



*LIST OF
PUBLICATIONS*

PUBLICATIONS

1. Bafna A.R. and Mishra S.H. Immunomodulatory activity of methanol extract flowerheads of *Sphaeranthus indicus* Linn. **ARS Pharmaceutica**, 45:3, 291-299, 2004.
2. Bafna A.R. and Mishra S.H. *In-vitro* antioxidant activity of methanol extract rhizomes of *Curculigo orchoides* Gaertn. **ARS Pharmaceutica**, 46:2, 147-159, 2005.
3. Bafna A.R. and Mishra S.H. Immunostimulatory effect of methanol extract of *Curculigo orchoides* on immunosuppressed mice. **Journal of Ethnopharmacology** (Accepted).
4. Evaluation of antioxidant properties of flower heads of *Sphaeranthus indicus* Linn. **Journal of Herbal Pharmacotherapy** (Under revision).
5. Protective effect of bioactive fraction of *Sphaeranthus indicus* Linn. against cyclophosphamide induced immunosuppression of humoral immunity in mice. **Journal of Ethnopharmacology** (Under revision).
6. Immunomodulatory activity of methanol extract of roots of *Cissampelos pareira* Linn. **ARS Pharmaceutica** (Under revision).
7. Immunomodulatory and antioxidant activity of alkaloidal fraction of *Cissampelos pareira* Linn. **Journal of Herbal Pharmacotherapy** (Under revision).
8. Immunomodulatory activity of methanol extract of rhizomes of *Curculigo orchoides* Gaertn. **ARS Pharmaceutica** (Communicated).
9. Immunomodulatory activity of petroleum ether extract of flowerheads of *Sphaeranthus indicus* Linn. **Journal of Herbal Pharmacotherapy** (Communicated).

Actividad inmunomoduladora del extracto de metanol de la cabeza floral de *Sphaeranthus indicus* Linn

Immunomodulatory activity of methanol extract of flower-heads of Sphaeranthus indicus Linn

BAFNA AR, AND MISHRA SH.*

Pharmacy Department, Faculty of Technology and Engineering,
The M.S.University of Baroda,Vadodara-390002,Gujarat, India

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

RESUMEN

El extracto de metanol y sus fracciones de éter de petróleo, cloroformo y metanol sobrante de las cabezas florales de *Sphaeranthus indicus* Linn demostraron su eficacia al aumentar la actividad fagocítica, el título de anticuerpos de la hemaglutinación y la hipersensibilidad de tipo retardado, mientras que sólo la fracción de metanol restante resultó activa en la normalización de los niveles de leucocitos totales en el caso de la mielosupresión inducida por ciclofosfamida en ratones. Por tanto, el presente estudio revela que el fármaco augura buenos resultados como agente inmunomodulador, al actuar como estimulante de la inmunidad celular y humoral y de la función fagocítica.

PALABRAS CLAVE: *Sphaeranthus indicus*. Actividad inmunomoduladora. Hemaglutinación. Mielosupresión

ABSTRACT

Methanol extract, its petroleum ether, chloroform and remaining methanol fractions, of flower heads of Sphaeranthus indicus Linn. were found effective in increasing phagocytic activity, haemagglutination antibody titer and delayed type hypersensitivity, whereas only remaining methanol fraction was found active in normalizing total WBC levels in case of cyclophosphamide induced myelosuppression in mice. Present study, therefore, reveals that the drug holds promise as immunomodulatory agent, which acts by stimulating both humoral as well as cellular immunity and phagocytic function.

KEY WORDS: *Sphaeranthus indicus*. Immunomodulatory activity Haemagglutination. Myelosuppression.

INTRODUCCIÓN

Los fármacos herbales son conocidos por sus propiedades inmunomoduladoras y por estimular de forma generalizada la inmunidad específica y no específica¹. Muchas de las plantas utilizadas en la medicina tradicional han demostrado poseer actividades inmunomoduladoras. Algunas de estas plantas estimulan tanto la inmunidad celular como la inmunidad humoral, mientras que otras sólo activan los componentes celulares del

INTRODUCTION

Herbal drugs are known to possess immunomodulatory properties and generally act by stimulating both specific and non-specific immunity¹. Many plants used in traditional medicine are reported to have immunomodulating activities. Some of these stimulate both humoral and cell mediated immunity while others activate only the cellular components of the immune system, i.e. phagocytic function without affecting the

sistema inmunitario, es decir, la función fagocítica sin afectar a la inmunidad celular o humoral. El extracto de hoja de *Picrorrhiza kurroa* actúa como estimulante de la respuesta humoral y de la función fagocítica del sistema reticuloendotelial. Algunas de estas plantas también actúan como supresores de la inmunidad celular y humoral^{2,3}.

Aproximadamente unas 34 plantas se identifican como *rasayanas* en el sistema de medicina Ayurvedic de la India y presentan diversas propiedades farmacológicas inmunoestimulantes, tónicas, neuroestimulantes, anti-envejecimiento, antibacterianas, antivirales, antireumáticas, anticancerígenas, adaptogénicas, antiestrés, etc.⁴ La materia médica ayurvédica dedica una sección completa a los fármacos utilizados para mejorar la resistencia corporal titulada 'Rasayana'. Se identificaron diversas plantas con actividad inmunomoduladora potencial, entre las que se encontraban algunas con las que ya se había emprendido la evaluación de sus actividades en animales y, en cierta medida, en humanos. *Asparagus racemosus*, *Azadirachta indica*, *Curcuma longa*, *Ocimum sanctum*, *Panax ginseng*, *Picrorrhiza kurroa*, *Tinospora cordifolia*, *Withania somnifera* etc. son algunos ejemplos evidentes de plantas con una actividad prometedora. Aún quedan por investigar muchas más, lo que amplía las posibilidades para futuras investigaciones⁴.

Sphaeranthus indicus Linn. (Compositae) es una hierba que se encuentra principalmente en el sur de la India que posee propiedades antiulcerosas, estomacales, estimulantes, curativas,pectorales, demulcentes y emolientes de forma externa. Los médicos locales recomiendan el agua destilada preparada como el agua de rosas procedente de la hierba para las afecciones biliares y la diseminación de varios tipos de tumores. Las flores (la cabeza floral) son muy apreciadas por sus propiedades curativas, depurativas, febrífugas y tónicas, muy útiles como purificadoras de la sangre en patologías dérmicas. El fármaco es también muy útil para combatir la ictericia y las secreciones uretrales. La presente investigación se realizó con el propósito de estudiar la actividad inmunomoduladora del extracto de metanol de las cabezas florales de *S.indicus* y sus distintas fracciones mediante los métodos establecidos para justificar las indicaciones tradicionales legadas por el fármaco como rasayana.

humoral or cell mediated immunity. Leaf extract of *Picrorrhiza kurroa* stimulated the humoral response and the phagocytic function of the reticuloendothelial system. Some of these plants also suppress both humoral and cell mediated immunity^{2,3}.

About 34 plants are identified as *rasayanas* in Indian Ayurvedic system of medicine having various pharmacological properties such as immunostimulant, tonic, neurostimulant, antiageing, antibacterial, antiviral, antirheumatic, anticancer, adaptogenic, antistress etc.⁴. An entire section of materia medica of Ayurveda is devoted to drugs entitled as 'Rasayana' used for enhancement of body resistance⁵. Many plants with potential immunomodulatory activity are reported, some of these have already been undertaken for evaluation of their activities in animals, and also to some extent in humans. Some glaring examples with promising activity are *Asparagus racemosus*, *Azadirachta indica*, *Curcuma longa*, *Ocimum sanctum*, *Panax ginseng*, *Picrorrhiza kurroa*, *Tinospora cordifolia*, *Withania somnifera* etc. A lot more are still to be explored and offer scope for further investigation⁴.

Sphaeranthus indicus Linn. (Compositae) is a herb found mostly in southern part of India used as bitter stomachic, stimulant, alterative, pectoral and demulcent, and externally emollient. Distilled water prepared like rose water from the herb is recommended by local physicians for bilious affections and for dispersions of various kinds of tumours. Flowers (flower heads) are highly esteemed as alteratives, depuratives, refrigerants and tonics, useful as blood purifiers in skin diseases. The drug is also useful in urethral discharges and in jaundice⁶. The present investigation was aimed to study the immunomodulatory activity of methanol extract of flower heads of *S.indicus* and its different fractions using reported methods in order to justify the traditional claims endowed upon the drug as rasayana.

MATERIALS AND METHODS

Animals: Swiss albino mice of either sex, weighing 20-25 gms, housed in standard conditions of temperature, humidity and light were used. They were fed with standard rodent diet and water *ad libitum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales: Ratones albinos suizos de ambos sexos, con un peso de entre 20 y 25 g., mantenidos en condiciones estándar de temperatura, humedad y luz. Fueron alimentados con una dieta estándar de roedor y agua *ad libitum*.

Material de la planta y preparación del extracto: Se recogieron cabezas florales frescas de *S.indicus* procedentes de los jardines de la ciudad y se autenticaron en el Departamento de botánica de la M.S.University, Baroda. La maceración de las cabezas florales disecadas al aire de *S.indicus* proporcionó un 6,65% de extracto de metanol (w/w). El extracto de metanol obtenido de este modo se fraccionó por maceración en disolventes de distintas polaridades como el éter de petróleo, el benceno, el cloroformo y el metanol. Todas sus respectivas fracciones se concentraron al vacío y se utilizaron para el cribado farmacológico y fitoquímico. El extracto de metanol resultó positivo en las pruebas de alcaloides, felónicos, esteroides, terpenoides y carbohidratos. Las fracciones de cloroformo, benceno y éter de petróleo resultaron positivas en las pruebas de terpenoides y esteroides, mientras que la fracción de metanol resultó positiva en las pruebas de alcaloides, felónicos y carbohidratos en el cribado fitoquímico⁷.

Muestras de prueba: Las cantidades pesadas de los extractos de prueba se suspendieron en un 1% de carboximetilcelulosa de sodio para preparar las formas de dosificación adecuadas. A los animales controlados se les proporcionó un volumen equivalente de carboximetilcelulosa de sodio como vehículo. La ciclofosfamida se utilizó como inmunosupresor estándar.

Suspensión de tinta de carbón: Se diluyó tinta Pelican AG, Germany ocho veces con solución salina y se utilizó para la prueba de depuración del carbón en una dosis de 10µl/gm de peso corporal de los ratones.

Los eritrocitos de cordero se lavaron tres veces en solución salina normal y se ajustaron a una concentración del 20% para la inmunización y del 1% para la prueba como antígeno.

Plant material and extract preparation: Fresh flower heads of *S.indicus* were collected from the outfield of city, and were authenticated in Botany Department of M.S.University, Baroda. Maceration of air-dried, powdered flower heads of *S.indicus* afforded 6.65% methanol extract (w/w). Methanol extract so obtained was then fractionated by maceration into different polarity solvents like petroleum ether, benzene, chloroform and methanol. All respective fractions were concentrated under vacuum and used for phytochemical and pharmacological screening. Methanol extract gave positive tests for alkaloids, phenolics, steroids, terpenoids and carbohydrates. Petroleum ether, benzene and chloroform fractions gave positive tests for terpenoids and steroids whereas methanol fraction gave positive tests for alkaloids, phenolics and carbohydrates on phytochemical screening⁷.

Test samples: Weighed quantities of test extracts were suspended in 1% sodium carboxy methylcellulose to prepare suitable dosage form. The control animals were given an equivalent volume of sodium carboxy methylcellulose vehicle. Cyclophosphamide was used as a standard immunosuppressant.

Carbon ink suspension: Pelican AG, Germany, ink was diluted eight times with saline and used for carbon clearance test in a dose of 10µl/gm body weight of mice.

Sheep red blood cells (SRBCs) were washed with three times in normal saline and adjusted to a concentration 20% for immunization and 1% for challenge as Antigen.

METHODS

Phagocytic activity

Phagocytic index was determined as per the method reported by Gonda et al.⁸ Mice were divided into 11 groups, of six animals each. The control group received 1.0 % sodium carboxy methylcellulose solution only as vehicle; while animals of the treatment groups were given test extracts (100 and 200 mg/kg, p.o.) in 1.0 % sodium carboxy methyl cellulose daily for 5 days. Carbon ink suspension was injected via tail vein to each mouse after 48 hours of 5 days treatment. Blood samples were drawn from orbital vein at

MÉTODOS

Actividad fagocítica

El índice fagocítico se determinó mediante el método establecido por Gonda et al.⁸ Los ratones se dividieron en 11 grupos con seis animales cada uno. El grupo de control sólo recibió un 1,0% de solución de carboximetilcelulosa de sodio como vehículo, mientras que a los animales de los grupos de tratamiento se les administraron los extractos de prueba (100 y 200 mg/kg, vía oral) en un 1,0% de carboximetilcelulosa de sodio diariamente durante 5 días. A cada ratón se le inyectó la suspensión de tinta de carbón a través de la vena de la cola 48 horas después del tratamiento de 5 días. Se extrajeron muestras de sangre de la vena orbital a los 0 y 15 minutos. La sangre (25- μ l) se mezcló con un 0,1% de carbonato sódico (2 ml) y se sometió a la determinación de densidades ópticas a 660 nm.

El índice fagocítico (K) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$K = (\ln OD_1 - \ln OD_2) / (t_2 - t_1)$$

donde OD_1 y OD_2 son las densidades ópticas en los momentos t_1 and t_2 , respectivamente.

Mielosupresión inducida por ciclofosfamida

La mielosupresión inducida por ciclofosfamida se estudió de acuerdo con el método descrito por Manjarekar et al.⁹ Los animales se dividieron en 12 grupos de seis animales cada uno. El grupo de control y el grupo de la ciclofosfamida recibieron un 1,0% de solución de carboximetilcelulosa de sodio sólo como vehículo diariamente durante 13 días, mientras que a los animales de los grupos de tratamiento se les administraron los extractos de prueba (100 y 200 mg/kg, vía oral) en un 1,0% de carboximetilcelulosa de sodio diariamente durante 13 días. Los días 11, 12 y 13, a todos los animales excepto a los del grupo de control se les inyectó ciclofosfamida (30 mg/kg, intraperitoneal) 1 hora después de la administración de los extractos. Las muestras de sangre se extrajeron el día 14 y se determinó el recuento de leucocitos totales.

0 and 15min. Blood (25- μ l) was mixed with 0.1 % sodium carbonate (2 ml) and subjected for determination optical densities at 660 nm.

The phagocytic index K, was calculated by using following equation:

$$K = (\ln OD_1 - \ln OD_2) / (t_2 - t_1)$$

where OD_1 and OD_2 are the optical densities at times t_1 and t_2 , respectively.

Cyclophosphamide induced Myelosuppression

Cyclophosphamide induced myelosuppression was studied according to the method described by Manjarekar et al.⁹ Animals were divided into 12 groups of six animals each. The control group and cyclophosphamide group received 1.0 % sodium carboxy methylcellulose solution only as vehicle daily for 13 days while animals in treatment groups were given the test extracts (100 and 200 mg/kg, p.o.) in 1.0 % sodium carboxy methyl cellulose daily for 13 days. On days 11, 12, 13 all the animals except in the control group were injected with cyclophosphamide (30mg/kg, i.p.) 1 hour after administration of the extracts. Blood samples were collected on day 14 and total white blood cell (WBC) count was determined.

Humoral antibody (HA) titre and delayed type hypersensitivity (DTH) response:

The method described by Puri et al.¹⁰ was adopted. Animals were divided into 11 groups of six animals each. The control group received 1.0 % sodium carboxy methylcellulose solution only as vehicle; while animals in the treatment groups were given the test extracts (100 and 200 mg/kg, p.o.) in 1.0 % sodium carboxy methyl cellulose daily for 7 days. The animals were immunized by injecting 0.1 ml of 20% of fresh sheep red blood cells suspension intraperitoneally on 0 day. Blood samples were collected in micro centrifuge tubes from individual animal by retro-orbital plexus on 7th day to obtain serum. Antibody levels were determined by haemagglutination technique. Briefly, equal volumes of individual serum samples of each group were pooled. Two fold dilutions of pooled serum samples were made in 25 μ l volumes of normal saline in microtitration plate and to it added 25 μ l of 1% suspension of sheep red blood cells in

Título de anticuerpos humorales y la respuesta de la hipersensibilidad de tipo retardado (DTH):

Se adoptó el método descrito por Puri et al.¹⁰ Los animales se dividieron en 11 grupos de seis animales cada uno. El grupo de control recibió un 1,0% de solución de carboximetilcelulosa de sodio sólo como vehículo, mientras que a los animales de los grupos de tratamiento se les administraron los extractos de prueba (100 y 200 mg/kg, vía oral) en un 1,0% de carboximetilcelulosa de sodio diariamente durante 7 días. El día 0, los animales fueron inmunizados mediante la inyección intraperitoneal de 0,1 ml de suspensión fresca de eritrocitos de cordero al 20%. Las muestras de sangre se extrajeron en tubos microcentrífugos a cada animal de forma individual del plexo retroorbital el día 7 para la obtención de suero. Los niveles de anticuerpos se determinaron mediante la técnica de hemaglutinación. En síntesis, se obtuvo el mismo volumen de suero de las muestras individuales de cada grupo. Las diluciones de factor dos de las muestras de suero mezclado se realizaron en volúmenes de 25 µl de solución salina normal en placas de microtítulo y a las que se añadieron 25 µl de suspensión de eritrocitos de cordero en solución salina al 1%.

Una vez realizada la mezcla, las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y se examinaron bajo el microscopio en busca de hemaglutinación. Se tomó como título de anticuerpos la muestra recíproca de la dilución más alta de los sueros de prueba que resultó positiva en aglutinación. El día 7, se midió el grosor de la pata trasera derecha mediante el calibrador digital Vernier. A continuación, se inyectó a los ratones 20µl de eritrocitos de cordero al 1% en la pata trasera derecha. Se midió de nuevo el grosor de la pata pasadas 24 horas. La diferencia entre el grosor de la pata antes y después de la inyección expresada en mm se tomó como medida de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH).

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media $\pm$ del análisis S.E.M. y el análisis estadístico se realizó con el empleo de pruebas *t* de estudiantes.

saline. After mixing, the plates were incubated at room temperature for 1 hr. and examined for haemagglutination under microscope. The reciprocal of the highest dilution of the test serum giving agglutination was taken as the antibody titre.

On 7th day, the thickness of the right hind footpad was measured using digital vernier caliper. The mice were then challenged by injection of 20µl of 1% SRBCs in right hind footpad. Foot thickness was again measured after 24 hrs of this challenge. The difference between the pre and post challenge foot thickness express in mm was taken as a measure of delayed type hypersensitivity (DTH).

Statistical analysis

Data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. and statistical analysis was carried out employing Student's *t*-test.

RESULTS

Carbon clearance test

Methanol extract of *S.indicus* and its fractions in different solvents possess macrophage stimulatory activity as evidenced by increased phagocytic index in carbon clearance test. The phagocytic activity of reticuloendothelial is generally measured by the rate of removal of carbon particles from blood stream. The phagocytic index for control group was found to be 0.094 ± 0.0065 whereas all test extracts of *S.indicus* increased it significantly. The maximum effect was found in case of methanol extract and its petroleum ether and remaining methanol fractions ($P < 0.001$) (Table 1).

RESULTADOS

Prueba de depuración del carbón

El extracto de metanol de *S.indicus* y sus fracciones en distintos disolventes poseen actividad estimuladora macrófaga como demostró el aumento del índice fagocítico en la prueba de depuración del carbón. La actividad fagocítica del sistema reticuloendotelial generalmente se midió en relación con la velocidad de eliminación de las partículas de carbón del flujo sanguíneo. El índice fagocítico del grupo de control fue de $0,094 \pm 0,0065$, mientras que en todos los extractos de prueba de *S.indicus* aumentó de forma significativa. El máximo efecto se encontró en el caso del extracto de metanol y la fracción de éter de petróleo y la fracción de metanol sobrante ($P<0,001$) (Tabla 1).

TABLA I: Efecto del extracto de metanol y sus distintas fracciones cromatográficas sobre el título de anticuerpos humorales, la respuesta DTH, el índice fagocítico y la mielosupresión inducida por ciclofosfamida.

TABLE I: Effect of methanol extract and its different Fractions on HA titre, DTH response, phagocytic index and cyclophosphamide induced myelosuppression.

Tratamiento Treatment	Dosis Dose mg/kg	Título de anticuerpos humorales Media $\pm$ análisis S.E.M. HA titre Mean $\pm$ S.E.M.	Respuesta DTH (mm) Media edema de la pata $\pm$ análisis S.E.M. DTH response (mm) Mean paw edema $\pm$ S.E.M.	Índice fagocítico Media $\pm$ análisis S.E.M. Phagocytic index Mean $\pm$ S.E.M.	Recuento de leucocitos totales Media $\pm$ análisis S.E.M. Total WBC count Mean $\pm$ S.E.M.
Control	-	64,00 $\pm$ 14,311	0,313 $\pm$ 0,038	0,0943 $\pm$ 0,006	5800 $\pm$ 99,16
Ciclofosfamida Cyclophosphamide	30	-	-	-	2142 $\pm$ 248,1
Extracto de metanol Methanol extract	100	682,7 $\pm$ 107,9 ^c	0,590 $\pm$ 0,054 ^c	0,150 $\pm$ 0,008 ^c	4191 $\pm$ 214,6 ^c
	200	405,3 $\pm$ 69,46 ^c	0,576 $\pm$ 0,084 ^c	0,126 $\pm$ 0,005 ^c	4300 $\pm$ 1544 ^c
Fracción de éter de petróleo Petroleum ether fraction	100	256,0 $\pm$ 57,24 ^c	0,470 $\pm$ 0,050 ^c	0,151 $\pm$ 0,005 ^c	3483 $\pm$ 222,4 ^b
	200	298,7 $\pm$ 71,39 ^c	0,510 $\pm$ 0,037 ^c	0,167 $\pm$ 0,004 ^c	3625 $\pm$ 197,8 ^c
Fracción de benceno Benzene fraction	100	170,7 $\pm$ 75,12 ^d	0,275 $\pm$ 0,033 ^{NS}	0,125 $\pm$ 0,002 ^c	2650 $\pm$ 172,7 ^d
	200	138,7 $\pm$ 25,69 ^a	0,246 $\pm$ 0,062 ^{NS}	0,123 $\pm$ 0,005 ^c	3058 $\pm$ 157,3 ^a
Fracción de cloroformo Chloroform fraction	100	277,3 $\pm$ 76,92 ^a	0,521 $\pm$ 0,022 ^c	0,123 $\pm$ 0,003 ^c	2868 $\pm$ 101,4 ^a
	200	160,0 $\pm$ 32,00 ^a	0,332 $\pm$ 0,059 ^{NS}	0,139 $\pm$ 0,005 ^c	3100 $\pm$ 96,61 ^a
Fracción de metanol Methanol fraction	100	341,3 $\pm$ 78,67 ^c	0,670 $\pm$ 0,050 ^c	0,165 $\pm$ 0,004 ^c	5275 $\pm$ 453,1 ^c
	200	426,7 $\pm$ 53,97 ^c	0,810 $\pm$ 0,037 ^c	0,162 $\pm$ 0,004 ^c	6083 $\pm$ 568,9 ^c

Los valores se expresan como la media $\pm$ del análisis S.E.M. n=6; a = $p<0,05$, b = $p<0,001$, d = N.S. (No significativo). Todos los grupos de tratamiento se compararon con el grupo de control para el título de anticuerpos humorales, la respuesta DTH y el índice fagocítico, y se compararon con el grupo de la ciclofosfamida en el caso de la mielosupresión inducida por la ciclofosfamida.

Values are expressed as mean $\pm$ S.E.M. n=6; a = $p<0,05$, b = $p<0,001$, d = N.S. (Non Significant) All treated groups are compared with control for HA titre, DTH response and phagocytic index, whereas with cyclophosphamide group in case of cyclophosphamide induced myelosuppression.

Mielosupresión inducida por ciclofosfamida

La administración de ciclofosfamida provocó el descenso significativo de los niveles de leucocitos totales en sangre ($2142 \pm 248,08$) en comparación con el grupo de control ($5800 \pm 99,16$). El extracto de metanol y la fracción de metanol sobrante resultaron ser unos potentes protectores de la mielosupresión inducida por ciclofosfamida como evidenció el aumento significativo de los niveles del recuento de leucocitos totales ($p < 0,001$). Las fracciones de éter de petróleo y cloroformo también aumentaron los niveles de leucocitos pero no pudieron alcanzar los valores normales. La fracción de metanol sobrante del extracto de metanol fue la única fracción que aumentó el recuento de leucocitos totales hasta valores normales de una forma dosis-dependiente ($5275 \pm 453,1$ y $6083 \pm 568,9$ para 100 y 200 mg/kg respectivamente).

Título de anticuerpos humorales y la respuesta de la hipersensibilidad de tipo retardado (DTH)

La respuesta humoral ante los eritrocitos de cordero se comprobó mediante el título de anticuerpos de la hemaglutinación. El valor del título de anticuerpos humorales del grupo de control fue $64,00 \pm 14,31$. La administración del extracto de metanol y sus fracciones produjo un aumento del título de anticuerpos humorales como evidenció la hemaglutinación en esta dilución. Se obtuvieron niveles estadísticamente significativos con el extracto de metanol y sus fracciones de éter de petróleo, cloroformo y metanol sobrante en ambas dosis. El aumento dosis-dependiente sólo se estableció con la fracción de éter de petróleo ($256 \pm 57,24$ y $298,7 \pm 71,39$) y la fracción de metanol ($341,3 \pm 78,67$ y $426,7 \pm 53,97$). El extracto de metanol ($682,7 \pm 107,9$ y $405,3 \pm 69,46$) y la fracción de cloroformo ($277,3 \pm 76,92$ y 160 ± 32) mostraron un descenso de los niveles a dosis más altas.

La respuesta DTH se comprobó por el aumento del grosor de la pata mediante el calibrador digital Vernier. La administración del extracto de metanol y sus fracciones produjo un aumento del grosor de la pata de los ratones, hecho que se tomó como medida de la respuesta DTH. Se obtuvo un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,001$) de la respuesta DTH en

Cyclophosphamide induced myelosuppression

Administration of cyclophosphamide has significantly lowered the levels of total WBC (2142 ± 248.08) as compared to control group (5800 ± 99.16) in blood. Methanol extract and remaining methanol fraction were found potent in protecting cyclophosphamide-induced myelosuppression as evidenced by increasing the levels of total WBC count significantly ($p < 0.001$). Petroleum ether and chloroform fraction also raised WBC levels but could not reach up to the normal values. Remaining methanol fraction of methanol extract was the only fraction that increased the total WBC count up to the normal values in a dose dependent manner (5275 ± 453.1 and 6083 ± 568.9 at 100 and 200 mg/kg respectively).

Humoral antibody (HA) titre and delayed type hypersensitivity (DTH) response

Humoral response to SRBCs was checked by haemagglutination antibody titre. The humoral antibody titre value in control was found to be 64.00 ± 14.31 . Administration of methanol extract and its fractions produced increase in humoral antibody titre as evident by haemagglutination at that dilution. Statistically significant levels were obtained with methanol extract and its petroleum ether, chloroform and remaining methanol fraction at both the dose level. The dose dependent increase was established only with petroleum ether (256 ± 57.24 and 298.7 ± 71.39) and methanol fraction (341.3 ± 78.67 and 426.7 ± 53.97). Methanol extract (682.7 ± 107.9 and 405.3 ± 69.46) and chloroform fraction (277.3 ± 76.92 and 160 ± 32) showed decrease in levels at higher dose.

DTH response was checked by increased footpad thickness using digital vernier calipers. Administration of methanol extract and its fractions produced increase in thickness of footpad of mice as a measure of DTH response. Statistically significant ($p < 0.001$) increase in DTH response in dose dependent manner by remaining methanol fraction (0.670 ± 0.050 and 0.810 ± 0.037) and petroleum ether fraction (0.470 ± 0.050 and 0.510 ± 0.037) obtained. Benzene fraction slightly reduced the DTH response by reducing thickness of footpad compared to control group. Methanol extract and chloroform fraction also

la forma dosis-dependiente con la fracción de metanol sobrante ($0,670 \pm 0,050$ y $0,810 \pm 0,037$) y la fracción de éter de petróleo ($0,470 \pm 0,050$ y $0,510 \pm 0,037$). La fracción de benceno redujo levemente la respuesta DTH al reducir el grosor de la pata en comparación con el grupo de control. El extracto de metanol y la fracción de cloroformo también mostraron un aumento de la respuesta DTH en comparación con el grupo de control.

DISCUSIÓN

Se estudió la actividad inmunomoduladora de *S.indicus* mediante la evaluación de su efecto en el título de anticuerpos, la respuesta DTH, la función fagocítica y la mielosupresión inducida por ciclofosfamida en ratones. La administración del extracto de metanol y sus fracciones mostró actividad inmunoestimuladora. Se obtuvo una estimulación significativa con respecto a estos parámetros con el extracto de metanol, la fracción de éter de petróleo y la fracción de metanol sobrante, mientras que las fracciones de cloroformo y benceno mostraron cambios poco significativos. El aumento en el índice de depuración del carbón reflejó la mejora de la función fagocítica de macrófagos mononucleares y de la inmunidad no específica. La fagocitosis de los macrófagos es importante frente a los parásitos de menor tamaño y su efectividad mejora notablemente gracias a la opsonización de los parásitos mediante los anticuerpos y el complemento C3b que es el encargado de una depuración más rápida de los parásitos de la sangre¹¹. La producción de anticuerpos frente a los eritrocitos de cordero (SRBC, antígeno T-dependiente) requiere la cooperación de los macrófagos y los linfocitos B¹². Los resultados obtenidos durante la presente investigación mostraron un aumento en la producción de anticuerpos en respuesta a los eritrocitos de cordero.

La respuesta DTH es específica del antígeno y causa eritema e inducción en el lugar de la inyección del antígeno en animales inmunizados. La histología de la hipersensibilidad retardada (DTH) puede variar según la especie, pero una característica general es la llegada de células del sistema inmune al lugar donde se realiza la inyección, macrófagos y basófilos en el caso de los ratones en los que la inducción resulta

showed increased DTH response compared to control group.

DISCUSSION

Immunomodulatory activity of *S.indicus* was explored, by evaluating its effect on antibody titre, DTH response, phagocytic function and cyclophosphamide induced myelosuppression in mice. Administration of methanol extract and its fractions showed immunostimulating activity. Significant stimulation with respect to these parameters was obtained with methanol extract, its petroleum ether and remaining methanol fraction while benzene, chloroform fractions showed insignificant changes. The increase in carbon clearance index reflects the enhancement of phagocytic function of mononuclear macrophage and non-specific immunity. Phagocytosis by macrophages is important against the smaller parasites and its effectiveness is markedly enhanced by opsonisation of parasite with antibodies and complement C3b leading to more rapid clearance of parasite from blood¹¹. The antibody production to T-dependent antigen SRBCs requires the cooperation of T and B-lymphocytes and macrophages¹². Results obtained during present investigation showed increased antibody production in response to SRBCs.

DTH is antigen specific and causes erythema and induction at the site of antigen infection in immunized animals. The histology of DTH can be different for different species, but the general characteristics are an influx of immune cells at the site of injection, macrophages and Basophils in mice and induction becomes apparent within 24-72 hours. T-cells are required to initiate the reaction^{13, 14}.

Increase in the DTH response indicates that drug has a stimulatory effect on lymphocytes and necessary cell types required for the expression reaction. DTH response, which is direct co-relate of cell-mediated immunity, was significantly increased as compared to untreated control¹⁵.

Statistically significant rise in HA titre, DTH response and phagocytic activity of petroleum ether and remaining methanol fraction suggest that active principles of flower heads which are responsible for stimulation of antibody response, cell mediated response and phagocytic function can be extracted with both polar and non

evidente a las 24-72 horas. Las células T son necesarias para iniciar la reacción^{13, 14}.

El aumento de la respuesta DTH indica que el fármaco produce un efecto estimulador sobre los linfocitos y los tipos de células necesarias para la expresión de la reacción. La respuesta DTH, que es el correlato directo de la inmunidad celular, aumentó significativamente en comparación con el grupo de control no tratado¹⁵.

El aumento estadísticamente significativo del título de anticuerpos humorales, la respuesta DTH y la actividad fagocítica de la fracción de éter de petróleo y la fracción de metanol sobrante sugirió que los principios activos de las cabezas florales, responsables de la estimulación de la respuesta de anticuerpos, la respuesta celular y la función fagocítica, se pueden extraer con disolventes polares y no polares.

En el caso de la mielosupresión inducida por ciclofosfamida, la fracción de metanol sobrante del extracto de metanol consiguió devolver el nivel de leucocitos a su nivel normal, mientras que el resto de fracciones no dieron resultado, lo que sugirió que los componentes polares son los responsables de la protección frente a la mielosupresión por ciclofosfamida. El efecto protector de la fracción de metanol sobrante del extracto de metanol frente a la mielosupresión inducida por ciclofosfamida es comparable a los efectos obtenidos con *Asparagus racemosus*¹⁶ y *W. somnifera*¹⁷.

Ciertos fitoconstituyentes de la planta ya se han aislado; tres nuevos eudesmanólidos junto con dos sesquiterpenoides, criptomeridiol y 4-epi-criptomeridiol¹⁸, tres nuevas hidroxilactonas estrechamente relacionadas se han aislado del extracto de cloroformo de las cabezas florales de *S.indicus*¹⁹. Aislamiento de los alcaloides de las flores²⁰ y aislamiento de 7-hidroxi-3', 4'.5, 6-tetrametoxiflavona 7-O-β-D-(1→4)-diglucósido: También se identificó un nuevo glicósido de flavonol en el pecíolo de *S.indicus*²¹. Un principio antimicrobiano aislado del extracto de éter de petróleo se identificó como lactona sesquiterpénica bicíclica²². Un glicósido sesquiterpénico aislado del extracto de metanol de *S.indicus* fue el responsable del aumento de la producción de anticuerpos²³.

Las lactonas sesquiterpénicas son importantes fitoconstituyentes de probada eficacia con variadas actividades farmacológicas como, por ejemplo, actividades antibacterianas (especialmente

polar solvents.

In the case of cyclophosphamide induced myelosuppression, remaining methanol fraction of methanol extract was able to bring back the levels of WBC to the normal while other fractions were ineffective suggesting that polar components responsible for protection against cyclophosphamide myelosuppression. The protective effect of remaining methanol fraction of methanol extract against myelosuppression induced by cyclophosphamide is comparable with those obtained for *Asparagus racemosus*¹⁶ and *W. somnifera*¹⁷.

A few phytoconstituents from the plant have already been isolated; three new eudesmanolides along with two sesquiterpenoids, cryptomeridiol and 4-epicryptomeridiol¹⁸, three closely related new hydroxy lactone have been isolated from chloroform extract of flower heads *S.indicus*¹⁹. Isolation of alkaloids from flowers²⁰ and isolation of 7-hydroxy-3', 4'.5, 6-tetramethoxy-flavone 7-O-β-D-(1→4)-diglucoside: a new flavone glycoside from the stem of *S.indicus*²¹ also reported. An antimicrobial principle isolated from petrol ether extract was identified as bicyclic sesquiterpene lactone²². One Sesquiterpene glycoside isolated from methanol extract of *S.indicus* was responsible for increased antibody production²³.

Sesquiterpene lactones are proven as important phytoconstituents with different pharmacological activities such as antibacterial (especially against gram positive bacteria), antifungal and anthelmintic activity. Some act as anti-parasitic agent- artemisinin an antimalarial of proven efficacy in humans²⁴. Recently three new Sesquiterpene glycosides isolated from *Dendrobium nobile* were reported for their immunomodulatory potential²⁵. During the present study Sesquiterpene lactones were found in non-polar fractions while remaining methanol fraction was devoid of these constituents. The activity of petroleum ether, benzene and chloroform fractions may therefore be attributed to the presence of such non-polar type of compounds. However, protection against cyclophosphamide myelosuppression was observed by only remaining methanol fraction, suggests the content of constituents other than sesquiterpenoids which were also responsible for increased humoral and cellular response.

The present investigation therefore reveals that flower heads of *S.indicus* certainly possess im-

frente a la bacteria Gram positiva), antifungales y antihelmínticas. Algunas lactonas, como el artesunato, actúan como agentes antiparasitarios, con una probada eficacia antimalaria en humanos. Recientemente, se ha demostrado el potencial inmunomodulador en tres nuevos glicósidos sesquiterpénicos aislados de *Dendrobium nobile*. Durante el presente estudio las lactonas sesquiterpénicas se encontraron en las fracciones no polares, mientras que la fracción de metanol sobrante carecía de estos constituyentes. Por tanto, es posible atribuir la actividad de las fracciones de éter de petróleo, benceno y cloroformo a la presencia de este tipo de compuestos no polares.

Sin embargo, la protección frente a la mielosupresión por ciclofosfamida se observó sólo en la fracción de metanol sobrante, lo que sugiere un contenido de constituyentes distintos de los sesquiterpenoides, que son los responsables del aumento de la respuesta celular y humoral. Por tanto, la presente investigación revela que las cabezas florales de *S.indicus* posee con certeza propiedades inmunomoduladoras. El mecanismo exacto de actuación, sin embargo, sólo se pudo desarrollar después de la caracterización detallada de la parte activa de las distintas fracciones. Se han tenido en cuenta los estudios en esta línea y se continuarán teniendo en cuenta en futuras investigaciones.

AGRADECIMIENTOS

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

munomodulatory properties. The exact mechanism of action, however, could only be unfolded after detailed characterization of active moieties from different fractions. Studies on these lines have already been taken up and shall follow in our future communications.

ACKNOWLEDGEMENT

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

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Wagner H and Proksh A. Immunostimulatory drugs of fungi and higher plants. In: Wagner H (editor) Economic and medicinal plant research. 1985, Vol I. Academic Press. London – New York. 113.
2. Atal CK, Sharma ML, Kaul A, Khajuria A. Immunomodulating agents of plant origin. I: Preliminary Screening J. Ethnopharmacol. 1986; 18: 133-141.
3. Sharma ML, Rao CS, Duda PL. Immunostimulator activity of *Picrorhiza* leaf extract. J. Ethnopharmacol. 1994; 41: 185-192.
4. Agrawal SS, Singh VK. Immunomodulators: A review of studies on Indian Medicinal Plants and Synthetic Peptides. Part-I: Medicinal Plants. Proc. Indian Natl. Sci. Acad. 1999; B (65): 179-204.
5. Thatte UM, Dahanukar SA. Rasayana concept: clues from immunomodulatory therapy In: Upadhyay SN (editor) Immunomodulation. 1997 Narosa Publishing House, New Delhi, 141.
6. Nadkarni KM. In: Indian Materia Medica. 1976; 3rd Edition. Popular Prakashan Vol.3, 1163.
7. Kokate CK. In: Practical Pharmacognosy. 1996; 1st Edition. Vallabh Prakashan: p. 110.
8. Gonda R, Tomoda M, Shimizu N, Kanari M. Characterization of an acidic polysaccharide from the seeds of *Malva verticillata* stimulating the phagocytic activity of cells of the RES. Planta Medica. 1990; 56: 73-76.

9. Manjarekar PN, Jolly CI, Narayanan S. Comparative studies of the immunomodulatory activity of *Tinospora cordifolia* and *Tinospora sinensis*. *Fitoterapia*. 2000; 71: 254-257.
10. Puri A, Saxena RP, Saxena KC, Srivastava V, Tandon JS. Immunostimulant activity of *Nyctanthes arbortristis* L. J. *Ethnopharmacol*. 1994; 42: 31-37.
11. Roitt I, Brostoff J, Male D. In: *Immunology*. 1993; 3rd Edition. London. 1: 7.
12. Benacerraf B. A hypothesis to relate the specificity of T lymphocytes and the activity of I region specific Ir genes in macrophages and Borrower lymphocytes. *J. Immunol*. 1978; 120: 1809-1832.
13. Waksman BH. Cellular hypersensitivity and immunity: Conceptual changes in the last decade. *Cell Immunol*. 1979; 42:155-169.
14. Poulter LW, Seymour GJ, Duke O, Janossy G and Panayi G. Immunohistological analysis of delayed-type hypersensitivity in man. *Cell Immunol*. 1982; 74:358-69.
15. Mitra SK, Gupta M, Sarma DNK. Immunomodulatory effect of IM-133 *Phytother. Res*. 1999; 13:341-343.
16. Thatte UM, Dahanukar SA. Comparative study of immunomodulating activity of Indian medicinal plants, Lithium carbonate and Glucan. *Ind. Expt. Clin. Pharmacol*. 1988; 10:639-644.
17. Davis L, Kuttan G. Suppressive effect of cyclophosphamide-induced toxicity by *Withania somnifera* extract in mice. *J. Ethnopharmacol*. 1998; Oct; 62(3): 209-214.
18. Supada R, Rojatkari Bhimsen A and Nagsampagi. 7-hydroxylated eudesmanolides from *Sphaeranthus indicus* Linn. *Phytochem*. 1992; 31(9): 3270-3271.
19. Gogte MG, Ananthasubramanian L, Nargund KS and Bhattacharya SC. Some interesting sesquiterpenoids from *Sphaeranthus indicus* Linn. *Indian J. Chem*. 1986; March, Vol. 25B: 233-238.
20. Chughtai MID, Khokhar I, Ahmad A. Isolation, purification and structural determination of alkaloids from the flowers of *Sphaeranthus indicus*. *Sci.Int. (Lahore)*. 1992; 4(2): 151-154.
21. Yadava RN, Kumar S. 7-Hydroxy- 3',4',5,6- tetramethoxy -flavone 7-O-β-D-(1→4)-diglucoside: a new flavone glycoside from the stem of *Sphaeranthus indicus* Linn. *J. Inst. Chemists (India)*. 1998; 70(5): 164-166.
22. Singh SK, Tripathi SV, Singh AK and Singh RH. An antimicrobial principle from *Sphaeranthus indicus* Linn. *Int. J. Crude Drug Res*. 1988; 26(4): 235-239.
23. Shekhani MS, Shah PM, Yasmin A, Siddiqui R, Parvin S, Khan KM, Kazmi SU and Atta-Ur-Rahman. An immunostimulant sesquiterpene glycoside from *Sphaeranthus indicus*. *Phytochem*. 1990; 29(8): 2573-2576.
24. Bruneton J. In: *Pharmacognosy: Phytochemistry Medicinal plants* 2nd edition. Lavoisier Publishing, France. 1999, 621.
25. Ye Q, Qin G, Zhao W. Immunomodulatory sesquiterpene glycosides from *Dendrobium nobile*. *Phytochem*. 2002; Dec; 61(8): 885-890.

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

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

BAFNA AR Y MISHRA SH*

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

*Dirección para correspondencia: Dr.S.H.Mishra. Pharmacy department, Faculty of Technology and Engineering, The M.S.University of Baroda, Vadodara-390002. Gujarat, India.

Correo electrónico:shmishra48@rediffmail.com

RESUMEN

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

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

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

INTRODUCCIÓN

Las evidencias experimentales sugieren que los radicales libres (RL) y las especies reactivas de oxígeno (ERO) pueden estar relacionadas con un gran número de enfermedades¹. Como las plantas producen gran cantidad de fracciones químicas que actúan como antioxidantes para controlar el estrés oxidativo causado por la radiación solar y el oxígeno, pueden servir de fuente para la obtención de nuevos compuestos antioxidantes. En la medicina *ayurveda*, un antiguo sistema medicinal indio, se utilizan, como una de las especialidades clínicas para la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades, un gran número de plantas medicinales que se consideran activas debido a su composición química y que se denominan '*Rasayana*'. *Rasayana* no es sólo una terapia farmacológica, sino un procedimiento especializado que se practica en forma de recetas rejuvenecedoras y regímenes dietéticos que promueven buenos hábitos. La finalidad de *rasayana* es doble: prevenir la enfermedad y contrarrestar el proceso de envejecimiento resultante de la optimización de la homeostasis². Sharma et al. han publicado la fuerte actividad antioxidante que presentan los fármacos *rasayana*³. En el sistema de medicina ayurvédica se han identificado como *rasayanas* unas 34 plantas⁴. Se han descrito diversas propiedades farmacológicas de estas plantas, inmunoestimulantes, tonificantes, neuroestimulantes, anti envejecimiento, antibacterianas, antivirales, antirreumáticas, anticancerígenas, adaptogénicas, anti estrés, etc. Algunas de estas plantas se han investigado específicamente por su bien demostrada actividad antioxidante.

Curculigo orchioides Gaertn (familia: Amaryllidaceae) es una pequeña hierba que crece en India en el Himalaya subtropical desde Kumaon hacia el este y en las montañas Ghats occidentales desde Konkan hacia el sur. Sus raíces tuberosas se consideran tónicas, curativas, emolientes, diuréticas y reconstituyentes⁵. En la medicina tradicional china se utilizan rizomas secos de *C. orchioides* como agente tonificante para el tratamiento del deterioro de la fuerza física⁶. Se ha publicado que tienen numerosos usos medicinales, y sus rizomas son un componente de varias preparacio-

INTRODUCTION

Experimental evidence suggests that free radicals (FR) and reactive oxygen species (ROS) can be involved in high number of diseases¹. As plant produce lot of chemical moieties as antioxidants to control oxidative stress caused by sunbeams and oxygen, these can serve as source of new antioxidant compounds. *Ayurveda*, an ancient Indian system of medicine, follow in prevention and treatment of various diseases a group of large number of medicinal plants which are considered active due to chemical constituents and are designated as '*Rasayana*' as one of the clinical specialties. *Rasayana* is not only a drug therapy but is a specialized procedure practiced in the form of rejuvenating recipes, dietary regimen promoting good habits. The purpose of *rasayana* is two-fold: prevention of disease and counteracting aging process, which result from optimization of homeostasis². Sharma et al. reported the strong antioxidant activity shown by *rasayana* drugs³. Around 34 plants are identified as *Rasayanas* in the *Ayurvedic* system of medicine⁴. These plants are described to possess various pharmacological properties such as Immunostimulant, Tonic, Neurostimulant, Anti-ageing, Anti-bacterial, Anti-viral, Anti-rheumatic, Anti-cancer, Adaptogenic, Anti-stress etc. Among these plants enlisted, some have been specifically investigated for their well demonstrated antioxidant activity.

Curculigo orchioides Gaertn. (Family: Amaryllidaceae) is small herb found in India in the sub tropical Himalayas from Kumaon eastwards and in the western ghats from konkan southwards. Its tuberous roots are considered tonic, alterative, demulcent, diuretic and restorative⁵. Dried rhizomes of *C. orchioides* are used in Chinese traditional medicine as a tonic agent for treatment of decline in physical strength⁶. It has been reported to have many medicinal uses, and rhizomes are a component of several *Ayurvedic* preparations⁷. It is claimed to be a medical cure for piles, asthma, jaundice, diarrhoea, colic, gonorrhoea and to be a aphrodisiac⁸.

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

nes ayurvédicas⁷. Se cree que es una cura médica para las hemorroides, el asma, la ictericia, la diarrea, los cólicos y la gonorrea, y se cree que es afrodisíaca⁸.

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

MÉTODOS

Material de la planta

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

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

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

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

METHODS

Plant material

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

TLC finger print profile of Methanol extract

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

In-vitro antioxidant activity:

Assay for antiradical activity with DPPH

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

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

Actividad antioxidante in vitro:

Estudio de la actividad antirradical con DPPH

La actividad antirradical se midió mediante el descenso en la absorbancia a 516 nm de una solución metanólica de 1, 1, difenil picril hidracina provocado por la muestra. Se preparó una solución de almacenamiento de DPPH disolviendo 4.4 mg en 3.3 ml de metanol. El medio de análisis incluye 150 ml de solución DPPH junto con distintas concentraciones de muestras en 3 ml de metanol. El blanco se realizó de la misma manera, sin añadir ninguna muestra. Después de 15 minutos, se registró el descenso en la absorbancia en presencia de la muestra. El IC_{50} se calculó como una reducción del 50% en la absorbancia ocasionada por la muestra en comparación con el blanco⁹. Como estándar se utilizó curcumina.

Estudio de la actividad de barrido de radicales de superóxido

El estudio se basó en la capacidad de la muestra para inhibir la formación de formazon azul mediante el barrido de los radicales superóxido generados en el sistema riboflavina-luz-azul de nitrotetrazolio (NBT). El medio de reacción contenía 2.5 ml de tampón fosfato (pH 7.6), 100 µl de riboflavina (20 µg), 200 µl de EDTA (12 mM), 100 µl de NBT (0.1 mg) y distintas concentraciones de muestra en 100 µl de metanol. Para iniciar la reacción, se iluminó la mezcla de reacción durante 5 minutos. La absorbancia se midió a 590 nm. El blanco se realizó de la misma manera, pero con 100 l de metanol en lugar de la sustancia de análisis. El IC_{50} se calculó como una reducción del 50% en la absorbancia ocasionada por la muestra en comparación con el blanco¹⁰. Como estándar se utilizó ácido ascórbico.

hydrazine brought about by sample. A stock solution of DPPH was prepared by dissolving 4.4 mg in 3.3 ml methanol. Test medium includes 150ml of DPPH solution along with different concentration of samples in 3 ml methanol. Blank was performed in the same way with no sample added. Decrease in absorbance, in presence of sample was noted after 15 minutes. IC_{50} was calculated as 50% reduction in absorbance brought about by sample compared with blank⁹. Curcumin was used as standard.

Assay for superoxide radical scavenging activity

The assay was based on capacity of the sample to inhibit blue formazon formation by scavenging the superoxide radicals generated in riboflavin-light-nitro blue tetrazolium (NBT) system. The reaction medium contains phosphate buffer (pH 7.6) 2.5 ml, 100µl riboflavin (20µg), 200µl EDTA (12mM), 100µl NBT (0.1 mg) and different concentration of sample contained in 100ml of methanol. The reaction was started by illuminating the reaction mixture for 5 minutes. The absorbance was measured at 590 nm. Blank was performed in the same way with 100ml of methanol instead of test substance. IC_{50} was calculated as 50% reduction in absorbance brought about by sample compared with blank¹⁰. Ascorbic acid was used as standard.

Assay for nitric oxide scavenging activity

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

Estudio de la actividad de barrido del óxido nítrico

El óxido nítrico se generó a partir de nitroprusiato de sodio y se midió mediante la reacción de Griess. El nitroprusiato de sodio en solución acuosa con pH fisiológico genera espontáneamente óxido nítrico, que reacciona con el oxígeno produciendo iones de nitrito que se pueden estimar mediante el reactivo de Griess. Los barredores de óxido nítrico compiten con el oxígeno, ocasionando una reducción en la producción de óxido nítrico. El nitroprusiato de sodio (5 mM) en solución salina de tampón fosfato se mezcló con distintas concentraciones de extractos de análisis disueltos en metanol e incubadas a temperatura ambiente durante 150 minutos. Se realizó el mismo proceso con el blanco sin muestra pero con la cantidad equivalente de metanol. Después se retiraron las soluciones de incubación y una cantidad igual de reactivo Griess (1% sulfanilamida, 2% H_3PO_4 y 0.1% naftiletildiamida). La lectura de absorbencia del cromóforo formado se realizó a 546 nm. El IC_{50} se calculó como una reducción del 50% en la absorbencia ocasionada por la muestra en comparación con el blanco¹¹. El estándar utilizado fue curcumina.

Determinación del poder reductor

El poder reductor del ME se determinó por el método de Oyaizu¹². Se mezclaron las muestras con 5 ml de tampón fosfato (2 M, pH 6.6) y 5 ml de ferrocianuro potásico (1%); a continuación, se incubó la mezcla a 50 °C durante 20 minutos, se añadieron 5 ml de ácido tricloroacético (10%) y se centrifugó la mezcla a 4000 r. p. m. Seguidamente, se mezclaron 5 ml de solución superior con 5 ml de agua destilada y 1 ml de cloruro férrico (0.1%). La absorbencia se midió a 700 nm. El aumento de absorbencia de la mezcla de reacción indicó un aumento de poder reductor. Como estándar se utilizó ácido ascórbico (0.3 mg).

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

El homogeneizado de hígado de rata se preparó homogeneizando el tejido en tampón Tris frío (10 mM, pH 7.4) en una concentra-

methanol was conducted in an identical manner. After incubation solutions were removed and equal amount of Griess reagent (1% sulphanilamide, 2% H_3PO_4 and 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride). The absorbance of the chromophore formed was read at 546nm. IC_{50} was calculated as 50% reduction in absorbance brought about by sample compared with blank¹¹. Standard used was Curcumin.

Determination of reducing power

The reducing power of ME was determined according to the method of Oyaizu¹². Samples were mixed with 5 ml phosphate buffer (2M, pH 6.6) and 5 ml potassium ferricyanide (1%), the mixture was then incubated at 50° C for 20 minutes, 5 ml trichloroacetic acid (10%) was added and the mixture was centrifuged at 4000 rev./ min. The upper 5 ml solution was then mixed with 5 ml distilled water and 1 ml ferric chloride (0.1%). The absorbance was measured at 700 nm. Increased absorbance of the reaction mixture indicated increased reducing power. Ascorbic acid (0.3 mg) was used as standard.

Measurement of effect on lipid peroxidation on rat liver homogenate

Rat liver homogenate was prepared by homogenizing the tissue in chilled Tris buffer (10mM, pH 7.4) at a concentration of 10% w/v; peroxidation was induced in liver tissue by Iron-ADP complex in the presence of ascorbic acid. The incubation medium constituted 0.5 ml of the liver homogenate (10% w/v), 100 μ M $FeCl_3$, 1.7 μ M ADP, 500 μ M of ascorbate and different concentrations of samples in 2 ml of total incubation medium. The medium was incubated for 20 min. at 37°C. Extent of lipid peroxidation was measured by estimation of malondialdehyde (MDA) content¹³. Results were expressed in terms of decrease in MDA formation by the sample extract. Ascorbic acid was used as positive control.

ción al 10% p/v; la peroxidación del tejido hepático se indujo mediante complejo hierro-ADP en presencia de ácido ascórbico. El medio de incubación constituía 0.5 ml del homogeneizado de hígado (10% p/v), 100 μ M de FeCl_3 , 1.7 μ M de ADP, 500 μ M de ascorbato y distintas concentraciones de muestras en 2 ml de medio de incubación total. El medio se incubó durante 20 min. a 37 °C. El grado de peroxidación lipídica se midió mediante la estimación del contenido de malondialdehído (MDA)¹³. Los resultados se expresaron en términos de descenso en la formación de MDA en el extracto de la muestra. Como control positivo se utilizó ácido ascórbico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La participación de especies de oxígeno reactivas en la etiología y fisiopatología de enfermedades humanas tales como trastornos neurodegenerativos, inflamación, infección viral, patologías autoinmunes y trastornos del sistema digestivo tales como inflamación gastrointestinal y úlcera gástrica, es ya evidente. Para comprender el papel de estas especies de oxígeno reactivas en diversos trastornos y el posible efecto protector antioxidante de los compuestos naturales en los tejidos afectados son cuestiones de gran interés en la actualidad. Inicialmente, es necesario investigar *in vitro* las propiedades antioxidantes de cualquier fármaco o producto natural antes de considerarlo una sustancia antioxidante, y realizar a continuación una evaluación de su función antioxidante en sistemas biológicos¹⁴.

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

Actividad antioxidante in vitro:

El DPPH es un radical libre estable en solución acuosa o de etanol y acepta un electrón o un radical hidrógeno para convertirse en una molécula diamagnética estable¹⁵. Para evaluar la potencia antioxidante mediante el barrido de radicales en las muestras del análisis, se registra la densidad óptica de los ra-

RESULTS AND DISCUSSION

The participation of reactive oxygen species in etiology and physiopathology of human disease, such as neurodegenerative disorders, inflammation, viral infection, autoimmune pathologies and digestive system disorders such as gastrointestinal inflammation and gastric ulcers is already evident. To understand role of these reactive oxygen species in several disorders and potential antioxidant protective effect of natural compounds on affected tissues are topics of high current interest. Initially it is necessary to investigate *in-vitro* antioxidant properties of any natural product or drug to consider it as an antioxidant substance, followed by evaluation of its antioxidant function in biological systems¹⁴.

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

In-vitro antioxidant activity:

DPPH is a stable free radical in aqueous or ethanol solution and accepts an electron or hydrogen radical to become a stable diamagnetic molecule¹⁵. In order to evaluate antioxidant potency through free radical scavenging with the test samples, the change in the optical density of DPPH radicals is monitored. Hence, DPPH $\cdot$ is usually used as a substrate to evaluate antioxidative activity of antioxidants¹⁶. Methanol extract showed a concentration dependent antiradical activity by inhibiting DPPH radical with an IC_{50} value of 105.99 μ g/ml (Table I). It showed two times less inhibitory activity on DPPH stable radical than standard Curcumin which showed IC_{50} at 52.71 μ g/ml.

dicales DPPH. Por ello, el DPPH se utiliza habitualmente como sustrato para evaluar la actividad antioxidante de los antioxidantes¹⁶. El extracto de metanol presentó una actividad antirradical dependiente de la concentración inhibiendo el radical DPPH con un valor IC₅₀ de 105.99 µg/ml (Tabla I). Su actividad inhibitoria fue dos veces menor en el radical DPPH estable que el estándar de curcumina, que presentó un IC₅₀ de 52.71 µg/ml.

TABLA I: Actividad antirradical del extracto de metanol de *C.orchioides* observada con DPPH.
TABLE I. Antiradical activity of methanol extract of *C.orchioides* observed with DPPH.

Muestras	Concentración (µg/ml)	% de inhibición	IC ₅₀ (µg/ml)
Extracto de metanol	25	4.503 ± 1.353	105.99
	50	15.613 ± 3.447	
	75	41.963 ± 2.153	
	100	67.563 ± 1.032	
	200	83.780 ± 0.341	
Curcumina			52.71

Los valores son la media ± E.S.M. de tres análisis replicados.
Values are mean ± S.E.M. of three replicate analyses.

Se sabe que el radical superóxido es muy perjudicial para los componentes celulares, como precursor de especies de oxígeno más reactivas¹⁷. El extracto de metanol demostró ser un barredor del radical superóxido generado en el sistema riboflavina-NBT-luz *in vitro*. El valor de IC₅₀ registrado fue de 29.28 µg/ml. La actividad barredora del superóxido del extracto fue comparable a la del estándar de ácido ascórbico, que presentó un valor de IC₅₀ de 23.52 µg/ml (Tabla II).

Superoxide radical is known to be very harmful to cellular components as precursor of more reactive oxygen species¹⁷. Methanol extract was found as scavenger of superoxide radical generated in riboflavin-NBT-light system *in-vitro*. IC₅₀ value was found 29.28 µg/ml. Superoxide scavenging activity of extract was comparable with standard ascorbic acid which showed IC₅₀ value 23.52 µg/ml (Table II).

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

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

Muestras	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	% de inhibición	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
Extracto de metanol	10	23.13 $\pm$ 0.680	29.28
	20	47.93 $\pm$ 0.527	
	30	50.61 $\pm$ 0.236	
	40	60.82 $\pm$ 1.244	
	50	71.43 $\pm$ 1.178	
Ácido ascórbico			23.52

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

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

Además de las especies de oxígeno reactivas, el óxido nítrico también está implicado en condiciones de inflamación, cáncer y otras patologías¹⁸. El extracto de metanol presentó una actividad moderada en el barrido del óxido nítrico, en comparación con el estándar de curcumina (Tabla III).

In addition to reactive oxygen species, nitric oxide is also implicated in inflammation, cancer and other pathological conditions¹⁸. Methanol extract showed moderate activity in scavenging nitric oxide compared to standard Curcumin (Table III).

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

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

Muestras	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	% de inhibición	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
Extracto de metanol	60	43.28 $\pm$ 2.21	90.96
	80	47.40 $\pm$ 2.56	
	100	50.69 $\pm$ 1.00	
	120	56.68 $\pm$ 1.09	
	140	65.82 $\pm$ 1.20	
Curcumina			21.59

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

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

La medición de la capacidad reductiva se realizó mediante transformación de Fe^{3+} - Fe^{2+} en presencia de extracto de metanol y de estándar antioxidante, ácido ascórbico¹². El poder reductor se asocia a la actividad antioxidante. Como se indica en la Tabla IV, el extracto de metanol presentó un poder reductor comparable al estándar a una concentración más elevada, de 15 mg/ml.

The measurement of reductive ability was done by Fe^{3+} - Fe^{2+} transformation in the presence of methanol extract and standard antioxidant, ascorbic acid¹². The reducing power is associated with antioxidant activity. As shown in Table IV, methanol extract showed reducing power comparable with standard at higher concentration i.e. at 15 mg/ml.

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

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

Muestra	Poder reductor de distintas concentraciones (mg/ml).			
	0.0	5.0	10.0	15.0
Extracto de metanol	0.028 ± 0.01	0.105 ± 0.13	0.258 ± 0.26	0.363 ± 0.10

Los valores son la media ± E.S.M. de tres análisis replicados.
Como estándar se utilizó ácido ascórbico (0.3 mg), con una lectura de 0.430 a 700 nm.
Values are mean ± S.E.M. of three replicate analyses.
Ascorbic acid (0.3 mg) was used as standard, giving a reading of 0.430 at 700 nm.

La peroxidación lipídica se inicia con el ataque de los radicales libres a los ácidos grasos insaturados, y se propaga mediante un ciclo de reacción en cadena¹⁹. Como los ácidos grasos insaturados son los componentes más importantes de las membranas biológicas y aportan propiedades deseables a la fluidez de la estructura de la membrana celular, la peroxidación de los ácidos grasos insaturados en las membranas biológicas lleva a la aparición de trastornos en la estructura y el funcionamiento de la membrana²⁰. En concreto, el O_2^- y el OH inducen diversos daños en los órganos circundantes y desempeñan una papel esencial en algunos trastornos clínicos. Por tanto, la eliminación de O_2^- y OH es la defensa más eficaz del organismo vivo contra la enfermedad²¹. Todos los compuestos, naturales o sintéticos, que tengan propiedades antioxidantes pueden aliviar total o parcialmente estos daños. En el presente estudio, el extracto de metanol demostró una fuerte inhibición de la

Lipid peroxidation is initiated by radicals attacking unsaturated fatty acids, and propagated by a chain reaction cycle¹⁹. Since unsaturated fatty acids are most important components of biological membranes and impart desirable properties upon the fluidity of cellular membrane structure, the peroxidation of unsaturated fatty acids in biological membranes leads to disruption of membrane structure and function²⁰. In particular O_2^- and OH induce various injuries to the surrounding organs and play a vital role in some clinical disorders. Therefore removal of O_2^- and OH is the most effective defense of the living body against disease²¹. Any compound —natural or synthetic— with antioxidant properties might totally or partially alleviate this damage. In the present study methanol extract showed potent inhibition of lipid peroxidation induced by Iron/ADP/Ascorbate complex in rat liver homogenate, IC_{50} value was 94.78 µg/ml. It showed dose dependent inhibition of lipid

peroxidación lipídica inducida por el complejo hierro/ADP/ascorbato en homogeneizado de hígado de rata. El valor de IC_{50} fue 94.78 $\mu\text{g/ml}$. La inhibición de la peroxidación lipídica era dosisdependiente. El estándar de ácido ascórbico presentó un valor de IC_{50} de 30.05 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla V).

peroxidation. Standard ascorbic acid showed IC_{50} value 30.05 $\mu\text{g/ml}$ (Table V).

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

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

Muestras	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	% de inhibición	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Extracto de metanol	25	14.24 $\pm$ 0.77	94.78
	50	24.33 $\pm$ 0.75	
	75	39.93 $\pm$ 0.42	
	100	51.14 $\pm$ 1.06	
	125	67.57 $\pm$ 1.08	
Ácido ascórbico			30.05

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

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

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

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

TABLA VI: Perfil de huella de TLC del extracto de metanol de *C. orchioides*.
TABLE VI. TLC finger printing profile of methanol extract of *C. orchioides*.

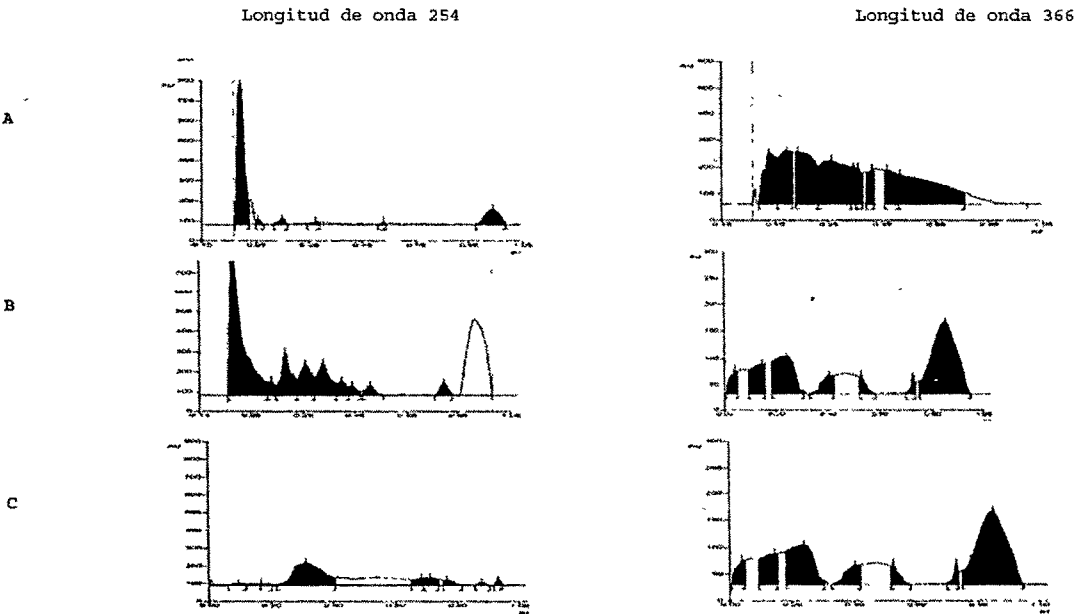
Analizado a	Sistema de disolvente 1			Sistema de disolvente 2			Sistema de disolvente 3		
	Rf	$\lambda_{\text{máx}}$	Porcenta je relativo	Rf	$\lambda_{\text{máx}}$	Porcenta je relativo	Rf	$\lambda_{\text{máx}}$	Porcenta je relativo
254 nm	0.03*	297	76.18	0.13	289	51.32	0.12	700	2.16
	0.09	409	1.63	0.16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

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

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

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

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



Las investigaciones fitoquímicas de *C. orchioi*des revelaron la presencia de un nuevo triterpenoide pentacíclico²⁵. Se ha comunicado la presencia de cuatro glucósidos fenólicos, identificados como curculigósido, glucósido de orcinol, curculigina A y corquiósido^{26,27}. Además de estos constituyentes, se han detectado también glucósidos de tipo cicloartano y sus glucósidos²⁸. Estudios recientes demuestran que ciertos productos de las plantas incluyen sustancias fenólicas, como flavonoides y taninos. Estas sustancias antioxidantes naturales tienen normalmente una fracción fenólica en su estructura molecular. Se han detectado entre flavonoides, tocoferoles y catequinas. Los ácidos orgánicos, carotenoides, hidrolizados de proteínas y taninos pueden actuar como antioxidantes o tener efectos sinérgicos cuando se utilizan conjuntamente con antioxidantes fenólicos. Los antioxidantes fenólicos tienen un gran poder destructor de radicales libres²⁹. Los compuestos fenólicos, componentes biológicamente activos, son los principales agentes que pueden donar oxígeno a los radicales libres y de esta forma romper la cadena de la oxidación lipídica en el primer paso de iniciación. Este elevado potencial de los compuestos fenólicos para el barrido de radicales se puede deber a sus grupos hidroxilo fenólicos³⁰. La actividad del extracto de metanol puede deberse a la presencia de glucósidos fenólicos. Sin embargo, el mecanismo exacto de actuación sólo se puede determinar tras la caracterización detallada de las fracciones activas del extracto.

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

AGRADECIMIENTOS

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

Phytochemical investigations on *C. orchioi*des revealed the presence of a novel pentacyclic triterpenoid²⁵. Four phenol glycosides have been reported and identified as curculigoside, orcinol glucoside, curculigine A and corchioside^{26,27}. Along with these constituents cycloartane type glycosides and their glycosides also reported²⁸. Recent studies showed that a number of plants products include polyphenolic substances such as flavonoids and tannins. Those natural antioxidative substances usually have a phenolic moiety in their molecular structure. They have been found among flavonoids, tocopherols and catechines. Organic acids, carotenoids, protein hydrolysates and tannins can act as antioxidants or have synergistic effects when used together with phenolic antioxidants. Phenolic antioxidants are potent free radical terminators²⁹. Phenolic compounds, biologically active components, are the main agents that can donate hydrogen to free radicals and thus break the chain reaction of lipid oxidation at the first initiation step. This high potential of phenolic compounds to scavenge radicals may be explained by their phenolic hydroxyl groups³⁰. The activity of methanol extract may be due to presence of phenolic glucosides. The exact mechanism of action, however, could only be unfolded after detailed characterization of active moieties from extract.

It may be concluded that the free radical scavenging activity of methanol extract of *C.orchioi*des may follow one of the above mechanisms in exhibiting its effectiveness in traditional medicine. Further *in-vivo* studies on evaluation of drug are warranted. Studies on these lines have already been taken up and shall follow in our future communications.

ACKNOWLEDGEMENT

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

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

- Richards RT, Sharma HM. Free radicals in health and disease. *Ind.J.Clinical Practice*. 1991; 2 (7): 15-26.
- Scartezzini P, Speroni E. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. *J.Ethnopharmacol*. 2000; 71: 23-43.
- Sharma HM, Hanna AN, Kauffman EM, Newman HAI. Inhibition of human low density lipo-protein oxidation in vitro by Maharishi Ayurveda herbal mixtures. *Pharmacol. Biochem. and Behavior*. 1992; 43: 1175-1182.
- Sharma PV. Translation: Charka Samhita, Chikitsothana. 1981; Vol. II, 1st edition. Chaukhambha Orientalia, Varanasi.
- Anonymous. Wealth of India. 1950; Vol.2. CSIR. New Delhi, India. 400.
- Jiangsu College of New Medicine. Dictionary of China Traditional Medicine. 1979; People's Press. Shanghai. 1363.
- Venkateshwarly J, Bhairavmurthy Rao PN. Flora of Vishakhapatnam. 1973; 191.
- Kirtikar KR, Basu BD. Indian medicinal plants. 1935; Vol II. Leader Press. Allahabad, India. 2469.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 26: 1199-1200.
- Beuchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Anal.Biochem*. 1971; 44: 276-277.
- Sreejayan, Rao MNA. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J.Pharm.Pharmacol*. 1997; 49: 105-107.
- Oyaizu M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn J. Nutr*. 1986; 44: 307-315.
- Slater TF, Sawyer BC. The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other halosenoalkanes on peroxidative reactions in rat liver fractions in vitro. *Bin-Item. J*. 1971; 123:805-814.
- Repetto MG, Llesuy SF. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcer. *Braz.J.med.Biol.Res*. 2002; 35(5):523-534.
- Soares JR, Dinis TCP, Cunha AP, Ameida LM. Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Rad. Res*. 1997; 26: 469-478.
- Duh PD, Tu YY, Yen GC. Antioxidant activity of water extract of harng jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebensm.-Wiss.u-Technol*. 1999; 32: 269-277.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. In: Free radicals, ageing and disease. *Free radicals in Biology and Medicine*. 1985; 2nd edition. Clarendon Press. Oxford. 279-315.
- Marletta MA. Nitric oxide: Biosynthesis and biological significance. *Trends Biol.Sci*. 1989; 14: 488-492.
- Shimazaki H. Antioxidants. In: Niki E, Shimazaki, H, Mino, M (eds), *Free radicals and biological defense*. 1994; Japanese Science Societies Press. Tokyo. 45-57.
- Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage: Protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J*. 1987; 1: 441-445.
- Lin JM, Lin CC, Chen MF. Scavenging effects of *Mallotus repandus* on active oxygen species. *J. Ethnopharmacol*. 1995; 46:175-181.
- Indian Herbal Pharmacopoeia. 1998; Vol. I and II. RRL Jammu Tawi and IDMA Mumbai, India.
- Houghton PJ. Pharmacognosy: the basis for quality herbal medicinal products. *Pharm. News*. 1999; 6(4): 21-27.
- Shah SA, Ravishankara MN, Nirmal A, Shishoo CJ, Rathod IS, Suhagia BN. Estimation of individual sennosides in plant materials and marketed formulations by HPTLC method. *J. Pharm. Pharmacol*. 2000; 52: 445-449.
- Mehta BK, Gawarikar R. Characterization of novel triterpenoid from *Curculigo orchioides* Gaertn. *Ind.J.Chem*. 1991; 30(B): 986-988.
- Kubo M, Nagamoto M, Nagao T, Nakanishi J, Uno, Nishimura H. A new phenolic glycoside, curculigoside from rhizomes of *Curculigo orchioides*. *Planta medica*. 1983; 47: 52-55.
- Garg SN, Misra LN, Agarwal SK. Corchioside A, an orcinol glycoside from *Curculigo orchioides*. *Phytochem*. 1989; 28(6): 1771-1772.
- Xu JP, Xu RS. Cycloartane-type sapogenins and their glycosides from *Curculigo orchioides*. *Phytochem*. 1992; 31(7): 2455-2458.
- Shahidi F, Wanasundara PKJPD. Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutrit*. 1992; 32: 67-103.
- Sawa T, Nakao M, Akaike T, Ono K, Maeda H. Alkylperoxyl radical scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: Implications for the antitumor promoter effect of vegetables. *J. Agric. Food Chem*. 1999; 47: 397- 492.

Journal of ETHNOPHARMACOLOGY

Dr Pulok K. Mukherjee

School of Natural Product Studies

Department of Pharmaceutical Technology, Jadavpur University, Kolkata - 700032, India
Tel. +91-33-24146046 (O) Fax +91-33-24146046 E-mail pknatprod@yahoo.co.in
Tel +91-33-24298313 (R) Fax +91-33-24146046 E-mail natprodpk@yahoo.com

Ref. No. PKM/170/12/04/VP2076
Kolkata, June 25, 2005

To
Dr. S. H. Mishra
Department of Pharmacy
Faculty of Technology and Engineering
The M S University of Baroda
Kalabhavan, Baroda-390001, Gujrat, India

MS. No. VP 2076

Dear Dr. Mishra

Thank you for your revised manuscript entitled "Immunostimulatory effect of methanol extract of *Curculigo orchioides* on immunosuppressed mice" authored by Bafna A. R., Mishra S. H., submitted to the *Journal of Ethnopharmacology* [JEP].

It is my pleasure to inform you that your manuscript has been accepted for publication and sent to the publisher to be printed. Your interest on JEP and kind support for our journal is really appreciated.

Thanking you,

With my best regards,



Pulok K Mukherjee

Associate Editor

Journal of Ethnopharmacology