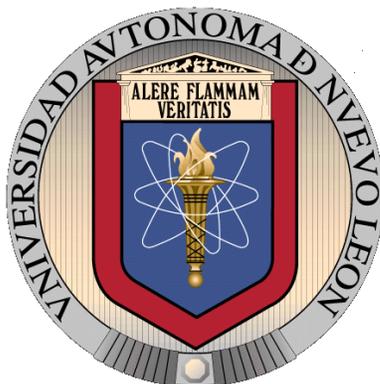


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



AISLAMIENTO DIRIGIDO A LA IDENTIFICACION DE
COMPUESTOS ANTIRRADICALES Y/O QUIMIOPREVENTIVOS

DE Hedeoma drummondii y Spirulina maxima

Por

JOSÉ EZEQUIEL VIVEROS VALDEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Acentuación en Química de Productos Naturales

Julio, 2009

AISLAMIENTO DIRIGIDO A LA IDENTIFICACION DE COMPUESTOS
ANTIRRADICALES Y/O QUIMIOPREVENTIVOS DE
Hedeoma drummondii y *Spirulina maxima*

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
Acentuación en Química de Productos Naturales

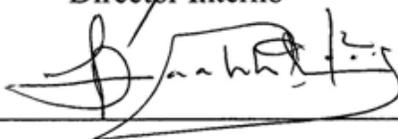
Por

JOSÉ EZEQUIEL VIVEROS VALDEZ

COMISIÓN DE TESIS:



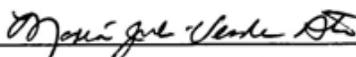
Dra. Catalina Rivas Morales
Director Interno



Dra. Pilar Carranza Rosales
Director Externo



Dra. Azucena Oranday Cárdenas
Secretario



Dra. Maria Julia Verde Star
Vocal



Dra. Delia Elva Cruz Vega
Vocal

ASLAMIENTO DIRIGIDO A LA IDENTIFICACION DE COMPUESTOS

ANTIRRADICALES Y/O QUIMIOPREVENTIVOS DE

Hedeoma drummondii y *Spirulina maxima*

Por

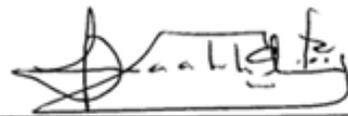
José Ezequiel Viveros Valdez

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la **Dra. Catalina Rivas Morales** del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL y la **Dra. Pilar Carranza Rosales** de la División de Biología Celular y Molecular del CIBIN-IMSS.



Dra. Catalina Rivas Morales

Director Interno



Dra. Pilar Carranza Rosales

Director Externo

DEDICATORIA

A **Dios** por dejarme ser y estar.

A mis padres:

Yolanda Guadalupe Valdez Almaguer y José Ezequiel Viveros Camacho

Por su ejemplo, por todo.

A mis compañeros de vida, mis hermanos:

Yolanda Magdalena y Víctor Enrique

A mi familia y amigos

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que de forma directa y/o indirecta contribuyeron en la realización de este proyecto, ya que en la investigación como en la vida diaria las colaboraciones más que necesarias son indispensables para enriquecer y aumentar la calidad de las mismas.

De forma particular quiero agradecer a la Dra. Catalina Rivas Morales por la oportunidad que me brindo de continuar estudiando en el área de productos naturales, pero sobre todo agradezco la confianza que ha depositado en mí. Muchas gracias.

De igual forma me gustaría agradecer a la Dra. Pilar Carranza Rosales quien ha sido parte importante en mi formación académica, por el apoyo y consejos que me brindo siempre de manera sincera, pero sobre todo por la amistad que me ha obsequiado. Muchas gracias.

No podría dejar pasar este momento para agradecer al Dr. Guillermo Schmeda Hirschmann, por la gran ayuda que de forma desinteresada pero a la vez constante me brindo, mi mas sincero agradecimiento.

Al distinguido y apreciado comité de tesis: Dra. Azucena Oranday Cárdenas, Dra. María Julia Verde Star y Dra. Delia Elva Cruz Vega, quienes con sus acertados consejos contribuyeron en la realización de este proyecto. Gracias.

Quiero agradecer a la Dra. Sandra Mendoza Díaz quien contribuyo de forma muy importante en este trabajo, sin otro incentivo que la cooperación y formación académica, esa ayuda desinteresada fundamental en cualquier investigación. Muchas gracias.

Al Dr. Jorge Castro Garza por sus acertadas críticas y sugerencias mismas que contribuyeron a un mejor trabajo. Gracias.

A la Dra. Eufemia Morales Rubio y M.C. Jaime Treviño Neaves, quienes con la amabilidad que les caracteriza, me abrieron las puertas para integrarme de manera externa a su grupo de trabajo. Muchas gracias.

A todo el personal técnico y de apoyo de los distintos laboratorios con los que he tenido oportunidad de convivir, gracias por compartir su consejos, sugerencias y “trucos”, con especial cariño para la Dra. Yesenia Silva Belmares, QBP Consuelo Coronado y los Químicos Irene Manríquez Rebolledo y Sergio Reyes Avila.

A todos mis amigos que obviaré sus nombres por temor a omitir alguno, a todos los que son, parecen y se hacen, gracias por su ánimo, sugerencias y apoyo.

A TODOS. Gracias.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Quiero agradecer las becas CONACYT (191633) e IMSS (99203880), que me fueron otorgadas; mi más sincero reconocimiento y agradecimiento a dichas instituciones.

Así mismo a los proyectos PAICYT /UANL (CA1717-07) y al programa de investigación en productos bioactivos de la Universidad de Talca por el financiamiento para la realización de este proyecto.

A las instituciones, departamentos y laboratorios que me recibieron y apoyaron:

Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, (Departamento de Química).

Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social, (División de Biología Celular y Molecular).

Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Querétaro, (Lab. de Fitoquímica de Nutracéuticos).

Instituto de Química de Recursos Naturales de la Universidad de Talca, (Lab. Química de Productos Naturales).

Gracias.

*“Las ciencias tienen las raíces amargas,
pero muy dulces los frutos”
Aristóteles*

*“Nada pasa, todo queda.
nada es efímero, nada es fugaz”
Guadalupe Amor*

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
Lista de Tablas	I
Lista de Figuras	II
Nomenclaturas	III
1. RESUMEN	1
1. ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. ANTECEDENTES	
3.1 Radicales libres y estrés oxidativo	5
3.1.1 Radicales libres y Cáncer	11
3.1.2 Carcinogénesis y estrés oxidativo	13
3.2 Agentes Quimiopreventivos	14
3.3 <i>Hedeoma drummondii</i> (Poleo)	18
3.4 <i>Spirulina maxima</i> (Espirulina)	19
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
5. HIPÓTESIS	22
6. OBJETIVO GENERAL	22
6.1 Objetivos Específicos	23
7. MATERIAL Y MÉTODOS	
7.1 Material Biológico	24
7.1.1 Poleo (<i>Hedeoma drummondii</i> L.)	24
7.1.2 Espirulina (<i>Spirulina maxima</i> O.)	25
7.1.3 Líneas Celulares	25
7.1.4 Hamsters dorados	26
7.2 Extracción del Material Vegetal	26
7.2.1 Pruebas Químicas	27
7.2.3 Contenido de Fenoles y Flavonoides	28
7.3 Evaluación de la Actividad Antirradical	29

	7.3.1 Actividad reductora (Ensayo FRAP)	29
	7.3.2 Secuestro del radical ABTS	29
	7.3.3 Captura del radical DPPH	30
	7.4 Aislamiento Dirigido	30
	7.4.1 Identificación de Compuestos	31
	7.5 Evaluación de la Actividad Antiproliferativa	32
	7.5.1. Ensayo MTT	32
	7.5.2. Ensayo WST-1	33
	7.6 Determinación del Efecto Antigenotóxico	33
	7.7 Análisis Estadístico	35
	7.7.1 Variables de Estudio	35
	7.7.2 Análisis descriptivo	35
	7.8 Estrategia Experimental	37
8.	RESULTADOS	
	8.1 Estudio Fitoquímico	38
	8.2 Determinación de la Actividad Antirradical	39
	8.3 Fraccionamiento Dirigido	40
	8.4 Estructuras de los Compuestos Identificados	46
	8.5 Efecto Antiproliferativo	49
	8.6 Efecto Antigenotóxico	52
9.	DISCUSIÓN	54
10.	CONCLUSIONES	62
11.	PERSPECTIVAS	63
12.	LITERATURA CITADA	64
13.	APÉNDICES	
	13.1 Espectros de los Compuestos Identificados	81
	13.2 Resumen Curricular	86
	13.3 Artículos ISI	87

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla		
I	Redimiendo y tamizaje fitoquímico preliminar.....	38
II	Contenido de fenoles totales, flavonoides totales y actividad Antirradical.....	40
III	Condiciones de corrida para las subfracciones de MHD.....	44
IV	Actividad antirradical y antiproliferativa de <i>H. drummondii</i>	50
V	Actividad antirradical y antiproliferativa de <i>S.maxima</i>	51

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Radical trifenilmetil.....	5
2.	Generación de RLS durante el metabolismo energético.....	6
3.	Producción de RLS como barrera de defensa.....	7
4.	Donador de electrones (antioxidantes).....	8
5.	Alteraciones causadas por RLS.....	10
6.	Modificación de guanina por RLS.....	11
7.	Mecanismos inductores de cáncer mediados por RLS.....	12
8.	Estructura química de diversos quimioprotectores.....	15
9.	Blancos molecular de los quimiopreventivos.....	17
10.	Fotos de <i>Hedeoma drummondii</i>	24
11.	Fotos de <i>Spirulina máxima</i>	25
12.	Curvas de estándares para flavonoides y fenoles totales.....	39
13.	Curvas de estándares de los ensayos DPPH, ABTS y FRAP...	41
14.	Cromatoplaqa de las fracciones	42
15.	Cromatógrama de la subfraccion B.....	42
16.	Cromatógrama de la subfraccion D.....	43
17.	Cromatógrama de la subfracción aromática.....	44
18.	Diagrama del estudio fitoquímico de <i>H. drummondii</i>	45
19	Ensayo de WST-1.....	51
20.	Escala de daño al DNA.....	52
21.	Cometa obtenido a 15 μ M de HgCl ₂	52
22.	Actividad protectora	53
23.	Cometas formados en rebanadas	53

NOMENCLATURAS

Abs	Absorbancia
ADN	Acido desoxirribonucléico
°C	Grados Celsius
d	Doblete (dato en RMN)
dd	Doble Doblete (dato en RMN)
δ	Desplazamiento químico
μ l	Micro Litro (10^{-6} litro)
μ M	Micro Molar (10^{-6} Molar)
EtOAc	Acetato de etilo
DAD	Detector con arreglos de diodos
DCM	Diclorometano
CLAR	Cromatografía de Alta Resolución
g	Gramo
h	Hora
Kg	Kilogramo
L	Litro
MeOH	Metanol
μ g	Microgramos
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar

mg	Miligramo (10^{-3} Gramo)
mL	Mililitro
M	Molar
mM	Milimolar
min	Minuto
m	Multiplete (En datos de RMN)
nm	Nanómetro
ppm	Partes por millón
pH	Potencial de Hidrógeno
Rf	Retention factor
RMN	Resonancia magnética nuclear
s	Singlete (dato en RMN)
t_R	Tiempo de retención

1. RESUMEN

Los radicales libres (RLS) resultan del metabolismo de la célula así como de procesos extracelulares. Los RLS ejercen algunas funciones necesarias para el mantenimiento de la homeostasis celular. Cuando estos se producen en cantidades superiores a las normales, pueden dañar al ADN lo cual se ha implicado en mutagénesis y carcinogénesis. Estudios científicos sugieren que muchos fitoquímicos dietéticos pueden desempeñar papeles importantes como agentes quimiopreventivos en la prevención de muchas enfermedades, incluyendo el cáncer.

El propósito de este estudio fue realizar un aislamiento dirigido a la identificación de compuestos antirradicales y/o quimiopreventivos de los extractos metanólicos de *Spirulina maxima* y *Hedeoma drummondii*. Para determinar la actividad antirradical se utilizaron los análisis de reducción de DPPH y de ABTS y el análisis de poder antioxidante férrico reductor (FRAP), también fue determinado el contenido de fenoles y flavonoides totales. El extracto metanólico de *H. drummondii* demostró el efecto antirradical más eficiente. El fraccionamiento dirigido del extracto crudo permitió la identificación de tres compuestos activos identificados como los ácidos: clorogénico, rosmarínico y caféico.

La actividad antiproliferativa de los extractos crudos de ambas especies fue examinada en líneas celulares de cáncer de mama y cervicouterino (MCF-7 y HeLa, respectivamente) y una línea celular normal (Vero), todos los extractos demostraron selectividad contra las células tumorales, nuevamente, el extracto metanólico de *H. drummondii* fue el más activo; el extracto crudo, las fracciones polares y los compuestos antirradicales de este exhibieron citotoxicidad significativa.

El efecto antigenotóxico de los compuestos antirradicales fue investigado usando el análisis de cometa en rebanadas de riñón de hámster. A concentraciones no citotóxicas los ácidos fenólicos (AF) previnieron el daño al ADN inducido por estrés oxidativo.

En conclusión, los AF aislados de *H. drummondii* protegen eficientemente al ADN contra la genotoxicidad inducida por el HgCl₂ e inhiben el crecimiento de las células cancerosas probadas. El efecto quimiopreventivo de los AF puede estar relacionado con su capacidad antirradical.

1. ABSTRACT

The free radicals (FRS) result from cell metabolism as well as from extracellular processes. FRS exerts some functions necessary for cell homeostasis maintenance. When produced in excess they can damage to the DNA which has been implied in mutagenesis and carcinogenesis. Scientific studies suggest that many dietary phytochemicals may play important roles as chemopreventive agents in prevention of many diseases, including cancers.

The purpose of this study was to realise an isolation directed to the identification of the antiradical and/or chemopreventive compounds of the methanolic extracts from *Spirulina maxima* and *Hedeoma drummondii*, in order to determine the antiradical activity was used the DPPH and ABTS reduction assays and the ferric reducing-antioxidant power (FRAP) assay, total phenolic and flavonoid content were determined too. The MeOH extract from *H. drummondii* showed the most efficient free radical scavenging effects. The assay-guided fractionation of the crude extract allowed the identification of three major active constituents identified as: chlorogenic, caffeic and rosmarinic acid.

The antiproliferative activity from crude extracts of both species were examined in cancer cell lines of mama and cervix (MCF-7 and HeLa, respectively) and a normal cell line (Vero), all extracts showed selectivity against tumor cell lines, again, the methanolic extract of *H. drummondii* was the most active; the crude extract, polar fractions and antiradical compounds of these, exhibited significant cytotoxicity.

The antigenotoxic effect of antiradicals compounds were investigated using the comet assay in precision cut hamster kidney slices. At non cytotoxic concentrations of the phenolics acids (PA) prevented the DNA damage induced by oxidative stress.

In conclusion, the PA isolation from *Hedeoma drummondii* efficiently protects DNA against genotoxicity of HgCl₂ damage and inhibited the growth of cancer cell lines probed. The chemopreventive effects of PA it is may be relation whit your radicals scavenging capacity.

2. INTRODUCCIÓN

Un radical libre es una especie química que tiene en su estructura uno o más electrones desapareados, lo que lo convierte en un compuesto altamente inestable y con gran capacidad de formar otros radicales libres por reacciones químicas en cadena (Halliwell, 1993, Ballester, 1996). Los radicales libres se sintetizan fisiológicamente en el organismo humano como parte del metabolismo energético, la reducción parcial de la molécula de oxígeno puede generar especies reactivas de oxígeno como el hidroperóxido de hidrógeno (H_2O_2), superóxido (O_2^-), hidroperóxilo (HO_2) e hidroxilo ($\cdot OH$) (Hogg, 1998); los óxidos de nitrógeno: óxido nítrico ($\cdot ON$) y dióxido nítrico (NO_2) son asimismo radicales libres (Lancaster, 2006). La definición de radical libre también incluye los metales de transición cuando éstos tienen electrones desapareados (Gutteridge *et al.*, 1982; Simpson *et al.*, 1988). A concentraciones moderadas y dada su corta existencia los radicales libres pueden desempeñar un importante papel como mediadores en la regulación de varios procesos fisiológicos, sin embargo, frente a agresiones externas tales como infecciones, ejercicio físico extremo, dietas desequilibradas, tóxicos alimentarios y/o contaminantes ambientales, los radicales libres tienden a incrementarse (Dröge, 2002, Sundaresan *et al.*, 1995). Esto los hace notablemente peligrosos para el organismo ya que dañan la mayoría de los constituyentes celulares y compuestos bioquímicos (Cross *et al.*, 1987); el daño a los ácidos nucleicos incluye modificaciones en las bases nitrogenadas, formación de aductos entre bases y azúcares, uniones entre timina y tirosina, roturas de la hebra de ADN y enlaces cruzados con otras moléculas (Beckman y Ames 1998). Si el estrés oxidativo es excesivo y los sistemas de reparación del ADN son insuficientes, se pueden dañar la actividad celular a nivel de metabolismo y de expresión génica y así producir mutagénesis y finalmente carcinogénesis (Lee *et al.*, 2004).

Por otra parte, los alimentos consumidos por los humanos pueden contener diferentes antioxidantes naturales que pueden contribuir al refuerzo de las defensas naturales del organismo. Así, los efectos beneficiosos derivados del consumo de dietas ricas en alimentos vegetales han sido atribuidos principalmente a las vitaminas antioxidantes, los carotenoides y particularmente, a los compuestos fenólicos (Lampe, 1999; Prior, 2003). Los antioxidantes pueden proteger directa o indirectamente a las células contra los efectos adversos de numerosas drogas y sustancias carcinogénicas. Tienen una gran capacidad para disminuir la carga de radicales libres en el organismo y desempeñan una importante función para la prevención de numerosas patologías como problemas cardiovasculares, enfermedades degenerativas e incluso el proceso de envejecimiento (Bendich, 1990).

El té y las infusiones herbales son una fuente importante de compuestos fenólicos en la dieta, sin embargo, su investigación se han centrado principalmente a las distintas presentaciones de té negro y verde obtenidos a partir de *Camellia sinensis* (Cooper *et al.*, 2005a,b). Recientemente, se han comenzado a estudiar los extractos obtenidos de otros tés herbales; la mayor parte pertenecientes a la familia de las Lamiaceae (Dimitrios, 2006), dentro de esta gran familia, en el noreste de México destaca *Hedeoma drummondii* (poleo), utilizada como condimento y como te herbal; de manera tradicional el poleo es utilizado para combatir los resfriados, la tos y como relajante (Vestal, 1952; Rogers, 1980; González- Ferrara, 1998; Sánchez, 1981; Estrada *et al.*, 2007), en investigaciones previas se ha demostrado su actividad antimicrobiana y antioxidante (Cantú- Cabello, 2001; Viveros- Valdez, 2004). Otra especie mexicana que en los últimos años ha llamado fuertemente la atención es *Spirulina maxima*, microalga que ha sido consumida desde tiempos de los Aztecas y que ha mostrado gran potencial en el área de la salud, ya que ha sido comprobada su actividad como antiinflamatorio, antioxidante, antiviral, etc y su nula toxicidad en modelos murinos (Miranda *et al.*, 1998; Chamorro *et al.*, 2002; Hernández-Corona *et al.*, 2002). Dado el potencial de dichas especies nos planteamos comenzar un estudio dirigido a compuestos bioactivos antirradicales, que prevengan o retarden la aparición de enfermedades degenerativas como el cáncer.

3. ANTECEDENTES

3.1 Radicales libres y estrés oxidativo

El concepto de radicales libres se originó en el siglo antepasado, cuando por primera vez los químicos orgánicos observaron que ciertos grupos de átomos dentro de una molécula, durante las reacciones químicas, parecían saltar de una molécula a otra. Cuando un radical se salía de una molécula, llegaba a ser libre, de allí su nombre. En el año 1900, el químico Moisés Gomber descubrió el primer radical libre, el radical trifenilmetil mostrado en la figura 1 (Petruševski y Najdoski, 2004).

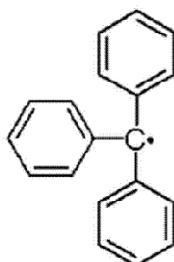


Figura 1. Radical trifenilmetil

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado por lo que son muy reactivos ya que tienden a secuestrar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica, con base en esta definición, son radicales libres la molécula de oxígeno, el átomo de hidrógeno y los metales de transición (Halliwell, 1993; Gutteridge *et al.*, 1982). Una vez que el radical libre ha conseguido el electrón que necesita para aparear su electrón libre, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre, por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena. La vida biológica media del radical libre es de microsegundos; pero tiene la capacidad de

reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a las moléculas y a las membranas celulares (Sieck, 2004).

Los radicales libres son resultado de los procesos fisiológicos propios del organismo, como el metabolismo de los alimentos (figura 2), la respiración, el ejercicio o bien generados por factores ambientales como la contaminación industrial, el tabaco, la radiación, medicamentos, aditivos químicos y pesticidas (Halliwell, 1993; Ballester, 1996; Abdollahi *et al.*, 2004).

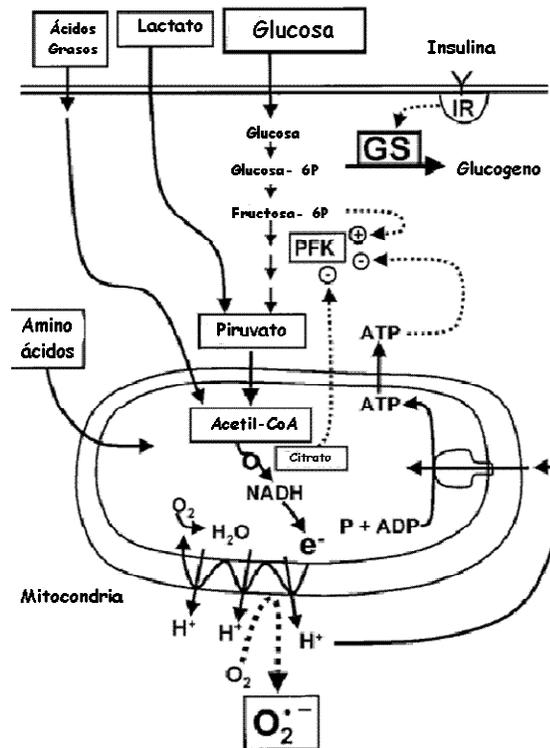


Figura 2. Generación de RLS durante el metabolismo energético (Dröge, 2002).

Los radicales libres juegan un papel fisiológico clave en la homeostasis, como es el caso del óxido nítrico sintetizado por la enzima óxido nítrico sintasa. El óxido nítrico participa en la relajación muscular, el control del tono vascular y varias otras funciones que dependen de la guanosina monofosfato cíclico (GMPc). El superóxido (O_2^-) formado por la oxidasa NADPH controla la producción de eritropoyetina, participa en la relajación del músculo liso y en la transducción de señales de varios receptores membranales que activan funciones inmunes (El-Benna *et al.*, 2005; Lancaster, 2006).

Los radicales libres (óxidos de nitrógeno) son generados y utilizados por células como los neutrófilos, los monocitos, los macrófagos, los eosinófilos y los fibroblastos para eliminar organismos extraños como bacterias y virus (figura 3). En la síntesis de prostaglandinas, también se utilizan radicales libres, del mismo modo que en la síntesis del colesterol y las hormonas esferoidales (Dröge, 2002).

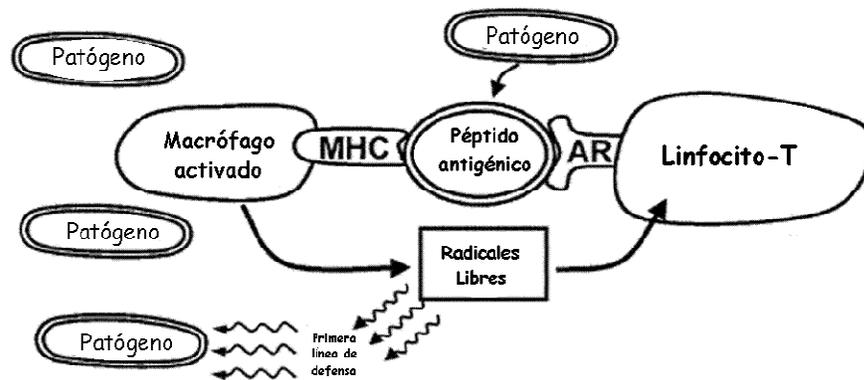


Figura 3. Papel de los RLS en la respuesta inmune frente a patógenos ambientales como barrera de defensa (Dröge, 2002).

Las células han desarrollado mecanismos que las protegen del efecto nocivo de los radicales libres con base en un complejo sistema de defensa constituido por los agentes antioxidantes. Así, cuando se incrementa la producción de radicales libres, se activan mecanismos antioxidantes para controlar y estabilizar el ambiente redox intra o extracelular (Matés, 2000). Los antioxidantes se definen como aquellas sustancias que en bajas concentraciones, retardan o previenen la oxidación. Al interactuar con el radical libre, el antioxidante cede un electrón y se oxida (figura 4). Los antioxidantes que se encuentran naturalmente en el organismo y en ciertos alimentos pueden bloquear parte de este daño debido a que estabilizan los radicales libres (Pietta, 2000).

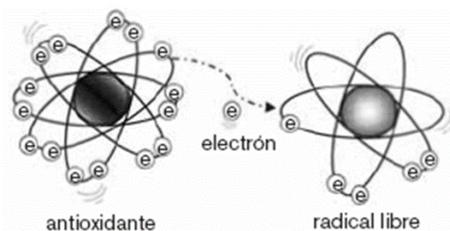


Figura 4. Un antioxidante es un donador de electrones que neutraliza o estabiliza a los radicales libres (Velázquez- Paniagua *et al.*, 2004).

Los antioxidantes pueden clasificarse en base a su fuente de obtención (García- Bacallao *et al.*, 2001):

- Antioxidantes endógenos: Se producen mediante mecanismos enzimáticos del organismo (superóxidodismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión y la coenzima Q-). Algunas de estas enzimas necesitan cofactores metálicos como selenio, cobre, zinc y magnesio para poder realizar el mecanismo de protección celular.
- Antioxidantes exógenos: son introducidos por la dieta y se depositan en las membranas celulares impidiendo la lipoperoxidación (vitaminas E y C, carotenos etc).

O en base a su forma de actuar (Velázquez- Paniagua *et al.*, 2004):

Antioxidantes primarios: estos previenen la formación de nuevos radicales libres, convirtiéndolos en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar, o evitando la formación de radicales libres a partir de otras moléculas. Algunos ejemplos:

- Las superóxido dismutasas (SODs) son una clase de las enzimas cercanamente relacionadas que catalizan el pasaje del anión de superóxido en peróxido de oxígeno y de hidrógeno, Las enzimas superóxido dismutasa contienen iones metálicos como cofactores que, dependiendo de la isoenzima, pueden ser cobre, zinc, manganeso o hierro (Bannister *et al.*, 1987).

- Las catalasas son enzimas que catalizan la conversión del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno usando hierro o manganeso como cofactor, Esta proteína se localiza en los peroxisomas de la mayoría de las células eucariotas (Chelikani *et al.*, 2004).

- El sistema del glutatión incluye glutatión, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa y glutatión S-transferasa, estas contiene cuatro cofactores de selenio que catalizan la ruptura del peróxido de hidrógeno y de hidroperóxidos orgánicos que convierte el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y los peróxidos lipídicos en moléculas inofensivas antes de que formen radicales libres (Meister, 1988).

- Las proteínas que se unen a metales y limitan la disponibilidad de hierro necesario para formar el radical OH•, en el caso de la tiorredoxina consiste en dos cisteínas vecinas, altamente conservadas que puede ciclar entre una forma activa del ditiol reducida y la forma oxidada del disulfuro. En su estado activo, la tiorredoxina actúa como un agente de reducción eficiente removiendo especies reactivas del oxígeno y manteniendo otras proteínas en su estado reducido (Arnér y Holmgren, 2000).

Antioxidantes secundarios: estos capturan los radicales libres evitando la reacción en cadena. Algunos ejemplos:

- La vitamina E o alfa-tocoferol.
- La vitamina C o ácido ascórbico.
- El beta-caroteno.
- El ácido úrico.
- La bilirrubina.
- La albúmina.
- La melatonina.
- Los estrógenos.

Antioxidantes terciarios reparan el daño causado a las biomoléculas dañadas por los radicales libres o bien eliminan aquellas que se han estropeado. Algunos ejemplos:

- Las enzimas reparadoras del Ácido Desoxirribonucleico (ADN) como las endonucleasas, exonucleasas, las metionina sulfóxido reductasa etc.

Como ya se ha demostrado los radicales libres se utilizan para gran cantidad de procesos fisiológicos, desde el crecimiento y proliferación hasta la diferenciación y muerte celular. Debido a su relevancia en la fisiología celular y a la gran cantidad de condiciones que alterna la producción y regulación de los radicales, se ha advertido que muchas de las patologías humanas tiene su origen en una alteración del balance o de la regulación de dichos radicales (Finkel y Holbrook, 2000). Cuando la producción de radicales libres aumenta en forma descontrolada y supera a las barreras antioxidantes se genera estrés oxidativo implicado en daño celular, bioquímico y molecular (figura 5).

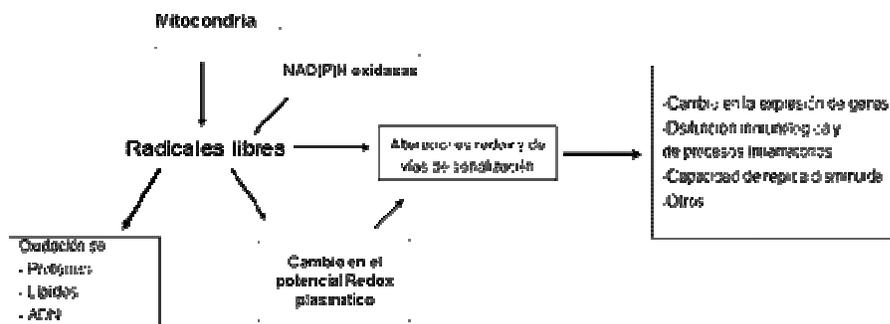


Figura 5. Alteraciones causadas por RLS.

Diversas enfermedades crónicas se han relacionado con el estrés oxidativo entre ellas (Dröge, 2002; Königsberg- Fainstein, 2008):

- Aterosclerosis: Peroxidación de lípidos en las partículas de LDL
- Cáncer: Daño del ADN.
- Cataratas: Modificaciones irreversibles en las proteínas.
- Cuadros Inflamatorios Crónicos: Activación de genes relacionados con la respuesta inflamatoria.
- Enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer etc): Los radicales libres atacan a las neuronas produciendo la oxidación de lípidos, proteínas y ADN, lo que se traduce en la muerte neuronal.

3.1.1 Radicales libres y Cáncer

Desde el punto de vista celular y molecular, un tejido canceroso presenta varias características comunes, como lo son incremento en la proliferación y autonomía celular, deficiencia en la apoptosis, diferenciación y metabolismo alterado, inestabilidad genómica, inmortalización celular y por último, metástasis e invasión. Los factores de riesgo reconocidos para el desarrollo de neoplasias incluyen los factores hereditarios o genéticos y ambientales ya sea químicos, físicos, biológicos o bien por alteraciones fisiológicas (Konigsberg- Fainstein, 2008).

La tasa de mutaciones celulares, en condiciones normales, es baja, pero, se incrementa cuando los genes y proteínas que detectan y reparan al ADN dañado son inactivados. Se sabe que los mecanismos celulares encargados de la eliminación de estos “errores” se encuentran inhibidas o atenuadas en las células tumorales. Por lo que la supervivencia de las células mutadas y el posible sobrecrecimiento de estas poblaciones se relaciona con el desarrollo y propagación de cáncer (Matés y Sánchez-Jiménez, 2000).

En relación con lo anterior, los radicales libres dañan de forma severa al ADN, por ejemplo es bien conocido que el $^1\text{O}_2$, (ONOO-) y el $\text{OH}\cdot$ interaccionan con las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos siendo el producto principal la 8-hidroxi guanina (8-OH-G) (figura 6), la cual puede hacer puentes de hidrogeno con una adenina en vez de una citosina y la 8- hidroxia adenina con guanina en vez de timina, si bien este es el principal mecanismo mediante el cual los radicales libres dañan el ADN, existen otro blancos como lo son: daño a las azucares, entrecruzamiento del ADN y ruptura de la cadena (Valko *et al.*, 2006).

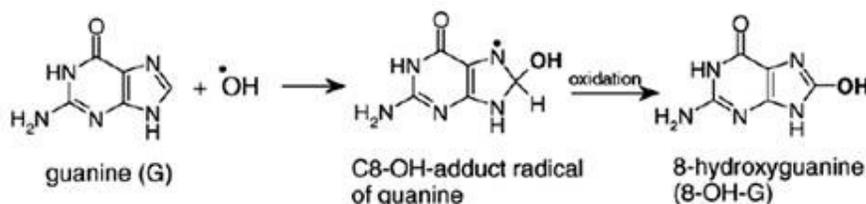


Figura 6. Modificación de guanina por RLS (Valko *et al.*, 2006).

La modificación química directa al ADN es solo uno de los mecanismos a través de los cuales el estrés oxidativo genera mutaciones. Por ejemplo se sabe que la oxidación de lípidos genera productos como malondialdehído y aldehídos insaturados, que se pueden unir al ADN para generar aductos mutagénicos, mientras que el daño oxidativo a las ADN polimerasas y enzimas reparadoras de ADN puede disminuir y/o retardar el proceso de reparación lo que llevaría a un aumento de errores en la replica del ADN conduciendo a mutaciones puntuales, las cuales pueden activar oncogenes e inactivar genes supresores de tumores y en consecuencia, el inicio de neoplasias y tumores ver figura 7 (Matés y Sánchez-Jiménez 2000; Valko *et al.*, 2004, 2005, 2006).

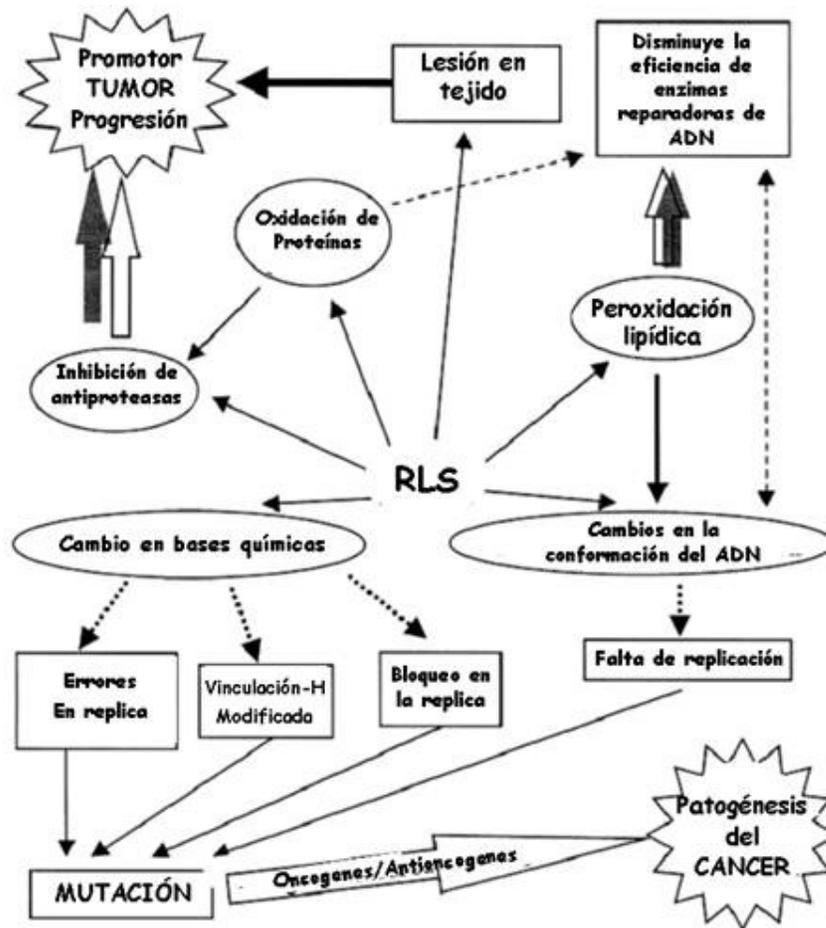


Figura 7. Mecanismos inductores de cáncer mediados por RLS (Matés *et al.*, 2002).

Por lo anterior es fundamental una regulación celular eficiente. En los últimos años se ha estudiado como estas regulaciones son afectadas por el estrés oxidativo,

enfocándose en diversos procesos celulares involucrados en la transcripción, duplicación, recombinación y reparación del daño al DNA. Una regulación epigenética eficiente logra una división celular libres de errores, permitiendo así la estabilidad genómica y una transmisión correcta de generación en generación celular (Valko *et al.*, 2005; Konigsberg- Fainstein, 2008).

3.1.2 Carcinogénesis y estrés oxidativo.

Una vez que se ha iniciado la modificación oxidativa del ADN, los radicales libres toman mayor relevancia como moduladores de la promoción de los tumores. Básicamente, la promoción tiene que ver con la activación de las vías de señalización que controlan la proliferación celular, ciclo celular, apoptosis o síntesis de proteínas de protección, como lo son las proteínas antioxidantes o las de choque térmico (Valko *et al.*, 2004).

Los radicales libres no solo intervienen en la formación y promoción de tumores, se ha observado que también juegan un rol en la inducción de metástasis, ya que las vías más importantes para la diseminación de las células cancerosas, son los vasos sanguíneos y linfáticos; el ataque por radicales libres a las células endoteliales causa la liberación de proteasas que pueden con posterioridad, degradar la membrana basal. Esta acción se asocia con la generación de compuestos químicos que atraen a las células tumorales. En estudios experimentales se ha observado un aumento del número de células tumorales retenidas por la pared vascular y su migración hacia el subendotelio después de la acción de radicales de oxígeno (oxigenación hiperbárica), cuatriplicándose el número de metástasis obtenidas (Malins *et al.*, 1996; Hussain *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2006).

Así mismo, la angiogénesis constituye uno de los procesos de gran significación en el desarrollo y posterior difusión de las células tumorales. Los radicales libres generados durante los breves episodios de hipoxia-reoxigenación de las células del endotelio microvascular humano, causan la activación del factor de transcripción nuclear (NF-Kappa B), acelerando significativamente el grado de morfogénesis tubular o neovascularización que define este proceso (Das, 2002).

3.2 Agentes Quimiopreventivos

Las hipótesis sobre la participación de las radicales libres en numerosas patologías, entre ellas el cáncer, ha condicionado que muchos investigadores propongan el uso de los antioxidantes como tratamiento (Kelloff *et al.*, 1996), tal vez la evidencia más contundente en cuanto a la relevancia de estos agentes (glutación, catalasas, vitaminas y compuestos fenólicos) sea el efecto protector que han demostrado experimentalmente al actuar en la inhibición del inicio, promoción y propagación del cáncer (Conney, 2003).

La evidencia epidemiológica sugiere que el consumo de frutas y verduras reduce el riesgo de cáncer y enfermedad cardiovascular. La hipótesis es que esto se debe a la presencia de compuestos denominados como antioxidantes dietarios, que protegerían al organismo de las enfermedades crónicas (Prior, 2003).

El término “quimiopreención” se refiere en oncología a la utilización de fármacos, productos naturales, nutrientes u otras sustancias biológicas para inhibir, disminuir o revertir la carcinogénesis, y que pueden ser aplicados en cualquier momento del proceso carcinogénico incluyendo el tratamiento a pacientes que han superado con éxito el tratamiento de un tumor maligno primario, pero que están con riesgo de sufrir una recaída (Kelloff *et al.*, 1996, 2006). Estas sustancias se utilizan en oncología como coadyuvantes a las terapias clásicas, como radio y quimioterapia, ya que mejoran la eficacia terapéutica, y muestran menor toxicidad (Sarkar y Li, 2006; Bode *et al.*, 2006).

Una de las áreas más prometedoras para el desarrollo de quimiopreventivos se fundamenta en la posibilidad de modular los sistemas de óxido-reducción (redox) y antioxidantes del organismo (Roberfroid 2002). Por esta razón, en la actualidad muchos tratamientos alternativos tienen como finalidad incrementar el aporte de antioxidantes naturales en la dieta. En este contexto, la adición de extractos vegetales ricos en compuestos fenólicos ha sido propuesta como una estrategia factible en el campo de investigación y desarrollo de nuevos compuestos bioactivos aislados y concentrados para su uso como suplementos, alimentos nutracéuticos o funcionales (Larrosa *et al.*, 2002; Psczcola, 2003).

Recientes investigaciones sugieren que combinado las terapias convencionales para tratar el cáncer (radioterapia, quimioterapia, etc.) con quimioprotectores dietéticos [p.e genisteína, indole-3-carbinol (I3C), curcumina, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), resveratrol, etc] (figura 8) conllevan a un tratamiento mucho más eficaz y específico, los compuestos dietéticos ejercen actividades antitumorales regulando diversos caminos de señalización de la célula. Por lo tanto, combinando con terapias comunes pudieran ejercer una acción sinérgica además de disminuir la toxicidad sistémica causada por quimioterapias o radioterapias al disminuir las dosis y/o frecuencia de estas (Sarkar y Li, 2006; 2007).

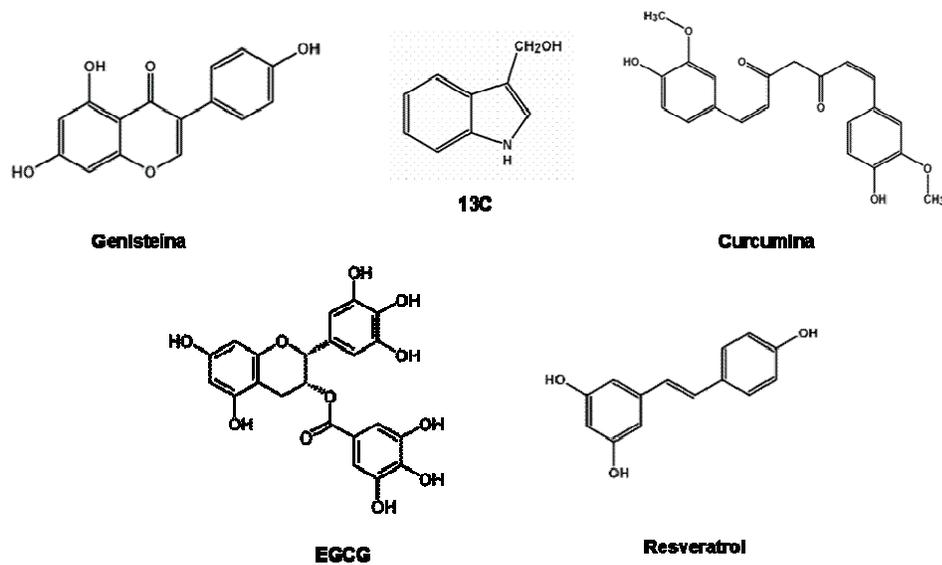


Figura 8. Estructura química de diversos quimioprotectores.

En relación con la anterior se ha demostrado que un pretratamiento con genisteína (15 a 30 μ M) potencializa el efecto inhibitorio de los antineoplásicos de uso común como el cisplatino, docetaxol, doxorubicina y gemcitabina contra células cancerosas de próstata, mama, páncreas y pulmón (Li *et al.*, 2005). Hwang *et al.*, (2005) reportaron que la combinación de la genisteína con 5- fluorouracil (5-FU) indujeron un efecto apoptótico sinérgico en células HT-29 de cáncer de colon fármaco resistentes, Tanos *et al.*, (2002) demostraron que la genisteína (1 a 10 μ g/mL) inhibe el crecimiento displásico y malignidad epitelial de células de cáncer

de mama además de mostrar un efecto sinérgico/aditivo junto con el tamoxifen, así mismo, se observó que la genisteína y sus isoflavonas análogas protegieron del daño inducido por el tamoxifen mediado por P450.

La curcumina otro quimioprotector ha mostrado efecto sinérgico inhibiendo el crecimiento celular de cáncer colorrectal (Lev-Ari *et al.*, 2005), también incrementó el efecto antitumoral del cisplatino, doxorubicina y taxol en células de cáncer hepático (HA22T/VGH), cérvico (HeLa) y ovárico (SKOV3) (Chan *et al.*, 2003; Notarbartolo *et al.*, 2005). El quimioprotector EGCG también mostró efecto sinérgico junto con el tamoxifen esto en células de cáncer de mama MDA-MB-231 (Chisholm *et al.*, 2004), también se ha demostrado que el resveratrol aislado de las uvas puede sensibilizar a células de linfoma no-Hodgkin y mielomas múltiples para su tratamiento con paclitaxel (Jazirehi y Bonavida, 2004), así mismo otros compuestos aislados de las uvas, las proantocianidinas pueden contribuir al efecto antineoplásico de la desoxirubicina en células de mama (K562/DOX) fármaco resistentes (Zhang *et al.*, 2005). Los compuestos de tipo 13C aislados de crucíferas, han demostrado mejorar la actividad del cisplatino y tamoxifen en células de próstata (PC-3) y mama (MCF-7) (Cover *et al.*, 1999). Estos resultados demuestran claramente el potencial que poseen los compuestos dietéticos al reforzar el potencial de las terapias antitumorales clásicas.

Los mecanismos moleculares por los cuales los agentes quimiopreventivos efectúan un efecto sinérgico/aditivo antitumoral podrían estar, en parte, relacionado con la regulación del factor nuclear B, Akt y ciclooxigenasa-2 (COX-2), que desempeñan papeles importantes en la supervivencia de la célula (figura 9). Los agentes de quimiopreventivos podrían también sensibilizar a las células cancerosas a apoptosis regulando varias moléculas importantes (es decir, Bcl-2, Bcl-XL, caspasas, p21^{WAF1}, etc.) en el camino apoptótico (Sarkar y Li, 2006).

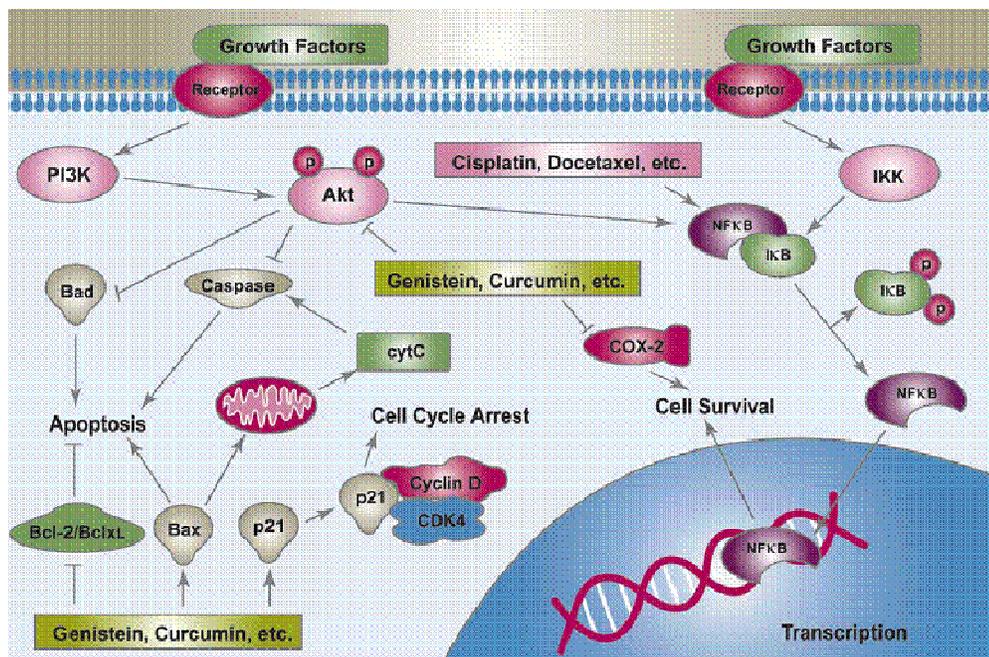


Figura 9. Blancos moleculares de los quimiopreventivos (Sarkar *et al.*, 2006).

El efecto antimutagénico de los polifenoles presentes en las plantas, se han relacionado con su capacidad para inhibir enzimas activadoras de carcinógenos y de inducir enzimas antioxidantes (Conney, 2003). Se ha demostrado que dosis elevadas de quercetina y rutina (50-100 microM) aumentan la concentración de glutatión y la expresión de superóxido dismutasa Cu/Zn e inhiben la actividad de catalasa en células HepG2. Todas las dosis de quercetina y rutina disminuyeron las especies reactivas de oxígeno, mientras que los polifenoles disminuyeron la concentración de malondialdehído, lo cual sugiere cambios favorables en el sistema de defensa antioxidante (Alia *et al.*, 2006). Por otro lado, compuestos oxidantes fénolicos produjeron cambios en la expresión de los genes p53, p300, Apaf-1, NF-kBp50 y p65 de la línea tumoral LNCaP, dando como resultado la inhibición en el crecimiento de estas células (Narayanan *et al.*, 2002).

Debido a la posibilidad real que existe de encontrar nuevos compuestos bioactivos aislados de productos naturales, nos propusimos estudiar a *Hedeoma drummondii* y *Spirulina maxima*, conocidas comúnmente como poleo y espirulina respectivamente, las cuales son dos especies consumidas en México, consideradas candidatas para la búsqueda de quimiopreventivos.

3.3 *Hedeoma drummondii* (Poleo)

Pertenece a la familia Lamiaceae que también es conocida como labiadas o plantas aromáticas, comprende 200 géneros y 3.200 especies, son dicotiledóneas, sus flores tienen corolas bilabiadas, simétricas y bilaterales poseen cinco pétalos y el ovario súpero está compuesto por dos carpelos fusionados, sus hojas son simples, opuestas y decusadas, sin estípulas. Dentro de esta gran familia existen géneros que han sido poco investigados, tal es el caso del género *Hedeoma*; este género comprende alrededor de 43 especies de hierbas perennes y subarborescentes distribuidas desde Canadá hasta Uruguay (Irving, 1980),

La familia Lamiaceae ha sido intensamente investigada por sus propiedades antioxidantes lo cual está en relación con su contenido de compuestos fenólicos (flavonoides, taninos, ácidos fenólicos etc), muchas especies pertenecientes a esta familia son utilizadas con fines medicinales y/o gastronómicos, dentro de estas destaca el estudio de especies utilizadas comúnmente por la población mexicana como: “albahaca” (*Ocimum basilicum* L.), “orégano” (*Origanum vulgare* L.), “tomillo” (*Thymus vulgaris* L.), “menta” (*Mentha piperita* L.), “romero” (*Rosmarinus officinalis* L.) y “salvia” (*Salvia officinalis* L.), Zgórk y Główniak, (2001).

Hedeoma drummondii es una especie endémica de Norteamérica, es pequeña, aromática y con olor característico a menta, tiene hojas enteras opuestas, tallo erguido así como flores color lavanda en las axilas de las hojas superiores (Estrada *et al.*, 2007). Se consume en forma de té, para combatir los resfriados y la tos, como calmante y relajante nervioso (González- Ferrara, 1979; Sánchez, 1981). Es utilizada por nativos americanos como condimento en sopas y para el tratamiento de dolores y resfriados (Vestal, 1952; Rogers, 1980) A pesar de que esta especie es ampliamente utilizada por la población del noreste de México; solamente se han realizado estudios locales donde destaca en una investigación de plantas antioxidantes del noreste de México (Cantú- Cabello, 2001), así como por su actividad bactericida (Viveros-Valdez, 2004). Su investigación fitoquímica se ha enfocado a la caracterización de su aceite esencial, este se caracteriza por su alto contenido de pulegona y mentol (Firmage, 1981).

3.4 *Spirulina maxima* (Espirulina)

S. maxima es un alga filamentosa unicelular que contiene abundante cantidad de proteínas, vitaminas, aminoácidos, minerales y otros nutrientes (Chamorro *et al.*, 2002). Se considera como "el alimento del futuro" en países donde la alimentación tradicional no proporciona en cantidad suficiente y equilibrada los factores necesarios para la salud (Belay, 2002).

La espirulina ha atraído la atención debido a que se ha comprobado que posee actividad antioxidante. Manoj *et al.* (1991) reportaron que el extracto alcohólico inhibió la peroxidación lipídica hasta en un 65%, en comparación con antioxidantes sintéticos tales como α -Tocoferol (35%), BHA (45%) y β -caroteno (48%). En otro estudio se encontraron dos fracciones en el extracto acuoso de *Spirulina sp.*, que poseen capacidad para capturar radicales hidroxilados a bajas concentraciones, inhibiendo además la oxidación de lípidos (Zhi-gang *et al.*, 1997). Mientras que Miranda *et al.*, (1998) demostraron que los extractos metanólicos de *S. maxima* poseen actividad antioxidante *in vivo* e *in vitro*; estas propiedades se atribuyen principalmente a su contenido de ácidos grasos omega-3 y omega-6, betacaroteno, α -tocoferol, ficocianina, compuestos fenólicos y a un complejo denominado CA-Spirulan (CA-SP) (Chamorro *et al.*, 2002).

Se ha demostrado mediante experimentos tanto *in vivo* como *in vitro* su inocuidad y efectividad en el tratamiento de algunos tipos de alergias, anemia, cáncer, hepatotoxicidad, inmunodeficiencias, enfermedades virales y procesos inflamatorios además de reducir el daño genotóxico inducido por hidrazida del ácido maleico y por ciclofosfamida (Salazar *et al.*, 1998; Chamorro *et al.*, 2002; Ruiz-Flores *et al.*, 2003; Chamorro-Cevallos *et al.*, 2008).

Torres- Durán *et al.*, (1998) determinaron que los triglicéridos hepáticos en ratas tratadas con tetracloruro de carbono fueron significativamente más bajos cuando se les administró una dieta de *S. maxima* con respecto a ratas no tratadas con esta alga. Hernández- Corona *et al.*, (2002) demostraron la actividad antiviral del extracto acuoso de *S. maxima* al inhibir el crecimiento del virus del Herpes simplex

tipo-2 el virus de la pseudorabia, el citomegalovirus humano y Herpes simplex tipo-1. Otros autores intoxicaron ratones con benzo- α -pireno y 7,12 dimetilbenzo- α -antraceno y establecieron que *S. platensis* induce actividad de enzimas de fase II, implicadas en la destoxicación de compuestos carcinogénicos, pero también, y de manera significativa, de enzimas antioxidantes (Dasgupta *et al.*, 2001).

Existe un número creciente de indicadores que sugieren efectos anticancerígenos de los carotenoides presentes en *Spirulina sp.* Este es el caso, de la actividad sobre tumores epiteliales orales inducidos experimentalmente con 7,12-dimetilbenz- α -antraceno (DMBA) (Schwartz *et al.*, 1987). La protección contra el cáncer ha sido atribuida a los componentes con actividad antioxidante, entre los que se encuentra el β -caroteno, uno de los principales carotenoides implicados en el sistema de defensa contra los radicales libres (Fedkovic, *et al.*, 1993).

Es muy probable que *Spirulina sp.* promueva mecanismos de quimioprotección, tales como la inducción de la capacidad celular para reparar el daño en el DNA, así como aumento en la actividad antioxidante a través del atrapamiento de radicales libres y otros mecanismos celulares y extracelulares (De Flora, 1997).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

Un número cada vez mayor de estudios epidemiológicos han demostrado la estrecha relación que existe entre el consumo de antioxidantes tales como flavonoides, carotenoides y glucosinolatos con la disminución de factores de riesgo de contraer cáncer, enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades crónicas. Debido a que la prevención de enfermedades crónicas constituye una mejor estrategia que su tratamiento, reducir el riesgo de enfermedades se ha convertido en una prioridad en los sistemas de salud de todos los países. Una de las herramientas más prometedoras para este fin es el uso de agentes quimiopreventivos. Considerando que el cáncer es una de las principales causas de mortalidad en nuestro país, y que las terapias antineoplásicas son poco selectivas, así como generadoras de estrés oxidativo que complican su tratamiento o bien desencadenan otras patologías; consideramos que es importante investigar compuestos bioactivos a partir de especies tales como *Hedeoma drummondii* (Poleo) y *Spirulina maxima* (Espirulina) que pudiera prevenir y/o retardar la aparición de cáncer, o bien que actúen sinérgicamente con los antineoplásicos de primera línea una vez detectado el cáncer. Las especies aquí planteadas son consumidas por la población mexicana y poseen potencial para la búsqueda de compuestos bioactivos, sin embargo los estudios científicos acerca de sus actividades biológicas y aislamiento de compuestos activos son escasos. Por lo cual proponemos una búsqueda sistemática a la identificación de los compuestos antirradicales/antioxidantes que pudieran inhibir el crecimiento de células de cáncer de mama y cervicouterino y al mismo tiempo proteger del daño inducido por estrés oxidativo.

5. HIPÓTESIS

Hedeoma drummondii y *Spirulina maxima* presenta actividad antirradical y poseen actividad antineoplásica selectiva hacia células cancerosas.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antirradical y antineoplásica de extractos de *Hedeoma drummondii* y *Spirulina maxima* e identificar el o los compuestos activos.

6.1 Objetivos Específicos

1. Obtener los extractos polares (metanólicos) de *Hedeoma drummondii* y *Spirulina maxima* mediante maceración con agitación continua.
2. Identificar la presencia o ausencia cualitativa de grupos funcionales en los extractos crudos mediante reacciones químicas específicas, con la finalidad de dar una idea preliminar sobre el potencial de cada uno de los extractos.
3. Cuantificar el contenido de fenoles y flavonoides totales presentes en los extractos crudos mediante extrapolación con curvas estándares, el contenido de ambos grupos químicos está estrechamente relacionado con su actividad antirradical/antioxidante dado la estereoquímica que caracteriza a estos grupos para la donación de protones.
- 4.- Evaluar la actividad antirradical de los extractos mediante las técnicas de aceptación de protones ABTS y DPPH, así como su poder reductor mediante el

ensayo FRAP, el uso de estas técnicas permitirá elegir al candidato idóneo para el posterior fraccionamiento e identificación de compuestos activos.

5.- Fraccionar el extracto óptimo, dirigido a compuestos que neutralicen al radical libre DPPH, esto mediante particiones liquido/liquido y técnicas cromatográficas como CC, CCD y CLAR.

6.- Identificar el o los compuestos antirradicales mediante la comparación de sus datos espectrofotométricos de ultravioleta (UV) y de resonancia magnética nuclear (RMN) con los obtenidos en bases de datos.

7.-Determinar el efecto del extracto, particiones y compuestos activos sobre el crecimiento de las líneas celulares neoplásicas humanas MCF-7 (carcinoma mamario) y HeLa (cáncer cervicouterino), así mismo sobre la línea celular normal Vero (riñón de mono verde) cuantificado espectrofotométricamente mediante la reducción de sales de tetrazolio mediada por enzimas mitocondriales.

8.- Determinar el efecto antigenotóxico de los compuestos antirradicales utilizado un modelo *ex vivo* (rebanadas de riñón), esto mediante la técnica de cometa.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Material Biológico

7.1.1 Poleo (*Hedeoma drummondii*, Lamiaceae)



Figura 10. Fotos de *Hedeoma drummondii*.

Se colectó en el municipio de Allende - Nuevo León, (México) mediante un muestreo aleatorio al azar en un área de 100 x 100 m, entre los meses de Mayo/Julio de 2005 en la localidad del Fraile. Su identificación corrió a cargo de la Dra. Marcela González Álvarez del herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL (número de voucher: 024244).

Reino: *Plantae*

Subreino: *Tracheobionta*

División: *Magnoliophita*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Asteridae*

Orden: *Lamiales*

Familia: *Lamiaceae*

Genero: *Hedeoma*

Especie: *H. drummondii*

7.1.2 *Espirulina* (*Spirulina maxima*, Oscillatoriaceae)

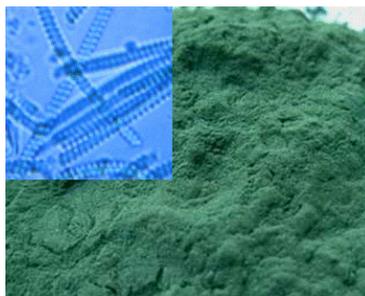


Figura 11. Fotos de *Spirulina maxima*.

Se utilizó una presentación comercial procesada en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, la cual fue donada por el Dr. Germán Chamorro, dicha especie se colectó de manera aleatoria completamente al azar, la identificación taxonómica corrió a cargo de la Dra. Catalina Mendoza González del herbario del Colegio Nacional de Ciencias Biológicas del IPN (número de voucher: 12584).

Reino: *Eubacteria*

Filum: *Cyanobacteria*

Clase: *Myxophyceae*

Orden: *Hormogonales*

Sub orden: *Homocystineae*

Familia: *Oscillatoriaceae*

Genero: *Spirulina*

Especie: *S. maxima*

7.1.3 Líneas Celulares.

Los modelos de células en cultivo representan una herramienta muy útil en la evaluación de la eficacia de fármacos y sustancias de distinto origen. En el presente proyecto se utilizaron dos líneas celulares provenientes de tumores humanos: la línea celular de carcinoma mamario (MCF-7, ATCC HTB-22) y cervicouterino (HeLa, ATCC CCL-2), así como la línea celular normal de riñón de mono verde (Vero,

ATCC CCL-81), esto para determinar la selectividad de los extractos y compuestos activos.

Las líneas tumorales se cultivaron en medio esencial mínimo de Eagle (MEM) suplementados con 10 % de suero fetal de bovino (SFB), mientras que las células Vero se cultivaron en medio M-199 con 4 % de SFB. Se mantuvieron a 37 °C en frascos de cultivo de poliestireno, en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. En ambos medios se utilizó una mezcla de antibióticos compuesta por penicilina y estreptomina (200, 000 UI: 0.5 g; 1mL/1L de medio)

7.1.4 Hamsters dorados (*Mesocricetus auratus*)

Se utilizaron animales machos jóvenes de peso entre 80-90 g obtenidos del bioterio del Centro de Investigación Biomédica del Noreste (IMSS), Monterrey-México. Los animales fueron colocados en jaulas de policarbonato, con acceso libre a alimento y agua. Los experimentos fueron realizados siguiendo las guías institucionales sobre el manejo y cuidado de animales de laboratorio establecidas internacionalmente.

7.2 Extracción del Material Vegetal

Para *H. drummondii* se realizó una extracción con metanol (MeOH) por la técnica de maceración a temperatura ambiente con agitación continua. Se extrajo un kilo del material vegetal con tres litros de solvente en un agitador, cambiándose el solvente cada 24 horas durante tres días consecutivos, posteriormente, el extracto se filtró usando papel filtro Whatman No. 1, al filtrado se le eliminó el solvente utilizando un rotavapor con temperatura y presión reducida.

Para *S. maxima*, se siguió la misma metodología descrita anteriormente solo que en esta ocasión, el solvente se separó por centrifugación a 800 rpm, se obtuvieron dos extractos metanólicos, uno convencional y otro más que se desgrasó con éter etílico.

7.2.1 Pruebas Químicas para Grupos Funcionales

Los extractos se sometieron a pruebas químicas con el fin de conocer la presencia o ausencia de grupos funcionales.

Prueba de Salkowski: Se adicionó a la muestra (1-2 mg en 1 mL de cloroformo) 1 mL de ácido sulfúrico, desarrollando colores amarillo o rojo, para esteroides y metilesteroides.

Prueba de Shinoda: Para compuestos de tipo flavonoides; 1.0 mg de la muestra se disolvió en etanol y se añadieron unas limaduras de magnesio, se calentó a 60°C y después se añadieron unas gotas de HCl por las paredes. Se consideró positiva con la aparición de colores naranja- rojo, rosa, azul o violeta.

Prueba de Ácido Sulfúrico: Para flavonoides. Una pequeña cantidad de muestra se disolvió en ácido sulfúrico concentrado y se consideró positiva si se observaron coloraciones amarillo para flavonas y flavonololes, naranja- guinda para flavonas; rojo- azulosos, para chalconas.

Prueba de Baljet: Para sesquiterpenlactonas. Se utilizaron 2 soluciones que se mezclaron en volúmenes iguales antes de usarse, la solución A), un gramo de ácido pícrico en 100 mL de etanol; solución B), 10 g de hidróxido de sodio en 100 mL de agua. La prueba se consideró positiva cuando se desarrolló una coloración naranja o roja oscura.

Prueba de Dragendorff: Modificación de Munier y Machelobuf. Para alcaloides.

Solución A: Se disolvieron 0.85 g de nitrato de bismuto, en una mezcla de 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua.

Solución B: Se disolvieron 8 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua.

El reactivo se preparó mezclando 5 mL de solución A), 4mL de solución B) y 100 mL de agua. La prueba se consideró positiva para alcaloides al dar la placa coloración roja o naranja, persistente por 24 h.

Prueba de Permanganato de Potasio: Para dobles enlaces. Se preparó una solución de permanganato de potasio al 2% en agua, se disolvieron 0.2 mg de muestra en agua, acetona o metanol después se tomó en un capilar y se le agregó la solución de permanganato de potasio. La prueba se consideró positiva al producirse decoloración del reactivo.

Prueba de cloruro férrico: Para oxhidrilos fenólicos. Se disolvió una pequeña cantidad de muestra en etanol y se añadió una gota de solución de cloruro férrico en agua (2.5%), la aparición de una coloración o precipitado rojo, azul, violeta o verde se consideró como positiva.

Prueba de 2,4- Dinitrofenilhidracina: Para grupo carbonilo. En un tubo de ensayo se disolvieron 50 mg de 2,4- dinitrofenilhidracina en 1mL de etanol caliente. Se agregaron 50 mg del compuesto carbonílico y se calentó a baño María por 10 a 15 minutos; se dejó en reposo y luego se enfrió a baño de hielo, la aparición de un precipitado indicó la presencia de un grupo carbonilo.

Prueba de Molisch: Para azúcares. En un tubo de ensayo se colocó la muestra, se le añadieron 3 gotas de reactivo de Molisch y se agitó. Después se inclinó el tubo y se depositaron por la pared 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. La prueba se consideró positiva cuando hubo formación de un anillo coloreado en la interfase. El reactivo se preparó disolviendo 1gr de α - naftol en 100 mL de etanol al 95% (Domínguez, 1973).

7.2.3 Contenido de Fenoles y Flavonoides Totales

La concentración de fenoles totales se determinó por el método descrito por Singleton *et* Rossi (1965) utilizando el reactivo de Folin- Ciocalteu, para lo cual a cada una de las muestras se les adicionó 250 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu (1N), posteriormente se añadió Na_2CO_3 al 20% y se dejó reposar por 2 horas. La

absorbancia fue medida a 760 nm. Los resultados fueron expresados en mg de ácido gálico por g de extracto (mg/g extracto).

Para determinar el contenido de flavonoides totales se utilizó la formación del complejo flavonoide- AlCl_3 en medio metanólico (Chang *et al.*, 2002), a cada uno de las muestras se le adicionaron 1250 μL de agua destilada y después se adicionó 75 μL de NaNO_2 al 5% posteriormente se adicionaron 150 μL de AlCl_3 al 10% y se dejó reposar 5 minutos. Después de esto se adicionaron 500 μL de NaOH (1M) y finalmente se completó el volumen de cada referencia y muestra a 2.5 mL con agua destilada, la absorbancia fue medida a 510 nm. Los resultados fueron expresados en mg de catequina por g de extracto (mg/g extracto).

7.3 Evaluación de la Actividad Antirradical

7.3.1 Poder Antioxidante Férrico Reductor (Ensayo FRAP)

Esta técnica fue desarrollada por Benzie y Strain (1996) como método para cuantificar la capacidad antioxidante plasmática, aunque posteriormente ha sido aplicado a otras muestras biológicas. El método determina la capacidad de la muestra para reducir un complejo de hierro férrico a su forma ferrosa. La capacidad para reducir el hierro se considera un índice del poder antioxidante de la muestra. (Prior *et al.*, 2005).

Para determinar la capacidad antioxidante de las muestras, se mezclaron 180 μL de la solución FRAP [buffer acetato, pH 3.6: TPTZ (ferroustripiridiltriazina) 10 mM en HCl 40 mM: FeCl 20 mM, 10:1:1] y 20 μL del extracto, posteriormente se registró la absorbancia a 595 nm. Los resultados se expresan como mM de FeSO_4 (forma reducida del Fe III).

7.3.2 Secuestro del radical ABTS

El ensayo del ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotioazolín-6-sulfónico) (ABTS) está basado en la captación por los antioxidantes del radical catión ABTS^\bullet generado en el medio de reacción. El radical catión del ABTS posee una coloración verde con

un máximo de absorción a 415 nm y una serie de máximos secundarios de absorción a 645, 660, 734, 815 y 820 nm (Re *et al.*, 1999). La generación del radical ABTS• por reacciones químicas, se hace reaccionando persulfato potásico con 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP).

Una vez formado el radical ABTS• se diluyó con etanol hasta obtener un valor de absorbancia de $0,700 \pm 0,100$ a 754 nm (longitud de máxima absorción). Ciento ochenta microlitros de la dilución del radical ABTS•, se mezcló con 20 μ L de la muestra y se determinó la absorbancia a 754 nm a 25 °C. El resultado se expresa como la Capacidad Antioxidante Equivalente en Trolox (CAET o TEAC por sus siglas en inglés).

7.3.3 Captura del radical DPPH

Este método se basa en la reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•) por los antioxidantes de la muestra. El radical es estable y tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando se añade la muestra conteniendo sustancias antioxidantes.

Para este ensayo se siguieron dos vías, primero se calculó la CAET del extracto, para lo cual se realizó una curva con trolox y la segunda vía calculando la concentración efectiva media (CE_{50} , μ g/mL), esto para dar seguimiento al fraccionamiento dirigido: en microplacas de 96 pozos se colocaron diferentes concentraciones de cada muestra con DPPH (2 mg/L) disuelto en metanol, se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente y posteriormente se leyó la absorbancia a 520 nm utilizando un lector de microplacas (Schmeda *et al.*, 2003). Se utilizó como control positivo la catequina.

7.4 Aislamiento Dirigido

El extracto crudo se sometió a partición sucesiva con diclorometano (DCM) y mezclas de DCM-MeOH (1:1, v/v). Se tomó como base la capacidad atrapadora de radicales libres (DPPH) para continuar con el fraccionamiento dirigido y aislamiento de sus compuestos activos. Se realizaron fraccionamientos por permeación en gel

Sephadex LH-20, utilizando columnas de 60.5 x 5 cm, utilizando mezclas de MeOH-H₂O. El análisis de los patrones cromatográficos de las fracciones obtenidas se realizó por cromatografía en capa delgada o TLC, por sus siglas en inglés (Merck, silica gel 60 F₂₅₄) eluidas en el sistema: acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua, (100:10:10:30), usando como revelador ácido difenil bórico disuelto en metanol al 0,5 % p/v. Las manchas fueron visualizadas bajo luz UV (365 y 254 nm). Las fracciones obtenidas con R_f similar fueron combinadas y concentradas a sequedad total en un rotavapor. Aquellas fracciones con mayor actividad atrapadora de radicales libres fueron sometidas al aislamiento de sus componentes por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR o HPLC por sus siglas en inglés) utilizando un equipo HPLC-DAD Merck-Hitachi (LaChrom, Tokio, Japan) equipado con una bomba L-7100, un detector UV con arreglo de diodos L-7455 UV y un cromatointegrador D-7000, de forma analítica se utilizó una columna Phenomenex, Torrence C18-RP (250 x 4,60 mm d.i., 5 µm) y de forma semipreparativa una Merck Lichrospher C18-RP (250 x 25 mm i.d., 7 µm). Los compuestos fenólicos mayoritarios fueron monitoreados a una longitud de onda de 254 nm, entre 200 y 400 nm. El gradiente de elución se hizo con agua-1 % ácido fórmico (solvente A) y MeOH (solvente B) a un flujo de 1 mL/min de forma analítica y 5 mL/min de forma semipreparativa.

7.4.1 Identificación de Compuestos

Las estructuras de los compuestos fueron determinadas usando técnicas de RMN de ¹H mayoritariamente. En caso necesario se midieron otros parámetros como RMN bidimensional y espectroscopia de UV. Se realizó una comparación de datos con aquellos publicados con anterioridad.

Resonancia magnética nuclear (RMN): Los espectros de RMN fueron obtenidos en un espectrómetro Bruker a 400 MHz para ¹H. Para realizar las mediciones se utilizó metanol deuterado (MeOH-d₄). Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresaron en ppm. En caso necesario se utilizaron programas de correlación bidimensional

Espectroscopia ultravioleta/visible: Los espectros ultravioleta (UV) y visible se midieron en un espectrofotómetro Heλios α V-3.06 UV/VIS de doble haz. Como disolvente se empleó metanol. Los valores de longitud de onda (λ) se expresan en nm.

Cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de Masas (CG.EM): la fracción aromática de *H. drummondii* se sometió a CG-EM con el fin de identificar a los compuestos mayoritarios, se utilizó un equipo Perkin-Elmer AutoSystem con columna Quadrex 007.5MS, (30 m, 0.25 mm, film D.I. 250 μ m). Utilizando gas Helio como acarreador y flujo de 50 mL/min. Tiempo total de corrida de 45 min utilizando un EM: PE Turbomass full scan 40 a 400 uma, EI+ (centroide).

7.5 Evaluación de la Actividad Antiproliferativa

7.5.1. Ensayo MTT

Para el tamizaje preliminar de los extractos crudos se realizó el ensayo de MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] que se basa en la reducción de esta sal mediada por las enzimas succinato deshidrogenada mitocondrial y formación de cristales de formazán, los cuales se disuelven en alcohol isopropílico acidificado, determinándose la viabilidad celular midiendo el cambio de la absorbancia a 545 nm (Mosmann, 1983).

Para el ensayo se utilizaron microplacas de 96 pozos donde se colocaron 5000 células por pozo, después de 24 h se incubaron las líneas celulares con diferentes concentraciones de los extractos por periodo de 48 h, después de este tiempo se realizó el ensayo de MTT descrito a continuación: una vez decantado el medio de cultivo se agregaron 100 μ L de una mezcla de MTT (2 mg/mL): PMS (3.5 mg/mL) a razón 5:1, se incubó 75 min, transcurrido el tiempo se decantó el reactivo y lavó cada pozo con 200 μ L de solución salina balanceada de Hank's, posteriormente se disolvieron los cristales de formazán (morados) en alcohol isopropílico ácido (0.04M) y se leyó a 545 nm, se relacionó directamente la absorbancia con viabilidad celular. Se realizaron tres ensayos independientes con seis repeticiones cada uno, los resultados se calcularon con probit, donde se expresa

como la concentración inhibitoria media (CI_{50}) en $\mu\text{g/mL}$. Como control positivo de muerte celular se utilizó tritón X-100 al 0.5% y como control negativo medio de cultivo este mismo se utilizó para disolver los extractos.

7.5.2. Ensayo WST-1

Para los ensayos de proliferación restantes (fracciones y compuestos activos) se eligió continuar con la técnica de WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) que si bien también se basan en la reducción de sales por enzimas succinato deshidrogenada mitocondrial, los cristales son solubilizados en el medio de cultivo (Ishiyama *et al.*, 1995), evitando lavados, lo que se traduce en un manejo más eficiente de los cultivos, del tiempo y de reactivos.

Para el ensayo WST-1 se siguió la misma metodología descrita anteriormente (para MTT), al concluir el tiempo de incubación de las células con las muestras se añadieron 10 μL del reactivo por pozo, se incubó la microplaca 90 min a 37 °C e inmediatamente después se leyó a 450 nm. Se corrieron tres ensayos independientes, los resultados se calcularon con probit, expresados como la concentración inhibitoria media (CI_{50}) en $\mu\text{g/mL}$. Como control positivo se utilizó tritón X-100 al 0.5% y como control negativo medio de cultivo este mismo se utilizó para disolver las muestras.

7.6 Determinación del Efecto Antigenotóxico (Ensayo Cometa)

Para determinar el efecto protector de los compuestos antirradicales se utilizó el ensayo cometa, este consiste en cuantificar el daño inducido al ADN de células incluidas en agarosa, lisadas en condiciones fuertemente alcalinas y luego sometidas a electroforesis a pH alcalino, de manera que los rompimientos inducidos en el núcleo se desplacen en dirección al ánodo, formando una cola de cometa, que se visualiza mediante fluorescencia (Singh, 1988).

Para determinar el efecto protector de los compuestos activos se utilizó HgCl_2 para generar estrés oxidativo e inducir daño al ADN esto en un modelo *ex vivo* de rebanadas de riñón. El ensayo se realizó de la siguiente manera: se sacrificaron

hámsters dorados (*Mesocricetus auratus*) con una sobredosis de pentobarbital sódico vía intraperitoneal, el riñón se colectó en buffer Krebs-Bicarbonato (118 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 1.2 mM KH₂PO₄, 4 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.8 mM CaCl₂ y 11.1 mM D-glucosa, pH 7.4), este se procesó utilizando el rebanador Brendel-Vitron; las rebanadas obtenidas de ~6 mm de diámetro y con grosor de ~250 µm se incubaron en medio MEM/F12 con 0 (control) y 15 µM de HgCl₂ solo y en presencia de los compuestos antirradicales durante 30 min, para la concentración de los compuestos se eligió una concentración que capturara eficazmente los radicales libres (determinado por la capacidad de reducir el DPPH) pero a la vez fuese inerte en células normales(Vero), se eligió probar el compuesto 1B a 3 µg/mL, el 2B a 9 µg/mL y el 3B a 6 µg/mL. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las rebanadas se disgregaron en un homogenizador provisto con mango de teflón (Potter Elvehjem, 50 mL), en buffer de sacarosa (0.25 M Sacarosa y 1mM MgCl₂), una vez disgregado, el material se centrifugó a 5000 rpm /10 min, la pastilla se resuspendió en 90 µl de agarosa de bajo punto de fusión (ABF, 0.75%), la mezcla se colocó en laminillas previamente tratadas con agarosa de normal punto de fusión (ANF, 0.75%), se dejó solidificar la agarosa ABF a 4 °C, durante 5 min y se procedió a colocar una última capa de ABF, después de solidificada esta capa, las laminillas se colocaron en buffer de lisis (2.5 M NaOH, 0.1 M EDTA, 0.01 M Tris y Triton X-100 al 1%, pH 10) por al menos 60 min a 4 °C, una vez transcurrido el tiempo se colocaron en un buffer alcalino pH 13 (300 mM NaOH y 1 mM EDTA) durante 20 min, después se corrió en electroforesis a 300 mV y 25 mA durante 20 min, transcurrido el tiempo las laminillas se neutralizaron con buffer Tris 0.4 M, pH 7.5 y se deshidrataron con alcohol etílico, por último las laminillas se tiñeron con 20 µL (5 µg/mL) de bromuro de etidio y se examinaron en un microscopio de fluorescencia equipado con un filtro de excitación de 515-560 nm. Para cada concentración fueron analizadas 25 células con un programa computarizado de análisis de imágenes (CASP, <http://casp.sourceforge.net/>) tomando en cuenta el momento de Olive (MO):

$$MO = \frac{CGT - CGH}{\%ADNT}$$

Que es la relación entre la distancia desde el centro de gravedad de la cabeza (CGH) al centro de gravedad de la cola (CGT) y el porcentaje de ADN en la cola %ADNT (Collins, 1996; Mayne, 2003; Konca, *et al.*, 2003). Entre mayor sea el Momento de Olive (MO), el daño implicado al ADN es mayor y viceversa.

7.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico FAUANL versión 2.5. Se capturaron los datos y de esta manera se construyó la base de datos, incluyendo las variables obtenidas de los parámetros evaluados durante el diseño experimental, en el cual para cada uno de los parámetros analizados se realizaron tres experimentos independientes con seis repeticiones con cuando menos tres dosis de las muestras.

7.7.1 Variables de Estudio

7.7.1.1 Variables Dependientes

Se consideraron variables dependientes a la proliferación celular de las diversas líneas celulares, a la neutralización del radical libre DPPH y al momento de olive de los cometas formados en rebanas de tejido.

7.7.1.2 Variables Independientes

Variables explicativas o predictivas ya que son responsables de la forma en que se comportarán las variables dependientes, es decir, la concentración y tipo de extracto (s), fracción(es) y/o compuesto(s).

7.7.2 Análisis descriptivo y relación entre variables

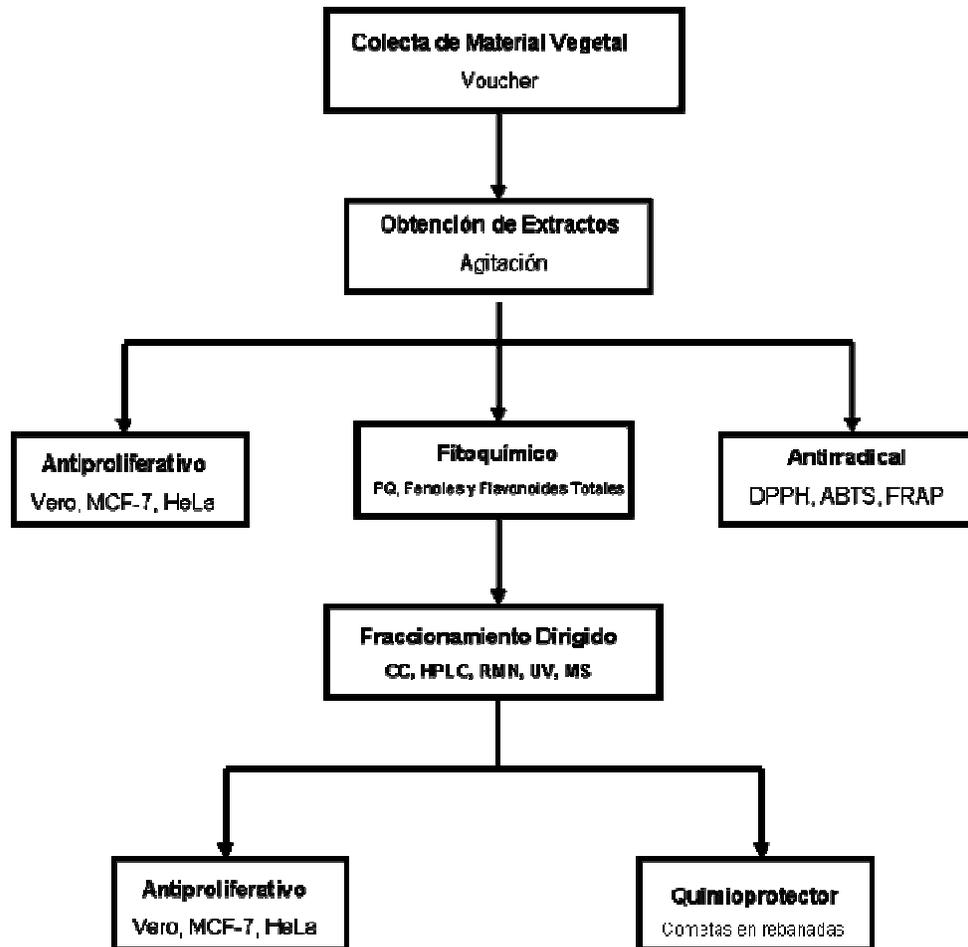
Las variables en estudio fueron sometidas a una evaluación para verificar que presentaran una distribución normal mediante los tests de Kolmogorov-Smirnov y el valor de Kurtosis, este último presentó un valor de tres, junto con lo anterior, se

analizo las medidas de tendencia central (media aritmética) y medidas de dispersión (desviación estándar).

La relación entre las variables inicialmente se estableció por medio de un análisis de correlación, utilizando el coeficiente de Pearson (r^2), posteriormente se calculó la Concentración Inhibitoria media (CI_{50}) de las muestras sobre el crecimiento de las líneas celulares, esta representa la concentración que causa la inhibición al 50 % de la población experimental en un tiempo determinado (48 horas) fue de tipo estático, los organismos se expusieron sin la renovación de las diluciones sometidas en el ensayo, posteriormente se realizó una transformación probit que resulta de un ajuste de los datos generando una curva sigmoideal que al ser sometida a una transformación logarítmica, logra una linealización de la misma, esto utilizando el programa EPA versión 1,5; este mismo principio se siguió para determinar la CE_{50} en los ensayos de secuestro de radicales DPPH, esta estiman la concentración efecto media (CE_{50}), la cual es la concentración de la sustancia de prueba que causa un efecto al 50% de la población experimental, al cabo de un tiempo determinado, para esto se utilizó la transformación de los datos obtenidos, siguiendo el principio anteriormente señalado. En el análisis del núcleo de células individuales (cometas), los núcleos dañados se observan como una imagen, donde la cola está formada por los fragmentos rotos de DNA, se realiza un análisis de las imágenes en el software CASP se analizaron su normalidad, media y desviación estándar.

La media de las concentraciones a las cuales se observó la efectividad media de las muestras (efecto antiproliferativos y secuestro de radicales DPPH), así como la media de los momentos de olive se sometieron a un análisis de varianza ANOVA (una vía) y test de Tuckey (Tukey Honestly Significant Difference, HDS) para el estudio comparativo de sus medias. Se tomó como diferencia significancia una $p < 0.05$ que exista entre los tratamientos.

7.8 Estrategia Experimental



8. RESULTADOS

8.1 Estudio fitoquímico

En este trabajo se investigó la actividad antirradical/antioxidante de *Hedoema drummondii* y *Spirulina maxima*, la primera especie es consumida como te herbal en México y como condimento en sopas por nativos americanos (Estrada *et al.*, 2007; Rogers, 1980) y la segunda los aztecas la comían en cantidades pequeñas con tortillas y también la utilizaban para condimentar el maíz en lugar de la sal (Mondragón, 1984). El tamizaje fitoquímico preliminar y rendimiento de los extractos se muestran en la tabla No. I, destacando la presencia de flavonoides y oxidrilos fenólicos, ya que estos compuestos poseen una estructura química especialmente adecuada para ejercer una acción antioxidante. Poseen anillos aromáticos con sustituyentes hidroxilos lo que les permite actuar como donadores de hidrógeno o electrones, o atrapadores de radicales libres (Skerget *et al.*, 2005); el contenido de fenoles y flavonoides totales presentes en los extractos se realizó por extrapolación con curvas realizadas con estándares (figura 12).

TABLA No. I
Rendimiento y tamizaje fitoquímico preliminar.

Muestra	Rendimiento (%)	Flavonoides		Sesquiterpenos		Esteres	
		Alcaloides	Instauraciones	Oxidrilos	Azúcares		
MHD	9.5	-	+	+	+	+	+
MSM	20	-	+	+	+	+	+
MSLG	18	-	+	+	+	+	+

MHD: extracto metanólico de *H. drummondii*; MSM: extracto metanólico de *S. maxima*; MSLG: extracto metanólico libre de grasas de *S. maxima*); (-) = Ausencia, (+) = Presencia

8.2 Determinación de la actividad antirradical

Existen numerosos métodos para cuantificar la actividad antioxidante total, los cuales se han aplicado a diferentes muestras biológicas. Estos métodos se basan generalmente en la captación o secuestro de radicales libres generados en la mezcla de reacción ($O_2 \bullet-$, $\bullet OH$, $ROO\bullet$, $ONOO-$, etc.), mientras que otros están basados en la reducción de iones metálicos tales como el Fe^{3+} o el Cu^{2+} (Sánchez-Moreno 2002; Schlesier *et al.*, 2002; Prior *et al.*, 2005).

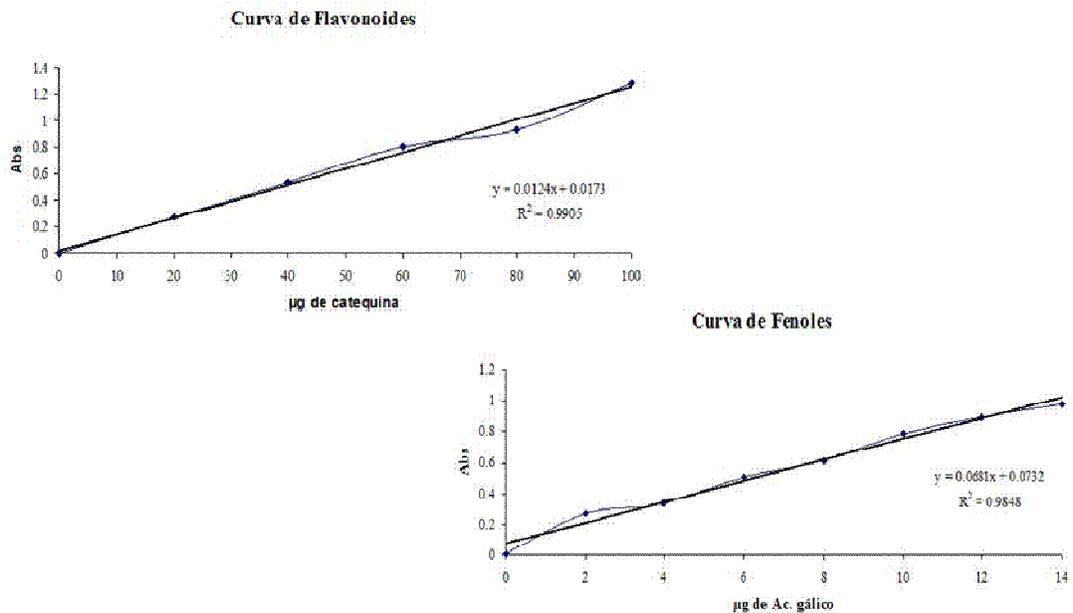


Figura 12. Curvas de estándares para flavonoides y fenoles totales.

En la tabla No. II se muestra la actividad antirradical que presentaron los extractos polares de las muestras. Una medida común para determinar el potencial antioxidante de las muestras es calculando el CAET (capacidad antioxidante equivalente a trolox), así mismo se determinó el poder reductor mediante el ensayo FRAP, este es capaz de detectar compuestos con un menor potencial redox y por lo tanto se considera un método adecuado para evaluar la capacidad de los antioxidantes para modular el tono redox de células y tejidos (Griffin y Bhagooli, 2004) (figura 13).

TABLA No. II

Contenido de fenoles totales, flavonoides totales y actividad antirradical.

Muestra	Fenoles (mg/g)	Flavonoides (mg/g)	ABTS (CAET)	DPPH (CAET)	FRAP (Fe⁺²)
MHD	32.36± 0.86	3.2± 0.36	668 ± 16.04	768 ± 19.23	3.1± 1.2 mM
MSM	0.15 ± 0.02	< .01	40 ± 2.37	42 ± 5.31	91 ± 12 μM
MSLG	0.291± 0.05	< .01	49 ± 1.78	53 ± 3.23	106 ± 16 μM

Media de tres ensayos independientes ± DE.

En la tabla anterior se puede observar que la capacidad antirradical esta plenamente relacionada con el contenido de fenoles y flavonoides totales, esto se observa claramente en *S. maxima* ya que el extracto que previamente se desgrasado aumento su contenido de fenoles y por ende su actividad antirradical.

8.3 Fraccionamiento dirigido y purificación de compuestos activos

Otra medida para calcular y comparar la actividad antirradical/antioxidante de muestras vegetales es mediante la concentración efectiva media (CE₅₀), utilizando la captura del radical DPPH, considerándose como buenos candidatos las muestras o compuestos con CE₅₀ ≤ 50 μg/mL. Dado los resultados obtenidos se seleccionó el extracto metanólico de *H. drummondii* (CE₅₀ de 25.12 μg/mL), ver tabla IV, como candidato para realizar un fraccionamiento sistemático para a la identificación de sus compuestos antirradicales, esto mediante particiones líquido/líquido y métodos cromatográficos, las particiones insolubles fueron las mas activas. En la figura 14 se observan los “pools” en que se organizaron las subfracciones obtenidas de cromatografías en Sephadex LH-20 (MeOH:H₂O, 1:1, isocrático) de la partición insoluble en DCM:MeOH (1:1, v/v).

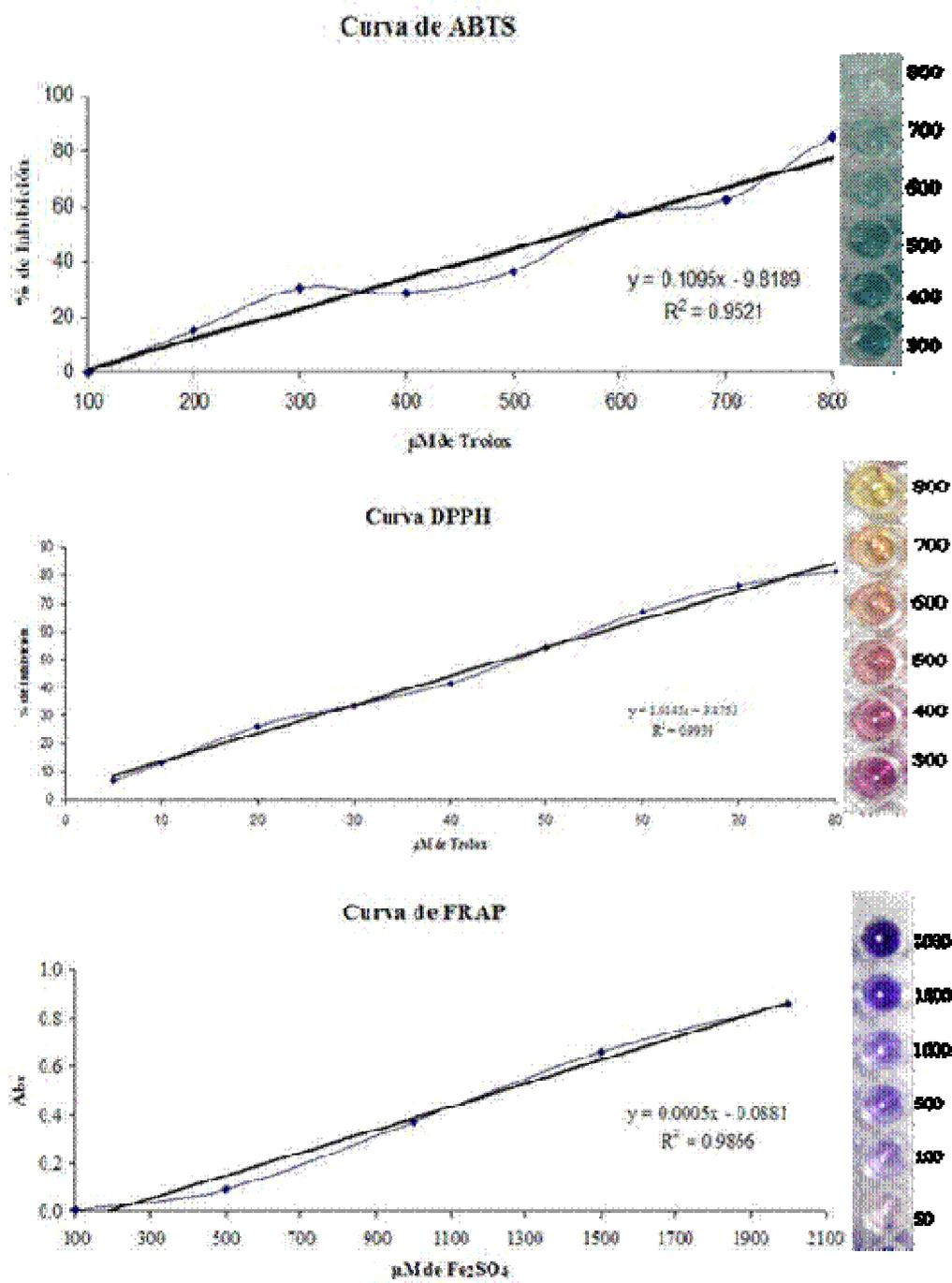


Figura 13. Curvas de estándares de los ensayos DPPH, ABTS y FRAP.

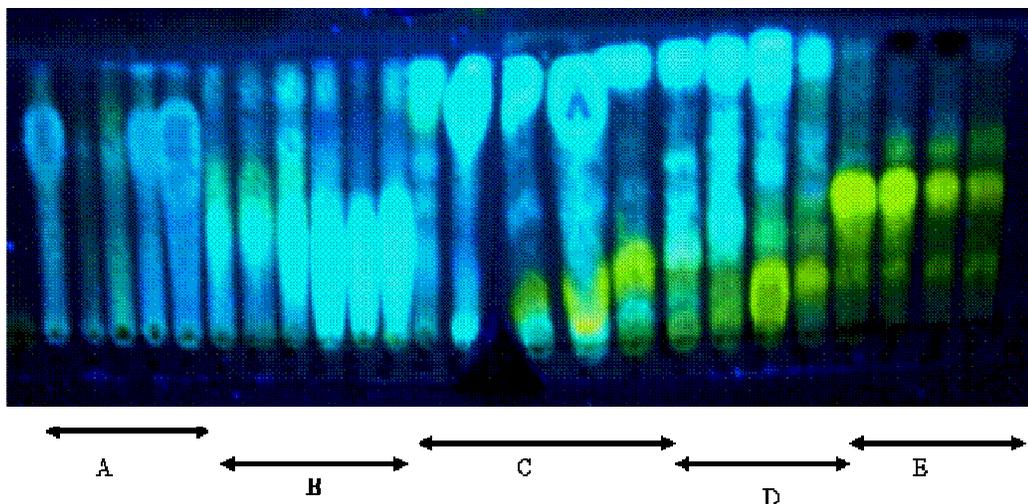


Figura 14. Cromatoplaqa de las fracciones obtenidas de la fracción insoluble (DCM;MeOH) del extracto metanólico de *H. drummondii*, revelada con ácido difenilbórico (0.5%).

De las subfracciones obtenidas (A →E), la mas activa fue la subfracción B, a partir de esta se logró aislar y purificar tres compuestos activos (figura 15).

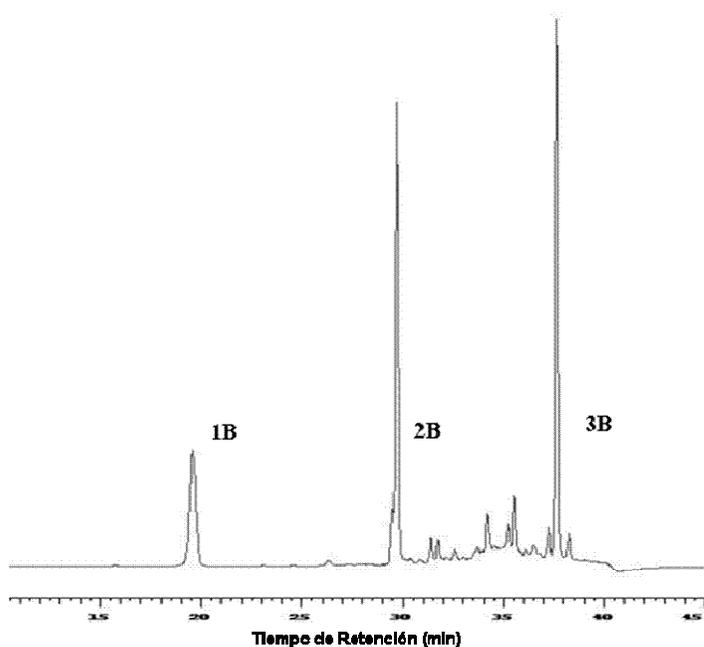


Figura 15. Cromatograma de la subfracción B del extracto metanólico de *H. drummondii*.

Dada la coloración azul fluorescente presentada por los compuestos de la subfracción B en la cromatoplaça revelada con ácido difenil bórico (figura 14) se consideró que pudiera tratarse de ácidos fenólicos, los cuales junto con compuestos de tipo flavonoide se caracterizan por su actividad antirradical/antioxidante, presentando estos últimos coloraciones amarillo- naranja cuando se utiliza el mismo revelador. Tomando en cuenta lo anterior, se determinó que en las subfracciones D y E y en menor medida en la C, se encuentran compuestos fenólicos y flavonoides. Lo anterior resultó muy interesante y se procedió a profundizar en la investigación fitoquímica de la especie, con ello, se purificaron dos compuestos de la subfracción D mediante cromatografía preparativa de alta resolución (figura 16) y uno más mediante precipitación con MeOH a -10 °C; las demás subfracciones (C y E) nos se trabajaron dado el poco material que se disponía para procesarlas.

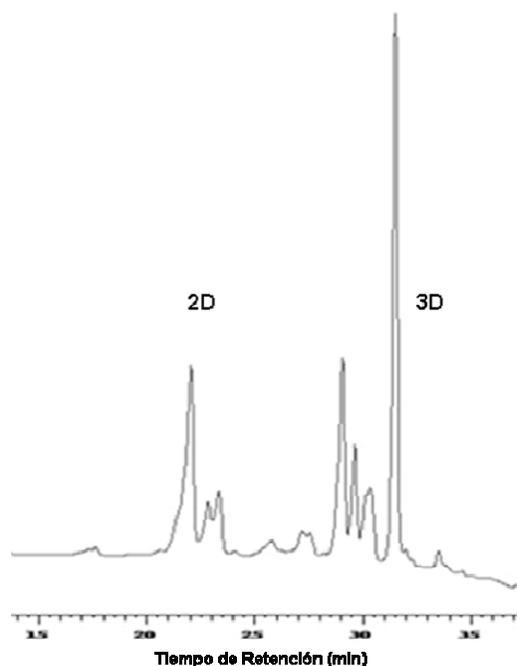


Figura 16. Cromatógrama de la subfraccion D del extracto metanólico de *H. drummondii*.

En la tabla III se presentan las condiciones en que se efectuaron las corridas cromatograficas en CLAR, para ambas subfracciones:

TABLA No. III

Condiciones de corrida para las subfracciones de MHD.

Subfracción B

Tiempo	B (MeOH)	A (Ac. formico 1%)
0	30	70
30	80	20
3'	30	70
45	30	70

Subfracción D

tiempo	B (MeOH)	A (Ac. formico 1%)
0	50	50
30	100	0
3'	50	50
45	50	50

Continuando con el estudio fitoquímico de *H. drummondii*, la fracción soluble en DCM, se sometió a cromatografía en sílica gel 60 (70-200 μm), utilizando gradientes de éter de petróleo (EP) y acetato de etilo (AcEt), la fracción aromática (70:30, EP: AcEt) se sometió a cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas (CG-EM, figura 17), para la identificación de los compuestos se compararon sus espectros de ES con los proporcionados por la biblioteca del equipo.

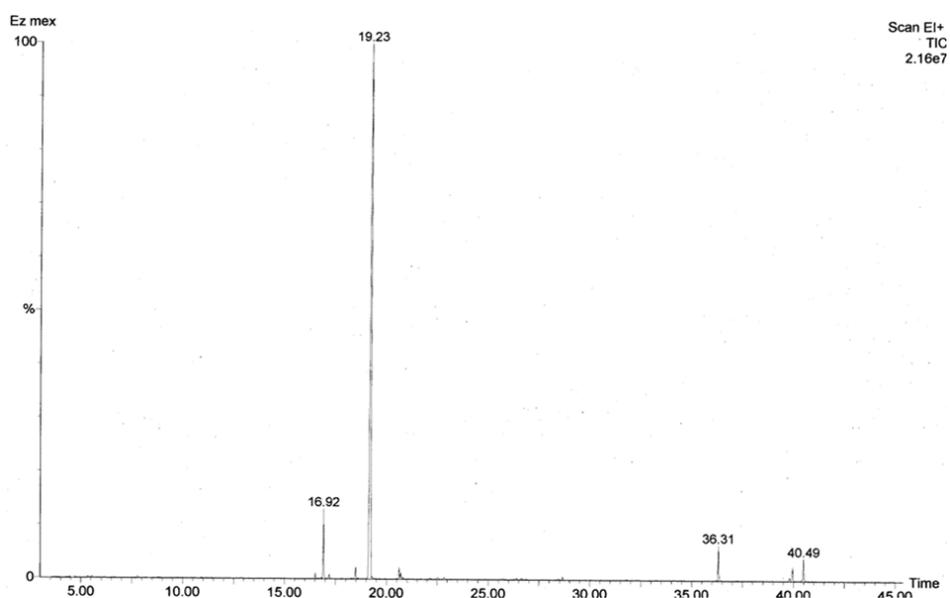


Figura 17. Cromatógrama de la subfracción aromática del extracto metanólico de *H. drummondii*.

En la figura 18 se presenta un diagrama esquemático que resume la forma en que se llevó a cabo el estudio fitoquímico de *H. drummondii*, incluyendo el rastreo sistemático al aislamiento de los compuestos antirradicales/antioxidantes.

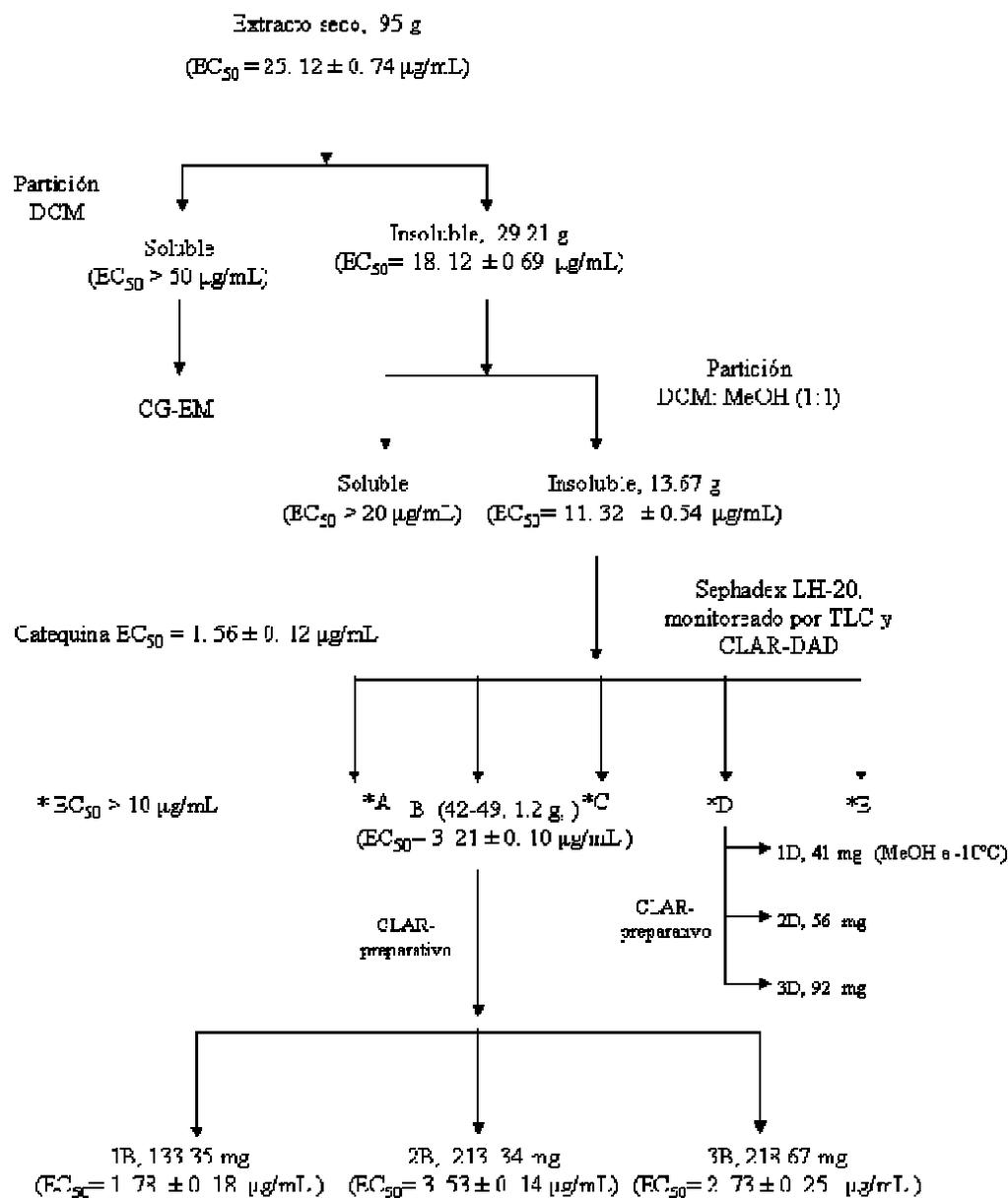
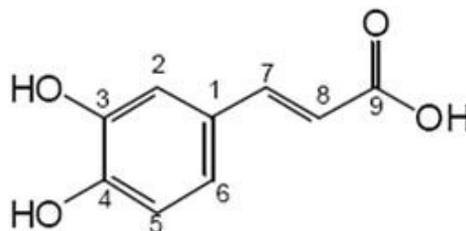


Figura 18. Diagrama del estudio fitoquímico de *H. drummondii* y aislamiento dirigido utilizando la captura del radical DPPH.

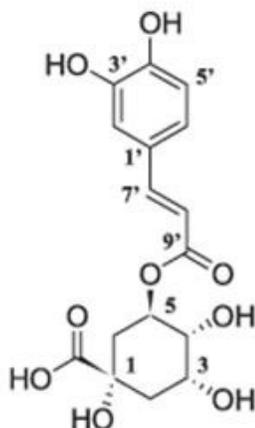
8.4 Estructuras de los compuestos identificados en el extracto metanólico de *H. drummondii*

A continuación se detallan las señales, estructuras y nombres de los compuestos aislados e identificados a partir del extracto metanólico de *H. drummondii*:

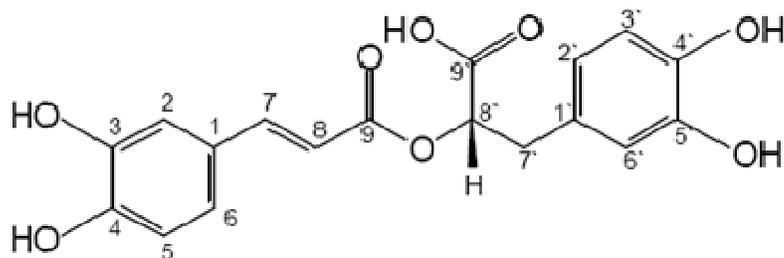
Compuesto 1B (ácido cafeíco): RMN-¹H (MeOH-d₄); 6.23(d, H₇), 7.05 (d, H₂), 6.95 (dd, H₆); UV= 242, 300 (H), 325 max; t_R = 19 min (CLAR-C 18). Estas señales concuerdan con los reportados por Kumaran y Karunakaran, 2007 y Sun *et al.*, 2006.



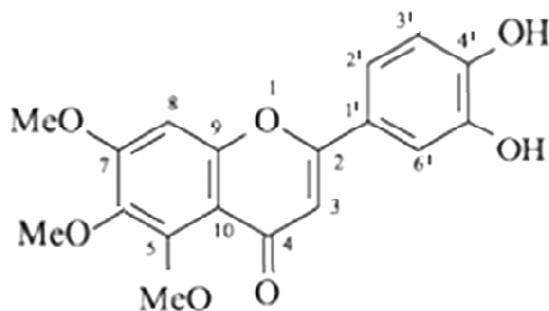
Compuesto 2B (ácido clorogénico): RMN-¹H (MeOH-d₄); 2.03(m, H₅), 2.15(m, H₃), 4.15 (dd, H₁), 6, 28 (d, H_{8'}), 6.78(d, H_{5'}), 6.99 (dd, H_{6'}), 7.6(d, H_{7'}); UV= 243, 300 (H), 325 max; t_R= 29 min (CLAR-C18). Esto concuerda con los datos reportados por Kumaran y Karunakaran, 2007.



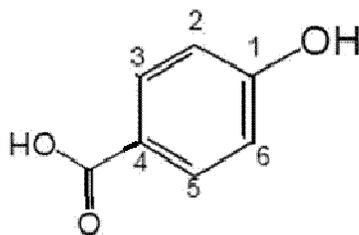
Compuesto 3B (ácido rosmarínico): RMN-¹H (MeOH-d₄); 2.99 (dd, H_{7'}β), 3.09 (d, H_{8'}), 6.60 (d, H₇), 6.68 (d, H₆), 6.75 (s, H₂), 6.91(d, H₆), 7.13 (d, H_{5'}), 7.21(s, H₂); UV= 242, 319 max; t_R= 37.57 min (CLAR-C18). Concuerdan con los datos reportados por Kumaran y Karunakaran, 2007 y Lu y Foo, 1999.



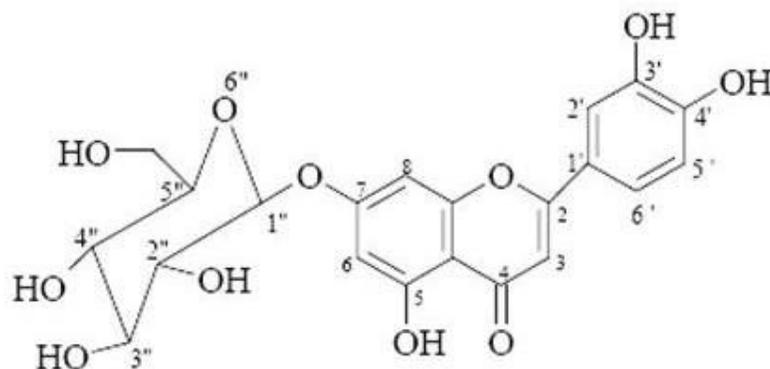
Compuesto 1D (sideritoflavona): RMN-¹H (MeOH-d₄); 7.57 (dd, H_{6'}), 7.55(d, H_{2'}), 6.95 (d, H_{5'}), 6.69 (S, H₃), 4.06, 3.98, 3.96 (S, OMe) . Estas señales concuerdan con los datos reportados por Kuhn *et al.*, 1994.



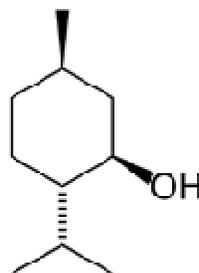
Compuesto 2D (ácido p-hidroxibenzoico): RMN-¹H (MeOH-d₄) 6.88 (d, H_{6,2}), 7.78 (d, H_{5,3}); t_R= 21.8 min (CLAR-C18). Estos datos concuerdan con las reportadas por Cho *et al.*, 1998.



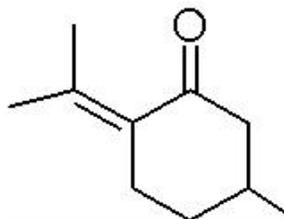
Compuesto 3D (luteína 7-*O* - glucosa): RMN-¹H (MeOH-d₄) 3.17-3.41 (m, H glucosa), 3.49 (d, H 5''), 3.91 (d, H 1''), 5.07 (d, H₆), 6.49 (s, H₃), 6.9 (d, H₅'), 7.33 (d, H₂'), 7.39 (dd, H₆'). UV= =255, 265 (H); t_R= 31.8 min (CLAR-C18). Los datos concuerdas con los publicados previamente por Parejo *et al.*, 2004.



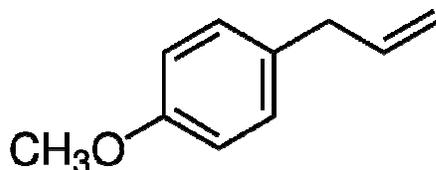
Mentol: EM-IE m/z 156 [M]⁺; 41(91), 43(69.7), 71(100), 81(54.5), 95(60.6), 96(21.2), 123(15.2), 138(12.1), 139(3). t_R= 16.9 min (CG-EM).



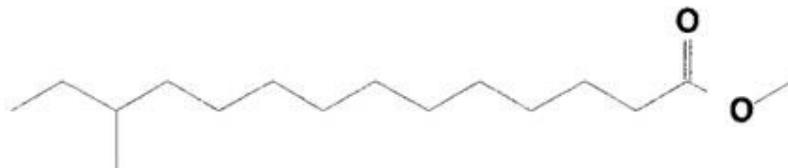
Pulegona: EM-IE m/z (%): 152 [M]⁺; 41(62.5), 53(28.1), 67(96.9), 81(100), 82(39.4), 95(21.2), 109(45.5), 137(21.2), 152(47.5), 153(9.4). t_R= 16.9 min (CG-EM).



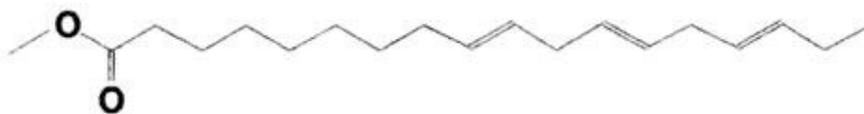
Estragol: EM-IE m/z (%):41(18.8), 50(31.3), 51(56.3), 52(18.6) 63(46.9), 77(90.6), 79(47), 105(65.6), 117(53.1), 133(37.5), 147(56.3), 148(100), 149(12.5). t_R = 20.6min (CG-EM).



12-metil tetradecanoato de metilo: EM-IE m/z (%): 256 $[M]^+$;43(78.1), 55(43.8), 57(21.9), 74(100), 75(18.8), 87(59.4), 97(9.4), 143(9.4), 171(6.3), 199(6.3), 227(9.4), 239(6.3). t_R = 36.3 min (CG-EM).



Linolato de metilo : EM-IE m/z (%): 292 $[M]^+$; 41(100), 55(72.7), 67(75.8), 93(36.4), 95(30.3), 108(15.2), 121(9.4), 135(6), 236(3,3). t_R = 39.9 min (CG-EM).



8.5 Efecto antiproliferativo

Hasta ahora la investigación se ha enfocado al estudio fitoquímico y aislamiento dirigido de compuestos antirradicales/antioxidantes, sin embargo varias publicaciones han relacionado la actividad secuestradora con efecto antineoplásico (Conforti *et al.*, 2007; Delgado- Saucedo *et al.*, 2008). Por este motivo investigamos el efecto antiproliferativo del extracto, particiones polares y compuestos antirradicales de *H. drummondii* contra células provenientes de cáncer mamario (MCF-7) y cervicouterino (HeLa), se utilizó la línea celular normal Vero para

determinar la selectividad, la viabilidad celular se calculó mediante el ensayo de WST-1 (figura 19). Como se mencionará más adelante, los extractos de *S. maxima* no presentaron actividad antioxidante en las condiciones estudiadas en el presente trabajo, sin embargo poseen efecto antiproliferativo. En la tabla No. IV, se observan las CE_{50} y CI_{50} de las muestras de *H. drummondii*, en donde se puede ver que a mayor actividad antirradical, mayor actividad antiproliferativa, en todos los casos, con excepción del ácido clorogénico, se observó un efecto significativamente selectivo hacia las células cancerosas.

TABLA No. IV
Actividad antirradical y antiproliferativa de *H. drummondii*.

Muestra	CE_{50} CI_{50} valores ($\mu\text{g/mL}$)			
	OPPH	Vero	MCF-7	HeLa
MHD	25.12 ± 0.7	240.9 ± 10.3^a	175.4 ± 4.5^b	158.2 ± 5.3^b
F1	18.12 ± 0.7	174.6 ± 5.9^a	128.0 ± 0.9^b	120.6 ± 2.3^b
F2	11.32 ± 0.5	136.8 ± 7.8^a	95.0 ± 1.4^b	81.8 ± 1.8^c
Acido clorogénico (2E)	3.53 ± 0.1^a	25.1 ± 1.5^a	24.8 ± 1.8^a	24.7 ± 1.1^a
Acido rosmarínico (3E)	2.73 ± 0.3^b	20.4 ± 0.2^a	19.9 ± 0.3^a	17.4 ± 0.3^b
Acido cafeico (1E)	1.78 ± 0.2^c	11.4 ± 0.3^b	10.7 ± 0.1^b	8.7 ± 0.1^c
Catequina	1.55 ± 0.1^c	NA	NA	NA

F1: Insoluble en DCM; F2: Insoluble en DCM:MeOH; NA: No analizado; Media de tres ensayos independientes \pm DE, Tukey $p \leq 0.05$.

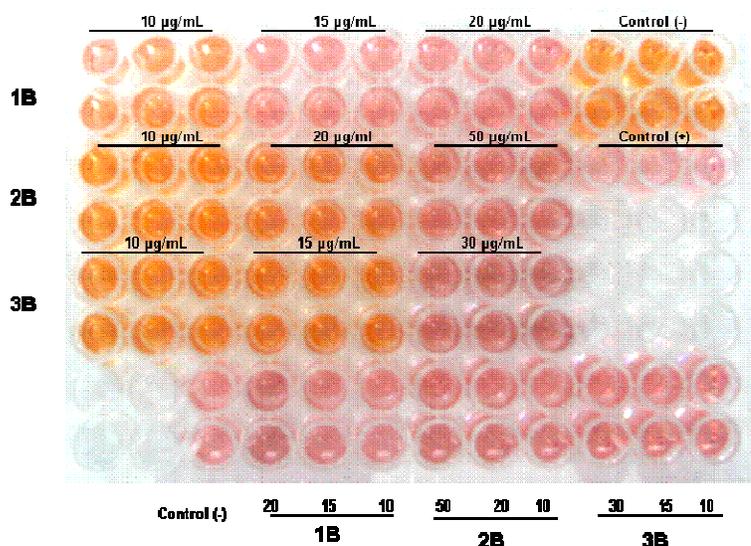


Figura 19. Ensayo de WST-1 con los compuestos activos de *H. drummondii* vs células MCF-7; C(-): medio de cultivo; C(+): tritón X-100 al 0.5%.

Si bien los extractos polares de *S.maxima* no mostraron actividad antirradical relevante, destaca la marcada selectividad que mostraron contra las líneas celulares cancerosas probadas (tabla No. V), acentuándose en el extracto que previamente se desgraso (MSLG).

TABLA No. V

Actividad antirradical y antiproliferativa de *S.maxima*.

Muestra	CE ₅₀	CI ₅₀ en µg/mL		
	DPPH	Vero	MCF-7	HoLa
MSM	> 50	> 1600 ^a	810.66 ± 10.6 ^b	710.57 ± 11.5 ^c
MSLG	> 50	> 1600 ^a	561.40 ± 12.6 ^b	517.16 ± 15.8 ^b

Media de tres ensayos independientes ± DE, se considero la concentración máxima de 1500 µg/mL para el análisis estadístico, Tukey $p \leq 0.05$.

8.6 Efecto Antigenotóxico de los Compuestos Antirradicales

Para determinar el efecto protector de los compuestos antirradicales aislados de *H. drummondii* se utilizó HgCl_2 (15 μM) como generador de estrés oxidativo e inductor de daño al ADN mediante el ensayo cometa, esto en un modelo *ex vivo* de rebanadas de riñón de hámster dorado. En la figura 20 se observan los cometas y el rango de daño visualizando la longitud de su “cola” y en la figura 21 el analisis de estas en el programa CASP. Como se menciona anteriormente la longitud del cometa esta directamente proporcional al daño ocasionado al ADN.

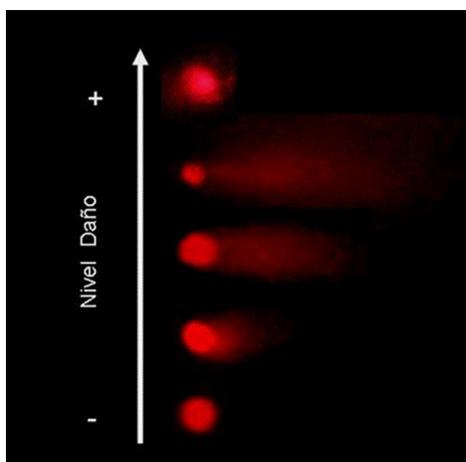


Figura 20. Escala de daño al DNA visualizado en el ensayo cometa.

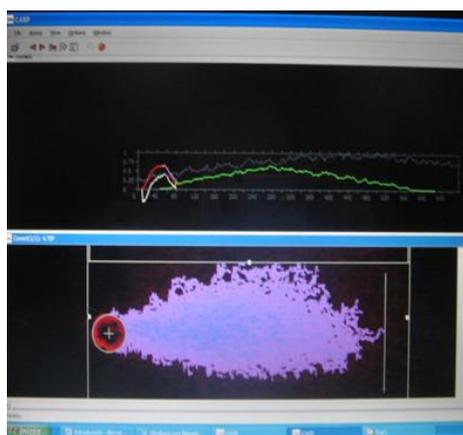


Figura 21. Cometa obtenido a partir de una rebanada expuestas a 15 μM de HgCl_2 analizada con el programa CASP.

En la figura 22 se puede observar como los compuestos antirradicales protegieron al tejido (rebanadas de riñón) del daño genotóxico, siendo el más activo el compuesto 1B (figura 23), se puede observar claramente la relación entre actividad antirradical y efecto protector, así el compuesto 1B resulto mejor que el compuesto 3B y este a su vez mejor que el 2B, si bien no hay diferencia significativa entre estos dos últimos cabe señalar que se utilizó la mita de compuesto 3B para producir el mismo efecto que el compuesto 2B.

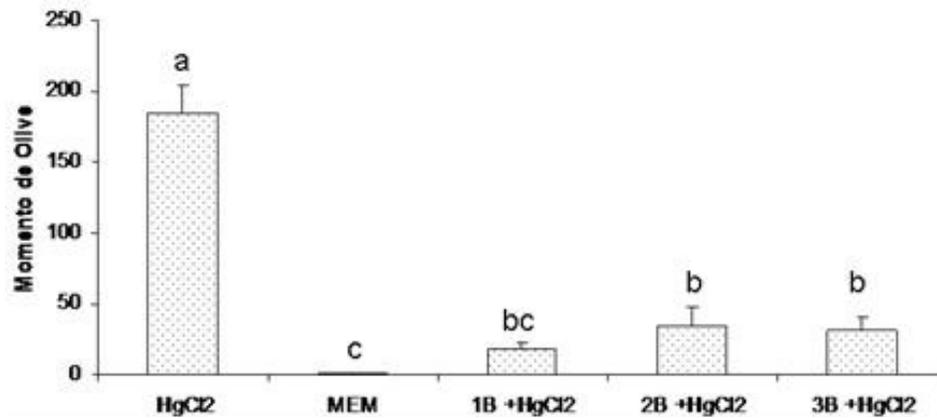


Figura 22. Actividad protectora de los compuestos antirradicales; 1B [3µg/mL], 2B [9 µg/mL], 3B [6 µg/mL]; los datos representan la media de 25 células por tratamiento ± DE, Tukey $p \leq 0.05$.

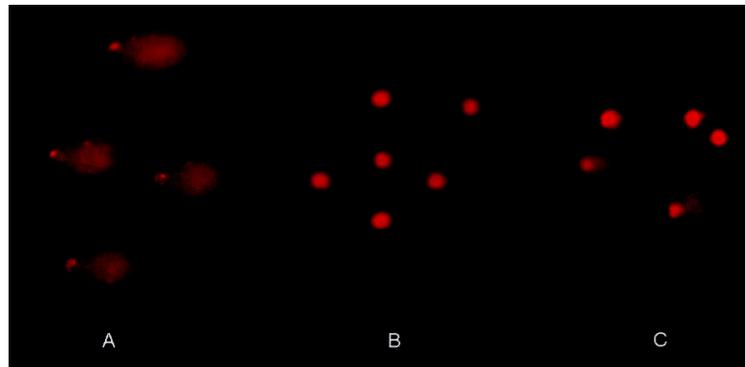


Figura 23. Cometas formados en rebanadas de riñón expuestas a: A = Control (+) (HgCl_2 , 15 µM); B = Control (-) (MEM/F12); C = HgCl_2 (15 µM) + 3µg/mL del compuesto 1B.

9. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se investigó el potencial quimioprotector de *H. drummondii* y de *S. maxima*, ambas especies consumidas por la población mexicana y a la cuales se les ha atribuido actividades terapéuticas relevantes.

Para la obtención de los extractos se optó por utilizar el metanol, ya que en estudios de tamizajes etnofarmacológicos este solvente resultó ser muy adecuado para la obtención de compuestos activos tanto citotóxicos como antirradicales/antioxidantes (Aligianis *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2005; Wan Chan *et al.*, 2008) cabe señalar que de *S. maxima* se obtuvieron dos extractos metanólicos, uno fue previamente desgrasado con éter etílico esto siguiendo las recomendaciones del trabajo previo realizado por Miranda *et al.*, (1998).

Los datos obtenidos del tamizaje preliminar, muestran que el extracto metanólico de *H. drummondii* resultó ser mejor que los extractos obtenidos a partir de *S. maxima*, esto tomando en cuenta su actividad antirradical y contenido de compuestos fenólicos; la microalga presentó un bajo contenido de ácidos fenólicos y solo trazas de flavonoides, lo cual se relaciona con la pobre actividad antirradical que presentó en las diversas técnicas utilizadas. En este trabajo se utilizaron los ensayos de DPPH y ABTS los cuales se basan en la donación de protones; la importancia de calcular el CAET por diferentes métodos es debido a que la presencia de color en los extractos puede provocar interferencias debido a que ciertos compuestos como la carotenos poseen un espectro de absorción similar al DPPH, así la diferencia de absorbancia entre el DPPH (520 nm) y ABTS (754 nm) nos da una idea más clara del potencial antirradical (Re *et al.*, 1999; Molyneux, 2004; Magalhães *et al.*, 2008). Es importante mencionar que la actividad secuestradora/antioxidante puede ejercerse por diferentes mecanismos por lo cual en este trabajo utilizamos a la par el ensayo FRAP para determinar el poder reductor, ya que se ha demostrado que la actividad de donar electrones (DPPH y ABTS), no

necesariamente está ligada con la capacidad para reducir metales (Gramza-Michałowska *et al.*, 2008). Continuando con nuestros resultados; los extractos metanólicos de *S. maxima* capturaron pobremente los radicales DPPH y ABTS y redujeron débilmente al Fe (III), esto contrasta fuertemente con los resultados presentados por Abd El-Baky *et al.*, (2009), donde equiparan el poder antioxidante de esta especie con el de antioxidantes sintéticos como el BHT y BHA, así, mientras nosotros obtuvimos valores de $CE_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$ en el ensayo de DPPH, los estudios realizados por ellos obtuvieron CE_{50} en el rango de 23.22 a 35.62 $\mu\text{g/mL}$, esto, dependiendo de las condiciones del cultivo y es precisamente este factor que pudiera ser clave para la diferencia de valores antirradicales (EC_{50}), mientras que Miranda *et al.*, (1998) y Abd El-Baky *et al.*, (2009), hacen uso de microalgas cultivadas en condiciones controladas (medios definidos, temperatura constante, fotoperiodos establecidos, etc) y procesadas en el momento justo antes de su uso (liofilizadas), en nuestro caso utilizamos una especie silvestre colectada y procesada en el centro de la república, presentándose una serie de factores desconocidos clave, como lo son su traslado, envasado y demás variables que pudieron haber afectado la composición química de la microalga, sin descartar una posible autooxidación, esto al recordar que estas microalgas tienen un alto contenido de ácidos grasos (Oliveira *et al.*, 1999; Colla *et al.*, 2004). Si bien los extractos de *S. maxima* no secuestraron eficientemente radicales libres, se encontró que mostraron una alta selectividad hacia las células cancerosas; cabe señalar que el proceso de desgrasado permitió aumentar de manera importante la selectividad con una CI_{50} de 561.40 $\mu\text{g/mL}$ para las células de cáncer de mama (MCF-7) y de 517.16 $\mu\text{g/mL}$ para las provenientes de cáncer cérvico-uterino (HeLa), mientras que para las células normales la CI_{50} fue $> 1500 \mu\text{g/mL}$, lo cual abre una importante ventana para la prevención y/o co-tratamiento de algunos tipos de cáncer frecuentes en la población femenina (Parkin *et al.*, 2005; Flores-Luna *et al.*, 2008; Gutiérrez-Delgado *et al.*, 2008). Es importante mencionar que otras investigaciones han demostrado la actividad selectiva hacia células cancerosas de extractos obtenidos de algas y microalgas (Harada *et al.*, 1997; Tan, 2007), así mismo es interesante señalar que *Spirulina platensis*, presentó actividad antiproliferativa sobre células HepG2 resistentes a doxorubicina (Roy *et al.*, 2007), por lo tanto, considerando la cercanía taxonómica-filogenética de esta *Spirulina*, es posible pensar que *S. maxima* pudiera presentar el mismo efecto biológico contra células resistentes a fármacos.

El poleo (*H. drummondii* L.) mostró una importante actividad secuestradora/antioxidante, la cual se correlaciona con su contenido de fenoles y flavonoides totales, es importante señalar que ya se ha demostrado la potente actividad antioxidante de las Lamiaceae (Zheng y Wang 2001, Shan *et al.*, 2005), al respecto, *H. drummondii* presentó un importante poder reductor al igual que otras Lamiaceae como *Melissa officinalis*, *Salvia officinalis*, *Ocimum basilicum* (Szollosi *et Szollosi* Varga, 2002).

El té y las infusiones herbarias son una fuente importante de compuestos fenólicos antioxidantes en nuestra dieta; recientemente se ha puesto gran atención a la capacidad secuestradora/antioxidante de muchos de los tes herbales tradicionales que en su mayoría forman parte de la familia Lamiaceae (Dimitrios 2006), por lo cual no es de extrañarse que esta familia ha sido de las más estudiadas en los últimos años. Como se menciono anteriormente, se observo una potente actividad secuestradora por parte del extracto metanólico de *H. drummondii* con una CE₅₀ de (25.12 µg/mL), esto en la captura del radical DPPH, similar a las obtenidas por extractos alcohólicos de otras Lamiaceae: *Galeopsis tetrahit* (26.24 µg/mL), *Leonurus cardiaca* (27.27 µg/mL), *Ballota nigra* (29.06 µg/mL) y superior a otras : *Marrubium vulgare* (36.69 µg/mL), *Salvia halophila* (67.73 µg/mL), *Lamium maculatum* (105.40 µg/mL), *Ocimum basilicum* (193 µg/mL), *Mentha arvensis* (195 µg/mL), *Orthosiphon stamineus* (209 µg/mL), *Coleus blumei* (261 µg/mL) (Matkowski *et al.*, 2008, Albayrak *et al.*, 2008, Zakaria *et al.*, 2008.).

Debido a los buenos resultados que se obtuvieron a partir del extracto crudo de *H. drummondii*, se realizó un fraccionamiento dirigido a la búsqueda de sus compuestos antirradicales, en donde las fracciones polares fueron las más activas, es decir la insoluble en DCM (18.12 µg/mL) e insoluble en DCM: MeOH (1:1) (11.32 µg/mL), a partir de esta última se obtuvieron 5 subfracciones (A → E), solo la subfracción B presentó una CE₅₀ < a 10 µg/mL, de esta subfracción se purificaron mediante CLAR semipreparativo tres compuestos que resultaron fuertemente activos 1B (1.56 µg/mL), 2B (3.43 µg/mL) y 3B (2.73 µg/mL). Para identificar su estructura se analizaron sus espectros de UV y RMN protón, en donde el compuesto 1B, mostró un par de dobletes a δ 7.05 y a δ 6.95, característicos del grupo aromático, así mismo

presentó absorbancia a 242 nm y un “hombro” a 300 nm, los datos concuerdan con los publicados con Kumaran y Karunakaran, (2007) y Sun *et al.*, (2007) con lo cual se identificó como ácido cafeico, el compuesto 2B mostró multipletes a δ 2.03 y a δ 2.15 y un doble doblete a δ 4.15, los cuales son característicos de un grupo quínico conjugado, esto junto con los dobletes a δ 6.28, δ 6.78 y δ 7.6 y el doble doblete a δ 6.99, aunado con su espectro de UV, tiempo de retención similar a estándares y similitud de señales descritas por por Kumaran y Karunakaran se identificó como el ácido clorogénico, el espectro del compuesto 3B se caracterizó por una serie de dobletes a δ 3.09, δ 6.60, δ 6.68, δ 6.91 y δ 7.13, un doble doblete a δ 2.99 y un par de singletes a δ 7.21 y a δ 6.75 absorbió a 242 nm con máximo de 319 nm los datos concuerdan con los publicados por Kumaran y Karunakaran, (2007) y Lu y Foo, (1999), se asignó como el ácido rosmarínico, es importante mencionar que ya ha sido demostrada la potente actividad antirradical/antioxidante de los tres ácidos fenólicos descritos (Matsuura *et al.*, 2003; Cheel *et al.*, 2005; Bektas *et al.*, 2007; Kadoma *et Fujisawa*, 2008), mientras que los compuestos 1D y 3D dan señales características de flavonoides, estas tiene en común dobletes en el rango de δ 6.9 y δ 7.33-7.55 y dobles dobletes entre δ 7.39- 7.57, característicos del anillo B; para el compuesto 1D se observa en la zona alifática δ (3,86-4,09) tres singletes correspondientes a los tres grupos metoxilo, los datos concuerdan con los publicados por Kuhn *et al.*, 1994, se identificó como sideritoflavona, cabe señalar que este compuesto ha mostrado actividad antiinflamatoria (Kim *et al.*, 2004), mientras que para el compuesto 3D se encontraron múltipletes entre δ 3.17-3.41 correspondientes a una azúcar, dos dobletes a δ 3.49 y a δ 3.91 se relacionan con la glucosa, su espectro de UV absorbe a 255 nm con hombro a 265 nm, los datos concuerdan con los publicados previamente por Parejo *et al.*, (2004) y por Chiruvella *et al.*, (2007), se trata de la luteoina 7- O – glucosa, este compuesto mostró efecto hepatoprotector contra daño inducido por CCl₄ (Qiusheng *et al.*, 2004) y antimicrobiano (Chiruvella *et al.*, 2007), el compuesto 2D dio señales típicas del ácido ácido p-hidroxibenzoico con dobletes a δ 6.88 y a δ 7.78 estos datos concuerdan con las reportadas por Cho *et al.*, (1998), este compuesto ha mostrado efecto hipoglicémico y antimicrobiano (Peungvicha *et al.*, 1998; Cho *et al.*, 1998). De la fracción aromática obtenida de la fracción soluble en DCM se detectaron mediante CG-EM tres monoterpenos aromáticos previamente descritos en la especie: mentol, pulegona y estragol (Firmage, 1981), estos compuestos han mostrado una amplia actividad

antimicrobiana (Bagamboula *et al.*, 2004; Duru *et al.*, 2004; Ben Arfa *et al.*, 2006), así como dos ácidos grasos esterificados.

Hasta este momento, nos enfocamos a la identificación de los compuestos secuestradores/antioxidantes presentes en *H. drummondii*, sin embargo, es de interés observar el posible rol quimioprotector que presentan estos, por lo cual decidimos analizar el efecto antiproliferativo del extracto, particiones polares y compuestos antirradicales sobre células cancerosas, esto partiendo de la premisa de que los antioxidantes poseen la cualidad de inhibir el crecimiento de diversos tipos de cáncer y de la regresión de algunas lesiones pre-cancerosas mediante vías comunes como: (1) inhibición del tumor por inmuno citocinas; (2) estímulo de genes supresores, tales como p53, y expresión o desregulación disminuida de oncogenes; (3) inhibición del angiogénesis del tumor con la inhibición de factores de angiogénesis, otros mecanismos parecen relacionarse con estímulos de la diferenciación celular y la apoptosis resultante de las células neoplásicas (Shklar G, 1998). Nuestros resultados sugieren (tabla No. IV) una estrecha relación entre actividad antirradical y efecto antiproliferativo; el extracto crudo de *H. drummondii* fue más activo que el extracto polar obtenido de otras Lamiaceae (*Teucrium polium*, *Melissa officinalis*, *Salvia palestina*, *S. spinosa*, *S. sclarea* y *S. dominica*) (Fiore *et al.*, 2006; Nematollahi-Mahani *et al.*, 2007; Canadanović-Brunet *et al.*, 2008). Por otra parte, el ácido cafeico mostró el mayor efecto citotóxico y selectividad hacia las células cancerosas. En cuanto a efectividad le siguió el ácido rosmarínico con cierta selectividad solo contra las células de cáncer cervicouterino, por último el ácido clorogénico no mostró selectividad contra ninguna de las células tumorales. Cabe señalar que este compuesto ha sido estudiado como posible quimioprotector ya que se ha sugerido su participación en la regresión de tumores cerebrales (Belkaid *et al.*, 2006), así mismo este compuesto junto con el ácido cafeico lograron inhibir la metilación inducida en la región del promotora del gene de *RARβ* en células MCF-7. El proceso de hipermetilación está fuertemente implicado en el desarrollo de cáncer de mama (Lee y Zhu, 2006), así mismo ha quedado demostrado que el ácido cafeico tiene la habilidad de inhibir la metástasis y el crecimiento tumoral de hígado (Chung *et al.*, 2004) y riñón (Jung *et al.*, 2007) e inhibir el crecimiento de células de cáncer de mama T47D (Kampa *et al.*, 2004); por otro lado el ácido rosmarínico tiene el potencial de inhibir el proceso de angiogénesis (Huang y Zheng, 2006), así como el

crecimiento de células de adenocarcinoma gástrico (MK1), melanoma murino (B16F10) y cervicoureterino (HeLa) (Yoshida *et al.*, 2005), es interesante señalar que el compuesto con mayor actividad antirradical fue también el más citotóxico, sin embargo, otros autores han encontrado una débil relación entre ambas actividades (Kinjo *et al.*, 2002), en el caso de nuestros experimentos al parecer el grupo catecol juega un papel fundamental para ambas actividades, esto mismo lo han propuesto otros investigadores (Nagao *et al.*, 2001; Gigante *et al.*, 2003).

Siguiendo con el posible rol como quimioprotector de los compuestos antirradicales de *H. drummondii* se analizó su capacidad para inhibir o atenuar el daño genotóxico inducido por HgCl₂; la capacidad genotoxicidad producida por estrés oxidativo se ha evaluado utilizando distintos procedimientos (Pérez Gastell y Pérez de Alejo, 2000), aunque no existe un método único y cada uno de ellos da cuenta en mayor o menor grado el potencial que poseen para generar daño. Sin embargo, las determinaciones realizadas *in vitro* sólo nos dan una idea de lo que ocurre en los seres vivos. En el caso del ensayo cometa en sus inicios se comenzó a estudiar con los linfocitos de sangre periférica, con el paso del tiempo se realizaron modificaciones y adecuaciones hasta llegar a utilizar modelos de celulares adherentes (Savi *et al.*, 2006), sin embargo surgieron interrogantes sobre los resultados obtenidos ya que muchos de estos modelos sufren limitaciones propias de su sistema ya que son incapaces de metabolizar de forma adecuada algunos tóxicos, esto al poseer deficiencias en sus rutas metabólicas tales como la del P450 (Aninat *et al.*, 2006). En este contexto, en años recientes el grupo encabezado por la Dra. Geny Groothuis, en Holanda, comenzó a estudiar el potencial del modelo de rebanadas de tejido murino para estudiar el efecto antígenotóxico de productos naturales, este modelo posee ventajas sustanciales a los modelos *in vitro* e *in vivo*, como lo son: la capacidad para mantener la arquitectura y homogeneidad celular presente en los tejidos, una adecuada y más realista metabolización del tóxico y una reducción muy importante en el número de animales a utilizar en los experimentos (Plazar *et al.*, 2007, 2008). Por estos motivos, nos propusimos implementar esta técnica e identificar el potencial de los compuestos aislados de *H. drummondii* para proteger contra el daño generado por estrés oxidativo.

Por otra parte, el mercurio es ampliamente utilizado en una gran variedad de procesos y sus aplicaciones incluyen aparatos médicos (termómetros, barómetros), aparatos eléctricos (baterías, switches, etc) y en la producción de varios productos farmacéuticos, por lo que las intoxicaciones por este metal pesado son muy frecuentes en el ser humano. El cloruro de mercurio es un metal de transición, promotor de radicales libres (RLS), estos tienden a dañar los compuestos bioquímicos y desencadenar estrés oxidativo (Girardi y Elias 1991; Clarkson y Magos, 2007; Valko *et al.*, 2005), por lo cual utilizamos HgCl_2 a concentración subtóxica como generador de estrés oxidativo, cabe mencionar que ya se ha aplicado este tóxico en estudios similares (Sharma *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2005).

Para visualizar de manera más eficaz los cometas obtenidos de rebanadas, es imprescindible poder disgregar la rebanada, el quipo de la Dra. Groothuis lo realiza de forma manual prensando la rebanada (grosor $\sim 100 \mu\text{m}$) entre el porta y cubreobjetos donde se prepara el ensayo, sin embargo, el equipo que utilizamos no nos permite obtener rebanadas de $100 \mu\text{m}$ de buena calidad, por lo que tuvimos que adecuar la técnica original, para esto, las rebanadas se disgregaron en un homogenizador de tejidos en presencia de buffer de sacarosa (Hymer y Kuff, 1964) para evitar que las células liberadas se lisaran, después de esto se continuó de forma rutinaria la técnica para la obtención y visualización de cometas.

Los resultados obtenidos (figura 22) muestran que los ácidos fenólicos de *H. drummondii* protegieron eficientemente el daño inducido por HgCl_2 ($15 \mu\text{M}$), siendo el ácido cafeico (1B) el que protegió de manera más eficaz, ya que a una concentración de $3 \mu\text{g/mL}$ no mostró diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo. Cabe también señalar que ya se ha demostrado la actividad protectora de este compuesto contra daño inducido por paracetamol (Janbaz *et al.*, 2004), por tert-butil hidroperóxido (Lima *et al.*, 2006), por luz ultravioleta (Neradil *et al.*, 2003) y por peróxido de hidrógeno (Kang *et al.*, 2006). Siguiendo con la efectividad de los ácidos antirradicales de *H. drummondii*, el ácido rosamrónico (3B) a una concentración de $6 \mu\text{g/mL}$ y el ácido clorogénico (2B) a una concentración de $9 \mu\text{g/mL}$ disminuyeron significativamente el daño generado por HgCl_2 . Se sabe que el ácido clorogénico protege el daño producido por el promotor tumoral TPA (Huang *et al.*, 1988) así mismo contra daño inducido por el

tetracloruro de carbono (Kapil *et al.*, 1994), por el herbicida paraquat (Tsuchiya *et al.*, 1996) y por hipoclorito (Gugliucci y Bastos, 2009); mientras que el ácido rosmarínico protege del daño causado por la aflatoxinas B1 y ocratoxina A (Renzulli *et al.*, 2004), por tert-butil hidroperóxido (Lima *et al.*, 2006), por peróxido de hidrógeno (Lee *et al.*, 2008) y contra daño inducido por dexorubicina (Furtado *et al.*, 2008), el efecto protector que mostraron estos ácidos fenólicos contra el daño inducido por HgCl₂ al parecer se relaciona con su actividad antirradical, esto ya lo han propuesto Rao y Sharma (2001) quienes encontraron que la vitamina E protege del daño reproductivo generado por cloruro de mercurio en ratones, mientras que Rao *et al.*, (2001), encontraron que la vitamina C protege del daño genotóxico inducido por HgCl₂ en sangre periférica, lo cual atribuyeron a la actividad antioxidante de la vitamina y a su naturaleza nucleofílica.

Los ácidos fenólicos pudieran inhibir y/o atenuar el daño generado por estrés oxidativo debido a varios factores entre ellos, su poder antioxidante y también secuestrando los radicales antes de que causen daño, como agentes quelantes de iones de metales de transición se unen a estos iones y reducen su capacidad para generar radicales libres y por último por su capacidad de inhibir, activar o proteger enzimas específicas en el organismo (Ferrari y Torres, 2003; Ferrari, 2004).

10. CONCLUSIONES

- ✓ Los extractos metanólicos obtenidos de *S. maxima* y *H. drummondii* inhiben selectivamente el crecimiento de células cancerosas MCF-7 y HeLa, comparado con el crecimiento de células normales Vero.
- ✓ La potente actividad antirradical de *H. drummondii* (EC_{50} 25.12 ± 0.7) se relaciona directamente con su contenido de ácido clorogénico, ácido rosmarínico y ácido caféico.
- ✓ Se reportan por primera vez el aislamiento de compuestos polares que presentan capacidad antirradical/ antigenotóxica y antiproliferativa de *H. drummondii*.
- ✓ El grupo catecol presente en los ácidos fenólicos aislados es el probable responsable de su actividad biológica.
- ✓ La identificación y cuantificación de los compuestos de *H. drummondii* permite disponer de una herramienta útil para el control de calidad de las preparaciones herbales a base de poleo.
- ✓ *H. drummondii* es una especie con potencial quimioprotector que pudiera prevenir o coadyuvar en el tratamiento de padecimientos crónicos como el cáncer.

11. PERSPECTIVAS

- ✓ Investigar como afectan las técnicas de cultivo, procesado (secado, molienda, etc.) y condiciones de almacenamiento, en el contenido de compuestos fenólicos y con la actividad antirradical/protectora de ambas especies con énfasis en *S.maxima*.
- ✓ Observar el posible efecto coadyuvante/sinérgico de *H.drummondii* y sus compuestos antirradicales junto con terapias clásicas en el tratamiento de enfermedades crónicas en modelos *in vitro*.
- ✓ Analizar la efectividad de *H. drummondii* como quimiprotector en un modelo inductor de carcinogénesis *in vivo*.
- ✓ Determinar los mecanismos moleculares mediante los cuales los ácidos fenólicos de *H. drummondii* inhiben y/o protegen contra daño inducido por estrés oxidativo.

12. LITERATURA CITADA

Abd El-Baky HH, El Baz FK, El-Baroty GS. 2009. Phenolics from *Spirulina maxima*: Over-production and *in vitro* protective effect of its phenolics on CCl₄ induced hepatotoxicity. J Med Plant Res 3(1):024-030.

Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A. 2004. Pesticides and oxidative stress: a review. Med Sci Monit 10(6):141-147.

Albayrak S, Aksoy A, Hamzaoglu E. 2008. Determination of Antimicrobial and Antioxidant Activities of Turkish Endemic *Salvia halophila* Hedge. Turk J Biol (32): 265-270.

Alia M, Mateos R, Ramos S, Lecumberri E, Bravo L, Goya L. 2006. Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). Eur J Nutr. 45(1):19-28.

Aligianis N, Mitaku S, Tsitsa-Tsardis E, Harvala C, Tsaknis I, Lalas S, Haroutounian S. 2003. Methanolic extract of *Verbascum macrurum* as a source of natural preservatives against oxidative rancidity. J Agric Food Chem. 51: 7308-7312.

Arnér E, Holmgren A. 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. Eur J Biochem 267 (20): 6102–6109.

Aninat C, Piton A, Glaise D, Le Charpentier T, Langouët S, Morel F, Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A. 2006. Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. Drug Metab Dispos 34(1):75-83.

Bagamboula CF, Uyttendaele M, Debevere J. 2004. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. Food Microbiology 21: 33–42

Ballester M. 1996. Anti-oxidants, free radicals, and health. A chemical, organic, and physical approach Med Clin (Barc) 107:509-515.

Bannister J, Bannister W, Rotilio G 1987. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. CRC Crit Rev Biochem 22 (2): 111-10

Beckman KB, Ames BN. 1998. The free radical theory of ageing matures. *Physiol Rev* 78: 547-581.

Bektas, T., Ozgur, E., Askin, A.H., Enes, A. 2007. Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm. *Food Chemistry* 100(3): 985-989.

Belay A. 2002. The Potential Application of *Spirulina* (Arthrospira) as a Nutritional and Therapeutic Supplement in Helath Management. *J Am Nutraceut Assoc* 5: 27-48.

Belkaid A, Currie JC, Desgagnés J, Annabi B. 2006. The chemopreventive properties of chlorogenic acid reveal a potential new role for the microsomal glucose-6-phosphate translocase in brain tumor progression. *Cancer Cell Int* 27;6:7.

Ben Arfa A, Combes S, Preziosi-Belloy L, Gontard N, Chalier P. 2006. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett Appl Microbiol* 43(2):149-54.

Bendich A. 1990. Antioxidant micronutrients and immune responses. *Ann N Y Acad Sci* 587:168-80.

Benzie IFF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem* 239:70-76.

Bode AM, Dong Z. 2006. Molecular and Cellular Targets. *Mol Carcinog* 45:422–430.

Canadanović-Brunet J, Cetković G, Djilas S, Tumbas V, Bogdanović G, Mandić A, Markov S, Cvetković D, Canadanović V. 2008. Radical scavenging, antibacterial, and antiproliferative activities of *melissa officinalis* L. extracts. *J Med Food* 11:133-143.

Cantú- Cabello M. 2001. Actividad Antioxidante de Extractos de 15 Plantas Nativas de Nuevo León. Tesis de licenciatura, U.A.N.L. Facultad de Ciencias Biológicas, México 20-30.

Chamorro-Cevallos G, Garduño-Siciliano L, Barrón BL, Madrigal-Bujaidar E, Cruz-Vega DE, Pages N. 2008. Chemoprotective effect of *Spirulina* (Arthrospira) against

cyclophosphamide-induced mutagenicity in mice. *Food Chem Toxicol* 46(2):567-574.

Chamorro G, Salazar M, Araujo KG, dos Santos CP, Ceballos G, Castillo LF. 2002. Update on the pharmacology of *Spirulina* (Arthrospira), an unconventional food. *Arch Latinoam Nutr* 52: 232-220.

Chan MM, Fong D, Soprano KJ, Holmes WF, Heverling H. 2003. Inhibition of growth and sensitization to cisplatin-mediated killing of ovarian cancer cells by polyphenolic chemopreventive agents. *J Cell Physiol* 194:63–70.

Chang C, Yang M, Wen H, Chern J. 2002, Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal* 10, 178-182.

Cheel J, Theoduloz C, Rodríguez J, Schmeda-Hirschmann G. 2005. Free radical scavengers and antioxidants from Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf). *Agric Food Chem* 6;53(7):2511-2517.

Chelikani P, Fita I, Loewen P 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci* 61 (2): 192–208.

Chiruvella KK, Mohammed A, Dampuri G, Ghanta RG, Raghavan SC. 2007. Phytochemical and Antimicrobial Studies of Methyl Angolensate and Luteolin-7-O-glucoside Isolated from Callus Cultures of *Soymida febrifuga*. *IJBS* 3(4): 269- 278.

Chisholm K, Bray BJ, Rosengren RJ. 2004. Tamoxifen and epigallocatechin gallate are synergistically cytotoxic to MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Anticancer Drugs* 15:889–897.

Cho JY, Moon JH, Seong KY, Park KH. 1998. Antimicrobial activity of 4-hydroxybenzoic acid and trans 4-hydroxycinnamic acid isolated and identified from rice hull. *Biosci Biotechnol Biochem* 62(11):2273-2276.

Chung TW, Moon SK, Chang YC, Ko JH, Lee YC, Cho G, Kim SH, Kim JG, Kim CH. 2004. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *FASEB J* 18(14):1670-1681.

Clarkson TW, Magos L. 2007. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit Rev Toxicol* 36(8):609-662.

Colla LM, Bertolin TE, Costa JA. 2004. Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. *Z Naturforsch [C]* 59(1-2):55-59.

Collins AR, Dusinska M, Gedik CM, Stetina R. 1996. Oxidative damage to DNA. Do we have a reliable biomarker? *Environm Health Persp* 104:465-469.

Conney AH. 2003. Enzyme induction and dietary chemicals as approaches to cancer chemoprevention: the Seventh DeWitt S. Goodman Lecture. *Cancer Res* 63(21):7005-3701.

aCooper R, Morr  DJ, Morr  DM. 2005. Medicinal benefits of green tea: Part I. Review of noncancer health benefits. *J Altern Complement Med* 11:521-528.

bCooper R, Morr  DJ, Morr  DM. 2005. Medicinal benefits of green tea: part II. review of anticancer properties. *J Altern Complement Med* 11:639-652.

Conforti F, Loizzo MR, Statti AG, Menichini F. 2007. Cytotoxic activity of antioxidant constituents from *Hypericum triquetrifolium* Turra. *Nat Prod Res* 21(1):42-46.

Cover CM, Hsieh SJ, Cram EJ, Hong C, Riby JE, Bjeldanes LF, Firestone GL. 1999. Indole-3-carbinol and tamoxifen cooperate to arrest the cell cycle of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 59:1244-51.

Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL 1987. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 107:526-45.

Das U. 2002. A radical approach to cancer. *Med Sci Monit* 8(4):RA79-92.

Dasgupta T, Banejee S, Yadav PK, Rao AR. 2001. Chemomodulation of carcinogen metabolising enzymes, antioxidant profiles and skin and forestomach papillomagenesis by *Spirulina platensis*. *Mol Cell Biochem* 226:27-38.

De Flora S. 1997. Mechanisms of inhibitor of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 402:151-158.

Delgado Saucedo JI, Villaseñor García MM, Santerre A, Puebla Pérez AM. 2008 Fracciones de *Bursera fagaroides* con alto contenido de daponinas y flavonoides: Evaluación de su actividad citotóxica en linfoma L5178Y y proliferativa en esplenocitos de ratón. Rev. Latinoamer. Quím (36). 74.

Dimitrios B. 2006. Sources of natural phenolic antioxidants. Trends Food Sci Technol 17:505–512.

Domínguez XA. 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. Ed. LIMUSA. 1era Ed. Págs 33-40.

Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev 82(1):47-95.

Duru ME, Oztürk M, Uğur A, Ceylan O. 2004. The constituents of essential oil and in vitro antimicrobial activity of *Micromeria cilicica* from Turkey. J Ethnopharmacol 94(1):43-8

El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA, Elbim C. 2005. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 53(3):199-206.

Estrada E, Villarreal JA, Cantú C, Cabral I, Scout L, Yen C. 2007. Ethnobotany in the Cumbres de Monterrey National Park, Nuevo León, México. J. Ethnobiol. Ethnomed 3, 8.

Fedkovic Y, Astre C, Pinguet F, Gerber M, Ychou M, Pujol H. 1993. *Spirulina et cancer*. Bull Inst Ocean 12:117-120.

Ferrari CK, Torres EA. 2003. Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. Biomed Pharmacother 7(5-6):251-60.

Ferrari CK. 2004. Functional foods, herbs and nutraceuticals: towards biochemical mechanisms of healthy aging. Biogerontology 5(5):275-89.

Finkel T, Holbrook NJ. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature. 408(6809):239-47.

Fiore G, Nencini C, Cavallo F, Capasso A, Bader A, Giorgi G, Micheli L. 2006. *In vitro* antiproliferative effect of six *Salvia* species on human tumor cell lines. *Phytother Res* 20(8):701-703.

Firmage HD. 1981. Environmental influences on the monoterpene variation in *Hedeoma drummondii*. *Biochem Syst Ecol* 9: 53-58.

Flores-Luna L, Salazar-Martínez E, Duarte-Torres RM, Torres-Mejía G, Alonso-Ruiz P, Lazcano-Ponce E. 2008. Prognostic factors related to breast cancer survival. *Salud Publica Mex* 50:119-125.

Furtado MA, de Almeida LC, Furtado RA, Cunha WR, Tavares DC. 2008. Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. *Mutat Res.* 657(2):150-154.

García Bacallao L, García Gómez LV, Rojo Domínguez DM, Sánchez García E. 2001. Plantas con propiedades antioxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed* 2001 20(3):231-5

Gigante B, Santos C, Silva AM, Curto MJ, Nascimento MS, Pinto E, Pedro M, Cerqueira F, Pinto MM, Duarte MP, Laires A, Rueff J, Gonçalves J, Pegado MI, Valdeira ML. 2003. Catechols from abietic acid synthesis and evaluation as bioactive compounds. *Bioorg Med Chem.* 17;11(8):1631-8.

Girardi G, Elias MM. 1991. Effectiveness of N-acetylcysteine in protecting against mercuric chloride-induced nephrotoxicity. *Toxicology.* 67(2):155-64.

González Ferrara M. 1998. *Plantas medicinales del Noreste de México*. México: Editorial El Sol. 24.

Gramza-Michałowska A, Abramowski Z, Jovel E, Hes M. 2008. Antioxidant potential of herbs extracts and impact on hepg2 cells viability. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment* 7(4): 61-72.

Griffin, S, Bhagooli R. 2004. Measuring antioxidant potential in corals using the FRAP assay. *Exp. Mar. Biol. Ecol.* 302, 201-211.

Gugliucci A, Bastos DH. 2009. Chlorogenic acid protects paraoxonase 1 activity in high density lipoprotein from inactivation caused by physiological concentrations of hypochlorite. *Fitoterapia* 80(2):138-42.

Gutiérrez-Delgado C, Báez-Mendoza C, González-Pier E, de la Rosa AP, Witlen R. 2008. Generalized cost-effectiveness of preventive interventions against cervical cancer in Mexican women: results of a Markov model from the public sector perspective. *Salud Publica Mex* 50:107-118.

Gutteridge JM, Rowley DA, Halliwell B. 1982. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals and lipid peroxidation in the presence of iron salts. Detection of 'catalytic' iron and anti-oxidant activity in extracellular fluids. *Biochem J*. 15;206(3):605-609.

Halliwell B. 1993. The chemistry of free radicals. *Toxicol Ind Health* 9(1-2):1-21.

Halliwell B, Whiteman M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*. 142:231- 255.

Harada H, Noro T, Kamei Y. 1997. Selective antitumor activity in vitro from marine algae from Japan coasts. *Biol Pharm Bull* 20(5); 541-456.

Hernández-Corona A., Nieves I., Meckes M., Chamorro G., Barron BL. 2002. Antiviral activity of *Spirulina maxima* against herpes simplex virus type 2. *Antiviral Res* 56:279-285.

Hogg N. 1998. Free radicals in disease. *Semin Reprod Endocrinol* 16(4):241-248.

Huang MT, Smart RC, Wong CQ, Conney AH. 1988. Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res* 48(21):5941-5946.

Huang SS, Zheng RL. 2006. Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action *in vitro*. *Cancer Lett* 8;239(2):271-280.

Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. 2003. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer* 3(4):276-285.

Hymer WC, Kuff EL. 1964. Isolation of nuclei from mammalian tissues through the use of triton x-100. *J Histochem Cytochem* 12:359-363.

Hwang JT, Ha J, Park OJ. 2005. Combination of 5-fluorouracil and genistein induces apoptosis synergistically in chemo-resistant cancer cells through the modulation of AMPK and COX-2 signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 332:433–440.

Irving, RS. 1980. The systematics of *Hedeoma* (Labiatae). *Sida* 8 218-295.

Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K, Watanabe M. 1995. Novel cell proliferation and cytotoxicity assays using a tetrazolium salt that produces a water-soluble formazan dye. *In vitro Toxicol* 8: 187-190.

Janbaz KH, Saeed SA, Gilani AH. 2004. Studies on the protective effects of caffeic acid and quercetin on chemical-induced hepatotoxicity in rodents. *Phytomedicine* 11(5):424-430.

Jazirehi AR, Bonavida B. 2004. Resveratrol modifies the expression of apoptotic regulatory proteins and sensitizes non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma cell lines to paclitaxel-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther* 3:71–84.

Jung JE, Kim HS, Lee CS, Park DH, Kim YN, Lee MJ, Lee JW, Park JW, Kim MS, Ye SK, Chung MH. 2007. Caffeic acid and its synthetic derivative CADPE suppress tumor angiogenesis by blocking STAT3-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells. *Carcinogenesis* 28(8):1780-1787.

Kadoma Y, Fujisawa S. 2008. A comparative study of the radical-scavenging activity of the phenolcarboxylic acids caffeic acid, p-coumaric acid, chlorogenic acid and ferulic acid, with or without 2-mercaptoethanol, a thiol, using the induction period method. *Molecules* 15;13(10):2488-2499.

Kampa M, Alexaki VI, Notas G, Nifli AP, Nistikaki A, Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Kouimtzoglou E, Blekas G, Boskou D, Gravanis A, Castanas E. 2004. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Res* 6(2):63-74.

Kang KA, Lee KH, Zhang R, Piao M, Chae S, Kim KN, Jeon YJ, Park DB, You HJ, Kim JS, Hyun JW. 2006. Caffeic acid protects hydrogen peroxide induced cell damage in WI-38 human lung fibroblast cells. *Biol Pharm Bull* 29(9):1820-1824.

Kapil A, Koul IB, Suri OP. 1994. Antihepatotoxic effects of chlorogenic acid from *Anthocephalus cadamba*. *Phytother. Res.* 9,(3), 189-193.

Kelloff GJ, Hawk ET, Crowell JA, Boone CW, Nayfield SG, Perloff M, Steele VE, Lubet RA, Sigman CC. 1996. Strategies for identification and clinical evaluation of promising chemopreventive agents. *Oncology* 10: 1471–1484.

Kelloff GJ, Crowell JA, Steele VE, Lubet RA, Malone WA, Boone CW, Kopelovich L, Hawk ET, Lieberman R, Lawrence JA, Ali I, Jaye LV, Sigman CC. 2006. Progress in Cancer Chemoprevention: Development of Diet-Derived Chemopreventive Agents. *The J. of Nutr* 467- 471.

Kinjo J, Nagao T, Tanaka T, Nonaka G, Okawa M, Nohara T, Okabe H. 2002. Activity-guided fractionation of green tea extract with antiproliferative activity against human stomach cancer cells. *Biol Pharm Bull* 25(9):1238-12340,

Kishore K.Chiruvella, Arifullah Mohammed, Gayathri Dampuri, Rama Gopal Ghanta,Sathees C. Raghavan. 2007. 2 Phytochemical and Antimicrobial Studies of Methyl Angolensate and Luteolin-7-O-glucoside Isolated from Callus Cultures of *Soymida febrifuga* . *Int J Biomed Sci* (3): 269-278

Konca K, Lankoff A, Banasik A, Lisowska H, Kuszewski, T, Gózdź S, Koza Z, Wojcik A. 2003. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Mutat Res* 534(1-2):15-20.

Konigsberg- Fainstein M, 2008. Radicales libres y estrés oxidativo. *Manula moderno* 347-459.

Kuhnt, M. Rimpler, H. Heinrich, M. Lignans and other compounds from the Mixe Indian medicinal plant *Hyptis verticillata*.1994. *Phytochemistry* 36 (2): 485-489.

Kumar M, Kumar Sharma M, Kumar A. 2005. *Spirulina fusiformis*: A Food Supplement against Mercury Induced Hepatic Toxicity. *J.Health Sci* 51(4), 424-430.

Kumaran, A. Karunakaran, R.J. 2007. Activity-guided isolation and identification of free radical-scavenging components from an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chem.* 100, 356-361.

Kwon KH, Barve A, Yu S, Huang MT, Kong AN. 2007. Cancer chemoprevention by phytochemicals: potential molecular targets, biomarkers and animal models *Acta Pharmacol Sin* 28(9):1409-1421.

Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. 2004. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J Pharmacol Sci* 96(3):229-245.

Lampe JW. 1999. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am J Clin Nutr* 70:475- 490.

Lancaster JR jr. 2006. Nitroxidative, nitrosative, and nitrative stress: kinetic predictions of reactive nitrogen species chemistry under biological conditions. *Chem Res Toxicol* 19: 1160–1174.

Larrosa M, Llorach R, Espín JC, Tomás -Barberán FA. 2002. Increase of antioxidant activity of tomato juice upon functionalisation with vegetable byproduct extracts. *Lebens Wiss Technol* 35:532-542.

Lee HJ, Cho HS, Park E, Kim S, Lee SY, Kim CS, Kim do K, Kim SJ, Chun HS. 2008. Rosmarinic acid protects human dopaminergic neuronal cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Toxicology* 4;250(2-3):109-15.

Lee J, Koo N, Min DB. 2004. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety* 3:21-33.

Lee WJ, Zhu BT. 2006. Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols *Carcinogenesis* 27(2):269-277.

Lev-Ari S, Strier L, Kazanov D, Madar-Shapiro L, Dvory-Sobol H, Pinchuk I, Marian B, Lichtenberg D, Arber N. 2005. Celecoxib and curcumin synergistically inhibit the growth of colorectal cancer cells. *Clin Cancer Res* 11:6738–6744.

Li Y, Ahmed F, Ali S, Philip PA, Kucuk O, Sarkar FH. 2005. Inactivation of nuclear factor kappaB by soy isoflavone genistein contributes to increased apoptosis induced by chemotherapeutic agents in human cancer cells. *Cancer Res* 65:6934–6942.

Lima CF, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C. 2006. Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: relevance of glutathione levels. *Life Sci* 79(21):2056-2068.

Liu LZ, Hu XW, Xia C, He J, Zhou Q, Shi X, Fang J, Jiang BH. 2006. Reactive oxygen species regulate epidermal growth factor-induced vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1alpha expression through activation of AKT and P70S6K1 in human ovarian cancer cells. *Free Radic Biol Med* 41(10):1521-3153.

- Lu, Y, Foo LY. 1999. Rosmarinic acid derivatives from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry* 51, 91-94.
- Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JL. 2008. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal Chim Acta.* 14 613(1):1-19.
- Malins DC, Polissar NL, Gunselman SJ. 1996. Progression of human breast cancers to the metastatic state is linked to hydroxyl radical-induced DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(6):2557-2563.
- Manoj G, Venkataraman LV, Srinivas L. 1991. Antioxidant properties of *Spirulina* (*Spirulina platensis*) In: Seshadri and Bai. *Spirulina*. MCRC 48-154.
- Matés JM. 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 16 153(1-3):83-104.
- Matés JM, Sánchez-Jiménez FM. 2000. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 32(2):157-170.
- Matkowski A, Tasarz P, Szypuła E. 2008. Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from Lamiaceae, subfamily Lamioideae. *J. Med. Plant. Res* (11): 321-330.
- Matsuura H, Chiji H, Asakawa C, Amano M, Yoshihara T, Mizutani J. 2003. DPPH radical scavengers from dried leaves of oregano (*Origanum vulgare*). *Biosci Biotechnol Biochem* 67(11):2311-2316.
- Mayne ST. 2003. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J Nutr* 133:933-940.
- Meister A. 1988. Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 263 (33): 17205 – 17208.
- Miranda MS., Cintra RG., Barros SB., Mancini FJ. 1998. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Braz J Med Biol Res* 31:1075-1079.
- Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol* 26(2) : 211-219.

Mondragón BMA. 1984. Cultivo y uso del alga tecuitlatl (*Spirulina maxima*), estudio recapitulativo. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México. 49.

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application on proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Meth* 65:55-60.

Nagao T, Abe F, Okabe H. 2001. Antiproliferative constituents in the plants 7. Leaves of *Clerodendron bungei* and leaves and bark of *C. trichotomum*. *Biol Pharm Bull* 24(11):1338-1341.

Narayanan BA, Narayana NK, Stoner GD, Bullock BP. 2002. Interactive gene expression pattern in prostate cancer cells exposed to phenolic antioxidants. *Life Sci* 70:1821-1839.

Nematollahi-Mahani SN, Rezazadeh-Kermani M, Mehrabani M, Nakhaee N. 2007. Cytotoxic Effects of *Teucrium polium* on Some Established Cell Lines. *Pharm. Biol* 45(5):295-298.

Neradil J, Veselsk R, Slanina J. 2003. UVC-Protective Effect of Caffeic Acid on Normal and Transformed Human Skin Cells in Vitro. *Folia Biologica (Praha)* 49, 197-202.

Notarbartolo M, Poma P, Perri D, Dusonchet L, Cervello M, D'Alessandro N. 2005. Antitumor effects of curcumin, alone or in combination with cisplatin or doxorubicin, on human hepatic cancer cells. Analysis of their possible relationship to changes in NF-kB activation levels and in IAP gene expression. *Cancer Lett* 224:53-65.

Oliveira MACL, Monteiro MPC, Robbs PG, Leite SGF. 1999. Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. *Aquacult. Int* 7: 261-275.

Parejo I, Caprai E, Bastida J, Viladomat F, Jáuregui O, Codina C. 2004. Investigation of *Lepechinia graveolens* for its antioxidant activity and phenolic composition. *J Ethnopharmacol* 94(1):175-184.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P: Global cancer statistics. 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55:74-108.

Pérez- Gastell, PL, Pérez de Alejo, JL. 2000. Métodos para medir el daño oxidativo. Rev. cuba. med. Mil 29(3):192-198.

Petruševski VM, Najdoski MZ. 2004. More than a century after the free radicals discovery: triphenylmethyl – the first known free radical. Bull. Chem. Technol. Macedonia 23(2): 201–205.

Peungvicha P, Temsiririrkkul R, Prasain JK, Tezuka Y, Kadota S, Thirawarapan SS, Watanabe H. 1998. 4-Hydroxybenzoic acid: a hypoglycemic constituent of aqueous extract of *Pandanus odoratus* root. J Ethnopharmacol 62(1):79-84.

Pietta PG. 2000. Flavonoids as antioxidants. J Nat Prod 63(7):1035-1042.

Plazar J, Hreljac I, Pirih P, Filipic M, Groothuis GM. 2007. Detection of xenobiotic-induced DNA damage by the comet assay applied to human and rat precision-cut liver slices. Toxicol In Vitro 21(6):1134-1142.

Plazar J, Filipic M, Groothuis GM. 2008. Antigenotoxic effect of Xanthohumol in rat liver slices. Toxicol In Vitro 22(2):318-327.

Prior RL. 2003. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. Am J Clin Nutr 78:570-578.

Prior RL, Wu X, Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J Agric Food Chem 53:4290- 4302.

Pszczola DE. 2003. Getting more fruits and vegetables into foods. Food Tech 57:52-63.

Qiusheng Z, Xiling S, Xubo, Meng S, Changhai W. 2004. Protective effects of luteolin-7-glucoside against liver injury caused by carbon tetrachloride in rats. Pharmazie 59(4):286-289.

Rao MV, Sharma PS. 2001. Protective effect of vitamin E against mercuric chloride reproductive toxicity in male mice. Reprod Toxicol 15(6):705-712.

Rao MV, Chinoy NJ, Suthar MB, Rajvanshi MI. 2001. Role of ascorbic acid on mercuric chloride-induced genotoxicity in human blood cultures. *Toxicol In Vitro* 15(6):649-654.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26(9-10):1231-1237.

Renzulli C, Galvano F, Pierdomenico L, Speroni E, Guerra MC. 2004. Effects of rosmarinic acid against aflatoxin B1 and ochratoxin-A-induced cell damage in a human hepatoma cell line (Hep G2). *J Appl Toxicol* 24(4):289-296.

Roberfroid MB. 2002. Global view on functional foods: European perspectives. *Br J Nutr* 88:133-138.

Rogers DJ. 1980. Lakota names and traditional uses of native plants by Sicangu (Brule) people in the Rosebud area, South Dakota. Rosebud Educational Society, St. Francis, SD. 49.

Ruiz Flores LE., Madrigal-Bujaidar E., Salazar M., Chamorro G. 2003. Anticlastogenic effect of *Spirulina maxima* extract on the micronuclei induced by maleic hydrazide in *Tradescantia*. *Life Sci* 72:1345-51.

Roy KR, Arunasree KM, Reddy NP, Dheeraj B, Reddy GV, Reddanna P. 2007. Alteration of mitochondrial membrane potential by *Spirulina platensis* C-phycoerythrin induces apoptosis in the doxorubicin-resistant human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *Biotechnol Appl Biochem* 47:159-167.

Salazar M, Martínez E, Madrigal E, Ruiz LE, Chamorro GA. 1998. Subchronic toxicity study in mice fed *Spirulina maxima*. *J Ethnopharmacol* 62(3):235-241.

Sánchez C. 1981. La herbolaria medicinal: su mercadeo en el área de Monterrey, Nuevo León, México, un estudio Etnobotánico. Tesis de Licenciatura, UANL. Facultad de Ciencias Biológicas, México. 20-25.

Sánchez-Moreno C. 2002. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Tech Int* 8:121-137.

Sarkar FH, Li Y. 2006. Using chemopreventive agents to enhance the efficacy of cancer therapy. *Cancer Res* 1;66(7):3347-3350.

Sarkar FH, Li Y. 2007. Targeting multiple signal pathways by chemopreventive agents for cancer prevention and therapy. *Acta Pharmacol Sin* 28(9):1305-15.

Savi LA, Barardi CR, Simões CM. 2006. Evaluation of antiherpetic activity and genotoxic effects of tea catechin derivatives. *Agric Food Chem* 5;54(7):2552-7.

Schlesier K, Harwat M, Böhm V, Bitsch R. 2002. Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods. *Free Rad Res* 36:177-187.

Schmeda-Hirschmann G., Rodriguez J.A., Theoduloz C., Astudillo S.L., Feresin G.E., Tapia, A. 2003. Free radical scavengers and antioxidants from *Peumus boldus* Mol. ("Boldo"). *Free Radic Res* 37: 447–452.

Schwartz J., Shklar G. 1987. Regression of experimental hamster cancer by beta carotene and algae extracts. *Oral Maxillofac Surg* 45:510-515.

Sharma MK, Kumar M, Kumar A. 2002. *Ocimum sanctum* aqueous leaf extract provides protection against mercury induced toxicity in Swiss albino mice. *Indian J Exp Biol* 40(9):1079-1082.

Shklar G. 1998. Mechanisms of cancer inhibition by anti-oxidant nutrients. *Oral Oncol* 34(1):24-29.

Sieck GC. 2004. Oxygen sensing in health and disease. *J Appl Physiol* 96(1):1-2.

Schlesier K, Harwat M, Böhm V, Bitsch R. 2002. Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods. *Free Rad Res* 36:177-187.

Simpson JA, Cheeseman KH, Smith SE, Dean RT. 1988. Free-radical generation by copper ions and hydrogen peroxide. Stimulation by HEPES buffer. *Biochem J* 1;254(2):519-523.

Singh N., McCoy M., Tice R., Schneider L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-191.

Singleton VL, Rossi Jr, JA. 1965. Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic* (16): 144–158.

Skerget Mojka, Kotnik, P., Hadolin, M., Rizner Hras, A., Simonic, M., & Knez, Z. 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavons and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chem* 89: 191-198.

Sun LX, Fu WW, Ren J, Xu L, Bi KS, Wang MW. 2006. Cytotoxic constituents from *Solanum lyratum*. *Arch Pharm Res* 29(2):135-139

Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. 1995. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 13;270(5234):296–299.

Szollosi R. Szollosi- Varga I. 2002. Total antioxidant power in some species of Labiatae (Adaptation of FRAP method). *Acta Biol. Szegediensis* 46(3-4):125-127

Tan LT. 2007. Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. *Phytochemistry* 68 (7):954-979.

Tan ML, Sulaiman SF, Najimuddin N, Samian MR, Tengku Muhammad TS.(2005). Methanolic extract of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) induces apoptosis in breast carcinoma, T47-D cell line. *J Ethnopharmacol* 96: 287–294.

Tanos V, Brzezinski A, Drize O, Strauss N, Peretz T. 2002. Synergistic inhibitory effects of genistein and tamoxifen on human dysplastic and malignant epithelial breast cells *in vitro* . *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 102: 188–194.

Torres- Duran PV., Miranda-Zamora R., Paredes-Carbajal MC., Mascher D., Diaz-Zagoya JC., Juarez-Oropeza MA. 1998. *Spirulina maxima* prevents induction of fatty liver by carbon tetrachloride in the rat. *Biochem Mol Biol* 44:787-793.

Tsuchiya T, Suzuki O, Igarashi K. 1996. Protective effects of chlorogenic acid on paraquat-induced oxidative stress in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 60(5):765-768.

Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 266(1-2):37-56..

Valko M, Morris H, Cronin MT. 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 12(10):1161-208.

Valko M, Rhodes CJ, Moncola J, Izakovic M, Mazura M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact* 160: 1–40.

Velázquez- Paniagua M, Prieto- Gómez B, Contreras Pérez R. 2004. El envejecimiento y los radicales libres. *Ciencias* (75): 36-43.

Vestal PA. 1952. The Ethnobotany of the Ramah Navaho. *Papers Peabody mus* 40: 1-94.

Viveros Valdez JE. 2004. Actividad bactericida de *Hedeoma drummondii* y *Ocimum basilicum* sobre bacterias de importancia en alimentos y su toxicidad sobre *Artemia salina*. Tesis de licenciatura, U.A.N.L. Facultad de Ciencias Biológicas, México. 20-30.

Wan Chan S, Li S, Yee Kwok C, Forster Benzie I F, Tong Szeto Y, Jian Guo D, Ping He X, Hoi Fu Yu P. 2008. Antioxidant Activity of Chinese Medicinal Herbs. *Pharm Biol* 46 (9): 587-595.

Yoshida M, Fuchigami M, Nagao T, Okabe H, Matsunaga K, Takata J, Karube Y, Tsuchihashi R, Kinjo J, Mihashi K, Fujioka T. 2005. Antiproliferative constituents from *Umbelliferae* plants VII. Active triterpenes and rosmarinic acid from *Centella asiatica*. *Biol Pharm Bull* 28(1):173-175.

Zakaria Z, Aziz R, Lachimanan YL, Sreenivasan A, Rathinam X. 2008. Antioxidant Activity of *Coleus Blumei*, *Orthosiphon Stamineus*, *Ocimum basilicum* and *Mentha arvensis* from Lamiaceae Family. *IJNES* 2 (1): 93-95.

Zheng W, Wang, SY. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric Food Chem* 49(11), 5165–5170.

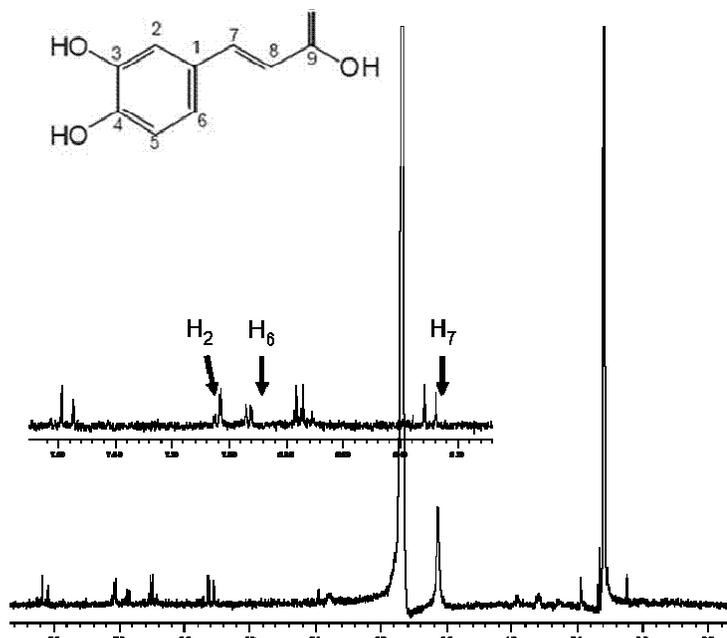
Zhang XY, Li WG, Wu YJ, Zheng TZ, Li W, Qu SY, Liu NF. 2005. Proanthocyanidin from grape seeds potentiates anti-tumor activity of doxorubicin via immunomodulatory mechanism. *Int Immunopharmacol* 5:1247–57.

Zhi-gang Z, Zhi-ili L. Xue-xian L. 1997. Study on the isolation, purification and antioxidation properties of polysaccharides from *Spirulina maxima*. *Acta Botánica Clínica* 39:77-81.

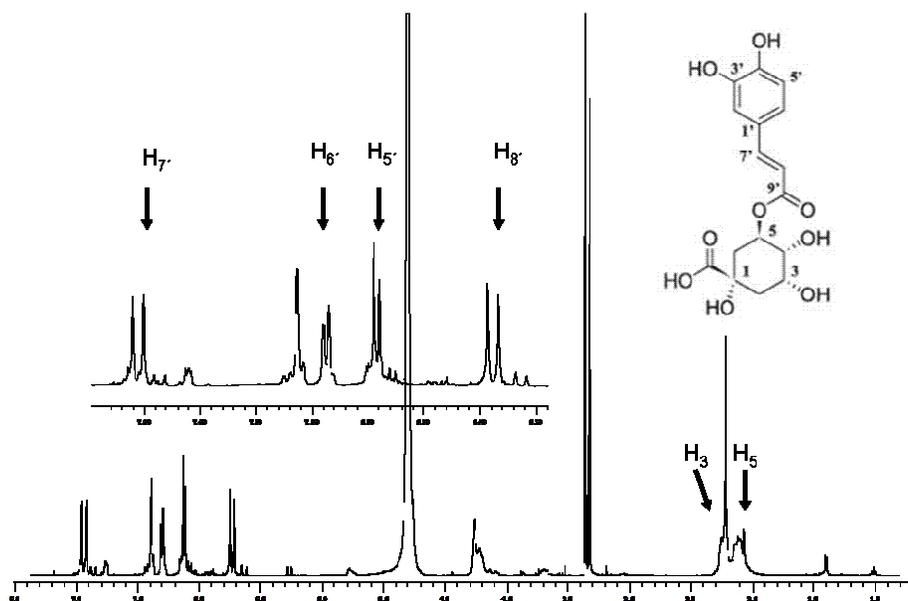
Zgórka G, Głowniak K. 2001. Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. *J J, Phar Biomed Anal* 26: 79-87.

13. APÉNDICES

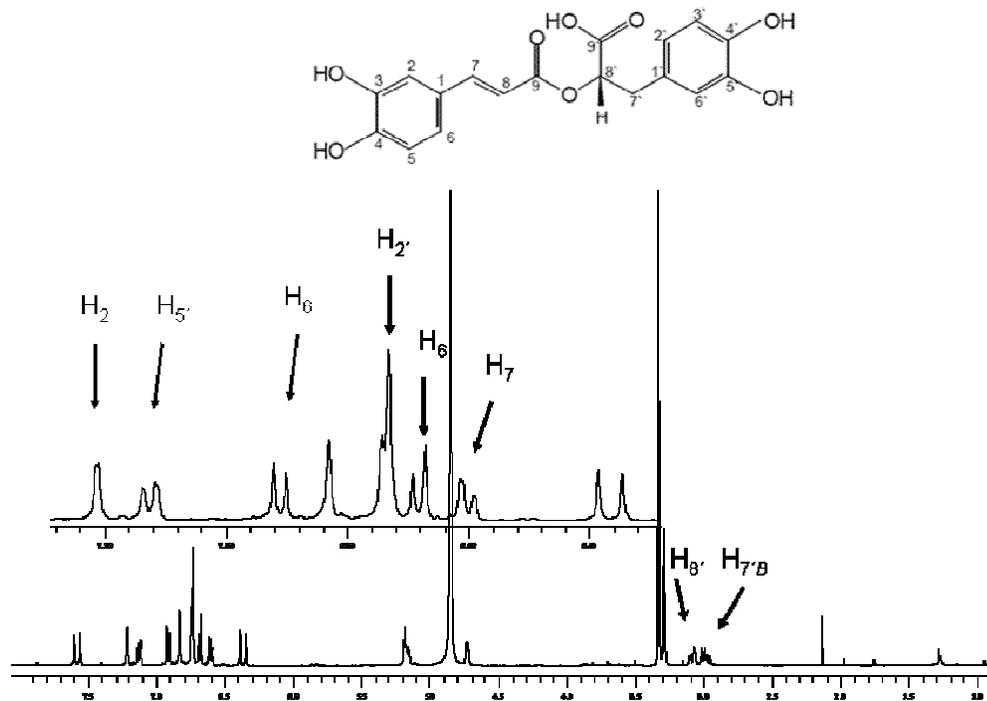
13.1 Espectros de los Compuestos Identificados.



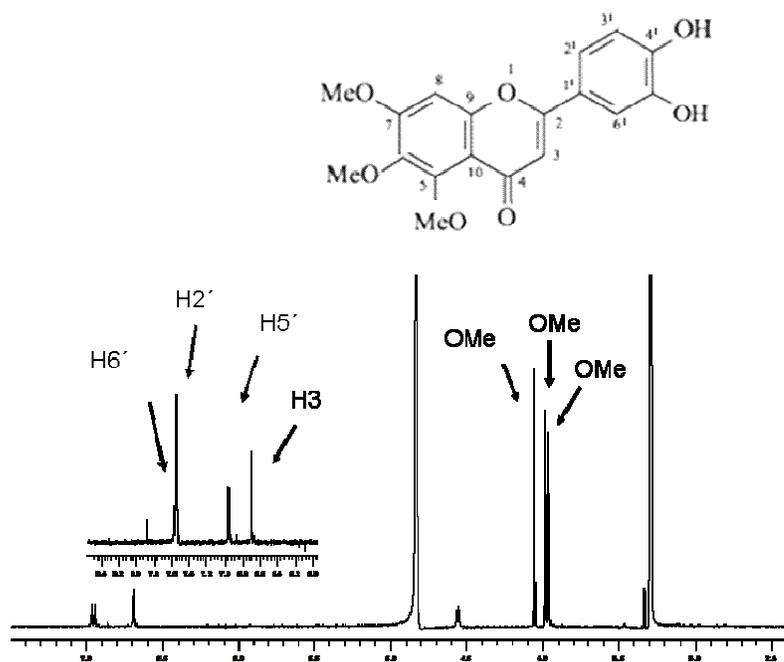
Espectro de RMN ^1H del compuesto 1B.



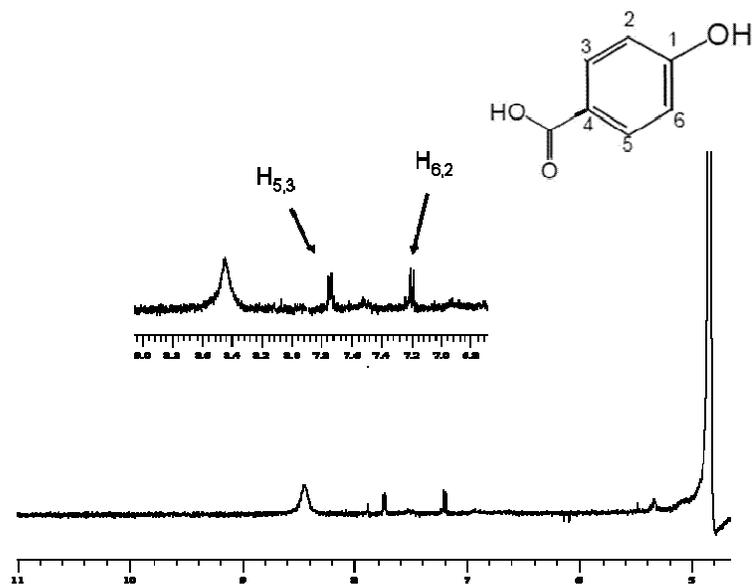
Espectro de RMN ^1H del compuesto 2B.



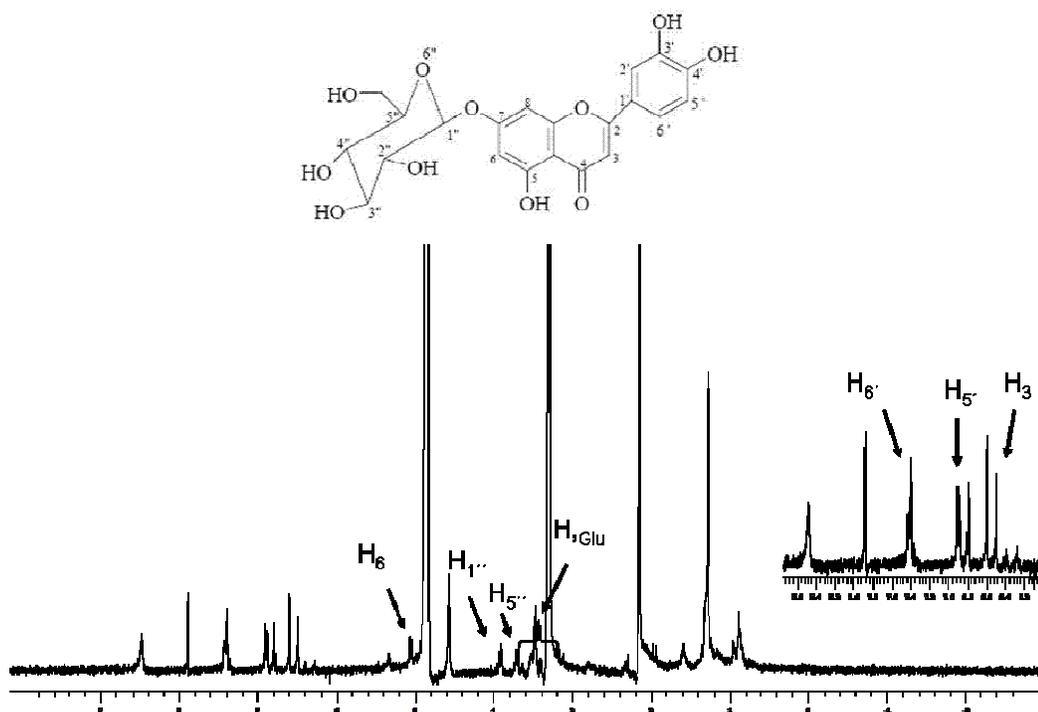
Espectro de RMN ^1H del compuesto 3B.



Espectro de RMN ^1H del compuesto 1D.

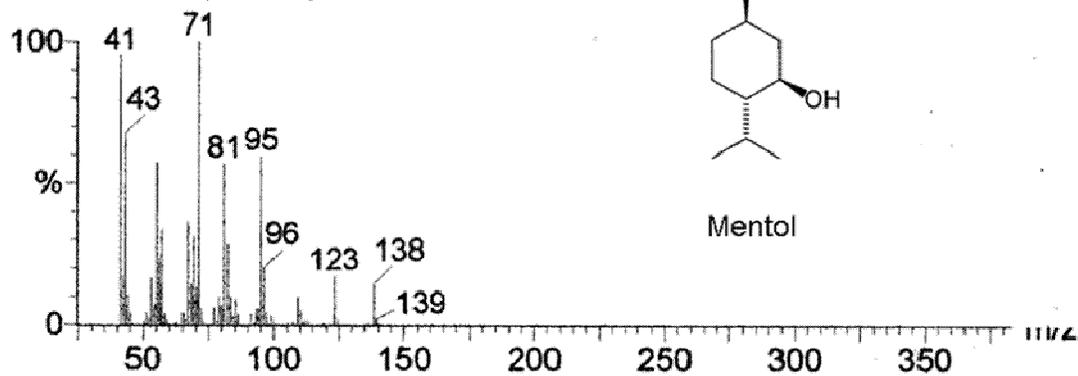


Espectro de RMN ^1H del compuesto 2D.



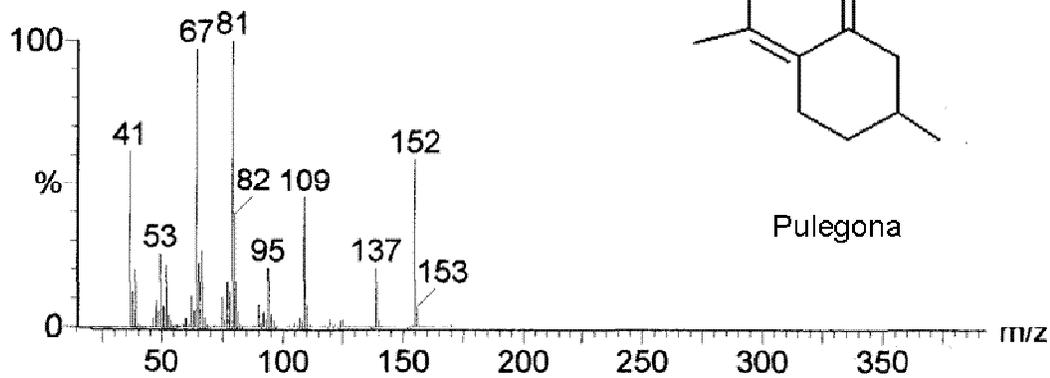
Espectro de RMN ^1H del compuesto 3D.

Ez mex 1610 (16.919)



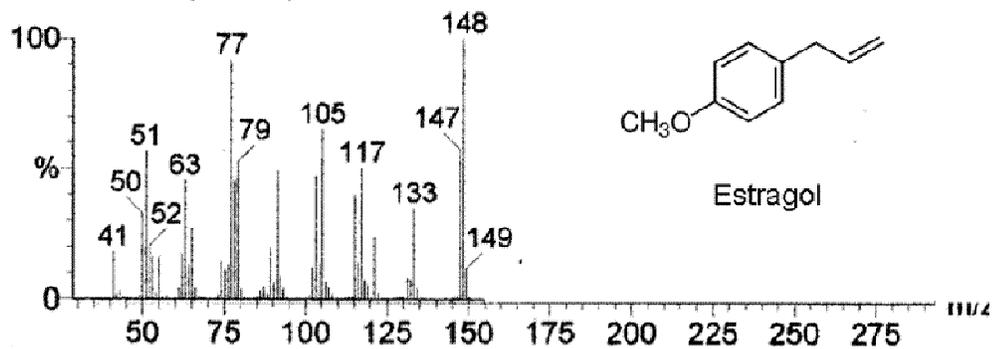
Espectro de Masas del compuesto con tiempo de retención 16.92min (CG-EM).

Ez mex 1885 (19.211)



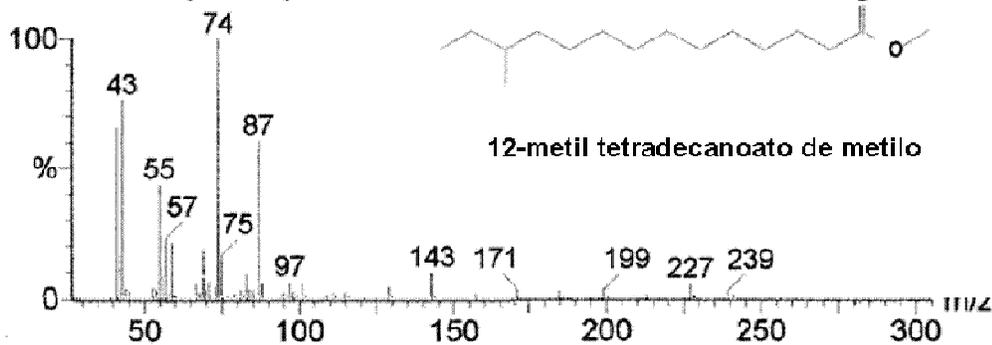
Espectro de Masas del compuesto con tiempo de retención 19.21 (CG-EM).

Ez mex 2055 (20.628)



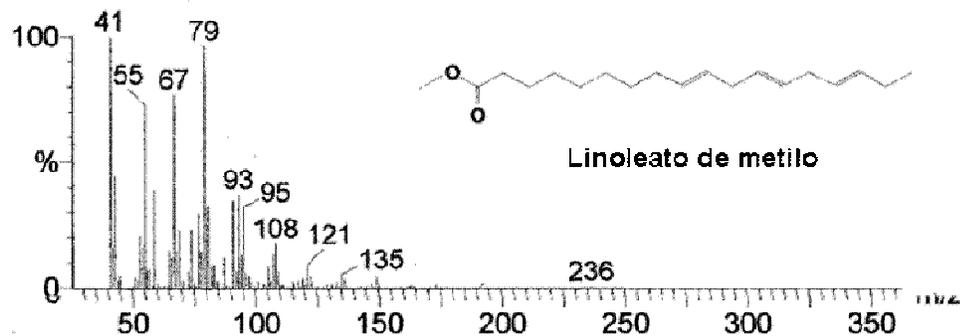
Espectro de Masas del compuesto con tiempo de retención 20.23 (CG-EM).

Ez mex 3936 (36.304)



Espectro de Masas del compuesto con tiempo de retención 36.30 (CG-EM).

Ez mex 4373 (39.947)



Espectro de Masas del compuesto con tiempo de retención 39.95 (CG-EM).

13.2 RESUMEN CURRICULAR

José Ezequiel Viveros Valdez

Candidato para el Grado de
Doctor en Ciencias con Acentuación en
Química de Productos Naturales

Tesis: AISLAMIENTO DIRIGIDO A LA IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ANTIRRADICALES Y/O QUIMIOPREVENTIVOS DE *Hedeoma drummondii* y *Spirulina maxima*.

Campo de Estudio: Ciencias Biológicas.

Datos Personales: Nacido San Nicolás de los Garza, Nuevo León el 13 de Diciembre de 1982, hijo de Yolanda Guadalupe Valdez Almaguer y José Ezequiel Viveros Camacho.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Licenciado en Ciencia de Alimentos en 2004.

Experiencia Profesional: Becario de Investigación IMSS (2005-2008).

13.3 ARTÍCULOS ISI

Free Radical Scavengers from the Mexican Herbal Tea “Poleo” (*Hedeoma drummondii*)

Ezequiel Viveros-Valdez^{a,b}, Catalina Rivas-Morales^a, Pilar Carranza-Rosales^b, Sandra Mendoza^c, and Guillermo Schmeda-Hirschmann^{d,*}

^a Departamento de Química, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Mexico

^b División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Monterrey, Mexico

^c Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, Mexico

^d Laboratorio de Química de Productos Naturales, Instituto de Química de Recursos Naturales, Universidad de Talca, Talca, Chile. E-mail: schmeda@utalca.cl

* Author for correspondence and reprint requests

Z. Naturforsch. 63 c, ▶▶▶–▶▶▶ (2008); received October 11/December 3, 2007

The aerial parts of the Lamiaceae *Hedeoma drummondii* (Benth.) are used in Mexico to prepare a herbal tea and by North American Amerindians as a spice. The methanolic extract of the aerial parts exhibited a strong antioxidant effect measured by the scavenging of the free diphenyl picrylhydrazyl radical (DPPH). Assay-guided fractionation of the crude methanolic extract allowed the identification of three major active constituents, chlorogenic, caffeic and rosmarinic acid, as well as sideritoflavone derivatives and simple phenolics. The TEAC, FRAP, total phenolic and flavonoid content were determined. The high content of caffeic acid and rosmarinic acid relates to the antioxidant activity of *H. drummondii*.

Key words: *Hedeoma drummondii*, Lamiaceae, Free Radical Scavengers

Introduction

Several secondary plant metabolites are thought to be beneficial for human health and disease prevention. Antioxidant compounds are a relevant group of products with nutraceutical properties that can be found in vegetables, fruits and herbal teas (Ness and Powles, 1997; Steinmetz and Potter, 1991; Heinonen *et al.*, 1998; Record *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1996). Plant phenolics provide protection against the harmful effects of oxidative stress, which is related to the risk of coronary heart disease, cardiovascular disease, atherosclerosis, inflammation (Youdim *et al.*, 2002; Andersen *et al.*, 2006; Luyten *et al.*, 2005), certain types of cancer (Neto, 2007) and other neurodegenerative diseases (Spiteller, 2006).

The Lamiaceae is one of the plant families most intensively studied and tested for its antioxidant activity. In Mexico, several species belonging to this plant family have been used since pre-Hispanic times as spices, teas and medicinal plants. After Spanish conquest, several Lamiaceae from the Mediterranean basin were introduced and are now extensively used for cooking as well as for

medicinal purposes, like “albahaca” (*Ocimum basilicum* L.), “tomillo” (*Thymus vulgaris* L.) and “menta” (*Mentha piperita* L.). The blend of old Amerindian tradition and European aromatic plants gives Mexican cuisine a distinct flavour and taste. While some genera belonging to the Lamiaceae have been extensively investigated both for secondary metabolites and biological activity, such as *Salvia*, *Melissa*, *Mentha*, *Thymus*, *Lavandula*, *Rosmarinus* and *Origanum* (Zgórká and Główniak, 2001; Dorman *et al.*, 2003), little is known on the North American species from the genus *Hedeoma*. *Hedeoma drummondii* has been used as a spice in soups, and as a tea to relieve cold and cough in the north of Mexico and USA (Gilmore, 1913; Vestal, 1952; Rogers, 1980; González, 1998; Estrada *et al.*, 2007).

Taking into account that plants belonging to the Lamiaceae family are good sources of antioxidants, including flavonoids and phenolic acids (Grayer *et al.*, 2003; Proestos *et al.*, 2006), the aim of this study was to assess the antioxidant activity of the Mexican aromatic plant *Hedeoma drummondii* and to identify the main compounds responsible for this activity.

0939-5075/2008/0100-0001 \$ 06.00 © 2008 Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen · <http://www.znaturforsch.com> · D

Job: NAFOCS Artikel-Nr. 7245 U245 – 25-02-08 13:13:05 – Rev 17.02 Auftr.-Nr.: 13/08

Materials and Methods

General

The NMR spectra of the isolated compounds were recorded on a Bruker Avance 400 NMR spectrometer operating at 400 MHz for ^1H and 100 MHz for ^{13}C NMR. Samples were dissolved in deuterated methanol. Mass spectra were obtained on a MAT 95XP Thermo Finnigan spectrometer using perfluoro *tert*-butylamine, FC43, as a reference. A Lambda 40 Perkin Elmer UV/Visible instrument and an ELX 800 microplate reader Bio-Tek equipment were used for colorimetric and spectrophotometric determinations. GC-MS was carried out using a Perkin-Elmer AutoSystem GC equipment and a Quadrex 007.5MS column (30 m \times 0.25 mm, film thickness 0.25 μm): carrier gas, helium; split flow, 50 ml/min; initial setpoint, 10 PSIG; oven program: initial temperature 40 $^\circ\text{C}$, hold for 1.0 min, ramp 5.0 $^\circ\text{C}/\text{min}$ to 260 $^\circ\text{C}$, hold for 0.00 min; total run time 45.00 min. MS: PE Turbomass full scan 40 to 400 mass units, EI+ (centroid). HPLC analysis was performed using a HPLC-DAD Merck-Hitachi (LaChrom, Tokyo, Japan) equipment consisting of an L-7100 pump, an L-7455 UV diode array detector and a D-7000 chromatointegrator. For analytical purposes, a C18-RP column (250 \times 4.6 mm i.d., 5 μm) (Phenomenex, Torrance, CA) was used. For the semi-preparative isolation, a Merck Lichrospher column (250 \times 25 mm i.d., 7 μm) was used. Gel permeation was performed on Sephadex LH-20 (Pharmacia). Pre-coated thin layer chromatography plates were from Merck (Darmstadt, Germany), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH), diphenylborinic acid ethanolamine ester, gallic acid, (+)-catechin and the other reagents were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The solvents used for chromatography were HPLC grade and the other chemicals were analytical grade.

Plant material and extraction

The aerial parts of *Hedeoma drummondii* (Benth.) (Lamiaceae) were collected in Allende, Nuevo León state, Mexico, in May/June 2005. The plant was identified by Dr. Marcela González Alvarez and a voucher specimen was deposited in the ethnobotanical collection of the herbarium FCB-UANL, San Nicolás de los Garza, NL, Mexico (voucher specimen number 024244).

The aerial parts of the plant were dried at room temperature and 1 kg of the dry, powdered material was extracted with MeOH by maceration (3 \times 24 h). The plant-solvent ratio was 1:5 w/v. After filtration and concentration under reduced pressure, 95 g of a dark-green extract were obtained (w/w yield 9.5%).

Determination of total phenolic and flavonoid content

The total phenolic content was determined using the Folin-Ciocalteu reagent as described by Singleton and Rossi (1965) with some modifications. Samples (100 μl) were placed in test tubes, 250 μl of Folin-Ciocalteu (1 N) reagent, 1250 μl of sodium carbonate (20%) and 400 μl of distilled water were added. The mixture was incubated for 2 h and the change in absorbance was measured at 760 nm. Gallic acid was used as a standard. The total phenolic content was expressed as mg gallic acid equivalent (eq)/g dry extract. Results are presented as means \pm SD. Each measurement was performed at least in triplicate.

The flavonoid content was determined by the aluminum chloride colorimetric method according to Chang *et al.* (2002). (+)-Catechin was used as a reference for the calibration curve. The absorbance of the reaction mixture was measured at 415 nm. Results are expressed as mg (+)-catechin equivalent (eq)/g extract. Data are reported as means \pm SD for at least three replicates.

ABTS assay

The Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of the extract was determined by the ABTS [2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] radical cation discoloration assay (Re *et al.*, 1999) and the values are reported as μM Trolox. The method is based on the consumption of the preformed ABTS $^{+\cdot}$ in the presence of potassium persulfate followed at the maximum absorption of 734 nm. Added antioxidants reduce ABTS $^{+\cdot}$ to ABTS. The assay was performed in 96-well microplates, the absorbance of ABTS $^{+\cdot}$ was adjusted to 0.70 \pm 0.02. The decrease of the absorption was measured after 6 min. The results are presented as means \pm SD. Each measurement was performed at least in triplicate.

FRAP assay

The ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay uses antioxidants as reductants in a redox-linked colorimetric method. The antioxidant activity was measured by the sample ability to reduce the Fe^{3+} /ferricyanide complex by forming ferrous products in a 96-well microplate reader. Absorbance was measured at 595 nm exactly 8 min after mixing the FRAP solution and the sample. 25 μl of MeOH were used as a blank. The FRAP values are expressed as $\text{mM FeSO}_4/\text{mg}$ dried plant (Griffin and Bhagooli, 2004).

DPPH radical scavenging activity

Serial dilutions of the test samples dissolved in MeOH were mixed with DPPH \cdot (2 mg/l) solution in 96-well microplates. MeOH was used as a negative control and (+)-catechin was used as a positive control. The change in absorbance at 517 nm was measured. Mean values were obtained from triplicate experiments. Inhibition percentage was calculated using the equation: % inhibition = $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$, where A_0 is the absorbance of the control and A_1 the absorbance of the samples (Schmeda-Hirschmann et al., 2003). The radical scavenging activities were expressed as the median effective concentration (EC_{50}). The EC_{50} values were calculated from the log-dose inhibition curve obtained by a nonlinear regression algorithm (Prism, 4.0, GraphPad, GraphPad Software Inc., CA, USA).

Isolation of active compounds

The crude extract (95 g) was dissolved in dichloromethane (DCM, 4 \times 500 ml) to afford a DCM-soluble and a DCM-insoluble fraction. The DCM-insoluble portion of the extract (29.21 g) was resuspended in DCM/MeOH (1:1 v/v) (3 \times 500 ml) yielding a soluble and an insoluble fraction. The insoluble fraction (13.67 g) was dissolved in MeOH/H $_2$ O (1:1) and permeated on a Sephadex LH-20 column (60.5 \times 5 cm, flow rate 2 ml/min) using MeOH/H $_2$ O (1:1) to afford 107 fractions of 50 ml each. The fractions were monitored by thin-layer chromatography on silica gel (EtOAc/acetic acid/formic acid/H $_2$ O 100:10:10:30 v/v). After drying, the plates were sprayed with 0.5% diphenylboric acid in MeOH and the compounds visualized under UV light at 254 and 365 nm. Fractions were pooled according to the TLC patterns into 5 fractions; fraction B (1.2 g)

was the most active DPPH scavenging fraction. Analytical DAD-HPLC of fraction B was carried out with a linear gradient of water/1% formic acid (solvent A) and MeOH (solvent B). The initial composition of the solvent system was 10% B, 90% A, changing to 20% B at 20 min and 75% B at 35 min, returning to the initial conditions at 36 to 45 min with a flow rate of 1 ml/min. For semi-preparative HPLC, the running conditions were: 50% A, 50% B changing to 100% B at 45 min, with 5 min of isocratic elution at 100% B before returning to the initial conditions at 65 min with a flow rate of 5 ml/min.

Results and Discussion

The results of the preliminary phytochemical analysis revealed that the methanolic extract of *H. drummondii* shows a total phenolic and flavonoid content of (32.36 \pm 0.86) mg gallic acid eq/g extract and (3.2 \pm 0.36) mg catechin eq/g extract, respectively. The antioxidant properties of the extract were determined by the DPPH, ABTS and FRAP assays. The extract was capable of scavenging DPPH radicals in a concentration-dependent manner. The estimated median effective concentration (EC_{50}) was (25.12 \pm 0.74) $\mu\text{g}/\text{ml}$. 1 mg of dry methanolic extract is equivalent to (668 \pm 16.04) μM of Trolox, according to TEAC values in the ABTS** assay. The FRAP method measures the reducing capacity of the sample which is related to its antioxidant potential. The FRAP value for the extract was (3.1 \pm 1.2) $\text{mM FeSO}_4/\text{mg}$ dry extract.

To isolate and identify the antioxidant compounds of *H. drummondii*, activity-guided fractionation of the methanolic extract was performed using the DPPH bleaching assay. Solvent partition of the crude MeOH extract with DCM afforded an inactive DCM-soluble fraction ($\text{EC}_{50} > 50 \mu\text{g}/\text{ml}$) and an insoluble part [EC_{50} (18.12 \pm 0.69) $\mu\text{g}/\text{ml}$] which after partition with DCM/MeOH (1:1) yielded a DCM/MeOH extract ($\text{EC}_{50} > 20 \mu\text{g}/\text{ml}$) and 13.67 g of insolubles [EC_{50} (11.32 \pm 0.54) $\mu\text{g}/\text{ml}$]. From the DCM/MeOH (1:1)-insoluble fraction, after gel permeation, 5 combined fractions were obtained. While the EC_{50} values of fraction pools A, C, D and E were $> 10 \mu\text{g}/\text{ml}$, fraction B showed an EC_{50} value of (3.21 \pm 0.12) $\mu\text{g}/\text{ml}$. From fraction pool B (1.2 g), after preparative HPLC, three main free radical scavenger compounds were isolated. The chemical structure of

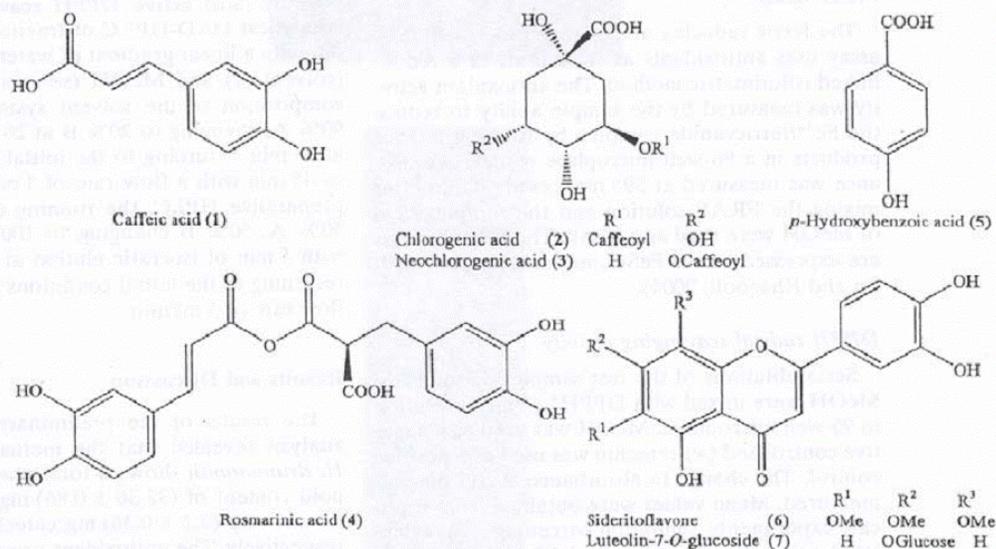


Fig. 1. Structure of the compounds isolated from the aerial parts of *H. drummondii*.

caffeic acid (1) (133 mg), chlorogenic acid (2) (213 mg), with traces of neochlorogenic acid (3), and rosmarinic acid (4) (219 mg) (Fig. 1) was elucidated on the basis of UV-Vis, ^1H , ^{13}C NMR, MS spectroscopic and spectrometric data as well as by comparison with reference samples (Kumaran and Karunakaran, 2007; Lu and Foo, 1999). The free radical scavenging activity of the compounds (as EC_{50} values in $\mu\text{g}/\text{ml}$) were (1.78 ± 0.2) , (3.53 ± 0.14) and (2.73 ± 0.25) for caffeic acid, chlorogenic acid and rosmarinic acid, respectively. Under the same experimental conditions, the EC_{50} value of (+)-catechin was $(1.56 \pm 0.12) \mu\text{g}/\text{ml}$. The HPLC chromatogram of the active pool fraction B is presented in Fig. 2. From the less active fraction pool D, 41 mg of sideritoflavone (6) precipitates in MeOH at -10°C , 92 mg of luteolin-7-*O*-glucoside (7) and 56 mg of *p*-hydroxybenzoic acid (5) were obtained and identified by comparison of the spectroscopic data with literature ones (Kuhnt *et al.*, 1994; Lu and Foo, 1999). As far as we know, there are no references in the literature concerning the isolation of these phenolic acids as well as of the sideritoflavone derivatives from *H. drummondii*; therefore this is the first report. GC-MS analysis of the DCM-soluble part allowed the identification of pulegone ($\text{Rt} = 19.23$ min) and

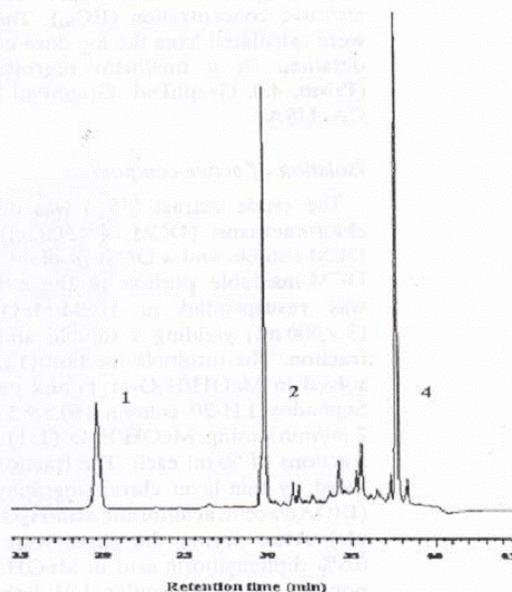


Fig. 2. HPLC trace of fraction pool B from *H. drummondii* aerial parts. 1, caffeic acid; 2, chlorogenic acid; 4, rosmarinic acid.

menthol (Rt = 16.52 min) as the major monoterpene constituents of the aromatic fraction.

From the methanolic extract of the aerial parts of *H. drummondii*, three main compounds were identified as the free radical scavengers/antioxidant constituents. Caffeic acid, chlorogenic acid and rosmarinic acid could be clearly associated with the activity of the extract. While caffeic acid showed a DPPH bleaching effect comparable to that of (+)-catechin, chlorogenic and rosmarinic acids were about half as active as the positive control.

The occurrence of sideritoflavone and rosmarinic acid in the Mexican plant *Hypoxis verticillata*, used by the Mixe Indians, was reported by Kuhn et al. (1994), while luteolin glycosides, including its 7-O- β -D-glucoside were identified in *Falcataria affinis* by Lu and Fao (1999). The variation of free phenolic acids in Lamiaceae plants was published by Zgórka and Glowniak (2001). The authors revised the phenolic acid content in Polish medicinal plants from the Lamiaceae family, and found that rosmarinic acid was the most predominant phenolic compound in the analyzed plant parts. Chlorogenic acid was found only in two samples, and the caffeic acid content was the highest in *Ocimum*

basilicum. The presence of rosmarinic acid in *H. drummondii* is of interest as this compound has been shown to display immunomodulating, antiviral, antioxidant (Lima et al., 2007), anticarcinogenic and anti-inflammatory properties (Ousaby et al., 2004; Huang and Zheng, 2006). A review on rosmarinic acid was recently published by Petersen and Simmonds (2003).

Caffeic acid has been reported as a strong antioxidant (Lim et al., 2003) and chlorogenic acid and its isomers are long known for their free radical antioxidant effect (Niggewong et al., 2004). Gómez et al. (2001) have shown that chlorogenic and caffeic acid are effectively absorbed in the intestinal tract and can be detected in blood.

Acknowledgements

Financial support from the Programa de Investigación en Productos Bioactivos (Universidad de Talca, Chile) is thankfully acknowledged. We thank Dr. Iván Ruzmilis, Universidad de Talca, Chile, for running the GC-MS spectra and the Proyecto MECESUP UCH 0416 from the Red Nacional de Doctorado en Química (Chile) for the mass spectra. Ecopiel Viveros-Vázquez thanks INNS and CONACYT (191603) for financial support.

- Anderson J. F., Jacobs Jr. D.R., Carlson M.H., and Blomhoff R. (2006), Consumption of coffee is associated with reduced risk of death attributed to inflammatory and cardio-vascular diseases in the Iowa Women's Health Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **83**, 1059–1066.
- Chang C., Yang M., Wen H., and Chen J. (2002), Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal.* **10**, 178–182.
- Dorman H.J.D., Felisberto A., Hiltunen R., and Tiihonen M.J. (2003), Characterization of the antioxidant properties of de-caffeinated aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chem.* **83**, 255–262.
- Estroff E., Villarreal J.A., Casati C., Cabral L., Scott L., and Yeo C. (2007), Ethnobotany in the Cuernavaca de Morelos National Park, Nueva Leda, Mexico. I. Ethnobot. International, **3**, 8.
- Gilman M.R. (1912), Some native Nebraska plants with their uses by the Dakota. *Nebraska State Historical Soc. Coll.* **17**, 356–370.
- González P.M. (1986), *Plantas medicinales del Noroeste de México*. Editorial El Sol, Monterrey, Nueva Leda, México, p. 24.
- Grayer R.J., Eckert M.B., Welch N.C., Kite G.C., Martin P.D., Kokubun T., Simmonds M.S.J., and Patten A.J. (2003), The chemotaxonomic significance of two bioactive caffeic acid esters, hyperidin A and B, in the Lamiaceae. *Phytochemistry* **64**, 319–328.
- Groff S.P. and Bhagooli R. (2004), Measuring antioxidant potential in cereals using the FRAP assay. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **302**, 209–214.
- Hansson M.L., Meyer A.S., and Frankel E.N. (1998), Antioxidant activity of beta-phenols on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 4107–4112.
- Huang S.K. and Zhang H.L. (2006), Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action *in vitro*. *Cancer Lett.* **239**, 271–280.
- Kuhn M., Rimpfer H., and Herrich M. (1994), Lignan and other compounds from the Mixe Indian medicinal plant *Hypoxis verticillata*. *Phytochemistry* **26**, 485–489.
- Kumar A. and Karanikumar R.J. (2007), Activity-guided isolation and identification of free radical-scavenging components from an aqueous extract of *Colysis aromatica*. *Food Chem.* **109**, 356–362.
- Lim E.-K., Higgins G.S., Li Y., and Bowler D.J. (2003), Regioselectivity of glucosylation of caffeic acid by a UDP-glucose:glucosyltransferase is maintained in plants. *Biochem. J.* **373**, 987–992.
- Lima C.F., Valencia C.R., Andrade P.B., Scoby R.M., Fernandes-Ferreira M., and Pereira-Wilson C. (2007),

Antiproliferative effects from the Mexican Poleo

(*Hedeoma drummondii*)

Ezequiel Viveros-Valdez^{1,2}, Catalina Rivas-Morales¹, Azucena Oranday-Cárdenas¹, Jorge Castro-Garza² and Pilar Carranza-Rosales²

¹ Departamento de Química, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, México.

² División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey, México.

Running title: Antiproliferative *Hedeoma drummondii*

*** Author for correspondence and reprint requests:**

Dra. Pilar Carranza-Rosales

Centro de Investigación Biomédica del Noreste

Instituto Mexicano del Seguro Social

Administración de Correos No. 4, Apartado Postal 020.

Colonia Independencia, Monterrey, Nuevo León, C.P. 64720. México.

Tel. and Fax: +(52)-81-8190-4035

E-mail address: pilarcarranza@cibinmty.net

Abstract

The methanolic extract, polar fractions and major antioxidant compounds of the Mexican herbal tea obtained from aerial parts of *Hedeoma drummondii* (Poleo) showed antiproliferative effect against the cancer cell lines MCF-7 (human breast) and Hela (human cervix). Caffeic acid showed the strongest antiproliferative activity against both cancer cells lines. Considering the relationship between antioxidants and cancer prevention, these results suggests that the herbal poleo tea may have a chemopreventive effect on breast and cervix cancer.

KEY WORDS: Antioxidants; *Hedeoma*; Phenolic acid; Spice; Tea.

Herbal teas and spices are an important group of products with nutraceutical properties giving protection against degenerative diseases; they have been exhaustively studied in recent years ^{1,2}. *Hedeoma drummondii* is a small plant (4-15 inches) belonging to Lamiaceae family; it has a very strong and pleasant mint aroma. This plant is found in North America; it is used by North American Amerindians to treat the flu and also as a spicy condiment in soups, while in northeast of Mexico, it is used as tea for insomnia^{3,4,5}.

The chemical composition of the essential oil is conformed mainly by the monoterpenes pulegone and menthol ⁶. Also, other components like sideritoflavone, luteolin-7-*O*-glucoside, caffeic, chlorogenic, rosmarinic and *p*-hydroxybenzoic acids have been isolated from it ⁷. Many natural compounds, particularly plant products and dietary constituents, exhibit antioxidant and cancer chemopreventive activities, both *in vitro* and *in vivo*. Experimental studies and clinical trials have demonstrated the beneficial effects of isoflavone, curcumin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), resveratrol, indole-3-carbinol (I3C), and 3,3'-diindolyl-methane (DIM) in prevention and treatment of cancer ⁸. Previously, we reported that herbal tea "poleo" is a good source of antioxidants⁷. Then, the aim of this study was to assess the antiproliferative activity from the crude extract, polar fractions and major antioxidant constituents isolated from the Mexican aromatic plant *Hedeoma drummondii* against cancer cell lines from cervix (HeLa: ATCC No. HTB-22) and breast (MCF-7: ATCC No. CCL-2).

The aerial parts of *Hedeoma drummondii* (Benth) were collected in Allende, State of Nuevo León, Mexico during May and June in 2005, a dried specimen was deposited in the ethnobotanical collection of the Herbarium FCB-UANL, San

Nicolás de los Garza NL (voucher specimen number 024244). Extraction was carried on as reported previously⁷: 1 Kg of dried plant was extracted with MeOH (3 x 24 h) by maceration; the extracts were dried under reduced temperature and pressure, the dry extract (95 g) was dissolved with dichloromethane (DCM); the recovered DCM-insoluble (28 %) fraction was resuspended in DCM/MeOH (1:1 v/v), and the insoluble fraction (13 %) in this mix was subjected to chromatographic methods using a Sephadex column LH-20, MeOH/H₂O₂ (1:1 v/v) as the eluent and preparative HPLC (gradients MeOH/Formic Ac. 0.1%). The major antioxidants compounds were isolated and identified as caffeic (0.13%), chlorogenic (0.2 %) and rosmarinic (0.21%) acids (figure 1) by their ¹H and ¹³C NMR, UV and MS spectral data as well as by comparison with reference samples ^{9,10}.

Antiproliferative assays were performed in 96-well microplates containing 5×10^3 cells/well in minimum essential medium Eagle (MEM) supplemented with 10 % of fetal calf serum. Cell cultures were exposed to different concentrations of extracts (30-300 µg/mL), fractions (20-200 µg/mL), and active compounds (5-50 µg/mL) for 48 h. Then, cell viability was measured by WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1, 3-benzene disulfonate) assay¹¹. The concentration of the samples that inhibited 50% of cell growth (IC₅₀) was calculated from the log-dose inhibition growth curve obtained by a nonlinear regression algorithm (EPA probit analysis program, version 1.5). Culture medium without any extract, fraction or compound was used as zero control (no dead cells), while Triton X-100, a cytolytic agent, added to the medium was used as positive control (100% dead cells). Results are presented as the mean ± SD. Each measurement was performed at least in triplicate. The antiproliferative effect of *H. drummondii*

samples on MCF-7 and HeLa cell lines measured by WST-1 assay is shown in table 1. The methanolic extract of *H. drummondii* was more active than the polar extract from other Lamiaceae (*Melissa officinalis*) reported before¹². The polar compound obtained by polarity guided fractionation with the highest antiproliferative activity was the caffeic acid, with an IC₅₀ of 10.723 µg/mL and 8.682 µg/mL upon MCF-7 and HeLa cells lines respectively; chlorogenic and rosmarinic acid were about half as active as the caffeic acid.

Antioxidants compounds are considered chemopreventive agents; many studies have shown the relationship of the presence of free radical scavengers and cancer protection^{13, 14, 15}. Breast and cervix cancer are the most common cancer among women in the world¹⁶. Studies on treatment and prevention of these diseases are a priority for the scientific community. In this study we report that herbal tea "poleo" and its compounds have an antiproliferative effect on two cancer cell lines. These results and the fact that this plant has several antioxidants compounds, there is a potential use of this plant as a chemopreventive. This effect may be due to the compounds with the highest antioxidant activity like phenolic acids. The catechol group in these compounds is the most probably responsible for the antioxidant and antiproliferative activities¹⁷.

Acknowledgements

Authors thanks to IMSS and CONACYT for Ezequiel Viveros-Valdez fellowship (191633) and PAICYT/ UANL (CA1717-07) for financial support.

References

1. Cooper R, Morr  DJ, Morr  DM: Medicinal benefits of green tea: Part I. Review of noncancer health benefits. *J Altern Complement Med* 2005; 11:521-528.
2. Cooper R, Morr  DJ, Morr  DM: Medicinal benefits of green tea: Part II. review of anticancer properties. *J Altern Complement Med* 2005; 11:639-52.
3. Rogers DJ: Lakota names and traditional uses of native plants by Sicangu (Brule) people in the Rosebud area, South Dakota. Rosebud Educational Society, St. Francis, SD, 1980, pp. 49.
4. Vestal PA: The Ethnobotany of the Ramah Navaho. *Papers Peabody mus* 1952; 40: 1-94.
5. Estrada E, Villarreal JA, Cant  C, Cabral I, Scout L, Yen C: Ethnobotany in the Cumbres de Monterrey National Park, Nuevo Le n, M xico. *J Ethnobiol Ethnomed*; 2007: 3, 8.
6. Firmage HD: Environmental influences on the monoterpene variation in *Hedeoma drummondii*. *Biochem Syst Ecol* 1981; 9: 53-58.
7. Viveros- Valdez E, Rivas-Morales C, Carranza-Rosales P, Mendoza S, Schmeda-Hirschmann G: Free Scavengers from Mexican Herbal Tea "Poleo" (*Hedeoma drummondii*). *Z. Naturforsch* 2008; 63c: 341-346.
8. Sarkar FH, Li YW : Targeting multiple signal pathways by chemopreventive agents for cancer prevention and therapy. *Acta Pharmacol Sin* 2007; 28: 1305–1315.

9. Kumaran A, Karunakaran RJ: Activity-guided isolation and identification of free radical-scavenging components from an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. Food Chem 2007;100: 356-361.
10. Lu Y, Foo LY: Rosmarinic acid derivatives from *Salvia officinalis*. Phytochemistry 1999; 51: 91-94.
11. Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K, Watanabe M: Novel cell proliferation and cytotoxicity assays using a tetrazolium salt that produces a water-soluble formazan dye. In vitro Toxicology 1995; 8: 187-190.
12. Canadanović-Brunet J, Cetković G, Djilas S, Tumbas V, Bogdanović G, Mandić A, Markov S, Cvetković D, Canadanović V: Radical scavenging, antibacterial, and antiproliferative activities of *Melissa officinalis* L. extracts. J Med Food 2008; 11:133-143.
13. Steinmetz KA, Potter JD: Vegetables, fruit and cancer. I. Epidemiology. Cancer Causes Control 1991; 2:325-357.
14. Neto CC: Cranberry and blueberry: Evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. Mol Nutr Food Res 2007;51: 652-664.
15. Conforti F, Loizzo MR, Statti AG, Menichini F: Cytotoxic activity of antioxidant constituents from *Hypericum triquetrifolium* Turra. Nat Prod Res 2007; 21: 42–46.
16. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P: Global cancer statistics. 2002. CA Cancer J Clin 2005; 55:74-108.
17. Nagao T, Abe F, Okabe H: Antiproliferative constituents in the plants 7. Leaves of *Clerodendron bungei* and leaves and bark of *C. trichotomum*. Biol Pharm Bull 2001; 24:1338-1341.

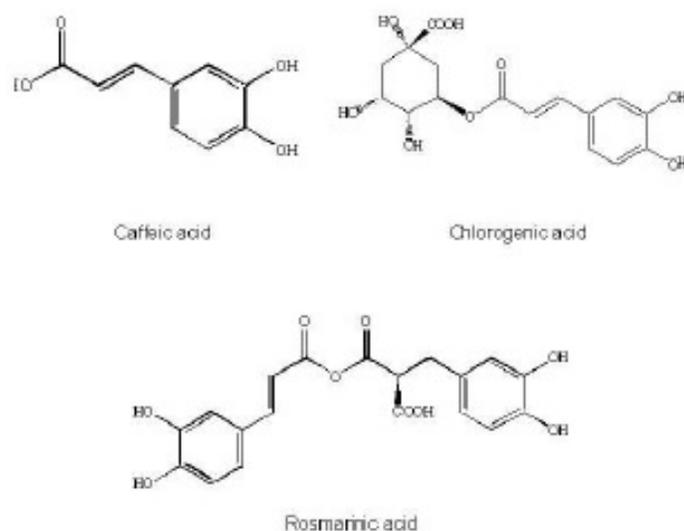


Figure 1.

Figure 1. Structure of the antioxidant compounds from the aerial parts of *H. drummondii*.

Table 1. Antiproliferative effect of MeOH extract, polar fraction and phenolic antioxidant compounds from *H. drummondii*.

Sample	IC ₅₀ value (µg/ml)*	
	MCF-7 (human breast cancer)	HeLa (human cervix cancer)
Crude Extract	176.4 ± 4.5	158.2 ± 8.3
F1	125.0 ± 0.9	120.8 ± 2.3
F2	95.0 ± 1.4	81.9 ± 1.8
Chlorogenic acid	24.8 ± 1.8	24.7 ± 1.1
Rosmarinic acid	19.8 ± 0.3	17.4 ± 0.3
Caffeic acid	10.7 ± 0.1	8.7 ± 0.1

*Exposure time 48 h ±SD (n=3).
 F1= Fraction DCM-insoluble
 F2= Fraction DCM/MeOH-insoluble