metanol en agua.

2.4.3 Determinación de la Actividad Antioxidante de los Extractos

La capacidad para capturar radicales libres de los extractos fue determinada utilizando como referencia la disolución de 1,1-Difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) de acuerdo al método reportado por Fukumoto y Mazza [10]. EL DPPH se caracteriza

Figura 2-6: Placa de 96 pozos para muestras



por poseer un electrón desapareado que es un radical libre, estabilizado por resonancia. Por esta propiedad, el DPPH se utiliza como material de referencia para determinar el poder antioxidante de una sustancia por captura de radicales libres.

Para la determinación de la actividad antioxidante de los extractos objeto de este estudio, se tomaron 30 μL de cada extracto a 6 concentraciones (Secc. 2.4) y se le adicionó a cada uno 150 μL de la solución de 150 $\mu\text{mol/L}$ de DPPH. Todas las reacciones fueron llevadas a cabo durante 30 min a temperatura ambiente, en microplacas de 96 pozos protegidas de la luz. Ver figura 2-8. Después de lo cual, se mide la absorbancia a 520 nm en un espectrómetro.

La actividad antioxidante se expresa como porcentaje de inhibición lo cual corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración, de acuerdo con la siguiente ecuación (2-1):

$$\% \text{Inhibición} = \%I = \frac{A - A_1}{A} * 100 \quad (2-1)$$

donde A es la absorbancia del blanco, y A1 es la absorbancia de la muestra.

Los resultados obtenidos por este método se reportan como IC50 que es la concentración inhibitoria media, es decir, la concentración de compuestos antioxidantes que es capaz de inhibir el 50 % del radical DPPH (48).

2.4.1 Cromatografía en columna

Con el extracto del Grupo RxPP2 se realizó una cromatografía de columna, se utilizó 49 g de sílica gel Merck 60 (0,064 – 0,200 mm), se preparó una pastilla de mezcla del extracto de 1,218 g más 5 g de sílica gel. La columna se eluyó utilizando como fases móviles las siguientes soluciones de 200 ml. Ver Tabla 2-3 y el fraccionamiento por volúmenes de 50 ml

Tabla 2-3: Fraccionamiento por volúmenes de 50ml

Sub-fracción	Volumen (ml)	Fase Móvil
1	400	Hexano 100%
2	400	CHCl ₃ 100%
3	200	CHCl ₃ : CH ₃ OH 90/10
4	200	CHCl ₃ : CH ₃ OH 80/20
5	200	CHCl ₃ : CH ₃ OH 60/40
6	200	CHCl ₃ : CH ₃ OH 50/50
7	200	CHCl ₃ : CH ₃ OH 40/60
8	200	CHCl ₃ : CH ₃ OH 30/70
9	200	CHCl ₃ : CH ₃ OH 20/80
10	200	CH ₃ OH 100%

Se colectaron fracciones de aproximadamente 50 ml, que se rotaevaporaron a 35°C y se llevaron a sequedad a temperatura ambiente (20°C) durante 72 horas, se realizaron cromatografías y se revelaron con Godin y NP-PEG, se reunieron fracciones con perfiles químicos similares. Para realizar cromatografías con patrones, Tabla 4 para lograr un perfil químico que apoyen la selección de fracciones de interés en las pruebas biológicas.

Figura 2-7: Cromatografía en columna de *P paniculata*

2.5 Búsqueda bibliográfica sobre las relaciones antioxidantes y neuroprotectores de los flavonoides

Se realizó una búsqueda bibliográfica sobre el efecto neuroprotector de los antioxidantes y los flavonoides en las bases de datos PubMed, ScienceDirect, y el portal ResearchGate, con las palabras de búsqueda “antioxidant”, “antioxidative”, “flavonoids”, “traditional Chinese medicine”, “herbal”, neurodegenerative disease” en artículo o revisiones.

De acuerdo con los resultados, se depuraron los artículos repetidos y se seleccionaron los artículos posteriores a 2012 que hacían referencia a compuestos naturales encontrados en la flora. Se seleccionaron los artículos que abordan información sobre enfermedades degenerativas principales y se descartaron aquellos con énfasis en compuestos específicos o en vías biológicas específicas.

3 Capítulo 3: Resultados y discusión

3.1 Fitoquímica preliminar

3.1.1 Elaboración de extractos

A partir de las raíces y de las partes aéreas de las plantas recolectadas de *Polygala paniculata* del grupo de plantas frescas y plantas secas se obtuvieron extractos secos con los siguientes rendimientos, Tabla 3-1.

Tabla 3-1: Rendimientos de los extractos de *P. paniculata* y *P. tenuifolia*

Codificación	Parte usada para el extracto	Peso material vegetal molido(g) o material de partida	Extracto(g)	Rendimiento (%)
RxPP1 fresca	Raíces	13,032	1,686	12,94
AxPP1 fresca	Partes aéreas	85,488	15,16	17,83
RxPP2 seca	Raíces	11.470	1,218	11,47
AxPP2 seca	Partes aéreas	115,65	18,73	16,3
ExPT Cápsula	Producto terminado en cápsulas	4,259	ND	-

Esta es la equivalencia de *P. tenuifolia* 20 capsulas x 100mg = 2 g 20:1

El rendimiento de los extractos estuvo en un rango de 12% para las raíces y cerca de 17% para las partes aéreas, estos rendimientos se encuentran dentro de los rangos reportados para hierbas y partes aéreas. Las raíces tienen un rendimiento significativo comparado con raíces de plantas de mayor tamaño, que generalmente están constituidas por material lignificado y de mayor dureza.

3.1.2 Caracterización cualitativa

La caracterización química preliminar de los extractos usando CCD y los respectivos reveladores se muestran en la Figura 3-1 y se resumen en la Tabla 3-2.

Figura 3-1: Cromatografías de capa delgada (CCD) de extractos de *P paniculata*

UV 364nm					UV 254nm					Godin					NP/PEG					NP/PEG UV365nm				
Ax1	Rx1	Ax2	Rx2	Eol	Ax1	Rx1	Ax2	Rx2	Eol	Ax1	Rx1	Ax2	Rx2	Eol	Ax1	Rx1	Ax2	Rx2	Eol	Ax1	Rx1	Ax2	Rx2	Eol
Extractos etanólicos con fase fija silica gel										Nomenclatura columnas														
Fase móvil 20/80 CHCL3/MeOH										Ax1 = Partes aéreas fresca <i>P paniculata</i>														
										Rx1 = Raíces frescas <i>P paniculata</i>														
										Ax1 = Partes aéreas secas <i>P paniculata</i>														
										Rx2 = Raíces secas de <i>P paniculata</i>														
										Eol = esterol														

Tabla 3-2: Caracterización preliminar de los extractos de *P paniculata*

Revelador	Detección	RxPP1	AxPP1	RxPP2	AxPP2	ExPT
Godín	Terpenos, esteroides y saponinas	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
NP-PEG	Flavonoides	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
AlCl ₃	Flavonoides y saponinas	Positivo	Positivo			
UV	Cumarinas	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
Dragendorff	alcaloides	Negativo*	Negativo*	Negativo*	Negativo*	Negativo
Bontrager-Kraus	antraquinonas	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

* Se evidencia una sospecha de presencia de alcaloides que tendría que ser confirmada con pruebas adicionales

En la Figura 3-1 observamos las placas cromatográficas reveladas con reactivos de Godín y NEP-PEG que revelan de color amarillo a anaranjado los compuestos tipo flavonoide, como podemos ver estos compuestos se encuentran de manera representativa en todos los extractos, así mismo en esta figura se observan en las placas reveladas con Godín, compuestos tipo esterol y/o terpeno con colores morados y azules, que como vemos son compuestos de menor polaridad que los anteriores.

En un paso posterior se compararon mediante cromatografía de capa delgada (CCD), los extractos obtenidos de *P paniculata* con los obtenidos de las cápsulas de *P tenuifolia*, evidenciado diferencias importantes que pueden estar asociadas tanto a diferencias en los perfiles químicos de las especies de origen colombiano y la de origen asiático así como al procesamiento que pueda tener el extracto para ser incorporado en esta forma farmacéutica, de cualquier forma los perfiles químicos son considerablemente diferentes, Figura 3-2.

Figura 3-2: CCD para comparación *P paniculata* VS *P tenuifolia*

Revelador→	UV 364nm				UV 254nm				Godin				NP/PEG				NP/PEG UV254nm			
Extractos etanólicos con fase fija silica gel Fase móvil 30/70 CHCL ₃ /MeOH																				
Extractos→	Rx2	Ax1	Rx1	Tx1	Rx2	Ax1	Rx1	Tx1	Ax1	Rx1	Rx2	Tx1	Rx2	Ax1	Rx1	Tx1	Rx2	Ax1	Rx1	Tx1
Nomenclatura columnas																				
Rx2 = Raíces secas de <i>P paniculata</i>																				
Ax1 = Partes aéreas fresca <i>P paniculata</i>																				
Rx1 = Raíces frescas <i>P paniculata</i>																				
Tx1 = <i>P tenuifolia</i>																				

3.1.3 Resultado Fraccionamiento líquido-líquido

Con la caracterización anterior se decidió realizar un fraccionamiento líquido-líquido de uno de los extractos, considerando que el órgano más usado en la medicina tradicional China es la raíz, se decidió comenzar a trabajar con este extracto a fin de obtener fracciones con diferente polaridad que puedan ser posteriormente evaluadas en ensayos biológicos y en estudios químicos más detallados.

Para tal efecto se comenzó la partición con 1,54 g de *Polygala paniculata* con los rendimientos mostrados en la Tabla 3-3

Tabla 3-3 Fraccionamiento liquido-liquido de extractos de *P paniculata*

Fracción	Eluyente	Peso seco (g)	Rendimiento (%)
1	Hexano	0,053	3,44
2	Cloroformo	0,214	13,90
3	Acetato de etilo 1	1,010	65,58
4	Acetato de etilo 2	0,030	1,95
	Totales	1,307	84,87
	Residuos	0,233	15,13

En el proceso fue necesario realizar dos fraccionamientos con acetato de etilo por formación de una emulsión, las fracciones separadas como Acetato de etilo 1 y 2 mostraron similitud en su perfil cromatográfico por lo que fueron reunidas. La fracción 3 constituyó dos tercios de la muestra lo que nos permite inferir que la mayor cantidad de metabolitos corresponden a compuestos de una polaridad media a alta. Las fracciones también fueron caracterizadas empleando CCD, las cromatografías reveladas con Godin y NP-PEG, corroboraron la considerable presencia de flavonoides particularmente en las fracciones obtenidas con cloroformo y acetato de etilo, en esta última considerando la polaridad, se espera encontrar en su mayoría flavonoides glicosilados. Figura 3-3 con fase móvil 30/70 CHCL₃/MeOH. Figura 3-4 con fase móvil 80/20 CHCL₃/MeOH.

La comparación cromatográfica de las fracciones con *Polygala tenuifolia* no mostró similitudes en la composición química, más allá de evidenciar la presencia de cumarinas en los extractos de *P. paniculata* y en *P. tenuifolia*.

Figura 3-3: CCD de las fracciones de *P paniculata* (30/70)

Revelador→	UV 364nm				UV 254nm				Godin				NP/PEG				NP/PEG UV254nm			
Fracciones en fase fija silica gel																				
Fase móvil 30/70 CHCL ₃ /MeOH																				
Extractos→	Hex	Clo	AdE1	AdE2	Hex	Clo	AdE1	AdE2	Hex	Clo	AdE1	AdE2	Hex	Clo	AdE1	AdE2	Hex	Clo	AdE1	AdE2
Nomenclatura columnas																				
Hex = fracción de pasada con Hexano 100%																				
Clo = fracción de pasadas con Cloroformo 100%																				
AdE = fracciones de pasada con Acetato de etilo 1 y 2 respectivamente																				

Figura 3-4: CCD de las fracciones de *P paniculata* (20/80)

Revelador→	UV 364nm				UV 254nm				Godin				NP/PEG				NP/PEG UV254nm			
Fracciones en fase fija silica gel																				
Fase móvil 20/80 CHCL ₃ /MeOH																				
Extractos→	Hex	Clo	AdE1	AdE2	Hex	Clo	AdE1	AdE2	Hex	Clo	AdE1	AdE2	Hex	Clo	AdE1	AdE2	Hex	Clo	AdE1	AdE2
Nomenclatura columnas																				
Hex = fracción de pasada con Hexano 100%																				
Clo = fracción de pasadas con Cloroformo 100%																				
AdE = fracciones de pasada con Acetato de etilo 1 y 2 respectivamente																				

3.2 Resultados de la estimación de flavonoides totales

Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se procedió a realizar la respectiva lectura de absorbancias en un lector de microplacas a la longitud de onda de 420 nm, los datos obtenidos fueron exportados en un archivo digital en formato de hoja de cálculo, lo cual permitió el su procesamiento. Se utilizó la aplicación Excel de Microsoft Office versión 18.2110.13110.0. Se muestran los datos obtenidos y las gráficas con el respectivo comportamiento de las muestras, en la cuales se resalta la del patrón de quercetina como referencia. Tabla 3-4 y Figura 3-6, La Figura 3-5 muestra la placa respectiva.

Tabla 3-4: Resultados para estimación de Flavonoides en Extractos de *P paniculata*

Absorbancia quercetina y extractos $A_{420} = \log_{10} I/I_0$ (adimensional) $I =$ Longitud de onda de luz = 420nm			
Concentración (ug/ml)	Quercetina	Raíces	Partes aéreas
4,9	0,076		
9,8	0,141		
14,7	0,218		
19,6	0,243		
24,5	0,455		
49	0,738	0,0154	0,069
68,6	1,018		
98	1,443		
125		0,018	0,121
250		0,051	0,262
350		0,057	0,331
500		0,094	0,446

Figura 3-5: Placa de 96 pozos con prueba estimación Flavonoides

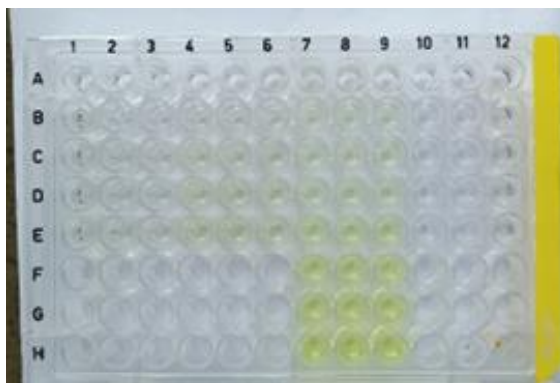
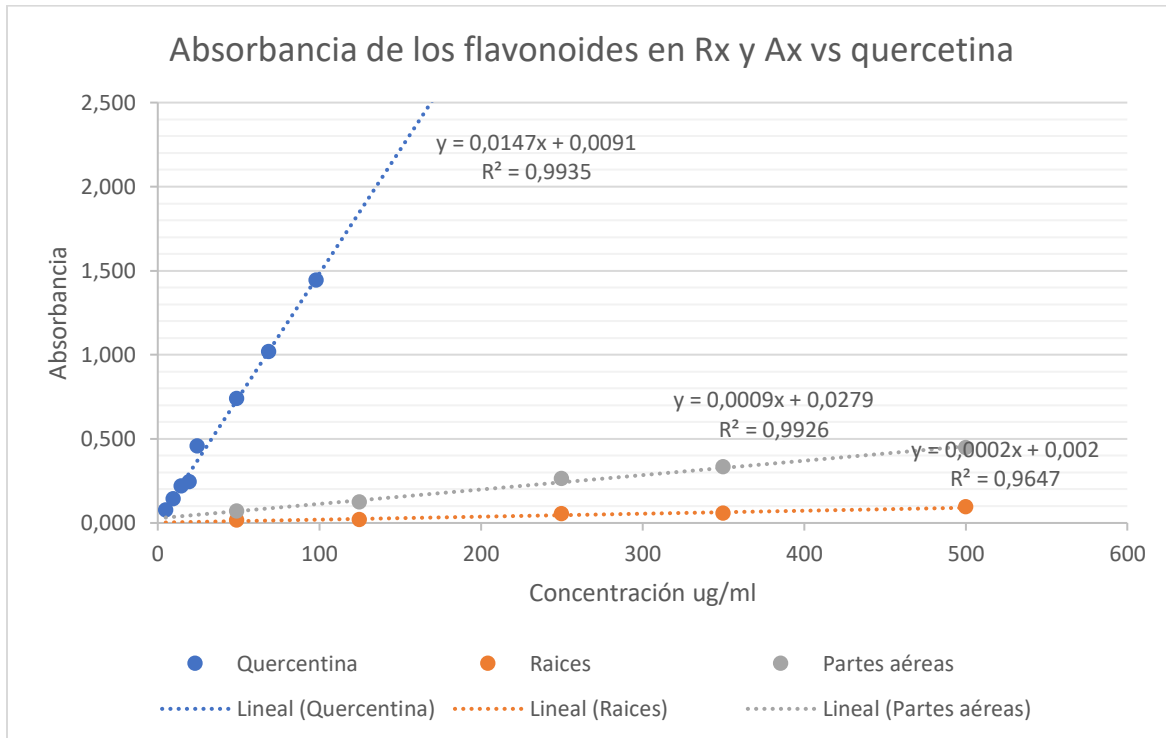


Figura 3-6: Absorbancia de los flavonoides en raíces y partes aéreas vs quercetina

Los datos recopilados permiten inferir un contenido de flavonoides considerando una relación lineal entre la concentración de los extractos y la absorbancia, para ser expresados en términos de un compuesto de referencia, en este caso quercetina.

Considerando las diferencias en concentración se tomó la lectura para la concentración de 50 ug/mL de quercetina equivalente a 0,7441y con este valor se estimó el contenido de flavonoides.

Tabla 3-5: Estimación de flavonoides totales en los extractos de *P paniculata*

Muestra	Concentración estimada ug/ml	Porcentaje estimado de flavonoides en cada muestra
Quercetina	50	-
Partes aéreas	795,78	6,28%
Raíces	3713,5	1,34%

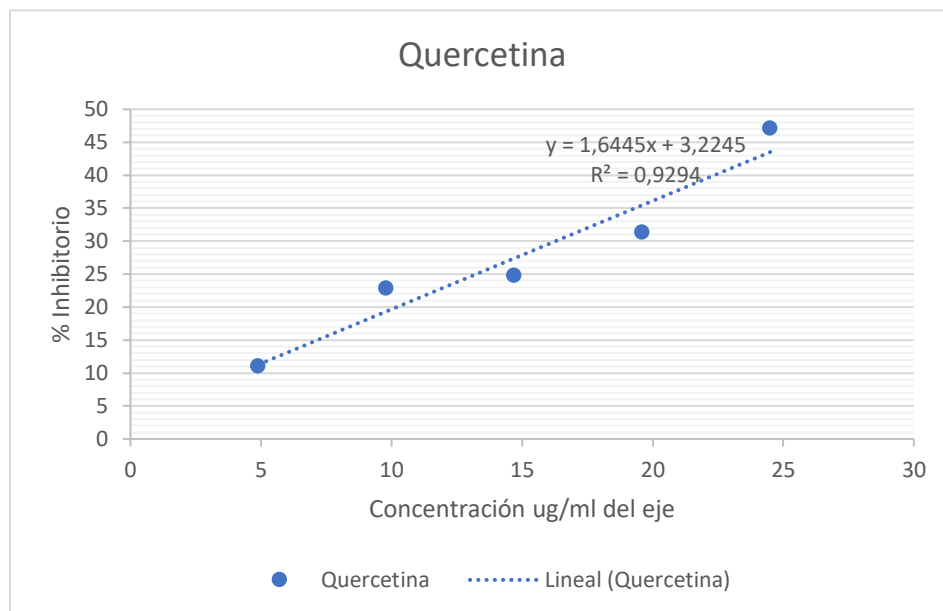
Los resultados obtenidos en términos de porcentaje nos permiten evidenciar una importante diferencia en el contenido de flavonoides de las raíces respecto a las partes aéreas, esto había sido evidenciado de manera cualitativa en las placas cromatográficas donde se observa una mayor intensidad de flavonoides en las muestras de partes aéreas. Tabla 3-5.

3.3 Evaluación de la actividad antioxidante

La placa de 96 pozos preparadas tal como se detalló en la metodología se sometió a lectura en un espectrómetro de UV para evaluar la absorbancia de las muestras, los datos fueron exportados en un archivo digital en formato hoja de cálculo, lo cual permitió su procesamiento y análisis, al igual que la elaboración de gráficos. Se utilizó la aplicación Excel de Microsoft Office versión 18.2110.13110.0. A partir de los datos de absorbancia y aplicando la fórmula descrita en la metodología se calcularon los porcentajes de inhibición tanto para el flavonoide quercetina como para las muestras de *Polygala paniculata* los resultados obtenidos se presentan en la tabla 3-6 y 3-7. Se visualizan las curvas de las muestras y del patrón quercetina en las figuras 3-7 y 3.9. La Figura 3-8 muestra la placa leída para DPPH.

Tabla 3-6: Datos para el patrón de Quercetina

Concentración inhibitoria de Quercetina sobre DPPH	
Concentración (ug/mL)	% de inhibición calculado
50	3,73
125	11,58
250	15,67
350	25,56
500	34,69

Figura 3-7: Curva patrón de Quercetina**Tabla 3-7:** Datos de % de inhibición de los extractos de *P paniculata*

Curva de Inhibición de extracto de <i>P paniculata</i>		
Concentración de extractos de <i>P paniculata</i> (ug/mL)	% de inhibición de partes aéreas	% de inhibición de Raíces
50	3,73	2,10
125	11,58	5,20
250	15,67	6,07
350	25,56	6,31
500	34,69	11,28

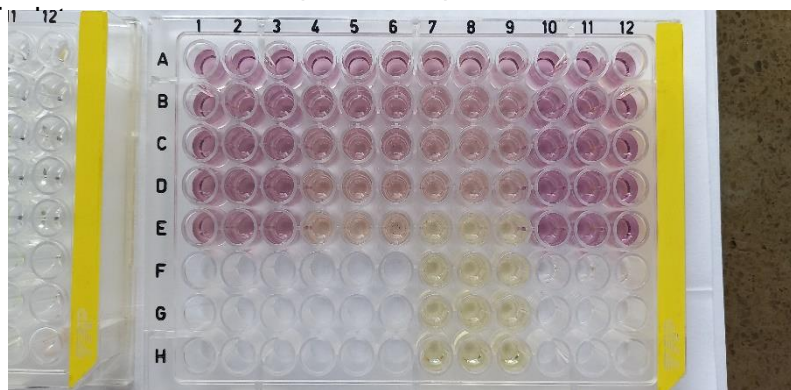
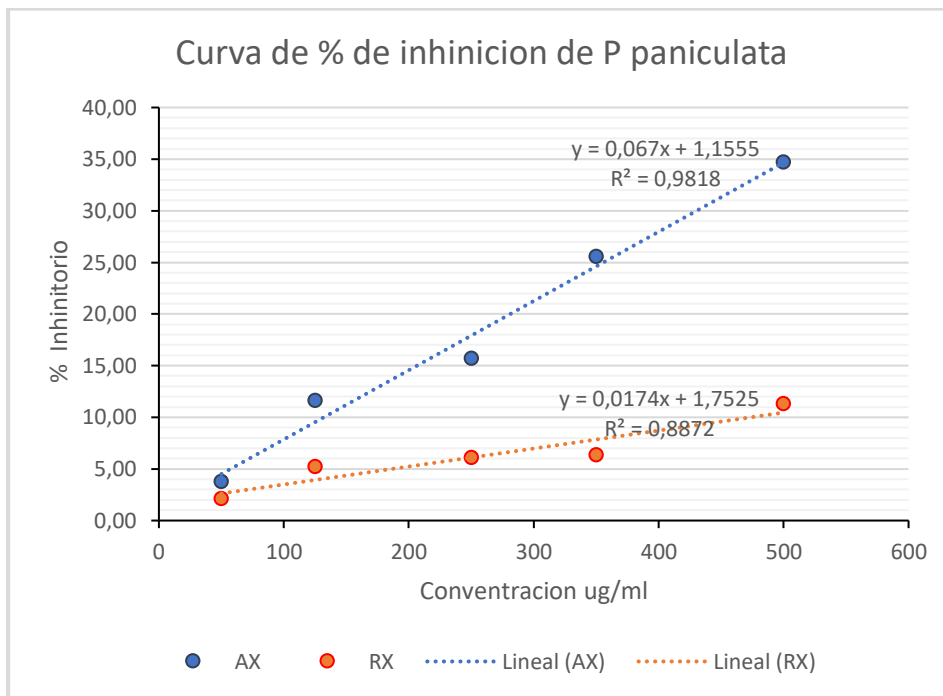
Figura 3-8: Placa de 96 pozos con prueba de DPPH de P

Figura 3-9: Curva de % de inhibición de *P paniculata*



Se reporta en resultado como IC₅₀ (Concentración Inhibitoria 50%)

Tabla 3-8: Comparación de concentración inhibitorias medias quercetina/extractos

Muestra	Concentración inhibitoria (IC ₅₀) ug/mL
Patrón quercetina	28,44
Partes aéreas de <i>P paniculata</i>	729,02
Raíces de <i>P paniculata</i>	2.772,84

La actividad se reporta en términos de CI₅₀ (concentración inhibitoria 50), si bien los valores de IC₅₀ para los extractos es alto comparado con el de la quercetina, Tabla 3-8, cabe considerar que se tiene como patrón una sustancia al 98% de pureza y los extractos tanto de raíces como de partes aéreas contienen además de flavonoides otros tipo de metabolitos y componentes, como vimos en el ensayo anterior el extracto de partes aéreas contiene cerca del 6% de metabolitos tipo flavonoide, que no son necesariamente los únicos responsables de la actividad antioxidante pero si los que se encuentran en una concentración considerable.

3.4 Cromatografía de columna

En la parte final del trabajo se decidió realizar una cromatografía en columna con el extracto de las raíces de *Polygala paniculata* (RxPP2), esto con el fin de obtener fracciones que pudieran ser evaluadas en un ensayo in vitro con células y determinar con más precisión el tipo de flavonoides presentes en la muestra, sin embargo, no fue posible realizar los ensayos de actividad in vitro. Con el extracto de las raíces de *Polygala paniculata* de plantas (RxPP2) se le realizó una cromatografía de columna con fases móviles de diferente polaridad como se describió en la metodología, los resultados se muestran en la Tabla 3-9. La figura 3-10 muestra un paso del proceso.

Figura 3-10: Cromatografía en columna



Tabla 3-9: Resultados de la cromatografía de columna

Vial	Tara	Peso bruto (g)	Peso neto (mg)	Fase Móvil*
1	8,613	8,674		90/10
2	8,57	8,608	38	
3	8,457	8,484	27	80/20
4	8,575	8,605	30	80/20
5	8,521	8,546	25	
6	8,543	8,559	16	
7	8,547	8,787	240	70/30
8	8,701	8,765	64	60/40
9	8,548	8,6	52	
10	8,452	8,708	256	50/50
11	8,7	8,744	93	40/80
12	8,65	8,703	53	
13	8,54	8,821	281	30/70
14	9,528	9,535	7	20/80

*A excepción de la primera pasada fue con Hexano y la segunda pasada con Metanol Cloroformo al 100%, el resto de pasadas consisten en soluciones Cloroformo CHCL₃ / Metanol MeOH

Esta prueba se realizó teniendo en cuenta los resultados del fraccionamiento líquido-líquido de los extractos de *P paniculata*, en los cuales las fracciones de mayor porcentaje mostraron ser de metabolitos polares, y pretende una mejor caracterización de los metabolitos mayoritarios.

Con los resultados gracias al cambio secuencial de la fase móvil, se realizan cromatografías de capa delgada que permiten visualizar mediante revelado con NP/PEG y luz ultravioleta, la presencia de grupos de compuestos principales de gran interés. Los resultados también permitieron unificar muestras similares y con los valores de peso permitieron estimar la distribución de los metabolitos. En las CCD se utilizaron patrones conocidos: saponina, cumarina, quercetina y rutina que permiten sugerir en este extracto la presencia de rutina como uno de los flavonoides principales.

Los resultados se pueden ver en la figura 3-11,3-12, 3-13.

Figura 3-11: CCD de separaciones 1 a 11 obtenidas de Ax2 de *P paniculata*

	1-5 extratos Ax2 de <i>P paniculata</i>		6-12 extractos Ax2 de <i>P paniculata</i>	
Luz visible Patrones Cumarina Saponina Rutina Quercetina				
UV 364nm Patrones Cumarina Saponina Rutina Quercetina				
UV 254nm Patrones Cumarina Saponina Rutina Quercetina				
NP/PEG Patrones Cumarina Saponina Rutina Quercetina				
NP/PEG UV 254nm Patrones Cumarina Saponina Rutina Quercetina				
	Fracciones de E	Patrones	Fracciones de Extract	Patrones

Figura 3-12: CCD de separaciones 12 a 20 obtenidas de Ax2 de *P paniculata*

		13-20 Extractos Ax2 de <i>P paniculata</i>	
UV 364nm	Patrones Cumarina Saponina Rutina Quercetina		
UV 245nm	Patrones Cumarina Saponina Rutina Quercetina		
NP/PE G	Patrones Cumarina Saponina Rutina Quercetina		
NP/PE G UV 254nm	Patrones Cumarina Saponina Rutina Quercetina		
		Fracciones de Extracto	Patrones

Figura 3-13: CCD de separaciones 21 a 32 obtenidas de Ax2 de *P paniculata*

	21-26 Extractos Ax2 de <i>P paniculata</i>		27-32 Extractos Ax2 de <i>P paniculata</i>	
UV 364nm Patrones Cumarina Saponina Rutina Quercetina				
UV 254nm Patrones Cumarina Saponina Rutina Quercetina				
NP/PE G Patrones Cumarina Saponina Rutina Quercetina				
NP/PE G UV 254nm Patrones Cumarina Saponina Rutina Quercetina				
	Fracciones de extracto	Patrones	Fracciones de Extracto	Patrones

Estas pruebas evidencian una rica composición de flavonoides, la presencia de terpenos, esteroides, algún rastro de cumarina, y también en mayor cantidad aparecen flavonoides glicosilados como ejemplo la rutina y probablemente miricitrina.

En el siguiente capítulo se revisa la literatura sobre el papel que cumplen los flavonoides y los metabolitos antioxidantes en relación con el efecto neuroprotector y de esta forma explicar la importancia de los hallazgos y resultados encontrados como son una composición de metabolitos rica en flavonoides y alta actividad antioxidante que como lo menciona la literatura revisada, colocan a *P paniculata* con una muy posible fuente de compuestos con efecto neuroprotectores. No se pudo realizar la prueba biológica planeada inicialmente, que permitiera la confirmación de la acción de los flavonoides presentes, pero además la acción otros metabolitos que contribuyan a este efecto neuroprotector y neuro restaurador, sin embargo, el presente trabajo podrá ser la base para que sean llevadas a cabo en un futuro.

3.5 Resultado de la búsqueda bibliográfica

Se realizó una búsqueda en las principales bases de datos con el enfoque de revisión narrativa y haciendo una selección de acuerdo a la lectura del Resumen o *abstract* fuera pertinente al tema. La siguiente tabla 3-10 muestra los resultados de búsqueda por base de datos.

Tabla 3-10: Cuadro de búsqueda de Artículos bibliográficos

Base de datos	Expresión de búsqueda	Número artículos encontrados
PubMed	(Flavonoids in neurodegenerative diseases) AND (traditional Chinese medicine)	10
	(Oxidative stress in neurodegenerative diseases) AND (traditional Chinese medicine)	26
	The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases) AND (traditional Chinese medicine)	7
ScienceDirect	(Flavonoids in neurodegenerative diseases) AND (traditional Chinese medicine)	53
ResearchGate	(Flavonoids in neurodegenerative diseases) AND (traditional Chinese medicine)	34

Se revisaron los resúmenes de los artículos disponibles y se seleccionaron aquellos que cumplían los perfiles detallados en la metodología de acuerdo con los criterios de inclusión. Los resultados se muestran en el capítulo siguiente-

4 Capítulo 4: Papel de los antioxidantes y los flavonoides en las enfermedades neurodegenerativas

4.1 Generalidades sobre flavonoides y su relación con las enfermedades neurodegenerativas

Existen un gran número de sustancias bioactivas contenidas las plantas con actividades biológicas importantes, con propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas, antioxidativas, de utilidad medicinal son denominados fitoquímicos que pueden ser clasificados en cuatro grupos: 1) terpenoides y polienos; 2) polifenoles; 3) compuestos organosulfurados, y 4) nitrogenados. Los polifenoles constituyen el grupo más abundante e incluye: flavonoides, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianinas, catequinas, ácidos fenólicos, taninos, fitoestrógenos, estilbenos y curcuminoides (50,51).

Los polifenoles son moléculas que, debido a su capacidad de donar electrones y átomos de hidrógeno, poseen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias capaces de neutralizar los radicales libres (52). Se ha reportado que tienen actividad terapéutica en enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer y enfermedades neurodegenerativas.

Los flavonoides son una familia de compuestos fenólicos que, al consumirlos, actúan en muchos sistemas simultáneamente y traen beneficios para la salud humana. Hacen parte de dieta diaria humana pues están presente en casi todos los alimentos y también sirven como ingredientes principales de muchos tipos de suplementos herbales (53).

Según la nomenclatura de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), los flavonoides se pueden clasificar en 14 subclases diferentes. Entre los flavonoides que se encuentran en la dieta humana, las subclases más interesantes son las flavonas,

flavanonas, flavanoles, catequinas, dihidroflavanoles, chalconas, auronas, antocianidinas, isoflavonas y flavonoles (14) (54).

Figura 4-1: Bioactividad de flavonoides en hierbas de MTCh

TABLE 1. Bioactivities of Selected Flavonoids from Common Chinese Herbs											
Flavonoids	I	II	III	IV	V	Flavonoids	I	II	III	IV	V
Flavanones						Isoflavones					
Alpinetin	-	-	-	-	+	Calycosin	-	-	-	-	+++
Farrerol	+	-	-	-	++	Calycosin-7-O-glc	-	-	-	-	++
Hesperidin	-	-	++	+	-	Daidzein	+	+	++	+	++
Liquiretin	+	-	-	-	+	Daidzin	-	-	-	-	++
Naringenine	-	-	+	-	+	Formononetin	++	-	-	-	++
Naringin	-	-	-	-	-	Genistein	-	-	++	+	+++
Neohesperidin	+	-	-	-	-	Genistin	-	-	-	-	+++
Prunin	-	-	-	-	+	Glycitein	-	-	++	+	++
Flavones						Glycitin	+	+	-	-	++
Apigenin	++	-	-	-	+++	Irisfloreantin	+	-	+	+	+++
Apin	-	-	-	-	-	Ononin	+	+	++	-	++
Baicalin	-	++	-	-	++	Pratensein	+	-	+	+	+++
Baicalin	-	+	-	-	-	Puerarin	+	-	-	-	+
Chrysin	-	-	-	-	+	4',7-OCH ₃ -puerarin	+	-	-	-	-
Hebaacetin-8-O-CH ₃	+	-	+	-	+	4',7-OCOCH ₃ -puerarin	+	-	-	-	-
Isovitexin	+	-	-	-	-	Tectoridin	++	-	++	+	++
Luteolin	+	-	+++	+++	++	Tectorigenin	+++	-	-	-	+++
Lysionotin	++	+	-	-	+++	Flavonols					
Morusin	-	-	-	-	-	Astragalin	-	-	-	-	-
Scutellarin	-	++	-	-	+	Galangin	-	-	+	+	++
Scoparin	-	-	+	-	-	Hibifolin	+	++	-	-	-
Tangeretin	-	-	+	-	+	Hyperin	+	-	+	+	-
Wogonin	-	-	-	-	-	Icarin	-	-	-	-	-
Auronas						Isoquercitrin	-	+	-	-	-
Sulphuretin	+	+	++	+	+	Isohamnetin	+	-	+++	+++	-
Biflavones						Isohamnetin-3-O-rut	-	+	-	-	-
Ginkgetin	+	-	+	-	-	Kaempferol	+	+	++	+	++
Dihydrochalcones						Kaempferol-3-O-rut	-	+	-	-	+
Phloretin	+	-	-	-	+	Kaempferol-3-O-glc	+	-	+	-	-
Phloridzin	+	-	-	-	-	Quercetin	++	-	++	+	+
Flavanonols						Quercetin-3'-O-glc	++	+	+	-	+
Dihydromyricetin	-	+	-	-	-	RNFG	+	+	+	+	+
Silybin	++	-	-	-	+	Rutin	-	-	-	-	-
Chalcones						Tiliroside	-	-	-	-	-
Cardamonin	+	-	+++	+	-	Vitexicarpin	-	-	-	-	-
Flavanes						Vitamin C	+++	/	/	/	/
(-)-Catechin	-	+	-	++	-	Congo red	/	++	/	/	/
(-)-Epicatechin	-	+	-	-	-	NGF	/	/	+++	/	/
						Bt ₂ -cAMP	/	/	/	+++	/
						17β-Estradiol	/	/	/	/	+

Data are mean ± SEM, n=3-6, each with triplicate samples. The value of SEM is within 5% of the mean, which is not shown for clarity. + to +++ indicate the ranking of the bioactivities. "/" means not determined.

I): Anti-oxidation. Cultured PC12 cells in a 96 well plate were pretreated with different flavonoids for 24 h and labeled by 100 μM DCFH-DA (Sigma) in HBSS for 1 h at room temperature. Cultures were then treated with 0.4 mM hydrogen peroxide (H₂O₂) for 1 h. The amount of intracellular H₂O₂-induced ROS was detected by fluorometric measurement with excitation at 485 nm and emission at 530 nm. Vitamin C at 500 μM served as the positive control (Zhu et al., 2007).

II): Anti-Aβ-induced toxicity. Cultured PC12 cells in a 96 well plate were treated with aged Aβ with the pre-treatment of flavonoids. MTT assay was performed to determine the cell viability. Congo red at 1 μM served as the positive control (Zhu et al., 2007).

III): Neurofilament expression. Cultured PC12 cells were treated with flavonoids. The expression levels of neurofilaments were determined by Western blot. The result of Neurofilament 68 expression is shown here. NGF at 50 ng ml⁻¹ served as the positive control (Xu et al., 2012).

IV): Synaptotagmin expression. Cultured rat cortical neurons were treated with flavonoids. The expression levels of synaptotagmin were determined by real-time PCR. Bt₂-camp at 1 mM served as the positive control (Xu et al., 2013).

V): Estrogenic activity. Three repeats of estrogen-responsive elements (5'-GGT CAC AGT GAC C-3') were synthesized and subcloned into a reporter vector that has a downstream reporter of firefly luciferase gene. A stable cell line of MCF-7 was established by cotransfection of pERE-Luc and pcDNA3 under selection of 500 μg ml⁻¹ G418. Flavonoids were applied onto the cells, and luciferase assay was performed to determine estrogenic activity. The 17β-estradiol at 10 nM served as the positive control (Zhu et al., 2012).

Birth Defects Research (Part C) 99:292-299 (2013)

Fuente: Anju Singh, Ritushree Kukreti, Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases, 2019 Molecules 2019, 24(8), 1583

Los estudios sobre flavonoides sugieren que los flavonoides son multifuncionales, multisistemas y multinivel. En general, se acepta que los flavonoides tienen efectos antiinflamatorios, antitumorales, antioxidantes y de estimulación estrogénica y, lo que es más importante, se consideran seguros (14).

El flavonoide rutina, por ejemplo, que se usa para mejorar los síntomas del envejecimiento y los problemas cardiovasculares, tiene una actividad antioxidante muy bien estudiada. Los flavonoides son los principales ingredientes activos en la mayoría de las hierbas chinas, incluida la fórmula a base de hierbas más utilizada derivada de las hojas de *Ginkgo biloba* (14).

Un estudio de revisión buscó las posibles funciones neuronales de las diferentes clases de flavonoides, se seleccionaron los flavonoides más comunes que se encuentran en las hierbas chinas para buscar los bioensayos relacionados con las funciones neuronales Tabla 4-1. Y la revisión concluyó que muchos flavonoides tenían bioactividades significativas en diferentes sistemas, incluidos el sistema nervioso, el sistema óseo, el sistema de eritropoyético, etc. (43).

En un estudio, el flavanonol fustin, un tipo de flavonoide, que se puede encontrar en fustas jóvenes (*Cotinus coggygria*) y en el árbol de laca (*Toxicodendron vernicifluum*), que había probado tener propiedades antiinflamatorias, ahora muestra efectos protectores sobre la muerte celular neuronal inducida por 6-hidroxi-dopamina (55), este flavonoide confiere neuroprotección a las NDA SK-N-SH pretratadas por 30 min antes de la exposición a 6-OHDA (125M) por 24 h, observándose una inhibición sobre los niveles de las ROS y el aumento de calcio intracelular (Ca^{2++}). Además, impidió el incremento en la relación Bax/Bcl-2, así como la actividad de caspasa 3 y el bloqueo de la fosforilación de p38 (50).

La isoflavona biochanina A, obtenida de la planta *Trifolium pratense* con propiedades antiinflamatorias, confiere neuroprotección a las NDA obtenidas de mesencéfalo de rata, a concentraciones de 0,25, 1 y 2,5M, se observó que puede proteger de manera efectiva las células dopaminérgicas contra la neurotoxicidad inducida por LPS (10 ng/ml), que produce una reducción del 36,7% sobre la captación de DA, así como una disminución del 52% sobre la población celular. La biochanina A mejora significativamente la captación de DA (el 55,9, el 77,9 y el 88,7%) y protege a las células del daño por el LPS (el 62,5, el 81,9 y

el 89,4%); además, inhibe la producción de las citocinas proinflamatorias TNF- α y NO, así como el O₂ – de manera dependiente de la concentración (50).

La acetina es una flavona que posee propiedades anticancerígenas y antiinflamatorias; se encuentra en plantas como crisantemos y cártamos. En un cultivo primario de NDA mesencefálicas de rata expuestas al neurotóxico MPP+ (10M) y tratadas con acetina (50-200 nM) se observó un mayor número de células dopaminérgicas TH-IR y preservación de la morfología neuronal, incluyendo el acortamiento de las dendritas, en comparación con el grupo control. Además, inhibe de manera dependiente de la concentración la sobreproducción de los factores proinflamatorios NO, PGE2 y TNF- α (50).

De la planta *Scutellaria baicalensis*, se ha extraído de la raíz la baicaleína que es un flavonoide considerado como un excelente antioxidante neutralizador de radicales libres y antiinflamatorio. Se probó la resistencia a la toxicidad in vitro con 6-OHDA (100M) en cultivo de NDA SH-SY5Y previamente tratadas con baicaleína (0,05, 0,5 y 5g/ml), comprobándose un efecto neuroprotector a partir de la dosis de 0,5g/ml, con un 64% de supervivencia respecto al control (50). Además, el pretratamiento a 5g/ml disminuye significativamente el porcentaje de células apoptóticas.

En un artículo que mencionaba los enfoques o paradigmas para el descubrimiento de fármacos para enfermedades neurodegenerativa, se comenta que desde 1990, la combinación de biología molecular y estructural, química combinatoria y detección de alto rendimiento ha dominado el proceso de descubrimiento de fármacos (19). En el caso de las enfermedades neurodegenerativas si bien el sistema proporciona un proceso rápido para el descubrimiento de fármacos candidatos con alta selectividad y alta afinidad por un objetivo molecular específico, no ha producido los éxitos que inicialmente se esperaban. Antes, el enfoque de descubrimiento de fármacos estaba basado en objetivos, se descubrieron nuevos fármacos mediante la evaluación de sustancias químicas frente a características o fenotipos observables, en sistemas biológicos como células o animales. El paradigma ideal para la búsqueda de medicamentos debería ser su uso en los humanos, y así es como se descubrieron originalmente la mayoría de las drogas de primera clase basadas en productos naturales, este ya no es un enfoque éticamente viable y se deben usar los animales de laboratorio, principalmente modelos de enfermedades en ratones o una alternativa razonable es crear ensayos basados en células que definan vías de toxicidad molecular relevantes para la neurodegeneración asociada con la edad y

seleccionar fármacos candidatos que funcionen en múltiples ensayos, no solo en uno. En general, para la selección de candidatos a fármacos contra enfermedades neurodegenerativas, estos ensayos utilizarán neuronas primarias, líneas celulares similares a neuronas o líneas celulares micro gliales que se someten a una agresión tóxica que se ha observado que ocurre en el cerebro envejecido. Sin embargo, la cuestión crítica sigue siendo qué se debe examinar exactamente (19).

¿Por qué concentrarse en los flavonoides? Varios estudios epidemiológicos han destacado que, para la prevención de enfermedades neurodegenerativas, el potencial específicamente de los flavonoides puede resultar en un papel beneficioso (56). Figura 1-6a. Estructuras de flavonoides representativos.

Un estudio retrospectivo que analizó consumo de flavonoides en relación a la carga que produce la demencia en la población (medida en años de vida ajustados por discapacidad) en 23 países desarrollados (19). El resultado mostro que con el consumo de flavonoles la relación era negativa, es decir a mayor consumo menos demencia y que la relación de riesgo del tercio de mayor consumo versus el tercio de menor consumo era 0,49, es decir que el tercio de mayor consumo redujo el riesgo de padecer demencia a la mitad del riego del tercio que consumió menos.

En otro estudio epidemiológico muy grande (un total de ~130 000 personas seguidas durante 20 a 22 años) publicado hace varios años (57), examinó si una mayor ingesta de flavonoides totales de cinco fuentes principales de flavonoides en la dieta (té, bayas, manzanas, vino tinto y naranja o jugo de naranja) se asociaba con un menor riesgo de EP. Se examinaron utilizando una base de datos de composición de alimentos y un cuestionario de frecuencia de alimentos. El resultado mostró que los hombres, con el quintil más alto de consumo de flavonoides tenían un 40 % menos de riesgo de desarrollar EP en comparación con los del quintil más bajo. Sin embargo, no se observó una relación significativa entre el consumo general de flavonoides y el riesgo de EP en las mujeres (19).

Estudios recientes han demostrado que los flavonoides tienen una amplia gama de actividades, diferentes a aquellos de sus efectos antioxidantes y de eliminación de radicales libres, que podrían hacerlos particularmente efectivos para bloquear las vías de toxicidad asociadas con la edad y con enfermedades neurodegenerativas.

Existen series de estudios preclínicos y, en algunos casos, clínicos, que analizaron los efectos beneficiosos de diferentes flavonoides en modelos animales de AD, PD, HD o ALS. Para cada enfermedad, se hace una descripción seguida de una descripción de los modelos utilizados para estudiar los efectos de los flavonoides en la enfermedad. y la evidencia del efecto neuroprotector de los flavonoides en asociación con sus actividades antioxidativas, en algunos describen el modo por el cual los flavonoides contrarrestan la enfermedad (50), Sin descartar que los extractos y sus combinaciones tengan otras vías de intervención para una determinada patología.

4.2 Estrés oxidativo y las enfermedades neurodegenerativas

Existen varios tipos de especies reactivas de oxígeno (ROS). El oxígeno puede llegar a formar especies reactivas debido a que posee dos electrones desapareados presentes en la capa externa de electrones. Se definen especies reactivas de oxígeno (ROS) a las moléculas reactivas derivadas del oxígeno, generalmente de vida corta y altamente reactivas debido a sus electrones de valencia no apareados. Las ROS incluyen, entre otros, radicales libres (superóxido, O_2^-), radicales hidroxilos ($\cdot OH$) o no radicales (peróxido de hidrógeno, H_2O_2). O_2 : se considera es el paso inicial en la producción de ROS. O_2^- puede transformarse en la forma más estable de H_2O_2 por superóxido dismutasa (SOD) (\cdot). También se puede protonar para formar HO_2^- . El H_2O_2 puede tener potencial para generar radicales hidroxilos altamente reactivos $\cdot OH$, mientras que la catalasa, la glutatión peroxidasa y otras peroxidases pueden dividirlo en H_2O y O_2 . El $\cdot OH$ es conocido por ser uno de los ROS más reactivos que son los principales responsables de los efectos citotóxicos de los ROS. El $\cdot OH$ puede generarse a partir de H_2O_2 y O_2^- y es catalizado por iones de hierro a través de la reacción de Fenton que se refiere a Fe^{2+} - descomposición mediada por H_2O_2 (58).

En las células, la mitocondria es la principal fuente de producción de ROS. En condiciones fisiológicas normales, hasta el 2% del consumo total de O_2 mitocondrial celular puede estar relacionado con la generación de ROS, incluido el O_2^- . Se han propuesto múltiples formas de producción de ROS mitocondriales, que están moduladas principalmente por los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, que consta de cinco complejos de múltiples subunidades que incluyen NADH-coenzima Q (CoQ) reductasa (NADH

deshidrogenasa, Complejo I), succinato deshidrogenasa (Complejo II), coenzima Q-citocromo c reductasa (Complejo III), citocromo C oxidasa (Complejo IV) y ATP sintasa (Complejo V). El responsable de la producción de ROS de O_2 – es el complejo I y facilita la transferencia de electrones de NADH a CoQ. Durante este paso, los protones también se translocan desde la matriz al espacio intermembrana. El complejo II está involucrado en la reducción de CoQ y se le culpa de la producción de niveles bajos de O_2^- (58). El complejo III, por otro lado, está involucrado en la generación de O_2 , en el espacio intermembrana. La generación de O_2 aumenta especialmente cuando la transferencia de electrones se reduce con el aumento del potencial de membrana.

Las NADPH oxidasas (Nox), un complejo enzimático transmembranal, es otra fuente endógena importante de producción de O_2 puesto que debe de catalizar la transferencia de electrones de NADPH a oxígeno. Nox se encuentra en gran cantidad en los fagocitos (neutrófilos, eosinófilos, monocitos y macrófagos, llamados Phox o NOX2), así como en el endotelio del tejido cardiovascular.(58).

Varios eventos como los factores ambientales, la disfunción mitocondrial y el proceso metabólico celular son responsables del estrés oxidativo. Como se mencionó anteriormente el desequilibrio entre la capacidad moléculas encargadas de neutralizar las ROS y la producción de ROS, inician un deterioro celular importante y especialmente en el sistema neuronal. Figura 4-2, El mal plegamiento y la agregación de proteínas son características comunes de varios trastornos neurodegenerativos. El estrés oxidativo activa PP2A, p38MAPK y JNK que conducen a un aumento de la expresión de A β y tau neurotóxicos (características de la enfermedad de Alzheimer) que aumentan aún más los niveles celulares de ROS y RNS y dan como resultado la neurodegeneración. Además, el estrés oxidativo causa disfunción neuronal por mal plegamiento atípico y agregación de α -sinucleína (para la enfermedad de Parkinson), mHtt (para la enfermedad de Huntington) y TDP-43 para (esclerosis lateral amiotrófica) al aumentar los niveles de ROS y RNS. ROS, especies reactivas de oxígeno; RNS, especies nitrogenadas reactivas; PP2, proteína fosfatasa 2; p38MAPK, proteína quinasa p38 activada por mitógeno; JNK, quinasa terminal c-Jun N; mHtt, huntingtina mutante; TDP-43, proteína de unión al ADN TAR 43; NOX, NADPH oxidasa; NFT, ovillos neurofibrilares (17).

Hoy se sabe que las ROS tienen un efecto nocivo sobre los lípidos al estar involucradas en la peroxidación de lípidos a malondialdehído (MDA), carbonilos de proteínas y oxidación

de guanina a 8-oxo-desoxiguanosina en el ADN. La cardiolipina (CL) es un fosfolípido que está involucrada específicamente con las proteínas de la cadena de transporte de electrones en la membrana mitocondrial interna y, se requiere por la translocasa de nucleótido de adenina, que funciona como un transportador de membrana interna (43). El enriquecimiento de la cardiolipina en ácidos grasos poliinsaturados como el ácido linoleico y la ubicación adyacente a los sitios de producción de ROS en la cadena de transporte de electrones mitocondrial la convierten en un objetivo principal para las ROS. La cardiolipina se oxida con facilidad, conduce a la disfunción de la cadena de transporte de electrones mitocondriales y se sospecha que está involucrado en la liberación de proteínas proapoptóticas. ROS tiene un efecto dañino directo sobre las proteínas y los lípidos, lo que dificulta la función bioenergética en las mitocondrias. Los ROS tienen un efecto nocivo sobre el ADN mitocondrial, asociado directamente con la inactivación del promotor y la regulación a la baja de la expresión génica mitocondrial. Por lo tanto, se supone que los niveles elevados de producción de ROS en las mitocondrias, que tienen vidas medias más largas, como H_2O_2 ; hidroperóxido lipídico; o aldehídos activos como MDA, acroleína, etc.

Figura 4-2: Biomarcadores que sufren consecuencias del estrés

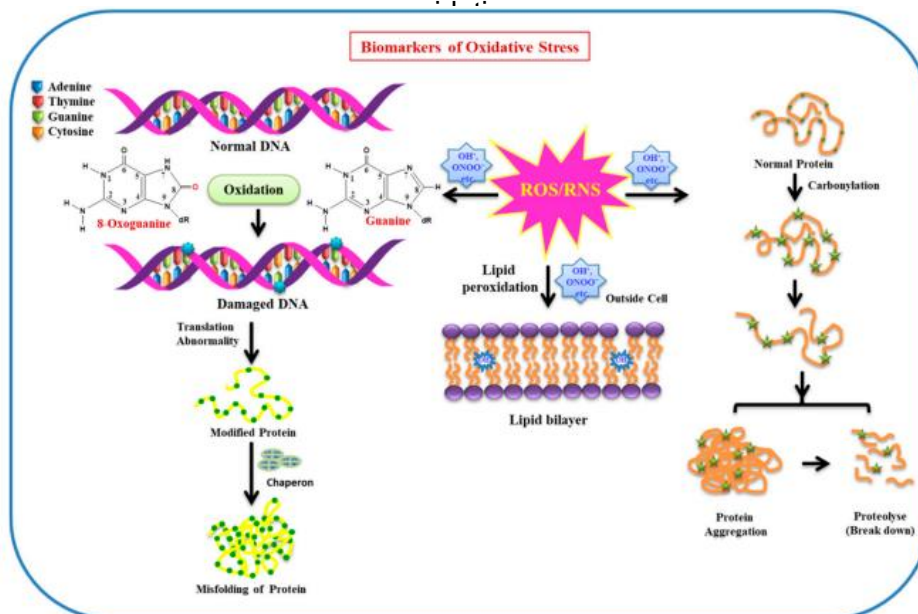


Figure 2. Effect of ROS/RNS on biomolecules (DNA, protein, lipid, etc.) used as biomarkers of oxidative stress in cellular environment.

Fuente: Anju Singh, Ritushree Kukreti, Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases, 2019 Molecules 2019, 24(8), 1583

(generados en otros lugares pero que finalmente llegan a las mitocondrias), pueden causar disfunción mitocondrial y, en última instancia, obstaculizar los procesos biológicos que conducen a diversas enfermedades. conduce a la disfunción de la cadena de transporte de electrones mitocondriales y se supone que está involucrado en la liberación de proteínas proapoptóticas procesos biológicos que conducen a diversas enfermedades (43).

Las EN, incluidas la esclerosis múltiple (EM), la EH, la EP y la EA, caen bajo el paraguas de la neurodegeneración junto con las dolencias neurotraumáticas. Los factores ambientales y genéticos también contribuyen significativamente a la progresión de los EN. La neuroinflamación, el OS y la acumulación de ciertas proteínas agregadas son las características patológicas comunes de los EN. Estos estímulos están incrustados en la membrana plasmática a través de receptores extracelulares. La inflamación crónica está asociado directamente al estrés oxidativo. El mecanismo de apoptosis neuronal mediada por estrés oxidativo y neurodegeneración. Una serie de eventos intracelulares patogénicos como el estrés del retículo endoplásmico y la disfunción mitocondrial causan estrés oxidativo al aumentar el flujo de entrada de Ca^{2+} y la subsiguiente excitotoxicidad neuronal. La producción excesiva de especies reactivas provoca la oxidación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos que conducen a la neurodegeneración. El estrés oxidativo provoca la activación de la vía apoptótica p53 que conduce a la expresión de Noxa, Bax y Puma. La expresión de Puma provoca la liberación de p53 citosólico que se mantuvo inactivo al unirse con Bcl-xL. El complejo P53 y Bcl-xL causa la oligomerización de Bax y la translocación mitocondrial. La acumulación de p53 intracelular sirve como una fuente importante de p53 mitocondrial que induce la oligomerización de Bax y Bak y antagoniza el efecto antiapoptótico de Bcl-2 y Bcl-xL en las mitocondrias (17). Como resultado, se libera citocromo c mitocondrial que estimula la activación de las vías de la caspasa que conducen a la apoptosis neuronal y finalmente a la neurodegeneración. p53, proteína supresora de tumores p53; 8-OHG, 8-hidroxiguanosina; 8-OHdG, 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina; 4-HNE, 4-hidroxi-2-nonenal; MDA, malondialdehído; Noxa, proteína 1 inducida por forbol-12-miristato-13-acetato; Puma, modulador de apoptosis regulado al alza por p53; Bax, proteína X asociada a Bcl-2; Bak, antagonista/asesino de Bcl-2; Bcl-2, linfoma de células B 2; Bcl-xL, linfoma de células B extragrande, directamente relacionado con el estrés oxidativo/nitrosativo). La lipoxigenasa (LOX), así como las cascadas de ciclooxigenasa (COX), están reguladas al alza en patologías cerebrales crónicas y

relacionadas con la edad El metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) se ve afectado por la COX. Además, COX-1, COX-2 son responsables de la generación de muchos eicosanoides, así como de LOX que catalizan la adición de oxígeno a los ácidos docosahexaenoico linolénico y araquidónico y otros PUFA que juegan un papel crucial en la generación de lípidos bioactivos, que afecta considerablemente el evento de neurodegeneración. Entre numerosas isoformas, las lipoxigenasas 12/15-LOX y 5-LOX son particularmente importantes en la neuroinflamación o neurodegeneración. En el cerebro, aumento de los niveles de ácidos grasos polisaturados PUFA, incluido el ácido araquidónico. Neutralizar tal cantidad de cambios mediante el uso de medicamento convencionales ha resultado ineficaz y con muchos efectos secundarios. El uso de flavonoides en forma de medicamentos herbales es una respuesta valida y segura y de forma por enfermedad, por lo cual han sido hechos un gran número de estudios muy focalizados (17).

Todos los datos anteriormente presentados resaltan la importancia de especies que como *Polygala paniculata*, que contiene una rica cantidad de flavonoides y buen efecto antioxidante pueden ser fuente de ingredientes activos para la prevención o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

5 Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

- La fitoquímica de *Polygala paniculata* mostró la rica presencia de metabolitos en especial flavonoides de una polaridad media a alta, incluyendo flavonoides glicosilados.
- Se determinó la actividad antioxidante del extracto de hojas y raíces de *Polygala paniculata*.
- La literatura revisada muestra que existe evidencia sobre el papel relevante de los flavonoides, su efecto neuroprotector y su actividad benéfica antioxidante y dado los hallazgos de este estudio sobre la *Polygala paniculata*, es razonable interpretarlos como indicativo promisorio, que invita a seguir adelante en la investigación a fin de establecer su posible efecto neuroprotector.
- *Polygala paniculata* mostró grandes ventajas al encontrar que los metabolitos están presentes en todo el material vegetal y que resiste a largos periodos de almacenamiento con un buen rendimiento.
- La comparación de las especies *P paniculata* y *P tenuifolia* mediante su caracterización química preliminar no mostró correspondencias bajo las condiciones del estudio realizado.

5.2 Recomendaciones

- Se espera que se realicen pruebas fitoquímicas más precisas tales como espectrometría de masas, la resonancia magnética nuclear y cromatografías de alta calidad, a fin caracterizar con más detalle la especie *P paniculata*.
- Realizar las pruebas *in vitro* que estuvieron planeadas en este estudio, pero por motivos de la pandemia no se realizaron. Esto sería un paso deseable, necesario y aclaratorio sobre efecto neuroprotector de *P Paniculata* en un esperanzador hallazgo de alivio a las enfermedades neurodegenerativas.

A. Anexo: Certificación del Herbario Nacional Colombiano



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE CIENCIAS
INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES
HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO (COL)

Bogotá D.C., 23 de noviembre de 2021

Estudiante de Maestría
Miguel Oswaldo González Rodríguez
Medicina Alternativa
Facultad de Medicina
Universidad Nacional de Colombia
La ciudad

Asunto: Identificación Taxonómica muestras

Cordial saludo. Me permito dar respuesta a su solicitud referente a la identificación taxonómica de la(s) muestra(s) botánica(s):

Nombre	FAMILIA	No. COL	Colector	No de Colecta	Determinó
<i>Polygala paniculata</i> L.	Polygalaceae	612120	Miguel Oswaldo González Rodríguez	1	Cristian Castro /2021

Permiso de recolecta / Permiso de Investigación: No aplica. Planta adquirida en plaza de mercado.

Esta certificación no es válida para trámites ante el INVIMA o el ICA. El (Los) pliego(s) testigo(s) quedará(n) depositado como muestra permanente en nuestro herbario.

Cordialmente,

Prof. JULIO C. BETANCUR-BETANCUR
Director
Herbario Nacional Colombiano - COL
Universidad Nacional de Colombia
E-mail: herbacol_fcboq@unal.edu.co

B. Anexo: Resultado de Estimación de Flavonoides con $AlCl_3$

Diluciones	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Concentración	Extractos de raíces			Extractos partes			Quercetina			Blanco		
A	0,233	0,244	0,261	0,289	0,305	0,305	0,314	0,296	0,31	0,25	0,235	0,234
B	0,246	0,244	0,256	0,345	0,352	0,357	0,379	0,363	0,372	0,232	0,23	0,216
C	0,286	0,284	0,275	0,493	0,498	0,486	0,444	0,46	0,441	0,244	0,229	0,208
D	0,278	0,292	0,292	0,548	0,568	0,57	0,475	0,466	0,48	0,22	0,215	0,223
E	0,314	0,329	0,331	0,667	0,682	0,682	0,671	0,682	0,705	0,247	0,234	0,242
F	0,044	0,05	0,048	0,05	0,05	0,067	0,973	0,964	0,97	0,051	0,049	0,061
G	0,052	0,05	0,051	0,05	0,047	0,049	1,237	1,223	1,286	0,057	0,055	0,05
H	0,047	0,052	0,047	0,053	0,045	0,052	1,638	1,712	1,671	0,052	0,056	0,058

Statistics

Measurement: 21/04/2022 13:45:56

Data File:

POLYGALAre210422.wgd

Parameter File:

FLAVONOIDES.wgp

Reader:

BertholdTech TriStar2S, Driver Version: 1.00 (1.0.0.5), S/N: 37-1001, Embedded Version: 2.05

Plate Type: Berthold 96 - No:23300/23302

Name Shake

Duration [s] 10.0 Speed Normal

Diameter 0.1 Type Orbital

Measurement Mode by Plate Repeated operation Yes

Name Endpoint

Delay before Meas. No

Counting Time [s] 0.10 Measurement Mode by Plate

Monochromator Yes

Xenon Lamp Lamp Energy [%] 100

Aperture Default

Beam Size Default

Measurement Wavelength ... 420

Measurement Slit Width ... 4

Ref. Measurement No

Constant Voltage No

Start Temperature 25.1 End Temperature 24.9

Program:

ICE, Version 1.0.9.0

Operating System:

Microsoft Windows 7 Enterprise (32-bit) Service Pack 1

POLYGALAre2FLAVONOIDES.wgp

C. Anexo: Resultado análisis DPPH

Diluciones	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Concentraciones	Extractos de raíces			Extr. partes aéreas			Quercetina			Blanco		
A	0,545	0,556	0,572	0,544	0,564	0,537	0,52	0,497	0,503	0,572	0,568	0,562
B	0,526	0,551	0,543	0,499	0,525	0,487	0,432	0,442	0,445	0,557	0,572	0,563
C	0,543	0,54	0,522	0,458	0,478	0,505	0,437	0,418	0,431	0,566	0,586	0,539
D	0,534	0,537	0,53	0,415	0,424	0,433	0,39	0,388	0,396	0,56	0,587	0,555
E	0,501	0,503	0,512	0,372	0,372	0,404	0,311	0,296	0,297	0,585	0,568	0,604
F	0,076	0,076	0,085	0,081	0,09	0,076	0,26	0,263	0,262	0,225	0,222	0,153
G	0,068	0,081	0,084	0,087	0,085	0,097	0,28	0,276	0,279	0,1	0,104	0,096
H	0,084	0,089	0,081	0,077	0,078	0,093	0,258	0,244	0,259	0,098	0,072	0,088

Measurement: 21/04/2022 13:51:48

Data File:

POLYGALAP210422.wgd

Parameter File: ANTIOXIDANTE.wgp

Reader:

BertholdTech TriStar2S, Driver Version: 1.00 (1.0.0.5), S/N: 37-1001, Embedded Version: 2.05

Plate Type: Berthold 96 - No:23300/23302

Name Shake

Duration [s] 10.0 Speed Normal

Diameter 0.1 Type Orbital

Measurement Mode by Plate Repeated operation Yes

Name Endpoint

Delay before Meas. No

Counting Time [s] 0.10 Measurement Mode by Plate

Monochromator Yes

Xenon Lamp Lamp Energy [%] 100

Aperture Default

Beam Size Default

Measurement Wavelength ... 520

Measurement Slit Width ... 4

Ref. Measurement No

Constant Voltage No

Start Temperature 25.0 End Temperature 24.9

Program:

ICE, Version 1.0.9.0

Operating System:

Microsoft Windows 7 Enterprise (32-bit) Service Pack 1

POLYGALAP21 ANTIOXIDANTE.

Bibliografía

1. Klein LC, de Andrade SF, Cechinel Filho V. A pharmacognostic approach to the *Polygala* genus: phytochemical and pharmacological aspects. *Chem Biodivers*. 2012 Feb;9(2):181–209.
2. Alzate Guarín F. Redescubriendo a *Polygala corifolia* (Polygalaceae) después de 170 años de su descripción. *Acta biol Colomb*. 2016 Aug 30;21(3):645.
3. Lacaille-Dubois M-A, Delaude C, Mitaine-Offer A-C. A review on the phytopharmacological studies of the genus *Polygala*. *J Ethnopharmacol*. 2020 Mar 1;249:112417.
4. Farina M, Franco JL, Ribas CM, Meotti FC, Missau FC, Pizzolatti MG, et al. Protective effects of *Polygala paniculata* extract against methylmercury-induced neurotoxicity in mice. *J Pharm Pharmacol*. 2005 Nov;57(11):1503–8.
5. Consejo interterritorial del Sistema Nacional de Salud. Estrategia en Enfermedades Neurodegenerativas del Sistema Nacional de Salud. Madrid, España: MINISTERIO DE SANIDAD, SERVICIOS SOCIALES E IGUALDAD; 2016 Apr. Report No.: 680-16-030–3.
6. THE PLANT LIST, A working list of the all plant species [Internet]. THE PLANT LIST, A working list of the all plant species. 2012 [cited 2021 May 30]. Available from: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2555416>
7. Universidad Nacional de Colombia: [Internet]. [cited 2021 Jun 15]. Available from: <http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co/es/resultados/especie/Polygala%20paniculata/>
8. Gupta MP, Solís PN, Calderón AI, Guionneau-Sinclair F, Correa M, Galdames C, et al. Medical ethnobotany of the Teribes of Bocas del Toro, Panama. *J Ethnopharmacol*. 2005 Jan 15;96(3):389–401.
9. Nguyen X-M-A, Bun S-S, Ollivier E, Dang T-P-T. Ethnobotanical study of medicinal plants used by K'Ho-Cil people for treatment of diarrhea in Lam Dong Province, Vietnam. *J Herb Med*. 2020 Feb;19:100320.

10. Hermano D. Plantas Utilizadas en los Laboratorios de Farmacia [Internet]. 1960 [cited 2021 Mar 3]. Available from: <https://revistas.upb.edu.co>
11. Farina M, Aschner M. Glutathione antioxidant system and methylmercury-induced neurotoxicity: An intriguing interplay. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2019 Jan 16;1863(12):129285.
12. Franco JL, Braga HC, Stringari J, Missau FC, Posser T, Mendes BG, et al. Mercurial-induced hydrogen peroxide generation in mouse brain mitochondria: protective effects of quercetin. *Chem Res Toxicol*. 2007 Dec;20(12):1919–26.
13. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Plants of the World Online [Internet]. About Plants of the World Online. 2019 [cited 2021 Mar 30]. Available from: <http://www.plantsoftheworldonline.org/>
14. Xu SL, Zhu KY, Bi CWC, Yan L, Men SWX, Dong TTX, et al. Flavonoids, derived from traditional Chinese medicines, show roles in the differentiation of neurons: possible targets in developing health food products. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2013 Dec;99(4):292–9.
15. Reynaldo I, Cartaya O. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*. 2001;
16. Forni C, Facchiano F, Bartoli M, Pieretti S, Facchiano A, D’Arcangelo D, et al. Beneficial Role of Phytochemicals on Oxidative Stress and Age-Related Diseases. *Biomed Res Int*. 2019 Apr 7;2019:8748253.
17. Uddin MS, Al Mamun A, Kabir MT, Ahmad J, Jeandet P, Sarwar MS, et al. Neuroprotective role of polyphenols against oxidative stress-mediated neurodegeneration. *Eur J Pharmacol*. 2020 Nov 5;886:173412.
18. Pastore JFB, Abbott JR, Neubig KM, Van Den Berg C, Mota MCDA, Cabral A, et al. Phylogeny and biogeography of *Polygala* (Polygalaceae). *Taxon*. 2019 Aug;68(4):673–91.
19. Maher P. The potential of flavonoids for the treatment of neurodegenerative diseases. *Int J Mol Sci*. 2019 Jun 22;20(12).
20. Abbott R. PHYLOGENY OF THE POLYGALACEAE AND A REVISION OF BADIERA . UNIVERSITY OF FLORIDA; 2009.
21. Kubitzki K, editor. Flowering Plants · Eudicots: Berberidopsidales, Buxales, Crossosomatales, Fabales p.p., Geraniales, Gunnerales, Myrtales p.p., Proteales, Saxifragales, Vitales, Zygophyllales, Clusiaceae Alliance, Passifloraceae Alliance, Dilleniaceae, Huaceae, Picramniaceae, Sabiaceae. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2007.
22. Martins-Silva C, de Souza Pinho N, Ferreira GG, Aguiar RM, Ferreira TA, Pires RGW, et al. *Polygala sabulosa* A.W. Bennett extract mitigates motor and cognitive deficits in a mouse model of acute ischemia. *Metab Brain Dis*. 2021 Mar;36(3):453–62.

23. Ficha de *Polygala tenuifolia* - Botánica Y Jardines [Internet]. [cited 2022 Jun 13]. Available from: <http://www.botanicayjardines.com/polygala-tenuifolia/>
24. Jiang N, Wei S, Zhang Y, He W, Pei H, Huang H, et al. Protective effects and mechanism of radix polygalae against neurological diseases as well as effective substance. *Front Psychiatry*. 2021 Dec 17;12:688703.
25. Zhao X, Cui Y, Wu P, Zhao P, Zhou Q, Zhang Z, et al. *Polygalae Radix*: A review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology, toxicology, and pharmacokinetics. *Fitoterapia*. 2020 Nov;147:104759.
26. Ba Y, Wang M, Zhang K, Chen Q, Wang J, Lv H, et al. Intestinal absorption profile of three polygala oligosaccharide esters in polygalae radix and the effects of other components in polygalae radix on their absorption. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2019 Jul 2;2019:1379531.
27. Wagner H, Püls S, Barghouti T, Staudinger A, Melchart D. Radix polygalae – yuanzhi. In: Wagner H, Püls S, Barghouti T, Staudinger A, Melchart D, editors. *Chromatographic fingerprint analysis of herbal medicines volume V*. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 103–15.
28. Deng X, Zhao S, Liu X, Han L, Wang R, Hao H, et al. *Polygala tenuifolia*: a source for anti-Alzheimer's disease drugs. *Pharm Biol*. 2020 Dec;58(1):410–6.
29. Li Z, Liu Y, Wang L, Liu X, Chang Q, Guo Z, et al. Memory-Enhancing Effects of the Crude Extract of *Polygala tenuifolia* on Aged Mice. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014 Mar 12;2014:392324.
30. Sun X-L, Ito H, Masuoka T, Kamei C, Hatano T. Effect of *Polygala tenuifolia* root extract on scopolamine-induced impairment of rat spatial cognition in an eight-arm radial maze task. *Biol Pharm Bull*. 2007 Sep;30(9):1727–31.
31. Yu L, Sun L, Chen S. Protective effect of senegenin on splenectomy-induced postoperative cognitive dysfunction in elderly rats. *Exp Ther Med*. 2014 Apr;7(4):821–6.
32. Universidad Nacional de Colombia. Catálogo de plantas y líquenes de Colombia [Internet]. <http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co/es/resultados/especie/Polygala%20paniculata/>. 2015 [cited 2021 Jun 15]. Available from: <http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co>
33. Farina M, Rocha JBT, Aschner M. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies. *Life Sci*. 2011 Oct 10;89(15–16):555–63.
34. Franco JL, Posser T, Missau F, Pizzolatti MG, Dos Santos ARS, Souza DO, et al. Structure-activity relationship of flavonoids derived from medicinal plants in preventing methylmercury-induced mitochondrial dysfunction. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2010 Nov 1;30(3):272–8.

35. Bettio LEB, Machado DG, Cunha MP, Capra JC, Missau FC, Santos ARS, et al. Antidepressant-like effect of extract from *Polygala paniculata*: involvement of the monoaminergic systems. *Pharm Biol.* 2011 Dec;49(12):1277–85.
36. Nogueira FLP, Fernandes SBO, Reis GM, Matheus ME, Fernandes PD, Lage CLS, et al. Atividade analgésica e antiedematogênica de *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae) selvagem e obtida por micropropagação. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2005 Dec;15(4).
37. Simanjuntak HA, Gurning K. UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI DARI SEDIAAN KRIM EKSTRAK ETANOL HERBA TUMBUHAN BALSEM (*Polygala paniculata* L.) TERHADAP BAKTERI *Propionibacterium acnes* PENYEBAB JERAWAT. *eksakta.* 2020 Aug 2;5(2):133.
38. Hamburger M, Gupta M, Hostettmann K. Coumarins from *Polygala paniculata*. *Planta Med.* 1985 Jun;(3):215–7.
39. Pizzolatti MG, Cristiano R, Monache FD, Branco A. Artefatos cumarínicos isolados de *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2002;12(1).
40. Cristiano R, Pizzolatti MG, Monache FD, Rezende CM, Branco A. Two Xanthenes from *Polygala paniculata* and Confirmation of the 1-Hydroxy- 2,3,5-trimethoxy-xanthone at Trace Level by HRGC-MS. *Z Naturforsch C.* 2003 Aug 1;58(7–8):490–4.
41. Pizzolatti MG, Mendes BG, Soldi C, Carasek E. Analysis of Volatile Compounds Released From Flowers and Roots of *Polygala cyparissias* and *Polygala paniculata* by Headspace. 2009 May;
42. Victório CP, Beltrami J, Celso Luiz Salgueiro Lage. *Polygala paniculata*: a source of methyl salicylate produced through plant tissue culture. 2011 Jun;
43. Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S. Oxidative stress: A key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules.* 2019 Apr 22;24(8).
44. Vila M, Przedborski S. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* 2003 May;4(5):365–75.
45. Flavonoides [Internet]. [cited 2022 Jun 12]. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13028951>
46. Pino N, Álvarez R, Prado G. Determinación de metabolitos secundarios por cromatografía en capa delgada a especies con uso etnomedicinal como estrategia pedagógica en el aula de clase | . *Rev Asoc Col Cienc(Col),.* 2017;
47. Marghitas LA. The Development of a Biochemical Profile of Acacia Honey by Identifying Biochemical Determinants of its Quality [Internet]. (8) (PDF) The Development of a Biochemical Profile of Acacia Honey by Identifying Biochemical Determinants of its Quality. 2010 [cited 2022 Jun 12]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/235339573_The_Development_of_a_Bioc

hemical_Profile_of_Acacia_Honey_byIdentifying_Biochemical_Determinants_of_its_Quality

48. Marina D, Avella G, Alberto C, García O, Cisneros A. Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal. undefined. 2008;
49. Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini-Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2005 Dec;25(4):726–32.
50. Sandoval-Avila S, Diaz NF, Gómez-Pinedo U, Canales-Aguirre AA, Gutiérrez-Mercado YK, Padilla-Camberos E, et al. Neuroprotective effects of phytochemicals on dopaminergic neuron cultures. *Neurologia*. 2019 Mar;34(2):114–24.
51. ANTIOXIDANTES EN ALIMENTOS Y SALUD - PDF Free Download [Internet]. [cited 2022 Jun 14]. Available from: <https://docplayer.es/57194382-Antioxidantes-en-alimentos-y-salud.html>
52. Batista ÂG, Ferrari AS, da Cunha DC, da Silva JK, Cazarin CBB, Correa LC, et al. Polyphenols, antioxidants, and antimutagenic effects of *Copaifera langsdorffii* fruit. *Food Chem*. 2016 Apr 15;197 Pt B:1153–9.
53. Cassidy A, Rimm EB, O'Reilly EJ, Logroscino G, Kay C, Chiuve SE, et al. Dietary flavonoids and risk of stroke in women. *Stroke*. 2012 Apr;43(4):946–51.
54. Schneider H, Schwiertz A, Collins MD, Blaut M. Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract. *Arch Microbiol*. 1999 Jan;171(2):81–91.
55. Park BC, Lee YS, Park H-J, Kwak M-K, Yoo BK, Kim JY, et al. Protective effects of fustin, a flavonoid from *Rhus verniciflua* Stokes, on 6-hydroxydopamine-induced neuronal cell death. *Exp Mol Med*. 2007 Jun 30;39(3):316–26.
56. Bakoyiannis I, Daskalopoulou A, Pergialiotis V, Perrea D. Phytochemicals and cognitive health: Are flavonoids doing the trick? *Biomed Pharmacother*. 2019 Jan;109:1488–97.
57. Gao X, Cassidy A, Schwarzschild MA, Rimm EB, Ascherio A. Habitual intake of dietary flavonoids and risk of Parkinson disease. *Neurology*. 2012 Apr 10;78(15):1138–45.
58. Kim GH, Kim JE, Rhie SJ, Yoon S. The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Exp Neurobiol*. 2015 Dec;24(4):325–40.