



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“ESTUDIO DE LOS COMPONENTES QUÍMICOS DE *Plantago spp.*  
COMO POSIBLES AGENTES ANTITUMORALES”**

Memoria presentada por Marina Gálvez Peralta  
para aspirar al Grado de Doctor en Farmacia  
Sevilla, Abril de 2004



D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> TERESA SAENZ RODRÍGUEZ, Profesora Titular de Farmacología y Directora del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla

INFORMA:

Que el presente trabajo titulado “Estudio de los Componentes Químicos de *Plantago spp.* como Posibles Agentes Antitumorales”, ha sido dirigido por las Doctoras M<sup>a</sup> Jesús Ayuso González y Carmen Martín Cordero, y realizado en el Departamento de Farmacología de esta Facultad, cumpliendo todos los requisitos previstos para este tipo de trabajo de investigación.

Y para que conste, firmo el presente informe en:

Sevilla, a 1 de Abril de 2004.

Fdo. María Teresa Sáenz Rodríguez.



D<sup>a</sup> MARÍA JESÚS AYUSO GONZÁLEZ, Catedrática de Farmacología y D<sup>a</sup> CARMEN MARTÍN CORDERO, Profesora Titular de Farmacología, de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla,

INFORMAN:

Que el trabajo presentado por la Lcda. Marina Gálvez Peralta, titulado “Estudio de los Componentes Químicos de *Plantago spp.* como Posibles Agentes Antitumorales”, ha sido realizado en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de esta Universidad, bajo nuestra dirección.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos su presentación para que sea juzgado por el tribunal correspondiente.

Sevilla, a 1 de Abril de 2004.

Las directoras

Fdo. María Jesús Ayuso González.

Fdo. Carmen Martín Cordero.



*A mis padres  
A mi hermano Cándido*



## *Agradecimientos*

*Quién iba a decir, al entrar por primera vez en esta facultad, que iba casi 10 años después a encontrarme aquí. Desde entonces, he de agradecer de todo corazón (aunque no haya suficientes palabras) a toda las personas que se han cruzado en mi camino, apoyándome.*

*Quiero agradecer, de una forma especial, a mis directoras de tesis, la Dra. María Jesús Ayuso y Dra. Carmen Martín, por su inestimable ayuda y confianza para llevar a cabo este trabajo de investigación, y a Dra. María Victoria Toro, por sus consejos.*

*También, al Dr. Luis Bravo, catedrático y director de departamento cuando inicié mi tesis doctoral, por darme la oportunidad de convertirme en “su ayudante” en la docencia.*

*A Dra. Teresa Sáenz, actual directora del departamento, por facilitarme “la etapa final”.*

*A todo el profesorado del departamento, por sus recomendaciones, consejos y atención.*

*Al “despacho de los asociados” por soportarme entre tantas montañas de artículos, a María por todo lo que me ha aportado, a Mayche por transmitirme siempre buen humor, a Mamen por su interés y a Miguel, mi compañero de grupo, por haberme enseñado tanto y compartir su “sitio”.*

*A todos mis compañeros de laboratorio, gracias a todos, los que estáis y los que no. Gracias de forma especial a Rosalía, “mi compi”, Ana, Marina, Antonio, Rai, “Elenas”, Rosa, Isabel, Bettina, Susana, Sofía, Bia..., por ser tan especiales y convertir el laboratorio en una gran familia, por los buenos momentos, por todo lo que he recibido y vuestro apoyo. Gracias también a los alumnos internos que hemos tenido en nuestro grupo de investigación.*

*A Mari Carmen, por todo el “papeleo” y las mil preguntas que ha tenido que soportar.*

*A “Reina”, por ayudar a mantener todo en orden y por los buenos momentos que nos hace pasar, y a Emilia, deseando su pronta y total recuperación.*

*A la Dra. María Luisa Soria, por “introducirme” en el mundo del HPLC.*

*A los Drs. Fernando Iglesias y José Luis Espartero, por su ayuda en la espectroscopía RMN.*

*Al Dr. Felipe Cortés y el Dpto. de Biología Celular, por facilitarme la infraestructura para realizar los experimentos de cultivo celular.*

*Al Prof. Peter Houghton del “Department of Pharmacognosy and Medicinal Chemistry”, de la Facultad de Farmacia de King’s College, Londres, por permitirme realizar en su laboratorio una de mis estancias, y a todo su equipo.*

*Al Prof. John M. Pezzuto y la Dra. Guee Tan, del departamento de “Pharmacognosy and Medicinal Chemistry. College of Pharmacy, UIC, Chicago”, por aceptarme en su laboratorio y permitirme aprender y realizar diversas técnicas de Quimioprevención. Gracias a todo el equipo por su ayuda y gran amistad, en especial a Pam, Joell, Sonia, So-Yung, Ying-Mei, Muriel, Tanvi, Gaurav, Aashit, Jignesh....*

*A todos mis amigos, especialmente a Carmen, Trini y Melania, compañeras de fatiga desde la niñez, estando a las “duras y a las maduras” y a mis compañeros de facultad.*

*A toda mi familia, desde donde estéis, gracias por vuestro cariño, sobre todo a mis abuelos por su continua atención.*

*A mi hermano, por todo lo que ha hecho por mí estos años, por su “asesoramiento” fotográfico e informático, por “compartir” los momentos de agobio, y responsabilizarte de tanto en mis ausencias...*

*A mis padres, por ser lo que soy, por enseñarme a luchar por lo que quiero, por su entrega, ayuda y gran cariño.*

*A Tí, porque hacer que todo esto sea posible, porque, todo está en Tus manos...*

*La vida es una oportunidad, aprovéchala.  
La vida es belleza, admírala.  
La vida es beatitud, saboréala.  
La vida es un sueño, hazlo realidad.  
La vida es un reto, afróntalo.  
La vida es un deber, cúmplelo.  
La vida es un juego, juégalo.  
La vida es preciosa, cuidala.  
La vida es riqueza, consérvala.  
La vida es amor, gózala.  
La vida es un misterio, desvévalo.  
La vida es promesa, cúmplela.  
La vida es tristeza, supérala.  
La vida es un himno, cántalo.  
La vida es un combate, acéptalo.  
La vida es una tragedia, doméñala.  
La vida es una aventura, arróstrala.  
La vida es felicidad, merécela.  
La vida es vida, defiéndela.*

*Madre Teresa*

*Si quieres que tus sueños se hagan realidad, ¡Despierta!.  
Ambrose Bierce.*

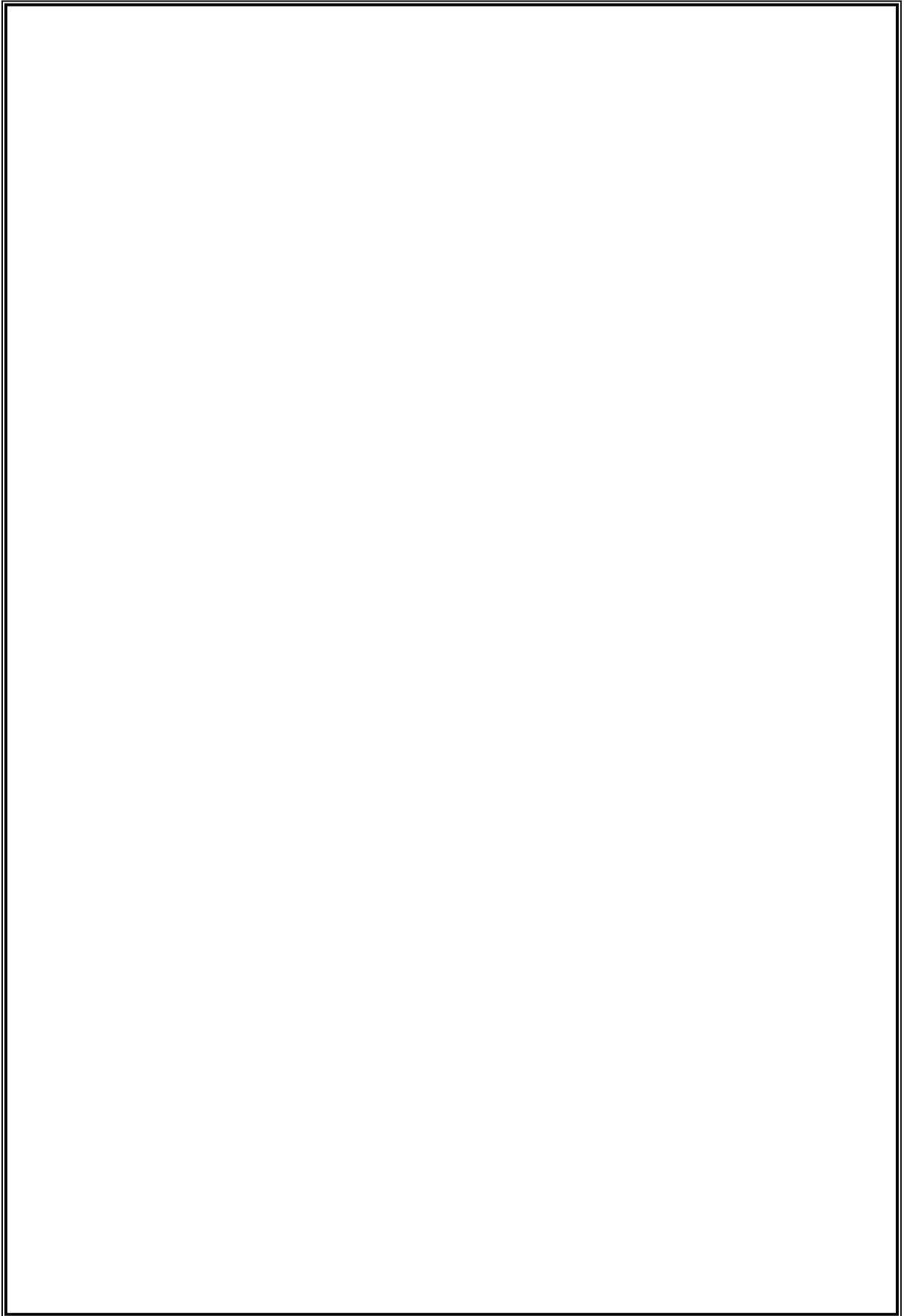
**SUMARIO**

---

	Pág.
<b>I. - <u>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</u></b>	<b>vii</b>
<b>II. - <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u></b>	<b>1</b>
<b>II.1.- ESPECIES VEGETALES EN ESTUDIO</b>	<b>3</b>
<b>II.2.- ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA DE IRIDOIDES, FENILPROPANOIDES         Y FLAVONOIDES</b>	<b>43</b>
<b>II.3.-ASPECTOS GENERALES SOBRE CARCINOGENÉISIS Y         QUIMIOPREVENCIÓN.</b>	<b>106</b>
<b>III.- <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u></b>	<b>129</b>
<b>III.1.- MUESTRAS</b>	<b>129</b>
<b>III.2.- OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS</b>	<b>129</b>
<b>III.3.- ENSAYOS FITOQUÍMICOS</b>	<b>129</b>
<b><i>III.3.1.- Técnicas cromatográficas.</i></b>	<b><i>129</i></b>
<b><i>III.3.2.- Técnicas colorimétricas.</i></b>	<b><i>136</i></b>
<b><i>III.3.3.- Equipos analíticos utilizados</i></b>	<b><i>139</i></b>
<b>III.4.- ENSAYOS DE QUIMIOPREVENCIÓN</b>	<b>140</b>
<b><i>III.4.1.- Actividad antioxidante</i></b>	<b><i>140</i></b>
<b><i>III.4.1.1.- <u>Actividad antirradicalaria frente al DPPH.</u></i></b>	<b><i>140</i></b>
<b><i>III.4.1.2.- <u>Inhibición de la peroxidación lipídica microsomal.</u></i></b>	<b><i>142</i></b>
<b><i>III.4.2.- <u>Ensayo de inducción de la enzima Quinona Reductasa (QR).</u></i></b>	<b><i>145</i></b>
<b><i>III.4.3.- <u>Ensayo de inhibición de la transformación celular por TPA.</u></i></b>	<b><i>150</i></b>
<b><i>III.4.4.- <u>Ensayo de inhibición de la inducción de Ornitina Descarboxilasa (ODC)             por TPA.</u></i></b>	<b><i>153</i></b>
<b><i>III.4.5.- <u>Actividad estrogénica-antiestrogénica.</u></i></b>	<b><i>155</i></b>
<b><i>III.4.5.1.- <u>Determinación de actividad por afinidad a los receptores                 estrogénicos.</u></i></b>	<b><i>157</i></b>
<b><i>III.4.5.2.- <u>Determinación de actividad en la línea celular Ishikawa.</u></i></b>	<b><i>159</i></b>
<b>III.5.- ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD</b>	<b>164</b>
<b><i>III.5.1.- <u>Cultivos celulares.</u></i></b>	<b><i>164</i></b>
<b><i>III.5.2.- <u>Venenos de Topoisomerasas.</u></i></b>	<b><i>170</i></b>
<b><i>III.5.3.- <u>Ensayo de Inducción de la diferenciación celular.</u></i></b>	<b><i>172</i></b>
<b>III.6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.</b>	<b>177</b>

<b>IV. – RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>179</b>
<b>IV.1.- RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS.</b>	<b>181</b>
<b>IV.2.- ENSAYOS CUALITATIVOS</b>	<b>181</b>
<b>IV.3.- FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO. DESCRIPCIÓN DE LOS           COMPUESTOS AISLADOS.</b>	<b>182</b>
<i>IV.3.1.- Extracto metanólico de P. bellardii.</i>	<i>182</i>
IV.3.1.1.- <u>Resultados</u>	182
IV.3.1.2.- <u>Discusión de resultados.</u>	191
<i>IV.3.2.- Extracto metanólico de P. lagopus.</i>	<i>194</i>
IV.3.2.1.- <u>Resultados</u>	194
IV.3.2.2.- <u>Discusión de resultados.</u>	200
<i>IV.3.3.- Extracto metanólico de P. serraria.</i>	<i>201</i>
IV.3.3.1.- <u>Resultados</u>	201
IV.3.3.2.- <u>Discusión de resultados.</u>	206
<b>IV.4.- DETERMINACIONES COLORIMÉTRICAS.</b>	<b>208</b>
<i>IV.4.1.- Resultados.</i>	<i>208</i>
<b>IV.5.- DETERMINACIONES CROMATOGRÁFICAS.</b>	<b>208</b>
<i>IV.5.1.- Resultados</i>	<i>219</i>
<b>IV.6.- ENSAYOS DE QUIMIOPREVENCIÓN.</b>	<b>226</b>
<i>IV.6.1.- Actividad antioxidante</i>	<i>226</i>
IV.6.1.1.- <u>Resultados</u>	226
IV.6.1.2.- <u>Discusión de resultados.</u>	232
<i>IV.6.2.- Ensayo de inducción de la enzima Quinona Reductasa (QR).</i>	<i>234</i>
IV.6.2.1.- <u>Resultados</u>	234
IV.6.2.2.- <u>Discusión de resultados.</u>	237
<i>IV.6.3.- Ensayo de inhibición de la transformación celular por TPA.</i>	<i>238</i>
IV.6.3.1.- <u>Resultados</u>	238
IV.6.3.2.- <u>Discusión de resultados.</u>	244
<i>IV.6.4.- Ensayo de inhibición de la inducción de Ornitina Descarboxilasa (ODC)                   por TPA.</i>	<i>246</i>
IV.6.4.1.- <u>Resultados</u>	246
IV.6.4.2.- <u>Discusión de resultados.</u>	247

<i>IV.6.5.- Ensayo de actividad estrogénica-antiestrogénica.</i>	248
<u>IV.6.5.1.- Resultados.</u>	248
<u>IV.6.5.2.- Discusión de resultados</u>	256
<b>IV.7.- ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD.</b>	<b>259</b>
<i>IV.7.1.- Líneas celulares tumorales.</i>	259
<u>IV.7.1.1.- Resultados.</u>	259
<u>IV.7.1.2.- Discusión de resultados.</u>	261
<i>IV.7.2.- Venenos de Topoisomerasas.</i>	263
<u>IV.7.2.1.- Resultados.</u>	263
<u>IV.7.2.2.- Discusión de resultados.</u>	265
<i>IV.7.3.- Ensayo de inducción de la diferenciación celular.</i>	266
<u>IV.7.3.1.- Resultados</u>	266
<u>IV.7.3.2.- Discusión de resultados.</u>	269
<b>V. - <u>CONCLUSIONES</u></b>	<b>271</b>
<b>VI. - <u>BIBLIOGRAFÍA.</u></b>	<b>275</b>



## **I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



Especies del género *Plantago* han sido objeto de diferentes estudios encaminados a justificar sus numerosos usos terapéuticos, entre ellos, el tratamiento del cáncer.

En 1963, se investigan las propiedades citotóxicas de *P. major* L. y su efectividad en el carcinoma de Ehrlich, Styrl y en sarcomas. Karpilovskaia, en el mismo año, pone de manifiesto cómo el complejo polifenólico de *P. major* inhibe el efecto carcinogénico de la nitrosodimetilamina, sintetizada de forma endógena. Linthander, en 1992, detecta la potente acción profiláctica de extractos de *P. major* L. en el desarrollo experimental de neoplasias de mama.

La actividad antitumoral de *P. lanceolata* L. comenzó a estudiarse en 1974. Paper, en 2003, ha demostrado su acción inhibidora de la angiogénesis.

Recientemente ha sido publicado que compuestos fenólicos aislados de diversas especies vegetales, han mostrado ejercer actividad de manera específica sobre los mecanismos de control del ciclo celular y, por tanto, sobre la capacidad de la célula por dividirse.

Los fenoles pueden interferir en todas las etapas del proceso carcinogénico, resultando potencialmente activos en la reducción de riesgo de cáncer. Una variedad de mecanismos moleculares que contribuyen a estos efectos beneficiosos de los fenoles han sido descritos en diferentes sistemas celulares. Así, los fenoles pueden prevenir el daño en el ADN mediante una captura directa del carcinógeno debido, fundamentalmente, a su actividad antioxidante, así como estimulando la excreción de carcinógenos mediante la activación de los sistemas enzimáticos de fase I y II, involucrados en la eliminación de compuestos del organismo. Sin embargo, la inducción de enzimas de fase I puede conducir a la activación de precarcinógenos. Diferentes fenoles han mostrado su capacidad para inhibir enzimas de fase I y por tanto, su actividad anticarcinogénica.

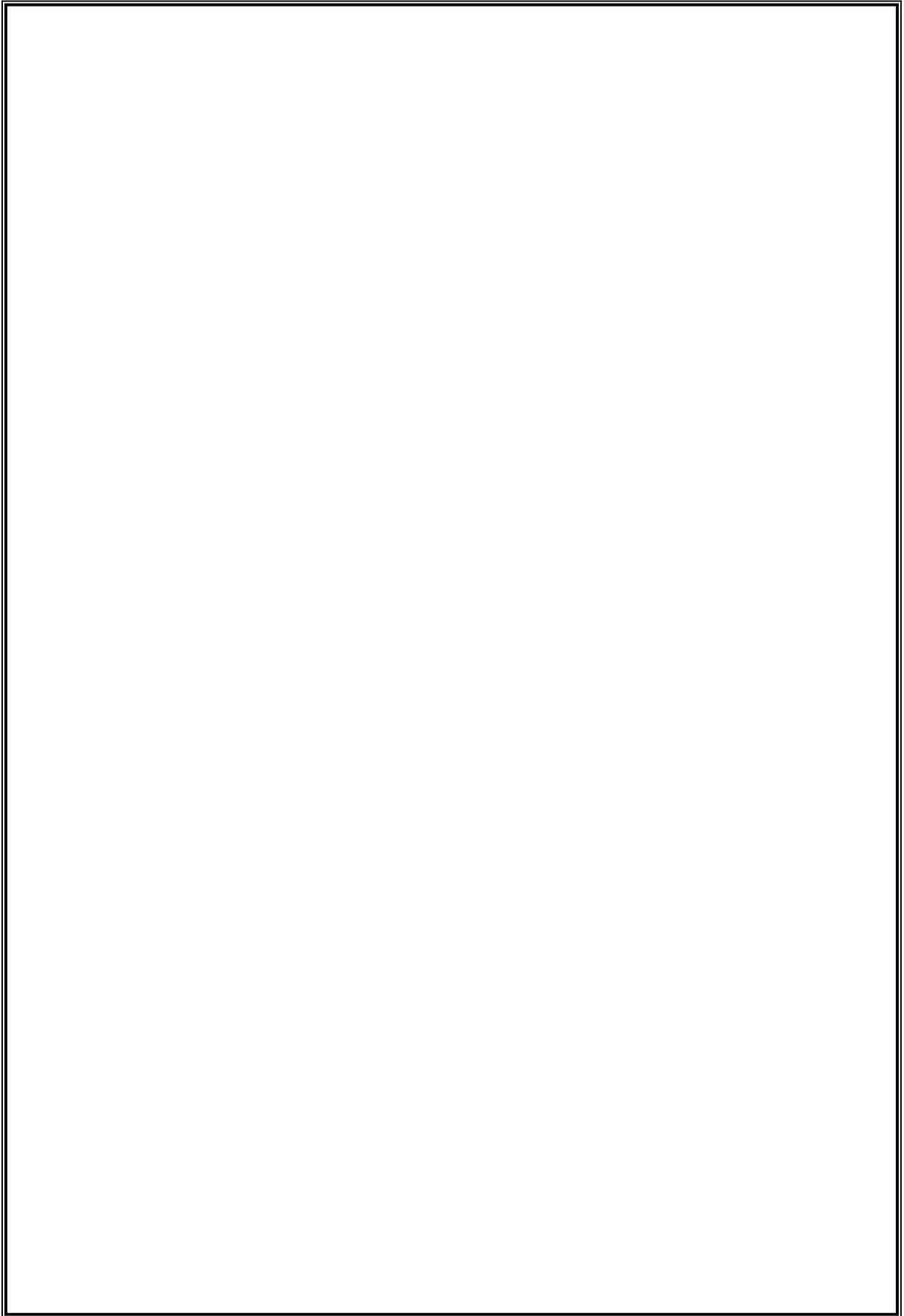
Por otra parte, las células tumorales pueden “destruirse” por apoptosis, y los fenoles han sido descritos como estimuladores de apoptosis. Pero, cuando una célula escapa de la apoptosis, se puede evitar la proliferación de estas células dañadas mediante el bloqueo de su replicación. Esta puede ser otra línea importante de defensa frente a la formación de tumores. Los fenoles pueden estar implicados en mecanismos que previenen la proliferación del tumor: inactivación o disminución de la expresión de enzimas prooxidantes. Varios fenoles son eficaces inhibiendo las enzimas oxidativas xantina oxidasa, ciclooxigenasas, o lipooxigenasas. Las protein-quinasas juegan un papel importante en la transducción de señales intracelulares. Estas quinasas median la regulación de la proliferación, diferenciación y transformación celular. La inhibición (o mejor dicho, la regulación) de estas quinasas puede revertir o suprimir el proceso carcinogénico. Los flavonoides han sido descritos como inhibidores eficaces de protein-tirosina kinasa, o protein-kinasa dependiente de AMPc o PKC.

La última etapa del proceso carcinogénico involucra el crecimiento del tumor con la destrucción de tejidos colindantes, incrementándose la formación de nuevos vasos sanguíneos para proporcionar nutrientes a las células tumorales e invasión de otros tejidos. Hay evidencias que, los fenoles pueden jugar un papel beneficioso en estas etapas. Los polifenoles del té han mostrado inhibir la angiogénesis, por ejemplo.

Finalmente, los fenoles pueden modular los niveles de hormonas esteroides en el organismo, y este efecto puede ser clave para la prevención de tumores dependientes de hormonas.

Con estos antecedentes, y dado que desde hace varios años, nuestro grupo investiga sobre la actividad antitumoral de especies vegetales, los objetivos que nos hemos planteado son los siguientes:

- **Validar** el uso popular de algunas especies de *Plantago* como antitumorales.
- **Aislar** los compuestos activos mayoritarios de los extractos obtenidos de *Plantago spp.*
- **Investigar** mecanismos implicados en la posible actividad antitumoral: actividad antioxidante, inducción de enzimas detoxificantes, inhibición de la transformación tumoral...



*La constancia es la virud mediante la cual, el resto dan su fruto.  
Anónimo*

## **II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**



## II.1. ESPECIES VEGETALES EN ESTUDIO.

**Situación taxonómica**<sup>1</sup> [Según Rahn (1996)]:

División: Magnoliophyta (Angiospermeae).

Subdivisión: Magnoliophytina

Clase: Magnoliópsida (Dicotyledones)

Subclase: Asteridae

Superorden: Lamianae

Orden: Lamiales

Familia: Plantaginaceae

Género: *Plantago*

Especies: *Plantago afra* L. (sinón.. *P. psyllium* L.)

*Plantago bellardii* All.

*Plantago coronopus* L.

*Plantago lagopus* L.

*Plantago lanceolata* L.

*Plantago serraria* L.

Se cree que la familia Plantaginaceae surge en la era Terciaria en Europa, al haberse encontrado polen fosilizado perteneciente al Mioceno, y que desde este continente, por mano del hombre, se dispersó mundialmente. Los indios norteamericanos, denominaban a los plantagos como “la huella del hombre blanco”, ya que los plantagos se encontraban en cualquier lugar donde llegaban los europeos (Jonsson, 1983).

Desde el siglo XIX el estudio de la familia Plantaginaceae ha estado rodeado de confusión, al haber multitud de opiniones en cuanto a la situación taxonómica de ésta, algunos autores la consideraban como una familia independiente, otros, como Hallier (1903) la incluían dentro de la

---

<sup>1</sup> En la nomenclatura botánica se ha seguido las recomendaciones del artículo 16 del Código Internacional de Nomenclatura Botánica. Para cada familia, género y especie, las indicadas por E.R. Farr, J.A. Leussink y F.A. Stafleu en *Index nominum Genericorum (plantarum)*, 1979 Utrecht & the Hague. Para las abreviaturas de autor, las recogidas en el apéndice I del vol.5 de *Flora Europaea*.

familia Scrophulariaceae. La corriente seguida actualmente es considerar que se trata de un grupo monofilético, tras analizar las diferentes características que comparten todas las especies que integran la familia.

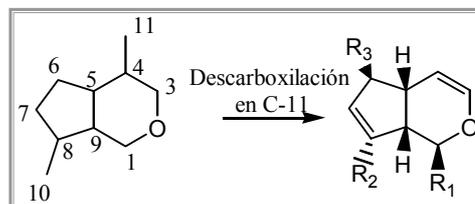
Desde el punto de vista evolutivo, el orden en el que se incluye Plantaginaceae está filogenéticamente en la zona más elevada. Cronquist (1981), la sitúa entre Lamiales y Scrophulariales, Thorne (1983) incluye la familia en Scrophulariales y Dahlgren (1989), la admite en Lamiales.

Familia	Orden	Superorden	Subclase
		Asteranae Cornanae Ericanae Gentiananae	Asteridae
Hippuridaceae	Hippuridales	Lamianae (=Lamiiflorae)	
Hydrostachyaceae	Hydrostachyales		
Acanthaceae	Lamiales	Lamianae (=Lamiiflorae)	
Bignoniaceae			
Buddlejaceae			
Callitrichaceae			
Gesneriaceae			
Globulariaceae			
Lamiaceae			
Lentibulariaceae			
Martyniaceae			
Myoporaceae			
Pedaliaceae			
<b>Plantaginaceae</b>			
Retziaceae			
Scrophulariaceae <sup>2</sup>			
Stilbaceae			
Trapellaceae			
Verbenaceae			
		Loasanae Solananae	

Tal y como se observa en el esquema, el superorden Lamianae, según Dahlgren (1989) está formado por tres órdenes, Hippuridales, Hydrostachyales y Lamiales. Dentro de este último se incluyen 17 familias, entre ellas, Plantaginaceae.

<sup>2</sup> En Scrophulariaceae se incluyen las familias Orobanchaceae y Selaginaceae.

La característica quimiotaxonómica destacable en el superorden Lamianae es la capacidad por la mayoría de las familias que lo componen, de biosintetizar iridoides, mediante la ruta que denominó Jensen (1991) como “ruta *Ila* seguida de descarboxilación en C-11”. Este tipo de iridoides, además de en Lamianae, se encuentra en tres órdenes más, Eucommiaceae, Garryaceae y Aucubaceae (Rahn, 1996). Es de destacar también, junto a los iridoides, la presencia en todas las familias, (con excepción de especies del género *Acanthaceae* y *Schrophulariaceae*) de un fenilpropanoide, el verbascósido, que fuera del superorden Lamianae, sólo se encuentra en los géneros *Echinacea* (Asteraceae) y *Plocosperma* (Loganiaceae) y especies aisladas de Icacinaceae, Cucurbitaceae y Magnoliaceae (Jensen, 1992).



Las características que comparten todas las especies que integran la familia son (Rahn, 1996):

- Raíz anual apomórfica, desarrollada como adaptación a la sequía y raíces adventicias como adaptaciones a condiciones de humedad.
- Elongación del tallo.
- Hojas paralelinervias y lobuladas. Los nervios de las hojas muertas permanecen en la planta como “barbas”. Pelos en la axila de las hojas.
- Polinización de tipo anemófila. Ello ha llevado a diversas adaptaciones morfo y fisiológicas de las especies para favorecer la acción del viento, como son:
  - Flores protóginas, de esta forma, se evita la autopolinización, al alcanzar el gineceo su madurez sexual antes que los estambres,.
  - Corola escariosa<sup>3</sup>.
  - Estilo largo, seco, papiloso, desarrollado a partir de la unión de los bordes de dos estigmas.
- Todas las especies necesitan alta intensidad lumínica, aunque los requerimientos de agua son variables, pudiendo crecer en lagos y zonas pantanosas o hasta incluso en desiertos.

<sup>3</sup> **Escarioso:** Aplíquese a los órganos de naturaleza foliar que tienen consistencia membranosa y son más o menos tiesos y secos, generalmente translúcidos (Font Quer, 1993).

Unificando todas estas características, podríamos describir a las Plantagináceas como plantas de porte variado, unas anuales, otras vivaces o perennes, bien sin tallo y con las hojas enteras, paralelinervias, sin estípulas, formando una roseta basal (de ahí su nombre en latín “planta” =pie), o bien con tallo, a veces leñoso y con las hojas opuestas o esparcidas. Las flores son tetrámeras y actinomorfas<sup>4</sup>, muy poco vistosas, y se agrupan en inflorescencias en forma de espiga. Cada flor se compone de un cáliz de cuatro sépalos herbáceos y de una corola de cuatro pétalos membranosos, todos unidos en una sola pieza tubulosa y con cuatro lóbulos cruzados, cuatro estambres, con las anteras oscilantes en el extremo de prolongados filamentos, muy delgados y flexuosos, que se sueldan con la corola. Del centro de ésta sale el estilo, largo y papiloso, que surge antes que los estambres. El fruto es en pixidio<sup>5</sup>, con dos o más semillas (Font Quer, 1976; Silvestre, 1987).

Actualmente se considera que la familia Plantaginaceae está constituida por un solo género, *Plantago* (Rahn, 1996).

### **GÉNERO *Plantago*.**

A pesar de toda la controversia que rodea a la ubicación taxonómica del orden y la familia, todas las clasificaciones defienden que el género *Plantago* pertenece a la familia Plantaginaceae, al compartir las características botánicas y, además, la biosíntesis de verbascósido e iridoides.

Según Dioscórides, el género está constituido por más de 450 especies, pero, autores más recientes defienden que *Plantago* reúne 265 especies (Willis, 1980). De acuerdo con Pilger (1937), el género se divide en dos subgéneros: *Plantago* (o *Euplantago*) y *Psyllium*. Más tarde, Rahn (1978), introdujo un tercero, *Coronopus*. Finalmente, el mismo autor, (1996), propuso un nuevo y original esquema taxonómico del género, conteniendo 6 subgéneros: *Albicans*, *Bougueria*, *Coronopus*, *Littorella*, *Plantago* y *Psyllium*.

Los primeros estudios botánicos del género *Plantago* describen sus características macromorfológicas (Decaisne, 1852; Harms y Reiche 1895; Pilger, 1937), y los últimos trabajos, caracteres embriológicos (Misra, 1964), morfología del polen (Saad, 1996), estructura de las semillas (Rezk, 1980), número de cromosomas, y caracteres químicos. Como marcadores quimiotaxonómicos, se han utilizado azúcares (Gorenflot y Bourdu 1962), ácidos fenilcarboxílicos, heterósidos

---

<sup>4</sup> **Actinomorfo:** Dícese de cualquier vegetal o de cualquiera de sus partes que tienen por lo menos dos planos de simetría (Font-Quer, 1993).

<sup>5</sup> **Pixidio:** Fruto sincárpico capsular con dehiscencia transversal; la parte superior del mismo se separa toda en una pieza, que se llama opérculo, y deja al descubierto la porción inferior seminífera, la urna (Font Quer, 1993).

feniletanoides (Andary *et al.*, 1988a; 1988b; Ronsted *et al.*, 2000), flavonoides (Tomás-Barberan *et al.*, 1988; Kawashty *et al.*, 1994), e iridoides (Taskova *et al.*, 2002).

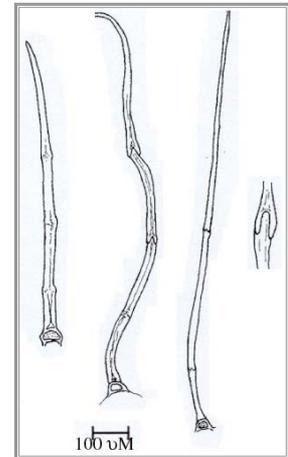
De los subgéneros en los que Rahn (1996) divide el género *Plantago*, en base a sus características macro y micromorfológicas, así como en distribución general, mencionaremos exclusivamente aquellos en los que están localizadas nuestras especies objeto de estudio.

Subgénero	Sección	Especie
<i>Albicans</i>	<i>Hymenospsyllium</i>	<b><i>P. bellardii</i> All.</b>
	<i>Lanceifolia</i>	<b><i>P. lagopus</i> L. <i>P. lanceolata</i> L.</b>
<i>Coronopus</i>		<b><i>P. coronopus</i> L. <i>P. serraria</i> L.</b>
<i>Psyllium</i>		<b><i>P. afra</i> L. (<i>sinon. P. psyllium</i> L.)</b>

A continuación comparamos las diferencias entre estos subgéneros.

#### Subgénero *Albicans* Rahn

– Posee dos tipos de pelos, tectores y glandulosos. Los primeros, que unifican a este subgénero, son muy largos, pluricelulares, uniseriados, articulados, con paredes refractantes y lumen estrecho, y se encuentran, sobre todo, encima de los nervios y a lo largo del borde de la hoja. También, aunque más raramente, posee pelos articulados con una segunda o más células que sobresalen a la anterior, en forma de articulación o garra. También están presentes pelos glandulosos, de 35-40  $\mu\text{m}$  de largo, con pie unicelular y la cabeza constituida por varias filas de pequeñas células.



- El polen posee un opérculo<sup>6</sup> sólido.
- La raíz puede ser como en subgénero *Psyllium*, gruesa y anual, o bien, no gruesa, rígida y perenne, no carnosa.
- El iridoide catalpol está presente en todas las especies de la sección *Lanceifolia*, pero ausentes en el resto de las plantagináceas, según Andrzejewska-Golec y Swiatek (1984a).

<sup>6</sup> **Opérculo:** En el caso del polen, es la porción de extexina que está aislada del resto por una estrecha zona en la cual falta totalmente o está muy reducida, cubre un pro o un surco.

- Este subgénero se ha adaptado a hábitat seco, y crece en Asia, Europa, África y América, estando ausente en Nueva Guinea, Australia y Nueva Zelanda.

Subgénero *Coronopus* (Lam & D.C) Rahn.

- La característica fundamental de este subgénero es la corola tubular cubierta por pelos cortos, que la diferencia del resto de los plantagos, donde es glabra.
- En toda la planta se pueden encontrar pequeños pelos glandulares cónicos.
- Los sépalos poseen una afilada quilla o ala.
- Las especies están distribuidas a lo largo del Mediterráneo (Moore *et al.*, 1972).
- Especies pertenecientes a este grupo han sido objeto de diversos estudios botánicos debido a la capacidad de supervivencia en condiciones extremas, como hábitats desérticos o zonas próximas al mar, con alto nivel de salinidad (Piotrwska, 1989; Gutterman *et al.*, 1998). Uno de los métodos de supervivencia se conoce con claridad, las inflorescencias se lignifican al comienzo de las elevadas temperaturas, protegiendo las semillas. Las inflorescencias caen al suelo durante todo el verano. Con las lluvias, estas estructuras se hinchan y quedan libres las semillas (Evenari *et al.*, 1982; Gutterman, 1997).



Subgénero *Psyllium* Juss.

- Las especies de este subgénero han sido confundidas entre sí desde Linneo, y aún están en revisión taxonómica.
- La característica fundamental que lo diferencia del resto de los subgéneros es la existencia de tallos con internudos alargados, ya que el resto de las Plantagináceas son escaposas<sup>7</sup>.
- Las hojas son opuestas o en grupos de tres en forma de espiral.
- Los pelos pueden ser tectores, sencillos y uniseriados o glandulosos, de forma larga y afilada. En el tallo también se encuentran pelos tectores marcados, no antrorsos<sup>8</sup> (Rahn, 1992; Andrzejewska-Golec, 2003).



---

<sup>7</sup> **Escapo:** Tallo que, arrancado de un rizoma, bulbo, etc., está desprovisto de hojas y trae las flores en el ápice. (vulg. bohordo). (Font Quer, 1993).

<sup>8</sup> **Antrorso:** Dícese de aquellos elementos que se dirigen hacia delante o arriba. (Font Quer, 1993)

- Todas las especies de este subgénero contienen los iridoïdes aucubina (sinón. aucubósido) y bartsióside, este último, ausente en el resto de las plantagináceas (Andrzejewska-Golec *et al.*, 1993).
- Este subgénero es originario del área mediterránea y Macaronesia. Crece en hábitat seco.

A continuación, en las tablas I, II y III, se describen las principales características botánicas de cada una de las especies objeto de nuestro estudio (Silvestre, 1987).

		<i>P. afra</i>	<i>P. bellardii</i>	<i>P. coronopus</i>	<i>P. lagopus</i>	<i>P. lanceolata</i>	<i>P. serraria</i>
Edad		Anual	Anual	Anual Bienal Perenne	Anual Perenne	Anual Perenne	Perenne
Escapos/ tallos		Tallos	Escapos	Escapos	Escapos	Escapos	Escapos
	Dimensiones	45 cm	3,5-8 cm	5-56 cm	10-37 cm	18-50 cm	12-35 cm
	Morfología	 Erectos A veces ramificados desde la base Pubescente- glandulosos.	Indumento <sup>9</sup> pardo- amarillento Pelos patentes cortos y largos (>1mm) 				
Hojas		Opuestas/ espiral	1 roseta	1 o más rosetas basales	1 o más rosetas basales	1 o más rosetas basales	1 o más rosetas basales
	Dimensiones	1,5-6,2 x 0,2-0,5 cm	3-9 x 0,2-0,6 cm	1,5-2,2 x 0,1-1,5 cm	5-13 x 1-5 cm	5-19 x 1,3-4 cm	8-26 x 1,4-3,5 cm
	Morfología	Lineal-lanceoladas Enteras o denticuladas Dientes agudos distantes	Estrechamente oblanceoladas Enteras Rara vez denticuladas	Lineares- oblanceoladas Pinnatífidas <sup>10</sup> o bipinnatífidas Lóbulos enteros o dentados	Oblanceoladas Enteras Rara vez remotamente dentadas	Oblanceoladas Enteras	Oblanceoladas Simétricamente serrado-dentadas
	Nerviación		3 nervios	Pinnada o bipinnada	3-7 nervios	3-6 nervios	3-8 nervios
	Pelos		Vilosas, pelos patentes	Glabras o velutinas <sup>11</sup>	Pubérulas <sup>12</sup> - pilosas	Subglabras- vilosotomentosas <sup>13</sup>	Subglabras-velutinas
Espigas	Dimensiones			2-20 cm	2-6 cm	1,4-6 cm	5-12 cm
	Morfología	Ovoideas Pedunculadas	Ovoideas Densas	Cilíndricas Densas	Subglobosas- Cilíndricas	Cilíndricas Densas	Cilíndricas Densas

**Tabla I:** Características botánicas de diferentes especies de *Plantago*. (Silvestre, 1987)

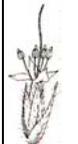
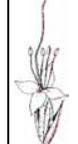
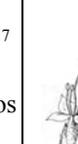
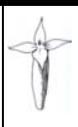
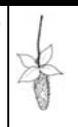
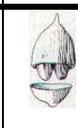
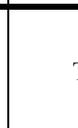
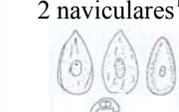
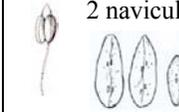
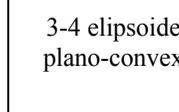
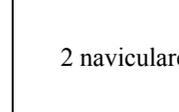
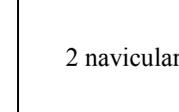
<sup>9</sup> **Indumento:** Conjunto de pelos, glándulas, escamas, etc., que recubre la superficie de los diversos órganos de una planta. (Font Quer, 1993)

<sup>10</sup> **Pinnatífida:** Aplicase a la hoja o a cualquier órgano foliáceo de nervadura pinnada cuando tiene el margen hendido de tal manera que las divisiones llegan a lo sumo hasta la mitad del semilimbo.

<sup>11</sup> **Velutino:** Finamente aterciopelado.

<sup>12</sup> **Pubérula:** Ligeramente pubescente o con pelitos muy finos, cortos y escasos.

<sup>13</sup> **Tomentoso:** Dícese de la planta u órgano que están cubiertos por pelos generalmente ramificados, cortos y dispuestos muy densamente.

		<i>P. afra</i>	<i>P. bellardii</i>	<i>P. coronopus</i>	<i>P. lagopus</i>	<i>P. lanceolata</i>	<i>P. serraria</i>
Brácteas	Dimensiones	3-6 mm	3-7 mm	2,3-4 mm	3-4,5 mm	3-6 mm	2,3-4,2 mm
	Morfología	Ovado-lanceoladas Agudas Pubescentes Glandulares Margen escarioso acuminado <sup>14</sup>	Ovado-lanceoladas Largamente acuminadas Vilosas	Ovadas Largamente acuminadas Margen escarioso y ciliado	Ovado-lanceoladas a lanceoladas Ápice viloso	Ovado-lanceoladas Largamente acuminadas Margen escarioso, glabras o pilosas	Ovadas Largamente acuminadas Margen escarioso y ciliado
Sépalos	Morfología	 3-3,2 mm Oblongo- lanceolados Asimétricos Pubescente- glanduloso Margen escarioso	 4-5 mm Ovado- lanceolados Margen escarioso Viloso <sup>15</sup>	 Pelosos <sup>16</sup> Margen escariosos asimétrico		 Glabros <sup>17</sup> o subglabros	 Pilosos Margen escarioso asimétrico
		Corola	 Tubo glabro	 Tubo glabro	 Tubo pubescente	 Tubo glabro	 Tubo glabro
Cápsula			 Bilocular	 Trilocular		 Bilocular	 Bilocular
		Semillas	 2 naviculares <sup>18</sup>	 2 naviculares	 3-4 elipsoideas plano-convexas	 2 naviculares	 2 naviculares

**Tabla II:** Características botánicas de diferentes especies de *Plantago* (cont.)

<sup>14</sup> **Acuminado:** Terminado en acumen. (Punta con la que terminan algunos órganos vegetales). (Font Quer, 1993)

<sup>15</sup> **Viloso:** Con pelo largo.

<sup>16</sup> **Peloso:** Que tiene pelo en general. Si es muy fino y suave al tacto, el órgano es pubescente; si es rígido y áspero, se emplea el término de hirsuto o hispido.

<sup>17</sup> **Glabro:** Desprovisto absolutamente de pelo o vello. (Font Quer, 1993)

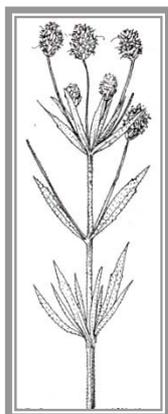
<sup>18</sup> **Navicular:** Dícese de cualquier órgano vegetal con forma parecida a una barquita o navícula.

		<i>P. afra</i>	<i>P. bellardii</i>	<i>P. coronopus</i>	<i>P. lagopus</i>	<i>P. lanceolata</i>	<i>P. serraria</i>
Floración		Febrero-Junio	Abril-Junio	Febrero-Junio	Marzo-Mayo	Abril-Junio	Abril-Junio
Hábitat		Indiferente edáfico, preferentemente ruderal y arvense	Zonas secas de los pastizales litorales o del interior Suelos preferentemente ácidos	Pastizales degradados Cunetas Márgenes cultivos	Suelos básicos, textura arenosa cunetas, pastizales y cultivos	Praderas Cunetas Suelos húmedos neutros o básicos	Pastizales Cunetas Bordes caminos Suelos básicos, a veces salobres
Áreas		S Europa N y E África SO Asia hasta Paquistán Macaronesia	S Europa NO Asia Gran Canaria (introducida)	Europa excepto extremo N Macaronesia SO Asia N África	Región mediterránea, Macaronesia	Eurasia excepto extremo N N África Macaronesia N América (introducida)	S Europa NO África
							

**Tabla III:** Características botánicas de diferentes especies de *Plantago*. (cont. y final)



### ***Plantago afra* o *P. psyllium* L.**



#### **a) Usos en medicina popular.**

Nombres comunes: zaragatona, psilio, zaracatona, zargatona (todos estos de origen árabe). También es conocida como “semilla de pulga” por la morfología de sus semillas, elípticas, pequeñas, de color rojizo y con una superficie muy lustrosa, de ahí que también se llame a esta especie pulchión y pulquión (*pulch*, pulga.) (Dr. Asin de Palacios en Umdat al-Tabib) (Font Quer, 1976).

Psyllium se ha confundido a lo largo del tiempo con *P. ovata* y *P. arenaria*, pero, se pueden diferenciar gracias a las semillas. Las de *P. ovata* son naviculares, y de color gris claro mientras que las de *P. arenaria*, son pardo-negruzcas (Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 2001).

La planta se conoce desde muy antiguo, y Dioscórides ya nos habla de ella en el capítulo 71 del libro IV de su Materia Médica. Según el intérprete, Andrés Laguna, “*P. psyllium* tiene fuerza de resfriar y de restriñir. Aplicado en forma de emplasto, es útil a los dolores de las junturas, a las apostemillas que se hacen tras los oídos, a los durujoncillos, a las hinchazones y a los miembros desconcertados. Aplícase con aceite rosado, o con vinagre o con agua contra el dolor de cabeza. Mezclado con vinagre y puesto, sana las quebraduras de los muchachos y reprime los ombligos salidos a fuera. Conviene tomar un acetábulo de psylio majado, y dejarlo en remojo dentro de un sextario de agua, y después aplicarle, en siendo tornada de la dicha agua espesa, porque refría notablemente. Echado el psylio en agua hirviendo, la entibia. Tiene grande eficacia contra el fuego de Sant Antón. Dícese que en la casa a donde estuviere esta hierba verde, no se engendrarán jamás pulgas. Majada con unto de puerco, mundifica las llagas sucias y las de mala natura. Su zumo, instilado con miel, es útil a los manantíos oídos y a aquellos en los cuales se crían gusanos”. En España, el mismo autor nos menciona “Echada en remojo la simiente, se deshace luego en ciertas babazas útiles en extremo para quitar el amargor de la boca, ablandar las asperezas de la lengua en los febricitantes y sana las quemaduras del fuego.”

En el caso de su acción laxante (aunque su empleo como laxante mecánico es relativamente moderno, debido a la tendencia inicial de utilizar métodos más enérgicos y potentes), sobre todo contra el estreñimiento pertinaz, Font Quer recomienda “una dosis de 0,5 a 1,5 onzas de simientes que se revuelven con el agua necesaria y se tragan juntas, pero sin dejarlas en maceración, antes de acostarse. Otros aconsejan macerara previamente las semillas en agua, por ejemplo, en una taza grande de la misma, y colar el mucilago cuando, pasadas unas horas, se han hinchado totalmente.

Este mucílago colado y limpio de semillas, se propina por la mañana, en ayunas. La misma babaza sirve para darla en enemas, en caso de inflamaciones intestinales o anales, hemorroides, etc. como emoliente.” (Font Quer, 1976).

Uso tradicional	Parte de la planta	País	Referencia
<b>Metabolismo</b>			
▪ <i>Hipocolesterolemiantes</i>	Semillas (en agua)	Europa	(Roberts y Bencke 1994)
▪ <i>Diabetes</i>	Semillas (en agua)		(Frati-Munari <i>et al.</i> , 1989)
<b>Piel</b>			
▪ <i>Alisar pelo</i>	Semillas		(Rivera Núñez y Obón de Castro 1991)
▪ <i>Antiséptico</i>	Semillas	Jordania	(Lev y Amar 2002)
▪ <i>Astringente y emoliente</i>	Sumidad (infusión y baños)		(Rivera Núñez y Obón de Castro 1991)
<b>Sistema digestivo</b>			
▪ <i>Alteraciones en el intestino</i>	Semillas	Jordania	(Lev y Amar 2002)
▪ <i>Enfermedad inflamatoria intestinal</i>	Semillas y cutículas (en agua)		(Mills y Bone 2000)
▪ <i>Estreñimiento</i>	Semillas (Extº. acuoso caliente)	España	(Darias <i>et al.</i> , 1989; Mills y Bone 2000)
▪ <i>Obesidad</i>	Semillas y cutículas (en agua)		(Mills y Bone 2000)

#### b) Ensayos biológicos realizados.

Tal y como hemos mencionado anteriormente, durante mucho tiempo se han confundido las semillas de *P. psyllium* con *P. ovata*. Tanto es así, que la farmacopea americana, a diferencia de la Europea, incluye dentro de la misma monografía “Semillas de plantago” a *P. ovata* y *P. psyllium*. (Bruneton, 1999). Revisando los ensayos biológicos realizados empleando las dos especies, hemos encontrado que, generalmente, se emplea *P. ovata*, al estar más extendido su uso. Los ensayos farmacológicos sobre *P. psyllium*, están orientados hacia el efecto de las semillas sobre el estreñimiento y a nivel metabólico. El mucílago de las semillas, al unirse a los ácidos biliares y colesterol, induce un aumento de la eliminación fecal de éstos, disminuyendo su reabsorción intestinal. También se ha postulado que, como los mucílago son una clase de polisacáridos relacionados con la fibra soluble, la flora intestinal en el intestino grueso, podría metabolizar la fibra soluble formando ácidos grasos de cadena corta. Algunos de estos ácidos grasos, se transportarían hasta el hígado por la vena porta, donde, ejercerían su efecto inhibiendo parcialmente la biosíntesis de colesterol (Mills y Bone 2000).

Ensayos clínicos a doble ciego, han demostrado que el consumo diario de psyllium reduce los niveles de colesterol total, LDL y triglicéridos (Kris-Etherton *et al.*, 2002), de glucemia (Frati-Munari



*et al.*, 1989; Munari *et al.*, 1998), mientras que los niveles de HDL se elevan de forma significativa (Rodríguez-Morán *et al.*, 1998). Estos estudios se han realizado en personas sanas y enfermos diabéticos tipo II. Además se ha descrito un efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico a la dosis de 100 mg/kg (Kalantari, 1998), y efectos beneficiosos en pacientes con encefalopatía hepática y diabetes mellitus tipo II cuando se asocia el consumo de semillas de *P. afra* con proteína de origen vegetal (Uribe *et al.*, 1985). Otros trabajos mencionan su utilización en casos de colon irritable, aunque parece, no obstante, que, en esta sintomatología, su efecto apenas se diferencia del de un placebo.

Además, el extracto metanólico y hexánico de la sumidad ha demostrado ser activo como insecticida, repelente de insectos y larvas a la dosis de 2 mg/mL (Pascual-Villalobos y Robledo 1998).

### c) Componentes químicos.

Se han identificado los siguientes compuestos:

Tipo	Compuesto	Parte de la planta	Referencia
<b>Alcaloides monoterpénicos</b>			(Martín-Guerrero, 1983)
	Indicaína	Semillas	
	Indicainina	Semillas	
	Plantagonina	Semillas	
<b>Enzimas</b>			(Font Quer, 1976)
	Emulsina	Sumidad	
	Invertina	Sumidad	
<b>Esteroles</b>			(Bruneton, 1999)
<b>Fenilpropanoides</b>			
	Plantamósido	Hoja	(Andary <i>et al.</i> , 1988a; 1988b)
	Verbascósido	Hoja	(Andary <i>et al.</i> , 1988a; 1988b; Ronsted <i>et al.</i> , 2000)
<b>Flavonoides</b>			(Kawashty <i>et al.</i> , 1994)
	Apigenin-7-glucósido	Sumidad	
	Apigenin-6,8-di-C-glucósido	Sumidad	
	Chrisoeriol-7-gentiobiósido	Sumidad	
	Chrisoeriol-7-glucósido	Sumidad	
	Luteolin-7-glucósido	Sumidad	
	Tricina	Sumidad	
	Tricin-7-glucurónido	Sumidad	
<b>Iridoides monoterpénicos</b>			
	Aucubina	Sumidad	(Font Quer, 1976; Andrzejewska-Golec y Swiatek 1984a)
		Semillas	(Andrzejewska-Golec y Swiatek 1984a)
	Plantarenalósido	Sumidad	(Popov <i>et al.</i> , 1981; Andrzejewska-Golec y Swiatek 1984a)
	Bartsióside	Sumidad	(Andrzejewska-Golec y Swiatek 1984a; Andrzejewska-Golec <i>et al.</i> , 1993)

Tipo (cont.)	Compuesto (cont.)	Parte de la planta	Referencia
<b>Glúcidos (mucílago)</b>	Arabinoxilosano, hidrólisis : D-xilosa (70%) L-arabinosa (10%) $\alpha$ -D-galacturonil (1-4)- L-xilosa o D-galactosa	Semillas (epidermis tegumento seminal)	(Bruneton, 1999)
<b>Lípidos</b>	Ácidos grasos insaturados		(Bruneton, 1999)
<b>Proteínas</b>			(Bruneton, 1999)

#### d) *Indicaciones en Fitoterapia.*

Según la Comisión E de Plantas Medicinales<sup>19</sup> y la Farmacopea Europea, la droga está constituida por las semillas maduras desecadas o los tegumentos seminales, con un índice de hinchamiento de, al menos, 10 por gramo de droga (Blumenthal *et al.*, 1998). En España *P. afra* se incluye dentro del grupo PA06 de la clasificación terapéutica de plantas medicinales, (grupo de plantas medicinales laxantes), y se indica su uso para estreñimiento crónico e irritación intestinal (Cañigüeral *et al.*, 1998; Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 2001).

Indicaciones:

Debido al elevado índice de hinchamiento de las semillas en contacto con líquido, se emplea como laxante formador de volumen. El mucílago de las semillas se hincha, causando la distensión de la pared intestinal, estimulando el peristaltismo intestinal y por tanto, provocando la evacuación. Además, la masa mucilaginosa forma un estrato lubricante que facilita el transporte del contenido intestinal. El mucílago no se degrada a nivel del intestino delgado, solamente se va a hidrolizar de forma parcial por las bacterias colónicas. Su efecto laxante se manifiesta después de las 24 h de su administración. A este efecto, contribuyen, además del mucílago, el aceite que contienen las semillas.

En el caso de diarrea y colitis espasmódica, el mucílago puede actuar como regulador intestinal, al poder absorber el exceso de líquido de las asas intestinales, aumentando su viscosidad, y por tanto, disminuyendo la velocidad de tránsito.

Visto los resultados en ensayos clínicos, *P. afra* asociada a un régimen alimenticio pobre en grasas saturadas y en colesterol, puede ser útil en casos de elevación moderada de la colesterolemia, aunque el interés clínico a largo plazo continúa, en este caso, pendiente de confirmación.

<sup>19</sup> **Comisión E:** Guía terapéutica de las hierbas medicinales desarrollado por un comité especial de expertos del instituto alemán para fuentes medicinales y medicamentos.



Y por último, también está admitido su empleo como saciante, administrado con grandes cantidades de agua, disminuyendo la sensación de apetito.

La zaragatona no provoca efectos secundarios importantes, pero ocasionalmente, en casos de individuos especialmente sensibles, a altas dosis, o en aquellos que hagan un uso incorrecto, puede producir reacciones digestivas, (<1%), flatulencia, distensión abdominal, obstrucción esofágica o intestinal y reacciones alérgicas o dermatológicas: reacciones de hipersensibilidad con rinitis, espasmo bronquial y urticaria e incluso anafilaxia tanto en consumidores como en manipuladores, especialmente en drogas pulverizadas.

En España, esta droga se comercializa como simple o el mucílago extraído de las semillas y también interviene en algunas mezclas laxantes. Lo mismo sucede en Francia, Italia, Suiza y Estados Unidos. Sin embargo, en Alemania, se sustituye esta planta por la semilla de ispágula (*P. ovata*).

Se debe acompañar de un volumen adecuado de agua (150 ml cada 5 g, según la monografía de la comisión E alemana), además de asegurar un aporte de líquido de al menos 2 litros diarios para evitar la aparición de obstrucciones intestinales. El mucílago como tal (hemicelulosa de la semilla de zaragatona), en polvo o en gránulos (no se debe masticar) se debe tomar también con una cantidad suficiente de líquido. Generalmente se utiliza solo, o a veces, se incluye en asociaciones con sorbitol, citrato o aceite de parafina.

Las dosis diarias recomendadas son (Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 2001):

Droga pulverizada: 4-12 g /8h (adulto)

Droga pulverizada: 2 g/8 h (niños de 6-12 años)

Extº. fluido: 1:1 (g/ml): 2-5 ml/24 h

Si la ingesta de agua no es la adecuada, puede empeorar casos de afecciones estenosantes de píloro, obstrucción esofágica, íleo espástico y oclusión intestinal. Al alterar la motilidad intestinal, han de utilizarse con prudencia en el caso de megacolon. También está contraindicado en dolor abdominal de origen desconocido, apendicitis y niños menores de 2 años, debido a la ausencia de datos que avalen su seguridad y personas encamadas (para evitar el estacionamiento del producto en el esófago).

La Comisión E no recomienda el uso de la zaragatona, en caso de diarrea, durante un periodo de más de 3 o 4 días sin consultar a un médico. En el caso de los ancianos, debe prescribirse con precaución, debido a que puede exacerbar estados de debilidad, hipotensión e incoordinación psicomotriz. Los ancianos deben comenzar el tratamiento con la mitad de la dosis normal.

Se ha estudiado que, al reducir el tiempo de tránsito intestinal, puede disminuir la absorción de nitrofurantoína. También puede verse afectada la biodisponibilidad oral de otros fármacos, como digitálicos, ácido acetilsalicílico o estrógenos. En el caso de este último, se ha estudiado cómo el consumo de las semillas en tratamientos de adelgazamiento o estreñimiento, disminuye la velocidad de absorción, aunque aumenta ligeramente la concentración de estradiol absorbido (García *et al.*, 2000). Por el contrario, puede potenciar los efectos de antidiabéticos orales e insulina, al poder producir *P. afra* per sé una disminución de la glucemia, por lo que, en caso de coadministración, deberán reajustarse las dosis.

En caso de embarazo, la FDA incluye este medicamento en la categoría A, es decir, su uso es seguro durante el embarazo, y en la lactancia se ignora si los componentes de la zaragatona son excretados en cantidades significativas con la leche materna, y si ello pudiese afectar al niño.

-Presentaciones (Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 2001):

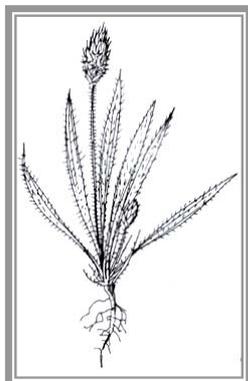
Reduccher Zaragatona<sup>®</sup>

Roha-Med coadyuvante en el control de peso<sup>®</sup>

Zaragatona<sup>®</sup>



### ***Plantago bellardii* All.**



#### **a) Usos en medicina popular.**

No se han encontrado datos acerca de su empleo en medicina popular hasta el momento.

#### **b) Ensayos biológicos realizados.**

Tampoco se han realizado hasta el momento ensayos de actividad biológica a extractos obtenidos a partir de *P. bellardii*.

#### **c) Componentes químicos.**

Los componentes identificados mediante cromatografía en capa fina en *P. bellardii*, son los siguientes:

Tipo	Compuesto	Parte de la planta	Referencia
<b>Fenilpropanoides</b>	Ácido clorogénico	Sumidad	(Ronsted <i>et al.</i> , 2000)
	Verbascósido	Sumidad	
<b>Iridooides monoterpénicos</b>			(Ronsted <i>et al.</i> , 2000)
	Ácido geniposídico	Sumidad	(Andrzejewska-Golec y Swiatek 1984a)
	Asperulósido	Sumidad	
Aucubina	Sumidad Semilla		

#### **d) Indicaciones en Fitoterapia**

No se han descrito.

***Plantago coronopus* L.**



**a) Usos en medicina popular**

Nombres vulgares: Estrellamar, coronopo, hierba de la estrella, hierba estrella, estrella, cuerno de ciervo, corniciervo, pie cervino, hierba cervina.

Su nombre se debe a que las hojas son hendidas. También, ha recibido el nombre de *pedem corvinum*, que quiere decir *pie de cuervo*. Teophrasto puso esta planta en la lista de las espinosas, mirando solamente a la fracción de las hojas que son en sí puntiagudas.

Dioscórides trata de esta planta en el capítulo 119 del libro II de la Materia Médica, y según Andrés de Laguna, “*el coronópode se puede cocer para comerla en ensaladas. La raíz es útil frente a los flujos estomacales, además, se la considera altamente diurética y facilita la eliminación de arenillas. La raíz seca en España, bebida con vino es valeroso remedio contra las mordeduras de víboras*” (Font Quer, 1976).

Otros autores corroboran estos usos, como Jarava en el siglo XVI, que menciona cómo esta planta se cultivaba en los huertos para comerlo en ensaladas, en Francia también se la considera comestible y en el Norte de Africa, las semillas son molidas o machacadas y se utilizan para hacer papillas (Rivera Núñez y Obón de Castro 1991).

Uso tradicional	Parte de la planta	País	Referencia
<b>Aparato genitourinario</b>			
▪ <i>Diurético</i>	Sumidad (cocimiento, 30 g/L)	Grecia	(Emmanuel y Papavasilion 1920)
▪ <i>Litolisis</i> <sup>20</sup>	Sumidad (cocimiento) Sumidad (cocimiento)	Irán España	(Zagari, 1992) (Darias <i>et al.</i> , 1989)
<b>Aparato respiratorio</b>			
▪ <i>Asma</i>	Sumidad (cocimiento)	Irán	(Zagari, 1992)
▪ <i>Dolor garganta</i>	Hojas (infusión)	Madeira	(Rivera y Obón 1995)
<b>Órganos sensoriales</b>			
▪ <i>Dolor dental y otalgia</i>	Sumidad (cocimiento)	Irán	(Zagari, 1992)
▪ <i>Inflamación ocular</i>	Semillas (mucílago, colirio)	Irán	
<b>Piel</b>			
▪ <i>Analgésico</i>	Sumidad (infusión)	España	(Darias <i>et al.</i> , 1986; 1989; Zagari, 1992)
▪ <i>Astringente</i>	Raíz desecada	Irán	
▪ <i>Calmante (externo)</i>	Sumidad (cocimiento)	Irán	
▪ <i>Cicatrizante heridas</i>	Hojas frescas	Iran	
▪ <i>Demulcente</i>	Sumidad (infusión)	España	

<sup>20</sup> *Litolisis*: disolución de cálculos por medio de sustancias litotripsicas.



Uso tradicional (cont.)	Parte de la planta (cont.)	País	Referencia
<b>Piel (cont.)</b>			
▪ <i>Emoliente</i>	Sumidad (cocimiento)	Irán	
<b>Sistema circulatorio</b>			
▪ “Rectificador” de sangre	Sumidad (cocimiento)	Irán	(Zagari, 1992)
<b>Sistema digestivo</b>			
			(Zagari, 1992)
▪ <i>Catártico</i>	Sumidad (cocimiento)	Irán	
▪ <i>Estomatitis</i>	Sumidad (cocimiento)	Irán	
▪ <i>Diarrea</i>	Sumidad (cocimiento)	Irán	

### b) Ensayos biológicos realizados.

*P. coronopus* ha sido incluido en ensayos utilizados en medicina popular en infecciones bacterianas y fúngicas de la piel o en el tratamiento de desórdenes gastrointestinales.

Actividad	Tipo extracto	Resultado	Referencia
<b>Antibacteriana</b>			
	Etanólico 95% (sumidad)		(Donrberger y Lich 1982)
<i>Agrobacter aerogenes</i>		Negativo <sup>21</sup>	
<i>Bacillus globifer</i>		Negativo	
<i>Bacillus globifer resistente a eritromicina</i>		Negativo	
<i>Bacillus globifer resistente a tetraciclina</i>		Negativo	
<i>Bacillus mycoides</i>		Negativo	
<i>Bacillus subtilis</i>		Negativo	
<i>Escherichia coli</i>		Negativo	
<i>Escherichia coli resistente a estreptomina</i>		Negativo	
<i>Micobacterium phlei</i>		Negativo	
<i>Micobacterium smegmatis</i>		Negativo	
<i>Proteus morgani</i>		Negativo	
<i>Proteus vulgaris</i>		Negativo	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Negativo	
<i>Serratia marcescens</i>		Negativo	
<i>Staphylococcus aureus</i>		Negativo	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acuoso (sumidad)	Negativo	(Caldes <i>et al.</i> , 1975)
<i>Staphylococcus faecium</i>		Negativo	(Caldes <i>et al.</i> , 1975)
<b>Antifúngica-antilevadura</b>			
	Etanólico 95% (sumidad)		(Donrberger y Lich 1982)
<i>Fusarium culmorum</i>		Negativo	
<i>Fusarium solani</i>		Negativo	
<i>Kloeckera brevis</i>		Negativo	
<i>Penicillium notatum</i>		Negativo	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		Negativo	
<i>Scopulariopsis spp.</i>		Negativo	

<sup>21</sup> Negativo significa que el halo inhibitorio mediante la técnica de dispersión en disco fue <6-8 mm.

Actividad (cont.)	Tipo extracto	Resultado	Referencia
<b>Antimalárica</b>			
<i>Plasmodium berghei</i> (en ratón)	Acuoso (sumidad)	Inactivo	(Caldes <i>et al.</i> , 1975)
<b>Antitumoral</b>			
<i>Inhibición de inducción fagos</i>	Etanólico 95% (sumidad)	Inactivo	(Donrberger y Lich 1982)
<i>Leucemia- P388 en ratón via ip</i>	Acuoso (sumidad)	Inactivo	(Caldes <i>et al.</i> , 1975)

**c) Componentes químicos.**

Tipo	Compuesto	Parte de la planta	Referencia
<b>Alcaloides monoterpénicos</b>			
	Indicaína	Semillas	(Balbaa <i>et al.</i> , 1971)
		Escapos	(Rizk <i>et al.</i> , 1986)
	Plantagonina	Semillas	(Balbaa <i>et al.</i> , 1971)
<b>Enzimas</b>			
	Emulsina	Sumidad	(Font Quer, 1976)
	Invertina	Sumidad	
<b>Esteroles y triterpenos</b>			
			(Font Quer, 1976)
	Ácido coronópico	Sumidad	
	Ácido plantagínico	Sumidad	(Balbaa <i>et al.</i> , 1971)
	$\alpha$ - amirina	Semillas	
	$\beta$ - amirina	Semillas	
	Campesterol	Semillas	(Balbaa <i>et al.</i> , 1971; Rizk <i>et al.</i> , 1986)
	Estigmasterol	Semillas	(Balbaa <i>et al.</i> , 1971)
	Reseno	Sumidad	(Font Quer, 1976)
	$\beta$ -sitosterol	Semillas	(Balbaa <i>et al.</i> , 1971)
<b>Fenilpropanoides</b>			
	Plantamósido	Hojas	(Andary <i>et al.</i> , 1988a; 1988b)
	Salidrósido	Sumidad	(Ronsted <i>et al.</i> , 2000)
	Verbascósido	Hojas	(Andary <i>et al.</i> , 1988a; 1988b)
<b>Flavonoides</b>			
	Apigenin-6,8-di-C-glucósido	Sumidad	
	Luteolina	Sumidad	
	Luteolin-7-glucósido	Sumidad	
	Luteolin-7-glucurónido	Sumidad	(Kawashty <i>et al.</i> , 1994; Velázquez-Fiz <i>et al.</i> , 2000b)
	Luteolin-7-glucurónido-3-glucósido	Sumidad	(Kawashty <i>et al.</i> , 1994)



Tipo	Compuesto	Parte de la planta	Referencia
<b>Iridoides monoterpénicos</b>			
	Ácido geniposídico	Sumidad	(Taskova <i>et al.</i> , 2002)
	Aucubina	Semillas	(Andrzejewska-Golec y Swiatek 1984a)
	Plantarenalósido	Sumidad	(Taskova <i>et al.</i> , 2002)
		Sumidad	(Ronsted <i>et al.</i> , 2000)
<b>Sales minerales</b>			
	ClNa	Sumidad	(Emmanuel y Papavasilion 1920)
<b>Saponinas</b>			
		Escapos	(Rizk <i>et al.</i> , 1986)
<b>Taninos</b>			
		Escapos	(Rizk <i>et al.</i> , 1986)
<b>Glúcidos</b>			
	Fructosa	Semillas	
	Glucosa	Semillas	
	Planteosa	Semillas	
	Sucrosa	Semillas	

***Plantago lagopus* L.**



**a) Usos en medicina popular.**

Nombres comunes: gallito, lengua de oveja, zarragananes.

Uso tradicional	Parte de la planta	País	Referencia
<b>Aparato respiratorio</b>			(Alkofahi <i>et al.</i> , 1996)
▪ <i>Bronquitis</i>	Sumidad	Jordania	
▪ <i>Resfriados</i>	Sumidad	Jordania	
<b>Sistema digestivo</b>			(Alkofahi <i>et al.</i> , 1996)
▪ <i>Antidiarreico</i>	Escapos (infusión con zarzamora)	España	(González-Tejero <i>et al.</i> , 1995)
▪ <i>Antiséptico intestinal</i>	Sumidad (cocimiento)	España	(Darias <i>et al.</i> , 1989)
▪ <i>Purgante</i>	Sumidad	Jordania	(Alkofahi <i>et al.</i> , 1996)

**b) Ensayos biológicos realizados.**

Actividad	Tipo de extracto	Resultado	Referencia
<b>Antibacteriana</b>			(Alkofahi <i>et al.</i> , 1996)
	Etanólico 100% (sumidad)	Negativo (2,5 mg/mL)	
<i>Escherichia coli</i>		Negativo	
<i>Proteus mirabilis</i>		Negativo	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Negativo	
<i>Staphylococcus aureus</i>		Negativo	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		Negativo	
<b>Antifúngica-antilevadura</b>			(Al-Shamma y Mitscher 1979; Alkofahi <i>et al.</i> , 1996)
<i>Candida albicans</i>	Etanólico 80% (sumidad)	Negativo (1mg/mL)	
	Etanólico 100% (sumidad)	Negativo (2,5 mg/mL)	



Actividad (cont.)	Tipo de extracto	Resultado	Referencia
<b>Antiparasitaria</b>			(Martín <i>et al.</i> , 1998)
<i>Leishmania infantum</i>	Clorofórmico (sumidad)	Débil actividad <sup>22</sup> .	
	Metanólico 80% (sumidad)	Débil actividad <sup>22</sup> .	
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Clorofórmico (sumidad)	Débil actividad <sup>22</sup> .	
	Metanólico 80% (sumidad)	Débil actividad <sup>22</sup> .	
<b>Antitumoral</b>			
	Etanólico 100% (sumidad)		(Alkofahi <i>et al.</i> , 1996)
<i>Artemia salina</i>		Inactivo, (se consideró tóxico si $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$ )	
Citotoxicidad en A549		Inactivo <sup>23</sup>	
Citotoxicidad en HT-29		Inactivo <sup>23</sup>	
Citotoxicidad en MCF-7		Inactivo <sup>23</sup>	
Mutagénica		Activo a 195 $\mu\text{g/ml}$	
<i>Salmonella typhimurium</i> T153			

### c) Componentes químicos.

Ausencia de alcaloides en sumidad. (Al-Shamma y Mitscher 1979) Se han detectado y/o aislado los siguientes compuestos.

Tipo	Compuesto	Parte de la planta	Referencia
<b>Fenilpropanoides</b>			(Fiz <i>et al.</i> , 2000)
	Ácido clorogénico	Sumidad	
	Ácido rosmarínico	Sumidad	
	Plantamajósido	Sumidad	
	Verbascósido	Hojas	(Andary <i>et al.</i> , 1988a; 1988b)
<b>Flavonoides</b>			(Kawashty <i>et al.</i> , 1994)
	Apigenina	Sumidad	
	Apigenin-7-glucósido	Sumidad	
	Apigenin-7-glucurónido	Sumidad	
	Apigenin-7-rutinósido	Sumidad	
	Cinarósido	Sumidad	(Fiz <i>et al.</i> , 2000)
	Luteolina	Hoja	(Harborne y Williams 1971; Kawashty <i>et al.</i> , 1994) (Kawashty <i>et al.</i> , 1994)
	Luteolin-7-glucósido	Sumidad	
	Luteolin-7-glucurónido	Sumidad	
	Luteolin-7-glucogalactósido	Sumidad	

<sup>22</sup>  $DL_{100} > 250 \mu\text{g/mL}$

<sup>23</sup> Se consideró activo si  $CI_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ .

Tipo	Compuesto	Parte de la planta	Referencia
<b>Flavonoides (cont.)</b>			
	Luteolin-7-neohesperidósido	Sumidad	(Kawashty <i>et al.</i> , 1994)
	Luteolin-7-rutinósido	Sumidad	(Kawashty <i>et al.</i> , 1994)
<b>Iridoides monoterpénicos</b>			
	Asperulósido	Sumidad	(Afifi <i>et al.</i> , 1990)
	Aucubina	Sumidad	(Andrzejewska-Golec y Swiatek 1984b; Afifi <i>et al.</i> , 1990; Velázquez-Fiz <i>et al.</i> , 2000a)
		Semillas	(Raszejam y Gill 1973; Andrzejewska-Golec y Swiatek 1984b)
	Catalpol	Sumidad	(Andrzejewska-Golec y Swiatek 1984b; Afifi <i>et al.</i> , 1990; Velázquez-Fiz <i>et al.</i> , 2000a)
		Semillas	(Raszejam y Gill 1973; Andrzejewska-Golec y Swiatek 1984b)
	10-benzoil-catalpol	Sumidad	(Velázquez-Fiz <i>et al.</i> , 2000a)
	10-cinamoil-catalpol	Sumidad	(Taskova <i>et al.</i> , 2002)
	6- $\alpha$ -hidroxi-genipósido	Sumidad	(Velázquez-Fiz <i>et al.</i> , 2000a)
	Harpagósido	Sumidad	(Velázquez-Fiz <i>et al.</i> , 2000a)
	Plantarenalósido	Sumidad	(Afifi <i>et al.</i> , 1990)

#### d) Indicaciones en Fitoterapia.

No se han descrito.



***Plantago lanceolata* L.**



**a) Usos en medicina popular.**

Nombres comunes: llantén menor, llantén de cinco nervios, llantén lanceolado.

Esta planta se ha utilizado desde la antigüedad por las propiedades ligeramente astringentes, emolientes y cicatrizantes de las hojas (Coon, 1963; Krochmal y Krochmal 1973), destinando su uso para lavados bucales (cocimiento de hojas solo o con ácido bórico) y antiinflamatorio. Vía oral, se empleaba como anticatarral y para inflamaciones del tracto respiratorio.

Además, no sólo se ha utilizado a nivel medicinal, sino también en la alimentación, así, las semillas eran útiles para espesar sopas, las hojas, se tomaban en ensaladas y además, tienen la capacidad de cuajar la leche, por un “jugo ácido que contienen” (Font Quer, 1976). Incluso también aparece en la literatura, en obras de Shakespearare.

*P. lanceolata* siempre ha estado vinculada con componentes supersticiosos y mágicos, en muchos lugares de Europa, las personas que tenían que atravesar lugares infestados de víboras se colocaban las inflorescencias atadas a las piernas, porque creían que estas plantas les protegerían de las serpientes y durante el siglo XVIII se colocaba en el interior de las diligencias como talismán para los viajes (Rivera Núñez y Obón de Castro 1991). Los llantenos en el arte cristiano medieval eran símbolo de las muchedumbres que buscaban a Cristo (Rivera Núñez y Obón de Castro 1991).

Diversas tribus de indios americanos han utilizado también diferentes especies del género *Plantago*. La tribu Cherokee (sureste de América del Norte) utilizaba las hojas pulverizadas de *P. lanceolata* como analgésico, aplicada como emplasto para los dolores de cabeza; el zumo de la planta, para úlceras y dolores oculares; las infusiones de raíces se tomaban como antidiarreico, frente a la disentería, y la planta en general era utilizada como antídoto frente a mordeduras de serpientes y picaduras de insectos. Las hojas, hervidas, se aplicaban sobre quemaduras. Infusiones de hojas se utilizaban para hematuria, molestias intestinales, espasmos intestinales y a los niños se les administraba oralmente como energético cuando comenzaban a caminar.

La tribu Kawaiisu empleaba infusiones de hojas para otalgias. Los Iroquis (noreste de América del Norte), utilizaron algunas especies de *Plantago* como analgésico, la decocción de la sumidad se tomaba para dolores de pecho y estómago, y la planta pulverizada en caliente se aplicaba a heridas o para el dolor. El cocimiento de las raíces se utilizaba para vómitos, diarrea y calambres, así como antirreumático y analgésico general. Las hojas trituradas se aplicaban de forma tópica para aliviar el

prurito de mordeduras de arañas y en úlceras. La raíz en infusión como antitérmico, problemas cardíacos, hemostático, problemas en articulaciones y también se incluía dentro de las plantas empleadas para regular el ciclo menstrual y para la esterilidad femenina; también se utilizaba por su efecto diurético, como suplemento energético y como sedante (Moerman y Ford 1986).

Uso tradicional	Parte de la planta	País	Referencia
<b>Antiparasitario</b>			
▪ <i>Antiparasitario en veterinaria</i>	Hojas (zumo) (v.o.)	Turquía	(Tabata <i>et al.</i> , 1994)
<b>Antitumoral</b>			
			(Jaén, 1992)
▪ <i>Cáncer cerebral</i>	Hojas (cruda/cocimiento)	España	
▪ <i>Carcinoma hepático</i>	Hojas (cruda/cocimiento)	España	
▪ <i>Cáncer de mama</i>	Hojas (cruda/cocimiento)	España	
▪ <i>Cáncer útero</i>	Hojas (cocimiento)	Turquía	(Tabata <i>et al.</i> , 1994)
<b>Aparato genitourinario</b>			
▪ <i>Cálculos renales</i>	Hojas frescas (cocimiento 70 g hojas/L.)	Italia	(De Feo y Senatore 1993)
▪ <i>Cistitis</i>	Sumidad (infusión)	Francia	(Novaretti y Lemordant 1990)
▪ <i>Disuria</i>	Hojas		(Mills y Bone 2000)
▪ <i>Diurético</i>	Hojas (infusión)	Japón	(Murai <i>et al.</i> , 1995b)
<b>Aparato respiratorio</b>			
▪ <i>Amigdalitis</i>	Raíz desecada	Etiopía	(Desta, 1993)
▪ <i>Antiasmático</i>	Hojas (cocimiento)	Turquía	(Yazicioglu y Tuzlaci 1996)
	Hojas (infusión)	Japón	(Murai <i>et al.</i> , 1995b)
▪ <i>Bronquitis</i>	Hojas (cocimiento, 70 g/L)	Italia	(De Feo y Senatore 1993)
▪ <i>Enfisema pulmonar</i>	Hojas		(Mills y Bone 2000)
▪ <i>Faringitis</i>	Hojas (sirope)	Italia	(Lokar y Poldini 1988)
	Hojas y zumo	España	(Jaen, 1993)
▪ <i>Infecciones</i>	Hojas	Alemania	(Wegener y Kraft 1999)
▪ <i>Inflamación generalizada vías respiratorias</i>	Hojas	España	(Jaen, 1993)
▪ <i>Obstrucción nasal</i>	Hojas (cocimiento+ vino)	España	(Jaen, 1993)
▪ <i>Rinitis y sinusitis</i>	Hojas		(Mills y Bone 2000)
▪ <i>Tos irritativa crónica</i>	Hojas	Alemania	(Wegener y Kraft 1999)
	Hojas (cocimiento con <i>Mentha suaveolens</i> )	Italia	(De Feo <i>et al.</i> , 1992)
<b>Articulaciones y sistema óseo</b>			
▪ <i>Artralgia</i>	Hojas frescas (v.t.)	Italia	(Leporatti y Pavesi 1990)
▪ <i>Gota</i>	Hojas (cocimiento) (v.o.)	Islas Rodríguez	(Gurib-Fakim <i>et al.</i> , 1996)
<b>Inflamación</b>			
	Hojas (infusión) (v.o.)	Japón	(Murai <i>et al.</i> , 1995b)
	Hojas (cocimiento) (v.o.)	España	(Ríos <i>et al.</i> , 1987)



Uso tradicional (cont.)	Parte de la planta	País	Referencia
<b>Órganos sensoriales</b>			
▪ <i>Conjuntivitis</i>	Hojas (cocimiento)	Madeira Guatemala	(Rivera y Obón 1995) (Cáceres <i>et al.</i> , 1987)
	Hojas (emplasto)	Italia	(Lokar y Poldini 1988)
▪ <i>Molestias oculares</i>	Hojas (zumo)	Francia	(Novaretti y Lemordant 1990)
▪ <i>Otitis media</i>	Hojas		(Mills y Bone 2000)
▪ “ <i>Sordera</i> ”	Hojas (cocimiento + vino)	España	(Jaen, 1993)
<b>Piel</b>			
▪ <i>Abscesos</i>	Hoja fresca (v.t.)	Grecia	(Malamas y Marselos 1992)
	Hojas (v.t.)	Turquía	(Fujita <i>et al.</i> , 1998)
	Hojas (con aceite de semillas de <i>Papaver somniferum</i> )	Turquía	(Yesilada <i>et al.</i> , 1995)
	Hoja fresca (v.t.)	Turquía	(Tabata <i>et al.</i> , 1994)
▪ <i>Alivio de dermatitis ocasionada por hiedra venenosa</i>	Hoja fresca triturada (v.t.)	E.E.U.U.	(Duckett, 1980) (Brown y Dattner 1998)
▪ <i>Antiacneico</i>	Hojas	Turquía	(Fujita <i>et al.</i> , 1998)
▪ <i>Antídoto venenos</i>	Hojas	Francia	(Novaretti y Lemordant 1990)
▪ <i>Antiinflamatorio</i>	Sumidad (infusión)	Francia	(Novaretti y Lemordant 1990)
	Hojas (cocimiento)	Italia	(Mascolo <i>et al.</i> , 1987)
	Hojas (infusión) (v.t.)	Cuba	(Ruiz <i>et al.</i> , 1996)
▪ <i>Antiséptico</i>	Hojas (infusión) (v.t.)	Cuba	(Ruiz <i>et al.</i> , 1996)
▪ <i>Astringente</i>	Sumidad (cocimiento) (v.t.)	Perú	(Ramirez <i>et al.</i> , 1988)
	Sumidad (cocimiento)	Francia	(Novaretti y Lemordant 1990)
▪ <i>Cicatrizante</i>	Hojas con sal machacadas (v.t.)	Turquía	(Tabata <i>et al.</i> , 1994)
	Hojas	Francia	(Novaretti y Lemordant 1990)
	Emplasto-cataplasma de hojas	Italia	(Lokar y Poldini 1988)
	Hojas (cocimiento) (v.t.)	España	(Ríos <i>et al.</i> , 1987)
	Hojas frescas (v.t.)	Italia	(De Feo y Senatore 1993)
	Hojas frescas pulverizadas o machacadas	Turquía	(Tabata <i>et al.</i> , 1994)
▪ <i>Dermatitis por picaduras de insectos</i>	Sumidad (v.t.)	Italia	(De Feo y Senatore 1993) (Brown y Dattner 1998)
▪ <i>Detoxificante</i>	Hojas secas (emplasto)	Italia	(Lokar y Poldini 1988)
▪ <i>Ecemas</i>	Hojas frescas (zumo)	Turquía	(Yazicioglu y Tuzlaci 1996)
	Hojas (cocimiento) (v.t.)	Islas Rodríguez	(Gurib-Fakim <i>et al.</i> , 1996)
▪ <i>Emoliente</i>	Sumidad (cocimiento)	Perú	(Ramirez <i>et al.</i> , 1988)
▪ <i>Forunculosis</i>	Hojas (v.t.)	Madeira	(Rivera y Obón 1995)
▪ <i>Heridas, úlceras, llagas y hematomas</i>	Zumo hojas frescas	Turquía	(Yazicioglu y Tuzlaci 1996)
	Cocimiento hojs secas (v.t.)	Turquía	(Yazicioglu y Tuzlaci 1996)
	Hoja fresca (v.t.)	Grecia	(Malamas y Marselos 1992)
	Hojas (cocimiento)	Guatemala	(Cáceres <i>et al.</i> , 1987)
▪ <i>Lavado de úlceras abiertas</i>	Hojas (cocimiento)	Madeira	(Rivera y Obón 1995)
▪ <i>Quemaduras</i>	Hojas desecadas	Turquía	(Yazicioglu y Tuzlaci 1996)
▪ <i>Vulnerario</i>	Hojas (zumo)	Francia	(Novaretti y Lemordant 1990)

Uso tradicional (cont.)	Parte de la planta	País	Referencia
<b>Sistema circulatorio</b>			
▪ <i>Antihemorrágico</i>	Hojas frescas (v.t.)	Italia	(De Feo y Senatore 1993)
▪ <i>Depurativo</i>	Hojas (sirope)	Italia	(Lokar y Poldini 1988)
▪ <i>Hemorroides (alivio picor)</i>	Hojas (cocimiento, 70 g/L)	Italia	(De Feo y Senatore 1993)
▪ <i>Hemostático</i>	Sumidad (cocimiento)	Francia	(Novaretti y Lemordant 1990)
▪ <i>Hemostático en heridas y varices</i>	Hojas frescas (v.t.)	Italia	(De Feo y Senatore 1993)
▪ <i>Varices</i>	Hojas (cocimiento, 70 g/L)	Italia	
<b>Sistema digestivo</b>			
▪ <i>Antidiarreico</i>	Sumidad (cocimiento)	Francia	(Novaretti y Lemordant 1990)
	Hojas (infusión)	España	(Jaen, 1993)
	Hojas (cocimiento con <i>Sambucus nigra</i> )	Italia	(De Feo <i>et al.</i> , 1992)
▪ <i>Colagogo</i>	Hojas (cocimiento, 70 g/L)	Italia	(De Feo y Senatore 1993)
▪ <i>Cólicos</i>	Hojas (infusión)	España	(Jaen, 1993)
▪ <i>Colitis</i>	Hojas		(Mills y Bone 2000)
▪ <i>Disentería</i>	Hojas (cocimiento, 70 g/L)	Italia	(De Feo y Senatore 1993)
			(Mills y Bone 2000)
▪ <i>Dispepsia e hiperacidez</i>	Hojas		
▪ <i>Enteritis</i>	Hojas		
▪ <i>Gastritis</i>	Hojas		
▪ <i>Ileitis</i>	Hojas		
▪ <i>Molestias estomacales</i>	Hojas frescas (v.o.)	Turquía	(Tabata <i>et al.</i> , 1994)
			(Mills y Bone 2000)
▪ <i>Reflujo esofágico</i>	Hojas		
▪ <i>Úlcera péptica</i>	Hojas		
<b>Sistema inmunológico</b>			
			(Holdsworth, 1992)
▪ <i>Anticatarral</i>	Hojas (infusión)	Islas del Este (Pacífico Sur)	
▪ <i>Antigripal</i>	Hojas (infusión)	Islas del Este (Pacífico Sur)	
	Hojas (sirope)	Italia	(Lokar y Poldini 1988)
▪ <i>Antiinfeccioso</i>	Hojas (cocimiento)	España	(Ríos <i>et al.</i> , 1987)
<b>Suplemento alimenticio (veterinaria)</b>			
	Hojas		(Grela, 2000)



## b) Ensayos biológicos realizados.

Actividad	Tipo extracto	Resultado	Referencia
<b>Alergénica</b>			
	Acuoso (polen)	Activo, no detalla dosis, administración intradérmica	(Baldo <i>et al.</i> , 1982)
<b>Analgésica</b>			
	Etanólico (50%) (sumidad)	Inactiva a dosis 0,5 mg/Kg (ip ratas) Método de presión cola	(Dhawan <i>et al.</i> , 1977)
<b>Antibacteriana</b>			
	Etanólico (95%) (semillas)	Activo	(Rizescu <i>et al.</i> , 1976) (patentada)
<b>Anticonvulsivante y espasmolítica</b>			
Anticonvulsivante	Etanólico (50%) sumidad	Inactivo a dosis 0,5 mg/kg (ratón vía ip) vs convulsiones inducidas por electroshock	(Dhawan <i>et al.</i> , 1977)
Espasmolítica (tipo inespecífico)	Etanólico (50%) sumidad	Inactivo en ileon de cobaya vs contracciones inducidas por Ach e histamina	(Dhawan <i>et al.</i> , 1977)
<b>Antifúngica</b>			
<i>Aspergillus niger</i>	Etanólico 50% (hojas)	No activo	(Dhawan <i>et al.</i> , 1977)
<i>Candida albicans</i>	Clorofórmico	No activo	(Desta, 1993)
	Etanólico 50%	No activo	(Dhawan <i>et al.</i> , 1977)
	Etanólico 100%	No activo	(Ríos <i>et al.</i> , 1987)
	Metanólico	No activo	(Ríos <i>et al.</i> , 1987)
			(Dhawan <i>et al.</i> , 1977)
<i>Criptococcus neoformans</i>	Etanólico 50%	No activo	
<i>Microsporium canis</i>	Etanólico 50%	No activo	
<b>Antihelmíntica</b>			
Tenicida	Acuoso (hojas) o sumidad desecada	Activa, dosis variable, en humanos adultos, v. oral	(Desta, 1995)
<b>Antiinflamatoria</b>			
	Ext <sup>o</sup> liofilizado (sumidad)	Activo a 500 µg/huevo (ensayo membrana corialantoínica embrión pollo)	(Marchsan <i>et al.</i> , 1998) (Patentada)
	Etanólico 50% (sumidad)	Inactivo dosis 0,5 mg/kg ratas v.o. vs edema talón inducido por carragenina	(Aktay <i>et al.</i> , 2000)
	Etanólico (80%) (hojas)	Confuso, 11% inhibición de edema vs edema inducido por carragenina en talón rata.	(Mascolo <i>et al.</i> , 1987)
	Etanólico (95%) (semillas)	Activo en humanos (v.t.)	(Rizescu <i>et al.</i> , 1976) (patentada)

Actividad (cont.)	Tipo extracto	Resultado	Referencia
<b>Antiinflamatoria (cont.)</b>			
	Ext <sup>o</sup> . a partir de semillas frescas Fracciones de ext <sup>o</sup> acuoso	Activo en humanos, dosis ensayada 10%. Activo frente a edema auricular de ratón	(Hose <i>et al.</i> , 1996) (patentada) (Murai <i>et al.</i> , 1995b)
<b>Antiprurítica</b>			
	Hojas	Activo, aplicado a zonas con dermatitis por hiedra venenosa	(Duckett, 1980)
<b>Antitumoral y quimiopreventiva</b>			
Antioxidante (Antirradicalario)	Etanólico 50% (sumidad)	Inactivo dosis 5 µg/ml vs anión superóxido	(Masaki <i>et al.</i> , 1995)
Antimutagénica <i>Bacillus subtilis</i> NIG-1125 HIS MET	Metanólico (hojas y escapos)	Inactivo. Dosis 50 µl/disco	(Ishii <i>et al.</i> , 1984)
Antimutagénica <i>Bacillus subtilis</i> NIG-1125- HIS MET	Metanólico (raíz)	Inactivo	(Ishii <i>et al.</i> , 1984)
Antimutagénica <i>Escherichia coli</i> B/R-WP2-TRP	Metanólico (hojas y escapos)	Inactivo. (50 µl/disco)	(Ishii <i>et al.</i> , 1984)
Antimutagénica <i>Escherichia coli</i> B/R-WP2-TRP	Metanólico (raíz)	Inactivo	(Ishii <i>et al.</i> , 1984)
Citotoxicidad en HeLa.	Acuoso (sumidad)	Inactivo a dosis 10 %	(May y Willuhn 1978)
Inducción profago	Etanólico 95%	Inactivo	(Donrberger y Lich 1982)
Inhibición de angiogénesis	Fracción cromatográfica	Activo no dosis detallada	(Paper, 2003) (patentada)
Inhibición inducción fagos en bacterias	Etanólico 95%	Inactivo	(Donrberger y Lich 1982)
Mutagénica <i>Salmonella typhimurium</i> TA100	Tintura (sumidad)	Inactivo (200 µl/disco)	(Schimmer <i>et al.</i> , 1994)
Mutagénica <i>Salmonella typhimurium</i> TA98	Tintura (sumidad)	Inactivo (200 µl/disco)	(Schimmer <i>et al.</i> , 1994)
Prevención de genotoxicidad y agregación cromosómica en <i>Aspergillus nidulans</i>	Ext <sup>o</sup> . fluido (hojas)	Activo. (4,76 mg/mL)	(Ruiz <i>et al.</i> , 1996)
<b>Antitusígena</b>			
	Mucílago (hojas)	Efecto demulcente sobre la mucosa faríngea.	(Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 2001)
<b>Antivírica</b>			
<i>Herpes simplex I</i>	Ext <sup>o</sup> acuoso (hojas)	No activo	(May y Willuhn 1978; Pacheco <i>et al.</i> , 1993)
<i>Herpes simplex II</i>	Ext <sup>o</sup> acuoso (hojas)	No activo	(Pacheco <i>et al.</i> , 1993)
<i>Influenza A2 (manheim 57)</i>	Ext <sup>o</sup> acuoso (hojas)	No activo	(May y Willuhn 1978)
<i>Poliovirus II</i>	Ext <sup>o</sup> acuoso (hojas)	No activo	(May y Willuhn 1978)
<i>VIH</i>	Ext <sup>o</sup> acuoso (hojas)	No activo	(Pacheco <i>et al.</i> , 1993)



Actividad	Tipo extracto	Resultado	Referencia
<b>Cicatrizante</b>			
	Acuoso (hojas)	Activo, promueve crecimiento epitelial, disminuye la hiperemia y acelera la cicatrización en conejos.	(Monastyrskaya y Petropavlovskaya 1953)
<b>Diurética</b>			
Diurética	Etanólico 50% (sumidad)	Activo dosis 0,25 mg/kg v. ip rata	(Dhawan <i>et al.</i> , 1977)
<b>Despigmentante</b>			
Inhibición tirosinasa en melanoma B-16	no especificado	Inactivo a dosis 500 µg/ml	(Obayashi <i>et al.</i> , 1996)
<b>Espermicida</b>			
Coagulación seminal	Etanólico 50% (sumidad)	Inactivo dosis 2% en esperma de rata	(Dhawan <i>et al.</i> , 1977)
Espermicida	Etanólico 50% (sumidad)	Inactivo	(Dhawan <i>et al.</i> , 1977)
<b>Hemolítica</b>			
Hemolítica	Fracción saponina (hojas)	Activo	(Tarle <i>et al.</i> , 1981)
<b>Hemostática</b>			
Hemostática	Acuoso (hojas)	Activo	(Monastyrskaya y Petropavlovskaya 1953)
<b>Hepatoprotectora (antihepatotóxica)</b>			
	Hojas	Activo	(Öztürk <i>et al.</i> , 1992)
	Etanólico (100%) (hojas)	Débil actividad (11%), frente a hepatotoxicidad inducida por Cl <sub>4</sub> C. Dosis 500 mg/kg rata	(Aktay <i>et al.</i> , 2000)
	Etanólico (100%) (hojas)	Inhibe infiltración leucocitaria y proliferación células Kupffer	(Aktay <i>et al.</i> , 2000)
	Etanólico (100%) (hojas)	No inhibe la degeneración de hepatocitos	(Aktay <i>et al.</i> , 2000)
	Metanólico (sumidad)	Débil actividad frente a hepatotoxicidad inducida por Cl <sub>4</sub> C. Dosis 500 mg/kg (ip ratas)	(Kumazawa <i>et al.</i> , 1990)
<b>Hipoglucemiante</b>			
Hipoglucemiante	Etanólico 50% (sumidad)	Produce < 30% descenso del nivel de glucemia. Dosis 250 mg/kg v.oral ratas.	(Dhawan <i>et al.</i> , 1977)

Actividad	Tipo extracto	Resultado	Referencia
<b>Hipolipemiante</b>			
		Disminuye niveles de triglicéricos, colesterol total y $\beta$ -lipoproteínas en conejo aterosclerótico	(Carretero, 1999)
		Disminuye niveles LDL en cerdos	(Grela, 2000)
<b>Hipotérmica</b>			
	Etanólico 50% (sumidad)	Activo dosis 0,5 mg/kg vía ip ratón	(Dhawan <i>et al.</i> , 1977)
<b>Inmunoestimulante</b>			(Plachcinska <i>et al.</i> , 1984)
Estimulación de síntesis endógena de interferón	Acuoso (hojas)	Activo. Dosis 2%	
Supresión receptor E en linfocitos	Acuoso (hojas)		
Incremento receptores Fc y C3	Acuoso (hojas)		
<b>Insecticida y repelente de insectos</b>			(Pascual-Villalobos y Robledo 1998)
	Hexánico (sumidad)	Activo. Dosis 2mg/mL	
	Acetona (sumidad)	Activo. Dosis 2mg/mL	
	Metanólico (sumidad)	Activo. Dosis 2mg/mL	
<b>Toxicidad</b>			
	Acuoso	LD <sub>50</sub> 2980 mg/kg vía ip en ratón	(Desta, 1995)
	Etanólico 50%	LD <sub>50</sub> 1000 mg/kg vía ip ratón	(Dhawan <i>et al.</i> , 1977)
	Hidroalcohólico	LD <sub>50</sub> 3350 mg/kg vía ip en ratón	(Desta, 1995)

Extractos										Referencia
	Cl <sub>3</sub> CH. (1g/L) (hojas)	EtOH 50% (25 µg/ml)	EtOH 95%	Tintura (10 hojas/100 mL EtOH) (30 µl/disco)	EtOH (100%)	MeOH (dosis 1g/L) (hojas)	Acuoso (hojas) (0,2 mL/disco)	Zumo(hojas)	Fracción saponina (hojas)	
<b>Antibacteriana</b>										
<i>Bacillus subtilis</i>		-	+				-			(Felklova, 1958; Dhawan <i>et al.</i> , 1977)
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-		-	-			(Felklova, 1958; Dhawan <i>et al.</i> , 1977; Cáceres <i>et al.</i> , 1987)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-				++	-	++			(Ríos <i>et al.</i> , 1987; Desta, 1993)
<i>Mycobacterium phlei</i>	-					-				(Ríos <i>et al.</i> , 1987)
<i>Micrococcus flavus</i>									+	(Tarle <i>et al.</i> , 1981)
<i>Proteus vulgaris</i>					++		++			(Desta, 1993)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-			-	- /++	-	-			
<i>Salmonella gallinarum</i>					- /++		++			
<i>Salmonella typhosa</i>		-								(Dhawan <i>et al.</i> , 1977)
<i>Staphylococcus albus</i>					++		++			(Desta, 1993)
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	+		-	-	+	+	(Felklova, 1958; Demidov, 1963; Dhawan <i>et al.</i> , 1977; Tarle <i>et al.</i> , 1981; Cáceres <i>et al.</i> , 1987; Ríos <i>et al.</i> , 1987)
<i>Streptococcus pyogenes</i>			+				-			(Felklova, 1958)

Actividad antibacteriana de *Plantago lanceolata*.

El signo “-“ significa que el halo inhibitorio mediante la técnica de dispersión en disco es < 6-8 mm, (+) halo de inhibición es 6-10 mm; (++) halo de inhibición es 10-15 mm.

Los extractos acuosos preparados en frío, los extractos fluidos y el zumo de planta fresca han mostrado actividad bacteriostática y bactericida *in vitro*, mientras que las infusiones y los cocimientos preparados en caliente, parece que no presentan ninguna actividad.

**c) Componentes químicos**

Tipo	Compuesto	Parte de la planta	Referencia
<b>Ácidos fenoles</b>			
	Ácido protocatéquico	Sumidad	(Blumenthal <i>et al.</i> , 1998)
<b>Alcaloides</b>		Escapos	(Rizk <i>et al.</i> , 1986)
<b>Antraquinonas<sup>24</sup></b>			(Mueller <i>et al.</i> , 1999)
	Ácido crisofánico	Sumidad	
	Emodina	Sumidad	
	Fisciona (Physcion)	Sumidad	
<b>Carotenoides</b>			
	Caroteno	Hojas	(Abzalov, 1971)
<b>Cumarinas</b>			
	Aesculetina	Sumidad	(Hazanagy, 1970)
<b>Fenilpropanoides</b>			
	Ácido trans-cinámico	Hojas Raíz	(Fons <i>et al.</i> , 1998a)
	Ácido clorogénico	Hoja	(Maksyutina, 1971)
	Ácido neoclorogénico	Hoja	
	Cistanósido F	Hojas	(Murai <i>et al.</i> , 1995b)
	Isoverbascósido	Hojas	
	Lavandufoliosido	Hojas	
	Plantamajósido	Hojas	
	Plantamósido	Hojas	(Noro <i>et al.</i> , 1991) (Andary <i>et al.</i> , 1988a; 1988b; Murai <i>et al.</i> , 1995b; Fons <i>et al.</i> , 1998a)
		Plántula	(Fons <i>et al.</i> , 1998b)
		Raíz	(Fons <i>et al.</i> , 1998a)
	Verbascósido	Hojas	(Andary <i>et al.</i> , 1988a; 1988b; Noro <i>et al.</i> , 1991; Murai <i>et al.</i> , 1995b; Fons <i>et al.</i> , 1998b)
		Plántula	(Fons <i>et al.</i> , 1998b)
		Raíz	(Fons <i>et al.</i> , 1998a)
<b>Flavonoides</b>			
	Apigenina	Sumidad	(Kawashty <i>et al.</i> , 1994)
	Apigenin-7-glucósido	Sumidad	
	Apigenin-7-glucurónido	Sumidad	
	Apigenin-7-glucuronil-glucósido	Sumidad	
	Apigenin-6,8-di-C-glucósido	Sumidad	

<sup>24</sup> La suma de antraquinonas totales= 0,4 mg/Kg de planta.



Tipo	Compuesto	Parte de la planta	Referencia
<b>Flavonoides (cont.)</b>			
	Cosmosiina	Sumidad	(Haznagy <i>et al.</i> , 1976) (Nishibe <i>et al.</i> , 1995)
	Escutellareina /Scutellareina	Sumidad	(Nishibe <i>et al.</i> , 1995)
	Homo plantaginina	Sumidad	(Nishibe <i>et al.</i> , 1995)
	Luteolina	Hojas	(Harborne y Williams 1971)
		Sumidad	(Kawashty <i>et al.</i> , 1994)
	6-hidroxi-luteolina	Sumidad	(Nishibe <i>et al.</i> , 1995) (Kawashty <i>et al.</i> , 1994)
	Luteolin-7-glucósido	Sumidad	
	Luteolin-7-glucurónido	Sumidad	
	Luteolin-7-glucuronilglucósido	Sumidad	
	Luteolin-7-glucurónido-3'-glucósido	Sumidad	
	Plantaginina	Sumidad	(Nishibe <i>et al.</i> , 1995)
<b>Iridoides monoterpénicos</b>			
	Ácido geniposídico	Sumidad	(Taskova <i>et al.</i> , 2002)
	Asperulósido	Flores	(Bianco <i>et al.</i> , 1984; Handjieva <i>et al.</i> , 1991)
	Ácido asperulosídico metil desacetilado	Sumidad	(Handjieva <i>et al.</i> , 1991)
	Aucubina	Semilla	(Andrzejewska-Golec y Swiatek 1984b)
		Escapos	(Hazanagy, 1970; Darrow y Bowers 1997)
		Hojas	(Duff <i>et al.</i> , 1965; Hazanagy, 1970; Tarle <i>et al.</i> , 1981; Miething <i>et al.</i> , 1986; Darrow y Bowers 1997)
		Inflorescencias	(Hazanagy, 1970)
		Raíz	
		Semillas	(Raszeja y Gills 1973)
		Sumidad	(Andrzejewska-Golec y Swiatek 1984b; Handjieva <i>et al.</i> , 1991; Cheng <i>et al.</i> , 1992; Long <i>et al.</i> , 1995; Adamczyk <i>et al.</i> , 1998)
	Catalpol	Escapos	(Darrow y Bowers 1997)
		Hojas	(Duff <i>et al.</i> , 1965; Darrow y Bowers 1997)
		Semilla	(Andrzejewska-Golec y Swiatek 1984b)
		Sumidad	(Andrzejewska-Golec y Swiatek 1984b; Handjieva <i>et al.</i> , 1991; Long <i>et al.</i> , 1995; Adamczyk <i>et al.</i> , 1998)
	Globuralina (10-cinamoil-catalpol)	Sumidad	(Handjieva <i>et al.</i> , 1991; Taskova <i>et al.</i> , 2002)
	Scutellariosido I	Sumidad	(Handjieva <i>et al.</i> , 1991)
<b>Sales minerales</b>			
	Ácido silícico	Sumidad	(Blumenthal <i>et al.</i> , 1998)
	Ácido oxálico	Hojas	(Guil-Guerrero, 2001)
	Calcio	Hojas	
	Sales potásicas	Sumidad	(Blumenthal <i>et al.</i> , 1998)

Tipo	Compuesto	Parte de la planta	Referencia
<b>Saponinas</b>			(Blumenthal <i>et al.</i> , 1998)
<b>Sesquiterpenos</b>	Loliólido	Sumidad n.d. <sup>25</sup>	(Toth <i>et al.</i> , 1976) (Pettit <i>et al.</i> , 1980)
<b>Taninos</b>			(Blumenthal <i>et al.</i> , 1998)
<b>Vitaminas</b>	Vitamina C	Hojas	(Guil-Guerrero, 2001)
<b>Glúcidos</b>	2-carboxi-arabinitol	Hojas	(Moore <i>et al.</i> , 1993)
	Mucílago	Hojas	(Kardosova, 1992)
	Polisacárido F-I	Hojas	(Brautigam y Franz 1985)
	Polisacárido F-II	Hojas	
<b>Lípidos</b>	Ácidos grasos poliinsaturados	Hojas Semillas (aceite)	(Guil-Guerrero, 2001) (Swiatek <i>et al.</i> , 1980)
	Ácido esteárico		
	Ácido linoleico		
	Ácido linolénico		
	Ácido mirístico		
	Ácido oleico		
	Ácido palmítico		
<b>Proteínas</b>	Sulfotransferasa APS	Hojas	(Schmidt, 1975)

#### d) Indicaciones en Fitoterapia

*P. lanceolata* está aprobada por la comisión E alemana de Sanidad, así como en España, en el catálogo de Plantas Medicinales del Consejo de Farmacéuticos, donde se la incluye dentro del grupo PRO2, plantas medicinales antitusivas. (Blumenthal *et al.*, 1998; Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 2001)

La droga está constituida por las partes aéreas frescas o secas, recolectadas en tiempo de floración, así como sus preparaciones a dosis efectivas.

Las indicaciones para las que está aprobado el empleo de esta planta son:

- Uso interno: Resfriados, tos improductiva, afecciones inflamatorias de la mucosa bucofaríngea, faringitis, bronquitis, fiebre.
- Uso externo: Afecciones inflamatorias de la piel.

Estas indicaciones se deben a sus propiedades protectoras del hidrocoloide que posee, y el papel antiinflamatorio de los iridoides (sobre todo aquellos derivados del catalpol). Los mucílago

<sup>25</sup> n.d.: No detallado.



podrían proporcionar un gradiente osmótico para los alérgenos causados por las picaduras e inhibir de forma competitiva las lectinas irritantes (Brown y Dattner 1998). Además los fenilpropanoides han mostrado inhibir la formación de ácido araquidónico en edema auricular de ratón (Murai *et al.*, 1995b). Estos efectos contrastan con las propiedades alérgicas que poseen el polen y las semillas (Mehta y Wheeler 1991; Calabozo *et al.*, 2001). Se ha visto que los antígenos del polen de *P. lanceolata*, tienen reacciones cruzadas con alérgenos del olivo y melón (García-Ortiz *et al.*, 1996). Estas reacciones alérgicas también han sido observadas en animales.

Posología y pauta de administración:

La droga se utiliza pulverizada, infusiones, macerados, extracto fluido, tinturas, jarabes.

Las dosis diarias recomendadas por vía interna son:

Droga pulverizada: 3-6 g/24 horas.

Infusión: 1,4 g/150 ml/6-8 horas.

Exto. fluido: 1:1 (g/ml): 2-4 ml/6-8 horas.

Tintura: 1:5 (g/ml): 7ml/6-8 horas.

Las dosis diarias recomendadas por vía externa son:

Macerado: 1,4 g/150 ml varias veces al día en forma de gargarismos o cataplasmas.

En el caso de embarazos, esta planta se incluye dentro de la categoría B según la FAO, lo que implica que se han realizado estudios sobre varias especies de animales, utilizando dosis varias veces superiores a las humanas, sin que se hayan registrado efectos embriotóxicos o teratogénicos; sin embargo, no se han realizado ensayos clínicos en seres humanos, por lo que el uso del llantén sólo se acepta en caso de ausencia de alternativas terapéuticas más seguras. En el caso de la lactancia, se ignora si los componentes son excretados en cantidades significativas con la leche materna, y si ello pudiera afectar al niño.

No se han descrito reacciones adversas ni interacciones con otros medicamentos, aunque, la presencia de mucílagos puede originar un riesgo potencial debido a la posible disminución o retraso de la absorción oral de otros principios activos.

-Presentaciones:

En Alemania, la droga se encuentra en “bolsitas” para infusión (0.9 g) mientras que su extracto aparece como preparados solubles instantáneos antitusivos (Bronchostad®) y en diversas especialidades emolientes, expectorantes y broncoespasmodicas.

A pesar de que en España tiene una mayor presencia la sumidad de *Plantago major*, a la que se le atribuyen las mismas indicaciones, el Catálogo de Plantas Medicinales del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos recoge 4 especialidades con *P. lanceolata* como especie única en su composición.

También se combina con otras plantas medicinales en diversas especialidades farmacéuticas, así se puede encontrar con la semilla de cacao, la flor de árnica, la hoja de salvia, hojas de eucalipto, flor de altea, entre otras, para el tratamiento del asma, problemas respiratorios, congestión pulmonar, resfriado y tos irritativa.

En este catálogo se han encontrado 6 preparados de *P. lanceolata* con más de tres especies:

Herbalpina antitusivo y expectorante<sup>®</sup>

Llantusil<sup>®</sup>

Oftalmax<sup>®</sup>

Roha-Mad antitusígeno expectorante<sup>®</sup>

Yalufor laxante<sup>®</sup>



***Plantago serraria* L.**



**a) Usos en medicina popular.**

La sumidad es consumida en la región de Lukania (Italia), por los arbëreshë (descendientes albanicos), cocida o frita, además de utilizar sus espigas y brotes con fines religiosos (Pieroni *et al.*, 2002).

**b) Ensayos biológicos realizados.**

No se han descrito

**c) Composición química**

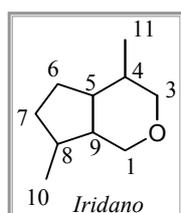
Tipo	Compuesto	Parte de la planta	Referencia
<b>Iridoide monoterpénico</b>			(Andrzejewska-Golec y Swiatek 1984b)
	Aucubina	Semilla Sumidad	

**d) Indicaciones en Fitoterapia.**

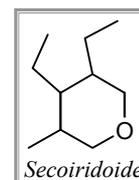
No se han descrito.

## II.2. ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA DE IRIDOIDES, FENILPROPANOIDES Y FLAVONOIDES.

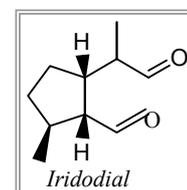
### II.2.1. IRIDOIDES



Los iridoides constituyen un grupo de monoterpenos con esqueleto ciclopenta[c]piránico, basados en la estructura del iridano (*cis*-2-oxabicyclo-[4,3,0]-nonano). En un sentido más amplio, también se pueden incluir los secoiridoides, caracterizados por la ruptura del enlace entre C-7, y C-8 del anillo ciclopentánico.



El término “iridoide” deriva de haber sido aislado, por primera vez, de las hormigas del género *Iridomyrmex*, que sintetizan iridodial con fines defensivos frente a otros insectos (Trim y Hill 1952). En las plantas, comenzaron a estudiarse a mediados del siglo XIX, con el descubrimiento de los compuestos asperulósido



(Schunk, 1848) o gentiopicrósido (Kromoeyer, 1862), aunque el auge no se alcanza hasta mediados de los años sesenta. Los iridoides objeto de nuestro estudio, aucubósido o aucubina<sup>26</sup> y genipósido, fueron aislados por primera vez por Bourquelot y Hérissé (aucubósido), a partir de las hojas de *Aucuba japonica* (1905), mientras que, genipina, genina de genipósido, lo fue por Djerassi y cols. en 1961 a partir de los frutos de *Gardenia jasminoides* (Djerassi *et al.*, 1961). Actualmente, se han identificado más de 500 iridoides, de los cuales, más de 300 son glicósidos y más de 100 son secoiridoides, siendo de interés científico al estar relacionados con los alcaloides indólicos, poseer diferentes actividades farmacológicas y servir de marcadores taxonómicos (Inouye, 1991; Bruneton, 2000; Sampaio-Santos y Kaplan 2001). Los iridoides son sintetizados por plantas dicotiledóneas, y dentro de éstas, las pertenecientes al grupo de las simpétalas, y por insectos. Los órdenes que destacan son las Dipsacales, Gentianales y Lamiales.

En general, los iridoides actúan como mecanismo de defensa frente a los herbívoros (Bowers y Stamp 1993). Los heterósidos, al ser hidrolizados, tiene propiedades desnaturizantes de proteínas, especialmente, del aminoácido lisina, mermando el contenido nutricional para el herbívoro, y además, al tener sabor amargo, hace que el animal rechace la planta en posteriores ocasiones (Jensen *et al.*, 2002).

---

<sup>26</sup> N.A. Apréciase que, aucubina y aucubósido se emplea para asignar a la misma molécula, a pesar de que el sufijo “ina” es utilizada para geninas, en este caso, ambos son glicósidos. Para designar a la genina, se emplea el término aucubigenina.

Por otro lado, algunos insectos han utilizado esta propiedad de los iridoides para protegerse. Así, determinadas especies de mariposas y abejas en estado larvario, han aprendido a capturar de forma selectiva determinados iridoides, generalmente aucubina, pasando de esta forma los iridoides a las larvas, sirviéndoles de defensa frente a sus depredadores. Se ha encontrado una relación entre la concentración y tipo de iridoides con la oviposición y desarrollo larvario de determinadas especies, de la familia Lepidopterae, Nymphalidae y Chrysomelidae, como *Euphydryas* (Bowers y Stamp 1997), *Junonia* (Klockars *et al.*, 1993; Adler *et al.*, 1995), *Melitaea* (Nieminen *et al.*, 2003), *Longitarsus* (Wiilinger y Dobler 2001) en plantas ricas en iridoides. Otros insectos artrópodos o microorganismos patógenos, pueden inducir una mayor síntesis de iridoides, lo que ayuda, aún más, a proteger de los herbívoros a la planta (Marak *et al.*, 2002a; 2002b). Por el contrario, ciertos iridoides son capaces de atraer a determinados felinos, como las iridolactonas de *Actinidia polygama* (Sakan *et al.*, 1969) o *Nepeta cataria* (Bates *et al.*, 1958).

Los iridoides también pueden tener propiedades antigerminativas, como aucubina, harpagósido o laterósido, que inhiben la germinación de semillas de *Hordeum vulgare* (cebada), e incluso, disminuyen la longitud de las raíces de semillas pregerminadas (Pardo *et al.*, 1998).

Los factores ambientales también afectan a la síntesis de iridoides. En estudios *in vitro* realizados con *Plantago lanceolata*, por ejemplo, los niveles de iridoides incrementan cuando las temperaturas son cálidas, comprendidas entre 18-20 °C, y disminuyen en situaciones de sombra o elevadas concentraciones de nitrógeno (Kordana *et al.*, 1998; Tamura, 2001; Tamura y Nishibe 2002). La radiación UV-B parece no influir en la producción de iridoides (McCloud y Berenbaum 1999).

Los iridoides son sustancias amargas, y extractos ricos en éstos han sido utilizados como tónicos estomacales (amarogentina, de las Gentianaceas), sedantes (valepotriatos, Valerianáceas), purgantes y coleréticos (genipina, *Gardenia*), o como antiinflamatorios y analgésicos (harpagósido, *Harpagophytum procumbens*), entre otras. Así, algunas plantas con iridoides están formando parte de especialidades en Fitoterapia, (raíz de valeriana, raíz de harpagofito...) y otras son utilizadas con fines no farmacéuticos (raíz de genciana).

En la tabla IV resumimos los ensayos farmacológicos realizados a iridoides biosintetizados por la ruta IIa, donde están incluidos genipósido y aucubina, así como la especie vegetal de la que se aisló y su uso popular.

La ruta II, comprende la serie “epi”, con estereoquímica  $8\alpha$ . A su vez, se tiende a dividir en dos subrutas, a, que comienza con 10-hidroxigeraniol, y va vía epi-iridodial, y que, tras la formación del ácido correspondiente, a menudo la descarboxilación en C-11 tiene lugar. La b, es idéntica a la

anterior hasta epi-iridotrial, donde la glucosilación tiene lugar y se da una oxidación del C-11 para formar un grupo carbonilo (Jensen, 1991).

Generalmente, cuando se da este tipo de iridoides en la especie, no aparecen los iridoides de tipo II.

Las familias que lo contienen son: Garryaceae, Aucubaceae (Cornales), Eucommiaceae (Eucommiales), todas las familias de los órdenes Lamiales e Hippuridales y la familia Ericaceae (Ericales)(Jensen, 1991).

En la figura 1, se muestra un diagrama de dicotiledoneas localizando los órdenes que biosintetizan iridoides mediante la ruta *Iia*. Estos órdenes están marcados con una zona punteada.

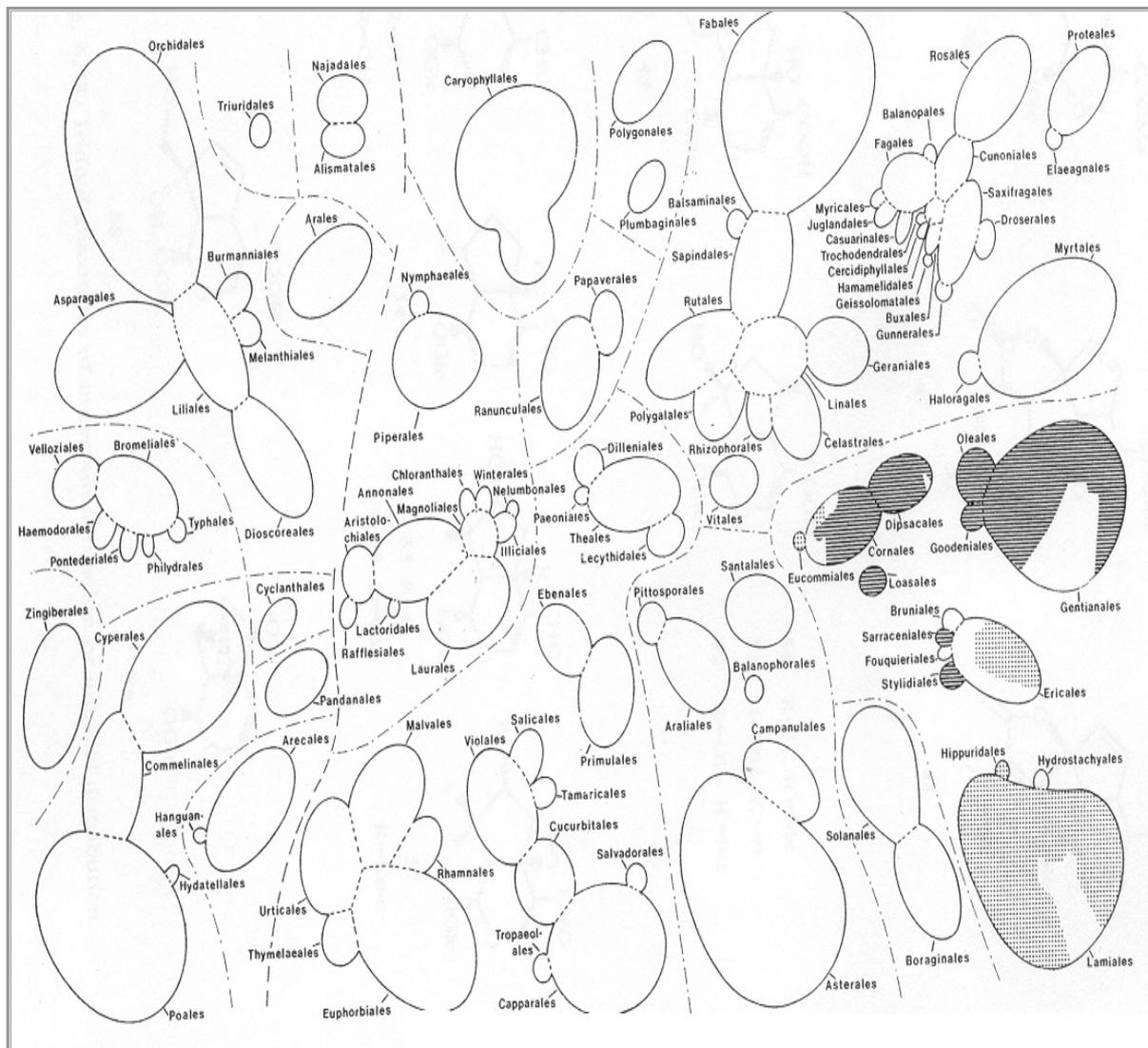


Figura 1: Distribución de iridoides biosintetizados por la ruta *Iia* (Jensen, 1991).

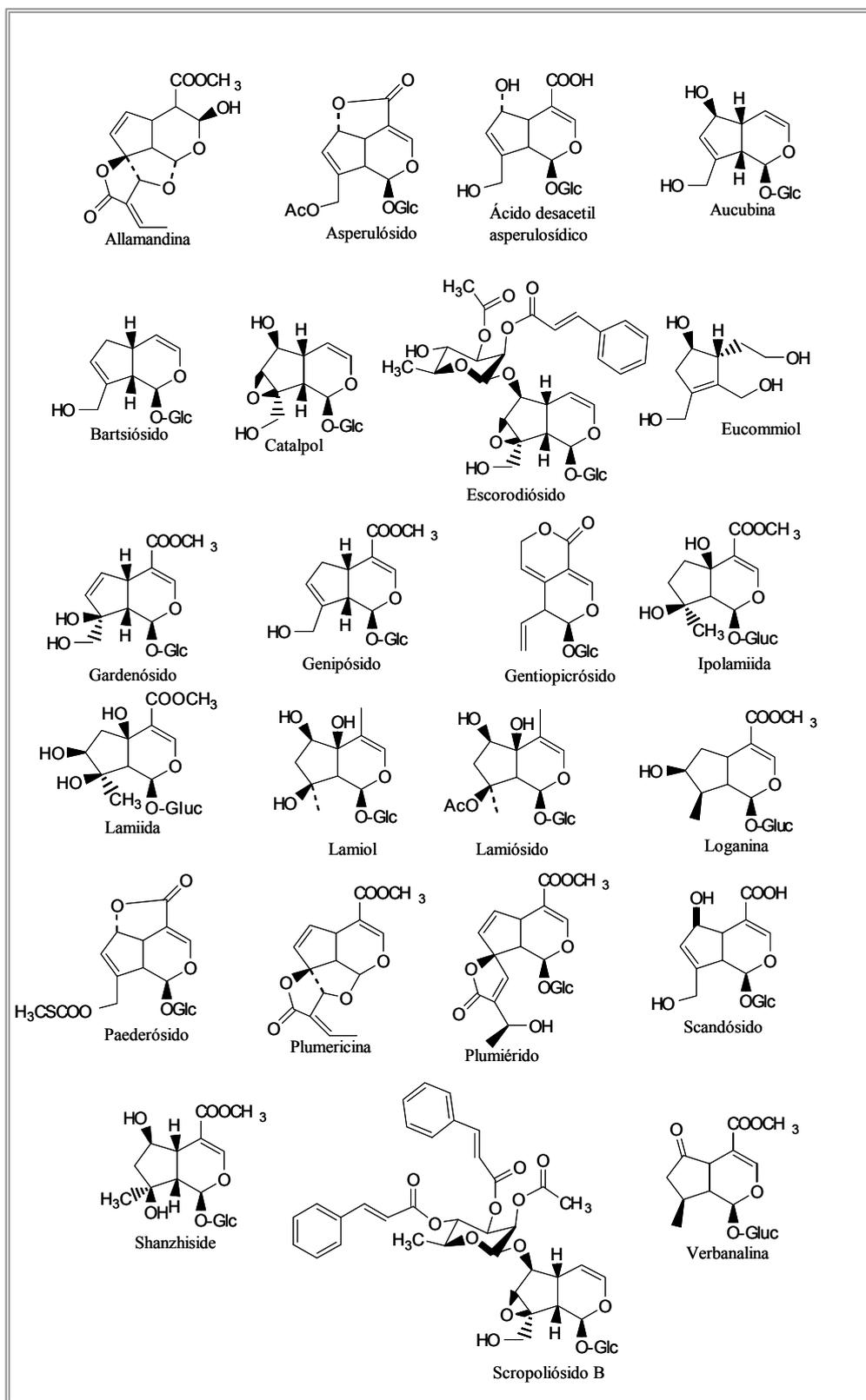


Figura 2: Estructuras químicas de iridoides biosintetizados por la ruta IIa (descarboxilados en C-11).



Familia <sup>27</sup>	Especie	Uso popular	Iridoide	Actividad ensayada	Referencia
Aucubaceae	<i>Aucuba japonica</i>		Aucubina	<p><b>Antiinflamatoria:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Inhibe la producción de TNF-<math>\alpha</math><sup>28</sup> e IL-6 inducida por antígenos. (Jeong <i>et al.</i>, 2002)</li> <li>▪ Fuertemente activo (v.t.) frente al edema auricular inducido por TPA en ratones (Recio <i>et al.</i>, 1994)</li> <li>▪ Activo (v.o.) frente al edema plantar inducido por carragenina en ratones (Recio <i>et al.</i>, 1994)</li> </ul> <p><b>Antimicrobiana</b> (Chang, 1998)</p> <p><b>Antitumoral:</b> (Ishiguro <i>et al.</i>, 1983)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Inhibición de ADN y ARN polimerasa. (Lee <i>et al.</i>, 2001)</li> <li>▪ Interacción con el ADN. (Lee <i>et al.</i>, 2001)</li> <li>▪ Inhibición de la degradación de I<math>\kappa</math>B. (Jeong <i>et al.</i>, 2002)</li> <li>▪ Débil citotoxicidad frente a células leucémicas y de linfoma humano. (Chiang <i>et al.</i>, 2003b)</li> </ul> <p><b>Colerética</b> (Miyagoshi <i>et al.</i>, 1988)</p> <p><b>Hemodinámica</b> (Circosta <i>et al.</i>, 1984)</p> <p><b>Hepatoprotectora:</b> (Chang, 2001)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Frente envenenamiento <i>Amanita virosa</i> en perros. (Chang y Yamaura 1993; Yamaura y Chang 1995)</li> <li>▪ Frente a hepatitis inducida por CCl<sub>4</sub>, y amanitina. (Chang, 1998)</li> <li>▪ Mecanismo de hepatoprotección: Incrementa la velocidad de eliminación de agentes tóxicos (células Hep G2). (Lee <i>et al.</i>, 2001)</li> </ul>	

**Tabla IV:** Ensayos farmacológicos realizados a iridoídes biosintetizados por la ruta IIa.

<sup>27</sup> La nomenclatura así como la sistemática botánica ha sido consultada en “The international Plant Name Index”, elaborado por The Royal Botanic Gardens, Kew, The Harvard University Herbaria y Australian National Herbarium. ([www.ipni.org/index.html](http://www.ipni.org/index.html))

<sup>28</sup> **TNF- $\alpha$ :** Factor de Necrosis Tumoral.

Familia	Especie	Uso popular	Iridoide	Actividad ensayada	Referencia
Aucubaceae (cont.)	<i>A. japonica</i> (cont.)		Aucubina (cont.)	<b>Neurogénica:</b> ▪ Inducción de la diferenciación neuronal. (Línea celular PC12h) No activo, pero sí la genina. <b>Quimiopreventiva:</b> ▪ Inhibición de citocromo p 450 <b>Toxicidad:</b> ▪ Unión irreversible mediante enlaces covalentes (tipo imino) entre su genina y sitios nucleofílicos de proteínas.	(Yamazaki <i>et al.</i> , 1994; 1996)  (Bartholomaeus y Ahokas 1995)  (Kim <i>et al.</i> , 2000)
Bignoniaceae	<i>Kigelia pinnata</i>	Infecciones cutáneas. Cáncer de piel	Norviburtinal	<b>Antibacteriana y antimicótica</b> <b>Antitumoral:</b> ▪ Cytotóxico en la línea tumoral de cáncer de piel.	(Houghton, 2002) (Houghton, 2002)
Caprifoliaceae	<i>Lonicera implexa</i>	Inflamación	Ácido logánico Loganina	<b>Antiinflamatoria:</b> v.o. frente al edema plantar inducido por carragenina y v.t. frente al edema auricular inducido por TPA en ratones: ▪ Activo ▪ Activo	(Recio <i>et al.</i> , 1994)

**Tabla IV (cont.):** Ensayos farmacológicos realizados a iridoides biosintetizados por la ruta IIa.

Familia	Especie	Uso popular	Iridoide	Actividad ensayada	Referencia
Lamiaceae					
	<i>Ajuga decumbens</i>	Inflamación Tos y problemas respiratorios.	8-acetilharpágido	<b>Quimiopreventiva:</b> ▪ Activo como inhibidor de la formación de tumores pulmonares inducidos por 4NQO <sup>29</sup> y glicerol en ratones. ▪ Activo como inhibidor de la inducción de formación de antígenos Epstein-Barr por TPA. ▪ Activo como inhibidor de la inducción de formación de tumores por donante de NO (NOR 1) y TPA. ▪ Activo frente a carcinogénesis hepática de ratón inducido por nitrosodietilamina y fenobarbital.	(Takasaki <i>et al.</i> , 1999)  (Konoshima <i>et al.</i> , 2000)
	<i>A. remota</i>	Paludismo	8-acetilharpágido	<b>Antimalárica</b> frente a <i>Plasmodium falciparum</i> : ▪ No activo. Dosis 500 µM.	(Kuria <i>et al.</i> , 2002)
	<i>Phlomis armenica</i>		Ipolamiida	<b>Antitumoral:</b> Citotoxicidad frente A431 <sup>30</sup> ▪ Débilmente activo	(Kuria <i>et al.</i> , 2002)
	<i>P. crinita</i>	Inflamación	Lamiida	<b>Antitumoral</b> (Citotoxicidad) <sup>31</sup>	(Saracoglu <i>et al.</i> , 1995b)
	<i>Scutellaria salviifolia</i>		Ipolamiida	<b>Antiinflamatoria:</b> ▪ Activo v.t. frente a edema auricular inducido por TPA en ratón. <b>Antitumoral</b> (Citotoxicidad) <sup>6</sup>	(Recio <i>et al.</i> , 1994)  (Saracoglu <i>et al.</i> , 1995b)

**Tabla IV (cont.):** Ensayos farmacológicos realizados a iridoídes biosintetizados por la ruta IIa.

<sup>29</sup> **4NQO** : 4-nitroquinilina-N-óxido

<sup>30</sup> **A431**: Carcinoma de piel humano.

<sup>31</sup> No detalladas las líneas tumorales frente a las que se ensayaron estos compuestos.

Familia	Especie	Uso popular	Iridoide	Actividad ensayada	Referencia
<b>Loganiaceae</b>					
	<i>Buddleja spp</i>	Enfermedades hepáticas.	Aucubina Catalpol Catalpósido 6-p-metoxicinamoil-aucubina 6-p-metoxicinamoil-catalpol	<b>Hepatoprotectora:</b> frente a hepatotoxicidad inducida por CCl <sub>4</sub> y galactosamina en hepatocitos. ▪ No activo. ▪ Débilmente activo. ▪ No activo. ▪ No activo. ▪ Débilmente activo.	(Houghton y Hikino 1989)
<b>Magnoliaceae</b>					
	<i>Eucommia ulmoides</i>	Osteopatías. Distrofias musculares Alteraciones hepáticas, renales pancreáticas. Hipertensión.	Ácido asperulosídico Ácido asperulosídico desacetilado. Ácido geniposídico Asperulósido Aucubina Eucommiol	<b>Quimiopreventiva:</b> Acción antimutagénica, inhibiendo las aberraciones cromosómicas inducidas previamente por mitomicina: ▪ Fuertemente activo. ▪ Débilmente activo. ▪ Fuertemente activo. ▪ Fuertemente activo. ▪ Inactivo. ▪ Inactivo.	(Nakamura <i>et al.</i> , 1997; Cheung <i>et al.</i> , 2003)
			Ácido geniposídico Aucubina Genipósido	<b>Cicatrizante:</b> Promueve la síntesis de colágeno y mejora del estrato córneo. ▪ Activo ▪ Activo ▪ Activo	(Li <i>et al.</i> , 1998; 1999b; 2000b)
<b>Myoporaceae</b>					
	<i>Eremophila alternifolia</i>	Cefaleas Fiebre, analgésico Lavados cutáneos y oculares	Ácido geniposídico	<b>Cardiotónica:</b> ▪ Inotrópico y cronotrópico negativo.	(Pennacchio <i>et al.</i> , 1996)

**Tabla IV (cont.):** Ensayos farmacológicos realizados a iridoides biosintetizados por la ruta IIa.

Familia	Especie	Uso popular	Iridoide	Actividad ensayada	Referencia
Oleaceae	<i>Nyctanthes arbor-tristis</i>	Leishmaniosis	Arbortristósido A Arbortristósido B Arbortristósido C 6-β-hidroxi-loganina	<b>Antiparasitaria:</b> Frente a amastigotes de <i>Leishmania donovani</i> in vitro e in vivo (hamsters): <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Activo.</li> <li>▪ Activo.</li> <li>▪ Activo.</li> <li>▪ Activo.</li> </ul>	(Tandon <i>et al.</i> , 1991)
Plantaginaceae	<i>Plantago major</i>	Alteraciones cutáneas, afecciones respiratorias, cáncer.	Aucubina	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Antiviral:</b> Inhibe la replicación del virus de hepatitis B humano in vitro previa preincubación con β-glucosidasa (activo la genina)</li> <li>▪ <b>Inmunoestimulante:</b> Induce la proliferación de linfocitos mononucleares y liberación de interferón</li> </ul>	(Chang, 1997)  (Chiang <i>et al.</i> , 2003c)
Rubiaceae	<i>Gardenia jasminoides</i>	Inflamación Hipertensión Fiebre Edemas Hemostático Sedante Problemas hepáticos	Genipósido y genipina	<b>Antitrombótica:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Prolonga el tiempo requerido para la oclusión trombótica en arteria femoral de ratón.</li> <li>▪ Inhibe la agregación plaquetaria inducida por</li> <li>▪ No activo como inhibidor de la agregación plaquetaria inducida por ácido araquidónico.</li> <li>▪ Inhibe la enzima PLA<sub>2</sub><sup>32</sup></li> </ul>	(Suzuki <i>et al.</i> , 2001)
				<b>Cicatrizante</b>	(Huang <i>et al.</i> , 1998)
				<b>Colerética</b>	(Miyagoshi <i>et al.</i> , 1988)

**Tabla IV (cont.):** Ensayos farmacológicos realizados a iridoídes biosintetizados por la ruta IIa.

<sup>32</sup> PLA<sub>2</sub>: Fosfolipasa A<sub>2</sub>.

Familia	Especie	Uso popular	Iridoide	Actividad ensayada	Referencia
Rubiaceae (cont.)	<i>G. jasminoides</i> (cont.)			<b>Hepatotóxica:</b> ▪ Activo	(Yamano <i>et al.</i> , 1990)
				<b>Hipoglucemiante</b>	(Kimura <i>et al.</i> , 1982; Miura <i>et al.</i> , 1996)
			Ácido asperulosídico desacetilado metil ester.	▪ Activo	
			Gardenósido	▪ No activo	
			Genipósido	▪ Activo	
			Scandósido metil ester	▪ No activo	
				<b>Neuritogénica:</b> Inducción de la diferenciación neuronal. (Línea celular PC12h)	(Yamazaki <i>et al.</i> , 1996)
			Gardenósido	▪ Activo.	
			Genipósido y genipina	▪ Activo. (estimulación PKA)	
			Genipósido y genipina	<b>Neuroprotectora:</b> Prevención de daño por $\beta$ -amiloide.	(Yamazaki <i>et al.</i> , 2001)
			Genipina asociada a proteínas	<b>Procarcinogénica:</b> ▪ No carcinogénico en ratas F344	(Imawaza <i>et al.</i> , 2000)
			Genipósido	<b>Purgante</b>	(Yamauchi <i>et al.</i> , 1976)
			Genipósido, genipina y ácido geniposídico.	<b>Quimiopreventiva:</b> Inhibición de la activación de antígenos de EB por TPA	(Ueda y Iwashashi 1991)
	<i>G. americana</i>		Genipina y ácido geniposídico	<b>Quimiopreventiva</b>	(Ueda y Iwashashi 1991)
	<i>Hedyotis chrysotricha</i>	Inflamación. Gripe. Cáncer.		<b>Hepatoprotectora:</b>	(Peng <i>et al.</i> , 1997)
			Ácido asperulosídico	▪ Activo.	
			Ácido asperulosídico- desacetilado	▪ Activo.	
			Asperulósido	▪ Activo.	
			6'-acetil- asperulósido	▪ Activo.	
			Asperulósido- desacetilado	▪ Activo.	

**Tabla IV (cont.): Ensayos farmacológicos realizados a iridoides biosintetizados por la ruta IIa.**

Familia	Especie	Uso popular	Iridoide	Actividad ensayada	Referencia
Rubiaceae (cont.)	<i>H. chrysotricha</i> (cont.)		6-β -hidroxi-genipina Hedyósido	<b>Hepatoprotectora (cont.):</b> ▪ Activo. ▪ Activo.	(Peng <i>et al.</i> , 1997)
			Loganina Scandiósido metil éster Scandiósido metil-éster desacetilado	▪ Activo. ▪ Activo. ▪ Activo.	
	<i>H. corymbosa.</i> <i>H. diffusa</i>	Tumores. Antídoto frente a tóxicos. Inmunoestimulante	Ácido geniposídico	<b>Antitumoral:</b> ▪ Activo frente a la inhibición del crecimiento de tumores transplantados en ratones ▪ Potencia el efecto antitumoral de radioterapia en ratones. ▪ Inhibe la leucopenia y alteraciones en el bazo inducida por radioterapia.	(Hsu <i>et al.</i> , 1997)
			Genipósido	▪ Activo frente a la inhibición del crecimiento de tumores transplantados en ratones ▪ Potencia el efecto antitumoral de radioterapia en ratones. ▪ Inhibe la leucopenia y alteraciones en el bazo inducida por radioterapia.	
	<i>Morinda citrifolia</i>		Citrifolinósido	<b>Quimiopreventiva:</b> ▪ Activo como inhibidor de AP-1 inducido por UV-B.	(Sang <i>et al.</i> , 2001)
	<i>Paederia scandends</i>		Paederósido	<b>Quimiopreventiva:</b> ▪ Activo como inhibidor de la inducción de cáncer por virus Epstein-Barr	(Kapadia <i>et al.</i> , 1996)

**Tabla IV (cont.): Ensayos farmacológicos realizados a iridoídes biosintetizados por la ruta IIa.**

Familia	Especie	Uso popular	Iridoide	Actividad ensayada	Referencia
Rubiaceae (cont.)	<i>Saprosma scortechinii</i>	Fiebre	Ácido asperulosídico Ácido paederósido Ácido 6-epi- paederósido Asperulósido Gardenogenina A Gardenogenina B 6- $\alpha$ -hidroxi- Genipósido Macrophyllósido Metilpaederósido  Paederósido Saprosmósido A Saprosmósido D Saprosmósido E Saprosmósido G	<b>Antiinflamatoria-quimiopreventiva:</b> Inhibición de la enzima lipoxigenasa <sup>33</sup> e hialuronidasa <sup>34</sup> .: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Inactivo frente a las dos.</li> <li>▪ Sólo débil actividad inhibitoria frente a lipoxigenasa.</li> <li>▪ Inactivo frente a las dos.</li> <li>▪ Sólo débil actividad inhibitoria frente a lipoxigenasa.</li> <li>▪ Inactivo frente a las dos.</li> <li>▪ Activo sólo frente a lipooxigenasa.</li> <li>▪ Activo sólo frente a lipoxigenasa.</li> <li>▪ Activo sólo frente a lipoxigenasa.</li> <li>▪ Activo sólo frente a lipoxigenasa.</li> </ul>	(Ling <i>et al.</i> , 2003)

**Tabla IV (cont.): Ensayos farmacológicos realizados a iridoideas biosintetizados por la ruta IIa.**

<sup>33</sup> La enzima lipoxigenasa está relacionada con psoriasis, metástasis y aterosclerosis.

<sup>34</sup> La enzima hialuronidasa está relacionada con procesos alérgicos, inflamación, migración de células tumorales y permeabilidad vascular.

Familia	Especie	Uso popular	Iridoide	Actividad ensayada	Referencia
<b>Scrophulariaceae</b>					
	<i>Parentucellia latifolia</i>		Aucubina peracetilada Catalpol peracetilado Penstemonósido peracetilado	<b>Anticolinérgica:</b> Antagonista no competitivo frente a ACh. ▪ Activo ▪ Activo ▪ Activo	(Ortiz de Urbina <i>et al.</i> , 1994)
	<i>Penstemon serrulatus</i>		Penstemina Penstemósido Serrulatólósido	<b>Antitumoral:</b> Antiproliferativa en linfocitos de bazo de ratón y hepatoma de hamster mediante inhibición síntesis de ADN. ▪ Activo. ▪ Activo. ▪ Activo	(Wysokinska y Skrzypek 1992)
			Penstemósido	<b>Antitumoral:</b> Citostática frente línea P-388 ▪ Activo	(Jolad <i>et al.</i> , 1976)
	<i>Picrorhiza kurroa</i>	Ictericia y hepatitis	Picroliv (picrosido-1: kútlósido)(1:1,5)	<b>Antiparasitaria:</b> ▪ Frente a <i>Leishmania</i> , potencia la eficacia de otros agentes. <b>Antitumoral:</b> ▪ Inhibición de topoisomerasas I y II ▪ Reduce la síntesis de PKC ▪ Inhibe selectivamente a tirosina kinasa (TK)	(Mittal <i>et al.</i> , 1998)  (Rajeshkumar y Kuttan 2001) (Gaddipati <i>et al.</i> , 1999)
				<b>Antiviral</b>	(Dhawan, 1995)
				<b>Hepatoprotectora:</b> frente a aflatoxina B <sub>1</sub> y <i>Amanita phalloides</i>	(Dwivedi <i>et al.</i> , 1990; 1993; Rastogi <i>et al.</i> , 1996; Saraswat <i>et al.</i> , 1999; 2000)
				<b>Inmunoestimulante:</b> ▪ Incrementa la respuesta linfocitaria frente a <i>Mycobacteria</i> .	(Sinha <i>et al.</i> , 1998)

**Tabla IV (cont.):** Ensayos farmacológicos realizados a iridoideas biosintetizados por la ruta IIa.

Familia	Especie	Uso popular	Iridoide	Actividad ensayada	Referencia
Scrophulariaceae (cont.)	<i>P. kurroa</i> (cont.)		Picroliv (cont.)		
				<b>Preventiva frente al daño renal</b>	(Sath <i>et al.</i> , 1999)
				<b>Protectora frente isquemia cardíaca:</b>	(Tandon <i>et al.</i> , 1995)
				▪ Reduce daño en la membrana celular inducido por hipoxia en células Hep 3B y glioma.	(Gaddipati <i>et al.</i> , 1999)
				<b>Quimiopreventiva:</b>	
				▪ Antioxidante	(Chander <i>et al.</i> , 1992b; Rajeshkumar y Kuttan 1999)
				▪ Disminuye la expresión de VEGF (factor angiogénico) y HIF-1 inducidos por hipoxia	(Gaddipati <i>et al.</i> , 1999)
				▪ Induce la enzima glutation sintetasa y los niveles de GSH y GPT.	(Rastogi <i>et al.</i> , 1995)
				▪ Inhibe la hepatocarcinogénesis inducida por N-nitrosodietilamina en ratas.	(Jose <i>et al.</i> , 1999; Rajeshkumar y Kuttan 1999; 2000)
				▪ Inhibe la peroxidación lipídica	(Chander <i>et al.</i> , 1992a; 1994)
				▪ Inhibe (v.o.) la inducción de sarcomas por 20- metil colantreno.	(Rajeshkumar y Kuttan 2001)
				▪ Inhibe (v.t.) la inducción de tumores cutáneos por DMBA en ratones	(Rajeshkumar y Kuttan 2001)
				▪ Inhibe el crecimiento de tumores procedentes de células DLA <sup>35</sup> y EAC <sup>36</sup> transplantados en ratón	

**Tabla IV (cont.): Ensayos farmacológicos realizados a iridoides biosintetizados por la ruta IIa.**

<sup>35</sup> **DLA:** Linfoma de ascitos de Dalton.

<sup>36</sup> **EAC:** Carcinoma de ascitos de Ehrlich

Familia	Especie	Uso popular	Iridoide	Actividad ensayada	Referencia
Scrophulariaceae (cont.)					
	<i>Rehmannia glutinosa</i>		Catalpol	<b>Neuritogénica:</b> Inducción de la diferenciación neuronal. (Línea celular PC12h) ▪ Activo.	(Yamazaki <i>et al.</i> , 1996)
	<i>Scrophularia auriculata</i>		Scropoliósido A Scrovalentinósido	<b>Antiinflamatoria:</b> frente a edema inducido por etil fenilpropionato. ▪ Activo. ▪ Activo.	(Giner <i>et al.</i> , 2000)
	<i>S. frutescens</i>	Inflamación	Harpagósido	<b>Antiinflamatorio:</b> Débil inhibición de edema plantar inducido por carragenina.	(García <i>et al.</i> , 1996)
	<i>S. corodonia</i>	Inflamación	8-acetilharpágido	<b>Antiinflamatorio:</b> Inhibición de liberación de PGE <sub>2</sub> , LTC <sub>4</sub> y TXB <sub>2</sub> en macrófagos y plaquetas estimulados. ▪ Activo como inhibidor de la liberación PGE <sub>2</sub> y TXB <sub>2</sub>	(Bermejo Benito <i>et al.</i> , 2000)
			Aucubina	▪ Activo como inhibidor de la liberación LTC <sub>4</sub> y TXB <sub>2</sub>	
			Bartsiósido	▪ Activo sólo como inhibidor de la liberación de TXB <sub>2</sub> (más efectivo que ibuprofeno).	
			Harpágido	▪ Activo sólo como inhibidor de la liberación LTC <sub>4</sub>	
			Harpagósido	▪ Activo como inhibidor de la liberación LTC <sub>4</sub> y TXB <sub>2</sub>	

**Tabla IV (cont.): Ensayos farmacológicos realizados a iridoídes biosintetizados por la ruta IIa.**

Familia	Especie	Uso popular	Iridoide	Actividad ensayada	Referencia
Selaginaceae	<i>Lagotis brevituba</i>	Fiebre, Hepatitis, Hipertensión		<b>Antitumoral:</b> Citotoxicidad frente a A-431, BC-1, HT, Lu-1, Mel-2, U-373, linfoma de Burkitt humano Raji, Hep-3B, E-367, RN-6, S-180, B-16, L-929, 3T3 <sup>37</sup> .	(Zong y Che 1995)
			Aucubina	▪ No es significativamente citotóxico. (EC <sub>50</sub> > 20 µg/mL):	
			Catalpol	▪ No es significativamente citotóxico. (EC <sub>50</sub> > 20 µg/mL):	
Verbenaceae	<i>Bouchea fluminensis</i>	Regulador intestinal, antiinflamatorio	Lamiide	<b>Antiinflamatoria:</b> ▪ Activo (v.o.) frente al edema plantar inducido por carragenina en ratas. <b>Quimiopreventiva:</b> ▪ Potente inhibidor de la peroxidación lipídica en cerebro de ratas.	(Howart Delaporte <i>et al.</i> , 2002)
			<i>Stachytarpheta cayennensis</i>	Ipolamiida	
	<i>Verbena officinalis</i>		Hastatóside	<b>Antiinflamatoria:</b> ▪ Activo (v.o.) frente a edema plantar inducido por carragenina	(Deepak y Handa 2000)
			Verbalina	<b>Antiinflamatoria:</b> ▪ Activo (v.o.) frente a edema plantar inducido por carragenina ▪ Activo (v.t.) frente al edema auricular inducido por TPA	

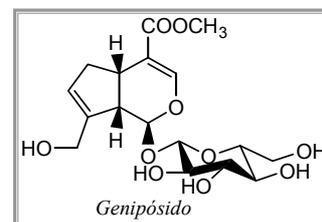
**Tabla IV (final):** Ensayos farmacológicos realizados a iridoides biosintetizados por la ruta IIa.

<sup>37</sup> **A-431** (carcinoma epodermóide humano); **BC-1** (cáncer de mama humano); **HT** (fibrosarcoma humano); **Lu-1** (cáncer de pulmón humano); **Mel-2** (melanoma humano); **U-373** (glioma humano); **Hep-3B** (hepatocarcinoma humano); **E-367** (neuroblastoma de rata); **RN-6** (neurinoma de rata); **S-180** (sarcoma de ratón); **B-16** (melanoma de ratón); **L-929** (células de tejido conectivo de ratón); **3T3** (fibroblasto de ratón)

Detallamos la actividad farmacológica de genipósido y sus derivados y aucubina:

**- Genipósido y derivados (genipina y ácido geniposídico)**

**Genipósido** se ha mostrado como: **antiagregante plaquetario** (vía i.v.), al inhibir la liberación de ácido araquidónico inducida por fosfolipasa (PLA<sub>2</sub>) (Suzuki *et al.*, 2001); **antiasmático** (vía inhalatoria), al prevenir la permeabilidad de las uniones intercelulares así como reestablecer la integridad tisular afectada por la exposición de antígenos (Liaw y Chao 2001); **cicatrizante**, al favorecer los entrecruzamientos de las cadenas de colágeno formadas (Li *et al.*, 1998; Sung *et al.*, 1999; 1999b; 2000b), y recientemente, se ha visto que posee efectos protectores no sólo a nivel hepático o tumoral, sino también frente a la enfermedad de Alzheimer, al prevenir la toxicidad neuronal frente a la proteína  $\beta$ -amiloide (Yamazaki *et al.*, 2001).



En cuanto a la actividad **quimiopreventiva** y **antitumoral**, el genipósido actúa a diferentes niveles:

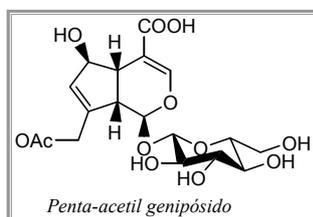
Se ha visto que inhibe la tumorigénesis inducida por diferentes carcinógenos, como TPA, benzo- $\alpha$ -pireno, o virus de Epstein-Barr (Ueda y Iwashashi 1991; Lee *et al.*, 1995); induce enzimas de fase II como glutation-S-transferasa (GST) y glutamil-cistein sintetasa, favoreciendo la detoxificación de carcinógenos (Wang *et al.*, 1991); e inhibe enzimas de fase I (citocromo P450 y otras monooxigenasas microsomales) (Kang *et al.*, 1997). Además, muestra una actividad antioxidante, al disminuir la peroxidación lipídica. Posee una actividad antimutagénica (Nakamura *et al.*, 1997), al proteger al ADN de la formación de aductos con sustancias carcinogénicas, como la aflatoxina B<sub>1</sub> (Wang *et al.*, 1991; 1992b). Genipósido inhibe enzimas involucradas en procesos oxidativos y tumorales, como la mieloperoxidasa (MPO) o la ornitin descarboxilasa (ODC) (Lee *et al.*, 1995). También ha mostrado inducir la diferenciación de células neuronales PCR12h, mediante la activación de señales celulares involucradas en el ciclo celular como AMP<sub>c</sub> o protein kinasa A (Yamazaki *et al.*, 1996).

Ensayos *in vivo*, han mostrado que genipósido inhibe el crecimiento de tumores y potencia los efectos de la radioterapia, incrementando además el recuento leucocitario y la respuesta blastogénica de las células del bazo. Ello, hace posible considerar que genipósido podría ser un compuesto coadyuvante como potenciador de la respuesta inmunitaria, al evitar algunos de los efectos secundarios de la quimioterapia (Hsu *et al.*, 1997).

**A nivel hepático**, hemos encontrado controversia en la actividad que desempeña, ya que hay autores que muestran que es hepatotóxico, al elevar los niveles de transaminasas (Yamano *et al.*, 1988;

1990), mientras que otros más recientes, defienden lo contrario (Wang *et al.*, 1991; 1992b; Kang *et al.*, 1997).

Un derivado sintético de genipósido, obtenido por acetilación, penta-acetil genipósido también

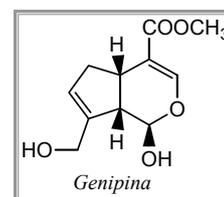


Penta-acetil genipósido

ha mostrado actividad **quimiopreventiva** frente al ataque de carcinógenos (Ueda y Iwashashi 1991; Tseng *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 2000) y **antitumoral**, al inhibir la síntesis de ADN y ARN, disminuyendo, por tanto, la velocidad de crecimiento de la línea celular de glioma C6 tanto *in vitro* como *in vivo* (Wang *et al.*, 1992a; 1993) mediante la inducción de apoptosis, activando señales proapoptóticas como p-53 y c-myc, e inhibiendo de Bcl-2 (Chang *et al.*, 2002).

**Genipina**, genina de genipósido, al igual que éste, ha mostrado actividad **antitrombótica** (Suzuki *et al.*, 2001) y **cicatrizante** (Huang *et al.*, 1998; Sung *et al.*, 1999).

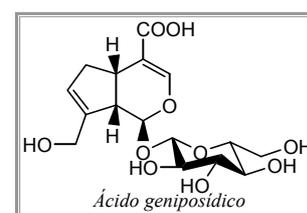
Genipina muestra una mayor actividad **quimiopreventiva** como inhibidor de la inducción de la formación de antígenos de EBV por TPA que genipósido (Ueda y Iwashashi 1991), pero, a nivel **antitumoral**, este compuesto, a diferencia de genipósido, es genotóxico y mutagénico (Ozaki *et al.*, 2002), desencadenando la muerte celular. Además, se ha detectado que eleva los niveles de caspasas, inhibiendo, la apoptosis (Yamamoto *et al.*, 2000). También induce la diferenciación de neuronas y protección de éstas frente a la toxicidad de la proteína  $\beta$ -amielode (Yamazaki *et al.*, 1996; 2001).



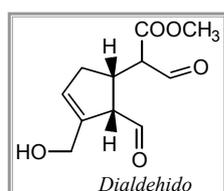
Genipina

Genipina muestra efectos tóxicos **a nivel hepático** (Yamano *et al.*, 1988; 1990), aunque también incrementa los niveles de glutatión transferasa (GST) (Wang *et al.*, 1991).

El **ácido geniposídico** muestra mayor actividad **quimiopreventiva** como antimutagénico que genipósido (Nakamura *et al.*, 1997) aunque menor efecto **antitumoral** y regenerador de la médula ósea (Hsu *et al.*, 1997). A nivel **cardíaco**, posee actividad inotrópica y cronotrópica negativa y es **cicatrizante**, al igual que genipósido (Li *et al.*, 1998; 1999b; 2000b).



Ácido geniposídico

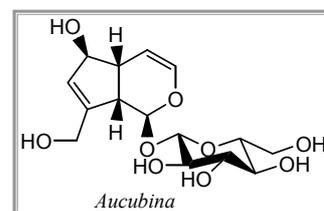


Dialdehído

A nivel general, los dialdehídos generados por metabolización e hidrólisis de las geninas de los iridoides, pueden desempeñar un papel importante en las actividades descritas, ya que el grupo carbonilo insaturado puede interactuar con grupos SH, reaccionando, por tanto con los aminoácidos de los ácidos nucleicos y enzimas celulares, desencadenando la inhibición del crecimiento bacteriano y células tumorales (Kim *et al.*, 2000; Ling *et al.*, 2003).

### - Aucubina

Al igual que el genipósido, aucubina ha sido estudiada como **antiinflamatoria** mostrando ser activa tanto, vía tópica, en edema auricular inducido por TPA como, vía oral, frente al edema plantar inducido por carragenina (Recio *et al.*, 1994); Los iridoides, en general, no son activos como antiinflamatorio en procesos agudos, pero, son eficientes en procesos subagudos. En base a los resultados obtenidos se cree que la primera diana de los iridoides es la inhibición selectiva de liberación de TXB<sub>2</sub>, por la inhibición selectiva de TX-sintasa sin que se afecte a PG-sintasa (Bermejo Benito *et al.*, 2000). También ha mostrado ser  **cicatrizante** al estimular síntesis de colágeno (Li *et al.*, 1998; 1999b; 2000b).



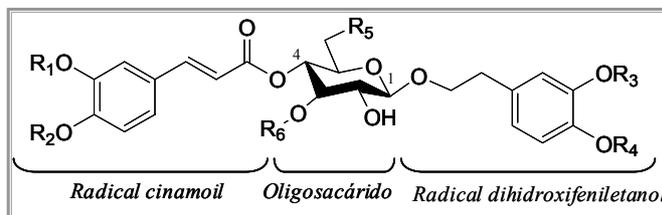
A **nivel quimiopreventivo y antitumoral**, aucubina inhibe enzimas de fase I como citocromo P-450, (Bartholomaeus y Ahokas 1995), induce un aumento de la apoptosis, al elevar los niveles de IκB mediante la inhibición de su degradación y fosforilación, y por tanto, NF-κB no se activa para translocarse al núcleo (Jeong *et al.*, 2002), e inhibe la producción de TNF-α e IL-6 (Jeong *et al.*, 2002). A diferencia de genipósido, no muestra actividad antimutagénica (Nakamura *et al.*, 1997; Cheung *et al.*, 2003).

A nivel hepático, aucubina ha mostrado poseer un efecto detoxificante y actuar como  **protector hepático**, al incrementar la velocidad de excreción de sustancias tóxicas como la. α-amanitina (Chang *et al.*, 1983; 1984; 1993; Yamaura y Chang 1995; 1998; 2001; Lee *et al.*, 2001), aunque otros autores demuestran que ni es hepatotóxico *per se* ni protege frente a hepatotoxicidad inducida por Cl<sub>4</sub>C (Houghton y Hikino 1989).

La genina de aucubina posee actividad  **antitumoral**, inhibiendo ADN polimerasa y ARN polimerasa en células Hep G2, y, además, tiene capacidad de interactuar con el ADN (Lee *et al.*, 2001). Aunque en otras líneas tumorales o bien no ha mostrado ser citotóxico de forma significativa (Zong y Che 1995), o bien, débil frente a células leucémicas. (Chiang *et al.*, 2003b). También, al igual que genipósido y su genina, muestra actividad  **neuritogénica** (Yamazaki *et al.*, 1994; 1996).

### II.2.2. FENILPROPANOIDES (ÉSTERES FENILPROPANOICOS).

Un grupo de derivados del fenilpropano, distribuidos en Gamopétalas (Lamiales, Oleales, Asterales...) y localizados en la mayoría de los tejidos vegetales, así como en el polen, (Molgaard y Ravn 1988; Ibrahim y Barron 1989; Scogin, 1992; Bruneton, 2001a), son los ésteres fenilpropanoicos (PPG), constituidos por un radical cinamoil y uno hidroxifeniletanol, ambos unidos a  $\beta$ -glucosa mediante enlace ester (C-4) y éter (C-1). Otros azúcares como rhamnosa, xylosa o arabinosa, pueden unirse a los carbonos C-3, C-4 o C-6 de la molécula de glucosa (Ibrahim y Barron 1989).



Se ha observado que, las plantas incrementan la síntesis de fenilpropanoides en diferentes situaciones, como defensa frente a herbívoros, protección ante el ataque de microorganismos, invasión de otras especies o cuando aumentan los niveles de radicales libres debido a factores externos, como estrés medioambiental, elevada luminosidad (mayor incidencia de radiación UV), bajas temperaturas, infecciones por patógenos, déficit de nutrientes (Sakihama *et al.*, 2002), sequía, exposición de ozono (Dixon y Paiva 1995), o bien como atracción de polinizadores, sin olvidar que estos metabolitos sirven de precursores para otras moléculas más complejas útiles para la planta (Weisshaar y Jenkins 1998; Grace y Logan 2000).

A partir de estos fenilpropanoides sencillos, se sintetizan otros tipos de fenoles, como flavonoides, cumarinas, lignanos, estilbenos, psoralenos, pterocarpanos, taninos, que también responden al estrés oxidativo (Boudet *et al.*, 1995).

El papel que desempeñan los fenilpropanoides, ha conducido que la ingeniería genética modifique su ruta biosintética, induciendo la resistencia a enfermedades o buscando incrementar la digestibilidad de las plantas forrajeras, entre otros fines (Anterola y Lewis 2002).

Los fenilpropanoides actúan como antioxidantes por diversos mecanismos: Tienen actividad **antirradicalaria** frente a los aniones superóxido, hidroxilo, peróxido de hidrógeno, hipoclorito y óxido nítrico, tanto en sistemas *in vitro* sin células como con células (Zhou y Zheng 1991; Xiong *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996a; 1996b; Gao *et al.*, 1999; Xiong *et al.*, 2000; He *et al.*, 2000; Daels-Rakotoarison *et al.*, 2000). Algunos fenilpropanoides a bajas dosis se comportan como prooxidantes, al promover la generación de radicales hidroxilo (como martynósido y pediculariósido M y N). Se sabe que esta

“dualidad” antioxidante-prooxidante es debida, en parte, a la capacidad reductora que poseen, reduciendo el ión férrico a ferroso. Sin embargo, otros fenilpropanoides como verbascósido no tienen ese poder reductor, comportándose sólo como antioxidantes (Wang *et al.*, 1996a).

Es difícil de enlazar todos los resultados obtenidos en los PPG, ya que se parte de modelos experimentales diferentes y en cada ensayo se han comparado diferentes tipos de PPG, aún así, se ha visto que existe una relación estructura química- actividad farmacológica entre los diferentes fenilpropanoides, que relacionan de forma directa, la actividad antioxidante con el número de grupos hidroxilo que poseen, y una menor actividad con mayor número de monosacáridos unidos a la molécula.

Tanto en modelos enzimáticos como en células, se ha comprobado que verbascósido es en términos generales, el que muestra mayor poder antirradicalario: verbascósido > forstithósido > arenariósido > ballotetrósido o bien, verbascósido > pediculariósido A > pediculariósido M > leucosceptósido A > martynósido N > permetilverbascósido (Wang *et al.*, 1996a). Sólo hay un experimento de lo revisado donde han mostrado que brandiósido y poliumósido, son mejores antirradicalarios que verbascósido frente a radical superóxido, ya que los radicales rhamnosilo presentan mayor potencia para superóxido (He *et al.*, 2000).

Esta capacidad antirradicalaria se fundamenta en la interacción de estos radicales libres al sitio o-hidroxilo de los ésteres fenilpropanoicos, formándose un radical semiquinona, estable por resonancia, debido a los puentes de hidrógeno. A mayor número de grupos OH, mayor número de radicales reaccionará; sin embargo, si los sustituyentes son OCH<sub>3</sub>, se forman radicales aroxilo, que son menos estables al no formarse puentes de hidrógeno (Bruneton, 2001b).

Hay controversia en la literatura acerca de las propiedades quelantes de los fenilpropanoides, ya que unos autores defienden que son quelantes del ión férrico (Li *et al.*, 1997a), mientras que otros demuestran lo contrario, tanto para el ión férrico (Wang *et al.*, 1996a) como cuproso (Seidel *et al.*, 2000).

En los ensayos de inhibición de la peroxidación lipídica (Xiong *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1997a; 1998), también se ha estudiado isoverbascósido, isómero de verbascósido, mostrando una ligera mayor actividad que éste, aunque no hay que olvidar que, investigadores, defienden que habría que ensayar estos compuestos en modelos donde la peroxidación no dependa de un iniciador (como un metal de transición) ya que el fenilpropanoide podría quelar a éste, dando un resultado confuso.

Se ha estudiado también si algunos fenilpropanoides interfieren en la expresión o en la activación de enzimas que producen radicales libres, como xantina oxidasa (Li *et al.*, 1993; Wang *et*

*al.*, 1996b) u óxido nítrico sintasa inducible (Xiong *et al.*, 2000), observándose que éstos, no afectan a las enzimas, sino que directamente capturan al radical correspondiente (superóxido y óxido nítrico, respectivamente), salvo una excepción, isoverbascósido, que inhibe de forma competitiva a la enzima xantina oxidasa (Xiong *et al.*, 1996; Kong *et al.*, 1999).

La actividad antioxidante, y en concreto, las propiedades antirradicalarias de los fenilpropanoides, son las responsables, junto con otros mecanismos, de algunas de las acciones farmacológicas que se han descrito a los PPG, como **antiinflamatoria**, **protectora** de membranas, **cicatrizante**, y sobre todo, **quimiopreventiva** y **antitumoral**.

Algunos fenilpropanoides inhiben a las kinasas, y otros, como arenariósido, a la enzima fosfoliapaasa C, responsable de la síntesis de inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), mediadores involucrados en la activación de los leucocitos PMN.

Los ésteres fenilpropanoicos, como verbascósido, son capaces de inducir la formación de colágeno y reducir el periodo de cicatrización (Sudo *et al.*, 1999; Mensah *et al.*, 2001).

En cuanto a las propiedades **quimiopreventivas** que muestran los ésteres fenilpropánicos, destacan:

- La capacidad de **reparar** daños en el **ADN** producidos por diferentes ROS, colaborando con los sistemas reparadores de las células. Esta actividad se ha estudiado de forma muy extensa y detallada en diferentes aductos de bases púricas y pirimidínicas, tanto aniónicos como catiónicos (Li *et al.*, 1996; 1997d; 1997e; 1999a; Shi *et al.*, 1999b; 2000a; 2000a). Los fenilpropanoides, al ser principalmente donantes de electrones (nucleofílicos), reaccionan con mayor facilidad con los aductos oxidantes (electrofilicos), y gracias al grupo carbonil-insaturado fenil-sustituído, que es electrofílico, también pueden actuar como aceptores de electrones. De forma general podemos concluir que los PPG son capaces de reparar el ADN gracias a sus grupos fenoles, y que la reparación consiste en una transferencia de electrones mediante la intercalación de los PPG en el surco menor del ADN, sin que genere cambios conformacionales en la doble hélice (Gao *et al.*, 2003).

- Inhibición de la inducción de tumores por sustancias carcinogénicas, como galactosamina (Kunvari *et al.*, 1999; Takasaki *et al.*, 2001) y lipopolisacárido (Xiong *et al.*, 1999) o metil fenil pirixidio, al favorecer su degradación.

- Incrementar las enzimas de fase II, manteniendo los niveles de glutatión disulfuro reductasa y glutatión-S-transferasa (GST). En este caso, la relación estructura química-actividad farmacológica parece está relacionada con el radical  $\alpha$ - $\beta$  insaturado de los fenilpropanoides.

- Inducir la diferenciación celular, al comprobar que las células tumorales tienen menores niveles de antioxidantes, por tanto, inhibidores de ROS, pueden actuar como inductores de dicha diferenciación (Li *et al.*, 1997c; Wang *et al.*, 1999; Rui-Chuan *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2002).

- Inhibir enzimas transductoras y señales oncológicas, involucradas en procesos de proliferación, diferenciación y transformación celular, como EGFR<sup>38</sup> (Kunvari *et al.*, 1999), Tirosin-kinasas (TK), proteín-kinasa C (PKC) (Herbert *et al.*, 1991; Zhou *et al.*, 1998) o ciclooxigenasa (COX) (aunque con esta última enzima hay contradicciones en la literatura) (Liao *et al.*, 1999b; Sahrpaz *et al.*, 2002).

- Inducir la apoptosis (Inoue *et al.*, 1998), también relacionado, en parte con su capacidad antioxidante, ya que se eliminan los ROS inducidos por TNF- $\alpha$ , que interfiere con las señales apoptóticas. Paradójicamente, también aquellos PPG con actividad prooxidante, también muestran esta actividad, ya que pueden originar daño en el ADN a través de la formación de peróxido de hidrógeno, fragmentándolo y conduciendo a la célula hacia la apoptosis. *In vivo* es más activo que *in vitro*.

- Inhibir la enzima telomerasa (por verbascósido), desencadenando que las células inicien el proceso de diferenciación o apoptosis (Zhang *et al.*, 2002).

- Inhibir la angiogénesis y metástasis (Ohno *et al.*, 2002; Wartenberg *et al.*, 2003), donde los ROS también juegan un papel importante. Esta actividad se ha mostrado *in vivo*.

A nivel **citotóxico** (Saracoglu *et al.*, 1995a; 1997; Bermejo *et al.*, 2002), de todas las líneas celulares ensayadas, curiosamente, verbascósido sólo muestra actividad en líneas de origen murino. También parece existir una relación estructura química-actividad farmacológica, donde la posesión de grupos metoxilo disminuye la actividad.

Resumimos en la tabla V, los ensayos farmacológicos realizados a ésteres fenilpropánicos, (incluido verbascósido), las especies vegetales de los que fueron aislados y su uso popular, y en la figura 3 las estructuras químicas de los ésteres fenilpropanoicos más estudiados.

---

<sup>38</sup> **EGFR:** Receptor del factor de crecimiento epitelial.

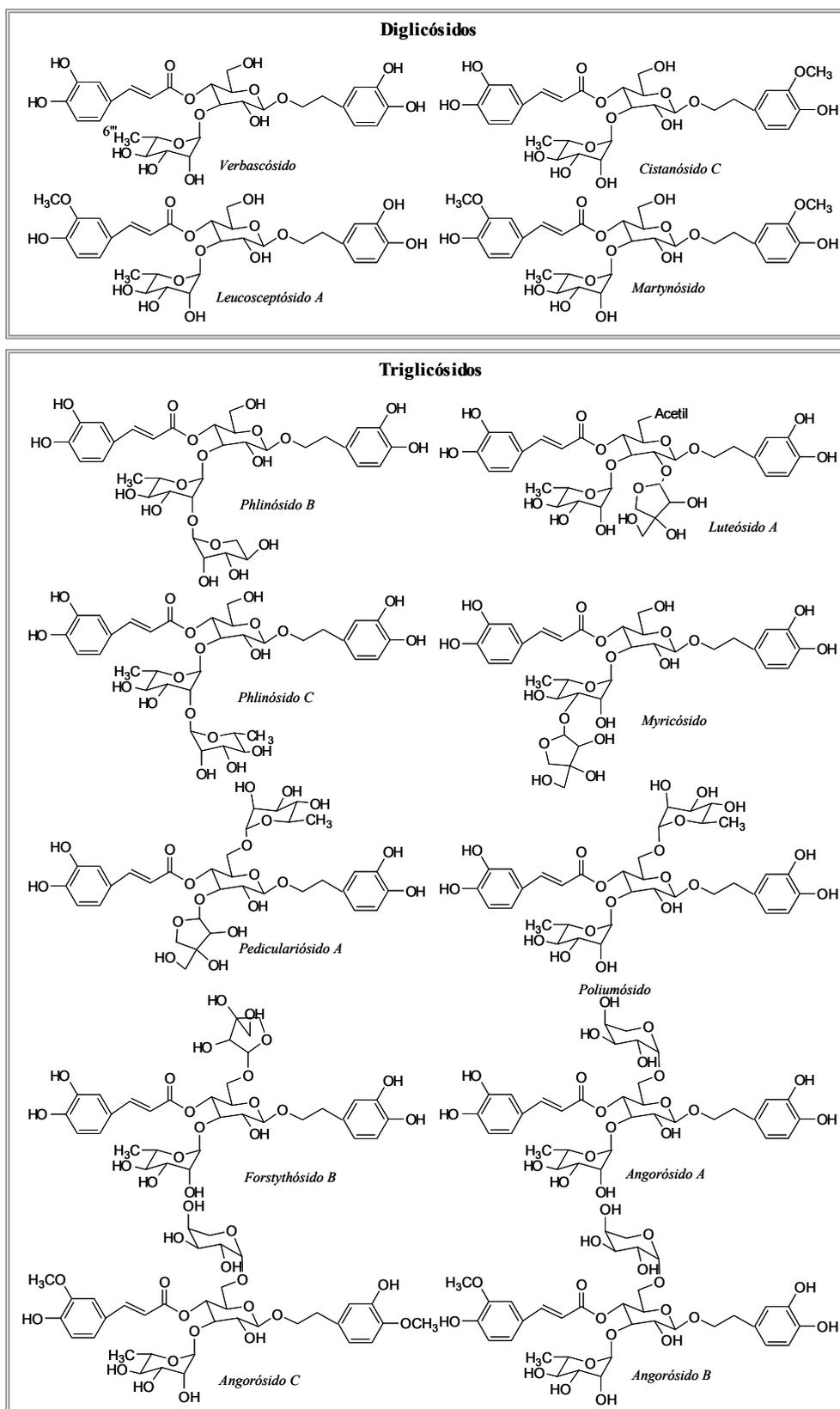
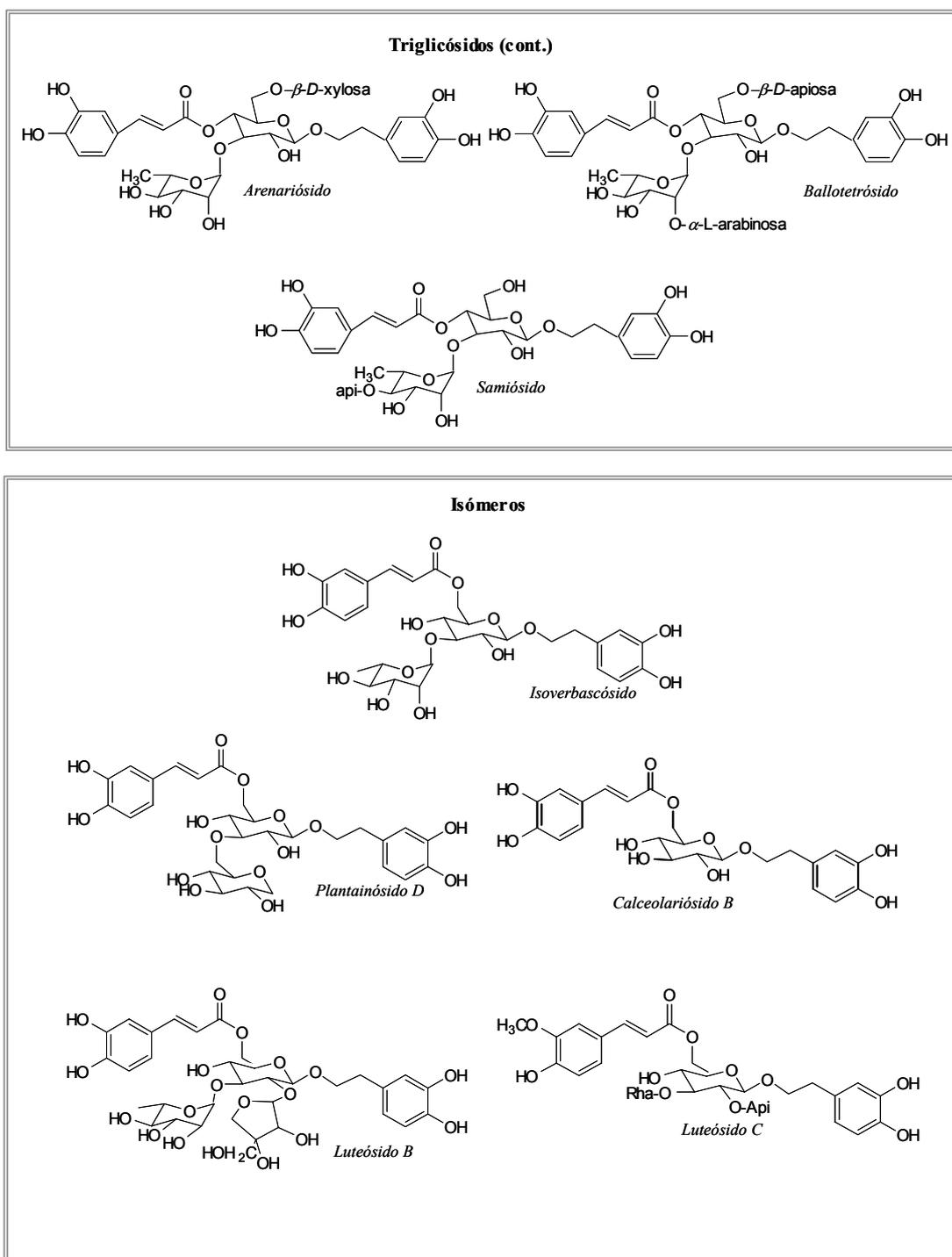


Figura 3: Estructuras químicas de ésteres fenilpropanoicos (PPG)



**Figura 3:** Estructuras químicas de ésteres fenilpropanoides (PPG) (cont.y final)

Familia	Especie	Uso popular	Fenilpropanoide	Actividad ensayada	Referencia
<b>Acanthaceae</b>					
	<i>Barleria prioniits</i>	Asma, Fiebre, Resfriados	Verbascósido	<b>Antiviral:</b> ▪ Activo frente VRS	(Chen <i>et al.</i> , 1998)
<b>Bignoniaceae</b>					
	<i>Markhamia lutea</i>	Diarrea, Astenia, Infecciones	Isoverbascósido	<b>Antiviral:</b> ▪ Activo frente VRS. ▪ No activo VZV, mCMV, HSV 1 y 2. <sup>39</sup>	(Kernan <i>et al.</i> , 1998)
			Luteosido A	▪ Activo frente VRS	
			Luteósido B	▪ Activo frente VRS	
			Luteósido C	▪ No activo HSV-1 y 2	
			Verbascósido	▪ Activo frente VRS ▪ Activo frente a VRS. ▪ No activo HSV-2, CMV	
<b>Globulariaceae</b>					
	<i>Globularia trichosantha</i>	Retención urinaria, Estreñimiento, Problemas digestivos.	Crenatósido (=orapósido)	<b>Antioxidante:</b> Antirradicalaria (DPPH) (CCF) ▪ Activo	(Calis <i>et al.</i> , 1999)
			Rossicásido A	▪ Activo	
			Trichosanthósido A	▪ Activo	
			Trichosanthósido B	▪ Activo	
			Verbascósido	▪ Activo	

**Tabla V:** Ensayos farmacológicos realizados a ésteres fenilpropanoicos (PPG).

<sup>39</sup> **VRS:** Virus respiratorio sincitial; **VZV:** Virus Varicela zoster; **mCMV:** Citomegalovirus de ratón; **HSV-1 y 2:** Virus herpes simplex tipo 1 y 2.

Familia	Especie	Uso popular	Fenilpropanoide	Actividad ensayada	Referencia
Lamiaceae	<i>Ballota nigra</i>	Gripe, resfriados, Nerviosismo.		<b>Antibacteriana:</b> ♦ <i>S. aureus</i> ; <i>S. aureus</i> (resistente metecilina); <i>P. mirabilis</i> . ▪ No activo ▪ No activo ▪ No activo ▪ No activo ▪ Activo ▪ No activo ▪ No activo ▪ Activo ▪ No activo ▪ Activo	(Didry <i>et al.</i> , 1999)
			(+)-(E)-cafeoil-L- ácido málico Alyssonósido Angorósido A Arenariósido Ballotetrósido Ballotetrósido Forsythósido B Lavandulifoliósido Verbascósido	♦ <i>E. faecalis</i> ; <i>P. aeruginosa</i> ; <i>E.</i> <i>coli</i> ; <i>E. aeroenes</i> ; <i>K.</i> <i>pneumoniae</i> ; <i>K. oxytoca</i> ▪ No activo	(Didry <i>et al.</i> , 1999)
			(+)-(E)-cafeoil-L- ácido málico Alyssonósido Angorósido A	▪ No activo ▪ No activo ▪ No activo	

**Tabla V (cont.):** Ensayos farmacológicos realizados a ésteres fenilpropanoicos (PPG).

Familia	Especie	Uso popular	Fenilpropanoide	Actividad ensayada	Referencia
Lamiaceae (cont.)	<i>B. nigra (cont.)</i>			<b>Antioxidante:</b> -Antirradicalaria in vitro e in vivo frente a $O_2^-$ , $H_2O_2$ , $OHCl$ , $OH$ . <sup>40</sup>	(Daels-Rakotoarison <i>et al.</i> , 2000)
			(+)-E-ácido malico cafeico	▪ Activo	
			Alyssonósido	▪ Activo	
			Angorósido A	▪ Activo	
			Arenariósido	▪ Activo	
			Ballotetrósido	▪ Activo	
			Forsythósido B	▪ Activo	
			Lavandulifoliósido	▪ Activo	
				-Inhibición peroxidación LDL inducida por cobre.	(Seidel <i>et al.</i> , 2000)
			(+)-E-ácido malico cafeico	▪ Activo	
			Arenariósido	▪ Activo	
			Ballotetrósido	▪ Activo	
			ForsythósidoB	▪ Activo	
			Verbascósido	▪ Activo	
				-Quelante metales (cobre)	(Seidel <i>et al.</i> , 2000)
			(+)-E-ácido malico cafeico	▪ No activo	
			Arenariósido	▪ No activo	
			Ballotetrósido	▪ No activo	
			ForsythósidoB	▪ No activo	
			Verbascósido	▪ No activo	

**Tabla V (cont.):** Ensayos farmacológicos realizados a ésteres fenilpropanoicos (PPG).

<sup>40</sup>  $O_2^-$ : superóxido,  $H_2O_2$ : peróxido hidrógeno,  $OHCl$ : ácido hipoclorito,  $OH$ : hidroxil-superóxido

Familia	Especie	Uso popular	Fenilpropanoide	Actividad ensayada	Referencia
Lamiaceae (cont.)	<i>B. nigra (cont.)</i>			<b>Sedante:</b> Agonista receptores BZD; D, $\mu$	(Daels-Rakotoarison <i>et al.</i> , 2000)
			(+)-E-ácido malico cafeico	▪ Activo	
			alyssonósido	▪ Activo	
			Angorósido A	▪ Activo	
			Arenariósido	▪ Activo	
			Ballotetrósido	▪ Activo	
			Forsythósido B	▪ Activo	
			Lavandulifoliósido	▪ Activo	
			Verbascósido	▪ Activo	
	<i>Leonotis nepetaefolia</i>			<b>Antioxidante:</b> Antirradicalaria (DPPH)	(Takeda <i>et al.</i> , 1999)
			Lavandulifoliósido	▪ Activo	
			Martynósido	▪ Activo	
			Verbascósido	▪ Activo	
	<i>Leonurus cardica</i>			<b>Cronotrópica:</b> ▪ Negativa	(Milkwska-Leyck <i>et al.</i> , 2002)
			Lavandulifoliósido		
				<b>Hipotensora:</b> ▪ Activo	(Milkwska-Leyck <i>et al.</i> , 2002)
	<i>Marrubium vulgare</i>			<b>Antioxidante:</b> Inhibición oxidación LDL por Cu y AAPH <sup>41</sup>	(Martín-Nizard <i>et al.</i> , 2003)
			Arenariósido	▪ Activo	
			Ballotetrósido	▪ Activo	
			Forsythósido B	▪ Activo	
			Verbascósido	▪ Activo	

**Tabla V (cont.):** Ensayos farmacológicos realizados a ésteres fenilpropanoicos (PPG).

<sup>41</sup> *AAPH*: 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorhidrico.

Familia	Especie	Uso popular	Fenilpropanoide	Actividad ensayada	Referencia
Lamiaceae (cont.)	<i>M. vulgare (cont.)</i>			<b>Inhibidora enzimática: (antiinflamatoria)</b>	(Sahpaz <i>et al.</i> , 2002)
			(+)-E-cafeoil-L-ácido málico	▪ Inactivo.	
			Arenariósido	▪ Inhibidor COX-2	
			Ballotetrósido	▪ Inhibidor COX-1	
			Forsythósido B	▪ Inhibidor COX-2	
			Verbascósido	▪ Inhibidor selectivo COX-2	
	<i>Nepeta ucrainica</i>		Verbascósido	<b>Inmunomoduladora:</b>	(Akabay <i>et al.</i> , 2002)
				▪ Aumenta actividad quimiotáctica.	
				▪ Aumenta respiración neutrofilica	
	<i>Phlomis armeniaca</i>			<b>Antitumoral:</b>	(Saracoglu <i>et al.</i> , 1995a)
				- Citotoxicidad frente dRLh-84; S-180;	
				P-388; HeLa; Hepatocitos <sup>42</sup>	
			Forsythósido B	▪ Activo en dRLh-84, S-180 y P-388/d1.	
				▪ No citotóxico hepatocito	
			Leucosceptósido A	▪ Inactivo.	
			Martynósido	▪ Inactivo.	
			Phlinósido B	▪ Activo en dRLh-84, S-180.	
				▪ No citotóxico hepatocito	
			Verbascósido	▪ Activo en dRLh-84, S-180 y P-388/d1.	
				▪ No citotóxico hepatocito	
				- Inducción apoptosis	(Inoue <i>et al.</i> , 1998)
			Verbascósido	▪ Activo en HL-60	

**Tabla V (cont.):** Ensayos farmacológicos realizados a ésteres fenilpropanoicos (PPG).

<sup>42</sup> **dRLh-84:** hepatoma de rata; **HeLa:** carcinoma epitelial humano; **S-180:** sarcoma; **P-388/D1:** neoplasma linfóide de ratón.

Familia	Especie	Uso popular	Fenilpropanoide	Actividad ensayada	Referencia
Lamiaceae (cont.)	<i>P. monocephala</i>			<b>Antioxidante:</b> Antirradicalaria (DPPH) <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Alyssonósido Activo</li> <li>▪ Forsythósido B Activo</li> <li>▪ Verbascósido Activo</li> </ul>	(Yalcin <i>et al.</i> , 2003)
	<i>P. physicalyx</i>			<b>Antioxidante:</b> Antirradicalaria (DPPH) <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Forsythósido B Activo</li> <li>▪ Leucosceptósido A Activo</li> <li>▪ Martynósido Activo</li> <li>▪ Physocalycósido Activo</li> <li>▪ Verbascósido Activo</li> <li>▪ Wiedemanniósido C Activo</li> </ul>	(Ersoz <i>et al.</i> , 2003)
	<i>P. pungens</i>			<b>Vasodilatadora:</b> Protección frente a la inhibición de la relajación de endotelio inducida por ROS <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Forsythósido B Activo</li> <li>▪ Alyssonósido Activo</li> </ul>	(Ismailoglu <i>et al.</i> , 2002)
	<i>P. samia</i>			<b>Antifúngica:</b> <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Samiósido Activo</li> </ul>	(Kyriakopoulou <i>et al.</i> , 2001)
				<b>Antimicrobiana:</b> <i>S. aureus</i> ; <i>S. epidermidis</i> ; <i>E. cloacae</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>K. pneumonia</i> ; <i>P. aeruginosa</i> . <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Samiósido Activo</li> <li>▪ Verbascósido Activo</li> </ul>	(Kyriakopoulou <i>et al.</i> , 2001)
				<b>Antioxidante:</b> Antirradicalaria (DPPH) <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Samiósido Activo</li> <li>▪ Verbascósido Activo</li> </ul>	(Kyriakopoulou <i>et al.</i> , 2001)

**Tabla V (cont.):** Ensayos farmacológicos realizados a ésteres fenilpropanoicos (PPG).

Familia	Especie	Uso popular	Fenilpropanoide	Actividad ensayada	Referencia
Lamiaceae (cont.)					
	<i>Sideritis licia</i>			<b>Antiinflamatoria:</b> Frente a edema plantar inducido por carragenina	(Akcós <i>et al.</i> , 1999)
			Lavandulifoliósido	▪ Activo	
			Leucosceptósido	▪ Activo	
			Martynósido	▪ Activo	
			Verbascósido	▪ Activo	
	<i>Stachys sieboldii</i>			<b>Protectora:</b> Inhibe letalidad inducida por KCN	(Yamahara <i>et al.</i> , 1990)
			Stachysósido C	▪ Activo	
			Verbascósido	▪ Activo	
				<b>Nefroprotectora:</b> ▪ Previene de nefritis y glomerulonefritis	(Hayashi <i>et al.</i> , 1996)
	<i>Teucrium polium</i>			<b>Antitumoral:</b> Citotoxicidad: dRLh-84, S-180, p-388/D1, HeLa	
			Poliumósido	▪ Activa en dRLh-84, S-180, p-388/D1.	(Saracoglu <i>et al.</i> , 1997)
Loganiaceae					
	<i>Buddleja cordata</i>			<b>Antibacteriana:</b> ▪ Activo frente <i>S aureus</i> . ▪ Afecta síntesis proteica	(Avila <i>et al.</i> , 1999)
			Verbascósido		
	<i>B. globosa</i>	Inflamaciones, Lavado de heridas y úlceras		<b>Antibacteriana:</b> ▪ Activo	(Pardo <i>et al.</i> , 1993)
			Verbascósido		(Liao <i>et al.</i> , 1999b)
				<b>Cicatrizante:</b> Protector de fibroblastos frente ROS.	
			Echinacósido	▪ Activo	
	<i>B. officinalis</i>	Conjuntivitis, úlceras y heridas, edemas, infecciones y disentería.		<b>Antibacteriana</b> ▪ Activo	(Li <i>et al.</i> , 1997b)
			Verbascósido		

**Tabla V (cont.):** Ensayos farmacológicos realizados a ésteres fenilpropanoicos (PPG).

Familia	Especie	Uso popular	Fenilpropanoide	Actividad ensayada	Referencia
<b>Loganiaceae (cont.)</b>					
	<i>B. officinalis (cont.)</i>		Verbascósido	<b>Antitumoral</b> ▪ Activo	(Li <i>et al.</i> , 1997b)
				<b>Inhibidora enzimática:</b> Inhibición COX y 5-LOX in vivo.	(Liao <i>et al.</i> , 1999b)
			Angorósido A	▪ Inactivo	
			Calceolariósido	▪ Inactivo	
			Campneósido	▪ Inactivo	
			Echinacósido	▪ Inactivo	
			Forsythósido B	▪ Inactivo	
			Verbascósido	▪ Inactivo	
				<b>Neuroprotectora:</b> Frente apoptosis por agentes tóxicos.	(Sheng <i>et al.</i> , 2002)
			Verbascósido	▪ Activo. Prevención Parkinson	
<b>Magnoliaceae</b>					
	<i>Magnolia sieboldii</i>		Syringin-4-O- $\beta$ -glucósido	<b>Inhibidor producción NO:</b> ▪ Activo	(Park <i>et al.</i> , 1996)
<b>Myoporaceae</b>					
	<i>Eremohyla alternifolia</i>	Fiebre, cefaleas, dolor, conjuntivitis, inflamación.	Verbascósido	<b>Antimicrobiana</b> ▪ Activo	(Pennacchio <i>et al.</i> , 1999)
				<b>Cardiotónica</b> ▪ Cronotrópico positivo. ▪ Inotópico positivo. ▪ Incremento de la velocidad de perfusión coronaria. por AMPc	
				<b>Hipo-hipertensora</b> ▪ No efecto en Pa	
	<i>E. gilesii</i>	Resfriados, cefaleas, dolor pecho, úlceras	Poliumósido	<b>Antiagregante plaquetario</b> ▪ Activo	(Grice <i>et al.</i> , 2003)
			Verbascósido	▪ Activo	
			Verbascósido	<b>Antiserotoninérgica</b> ▪ Activo	

**Tabla V (cont.):** Ensayos farmacológicos realizados a ésteres fenilpropanoicos (PPG).



Familia	Especie	Uso popular	Fenilpropanoide	Actividad ensayada	Referencia
Oleaceae (cont.)	<i>Olea europaea</i>		Verbascósido	<b>Antioxidante:</b> Antirradicalaria (ATBS) ▪ Activo	(Benavente-García <i>et al.</i> , 2000)
				<b>Antiviral:</b> ▪ No activo frente-VIH	(Lee-Huang <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Syringa vulgaris</i>		Verbascósido	<b>Depresora cardíaca:</b> ▪ Descenso de sístole, diástole.	(Ahmad <i>et al.</i> , 1995)
				<b>Hipotensora:</b> ▪ Activo	(Ahmad <i>et al.</i> , 1995)
Orobanchaceae	<i>Calceolaria hypericina</i>		Calceolariósido A	<b>Agregante plaquetario:</b> ▪ Activo	(Capasso <i>et al.</i> , 1993a)
	<i>Cistanche deserticola</i>			<b>Antioxidante:</b> Antirradicalaria DPPH y anión superóxido	(Xiong <i>et al.</i> , 1996)
			2'-acetil-verbascósido	▪ Activo	
			Cistanósido A	▪ Activo	
			Cistanósido F	▪ Activo	
			Echinacósido	▪ Activo	
			Isoverbascósido	▪ Activo	
			Syringálico A 3'- $\alpha$ -rhamnopiranosido	▪ Activo	
			Tubulósido A	▪ Activo	
			Tubulósido B	▪ Activo	
		Verbascósido	▪ Activo		

**Tabla V (cont.):** Ensayos farmacológicos realizados a ésteres fenilpropanoicos (PPG).

Familia	Especie	Uso popular	Fenilpropanoide	Actividad ensayada	Referencia
Orobanchaceae (cont.)	<i>C. deserticola</i> (cont.)			<b>Antioxidante (cont.):</b> Antirradicalaria de NO	(Xiong <i>et al.</i> , 2000)
			2'-acetil-verbascósido	▪ Activo	
			Cistanósido A	▪ Activo	
			Echinacósido	▪ Activo	
			Isoverbascósido	▪ Activo	
			Tubulósido A	▪ Activo	
			Tubulósido B	▪ Activo	
			Verbascósido	▪ Activo	
				Inhibición peroxidación lipídica inducida por NADPH-CCl <sub>4</sub>	(Xiong <i>et al.</i> , 1998)
			2'-acetil-verbascósido	▪ Activo	
			Isoverbascósido	▪ Activo	
			Tubulósido B	▪ Activo	
			Verbascósido	▪ Activo	
				Inhibición peroxidación lipídica inducida por ácido ascórbico y ferroso	(Xiong <i>et al.</i> , 1996)
			2'-acetil-verbascósido	▪ Activo	
			Cistanósido A	▪ Activo	
			Cistanósido F	▪ Activo	
			Echinacósido	▪ Activo	
			Isoverbascósido	▪ Activo	
			Syringálico A 3'- $\alpha$ - rhamnospiranósido	▪ Activo	
			Tubulósido	▪ Activo	
			Tubulósido A	▪ Activo	
			Verbascósido	▪ Activo	

**Tabla V (cont.):** Ensayos farmacológicos realizados a ésteres fenilpropanoicos (PPG).

Familia	Especie	Uso popular	Fenilpropanoide	Actividad ensayada	Referencia
Orobanchaceae (cont.)	<i>C. deserticola</i> (cont.)			<b>Hepatoprotectora:</b> Protección in vitro frente agentes CCl <sub>4</sub> o D-GalN <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Activo</li> </ul>	(Xiong <i>et al.</i> , 1998)
			2'-acetil-verbascósido Isoverbascósido Tubulósido B Verbascósido	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Activo</li> <li>▪ Activo</li> <li>▪ Activo</li> <li>▪ Activo</li> </ul>	
			Verbascósido	Inhibición apoptosis inducida por LPS y D-GalN en hepatocitos. <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Activo</li> </ul>	(Xiong <i>et al.</i> , 1999)
				<b>Inhibidora enzimática:</b> Xantina oxidasa (XOD)	(Xiong <i>et al.</i> , 1996)
			2'-acetil-verbascósido Cistanósido A Cistanósido F Echinacósido Isoverbascósido Syringálico A 3'- $\alpha$ - rhamnopiranosido Tubulósido A Verbascósido Tubulósido B	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ No activo</li> <li>▪ No activo</li> <li>▪ No activo</li> <li>▪ No activo</li> <li>▪ Activo</li> <li>▪ No activo</li> <li>▪ No activo</li> <li>▪ No activo</li> <li>▪ Activo.</li> </ul>	
			2'-acetil-verbascósido Cistanósido A Echinacósido Isoverbascósido Tubulósido A Tubulósido B Verbascósido	Óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ No activo</li> <li>▪ No activo.</li> </ul>	(Xiong <i>et al.</i> , 2000)

**Tabla V (cont.):** Ensayos farmacológicos realizados a ésteres fenilpropanoicos (PPG).

Familia	Especie	Uso popular	Fenilpropanoide	Actividad ensayada	Referencia
<b>Orobanchaceae (cont.)</b>					
	<i>C. salsa</i>	Insuficiencia renal infertilidad femenina leucorrea neuroastenia estreñimiento senil.	Verbascósido	<b>Neuroprotectora</b> ▪ Activo por inhibición caspasas	(Pu <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Orobanche hederæ</i>		Verbascósido Orobanchósido	<b>Antiagregante plaquetaria</b> ▪ Activo ▪ Activo	(Capasso <i>et al.</i> , 1993b)
	<i>O. hypericina</i>		Calceolariósido A Calceolariósido B Calceolariósido C	<b>Agregante plaquetaria</b> ▪ Activo ▪ No efecto ▪ No efecto	(Capasso <i>et al.</i> , 1993b)
<b>Pedaliaceae</b>					
	<i>Harpagophytum procumbens</i>	Fiebre, alteraciones sanguíneas, digestivas, tónico, lesiones cutáneas, osteoartritis, procesos reumáticos	Isoverbascósido 6'-O-acetil-verbascósido Verbascósido	<b>Inhibidora enzimática:</b> Elastasa ▪ Activo ▪ Muy activo ▪ No activo	(Boje <i>et al.</i> , 2003)
<b>Plantaginaceae</b>					
	<i>Plantago cynops</i>		Verbascósido	<b>Antibacteriana</b> ▪ Activo	(Debrauwer <i>et al.</i> , 1989)
	<i>P. lanceolata</i>		Cistanósido F Isoverbascósido Lavandulifoliósido Plantamajósido Verbascósido	<b>Antiinflamatoria:</b> Inhibición edema inducido por ácido araquidónico ▪ No activo ▪ No activo ▪ No activo ▪ Activo ▪ Activo	(Murai <i>et al.</i> , 1995a)

**Tabla V (cont.):** Ensayos farmacológicos realizados a ésteres fenilpropanoicos (PPG).

Familia	Especie	Uso popular	Fenilpropanoide	Actividad ensayada	Referencia
Plantaginaceae (cont.)					
	<i>P. major</i>		Plantamajósido	<b>Antibacteriana:</b> <i>S. aureus</i> ; <i>E. coli</i> ▪ Activo	(Ravn y Brimer 1988)
	<i>P. media</i>		Homoplantaginina Verbascósido	<b>Antitumoral-quimiopreventiva:</b> Inhibición EGFR; TK y crecimiento tumores ▪ Activo ▪ Activo	(Kunvari <i>et al.</i> , 1999)
Polygonaceae					
	<i>Polygonum lapatifolium</i>	Dolores articulares		<b>Quimiopreventiva:</b> Inhibición inducción tumores por EBV-EA <sup>43</sup> in vitro ▪ Activo Antipromotora frente tumores inducido por DMBA y TPA in vivo ▪ Activo	(Takasaki <i>et al.</i> , 2001)
			Lapathósido A Vanicósido B	▪ Activo ▪ Activo	(Takasaki <i>et al.</i> , 2001)
			Lapathósido A Vanicósido B	▪ Activo ▪ Activo	
Schrophulariaceae					
	<i>Brandisia hancei</i>	Osteitis necrotica, Artritis, hepatitis, hiperlipemia, Hipercolesterolemia	2'acetilverbascósido Brandiósido <sup>44</sup> Poliumósido Verbascósido	<b>Antioxidante:</b> Inhibición hemólisis y generación radicales superóxido: ▪ Activo ▪ Activo ▪ Activo ▪ Activo	(He <i>et al.</i> , 2000)
			2'acetilverbascósido Brandiósido Poliumósido Verbascósido	<b>Anti ateroesclerótica</b> ▪ Activo ▪ Activo ▪ Activo ▪ Activo	(He <i>et al.</i> , 2001)

**Tabla V (cont.):** Ensayos farmacológicos realizados a ésteres fenilpropanoicos (PPG).

<sup>43</sup> **EBV-EA:** Virus Epstein-Barr

<sup>44</sup> **Brandiósido:** Poliumósido acetilado en 2' de la glucosa.

Familia	Especie	Uso popular	Fenilpropanoide	Actividad ensayada	Referencia
Schrophulariaceae (cont.)	<i>B. hancei</i> (cont.)			<b>Antitumoral-quimiopreventiva:</b> Antiproliferación en células A7r5 <sup>45</sup> .	(He <i>et al.</i> , 2001)
			2'acetilverbascósido	▪ Activo	
			Brandiósido	▪ Activo	
			Poliumósido	▪ Activo	
			Verbascósido	▪ Activo	
				<b>Inhibidora enzimática:</b> Xantina oxidasa (antioxidante)	(Kong <i>et al.</i> , 1999)
			2'acetilverbascósido	▪ No activo	
			Arenariósido	▪ No activo	
			Brandiósido	▪ No activo	
			Isoverbascósido	▪ Inhibidor competitivo.	
			Verbascósido	▪ No activo	
	<i>Castilleja linariaefolia</i>			<b>Antitumoral:</b> Citotóxica frente P-388	(Pettit <i>et al.</i> , 1990)
			Isoverbascósido	▪ Activo	
			Verbascósido	▪ Activo	
	<i>Digitalis purpurea</i>			<b>Inhibidora enzimática:PKC<math>\alpha</math></b>	(Zhou <i>et al.</i> , 1998)
			2-(3-hidroxi-4-metoxi-fenil)-etil-O-( $\alpha$ -L-rhamnosil)-(1-3)-O-( $\alpha$ -L-rhamnosil)-(1-6)-4'-E-feruloil- $\beta$ -D-glucopiranosido.	▪ Activo	
			Calceolariósido A	▪ Activo	
			Calceolariósido B	▪ Activo	
			Forsythósido	▪ Activo	
			Plantainósido	▪ Activo	

**Tabla V (cont.):** Ensayos farmacológicos realizados a ésteres fenilpropanoicos (PPG).

<sup>45</sup> A7r5: Células de músculo liso de aorta de rata.

Familia	Especie	Uso popular	Fenilpropanoide	Actividad ensayada	Referencia
Schrophulariaceae (cont.)					
	<i>Monochasma savatierii</i>			<b>Inhibidora enzimática:</b> Aldosa reductasa in vivo. ▪ No activo ▪ Fuertemente activo	(Kohda <i>et al.</i> , 1989)
	<i>Pedicularis sp.</i>		Deshidroverbascósido Verbascósido	<b>Antioxidante:</b> Inhibición de oxidación de ácido linoleico en CTAB <sup>46</sup> ▪ Activo	(Zheng <i>et al.</i> , 1993)
			Cistanósido Echinacósido Isoverbascósido Pediculariósido A Verbascósido	▪ Activo ▪ Activo ▪ Activo ▪ Activo ▪ Activo	
			Cistanósido D Echinacósido Isoverbascósido Pediculariósido A Verbascósido	Protección frente hemólisis oxidativa ▪ Activo ▪ Activo ▪ Activo ▪ Activo ▪ Activo	(Li <i>et al.</i> , 1993)
			Cistanósido C Pediculariósido A Verbascósido	<b>Quimiopreventiva:</b> Reparación de aductos de ADN: dAMP+; dAMP-OH; dAMP(NH) <sup>47</sup> dGMP+; dGMP-OH; PoliG-OH; TMP ▪ Activo ▪ Activo ▪ Activo	(Shi <i>et al.</i> , 1999a; 2000b)
	<i>P. alashanica</i>			<b>Antioxidante:</b> Antirradicalaria frente aniones O <sub>2</sub> <sup>-</sup> y OH <sup>-</sup> ▪ Activo ▪ Activo	(Wang <i>et al.</i> , 1996a)
			Leucosceptósido A Martynósido		

**Tabla V (cont.):** Ensayos farmacológicos realizados a ésteres fenilpropanoicos (PPG).

<sup>46</sup> **CTAB:** Bromuro de cetil trimetil amonio.

<sup>47</sup> **dAMP:** 2'-deoxiadenosina-5'-monofosfato; **dGMP:** 2'-deoxiguanosina-5'-monofosfato; **TMP:** timidina 5'-fosfato.

Familia	Especie	Uso popular	Fenilpropanoide	Actividad ensayada	Referencia
Schrophulariaceae (cont.)					
	<i>P. lasiophyris</i>			<b>Antioxidante:</b> Inhibición hemolisis oxidativa in vitro ▪ Activo	(Li <i>et al.</i> , 1993)
			Cistanósido D		
	<i>P. plicata</i>		Martynósido	<b>Quimiopreventiva:</b> Reparación de aductos de ADN: T <sup>-48</sup> Activo	(Li <i>et al.</i> , 1997d)
			Verbascósido Martynósido	<b>A nivel motor:</b> Retraso de la fatiga del músculo esquelético. Mejora contractilidad. ▪ Activo ▪ Activo	(Li <i>et al.</i> , 1999a; Liao <i>et al.</i> , 1999a)
	<i>P. spicata</i>			<b>Quimiopreventiva:</b> Reparación de aductos de ADN: T <sup>-</sup> ▪ Activo	(Li <i>et al.</i> , 1997d) (Sperandio <i>et al.</i> , 2002)
			Cistanósido C		
	<i>P. striata</i>	Astenia, envejecimiento. ("ginseng nativo")		<b>Antioxidante:</b> Inhibición hemolisis oxidativa in vitro ▪ Activo ▪ Activo	(Li <i>et al.</i> , 1993)
			Echinacósido Pediculariósido A		
			Isoverbascósido Permetil-verbascósido Verbascósido	Inhibición peroxidación lipídica inducida por FeSO <sub>4</sub> ▪ Activo ▪ No activo ▪ Activo	(Li <i>et al.</i> , 1997a)
			Leucosceptósido A Martynósido Pediculariósido A Pediculariósido M Pediculariósido N Verbascósido	Antirradicalaria (OH <sup>-</sup> y O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) ▪ Activo ▪ Activo ▪ Activo ▪ Activo ▪ Activo ▪ Activo	(Wang <i>et al.</i> , 1996b)

**Tabla V (cont.):** Ensayos farmacológicos realizados a ésteres fenilpropanoicos (PPG).

<sup>48</sup> T.-: Radical aniónico de timidina

Familia	Especie	Uso popular	Fenilpropanoide	Actividad ensayada	Referencia
Schrophulariaceae (cont.)	<i>P. striata</i> (cont.)			<b>Antioxidante (cont.):</b> Protección de membrana eritrocito ante peroxidación lipídica ▪ Activo	(Liu <i>et al.</i> , 2003)
			Verbascósido	<b>Antitumoral-quimiopreventiva:</b> Induce diferenciación celular en: ▪ SMMC-7721 <sup>49</sup> y MGc803	(Rui-Chuan <i>et al.</i> , 2002; Chen <i>et al.</i> , 2002)
			Isoverbascósido	▪ MKN45 <sup>50</sup> y MGc803	(Li <i>et al.</i> , 1997c; Zhang <i>et al.</i> , 2002)
			Verbascósido	Antiproliferativo línea MGc803 ▪ Activo	(Chen <i>et al.</i> , 2002)
			Isoverbascósido	Inhibe telomerasa MKN45. ▪ Activo	(Zhang <i>et al.</i> , 2002)
			Verbascósido	Reparadora de aductos de ADN: T-OH <sup>51</sup> ▪ Activo	(Li <i>et al.</i> , 1997e)
			Pediculariósido A	▪ Activo	
			Verbascósido	▪ Activo T <sup>-</sup>	(Li <i>et al.</i> , 1997d)
			Leucosceptósido A	▪ Activo	
			Pediculariósido M	▪ Activo	
			Pediculariósido N	▪ Activo	
			Verbascósido	▪ Activo Reparadora de aductos de ADN: dGMP-OH <sup>51</sup>	(Li <i>et al.</i> , 1996)
			Verbascósido	▪ Activo	
			Verbascósido	Reparación lesiones en el ADN	(Gao <i>et al.</i> , 2003)
			Verbascósido	<b>Inhibidor enzimático:</b> ▪ No inhibe xantina oxidasa	(Li <i>et al.</i> , 1993; Wang <i>et al.</i> , 1996a)

**Tabla V (cont.):** Ensayos farmacológicos realizados a ésteres fenilpropanoicos (PPG).

<sup>49</sup> **SMMC-7721:** Carcinoma hepatocelular humano.

<sup>50</sup> **MKN45:** Carcinoma gástrico humano.

<sup>51</sup> **T-OH:** Radical hidroxilo de timidina; **dGMP-OH:** Radical hidroxilo de 2'-deoxyguanosina-5'-monofosfato.

Familia	Especie	Uso popular	Fenilpropanoide	Actividad ensayada	Referencia
Schrophulariaceae (cont.)					
	<i>P. striata</i> (cont.)		Isoverbascósido Permetil verbascósido Verbascósido	<b>Quelante iónico:</b> Ión ferroso ▪ Activo ▪ No quelante ▪ Activo	(Li <i>et al.</i> , 1997a)
	<i>Penstemon linarioides</i>		Leucosceptósido A Poliumósido Verbascósido	<b>Inhibidora enzimática:</b> PKC $\alpha$ ▪ Activo ▪ Activo ▪ Activo	(Zhou <i>et al.</i> , 1998)
	<i>Scrophularia albida</i>		(+) syringaresinol-o- $\beta$ - D-glucopiranosido	<b>Antitumoral:</b> Citotoxicidad frente dRLh-84; S-180; P-388/D1; HeLa <sup>52</sup> ▪ Activo	(Saracoglu <i>et al.</i> , 1997)
	<i>S. buergeriana</i>	Fiebre, sudoración, estreñimiento, faringitis, neuritis, laringitis	4-O-E-p- metoxicinamoil- $\alpha$ -L- rhamnopiranosido éster	<b>Hepatoprotectora:</b> ▪ Activo frente CCl <sub>4</sub> .	(Lee <i>et al.</i> , 2002a)
	<i>S. ningpoensis</i>		Angorósido C Verbascósido	<b>Quimiopreventiva-antitumoral:</b> Reparación de aductos de ADN: d-AMP-OH y d-GMP ▪ Activo ▪ Activo	(Li <i>et al.</i> , 2000a)
	<i>S. scopolii</i>		Angarósido A Angarósido B Angarósido C	<b>Antitumoral:</b> Citotoxicidad frente dRLh-84; S-180; P-388/D1; HeLa ▪ Activo ▪ Activo ▪ Activo	(Saracoglu <i>et al.</i> , 1997)

**Tabla V (cont.):** Ensayos farmacológicos realizados a ésteres fenilpropanoicos (PPG).

<sup>52</sup> **dRLh-84:** hepatoma de rata; **HeLa:** carcinoma epitelial humano; **S-180:** sarcoma; **P-388/D1:** neoplasma linfóide de ratón.

Familia	Especie	Uso popular	Fenilpropanoide	Actividad ensayada	Referencia
Schrophulariaceae (cont.)					
	<i>S. scorodonia</i>		Verbascósido	<b>Antiviral:</b> frente HSV y VSV <sup>53</sup> ▪ No activo	(Bermejo <i>et al.</i> , 2002)
			Verbascósido	<b>Antitumoral:</b> Citotoxicidad frente HeLa, Vero y BHK-21 <sup>54</sup> ▪ No activo	(Bermejo <i>et al.</i> , 2002)
	<i>Scutellaria armeniaca</i>		Teucriósido Verbascósido Leucosceptósido A Martynósido	<b>Antitumoral:</b> Citotoxicidad frente dRLh-84, S-180, P-388/d1 HeLa yhepatocitos. ▪ Activo. ▪ Activo dRLh-84; S-180 y P-388. ▪ No activo ▪ No activo	(Saracoglu <i>et al.</i> , 1995a)
	<i>Veronica persica</i>		3,4-dihidroxi-β-fenil-etoxi-O- [β-D-glucopiranosil -(1-2)]-[β-D-glucopiranosil -(1-3)]4-O- cafeoil-β-D-glucopiranosido Isoverbascósido Lavandulifoliósido Persicósido Verbascósido	<b>Antioxidante:</b> -Antirradicalaria DPPH ▪ No activo  ▪ No activo ▪ No activo ▪ Activo ▪ Activo	(Harput <i>et al.</i> , 2002)

**Tabla V (cont.):** Ensayos farmacológicos realizados a ésteres fenilpropanoicos (PPG).

<sup>53</sup> HSV: Virus herpes simplex tipo 1; VSV: Virus estomatitis vesicular.

<sup>54</sup> HeLa: Carcinoma cervical epitelial humano; Vero: células renales de mono verde africano; BHK-21: células renales de cría de hamster.

Familia	Especie	Uso popular	Fenilpropanoide	Actividad ensayada	Referencia
Verbenaceae	<i>Caryopteris incana</i>		Incanósido Isoverbascósido Phlinósido A Verbascósido 6-O-cafeoil- $\beta$ -D-glucosa	<b>Antioxidante:</b> Antirradicalaria frente DPPH, hidroxilo y superóxido. ▪ Activo ▪ Activo ▪ Activo ▪ Activo ▪ No activo	(Gao <i>et al.</i> , 1999)
	<i>Clerodendron bungei</i> y <i>C. trichotomum</i>		Alcohol 3,4-dihidroxifenetilacético 3,4-dihidroxifenetil glucósido Isoverbascósido Desrhamnosil-isoverbascósido Metil cafeato Verbascósido Desrhamnosil-verbascósido	<b>Antitumoral:</b> Antiproliferativa frente B16F10, MK-1 y HeLa <sup>55</sup> ▪ Activo en B16F10  ▪ Activo en B16F10 ▪ Activo en B16F10 ▪ Activo en B16F10 ▪ Activo en B16F10 ▪ Activo en B16F10	(Nagao <i>et al.</i> , 2001)
	<i>C. trichotomum</i>	Nerviosismo, hipertensión	Isomartynósido Isoverbascósido Jionósido D Leucosceptósido A Martynósido Plantainósido C Verbascósido	<b>Antiviral:</b> Integrasas HIV-1 ▪ No activo ▪ Activo ▪ No activo ▪ No activo ▪ No activo ▪ No activo ▪ Activo	(Kim <i>et al.</i> , 2001)

**Tabla V (cont.):** Ensayos farmacológicos realizados a ésteres fenilpropanoicos (PPG).

<sup>55</sup> **B16F10:** melanoma de ratón; **MK-1:** adenocarcinoma gástrico humano; **HeLa:** carcinoma uterino humano.

Familia	Especie	Uso popular	Fenilpropanoide	Actividad ensayada	Referencia
Verbenaceae (cont.)					
	<i>C. trichotomum (cont.)</i>		Isomartynósido Isoverbascósido Leucosceptósido Martynósido Verbascósido	<b>Inhibidora enzimática:</b> ACE <sup>56</sup> ▪ Activo ▪ Activo ▪ Activo ▪ Activo ▪ Activo	(Kang <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Lantana camara</i>		Verbascósido	<b>Inhibidora enzimática:</b> PKC ▪ Activo, por dominio catalítico	(Herbert <i>et al.</i> , 1991)
	<i>Lippia dulcis</i> <i>L. canescens</i>	Molestias gastrointestinales. Bronquitis y resfriados	Arenariósido Isoverbascósido leucosceptósido A Martynósido Martynósido diacetilado Verbascósido	<b>Antitumoral:</b>  Antiproliferativa frente a B16F10, MK-1 y HeLa ▪ Activo en B16F10. ▪ Activo en B16F10 ▪ Inactivo ▪ Inactivo ▪ Inactivo ▪ Activo en B16F10	(Compadre <i>et al.</i> , 1986; Abe <i>et al.</i> , 2002)
	<i>L. multiflora</i>			<b>Antiinflamatoria:</b> Inhibición síntesis TXA <sub>2</sub> ▪ No activo	(Pharm <i>et al.</i> , 1988)
	<i>Premna subscandens</i>	Malaria	Verbascósido	<b>Cicatrizante:</b> Formación de red colágeno in vitro. ▪ Activo	(Sudo <i>et al.</i> , 1999)
	<i>Stachytarpheta cayennensis</i>	Estomáquico, febrífugo, hepatitis, resfriados, arritirs, cicatrizante	Verbascósido	<b>Antiinflamatoria:</b> ▪ Inhibe el edema plantar inducido por carragenina ▪ Inhibe efectos de histamina y bradiquinina	(Schapoval <i>et al.</i> , 1998a)

**Tabla V (cont.):** Ensayos farmacológicos realizados a ésteres fenilpropanoicos (PPG).

<sup>56</sup> ACE: Enzima convertidora de angiotensina.

Familia	Especie	Uso popular	Fenilpropanoide	Actividad ensayada	Referencia
Verbenaceae (cont.)	<i>Verbena litoralis</i>			<b>Quimiopreventiva:</b>	
				No incremento del NGF <sup>57</sup>	(Li <i>et al.</i> , 2003)
			Isoverbascósido	▪ Activo	
			Jionósido	▪ Activo	
			Verbascósido	▪ Activo	
				<b>Antiinflamatoria</b>	
	<i>Verbena officinalis</i>		2'-acetil-verbascósido	Inhibe el edema plantar inducido por carragenina	(Deepark y Handa 2000)
	<i>n.d.</i> <sup>58</sup>		Desrhamnosil verbascósido	<b>Antimicrobiano</b> frente a <i>E. coli</i>	(Molnar <i>et al.</i> , 1989)
				<b>Antiviral</b> frente virus Aujeszky	(Molnar <i>et al.</i> , 1989)
			Isoverbascósido	<b>Antitumoral-quimiopreventivo:</b>	(Wang <i>et al.</i> , 1999)
				▪Inducción diferenciación HL-60	
			Purpureásido A	<b>Antimicrobiano</b> frente a <i>E. coli</i>	(Molnar <i>et al.</i> , 1989)
				<b>Antiviral</b> frente virus Aujeszky	
			Purpureásido B	<b>Antimicrobiano</b> frente a <i>E. coli</i>	
				No Antiviral frente virus Aujeszky	
			Purpureásido C	<b>Antimicrobiano</b> frente a <i>E. coli</i>	
				No Antiviral frente virus Aujeszky	
			Verbascósido	<b>Quimiopreventiva:</b>	(Zhou y Zheng 1991)
				▪Antirradicalaria frente superóxido y peroxidación lipídica	
				▪Antimetastásico en pulmón de células B16 (melanoma).	(Ohno <i>et al.</i> , 2002)
				▪Inhibidor angiogénesis por disminución de la expresión de MMP <i>in vitro</i> .	(Wartenberg <i>et al.</i> , 2003)
				▪Activo frente nefritis, inhibiendo expansión matriz o proliferación celular, al incrementar la actividad de metaloproteinasas	(Hattori <i>et al.</i> , 1996)

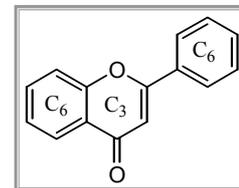
**Tabla VI (final):** Ensayos farmacológicos realizados a ésteres fenilpropanoicos (PPG).

<sup>57</sup> **NGF:** Factor de crecimiento neuronal.

<sup>58</sup> **n.d.:** No determinado.

### II.2.3. FLAVONOIDES

Los flavonoides constituyen el grupo más amplio de los polifenoles, derivados de la estructura difenilpropano (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) biosintetizados a través de rutas mixtas que combinan la vía del ácido sikímico y de los poliacetatos.



Son responsables de la coloración de flores, frutos..., y por tanto, de atraer a los polinizadores. Al absorber las radiaciones UV, actúan como mecanismo de defensa frente las mismas. Tienen un efecto sinérgico con hormonas vegetales, como auxinas, estimulando el crecimiento longitudinal de las células; activan la nodulación de bacterias en las raíces, y con ello, la fijación de nitrógeno; confieren resistencia a enfermedades, bien como antimicrobianos (han mostrado ser activos principalmente frente al género *Staphylococcus*), o antifúngicos. Además, protegen a las plantas del ataque de insectos y herbívoros, frente a nematodos y pueden ser estimulantes para otros insectos, como en la oviposición.

La actividad farmacológica de los flavonoides ha sido muy estudiada. Se han descrito como **venotónicos** o **vasoprotectores**, **hipotensores**, **hipocolesterolémicos**, **antibacterianos**... Actualmente, se están investigando sus efectos a nivel de cáncer y su prevención, la inflamación y la respuesta inmunitaria.

A nivel **quimiopreventivo** y **antitumoral** existen estudios *in vitro* e *in vivo* que han mostrado que los flavonoides son *antioxidantes* mediante diferentes mecanismos de acción, ya que reaccionan con el exceso de radicales libres, eliminándolos, actúan como quelantes de metales pesados que en determinadas condiciones se comportan como prooxidantes, inhiben enzimas que generan radicales libres y/o estimulan a enzimas y sistemas celulares detoxificantes que eliminan a los radicales libres. Todo ello conduce a que también se comporten como *antimutagénicos* porque, al reaccionar con los radicales libres, evitan que éstos dañen al ADN, y además, al estimular a enzimas detoxificantes de fase II, como la quinona reductasa, se eliminan también otras sustancias carcinogénicas. Se ha encontrado una relación entre el tipo de flavonoide y su actividad antioxidante, así, es importante la presencia de OH en C-3, grupo ceto en C-4 y el doble enlace entre C-2 y C-3.

También son *inhibidores de enzimas* involucradas en importantes rutas que regulan la división y proliferación celular, como oxidorreductasas, kinasas (TK, CdK...), transferasas, ligasas, liasas, topoisomerasas..., y por tanto se comportan como inductores de apoptosis y diferenciación celular e inhibidores de la mitosis.

Además, algunos flavonoides se han descrito como *citotóxicos* frente a numerosas líneas tumorales, cuya revisión ha sido publicada por nosotros (López-Lázaro *et al.*, 2002).

Todo ello, ha conducido a la introducción de algunos flavonoides en clínica, como es el caso de genisteína, que se está utilizando actualmente en el tratamiento de leucemia y cáncer de mama con anticuerpos conjugados, o de flavopiridol, que es el primer inhibidor de kinasas dependientes de ciclinas (cdk) ensayado en fase II.

A nivel de **inflamación**, los flavonoides poseen actividad antiinflamatoria, al inhibir enzimas implicadas en este proceso y en la agregación plaquetaria, como COX-2.

La actividad **inmunomoduladora** que muestran se relaciona con su capacidad para estimular a los linfocitos T y la síntesis de interferón.

Por último, determinados flavonoides pueden actuar como hormonas en plantas y animales. Esta actividad, en animales, puede deberse a que la posición de los grupos hidroxilo en las geninas adoptan la misma posición que los OH en los estrógenos, interaccionando con sus receptores, mostrando una actividad estrogénica o antiestrogénica.

Es importante destacar que los flavonoides son en general, seguros, sin efectos adversos, y están ampliamente distribuidos en nuestra dieta. Podemos encontrar flavonas en las semillas, flavonoles en frutas, flavanonas, en zumos de cítricos, o isoflavonas en legumbres...

Debido a la amplitud del tema, nos hemos limitado a citar los ensayos realizados en quimioprevención y actividad antitumoral de los flavonoides objeto de nuestro estudio, luteolina-7-glucósido y rutina, comparándolos con las correspondientes geninas, luteolina y quercetina, respectivamente.

Las revisiones bibliográficas de flavonoides que se recomiendan son las siguientes: (Harborne y Williams 2000; Yang *et al.*, 2001; Hollman, 2001; Birt *et al.*, 2001; Ross y Kasum 2002; Havsteen, 2002; López-Lázaro, 2002; López-Lázaro *et al.*, 2002)

Flavonoide	Actividad ensayada	Referencia
Luteolina-7-O-β- glucósido	<p><b>Antiinflamatoria:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibición hipersensibilidad inducida por dinitrofluorobenceno.</li> </ul> <p><b>Antioxidante:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Antirradicalaria <i>in vitro</i> frente DPPH</li> <li>Antirradicalaria <i>in vitro</i> frente AAPH y radicales peroxilo.</li> <li>Antirradicalaria <i>in vitro</i> frente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/OH</li> <li>Inhibe la inducción de formación de radicales superóxido en neutrófilos.</li> <li>Inhibe de la peroxidación lipídica inducida por radicales hidroxilo en microsomas hepáticos de rata</li> <li>Inhibición de oxidación de ácido linoleico y caroteno.</li> <li>Inhibición de peroxidación lipídica dependiente e independiente de enzimas</li> <li>Inhibición peroxidación lipídica inducida por ácido ascórbico en cerebro de rata</li> </ul> <p><b>Antimutagénica:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>en <i>Salmonella typhimurium</i> frente a mutágenos BHP y CHP, IQ<sup>59</sup></li> </ul> <p><b>Citotóxica<sup>60</sup>:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>COLO 320</li> <li>GLC4</li> <li>HTC-15</li> <li>MCF-7</li> <li>SHEP</li> </ul> <p><b>Genotóxica:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Ligera inducción de micronucleos en linfocitos</li> </ul> <p><b>Hepatoprotectora:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Activa frente CCl<sub>4</sub></li> </ul> <p><b>Inmunomoduladora:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Anticomplemento in vitro</li> </ul> <p><b>Regulación del ciclo celular e inhibición de señales mitógenas:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibición de la liberación de IL-6 y TNF-α</li> <li>Inhibición de tirosina fosforilasa.</li> </ul>	<p>(Wassel <i>et al.</i>, 1996) (Gongora.L. <i>et al.</i>, 2002)</p> <p>(Taskova <i>et al.</i>, 2003) (Edenharder y Grunhage 2003)</p> <p>(Fejes <i>et al.</i>, 2000) (Lu <i>et al.</i>, 2003) (Lee <i>et al.</i>, 2002c)</p> <p>(Igile <i>et al.</i>, 1994) (Hohmann <i>et al.</i>, 1999) (Fejes <i>et al.</i>, 2000)</p> <p>(Edenharder <i>et al.</i>, 1993; 2003)</p> <p>(Woerdenbag <i>et al.</i>, 1994) (Woerdenbag <i>et al.</i>, 1994) (Kamei <i>et al.</i>, 1996) (Fotsis <i>et al.</i>, 1997) (Fotsis <i>et al.</i>, 1997) (Popp y Schimmer 1991)</p> <p>(Adzet <i>et al.</i>, 1987)</p> <p>(Pieroni <i>et al.</i>, 1996; 2000)</p> <p>(Xagorari <i>et al.</i>, 2001) (Lu <i>et al.</i>, 2003)</p>

**Tabla VI:** Ensayos farmacológicos realizados a Luteolina-7-O-β-glucósido.

<sup>59</sup> **BHP:** Tert-butil hidroperóxido; **CHP:** cumeno hidroperóxido; **IQ:** 2-amino-3-metilimidazol quinolina.

<sup>60</sup> **COLO 320:** Cáncer de colon humano; **MCF-7:** Adenocarcinoma de mama;

Flavonoide	Actividad ensayada	Referencia
Luteolina	<p><b>Antiangiogénica y antimetastásica</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibición de la angiogénesis</li> <li>• Inhibición de la secreción de MMP. Antimetastático</li> </ul> <p><b>Antiestrogénica- Estrogénica:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Revierte los efectos de estrona frente a la proliferación y diferenciación en glándulas mamarias de ratas.</li> <li>• Unión a receptores estrogénicos tipo <math>\beta</math></li> <li>• Unión a receptores estrogénicos</li> <li>• Inhibición de la unión a receptores estrogénicos tipo II.</li> <li>• Compite por receptor estrogénico tipo II in vitro con estradiol, pero no interacciona con el receptor estrogénico en útero de rata.</li> <li>• Disminución de la actividad de la enzima aromatasa en células.</li> <li>• En células dependientes de estrógenos, MCF-7, efecto bifásico, a bajas dosis, inducción de la síntesis de ADN y a altas, inhibición.</li> <li>• Estimulación de la proliferación celular en MCF-7.</li> <li>• Estrogénica fuertemente en BT-474 (cáncer de mama) no actividad progestágena</li> <li>• Inhibición de proliferación celular en MCF.7 e inhibición de la proliferación inducida por estrógenos</li> <li>• Inhibición de síntesis del ADN inducida por estradiol en MCF-7</li> </ul> <p><b>Antiinflamatoria</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibición de la liberación de IL-6 y TNF-<math>\alpha</math></li> <li>• Inhibición de la migración y activación de leucocitos, desgranulación de células mastocitos e interleukina 5</li> <li>• Inhibición de la proliferación de leucocitos mononucleares</li> </ul> <p><b>Antimutagénica</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• en <i>Salmonella typhimurium</i> frente a mutágenos BHP y CHP, IQ</li> <li>• Inhibición del daño en el ADN</li> <li>• Inhibe la expresión de NAT<sup>61</sup>, y la formación de aductos de tipo ADN-aminofluoreno. en células T24<sup>62</sup></li> <li>• Inhibición de formación aductos de ADN por 2-aminofluoreno</li> </ul>	<p>(Fotsis <i>et al.</i>, 1998)</p> <p>(Huang <i>et al.</i>, 1999)</p> <p>(Holland y Roy 1995)</p> <p>(Han <i>et al.</i>, 2002)</p> <p>(Baker, 1992)</p> <p>(Holland y Roy 1995)</p> <p>(Markhaverich <i>et al.</i>, 1988)</p> <p>(Wang <i>et al.</i>, 1994)</p> <p>(Wang y Kurzer 1997)</p> <p>(Han <i>et al.</i>, 2002)</p> <p>(Zand <i>et al.</i>, 2000)</p> <p>(Han <i>et al.</i>, 2001)</p> <p>(Wang y Kurzer 1998)</p> <p>(Xagorari <i>et al.</i>, 2001)</p> <p>(Arnallal <i>et al.</i>, 1985; Abeysekera <i>et al.</i>, 1999)</p> <p>(Chiang <i>et al.</i>, 2003d)</p> <p>(Edenharder <i>et al.</i>, 1993; 2003)</p> <p>(Romanova y Vachalkova 1999)</p> <p>(Su <i>et al.</i>, 2003)</p> <p>(Li <i>et al.</i>, 2001)</p>

**Tabla VII:** Ensayos farmacológicos realizados a Luteolina.

<sup>61</sup> NAT: Arilamina N-acetiltransferasa-

<sup>62</sup> T24: Células de cáncer de vejiga humano.

Flavonoide	Actividad ensayada	Referencia
Luteolina (cont.)	<b>Antimutagénica (cont.)</b>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incremento de actividad GST y disminución de peróxidos lipídicos y actividad citocromo P-450.</li> </ul>	(Elangovan <i>et al.</i> , 1994)
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibición síntesis de ADN en células fibrosarcoma.</li> </ul>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibición de arilamina N-acetiltransferasa en células tumorales hepáticas (J5) de forma no competitiva.</li> </ul>	(Chen <i>et al.</i> , 2000)
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibe la apoptosis inducida por actinomicina en CMK-7<sup>63</sup></li> </ul>	(Shiono <i>et al.</i> , 2002)
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No oxida al ADN formando 8-oxodG (8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina)</li> </ul>	(Yamashita y Kawanishi 2000)
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacciona con carcinógenos, evitando la disminución en la actividad de glutathion peroxidasa, disminuye el incremento de los niveles de peróxidos lipídicos en la médula ósea</li> </ul>	(Sadzuka <i>et al.</i> , 1997)
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibición de incidencia de fibrosarcoma inducido por 20-metilcholantreno en ratones.</li> </ul>	(Elangovan <i>et al.</i> , 1994)
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibición de la actividad de NAT en células humanas y de ratón. de forma no competitiva.</li> </ul>	(Li <i>et al.</i> , 2001)
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anticarcinogénica</li> </ul>	(Romanova y Vachalkova 1999)
	<b>Antioxidante:</b>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antirradicalaria</li> </ul>	(Romanova y Vachalkova 1999)
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antirradicalaria frente DPPH</li> </ul>	(Edenharder y Grunhage 2003)
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antirradicalaria frente a anion superóxido</li> </ul>	(Shiono <i>et al.</i> , 2002)
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antirradicalaria frente AAPH y radicales peroxilo.</li> </ul>	(Edenharder y Grunhage 2003)
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibición peroxidación lipídica</li> </ul>	(Romanova y Vachalkova 1999)
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibición de la peroxidación lipídica inducida por radicales hidroxilo en microsomas hepáticos de rata</li> </ul>	(Lee <i>et al.</i> , 2002c)
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibición de peroxidación lipídica dependiente e independiente de enzimas</li> </ul>	(Hohmann <i>et al.</i> , 1999)
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibición de peroxidación lipídica dependiente de NADPH</li> </ul>	(Sadzuka <i>et al.</i> , 1997)
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protección al ácido linoleico frente a la oxidación inducida por EDTA o iones férrico</li> </ul>	(Deiana <i>et al.</i> , 2003)
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sólo leve daño en el ADN en presencia de Cu II</li> </ul>	(Yamashita <i>et al.</i> , 1999)

**Tabla VII (cont.):** Ensayos farmacológicos realizados a Luteolina.

<sup>63</sup> CMK-7: leucemia megacarioblástica humana.

Flavonoide	Actividad ensayada	Referencia
Luteolina (cont.)	<b>Citotóxica</b>	
	• A431 (carcinoma epidermoide humano)	(Huang <i>et al.</i> , 1999)
	• A549 (cáncer de pulmón de células no pequeñas)	(Kawaii <i>et al.</i> , 1999a)
	• B15F10 y SK-MEL-1 ligera inhibición	(Rodríguez <i>et al.</i> , 2002)
	• B16 (melanoma)	(Kawaii <i>et al.</i> , 1999a)
	• B16 melanoma 4-A-5.	(Iwashita <i>et al.</i> , 2000)
	• B16F10 melanoma y Melan-a melanocito.	(Martinez <i>et al.</i> , 2003)
	• Caco-2 (cáncer de colon).	(Kuntz <i>et al.</i> , 1999)
	• CCRF-HSB-2 (leucemia células T)	(Kawaii <i>et al.</i> , 1999a)
	• COLO 320 (cáncer de colon)	(Woerdenbag <i>et al.</i> , 1994)
	• GLC4	(Woerdenbag <i>et al.</i> , 1994)
	• HeLa (carcinoma uterino)	(Mori <i>et al.</i> , 1988)
	• HepG2	(Lin <i>et al.</i> , 2001)
	• HL-60 (leucemia)	(Kawaii <i>et al.</i> , 1999b)
	• HT-29 (cáncer de colon)	(Kuntz <i>et al.</i> , 1999)
	• K562 y P3HR1	(Chiang <i>et al.</i> , 2003a)
	• MCF-7 (adenocarcinoma de mama)	(Fotsis <i>et al.</i> , 1997)
	• NiaPaCa-2	(Lee <i>et al.</i> , 2002b)
	• NK/Ly	(Molnar <i>et al.</i> , 1981)
	• P-388 (leucemia mieloide murino)	(Afifi <i>et al.</i> , 1993)
	• Raji (linfoma) sin involucrar reacciones de peroxidación lipídica.	(Ramanathan <i>et al.</i> , 1994)
	• SHEP	(Fotsis <i>et al.</i> , 1997)
	• TGBC11TKB (cáncer gástrico linfoide)	(Kawaii <i>et al.</i> , 1999a)
	• WAC 2	(Fotsis <i>et al.</i> , 1997)
	<b>Epidemiología</b>	
	• Alimentos ricos en luteolina y quercetina relacionados de forma inversa con riesgo de cáncer del tracto respiratorio y gastrointestinal	(Hertog <i>et al.</i> , 1994)
	• No relaciona consumo de flavonoides con prevención del cancer de vejiga.	(García <i>et al.</i> , 1999)
	• No significativo como protector frente prevención de cancer de pulmón en mujeres	(García-Closas <i>et al.</i> , 1998)
	• Disminuye riesgo de cáncer gástrico	(García-Closas <i>et al.</i> , 1999)
	<b>Genotóxica:</b>	(Popp y Schimmer 1991)
	• Ligera inducción de micronucleos en linfocitos	
	<b>Inmunoestimulante:</b>	(Pieroni <i>et al.</i> , 2000)
	• Anticomplemento <i>in vitro</i> (menos activo que luteolina-7-glucósido)	

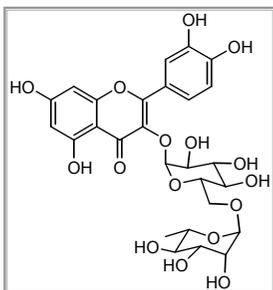
**Tabla VII (cont.):** Ensayos farmacológicos realizados a Luteolina.

Flavonoide	Actividad ensayada	Referencia
Luteolina (cont.)	<p><b>Proapoptótica:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Incrementa los niveles de p21 dependiente e independiente de p53, siendo potente regulador de la progresión del ciclo celular en LNCaP (celulas cáncer próstata humano)</li> <li>Incrementa los niveles de p53 y p21 en HepG2.</li> <li>Inducción apoptosis en NiaPaCa-2</li> <li>Ruptura de ADN y formación de complejos de rotura en HL-60.</li> <li>Inhibición de proliferación e inducción apoptosis en HL-60 (leucemia mieloide humana)</li> <li>Inhibición de síntesis de ADN en células MDA-MB-231 (independiente de estrógenos).</li> <li>Inhibición del crecimiento de células HL-60</li> </ul> <p><b>Regulación del ciclo celular e inhibición de señales mitógenas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Inducción de diferenciación celular de HL-60 a granulocitos</li> <li>Inhibe degradación de IκB</li> <li>Detención del ciclo celular en G1 y G2</li> <li>No alteración en CDK1, pero sí inhibición de CDK2</li> <li>Disminución de los niveles de CDK 4 en HepG2</li> <li>Inhibición del crecimiento y metabolismo de las líneas leucémicas CEM-C1 y C7</li> <li>Inhibe PKC en CMK-7</li> <li>Inhibición de la activación de PKC en aplicación tópica en tumores inducidos por teleocidina</li> <li>Inhibe TNF-alfa inducido por ICAM-1</li> <li>Inhibición de protein tirosina kinasa PTK responsable de la fosforilación de EGFR</li> <li>inhibición de crecimiento de tumores NK/ly (ascitos)</li> <li>Inhibidor de EGFR</li> <li>Modulación ruta EGF</li> <li>Inhibición de EGF y EGFR y de su actividad tirosin kinasa, disminuyendo los niveles de fosforilación de proteínas.</li> <li>Inhibición de la proliferación de células normales y tumorales.</li> <li>Antiproliferativa</li> </ul> <p><b>Otros mecanismos antitumorales</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibe topoisomerasa II- veneno de topoisomerasa II</li> <li>Veneno de topoisomerasa I</li> </ul>	<p>(Kobayashi <i>et al.</i>, 2002)</p> <p>(Yee <i>et al.</i>, 2003)</p> <p>(Lee <i>et al.</i>, 2002b)</p> <p>(Yamashita y Kawanishi 2000)</p> <p>(Ko <i>et al.</i>, 2002)</p> <p>(Wang y Kurzer 1997)</p> <p>(Takahashi <i>et al.</i>, 1998)</p> <p>(Takahashi <i>et al.</i>, 1998)</p> <p>(Xagorari <i>et al.</i>, 2001)</p> <p>(Matsukawa <i>et al.</i>, 1993;</p> <p>Casagrande y Darbon 2001;</p> <p>O'Prey <i>et al.</i>, 2003)</p> <p>(Casagrande y Darbon 2001)</p> <p>(Yee <i>et al.</i>, 2003)</p> <p>(Post y Varma 1992)</p> <p>(Shiono <i>et al.</i>, 2002)</p> <p>(Horiuchi <i>et al.</i>, 1986)</p> <p>(Shimoi <i>et al.</i>, 2000)</p> <p>(Lee <i>et al.</i>, 2002b)</p> <p>(Molnar <i>et al.</i>, 1981)</p> <p>(Lee <i>et al.</i>, 2002b)</p> <p>(Lee <i>et al.</i>, 2002b)</p> <p>(Huang <i>et al.</i>, 1999)</p> <p>(Fotsis <i>et al.</i>, 1998)</p> <p>(Romanova y Vachalkova 1999)</p> <p>(Yamashita y Kawanishi 2000)</p> <p>(Chowdhury <i>et al.</i>, 2002)</p>

**Tabla VII (final):** Ensayos farmacológicos realizados a Luteolina.

Flavonoide	Actividad ensayada	Referencia
Rutina	<p><b>Antiangiogénica-antimetastásica</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibición de formación de nódulos de células B16F10 (melanoma) en pulmón-antimetastásica</li> </ul> <p><b>Antiestrogénica- estrogénica</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Ligera unión a EBS</li> <li>No se une a los receptores EBS tipo II (sitio de unión del estrógeno) ni inhibe crecimiento celular de tumor pulmonar de células no pequeñas.</li> <li>No se une al EBS tipo II</li> <li>Unión a EBS tipo II e inhibición de la proliferación de HT-29, WiDr, Colo210 y LS-174T (líneas celulares colon)</li> <li>Inactivo frente al inhibición crecimiento de OVCA 433 (cancer ovario). No se une a EBS tipo II</li> <li>No efecto sobre la aromatasas</li> </ul> <p><b>Antiinflamatoria</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibición de producción de NO inducido por LPS, aunque no por inhibición de iNOS.</li> <li>No inhibe COX-2</li> </ul> <p><b>Antimutagénica</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibición de la formación de colonias de células epiteliales inducido por benzopireno.</li> <li>Protección de líneas Caco-2 y HepG2 frente al daño en el ADN inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></li> <li>Inhibe la mutagénesis por la activación de diferentes aminas heterocíclicas al inhibir citocromo p450</li> <li>Inhibe nitrorreducción y oxidorreducción de nitrofluorenos</li> <li>Activo inhibiendo la hiperproliferación y displasia y reduciendo la incidencia de tumores por azoximetanol en colon</li> <li>Inhibición dosis-dependiente de NAD(P)H:quinona reductasa</li> <li>Inhibidor de enzimas reductoras de grupos carbonilo</li> <li>No genotóxica mediante ensayo Ames o intercambio de cromátidas</li> <li>No activo como inhibidor de inducción de tumores por EBV.EA y TPA en células Raji</li> <li>No activo frente a la prevención de inducción de tumores en ratones mutados que desarrollan adenomas intestinales</li> <li>No activo frente a la protección de células Caco.2 frente al daño oxidativo en el ADN</li> <li>No afecta a las enzimas catalasas y SOD in vito y no induce daño en el ADN en las líneas Caco-2 y Hep G2. No citotóxico. Protege frente al ataque al ADN con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></li> </ul>	<p>(Menon <i>et al.</i>, 1995)</p> <p>(Larocca <i>et al.</i>, 1990) (Caltagirone <i>et al.</i>, 1997)</p> <p>(Scambia <i>et al.</i>, 1990a) (Ranelletti <i>et al.</i>, 1992)</p> <p>(Scambia <i>et al.</i>, 1990b)</p> <p>(Campbell y Kurzer 1993)</p> <p>(Chen <i>et al.</i>, 2001)</p> <p>(Steele <i>et al.</i>, 1990) (O'Brien <i>et al.</i>, 2000) (Bear y Teel 2000)</p> <p>(Ritter <i>et al.</i>, 2000) (Deschner <i>et al.</i>, 1993)</p> <p>(Merk y Jugert 1991) (Iffert <i>et al.</i>, 2000) (Rueff <i>et al.</i>, 1986) (Okamoto <i>et al.</i>, 1983) (Mahmoud <i>et al.</i>, 2000)</p> <p>(Duthie y Dobson 1999) (Aherne y O'Brien 1999)</p>

**Tabla VIII :** Ensayos farmacológicos realizados a Rutina.



Flavonoide	Actividad ensayada	Referencia
Rutina (cont.)	<p><b>Antimutagénica (cont.)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• No carcinogénico en ratas ACI</li> <li>• No carcinogénico in vivo (ratas) en forma de sal (sulfato)</li> <li>• No contrarresta los efectos antiapoptóticos de IGF-1</li> <li>• No afecta al índice mitótico en promoción de tumores inducido por azoximetano.</li> <li>• Previene promoción tumores por haemina y hemoglobina en cáncer de colon</li> <li>• Se incrementa los tumores en colon inducidos por azoximetano</li> <li>• Incrementa el foci GST-P (preneoplasico glutation S transferasa placentaria)</li> </ul> <p><b>Antioxidante</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• antirradicalario (donante de protones)</li> <li>• Inhibición de la oxidación en cadena de metil linoleato</li> <li>• Antirradicalaria frente ROO (alquilperoxil radical)</li> <li>• Quelante: Reacciona con Cu(II) y Fe(III)</li> </ul> <p><b>Citotóxica:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Débil actividad citotóxica frente a línea leucémica (AML) en humanos</li> <li>• Poco activo frente a la inhibición crecimiento en línea AT6.3 (línea de próstata de rata)</li> <li>• Caco-2</li> <li>• HT-29</li> <li>• MMLV RT</li> <li>• NK/Ly</li> <li>• Inhibición crecimiento frente NK/Ly ascitos</li> <li>• Inhibe débilmente el crecimiento de línea PC-3 (próstata humano independiente de andrógenos)</li> </ul> <p><b>Proapoptótica:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Incrementa el índice apoptótico en células colónicas tratadas con azoximetno, disminución de zonas displasia y incrementa expresión ciclina D1 in vivo</li> <li>• Incrementa el número y tamaño de tumores de B16 melanoma en ratones, incrementa metástasis e inhibe la formación de melanina</li> <li>• No Incrementa la apoptosis causando despolarización mitocondrial y liberación de citocromo c activándose las caspasas en cáncer pancreático</li> <li>• Inducción de apoptosis en LNCaP</li> </ul>	<p>(Hirono <i>et al.</i>, 1981)</p> <p>(Habs <i>et al.</i>, 1984)</p> <p>(Wang <i>et al.</i>, 2003)</p> <p>(Tao <i>et al.</i>, 2002)</p> <p>(Pierre <i>et al.</i>, 2003)</p> <p>(Tao <i>et al.</i>, 2002)</p> <p>(1999a; Hirose <i>et al.</i>, 1999b)</p> <p>(López-Vélez <i>et al.</i>, 2003)</p> <p>(Roginsky, 2003)</p> <p>(Sawa <i>et al.</i>, 1999)</p> <p>(Kuo <i>et al.</i>, 1998)</p> <p>(Larocca <i>et al.</i>, 1990)</p> <p>(Wang <i>et al.</i>, 2003)</p> <p>(Kuntz <i>et al.</i>, 1999)</p> <p>(Kuntz <i>et al.</i>, 1999)</p> <p>[22]</p> <p>(Molnar <i>et al.</i>, 1981)</p> <p>(Knowles <i>et al.</i>, 2000)</p> <p>(Yang <i>et al.</i>, 2000)</p> <p>(Drewa <i>et al.</i>, 1998)</p> <p>(Mouria <i>et al.</i>, 2002)</p> <p>(Romero <i>et al.</i>, 2002)</p>

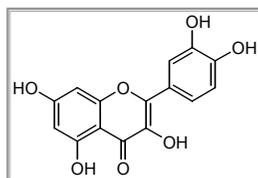
**Tabla VIII (cont.):** Ensayos farmacológicos realizados a Rutina.

Flavonoide	Actividad ensayada	Referencia
Rutina (cont.)	<p><b>Regulación del ciclo celular e inhibición de señales mitógenas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibición neoplasia inducida por AOM y reducción de fase S (Deschner <i>et al.</i>, 1991)</li> <li>• No inhibe el transporte de lactato en células HeLa sensibilizadas hipertérmicamente (Kim <i>et al.</i>, 1984)</li> </ul> <p><b>Coadyuvante en quimioterapia y en multirresistencias</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibe la degradación de daunorubicina (Iffert <i>et al.</i>, 2000)</li> <li>• No disminuye el daño celular en LLC-PK1 (células tubulares epiteliales) por cisplatino (Kuhlmann <i>et al.</i>, 1998)</li> <li>• No efecto inhibitorio incorporación de bromodeoxiuridina en células TCC (carcinoma transicional) (Larocca <i>et al.</i>, 1990)</li> <li>• No efecto sinérgico con citosina arabinósido frente a HL-60, CFU-L (formación de colonias leucémicas) (Teofili <i>et al.</i>, 1992)</li> <li>• No inhibición de la actividad de la bomba p-glicoproteína (Scambia <i>et al.</i>, 1994)</li> <li>• Unión a P-glicoproteína (relacionada con multirresistencias) (Conseil <i>et al.</i>, 1998)</li> </ul>	

**Tabla VIII (cont.):** Ensayos farmacológicos realizados a Rutina.

Flavonoide	Actividad ensayada	Referencia
Quercetina	<p><b>Antiangiogénica y antimetastásica</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibe proliferación celular, la expresión de MMP-9 a través de NF-kB y AP-1</li> <li>No Inhibición de formación de nódulos de células B16F10 (melanoma) en pulmón- no antimetastásica</li> <li>Activo inhibiendo la hiperproliferación y displasia y reduciendo la incidencia de tumores por azoximetanol en colon</li> </ul> <p><b>Antiestrogénica-Estrogénica</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>No efecto sobre la aromatasa</li> <li>No se une a los receptores EBS tipo II (sitio de unión del estrógeno) ni inhibe crecimiento celular de tumor pulmonar de células no pequeñas.</li> <li>Unión a EBS tipo II e inhibición de la proliferación de HT-29, WiDr, Colo210 y LS-174T (líneas celulares colon)</li> <li>Ligera unión a EBS</li> <li>Inhibición crecimiento de OVCA 433 (cancer ovario).</li> <li>Detiene ciclo celular en GO/G1 Se une a EBS tipo II</li> <li>Citotoxicidad frente a línea leucémica (AML, ALL) en humanos mediante inhibición proliferación de blastos leucémicos por un mecanismo que involucra unión con EBS tipo II</li> </ul> <p><b>Antiinflamatoria</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibición de producción de NO inducido por LPS, aunque no por inhibición de iNOS.</li> <li>No inhibe COX-2</li> </ul> <p><b>Antimutagénica</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Protección de líneas Caco-2 y HepG2 frente al daño en el ADN inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></li> <li>No afecta al índice mitótico en promoción de tumores inducido por azoximetano.</li> <li>No afecta al número de tumores en colon inducidos por azoximetano</li> <li>No activo frente a la prevención de inducción de tumores en ratones mutados que desarrollan adenomas intestinales</li> <li>No afecta a las enzimas catalasas y SOD in vitro y no induce daño en el ADN en las líneas Caco-2 y Hep G2. No citotóxico. Protege frente al ataque al ADN con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></li> <li>Incrementa el foci GST-P (preneoplásico glutation S transferasa placentaria)</li> </ul>	<p>(Moon <i>et al.</i>, 2003)</p> <p>(Menon <i>et al.</i>, 1995)</p> <p>(Deschner <i>et al.</i>, 1993)</p> <p>(Campbell y Kurzer 1993)</p> <p>(Caltagirone <i>et al.</i>, 1997)</p> <p>(Ranelletti <i>et al.</i>, 1992)</p> <p>(Larocca <i>et al.</i>, 1990)</p> <p>(Scambia <i>et al.</i>, 1990a)</p> <p>(Larocca <i>et al.</i>, 1990)</p> <p>(Chen <i>et al.</i>, 2001)</p> <p>(O'Brien <i>et al.</i>, 2000)</p> <p>(Tao <i>et al.</i>, 2002)</p> <p>(Tao <i>et al.</i>, 2002)</p> <p>(Mahmoud <i>et al.</i>, 2000)</p> <p>(Aherne y O'Brien 1999)</p> <p>(Hirose <i>et al.</i>, 1999a; Hirose <i>et al.</i>, )</p>

**Tabla IX :** Ensayos farmacológicos realizados a Quercetina.



Flavonoide	Actividad ensayada	Referencia
Quercetina (cont.)	<p><b>Antimutagénica (cont.):</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Protección de células Caco.2 frente al daño oxidativo en el ADN. Desciende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Inhibe las roturas en la cadena de ADN.</li> <li>• Activo como inhibidor de la formación de colonias de células epiteliales inducido por benzopireno.</li> <li>• Incrementa mutagenicidad en presencia de enzimas microsomales pero disminuye genotoxicidad y formación de cromátidas hermanas en presencia de enzimas hepáticas.</li> <li>• Activo como inhibición de inducción de tumores por EBV.EA y TPA en células Raji</li> <li>• No carcinogénico en ratas ACI</li> <li>• Inhibición de AT6-3 (carcinoma de próstata de rata). Contrarresta efecto antiapoptótico de IGF-1. Reduce sustrato IRS-1, involucrando ruta de tirosin kinasa</li> </ul> <p><b>Antioxidante</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Antirradicalario (donante de protones)</li> <li>• Antirradicalaria frente superóxido pero a dosis altas no afecta a peroxidación lipídica</li> <li>• Inhibición de la oxidación en cadena de metil linoleato</li> <li>• Quelante: Reacciona con Cu(II) y Fe(III)</li> </ul> <p><b>Proapoptótica</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inducción de apoptosis en LNCaP</li> <li>• Incrementa la apoptosis causando despolarización mitocondrial y liberación de citocromo c activándose las caspasas en cáncer pancreático</li> <li>• Incrementa el índice apoptótico en células colónicas tratadas con azoximetno, disminución de zonas displasa y incrementa expresión ciclina D1 in vivo</li> </ul> <p><b>Citotóxica</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• A549</li> <li>• A549</li> <li>• B16</li> <li>• Caco-2</li> <li>• CCRF-HSB-2</li> <li>• CO-K3</li> <li>• COLO 320</li> <li>• COLO-201</li> </ul>	<p>(Duthie y Dobson 1999)</p> <p>(Steele <i>et al.</i>, 1990)</p> <p>(Rueff <i>et al.</i>, 1986)</p> <p>(Okamoto <i>et al.</i>, 1983)</p> <p>(Hirono <i>et al.</i>, 1981)</p> <p>(Wang <i>et al.</i>, 2003)</p> <p>(López-Vélez <i>et al.</i>, 2003)</p> <p>(Ramanathan <i>et al.</i>, 1994)</p> <p>(Roginsky, 2003)</p> <p>(Kuo <i>et al.</i>, 1998)</p> <p>(Romero <i>et al.</i>, 2002)</p> <p>(Mouria <i>et al.</i>, 2002)</p> <p>(Yang <i>et al.</i>, 2000)</p> <p>(Caltagirone <i>et al.</i>, 1997)</p> <p>(Kawaii <i>et al.</i>, 1999a)</p> <p>(Kawaii <i>et al.</i>, 1999a)</p> <p>(Kuntz <i>et al.</i>, 1999)</p> <p>(Kawaii <i>et al.</i>, 1999a)</p> <p>(Ferrandina <i>et al.</i>, 1998)</p> <p>(Woerdenbag <i>et al.</i>, 1994)</p> <p>(Ranelletti <i>et al.</i>, 1992)</p>

**Tabla IX (cont.):** Ensayos farmacológicos realizados a Quercetina.

Flavonoide	Actividad ensayada	Referencia
Quercetina (cont.)	<b>Citotóxica (cont.)</b>	
	• COLO-320 DM	(Hosokawa et al., 1990)
	• ChaGo-K-1	(Caltagirone et al., 1997)
	• GCL4	(Woerdenbag et al., 1994)
	• H441	(Caltagirone et al., 1997)
	• H661	(Caltagirone et al., 1997)
	• HCT-15	(Kamei et al., 1996)
	• HeLa	(Mori et al., 1988)
	• HL-60	(Kawaii et al., 1999b)
	• HT-29	(Ranelletti et al., 1992)
	• HTB-43	(Kandaswami et al., 1992)
	• HuCC-T1	(Yanoshita et al., 1996)
	• KB	(Edwards, 1979)
	• LS-174T	(Ranelletti et al., 1992)
	• MCF-7	(Fotsis et al., 1997)
	• MCF-7	(So et al., 1997)
	• MDA-MB-435	(Singhal et al., 1995)
	• MMLV RT	(chu et al., 1992)
	• NCI-60	(Beutler et al., 1998)
	• NCI-60	(Beutler et al., 1998)
	• NK/Ly	(Molnar et al., 1981)
	• OVCA-433	(Scambia et al., 1990a)
	• OVCAR-5	(1998b)
	• PC-3 (próstata humano independiente de andrógenos). No apoptosis	(Knowles et al., 2000)
	• Raji (linfoma).	(Ramanathan et al., 1994)
	• SCC-25	(ElAttar y Virji 1999)
	• SHEP	(Fotsis et al., 1997)
	• SK-Lu1	(Caltagirone et al., 1997)
	• SK-MEL -28	(1998a)
	• SW-900	(Caltagirone et al., 1997)
	• TGBC11TKB	(Kawaii et al., 1999a)
	• WA	(Edwards, 1979)
	• WAC 2	(Fotsis et al., 1997)
	• WiDr	(Ranelletti et al., 1992)

**Tabla IX (cont.):** Ensayos farmacológicos realizados a Quercetina.

Flavonoide	Actividad ensayada	Referencia
Quercetina (cont.)	<p><b>Regulación del ciclo celular e inhibición de señales mitógenas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibe el transporte de lactato en células HeLa sensibilizadas hipertérmicamente (Kim <i>et al.</i>, 1984)</li> <li>• Inhibición crecimiento frente NK/Ly ascitos (Molnar <i>et al.</i>, 1981)</li> <li>• Inhibición de actividad NF-kB (Mouria <i>et al.</i>, 2002)</li> <li>• Detención del ciclo celular en G2 (O'Prey <i>et al.</i>, 2003)</li> <li>• Inhibición neoplasia inducida por AOM y reducción de fase S (Deschner <i>et al.</i>, 1991)</li> <li>• inhibición de kinasas del ciclo celular y detención del ciclo celular en G1 (Moon <i>et al.</i>, 2003)</li> </ul> <p><b>Coadyuvante en quimioterapia y en multirresistencias</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Efecto sinérgico con resveratrol induciendo apoptosis (Mouria <i>et al.</i>, 2002)</li> <li>• Incrementa la susceptibilidad de los riñones a la toxicidad por cisplatino. Disminuye el daño celular en LLC-PK1 (células tubulares epiteliales) por cisplatino (Kuhlmann <i>et al.</i>, 1998)</li> <li>• unión a P-glicoproteína (relacionada con multirresistencias) (Conseil <i>et al.</i>, 1998)</li> <li>• Efecto sinérgico con citosina arabinósido frente a HL-60, CFU-L (formación de colonias leucémicas) (Teofili <i>et al.</i>, 1992)</li> <li>• Efecto sinérgico con adriamicina en MCF-7 resistente a Adrioanmicina inhibiendo bomba P-glicoproteína (Scambia <i>et al.</i>, 1994)</li> <li>• Efecto sinérgico con cisplatino en OVCA 433 actuando por EBS (Scambia <i>et al.</i>, 1990b)</li> </ul>	

**Tabla IX (cont. y final) : Ensayos farmacológicos realizados a Quercetina.**

### **II.3. CARCINOGENÉNESIS Y QUIMIOPREVENCIÓN**

#### **CARCINOGENÉNESIS**

El desarrollo del cáncer en el hombre implica una compleja sucesión de diferentes fenómenos a lo largo de los años, incluso décadas. Durante este largo proceso, el genoma de las incipientes células cancerosas va adquiriendo mutaciones en los proto-oncogenes, genes supresores de tumores, y otros genes que controlan, directa o indirectamente, la proliferación celular. Un sucesivo incremento del número de estos genes contribuye a que se desencadenen las diferentes etapas involucradas en la transformación neoplásica (Hahn y Weinberg 2002).

La patogénesis del cáncer en el hombre está regida por un conjunto de reglas genéticas y bioquímicas y ambientales aplicable a la mayoría de los tumores, compartiendo una serie de características (Hanahan y Weinberg 2000), que se pueden resumir en:

- Capacidad de las células para generar sus propias señales mitógenas.
- Resistir a las señales exógenas de inhibición del crecimiento.
- Evadir la apoptosis.
- Proliferar sin control (inmortalización).
- Generar nueva vasculatura (angiogénesis).
- Invasión y metástasis.

A éstas, se le puede añadir una característica adicional, la inestabilidad genética, hecho que conduce al resto de las características citadas.

La formación de mutaciones, en condiciones normales, es baja, pero, se incrementa cuando, los genes y proteínas que detectan y reparan el daño en el ADN están inactivados. Además, los mecanismos celulares, como apoptosis, que eliminan las células que sufren alteraciones en el ADN, están inhibidos en las células tumorales. El resultado es la supervivencia de las células mutadas y el posible sobrecrecimiento de una gran población con estas mutaciones.

Todos estos factores conducen a una alteración en la regulación de las rutas enzimáticas involucradas en el funcionamiento de las células normales. Además, esta regulación puede ser inhibida por un amplio número de alteraciones genéticas y epigenéticas. Por tanto, podría decirse que el cáncer se debe a la acumulación de mutaciones resultantes de los errores de la replicación del ADN así como de mutaciones debida a una exposición prolongada de sustancias endo y exógenas que dañan al ADN.

No todos los cánceres en un determinado tejido tienen las mismas lesiones moleculares. La progresión, además, puede estar influenciada por factores específicos al ambiente del hospedador. Diferentes especies, diferentes tipos celulares e incluso mismo tipo de células dentro de un determinado individuo, pueden reaccionar de diferente forma ante el mismo carcinógeno.

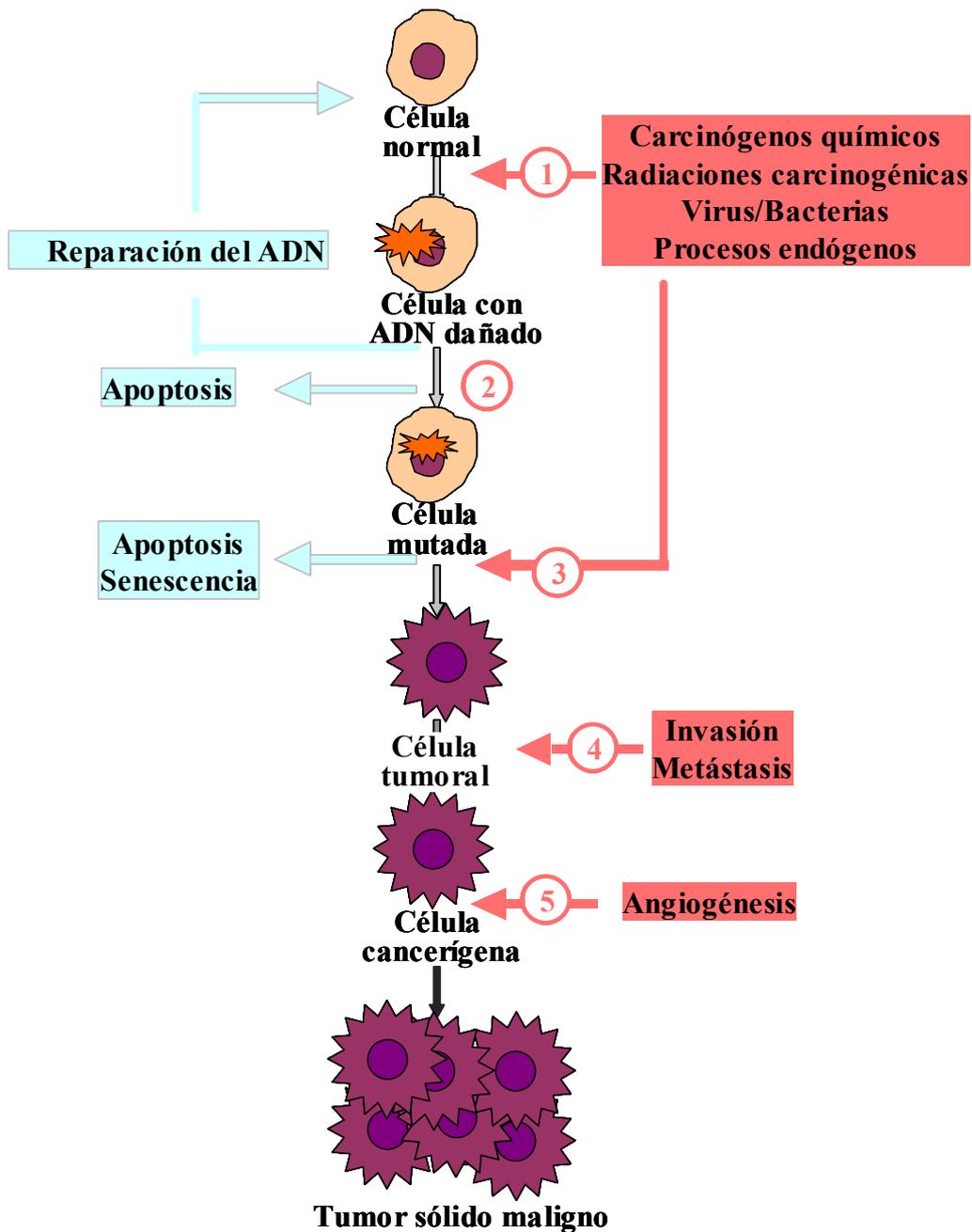


Figura 4: Etapas de transformación de una célula normal a tumor sólido maligno.

A continuación, vamos a ir deteniéndonos en algunos de estas etapas.

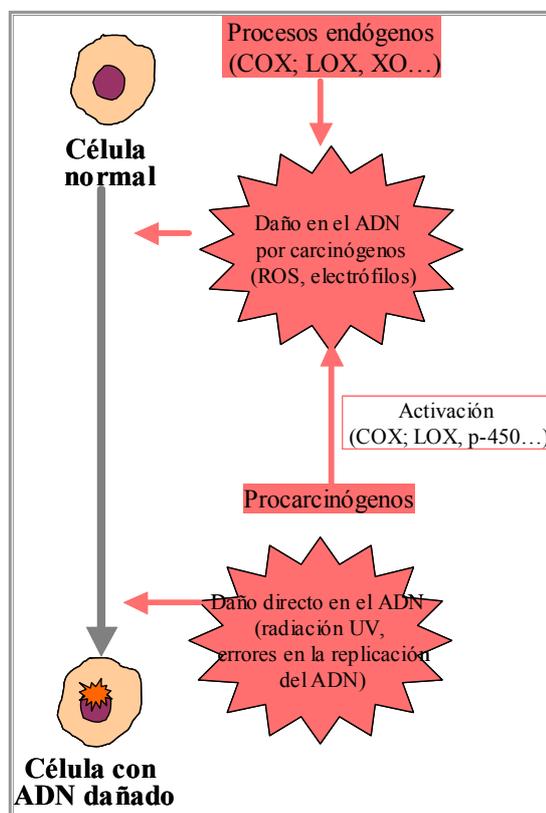
### -1. Transformación de célula normal a célula con daño en el ADN.

#### a) Formación y activación de carcinógenos.

La formación de carcinógenos puede ser tanto exógena como endógena, debido al metabolismo normal celular.

El NCI dicta unas características a tener en cuenta para los carcinógenos:

- 1.- Un carcinógeno químico no debe ser considerado siempre como mutágeno, ya que pueden ser carcinógenos no genotóxicos.
- 2.- Si el carcinógeno es de tipo genotóxico, puede tener ambos efectos, genético y epigenético.
- 3.- Puede tener relación dosis-respuesta lineal o no lineal, con respecto a la formación del tumor.



Los carcinógenos pueden clasificarse en:

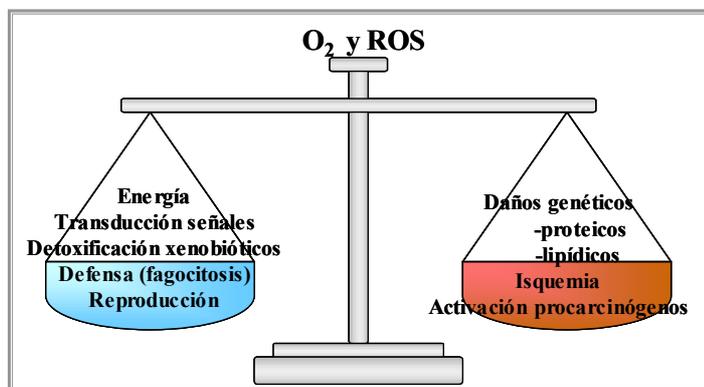
- Químicos, que, mediante su metabolización por enzimas de fase I (p-450), generan metabolitos electrofílicos<sup>64</sup> y radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ROS), que interaccionan con el ADN.
- Radiaciones, que provocan roturas en el ADN.
- Virus y bacterias, al introducir material genético en el ADN de la célula o mediante la generación de metabolitos electrofílicos.
- Procesos endógenos, donde se generan sustancias electrofílicas y ROS.

<sup>64</sup> **Electrofílico:** Deficiente en electrones.

Muchas sustancias químicas son procarcinógenos, es decir, son inocuas hasta que sufren una activación metabólica por enzimas endógenas del organismo, como el sistema de citocromo P-450 y otras enzimas de fase I, iniciando su efecto carcinogénico.

Como hemos visto, diferentes procesos endógenos, generan ROS y otros metabolitos altamente reactivos. Los ROS podrían definirse como moléculas o iones que contienen un electrón desapareado, siendo altamente reactivos y pudiendo permanecer estables en el medio. La mayor fuente de radicales en sistemas biológicos es el oxígeno molecular, que mediante reducción asociada a la cadena electrónica de la mitocondria y otras actividades enzimáticas, genera anión superóxido ( $O_2^-$ ) y peróxido ( $H_2O_2$ ). Éstos, a su vez, reaccionan con metales generando radicales hidroxilo ( $OH^-$ ).

Los ROS, una vez formados, en condiciones normales, intervienen en mecanismos de defensa, entre otras funciones, pero, la sobreproducción o el fallo en su captura y eliminación, puede desencadenar en que reaccionen de forma radicalaria, con diferentes moléculas biológicas, como lípidos, proteínas..., que a su vez, generarán nuevos radicales libres.



Además, también se producen especies reactivas de nitrógeno, y óxido nitrosilo, que ejerce efectos directos, e indirectos, como nitrosificación, oxidaciones que desencadenan roturas en el ADN, peroxidación lipídica...

Un sistema que contribuye en gran medida a la generación de ROS, junto con los neutrófilos y macrófagos, son las enzimas involucradas en procesos inflamatorios, como las ciclooxigenasas o la 5-lipooxigenasa, que a partir del ácido araquidónico (AA) sintetizan prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX), leucotrienos (LT) y ácidos hidroxi-eicosatetraenoico (HETE). Además, en las células tumorales, debido a la pérdida de la regulación enzimática, los niveles de estas enzimas también están incrementados.

**b) Inducción de daño en el ADN.**

Todos estos carcinógenos anteriormente mencionados, van a reaccionar con el ADN, dañándolo, generando diferentes alteraciones en las bases de ADN, en la estructura de doble hélice y en cromosomas, como despurinización o desaminación, formación de aductos oxi por ROS, hipometilación del ADN, rotura de cadenas por daño oxidativo  $\Rightarrow$  reorganización de los cromosomas y deleciones, translocación de bases, amplificación de genes, mutaciones puntuales... y además, sufrirá mayor número de errores en la replicación del ADN: Mutaciones en la enzima ADN polimerasa, fallos en la enzima recombinasa, alteración en los telómeros, fallos en las topoisomerasas I y II.

El mantenimiento de los telómeros, secuencias que constituyen los extremos de los cromosomas, parece ser un factor importante en la formación de la mayoría de los tumores (Harley *et al.*, 1994; DePinho, 2000; Hahn, 2001). Este hecho es un requisito para que las células proliferen de forma indefinida. La enzima encargada de extender los telómeros es la telomerasa, cuya expresión está inhibida en la mayoría de las células normales y que se reactivan en las células tumorales (Kim *et al.*, 1994; Bryan *et al.*, 1997), que tiene por objetivo extender los telómeros evitando la sucesiva reducción de los cromosomas y la consecuente pérdida de información genética.

**-2. Transformación de célula con daño en el ADN a célula mutada.**

**a) Fallos en la reparación del ADN**

Además, la célula también puede sufrir alteraciones en los sistemas enzimáticos encargados de la reparación del ADN, como la enzima alquildeoxiguanina-DNA alquiltransferasa, que repara los daños de alquilación de O<sup>6</sup>-deoxiguanosina, mutaciones en las topoisomerasas.

**b) Evasión de la apoptosis.**

En condiciones normales, las células que sufren daño en el ADN, si no es reparado por los sistemas enzimáticos, cae en la apoptosis (muerte celular programada). Este proceso está activado por diferentes factores, como radiaciones, radicales libres...y regulado por los genes supresores, destacando p53. En células normales, la proteína p53 codificada a partir de este gen, es responsable de detener de forma temporal, el ciclo celular hasta que el daño es reparado. Si esto no sucede, p53 conduce a la célula hacia la apoptosis (Jacks y Weinberg 1996; Levine, 1997; Lowe, 1999). Las células que hayan sufrido mutaciones en este gen, sufrirán alteraciones en la proteína p53, y, por tanto, evadirán la apoptosis, convirtiéndose en inmortales con daños no reparados en el ADN.

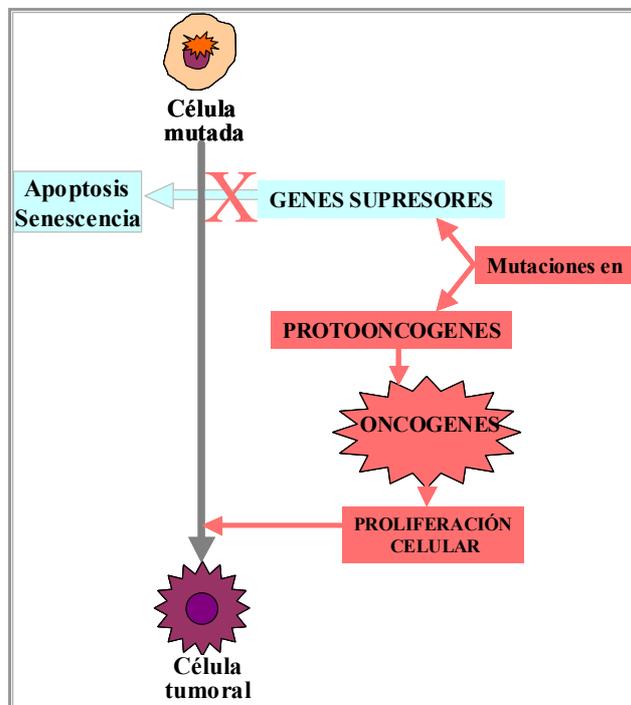
### -3. Transformación de una célula mutada a célula tumoral.

Una sola mutación no conlleva a que una célula se transforme en tumoral. Para que así sea, han de acumularse múltiples mutaciones (que es el daño en el ADN que se ha propagado, mediante la división celular, a la célula hija) Los carcinógenos, por tanto, van a seguir actuando a este nivel, originando más daños genéticos. Las células pueden sufrir mutaciones en genes reguladores de la proliferación celular, haciendo que la célula siga su ciclo celular de forma independiente a las señales y enzimas reguladoras.

#### a) Capacidad para generar las propias señales mitógenas.

La proliferación de las células normales depende de la presencia de factores de crecimiento en el medio; en ausencia de éstos, las células no proliferan. Sin embargo, las células tumorales, no dependen de estos estímulos externos, sino que se hacen independientes mediante la activación de oncogenes que generan sus propias señales mutagénicas (Hunter, 1991; McCormick, 1999).

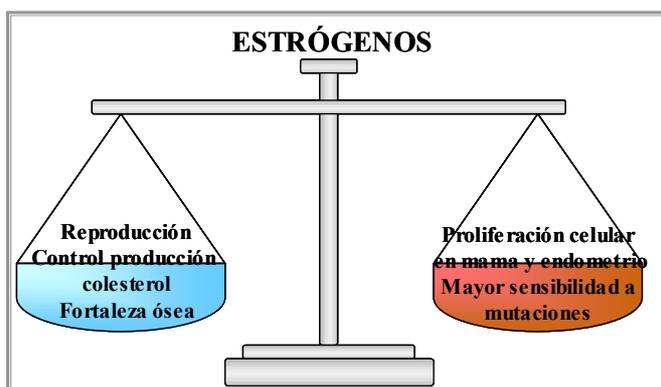
Los oncogenes son genes encargados de la regulación del crecimiento (protooncogenes) mutados (Bishop y Weinberg 1996). Entre ellos, destacan *myc* y *Ras* (detectándose en una elevada prevalencia en diferentes tipos de tumores). De esta forma, uniéndolo a que los genes supresores de tumores y la apoptosis están inhibidos, las células mutadas van a proliferar de manera incontrolada.



Además, hay moléculas, como es el caso de los estrógenos, que no van a afectar al ADN de forma directa, sino que, van a activar, de forma indirecta, a mecanismos de proliferación celular. Los estrógenos son una familia de moléculas relacionadas entre sí (esteroides) que afectan al crecimiento, diferenciación y desarrollo de los tejidos reproductores, incluyendo útero, vagina, glándulas mamarias en mujeres y testículos, epidídimo y próstata en hombre, y que ejercen su efecto mediante la unión de receptores estrogénicos, que residen en el núcleo de la célula.

En ausencia de estrógenos, estos receptores están inactivos y no ejercen influencia sobre el ADN. Pero, cuando una molécula estrogénica llega a la célula, se une al receptor, que se localiza en el núcleo, activándose más genes involucrados en procesos de crecimiento y proliferación celular (Enmark y Gustafsson 1999; Osborne *et al.*, 2000; Klinge, 2000; Ali y Coombes 2002).

Los efectos que desencadenan los estrógenos van a ser beneficiosos por un lado, al programar al tejido mamario y útero para la reproducción sexual, controlar la producción de colesterol, o preservar la fortaleza ósea, por lo que se utilizan en clínica como terapia hormonal, para prevenir y tratar los síntomas posmenopáusicos y el control de la ovulación y natalidad.



Pero, también estos efectos pueden ser dañinos, al tener, como efecto principal, el originar crecimiento y división celular, estimulando la proliferación celular sobre todo, en mama y endometrio. Además, se ha visto que los estrógenos pueden estimular la proliferación de las células mutadas, aumentando la población de células tumorales, así como que las células, expuestas a estrógenos, son más vulnerables a mutaciones espontáneas, considerándose entonces a los estrógenos también como “iniciadores” del tumor. Además, se ha detectado que en determinados tipos de tumores, se ha activado la enzima aromatasa, que sintetiza más estrógenos a partir de andrógenos.

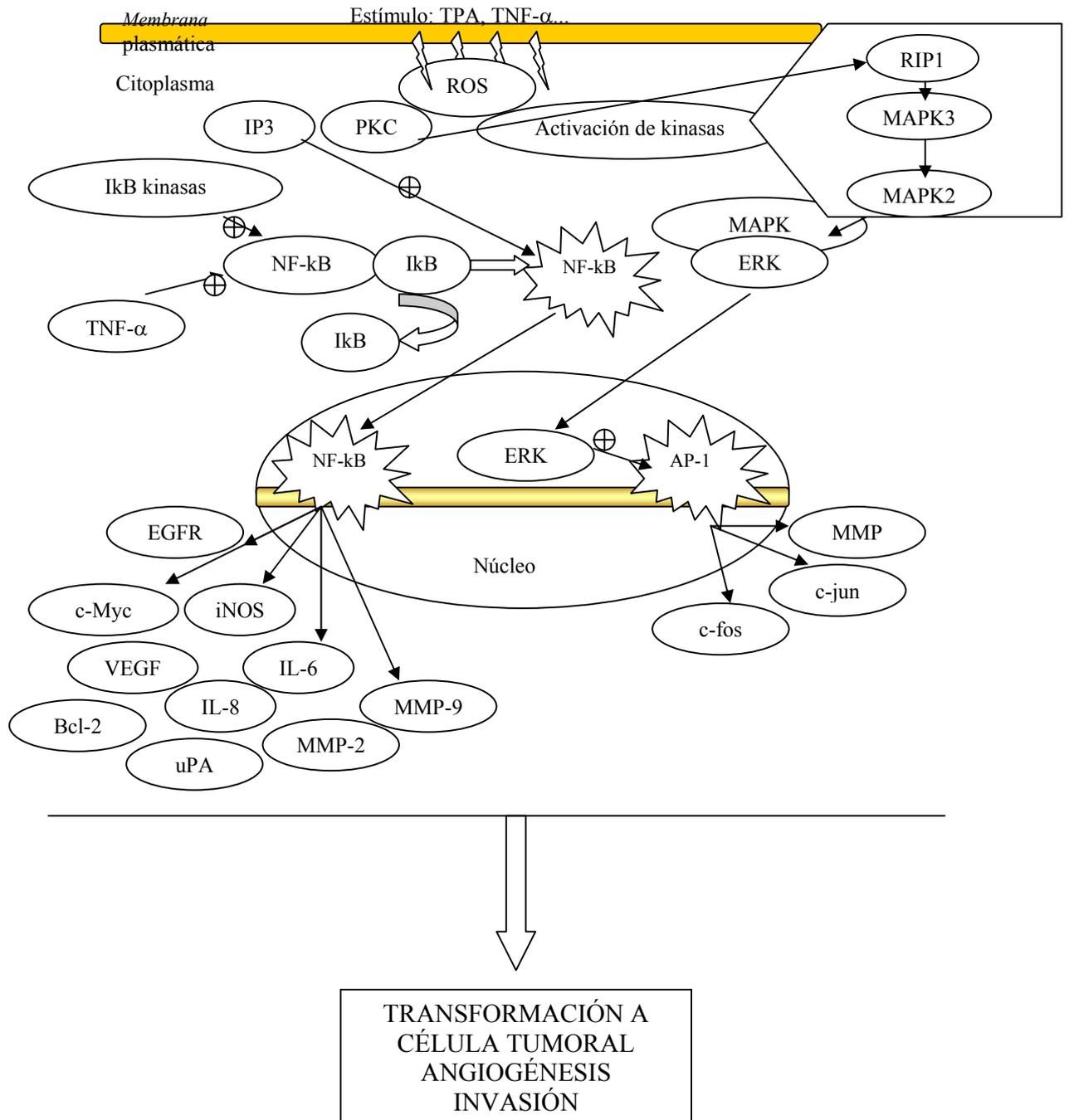
#### **-4. Transformación de célula tumoral a cancerígena: Invasión y metástasis.**

Los tumores malignos se caracterizan por ser invasivos y producir metástasis a distancia del tumor primitivo. La expansión del tumor y diseminación a lugares distantes requiere de la secreción de enzimas destructivas que degraden la matriz extracelular, como proteasas (uroquinasas, cathepsinas, y metaloproteinasas) (MMP), colagenasas, estromelinas, gelatinasas. Estas enzimas pueden a su vez activarse por otras señales celulares.

**-5. Formación del tumor sólido a partir de células cancerígenas: Angiogénesis.**

Los tumores necesitan oxígeno y nutrientes. Los tumores incipientes no pueden crecer más de 2-3 mm, a menos que puedan acceder al sistema circulatorio (Folkman, 1992; Hanahan y Folkman 1996). Esto, lo consiguen mediante su capacidad para liberar señales angiogénicas, que atraen y estimulan a las células endoteliales, que conlleva a la construcción de capilares en la masa tumoral, que van a conectar directamente con el sistema circulatorio, proporcionando los nutrientes y el oxígeno necesario para el tumor, y facilitando la eliminación de sus metabolitos.

Todos los tumores sólidos consiguen la apoptosis secretando factores proangiogénicos, principalmente, el factor de crecimiento endotelial o factor de crecimiento de fibroblastos, y mediante la disminución de la expresión de las proteínas antiangiogénicas, como trombospondina-1 (Hanahan y Folkman 1996; Fidler *et al.*, 2000). Sin embargo este proceso es mucho más complejo, e implica un amplio número de proteínas, aún por conocer.



**Figura 5 :** Ejemplo de algunos de los posibles mecanismos moleculares implicados en la transformación de una célula tumoral por acción de carcinógenos y ROS

## **QUIMIOPREVENCIÓN**

En términos generales, podríamos decir que la quimioprevención es el uso de agentes para disminuir la progresión, revertir o inhibir el proceso de carcinogénesis, esto es, para disminuir el riesgo de desarrollo de enfermedad invasiva o clínicamente significativa (Kelloff, 1999). Los pioneros de esta idea, durante los 60 y 70 fueron el Dr. Wattenberg y colaboradores, como el Dr. Kelloff, que introdujeron este nuevo concepto debido a que, a pesar de la radio y quimioterapia y las intervenciones, la incidencia y la morbilidad de cáncer se incrementaba anualmente. Ellos demostraron que, algunos compuestos, especialmente aquellos relacionados con frutas y verduras, podían inhibir la inducción de tumores por agentes carcinogénicos en animales, creando el término “quimioprofilaxis” de la carcinogénesis, Wattenberg, en 1966 ya clasificó los agentes que podrían ser útiles para la inhibición de la carcinogénesis (Wattenberg, 1966):

- Compuestos que inducen un incremento en los sistemas de detoxificación de carcinógenos (hidrocarburos policíclicos, grupos azo y aminas aromáticas). Estos compuestos pueden ser: fenotiacina y derivados, flavonas, isoflavonas, 2-fenil benzotiazol...
- Compuestos con estructuras similares a los carcinógenos y pueden originar inhibición de la carcinogénesis por procesos competitivos.
- Compuestos que inhiben la fase de iniciación de carcinogénesis. (inhibición de síntesis de ADN y ARN).
- Compuestos anticarcinogénicos de mecanismo desconocido.

Más tarde, el Dr. Kelloff y colaboradores definirían la quimioprevención como la intervención con agentes específicos para prevenir, inhibir o revertir la carcinogénesis antes de la malignidad. Dr Sporn, en 1976, acuñó el término “quimioprevención” para redefinir este hecho, considerándola como la disciplina en oncología que contempla el uso de fármacos, sustancias biológicas o nutrientes para inhibir, disminuir o revertir la carcinogénesis, y que pueden ser aplicados en cualquier momento del proceso carcinogénico antes de que decaiga en una enfermedad invasiva. Para Sharma, incluye el tratamiento a pacientes que han superado con éxito el tratamiento de un tumor maligno primario pero que están con riesgo de un segundo.

Como podemos apreciar, todos los autores coinciden en el empleo de sustancias para revertir la carcinogénesis. Lo que les diferencia es en la delimitación entre cuándo una sustancia deja de ser quimiopreventiva a pasar a terapéutica, pero lo que sí tienen en común es la necesidad de conocer los procesos de carcinogénesis para buscar formas de evitarla.

En la década 1970-80, el NCI (Instituto Nacional del Cáncer) creó el “Laboratorio de Quimioprevención”, que se volcó a investigar los retinoides. En 1982, debido a los prometedores resultados obtenidos, se estableció un “Programa de Quimioprevención”, por esta misma institución, para identificar y evaluar la eficacia de micronutrientes, compuestos naturales y fármacos, capaces de reducir la incidencia de cáncer.

El desarrollo y práctica de la quimioprevención, requiere una base científica multidisciplinar, en la que se pueden incluir la Biología Molecular y Celular, Genética, Carcinogénesis experimental, que pueden explicar los potenciales mecanismos de quimioprevención, Patología, que describirá los cambios fenotípicos, que marcará la progresión del cáncer y que definirán puntos de lesiones precancerosas donde podrán actuar agentes quimiopreventivos, Epidemiología, Farmacología, Toxicología, Química y Medicina. El NCI ha agrupado estas ciencias en dos bloques, el primero comprende los resultados epidemiológicos y el segundo, la investigación básica en el laboratorio, para desarrollar agentes candidatos y emplearlos en ensayos clínicos humanos.

Si analizamos brevemente las dos fuentes de este programa, vemos que, por un lado, la epidemiología proporciona evidencias, y orienta de cuáles podrían ser los agentes quimiopreventivos que se encuentran de forma natural en la dieta. Así se ha visto que los hábitos dietéticos y el consumo de tabaco y otros factores ambientales pueden ser responsables del 70 % de las muertes por cáncer. Por ejemplo, se han verificado algunas hipótesis como que ciertos factores dietéticos pueden afectar a la incidencia de un determinado tipo de cáncer en una población y a una edad. Además, se ha encontrado que en determinados grupos poblacionales que migran a un nuevo país, con diferentes hábitos dietéticos, pueden igualarse en la incidencia al tipo de cáncer típico de ese país. Entre los alimentos que destacan como quimiopreventivos se incluyen, col, brócoli, ajo, cebolla, jengibre, ginseng, cítricos, romero, pimiento, soja...

En cuanto a la segunda fuente, los estudios en laboratorios de investigación, están revelando que hay cientos de productos naturales que pueden mostrar actividad quimiopreventiva, destacando, cumarinas, fenoles, indoles, isotiocianatos aromáticos, bencenos alquenoles, flavonas metiladas, esteroides, sales de selenio, o inhibidores de proteasas, entre otros. Para obtener resultados homogéneos en los diferentes laboratorios, el Programa de Quimioprevención del NCI recomendó una serie de técnicas.

Antes de profundizar más en el tema, es importante saber diferenciar el concepto de quimioprevención del de prevención primaria, (en el que se incluyen medidas como evitar el consumo de tabaco, hábitos de vida...), y de quimioterapia (tratamiento administrado una vez que se diagnostica

el cáncer), aunque la división entre quimioprevención y este último es difícil, ya que hay compuestos que poseen ambas propiedades, prevenir y tratar el cáncer.

Actualmente, algunos autores dividen la quimioprevención en tres grupos:

- 1- Prevención primaria: Prevención de la iniciación del cáncer en individuos sanos.
- 2- Prevención secundaria: Prevención de formación de cáncer en pacientes en condiciones de tumores premalignos.
- 3- Prevención terciaria: Prevención de la aparición de un cáncer secundario en un cáncer tratado previamente.

Pero, no toda la comunidad científica está de acuerdo con esta rama de la oncología, ya que por ejemplo, en los estudios epidemiológicos, puede que la información recogida no sea completa, o que existan interacciones entre diferentes componentes de la dieta, y además, como el desarrollo de los tumores puede llevar años, no se sabe qué periodo de observación es el más relevante para llevar a cabo estos estudios. Otros defienden que existen fallos, ya que el paciente se considera “saludable” hasta que le diagnostica la enfermedad. El fallo a la hora de reconocer los riesgos en las primeras etapas desencadena errores para adoptar medidas preventivas, y por otro lado, un agente preventivo debería estar libre de efectos secundarios (Greenwald *et al.*, 1990).

Los agentes quimiopreventivos modulan el riesgo de cáncer a los niveles moleculares, celulares, tisulares y clínicos. Los mecanismos de estos agentes están definidos por las actividades estudiadas en los niveles molecular y celular, mientras que la eficacia se evalúa a niveles tisulares y clínicos.

Según el NCI, las estrategias para la quimioprevención, han de cumplir:

- Inhibición de carcinógenos
- Intervención en personas con riesgo genético
- Tratamiento de lesiones precancerosas
- Confirmación y translación desde la epidemiología en estrategias.

A medida que se ha ido avanzando en el conocimiento de la carcinogénesis, se han podido clasificar de forma más detallada los agentes y las dianas moleculares a las que afecta. Wattenberg los clasifica en dos grandes categorías, bloqueantes, que inhiben la iniciación de la carcinogénesis, bien inhibiendo la formación de carcinógenos, bien previniendo que éstos interaccionen con moléculas

celulares, como ADN, ARN o proteínas, y supresores, que inhiben la expresión maligna de las células dañadas, bien en la etapa de promoción o progresión (Kelloff *et al.*, 1997).

Hay que señalar que, todos estos grupos no son excluyentes, es decir, las actividades no son independientes, sino que están interrelacionadas y superpuestas.

Para evaluar la eficacia potencial de agentes quimiopreventivos, se miden diversos parámetros:

- Número de actividades farmacológicas relacionadas con la quimioprevención.
- Impacto de agentes en las rutas carcinogénicas
- Farmacodinamia del compuesto.
- Especificidad por la actividad quimiopreventiva comparada con interferencias con la función normal celular.

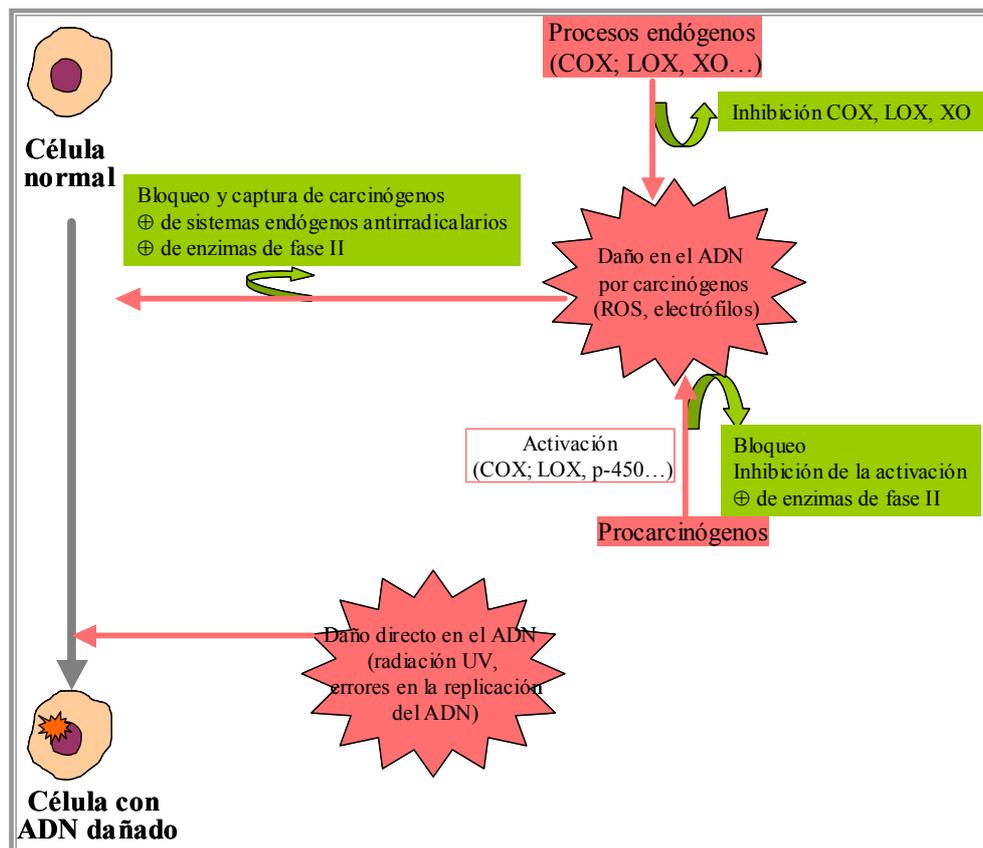
Estas sustancias quimiopreventivas están planteándose en oncología como coadyuvantes a las terapias clásicas, como radio y quimioterapia, al poder mejorar la eficacia terapéutica, al ser más selectivos (al actuar frente a dianas terapéuticas específicas) y menos tóxicos (interaccionan preferentemente a células tumorales frente a normales).

La clave para que la búsqueda de estos compuestos radica en que potencien los sistemas endógenos de defensas de la carcinogénesis, o que disminuyan los ROS que contribuyen a ella, reestableciéndose el equilibrio, sin que se genere una sobreestimulación o inhibición completa.

A continuación, mostramos los posibles mecanismos de acción que pueden poseer las sustancias quimiopreventivas, refiriéndonos posteriormente, a los compuestos más estudiados.

**-1. Transformación célula normal a célula con daño en el ADN.**

El daño indirecto en el ADN puede prevenirse mediante la inhibición de la formación de las sustancias que interaccionan con el ADN: Bloqueo de los carcinógenos, detoxificación de los procarcinógenos mediante la activación de enzimas de fase II, (glutacion-S-transferasa (GST), UDP-glucuronosil transferasa o quinona reductasa), inhibición de la activación de carcinógenos por enzimas (COX, LOX, citocromo P-450), inhibición de los procesos endógenos que forman radicales libres (COX, LOX, XO). Por otra parte, también se puede evitar el daño en el ADN mediante la inhibición de la interacción del carcinógeno con el ADN, mediante el bloqueo o captura de las sustancias que interaccionan con el ADN, estimulando los sistemas antirradicalarios endógenos, o mediante la detoxificación de carcinógenos mediante inducción de enzimas de fase II.



**a) Antioxidantes.**

Una definición amplia de antioxidante, podría ser, cualquier sustancia, que, a bajas concentraciones, retrasa o previene la oxidación de un sustrato (Halliwell, 1990; 1995). Los mecanismos básicos por los que un compuesto muestra actividad antioxidante son:

-Actividad antirradicalaria: Se basan en una reacción de óxido-reducción (redox), entre el antioxidante, que dona un electrón a un radical libre (Cadenas, 1997). Durante el transcurso de esta transferencia, el antioxidante se convierte en un radical. Los compuestos con esta actividad, podrán reaccionar con sustancias electrofílicas y ROS neutralizándolos, evitando que interaccionen posteriormente con el ADN.

-Inhibición de la peroxidación lipídica.

-Quelación de metales de transición: Los metales de transición, como hierro o cobre, son cofactores esenciales para diferentes enzimas involucradas en el metabolismo del oxígeno. Cuando estos iones están presentes en estado libre, pueden catalizar reacciones radicalarias (Halliwell y Gutteridge 1990). Por tanto, agentes que quelan a estos metales, puede hacer disminuir estos efectos biológicos.

-Activación de enzimas detoxificantes, al favorecer la eliminación de sustancias carcinogénicas.

-Inhibición de enzimas metabólicas de fase I, previniendo la activación de procarcinógenos hacia carcinógenos y generación de nuevos radicales libres.

-Inhibición de enzimas involucradas en otros procesos biológicos: Los ROS son producidos por enzimas, como xantina oxidasa, aldehído oxidasa, y otras enzimas metabolizadoras del ácido araquidónico, por tanto, la inhibición de éstos conducirán a una disminución de la producción de ROS.

-Inhibición de la interacción ROS-diana biológica (ADN, proteínas).

Numerosos datos epidemiológicos y preclínicos muestran la asociación entre las sustancias de la dieta, como té, especias como cúrcuma, jengibre..., crucíferas, alimentos ricos en flavonoides..., y la disminución de riesgo o incidencia de cáncer.

El selenio inhibe la fase de promoción de carcinogénesis de mama y la fase de iniciación de carcinogénesis de colon, aunque el efecto inhibitorio es reversible, y las dosis quimiopreventivas se aproximan a las dosis tóxicas, proporcionando actividad antioxidante. Se ha visto que la combinación de selenio con vitamina E es más eficaz.

Por otra parte, la vitamina E es una vitamina liposoluble, considerada como un nutriente esencial para animales superiores, debido a su función como principal antioxidante en las membranas celulares, al reaccionar con diferentes ROS, previniendo de la peroxidación de los lípidos de membrana. El  $\alpha$ -tocoferol inhibe la tumorigénesis en la cavidad oral, piel, mama, hígado, colon e

intestino delgado en animales. Los efectos quimiopreventivos no sólo se deben a su acción antioxidante, sino también a la estimulación del sistema inmunológico, la inducción de diferenciación celular, inhibición de la metabolización del ácido araquidónico (AA), de formación de carcinógenos, como nitrosamina...

Por otro lado, datos epidemiológicos sugieren un efecto protector del té verde o fermentado frente a cáncer de mama, colon, recto, vejiga, hígado, pulmón, nasofaringe, páncreas, estómago y útero, debido a la gran capacidad antioxidante que posee los polifenoles que posee como epicatequina, galato de epicatequina, epigallocatequina, epigallocatequin galato (EGCG) (Kelloff, 1999).

Además, se han detectado bajos niveles de antioxidantes en pacientes con cáncer gástrico.

Para la detección y caracterización de compuestos con actividad antioxidante hay diversas técnicas, como la determinación de la actividad antirradicalaria (frente al radical DPPH, entre otros), el ensayo de la inhibición de la peroxidación lipídica mediante la técnica del ácido tiobarbitúrico (TBA), o la determinación de las actividades enzimáticas (XO, COX...) entre otras.

#### ***b) Inductores de enzimas de fase II***

La desactivación de carcinógenos y detoxificación es uno de los mecanismos más importantes de la inhibición de carcinogénesis, por tanto, incrementar esta detoxificación puede ser una importante estrategia para la quimioprevención.

Nuestro organismo tiene dos rutas metabólicas para la eliminación de sustancias endo y exógenas:

- A) Introducción o exposición de grupos polares en compuestos xenobióticos vía fase I del metabolismo, que está regido por oxidasas microsomiales. En muchos casos, estos grupos polares se convierten en sustratos para conjugación.
- B) Vía fase II metabólica, enzimas responsables para la conjugación y formación de glucurónidos, conjugados con GSH y sulfatos.

Los inductores enzimáticos, se han clasificado en dos grupos: inductores monfuncionales, que incrementan sólo los niveles de enzimas de fase II, como difenoles, tiocarbamatos, isotiocianatos, 1,2-ditioles e inductores bifuncionales, que inducen el aumento de las enzimas metabólicas de fase I y II, como los compuestos aromáticos planares (Prochaska y Talalay 1988; Talalay, 1992; Talalay *et al.*, 1995). Aunque la inducción de enzimas de fase I se requiere para la completa detoxificación de diferentes compuestos por sucesiva acción de las enzimas de fase II, la inducción de las primeras es un

factor potencial de riesgo de cáncer al poder estimular la transformación de sustancias procarcinogénicas a carcinogénicas (Williams, 1967; Yang *et al.*, 1994).

Entre las enzimas de fase II se encuentran: Glutation-S-Transferasa (GST), que cataliza la conjugación de electrófilos (agentes carcinogénicos, como hidrocarburos aromáticos policíclicos) con glutatión (GSH); Glutation Peroxidasa (GSH-Px) que reduce peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos; Quinona Reductasa (QR) y UDP-glucuroniltransferasa; y como enzimas de fase I, destacan las oxidasas microsomales, como el sistema citocromo P-450.

De todas estas enzimas de fase II, una de las más estudiadas es la Quinona Reductasa, y además, el ensayo de la inducción de su actividad por posibles sustancias quimiopreventivas ha sido seleccionado dentro de los protocolos del NCI, en células de ratón Hepa 1c1c7, debido a que es una enzima ampliamente distribuída, es fácilmente medible y produce una elevada respuesta al ser inducible. Además se han desarrollado mutantes de esta línea celular deficientes en la actividad citocromo P450 para diferenciar las sustancias inductoras monofuncionales de las bifuncionales.

Esta enzima, Quinona Reductasa [(NAD(P)H: quinona oxido-reductasa], también denominada como DT diaforasa, es una enzima homodimérica del grupo de las flavoproteínas, que cataliza reducciones de dos electrones dependientes de NAD(P)H de quinonas, ortoquinonas, quinoneiminas, grupos azo y nitro y sucesiva glucuronidación, mediante la donación de un electrón :  $\text{NADPH} + \text{Quinona} \Rightarrow \text{NADP}^+ + \text{Semiquinona}$  (Talalay y Benson 1982; Li *et al.*, 1995).



La inducción de QR protege frente a los efectos tóxicos y neoplásicos de quinonas, ya que al reducirlas, se evita que reaccionen moléculas celulares nucleofílicas y grupos sulfidriilo. Además, QR activa importantes quinonas quimioterapéuticas, como mitomicinas o aziridilbenzoquinonas. Y como debido a que en algunos tumores hay elevados niveles de QR, estas células son más susceptibles que las normales al tratamiento con quimioterapéuticos.

Han sido ampliamente estudiadas las propiedades catalíticas (Hosoda *et al.*, 1974; Ernster *et al.*, 1987b; Prochaska, 1988), fisiológicas (Ernster *et al.*, 1987a) y su regulación transcripcional (Favreau y Pickett 1993; Jaiswal, 1994) de esta enzima.

Además, como desventaja, se ha visto que dicumarol, warfarina y otros anticoagulantes orales pueden inhibir a QR.

**c) Inhibidores de la metabolización del ácido araquidónico (antiinflamatorios) e inhibidores de iNOS.**

La inhibición de las rutas COX y LOX están implicadas en la quimioprevención. La acumulación de AA, conduce al incremento de la producción de ceramidas y apoptosis. A su vez, la acumulación de AA puede ser debida a la inhibición de COX, LOX o activación de fosfolipasas.

Debido a que los metabolitos del AA pueden influir en la carcinogénesis, podemos detener este proceso mediante diferentes mecanismos:

- En la formación de PGG<sub>2</sub>, inhibiendo COX.
- Inhibiendo la actividad peroxidasa.

Los AINE son fármacos que van a inhibir la enzima COX, y se les han atribuido diversas actividades quimiopreventivas como:

- Captura de ROS involucrados en la iniciación o promoción del tumor.
- Prevención de la activación de procarcinógenos mediante la inhibición de monooxigenasas citocromo P450.
- Inhibición de la promoción de tumores mediante la inhibición de la inducción de ornitina descarboxilasa (ODC).
- Reducción de la tumorigénesis mediante la modulación de la respuesta inmunológica, ya que pueden ralentizar el crecimiento del tumor en las primeras etapas atenuando la supresión inmune que origina PGE<sub>2</sub>, al inhibirse su síntesis.

El problema del uso crónico de AINES radica en sus efectos secundarios, al reducirse los niveles de PGE<sub>3</sub>, generando molestias gastrointestinales, úlceras o hemorragias, ya que se pierde la secreción del mucus protector del tracto gastrointestinal. Una solución para evitarlo, son los fármacos inhibidores selectivos de COX-2, de tipo esteroídico o no esteroídico. Los primeros, también denominados glucocorticoides, inhiben tanto COX-2 como PLA, sin afectar a COX-1, muestran ser los más eficaces antiinflamatorios, pero poseen serios efectos adversos por su actividad glicogénica. Los segundos, son AINE inhibidores selectivos de COX-2, que parecen que disminuyen los efectos secundarios de los AINE no selectivos.

En los pasados 10 años, se han utilizado inhibidores específicos de LOX para el tratamiento del asma, colitis ulcerosa, artritis y psoriasis.

Los efectos quimiopreventivos de la inhibición de LOX son:

- Reducción de la proliferación celular.
- Incremento de la apoptosis.
- Restauración de la regulación del crecimiento en las células.

Los inhibidores del óxido nítrico pueden actuar bien mediante captura directa de NO o bien, mediante inhibición de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Estos últimos tienen diversos efectos sobre la carcinogénesis:

- Pueden reducir la frecuencia de mutaciones.
- Incrementan la apoptosis.
- Reducen la metástasis, permeabilidad vascular y flujo de sangre al tumor.

Se han descrito numerosas sustancias de origen natural que inducen la apoptosis, mediante diferentes mecanismos, como, mediante la inducción de las caspasas, o la inhibición de la metabolización del ácido araquidónico. Además, también se han encontrado moléculas capaces de inhibir las telomerasas activas en las células tumorales.

### **-3. Transformación de célula mutada a célula tumoral.**

En esta etapa, una de las dianas es el bloqueo de la transmisión de señales mitógenas al núcleo, induciendo, por tanto, la parada del ciclo celular en fase G<sub>1</sub> y desencadenándose un incremento de la apoptosis. Entre los diferentes mecanismos y moléculas que lo consiguen, destacamos los inhibidores de receptores estrogénicos y androgénicos, y la inducción de la diferenciación celular.

#### ***a) Inhibidores de receptores estrogénicos y androgénicos y otros moduladores hormonales.***

Los moduladores hormonales pueden actuar bien por interacción con los receptores hormonales o bien por inhibición de la enzimas que sintetizan hormonas, como 5- $\alpha$ -aromatasa.

Se han descubierto moléculas que bloquean los receptores estrogénicos en determinados tejidos, mientras que mimetizan la acción de los estrógenos en otros. Esta selectividad se debe a la diferencia de receptores estrogénicos que se encuentran en los tejidos, tal y como se mencionó anteriormente. A estos fármacos se les denominan “moduladores selectivos de receptores estrogénicos, o SERM”, porque, ellos, selectivamente, estimulan o inhiben los receptores estrogénicos.

Este es el caso de tamoxifeno, que actúa como antagonista de estrógenos en la mama y agonistas en el sistema cardiovascular y en huesos, previniendo la hipercolesterolemia y osteoporosis. Tamoxifeno, no es sólo útil para el tratamiento del cáncer de mama, sino también en su profilaxis, al reducir el riesgo de cancer de mama en mujeres de alto riesgo. Además, la identificación de estos receptores en la próstata, conducen a pensar que los moduladores hormonales también puedan ser quimiopreventivos en este órgano.

La desventaja de tamoxifeno es que mimetiza los efectos de los estrógenos en el útero, estimulando la proliferación uterina, y, por tanto, pudiendo ser riesgo potencial para cáncer de útero.

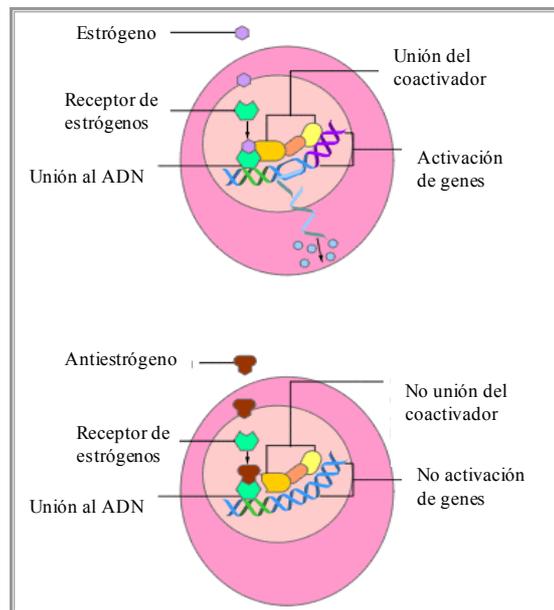
Actualmente, en clínica, los antiestrógenos se están utilizando como tratamiento en determinados tumores de mama y próstata. El reino vegetal es rico en “fitoestrógenos”, compuestos naturales que mimetizan las acciones hormonales de los estrógenos, como los lignanos e isoflavonas (genisteína o daizina).

En investigación se han diseñado diferentes técnicas en búsqueda de moléculas con esta actividad moduladora de estrógenos, destacamos, el ensayo con células de Ishikawa o el estudio de la unión a receptores estrogénicos.

**b) Interacción con receptores retinoicos (RAR y RXR) y otros inductores de la diferenciación celular.**

Cabe una mención especial mencionar el efecto quimiopreventivo de los retinoides, no sólo por sus consecuencias históricas (al ser uno de los primeros grupos en ser estudiados a nivel de quimioprevención), sino también porque ya se están utilizando en clínica.

La vitamina A, incluyendo retinol y sus ésteres con ácidos grasos, 3,4-dihidro-retinol y retinal, denominados como retinoides, son necesarios para el crecimiento y el desarrollo de los huesos, visión, reproducción, diferenciación del tejido epitelial, integridad del sistema inmunitario, síntesis de mucopolisacárido, colesterol y metabolismo de hidroxisteroides.



Los retinoides deben su actividad quimiopreventiva a que interaccionan con receptores retinoicos (grupo de receptores hormonales y esteroídicos) RAR ( $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ ) y RXR ( $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ ), modificando la transcripción de genes, que conllevarán al cambio de expresión de proteínas como:

- Modulación de señales intercelulares, como conexina.
- Modulación de señales intracelulares, PKC, ODC
- Expresión de factores de crecimiento, receptor de factor de crecimiento y oncogenes.
- Modulación de hormonas, como progesterona y respuesta inmunológica.
- Alteración de la matriz extracelular (colágeno, angiogénesis) y enzimas proteolíticas.
- Inhibición de la replicación de virus.

Estudios epidemiológicos relacionan bajos niveles de vitamina y provitamina A y desarrollo de cáncer de pulmón, cérvix, ovario, esófago, laringe, cavidad oral y nasofaríngea.

Se ha descubierto una actividad importante del ácido retinoico en el campo de la quimioprevención y terapéutica del cáncer, al inducir la diferenciación de células hematopoyéticas, siendo útil en el tratamiento de diferentes leucemias. Tiene diferentes efectos en las células sanguíneas en función de su estado de maduración, previniendo o retrasando la diferenciación de los precursores hematopoyéticos, mientras que activa la diferenciación terminal de las células madre de granulocitos y monocitos. También se han encontrado que la vitamina D y análogos ejercen el mismo efecto en células hematopoyéticas, abriéndose un nuevo campo de investigación en la búsqueda de sustancias que induzcan la diferenciación de las células tumorales.

#### **-4. Transformación de célula tumoral a célula cancerígena y formación del tumor.**

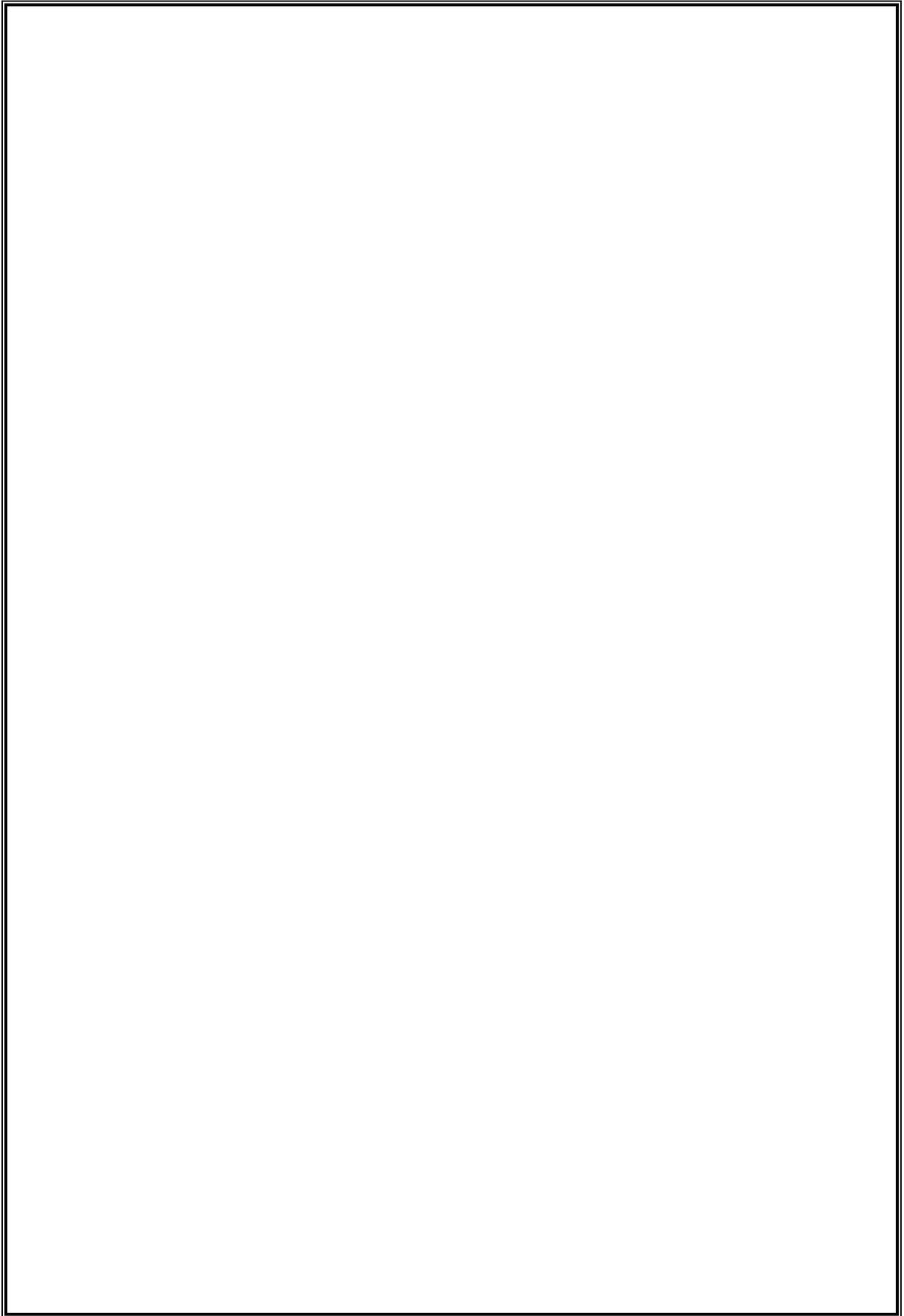
##### ***Inhibidores de la angiogénesis y metástasis.***

Hay diferentes mecanismos por los que un compuesto puede inhibir la metástasis y angiogénesis. Destacan, los inhibidores de enzimas tirosin-kinasas, de la trombomodulina, de la degradación de membranas (como, inhibidores de la colagenasa tipo IV), o estimulantes de la comunicación intracelular (inductores de la conexina 43).

Mediante todos estos mecanismos anteriormente citados, se han identificado más de 600 compuestos de origen natural y derivados sintéticos con propiedades quimiopreventivas, y algunos están bajo ensayos clínicos., como: Homoharringotina, compuesto de origen alcaloídico, con estructura similar a cefalotaxina, que muestra actividad antileucémica en fase I en combinación con citarabina en leucemia mielógena aguda; Pancratistatina (alcaloide); Phillantósido (glicósido sesquiterpeno) e ipomeanol (furanoide); Steganacina y steganangina, lignanos octadienos, son antileucémicos; Ácido 3-epimasticadienolico, que inhibe la enzima 5- $\alpha$  reductasa, los polifenoles del té verde; Curcumina; Genisteína; Indol-3-carbinol; Alcohol perillilo; Fenetil isotiocianato; combrestatinas, aisladas de un arbusto africano, *Combretum caffrum*, destacando Combrestatina A-4, que muestra selectiva citotoxicidad frente a células endoteliales y que en ensayos de fase I, la combinación con cisplatino, hace que disminuya su efecto secundario y aumente su eficacia. En fase II y III hay inhibidores de la angiénesis, como fumagillina, y un derivado semisintético, TNP-470.

A continuación resumimos las sustancias más relevantes y algunas de sus dianas en el proceso de carcinogénesis (Greenwald *et al.*, 1990; Sharma *et al.*, 1994; Kelloff *et al.*, 1997; Kelloff, 1999; Mann, 2002):

<b>Diana</b>	<b>Sustancia quimiopreventiva</b>
Formación de precursores carcinogénicos	Vitamina C, fibra
Formación y activación de carcinógenos. Activación de enzimas detoxificantes	Fenoles, flavonas. ácido elágico, isotiocianatos aromáticos, dialildisulfuro, antioxidantes, glutatión, S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , bencil isotiocianato, biochanina A, gingerol, capsaicina
Unión carcinógeno-ADN	Detoxificación por isotiocianatos aromáticos, glutatión, S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , carnosol
Apoptosis	Auraptano, indol-3-carbinol, capsaicina
Formación de señales mitógenas, inmortalidad y evolución del tumor	$\beta$ -caroteno, retinoides, tamoxifeno, DHEA, terpenos, inhibidores de PG y proteasas, Ca <sup>2+</sup> , nerolidal, fenoles, flavonas, taninos, curcumina, ácido glicirrético, glucaratos, limoneno, brusatol, gingerol



*Nunca vayas por el camino trazado, porque conduce hacia donde otros han ido ya.  
A. Graham Bell*

### **III.- MATERIAL Y MÉTODOS**

### III.1. MUESTRAS

Las muestras constituidas por las hojas de *Plantago afra* L., *P. bellardii* All., *P. coronopus* L., *P. lagopus* L., *P. lanceolata* L. y *P. serraria* L. se recolectaron en Don Benito (Badajoz), en el mes de Abril (período de floración). Confirmó la identidad del material el Dr. A. Aparicio, del Departamento de Botánica de la Universidad de Sevilla.

### III.2. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

Las hojas secas y troceadas se sometieron a extracción continua en Soxhlet a temperatura controlada (< 50 °C) con metanol durante 48 h, obteniéndose el correspondiente extracto metanólico.

A continuación, los extractos metanólicos fueron sometidos a extracción, en baño de ultrasonidos, con n-hexano hasta agotamiento, obteniéndose los correspondientes extractos n-hexánicos y los extractos metanólicos (agotados con n-hexano) para su posterior estudio.

### III.3. ENSAYOS FITOQUÍMICOS.

#### III.3.1. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

##### -Cromatografía en capa fina (CCF).

Material:

- Cubetas cromatográficas de vidrio (Desaga).
- Lámpara de luz UV (366 y 254 nm).
- Estufa de desecación.
- Pulverizador de aire a presión.
- Capilares de vidrio.

-Fases estacionarias:

- Silicagel 60 F<sub>254</sub> (cromatofolios) (Merck).

-Fases móviles:

- Ácido acético: Ácido fórmico: Agua: Acetato de etilo (11:11:27:100) (Wagner *et al.*, 1984)
- Acetato de etilo: Metanol: Agua (80:1:1; 80:3:3; 80:5:5)
- Butanol: Ácido acético: Agua (40:10:50)
- Diclorometano: Acetato de etilo (60:40)

- n-Hexano: Acetato de etilo (9:1; 8:2; 1:1; 1:9)

-Reveladores:

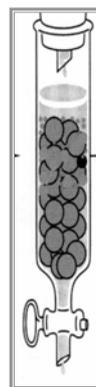
- Luz U.V. (254 y 366 nm). Detecta: compuestos con dobles enlaces conjugados (Houghton y Raman 1998).
- Oleum: ácido sulfúrico/ ácido acético glacial/ agua (2:40:8). Exposición a 120°C durante 5 minutos. Detecta: compuestos orgánicos, es un reactivo general.
- Tricloruro de aluminio al 2% en etanol. Observación visible y UV. Detecta: Flavonoides (Krebs *et al.*, 1969).
- Vainillina: Vainillina etanólica al 1% seguido de pulverización con ácido clorhídrico. La evaluación puede hacerse en el visible. Detecta: taninos, terpenos y antocianos. (Ríos *et al.*, 1986)
- Reactivo de Trim-Hill: Ácido acético glacial, solución acuosa al 0,2% de sulfato cúprico y HCl conc. (10:1:0,5) se calienta durante 5 min. a 100 °C. Detecta : Iridoides (Trim y Hill 1952).
- Reactivo de Ehrlich: p-dimetilaminobenzaldehido (0,25 g) en 130 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, en hielo, y se añade a 70 mL de agua y se mezcla con 0,2 mL de solución de cloruro férrico al 5%. Detecta: Grupos furánicos (Fisher y Orth 1934).

-Cromatografía en columna (CC):

a) Cromatografía sólido-líquido de adsorción en sílice.

Material:

- Columnas de vidrio de diversas longitudes y diámetros.
- Colector de fracciones LKB 2070 ULTRORAC® II
- Rotavapor.
- Tubos de ensayo de vidrio.



-Fases estacionarias:

- Silicagel 60 (0.063-0.2 mm)
- Silicagel 60 (0.2-0.5 mm)

-Fases móviles:

- Acetato de etilo: Metanol: Agua ( 80:3:3; 80:5:5; 80:7:5; 80:10:10).
- Metanol R.A.<sup>55</sup>
- Agua.

b) Cromatografía sólido líquido de adsorción el sílice de fase reversa (C18 Sep-Pak).

Material:

- Jeringas de plástico 10 mL.

-Fases estacionarias:

- Cartuchos C18 Sep-Pak (Waters ®)



-Fases móviles:

- Agua: Metanol (10:0; 9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 1:1; 0:1)
- Acetato de etilo.

Descripción de la técnica

El procesamiento de la muestra en la extracción en fase sólida necesita de 4 etapas:

- 1- Acondicionamiento, para que se obtenga una reproducibilidad en la retención del metabolito así como disminuir las posibles impurezas existentes en la fase estacionaria mediante la elución.
- 2- Reemplazar la fase móvil por el mismo disolvente en el que está diluida la muestra.
- 3- Añadir la muestra en el cartucho, a un flujo controlado.
- 4- Elución del analito con pequeños volúmenes, primero con un disolvente débil y posteriormente con uno fuerte para la posterior determinación. (Poole *et al.*, 2000)

Se utilizaron cartuchos C18 Sep-Pak (Waters), que fueron preconditionados haciendo pasar por ellos de forma secuencial, 8 mL de metanol, y 4 mL de agua, bidestilada. Se carga el extracto y se lava con agua, recogiendo las alícuotas obtenidas. Posteriormente, se eluye con mezclas agua: metanol a diferentes proporciones, disminuyendo de forma progresiva la polaridad, metanol y por último, acetato de etilo.

---

<sup>55</sup> **R.A.**: Reactivo de análisis.

c) Cromatografía sólido-líquido de exclusión molecular.

Material:

- Columnas de vidrio de diversas longitudes y diámetros.
- Colector de fracciones LKB 2070 ULTRORAC® II
- Rotavapor.
- Baño ultrasonido.
- Tubos de ensayo de vidrio.

-Fases estacionarias:

- Sephadex LH-20 (Pharmacie)

-Fases móviles:

- Diclorometano: Metanol (1:1)
- Metanol: Agua (80:20; 40:60).

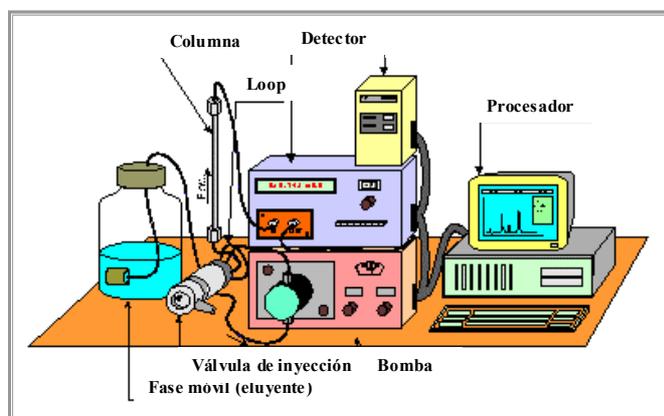
d) Cromatografía líquida de alta resolución : HPLC en fase reversa

Material

- Filtros de teflón PTFE de 13 mm de diámetro y 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula.
- Filtros HV de diámetro y 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula (Millipore).
- Jeringas plástico (1mL).
- Baño de ultrasonidos. Modelo Ultrasonic cleaner.

Sistema de HPLC:

- Bomba modelo 510 (Waters)
- Bomba modelo 515 (Waters).
- Controlador automático de gradiente (Waters).
- Detector UV-Vis, modelo Lambda Max 481 (Waters).
- Registrador e integrador modelo 745 (Waters).



-Fases estacionarias:

- Columna  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> (3,9 x 300 mm, tamaño partícula:10  $\mu$ m) (Waters Associates, Mildford, MA).

-Fases móviles:

- Metanol, calidad HPLC gradiente.
- Agua millipore.
- Ácido fórmico 98% R.A.
- Ácido acético glacial R.A.
- Ácido nítrico 60%
- Ácido ortofosfórico 85%

Descripción de la técnica:

Para inyectar las muestras en el HPLC (10  $\mu$ L), hay que proceder previamente al procesamiento de éstas. Para ello, se prepararon extractos disueltos en MeOH y se filtraron utilizando jeringas de 1 mL por filtros de teflón PTFE.

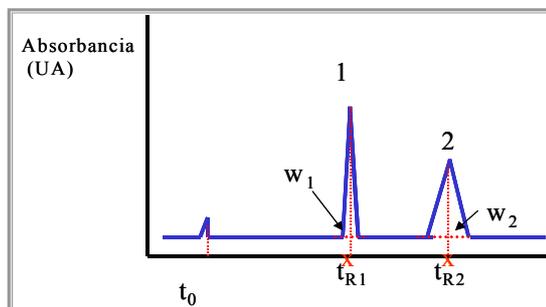
Los patrones fueron obtenidos a partir de los compuestos previamente aislados de diferentes especies objeto de nuestro estudio y en el caso de aucubina, adquirida en Extrasintesis<sup>®</sup>. Se disolvieron en MeOH a la concentración de 1 mg/mL y se conservaron a -20 °C. La estabilidad de los patrones fue comprobada durante todo el periodo de análisis.

Las fases móviles utilizadas (agua, metanol, acetonitrilo) fueron filtradas a vacío con filtros HV, y posteriormente, desgasificadas por ultrasonidos, La fase acuosa fue enriquecida con diferentes ácidos como acético, fórmico o fosfórico, para optimizar la resolución de los picos.

Se utilizaron métodos de elución en gradiente e isocrática, utilizando una bomba para cada disolvente, o previa preparación de la mezcla y empleando una sola bomba, en búsqueda de un método óptimo de separación.

Para poder interpretar los cromatogramas obtenidos, hay que tener en cuenta los siguientes parámetros:

- Tiempo de retención ( $t_R$ ): Tiempo que el soluto permanece en la fase estacionaria. Es característico de cada molécula.
- $t_0$ : Tiempo que tarda en eluir un soluto que no interacciona con la fase estacionaria, o el tiempo que tarda en eluir la fase móvil



- Factor de capacidad, ( $K'$ ): es una medida de la retención de los compuestos:

$$K' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

- Selectividad, o retención relativa ( $\alpha$ ), es el cociente entre los factores de capacidad de dos analitos diferentes ( $K_1'$  y  $K_2'$ ). Indica la separación de dos compuestos adyacentes, pero sin considerar el solapamiento de las bandas.
- Resolución, ( $R_s$ ) indica cómo están separadas las bandas de dos compuestos consecutivos. Debe alcanzar el valor de 1,5. Un valor inferior, indicaría el solapamiento de éstos, y superior, se está prolongando de forma innecesaria el tiempo de análisis.

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{(w_1 + w_2)}$$

La identificación de los compuestos en las muestras se lleva a cabo mediante la comparación de sus  $t_R$  con los obtenidos con los patrones, así como por el método de la adición estándar.

Para la cuantificación de los compuestos, se representa el área del pico obtenido frente a las concentraciones de los patrones ensayadas, obteniendo las correspondientes curvas de calibrado mediante el ajuste por mínimos cuadrados, e interpolando en éstas los valores del área proporcionados por el detector para cada muestra problema. En la curva patrón, hay que verificar que el rango de concentraciones de análisis sigue una respuesta lineal, es decir, que la respuesta proporcionada por el detector sea proporcional a la cantidad de analito. Para comprobarlo, se aconseja utilizar test estadísticos como F-test (test de Fisher) o el test de la significancia del coeficiente cuadrático de regresión (Miller y Miller 1988) y que la curva esté constituida por 5-8 valores, excluyendo los blancos (Shah *et al.*, 1992).

En todo método analítico, hay que validar el método elegido. La validación, en el caso del análisis con HPLC, comprende el estudiar la estabilidad de los compuestos bajo las condiciones de

almacenamiento, y determinar la precisión, exactitud, sensibilidad, reproducibilidad y la selectividad o especificidad. (Shah *et al.*, 1992).

Los principios para establecer que un método es válido deben ser:

-Determinar el rango de concentraciones en el que se cumple la linealidad.

-La precisión y exactitud se han de calcular tanto inter-día (se ha considerado que se deben realizar el mismo análisis 3 días consecutivos) como intra-día, es decir, repetir el análisis en el mismo día para verificar tanto la precisión como la reproducibilidad (Shah *et al.*, 1992). Al menos tres concentraciones representativas de todo el rango de la curva de calibrado deben ser estudiadas, una, cerca del límite inferior, otra, del superior y otra, en la zona intermedia de la curva. Se considera que el método es exacto si la media de los valores obtenidos no sobrepasa más del 15% de valor real, y preciso si el coeficiente de variación es inferior al 15 %.

Los resultados obtenidos deben expresarse como promedio  $\pm$  desviación estándar ( $M \pm \delta$ ), desviación estándar relativa (RSD) o porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD), donde se admite % RSD por debajo del 1-2% (ICH, 1996)<sup>56</sup>.

Por último, también ha de calcularse el límite de detección (LOD) (“Limit of detection”), que es la menor cantidad de analito de una muestra que puede ser detectado con un grado específico de certeza, pero no necesariamente cuantificado, y el límite de cuantificación (LOQ), menor cantidad de analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con un grado aceptable de precisión y exactitud (Castillo y Castells 2001). Para ello, Para calcular el LOD y LOQ utilizamos las recomendaciones de la IUPAC con los parámetros obtenidos a partir de la recta de regresión:

$$\text{LOD} = 3,3 (\sigma/S)$$

$$\text{LOQ} = 10 (\sigma/S)$$

S= Pendiente de la recta de calibrado

$\sigma$ = Desviación estándar de respuesta, que puede ser determinado basándose en la desviación estándar del blanco, en la desviación estándar residual de la línea de regresión o en la desviación estándar de la ordenada en el origen de la línea de regresión. En nuestro caso, hemos aplicado el segundo método, ya que es el que recientemente ha sido recomendado por ICH e IUPAC. Esta

---

<sup>56</sup> **ICH:** Conferencia Internacional para la armonización de requerimientos técnicos para el análisis de fármacos para el uso humano.

desviación estándar residual de la línea de regresión es proporcionada por diferentes soportes informáticos como SigmaPlot o Prism.

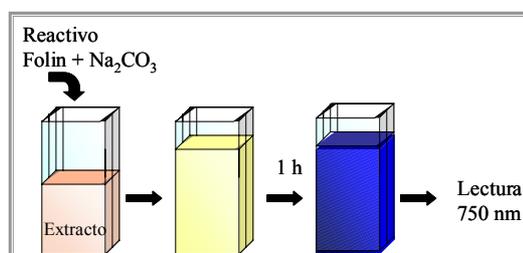
### III.3.2. TÉCNICAS COLORIMÉTRICAS.

#### a) DETERMINACIÓN DE FENOLES.

Seguimos el método descrito por Folin (Folin y Ciocalteu 1927), empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu fenol.

100  $\mu$ L de los extractos y patrones previamente disueltos en metanol y filtrados son mezclados con 7,9 mL de agua y 0,5 mL de reactivo, agitándose.

Transcurridos 1-8 min, se añade una solución de carbonato sódico (20%), se agita y tras 1 h (protegido de la luz), se registran las absorbancias en un espectrofotómetro UV-Vis a  $\lambda=750$  nm. La presencia de fenoles produce un cambio de coloración del reactivo, de amarillo a un color azul intenso (Julkunen-Tiitto, 1985).



El contenido de fenoles de cada extracto fue expresado como % (p/p), basándonos en la curva de calibrado del patrón, ácido protocatéquico, de ahí que se los resultados se refieran a mg de ácido protocatéquico/g de extracto. También se calcularon los mg de fenoles/g planta desecada.

#### b) DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES.

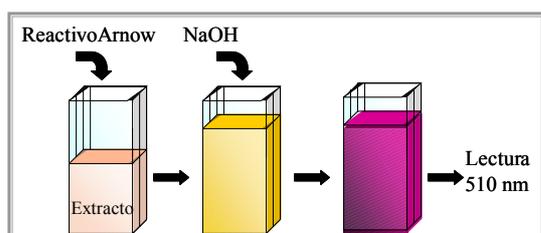
El contenido en flavonoides totales se realizó mediante la técnica descrita por Lamaison y cols. (Lamaison y Carnat 1990), que utiliza como reactivo  $AlCl_3$ , empleando diferentes longitudes de onda y un lector de placas. Se añaden por triplicado en una placa de 96 pocillos, 100  $\mu$ L de muestras disueltas en metanol previamente filtradas, y se adiciona el mismo volumen de reactivo ( $AlCl_3$  2% p/v en metanol). Tras 10 minutos, se registra la absorbancia a 415 nm en un lector automático de placas. Los patrones utilizados fueron rutina y luteolina glucósido aislados de *P. bellardii* y *P. lagopus*, respectivamente, a diferentes concentraciones para obtener las correspondientes curvas de calibrado. Todas las medidas se hicieron frente al blanco (100  $\mu$ L de muestra y 100  $\mu$ L de metanol). La presencia de flavonoides produce un cambio de coloración del reactivo a amarillo.

Los resultados fueron expresados como % de flavonoides existentes en cada extracto y como mg de flavonoides/g planta desecada.

#### c) DETERMINACIÓN DE FENILPROPANOIDES.

Se utilizó la técnica de Arnow (Arnow, 1937), validada por la Farmacopea Europea, que valora los derivados ortodihidroxicinámicos.

1 mL de cada muestra en metanol, previamente filtrada, se mezcla con 2 mL de HCl (0,5 N), 2 mL de solución acuosa al 10% de nitrito sódico y molibdato sódico al 10% p/v (reactivo de Arnow), y 2 mL de solución acuosa de NaOH 2N. La solución se ajusta a 10 mL con agua y procede en cubetas de vidrio de 3 mL a la lectura de la absorbancia de cada muestra en un espectrofotómetro ( $\lambda = 510$  nm).



El reactivo de Arnow, en presencia de fenilpropanoides, presenta una coloración naranja, y tras la adición de la sosa, se genera un color rosa-púrpura.

El patrón empleado para realizar la curva de calibrado fue verbascósido aislado de *P. serraria*.

Los resultados, expresados como % de fenilpropanoides totales en cada extracto y mg/g de planta desecada, fueron referidos a verbascósido.

#### d) DETERMINACIÓN DE IRIDOIDES

##### 1.- Ensayo con vainillina alcohólica.

Esta técnica ha sido descrita en bibliografía para la cuantificación de taninos, pero no para iridoides.

0,1-0,5 mL de cada extracto en MeOH, filtrados, son mezclados con 3 mL de vainillina (4 % p/v en MeOH) y con 1,5 mL HCl conc. Las muestras son protegidas de la luz durante 2 horas y se procede al registro de la absorbancia.

Previamente, se realiza este ensayo con el patrón, aucubina, haciendo varios registros, para seleccionar  $\lambda$  máx. = 510 nm.

También para los extractos se realizaron diferentes registros para ver las posibles interferencias con otros componentes. Se comprobó la veracidad de la técnica mediante el empleo de patrón interno.

La presencia de iridoides produce una coloración azul.

Los resultados fueron expresados como % de iridoides totales en cada extracto y mg/g planta desecada, referidos a aucubina.

#### *2.- Ensayo con HCl/CH<sub>3</sub>COOH*

Este reactivo detecta valepotriatos, e intentamos comprobar si también era sensible a otros iridoides. Se procedió de igual forma que lo descrito anteriormente. El reactivo consistió en mezcla equitativa HCl con y CH<sub>3</sub>COOH. Se añadieron 3 mL de reactivo a 0,1 mL de extracto, dando una coloración azul (Bruneton, 1999), midiendo a su  $\lambda$  máx= 605 nm.

Los resultados fueron expresados como % de iridoides totales en cada extracto y mg/g planta desecada, referidos a aucubina.

#### *3.- Ensayo de Trim y Hill:(Trim y Hill 1952)*

400  $\mu$ L de extracto fueron mezclados con 4 mL de reactivo, constituido por ácido acético glacial, solución acuosa de sulfato cúprico al 0,2% y HCl conc. (10:1:0,5). Tras calentar las muestras durante 5 minutos a 100 °C en un baño de agua termostaticado, se procede a su lectura a 609 nm. La aucubina proporciona un metabolito azul que absorbe a 590-600 nm .

Los resultados son expresados como % de iridoides totales en cada extracto y mg/g planta desecada, referidos a aucubina.

### ***III.3.3. EQUIPOS ANALÍTICOS UTILIZADOS.***

#### **- DETERMINACIÓN DEL PUNTO DE FUSIÓN.**

El punto de fusión fue determinado en un microscopio Thermovar HT 1 B 11, previa comprobación de los estándares.

#### **- ESPECTROSCOPIA UV**

Material:

- Espectrofotómetro Lambda 3 Perkin-Elmer
- Registrador (mod Perkin-Elmer 561).
- Cubetas de cuarzo de 1 cm de espesor y 3 mL de capacidad.

Reactivos:

- Metanol R.A.
- Metóxido sódico. Solución al 5 % en Metanol.
- Tricloruro de Aluminio. Solución al 5 % en Metanol
- Acetato sódico R.A.
- Ácido bórico R.A.
- Ácido clorhídrico 3N.

Para la identificación de los flavonoides, se llevaron a cabo espectros UV con los diferentes reactivos (Markham, 1989), siguiendo las técnicas descritas por Mabry y cols. (1970)

#### **- ESPECTROSCOPIA RMN**

Las muestras fueron examinadas en DMSO- $d_6$ . Los espectros se realizaron en un espectrómetro BRUKER AC TF que operaba a 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) y a 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ). Los desplazamientos químicos fueron expresados en ppm, usando como referencia las señales del disolvente a 2.49 ppm y 39.54 ppm para  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  respectivamente. Se utilizó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. El experimento de homocorrelación  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  con filtro de doble cuanta (COSY-DQF), se llevó a cabo en el modo sensible a la fase, empleando la secuencia de pulsos estándar del espectrómetro. El experimento

de heterocorrelación directa  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  realizó en el modo de detección inversa, vía coherencia de cuanta simple (HSQC-ed, QNP). El desacoplamiento del  $^{13}\text{C}$  se consiguió por el esquema de GARP. Este experimento fue ligeramente modificado por la implementación de un bloque de edición en la secuencia. El experimento de heterocorrelación  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  de largo alcance (HMBC) se ha obtenido en el modo de detección inversa. También COSY, NOESYpr.

#### - ESPECTROMETRÍA DE MASAS

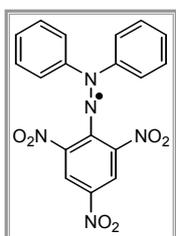
Los espectros de masas (EM) obtenidos mediante impacto electrónico (EI) y bombardeo rápido de átomos (FAB) se registraron en un espectrómetro KRATOS, mod. MS-80-RFA. La temperatura de la fuente de ionización fue de  $200^\circ\text{C}$  y la energía de ionización 70 eV.

### III.4. ENSAYOS DE QUIMIOPREVENCIÓN.

#### III.4.1. Actividad antioxidante.

##### III.4.1.1.- Actividad antirradicalaria frente al DPPH

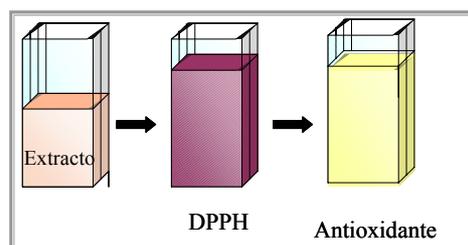
Fundamento de la técnica:



El DPPH, 1,1-difenil-2-picrilhidracilo, es un radical libre estable, que en disolución etanólica presenta un color violeta intenso, y teniendo una fuerte absorción a 517 nm.

Los antioxidantes pueden reaccionar con el radical, reduciéndolo, y por tanto, la absorción a esta  $\lambda$  desaparece. La absorción, y el grado de la decoloración resultante, es estequiométrico con respecto al número de electrones que capture:  $\text{DPPH}^\bullet + \text{AH} \Rightarrow \text{DPPH-H} + \text{A}^\bullet$

Esta técnica es un excelente método *in vitro* para investigar la capacidad antirradicalaria de los antioxidantes, es decir, la donación de átomos de hidrógeno a radicales libres.



Material:

- Extractos metanólicos de *Plantago spp.* y compuestos aislados
- Cromatofolios de Silicagel 60 F<sub>254</sub>
- Placas 96 pocillos.
- Lector automático de placas Multiskan Ex mod. 355 (Labsystems)

Reactivos:

- Metanol para espectroscopía.
- Solución metanólica de DPPH al 0,2% (ensayo cualitativo) y al 0,022% (ensayo cuantitativo).

Descripción de la técnica:

*a) Ensayo cualitativo:*

Las muestras a analizar son cromatografiadas en capa fina empleando las fases móviles seleccionadas para la óptima separación de los diferentes compuestos. Se revela con una solución al 0,2% DPPH en metanol. Las placas se observan tras 30 min del revelado. Los compuestos con actividad antirradicalaria, se detectarán como manchas amarillas frente a un fondo violeta (Cavin A. *et al.*, 1998). El ácido ascórbico fue empleado como patrón.

*b) Ensayo cuantitativo:*

El ensayo fue llevado a cabo en placas de 96 pocillos. 50 µL de solución de DPPH (0,022% en metanol), se añadieron a 230 µL de muestra (extractos y compuestos aislados) disueltos en metanol o DMSO. Las concentraciones ensayadas fueron siete diluciones seriadas 1:3 comprendidas en el rango 1000-1,3 µg/ mL para los extractos, y 1:2 en el rango 100-5 µM para los compuestos aislados.

La actividad antirradicalaria fue determinada tras 30 minutos de agitación en oscuridad, y se calcularon los valores de descenso de absorción inducidos por los compuestos restándose del control. La actividad antirradicalaria de cada extracto y compuesto fue expresada como valor IC<sub>50</sub>, (concentración en µg/mL o µM para extractos o compuestos, respectivamente, que reduce al radical DPPH en un 50%) y fue calculada por curvas de regresión lineal, representándose en abscisa las concentraciones de las muestras, y en ordenadas, el promedio del porcentaje de la reducción del radical DPPH. El control positivo empleado fue ácido ascórbico (Cuendet *et al.*, 1997).

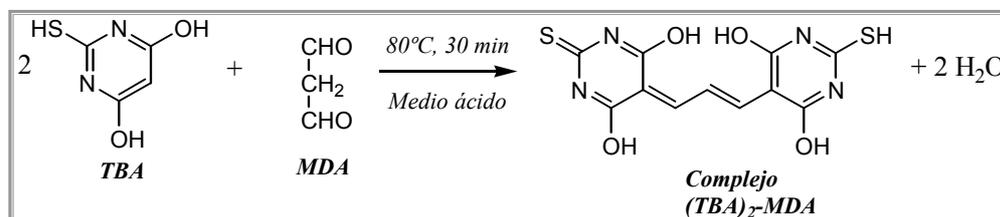
Además, en el caso de los compuestos aislados, se estudió la cinética de esta actividad antirradicalaria, determinando la absorbancia en intervalos de 5 minutos.

#### III.4.1.2.- Inhibición de la peroxidación lipídica microsomal. Test TBA.

Fundamento de la técnica:

La peroxidación lipídica se induce en liposomas de cerebro bovino, mediante la reacción de Fenton, con una fuente de metales ( $\text{FeCl}_3$ ) y ácido ascórbico, y se determina por el test del ácido tiobarbitúrico (TBA) (Uchiyama y Mihara 1978). Este ensayo se basa en el hecho de que la peroxidación de la mayoría de los sistemas de membranas desencadena la formación de malonaldehído libre (MDA) y otros metabolitos, que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA), generándose un complejo coloreado en medio ácido, que puede ser medido espectrofotométricamente (532 nm). El rendimiento de este complejo generado, es proporcional al MDA, y por tanto, a la peroxidación lipídica inducida (Gutteridge, 1982).

La incorporación de un compuesto antioxidante a este ensayo puede reducir la extensión de la peroxidación, generando menor formación de MDA y por tanto, menor formación del producto cromogénico.



Material:

- Extractos de cerebro bovino.
- Muestras: Extractos metanólicos de *Plantago spp*
- Perlas de vidrio de 2 mm de diámetro.
- Baño de ultrasonidos (a 4 °C)
- Tubos Falcon de plástico
- Baño de agua termostatzado (a 37° y 90 °C)
- Pipetas.
- Centrífuga.
- Espectrofotómetro UV-Vis.

Reactivos:

- PBS (solución salina fisiológica).
- Propilgalato
- Ácido ascórbico 1 mM.
- FeCl<sub>3</sub> 1 mM.
- Metanol.
- BHT (2,6-di-tert-butil-4-metoxifenol) en etanol al 2%
- Ácido tiobarbitúrico al 1% en NaOH 50 mM
- HCl al 25%
- n-Butanol.

Descripción de la técnica

En primer lugar, se procedió a la obtención de liposomas, para ello, se preparó una suspensión de extracto de cerebro bovino en PBS (5 mg/mL), añadiéndose perlas de vidrio de 2 mm de diámetro, sonicándose en agua helada hasta que la suspensión se encuentra totalmente homogénea (1-2 h). Es importante mantener el agua siempre a 4°C para evitar la degradación de los liposomas.

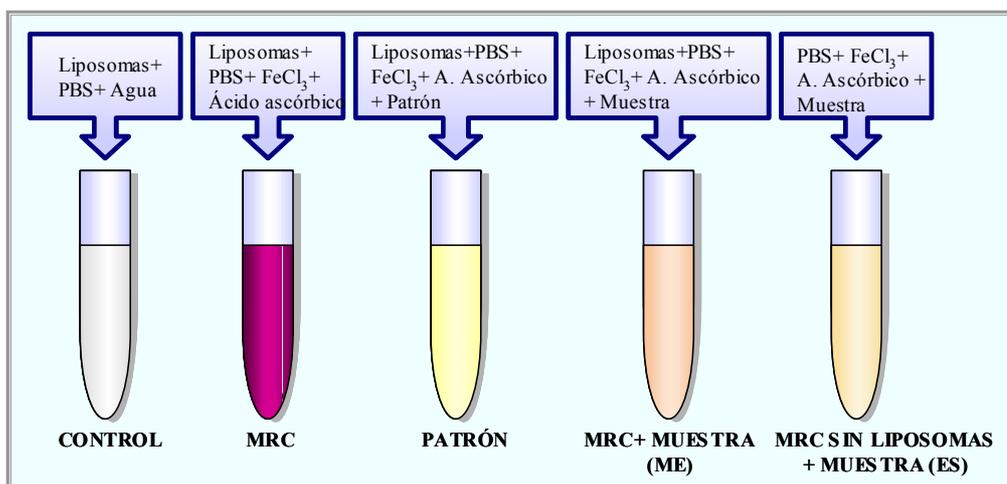
En tubos Falcon de 15 mL se mezclaron 0,2 mL de la solución de liposomas, FeCl<sub>3</sub> 1 mM (0,1 mL), ácido ascórbico 1 mM (0,1 mL), PBS (0,5 mL), y la muestra a evaluar la actividad antioxidante (0,1 mL). Se ensayaron 7 diluciones seriadas 1:3 comprendidas en el rango 1000-1,3 µg/mL. Todos los tubos se incubaron a 37 °C durante 20 minutos. Este ensayo incluye:

-Un control sólo con liposomas, PBS y agua (blanco), de esta forma, cualquier autoperoxidación puede ser detectada y restada del efecto total.

-La mezcla de reacción completa (MRC), contiene liposomas, PBS y los dos generadores de radicales (FeCl<sub>3</sub>, ácido ascórbico); esta mezcla se lleva a cabo para determinar el máximo de peroxidación en ausencia de antioxidantes.

-El control positivo, propilgalato, a la concentración de 10<sup>-4</sup> M. A esta concentración, propilgalato muestra una inhibición de 80-85%, que puede ser utilizada para calcular la precisión entre ensayos.

-Las muestras a ensayar, a diferentes concentraciones, con la mezcla de reacción completa (MRC) y las muestras con MRC sin liposomas, que se incluye para determinar y eliminar los efectos causados por la absorbancia de la propia muestra. Cada concentración se realizó por cuadruplicado.



La reacción se detiene añadiendo 0,1 mL de solución 2% de BHT en etanol, seguido de la adición de ácido tiobarbitúrico (0,5 mL) y 0,5 mL de HCl (25%). Posteriormente, se incubó durante 30 minutos a 90 °C y se dejó enfriar durante 30-60 min. Al final de este periodo de incubación, el ácido tiobarbitúrico habrá formado un complejo coloreado con malonaldehído.

Como la suspensión lipídica puede ser turbia e inestable para el análisis espectroscópico, el cromógeno es extraído con n-butanol, añadiendo 2,5 mL en cada tubo. La mezcla se agita y centrifuga a 3500 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente. La fase butanólica se extrae cuidadosamente de cada muestra en cubetas, y se analizaron por espectrofotometría a 532 nm.

El porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica fue determinado según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \left( \frac{(\text{MRC-B}) - (\text{ME-B-ES})}{(\text{MRC-B})} \right) \times 100$$

- MRC: Densidad óptica (D.O.) de la mezcla de reacción completa (liposomas, FeCl<sub>3</sub>, ácido ascórbico y disolvente).
- B: D.O. del control (sólo liposomas)
- ME: D.O. de la muestra a ensayar (MRC con muestra)
- ES: D.O. del blanco de la muestra, (MRC con muestra sin liposomas).

Los valores de porcentaje de inhibición son representados frente a las concentraciones ensayadas, obteniéndose la correspondiente curva dosis-respuesta. A partir de ésta, se calcula su IC<sub>50</sub> es decir, la concentración en µg/mL de muestra que inhibe la formación de MDA y otros metabolitos en un 50%.

### III.4.2. ENSAYO DE INDUCCIÓN DE LA ENZIMA QUINONA REDUCTASA (QR)

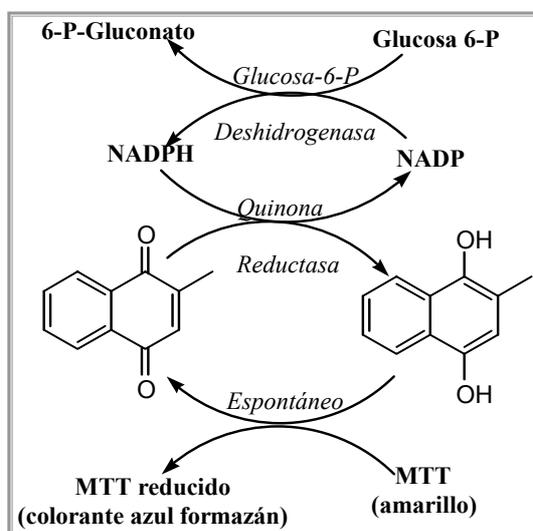
Fundamento de la técnica:

La enzima quinona reductasa (QR), protege a las células frente a la toxicidad de quinonas, que se generan por oxidación de metabolitos fenólicos del benceno, reduciéndolas a hidroquinonas, moléculas fácilmente eliminadas por glucuronidación.

La actividad específica de quinona reductasa (QR) aumenta de forma concomitante con otras enzimas de fase II en diferentes tejidos animales en respuesta a diversos agentes quimiopreventivos.

Esta técnica es un ensayo directo, al medirse la actividad enzimática en células de hepatoma de ratón Hepa 1c1c7, basándose en la producción de color azul cuando MTT [bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio] es reducido de forma no enzimática por menadiol, que es generado enzimáticamente a partir de menadiona por la enzima QR.

Glucosa 6-P y Glucosa 6-P deshidrogenasa continuamente están generando NADPH, que es utilizado por la enzima QR para transferir electrones a menadiona. El menadiol generado reduce MTT a azul formazán, cuya absorbancia puede ser medida en un amplio rango de longitudes de onda (550-640 nm).



Es un bioensayo rápido, preciso, poco costoso y versátil, al poderse ensayar gran número de compuestos en un solo experimento. Se monitoriza la inducción de la actividad QR, y esta respuesta es indicadora de una elevación generalizada de los niveles de enzimas de fase II.

La línea Hepa 1c1c7, posee las características de un tejido normal, particularmente en la capacidad para activar y metabolizar carcinógenos, y se ha comprobado que tiene buena correlación los resultados obtenidos *in vitro* con los posteriores *in vivo* (Prochaska y Santamaria 1988).

#### Material

- Línea celular: Hepa 1c1c7 (hepatoma de ratón)
- Muestras: Extractos metanólicos de *Plantago spp.* y compuestos aislados.
- Incubador, Campana de flujo laminar.
- Frascos de cultivo celular (75 cc), Botellas estériles de vidrio pyrex (125, 500, mL), pHmetro.
- Pipetas, Puntas micropipetas, Micropipetas, Micropipeta multicanal
- Filtros Millipack® 0,22 µm.
- Placas 96 pocillos.
- Lector automático de placas ELISA, mod. BT-2000 (Fisher Biotech) con filtro 595 nm.

#### Reactivos

- α-MEM (medio mínimo esencial de Eagle)
- Suero bovino fetal (FBS)
- Penicilina G sódica (100 U/ml), sulfato de Estreptomicina (100 µg/mL) y Anfotericina B (250 ng/mL).
- HCl 1 N, NaOH 1 M y CO<sub>3</sub>HNa.
- Tripsina-EDTA (0.25% tripsina, 1mM EDTA)
- Dimetil sulfóxido (DMSO)
- Cristal violeta al 2% en etanol
- Dodecil sulfato sódico (SDS) al 0,5% en etanol al 50%.
- Digitonina al 0,8% en EDTA al 2 mM (pH 7,8)
- Tampón tris-HCl 0,5 M (pH 7,4), Tween 20 al 1,5%.
- Flavin adenina dinucleótido (FAD) 7,4 mM en H<sub>2</sub>O.
- Glucosa-6-fosfato (G-6-P) (150 mM).
- Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (NADP) (50 mM).
- Albúmina sérica bovina (BSA)
- MTT [bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-di-fenil tetrazolio]
- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-P-D)
- Menadiona (50 mM en acetonitrilo)

- Bromoflavona

#### Descripción de la técnica

##### *-Medios de cultivo*

Medio:  $\alpha$ -MEM (medio mínimo esencial) sin ribonucleósidos ni deoxirribunucleósidos, suplementado con 10 % FBS, penicilina G sódica (100 U/ml), sulfato de estreptomicina (100  $\mu$ g/mL) y anfotericina B (250 ng/mL).

##### *-Cultivo celular:*

Las células son sembradas en placas de 96 pocillos por duplicado, ya que la actividad QR hay que expresarla en función del número de células, por tanto, en una placa se determinará la actividad enzimática y en la segunda, la viabilidad celular y proteínas totales.

En ambos casos, a cada pocillo se añaden 200  $\mu$ L de una concentración de  $1,5 \times 10^4$  células/mL, teniendo la precaución de no añadir células a la primera columna. Las placas son incubadas 24 h a 37 °C, en atmósfera 5% CO<sub>2</sub> y 100 % humedad.

##### *-Preparación e inoculación de las muestras.*

Transcurrido el periodo de preincubación, se procede a la adición de las muestras. Para ello, se decanta previamente el medio y se añaden las muestras por duplicado (extractos) o triplicado (compuestos) a diferentes concentraciones: 160, 80,40,20,10  $\mu$ g/mL para los extractos, y diluciones seriadas 1:3 para los compuestos, comprendido en el rango 25-0,01  $\mu$ g/mL, el patrón bromoflavona, (ensayándose concentraciones seriadas 1:2 a partir de 4  $\mu$ M) y control de DMSO (conc final 0,5%) disueltos en medio (volumen final 200  $\mu$ L), de acuerdo con el esquema mostrado a continuación:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A					Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4				
B					> conc.							
C					↓							
D												
E												
F												
G												
H					< conc.							

Se incuban otras 48 horas en las mismas condiciones y se procede a la determinación de proteínas y actividad enzimática de QR.

Para la determinación de proteínas totales y la viabilidad celular, se utiliza cristal violeta como colorante, que se va a unir mediante fuerzas electrostáticas a macromoléculas aniónicas, como proteínas, ARN o ADN, sirviendo como un colorante general de la biomasa (Skehan *et al.*, 1990). A cada pocillo, se añaden 200 µL de solución de cristal violeta al 2% en etanol, (previamente se decanta el medio y se elimina) dejándose a temperatura ambiente durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se elimina el colorante mediante lavado con agua de las placas hasta que no queden trazas de colorante y se dejan secar.

Una vez secas las placas, se añaden a cada pocillo 200 µL de solución 0,5% SDS en 50 % de etanol, y se incuban durante 1 h a 37°C, con agitación, hasta que el colorante se haya solubilizado completamente. A continuación se procede a medir en un lector automático de placa a 595 nm.

Para determinar la actividad enzimática de QR, se elimina el medio de la placa, y se incuban con 50 µL/pocillo de digitonina<sup>57</sup> 0,8% en 2mM EDTA (pH 7,8) durante 10 min a 37°C con agitación continua para provocar la lisis celular.

Transcurrido este tiempo, se añaden 200 µL/pocillo de la mezcla de reacción (5 mL de 0,5 M tris HCl (pH 7,4); 1 mL Tween 20 1,5%; 0,1 mL de FAD 7,5 mM en H<sub>2</sub>O; 1mL glucosa-6-fosfato (150 mM); 90 µL NADP (50 mM); 100 mg de albúmina sérica bovina; 45 mg MTT, completando el volumen hasta 15 mL con agua destilada; se añaden 300 U de enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa de levaduras, y justo antes de que la mezcla vaya a ser añadida a la placa, 50 mM de menadiona en

<sup>57</sup> La digitonina es poco soluble en este tampón, por lo que hay que calentar para favorecer la solubilización. En el caso de que se forme precipitado, sólo se utilizará el sobrenadante

acetonitrilo recién preparada). Las placas se agitan a temperatura ambiente 10 minutos y se procede a su lectura en un espectrofotómetro a 595 nm.

A partir de la placa tratada con cristal violeta, se calcula el porcentaje de supervivencia con el parámetro  $IC_{50}$ , concentración necesaria para inhibir el crecimiento en un 50%:

La determinación de la actividad enzimática de QR se calcula como:

- *Actividad enzimática QR* = (D.O muestra - D.O. blanco) x 3247/5.

$$\text{-Actividad enzimática específica QR} = \frac{\text{Actividad enzimática QR}}{\text{Supervivencia}}$$

Con los % de inducción se genera una curva y se calculan las concentraciones requeridas para inducir un incremento del 50% y del 100% de la enzima QR, esta última se denomina como CD (concentración que dobla la inducción de QR).

$$\text{- \% Inducción de la enzima QR} = \left( 1 - \frac{\text{Actividad específica QR en la muestra}}{\text{Actividad específica QR en DMSO}} \right) \times 100$$

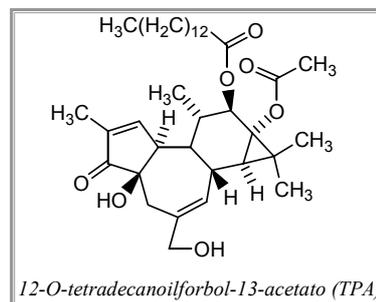
También se calcula el *índice de quimiopreención* = CD /  $IC_{50}$ .

### III.4.3. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA TRANSFORMACIÓN CELULAR (LÍNEA JB6) POR TPA.

Fundamento de la técnica:

La línea celular JB6 (células epidérmicas de ratón) es un sistema bien establecido utilizado extensivamente como modelo *in vitro* para el estudio de la promoción de tumores y actividad antitumoral. El ensayo de inducción de la transformación de células JB6 por TPA es un modelo de transformación irreversible y ha demostrado ser predictivo en el estudio de la carcinogénesis *in vivo* en ratones y en humanos.

El éster de forbol, TPA, aislado a partir del aceite de croton (*Croton tiglium*), induce diferentes respuestas en las células, y provoca transformación neoplásica. Mediante este promotor, la línea no tumorigénica, JB6, se transforma en tumoral (Colburn *et al.*, 1979), detectando la formación de grandes colonias tumorales en agar semisólido.



#### Material

- Línea celular: JB6 (células epidérmicas de ratón)
- Muestras: Extractos metanólicos de *Plantago spp.* y compuestos aislados
- Incubador, Campana de flujo laminar.
- Frascos de cultivo celular (75 cc), Botellas estériles de vidrio pyrex (125, 500, mL), pHmetro.
- Pipetas, Puntas micropipetas, Micropipetas.
- Filtros millipack 0,22  $\mu\text{m}$ .
- Placas 6 pocillos (35 mm diámetro/pocillo).
- Tubos centrífuga 15 mL.
- Baño termostático 40-45 °C.

#### Reactivos:

- Medio mínimo esencial de Eagle (EMEM) con EBSS, sin L-Glutamina.
- Suero bovino fetal (FBS), L-Glutamina 200 mM
- Penicilina G sódica (100 U/ml), Gentamicina 50 mg/mL y Anfotericina B (250 ng/mL).

- HCl 1 N, NaOH 1 M y CO<sub>3</sub>HNa.
- Tripsina-EDTA (0.25% tripsina, 1mM EDTA)
- Bacto-Agar.
- PBS (Tampón salino-fosfato de Dulbecco, sin calcio ni magnesio).
- TPA (16 μM en DMSO) y Dimetil sulfóxido (DMSO)
- Ácido 13 cis-retinoico (1 μM)

Descripción de la técnica: Se ha seguido el protocolo establecido por (Colburn *et al.*, 1979)

*-Medios de cultivo:*

El medio está constituido por (2) EMEM:PBS:FBS (4:1:1), con gentamicina 1%.

El agar, a la concentración de 1,25% en agua bidestilada; se esteriliza en autoclave 15-20 minutos.

*-Cultivo celular:*

La línea celular epidérmica de ratón JB6 fue cultivada en monocapas a 37°C bajo 5% CO<sub>2</sub> en medio EMEM enriquecido (4% FBS, L-Glutamina 2mM, Gentamicina 25 μg/mL y 2,2 g/L NaHCO<sub>3</sub>).

Las células se dejan crecer hasta que alcanzan aproximadamente el 80% de confluencia, momento óptimo para realizar el experimento o para realizar los subcultivos. El mantenimiento de la línea celular se realiza subcultivando alícuotas de  $2 \times 10^4$  células en 10 mL de medio EMEM modificado en frascos de cultivo T25.

Para despegar la monocapa celular del frasco de cultivo, se procede primero al lavado con PBS libre de calcio y magnesio repetidas veces, y a continuación se trata con tripsina-EDTA (0,05%)<sup>58</sup>. Se incuba 5 minutos a 37°C. Tras este tiempo, se resuspende con medio para proceder al contaje y determinar la concentración celular para el ensayo,  $3 \times 10^4$  células/mL.

Se prepara la mezcla agar-medio (4:6), cuando el agar haya alcanzado la temperatura de 40°C. Hay que procurar que, durante todo el experimento, la temperatura de esta mezcla permanezca constante, para evitar su solidificación. Se distribuyen 3 mL de esta mezcla en cada uno de los 6 pocillos de la placa y se deja reposar en condiciones estériles hasta que se consigue la completa solidificación (aprox. 6-8 horas). Para cada compuesto a ensayar, se utilizarán tres pocillos.

---

<sup>58</sup> Hay que tener en cuenta que, trazas de medio con FBS pueden interferir en la acción de la tripsina, de ahí la importancia de lavar cuidadosamente con PBS.

A continuación, dentro de la cabina de flujo laminar, se preparan tubos estériles de 15 mL, que se disponen en un baño termostatzado a 40-45 °C, y se mezclan 3 mL de medio:agar con 1,5 mL de células (la concentración final de células  $3 \times 10^4$  células/mL), pipeteando numerosas veces para homogeneizar la mezcla, evitando la formación de burbujas; esta mezcla, por tanto, tiene una suspensión celular con agar:medio al 0,33%.

*-Preparación e inoculación de las muestras.*

En los tubos se añaden los diferentes tratamientos, así, en el blanco, sólo se añade DMSO (0,1%), en el control, el agente promotor de tumores, (4,5 µL de TPA a 16 µM; concentración final, 10 nM), y los grupos de los extractos/compuestos a ensayar (4,5 µL), disueltos en DMSO junto con TPA (misma cantidad que el grupo control) Las concentraciones finales ensayadas fueron 4 µg/mL para los extractos y 4, 2, 1 y 0,5 µg/mL para los compuestos aislados. Como patrón positivo de la inhibición de la transformación celular, se utilizó ácido 13-cis retinoico (concentración final, 1µM). Distribuimos 1 mL de esta mezcla en cada pocillo (ya contenía la mezcla de agar:medio solidificado) se deja reposar durante 20-30 minutos y se incuban durante 14 días a 37°C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> 95% aire.

Tras este período de tiempo se procede al recuento de colonias para determinar la frecuencia de transformación, siguiendo la siguiente fórmula:

*-Frecuencia de transformación celular (FT)*=Promedio nº colonias (agrupaciones de más de 16 células) contadas en 3 áreas de 0.25 cm<sup>2</sup> elegidas al azar, en cada pocillo y por triplicado para cada grupo de tratamiento.

*-Frecuencia relativa de transformación celular (%FT)*=
$$\frac{\text{N}^\circ \text{ colonias compuesto} - \text{N}^\circ \text{ colonias DMSO}}{\text{N}^\circ \text{ colonias TPA} - \text{N}^\circ \text{ colonias DMSO}}$$

*- %Inhibición de la frecuencia de transformación:* Inversa de %FT

Paralelamente a este ensayo, se determina si el compuesto es citotóxico, (si es positivo, la inhibición de la transformación celular no se deberá a propiedades quimiopreventivas, sino a su actividad citotóxica).

#### **III.4.4. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA INDUCCIÓN DE ORNITINA DESCARBOXILASA (ODC) POR TPA.**

Fundamento de la técnica:

El principio básico de este ensayo radica en la capacidad que tiene el promotor de tumores, TPA (12-O- tetradecanoil-forbol-13-acetato) para inducir la actividad de ODC, basándose en la medida de la liberación de [<sup>14</sup>C] CO<sub>2</sub> a partir de L-[1-<sup>14</sup>C] ornitina. Esta técnica permite una estimación lineal y cuantitativa de la proteína ODC activa en las células.

Material

- Línea celular epidermis de ratón (JB6), no tumorigénica, proporcionada por Universidad de Illinois en Chicago (UIC)
- Muestras: Extractos metanólicos de *Plantago spp.* y compuestos aislados (4 mg/mL en DMSO).
- Incubador, Campana de flujo laminar.
- Frascos de cultivo celular (75 y 125 cc), Botellas estériles de vidrio pyrex (125, 500, mL)
- pH metro y hematocitómetro.
- Pipetas, Puntas micropipetas, Micropipetas.
- Filtros Millipack<sup>®</sup> 0,22 µm.
- Placas de cultivo de 24 pocillos.
- Papel de parafina.
- Jeringas 1 mL.
- Discos de papel de filtro Whatmann<sup>®</sup> p 81
- Placas de plástico de 24 pocillos para centelleo.
- Lector de centelleo.

Reactivos

- Medio mínimo esencial sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup>. (S-MEM)
- Suero bovino fetal (FBS), L-Glutamina 200 mM
- Penicilina G sódica (100 U/ml), sulfato de Estreptomicina (50 mg/mL) y Anfotericina B (250 ng/mL).

- Solución de aminoácidos no esenciales (NAA) (10 mM, 100X)
- HCl 1 N, NaOH 1 M y CO<sub>3</sub>HNa.
- Tripsina-EDTA (0.25% tripsina, 1mM EDTA)
- PBS (Tampón salino-fosfato de Dulbecco, sin calcio ni magnesio).
- TPA (0,4 mM en DMSO) y Dimetil sulfóxido (DMSO)
- L-[1-<sup>14</sup>C]Ornitina (56 mCi/mmol, 100 uCi/mL).
- Tampón fosfato sódico (0,2 M, pH 7,2)
- EDTA (12,5 mM, pH 8,0)
- Ditiotreitól (DTT, solución acuosa 50 mM).
- Piridoxal fosfato (5 mM en solución NaOH 10 mM)
- L-ornitina (78 µg/mL)
- Ácido tricloroacético (TCA) 5 N.

#### Descripción de la técnica

##### *-Cultivo celular*

Las células JB6 se cultivaron en medio S-MEM (medio mínimo esencial) enriquecido con aminoácidos no esenciales (1 %) ,FBS (5%), Ca<sup>2+</sup> (0,05 mM) y penicilina-estreptomomicina-anfotericina B (1%), a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

Cuando los cultivos han alcanzado la confluencia, se lavan con PBS libre de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>, y se añade nuevo medio de cultivo. Tras 24 h, las células se tratan con tripsina-EDTA y se siembran en placas de 24 pocillos a la densidad inicial de 2 x 10<sup>5</sup> células/mL/pocillo, incubándose por 18 h en las mismas condiciones.

##### *-Preparación e inoculación de las muestras.*

Se añaden 5 µL de las muestras, extractos de *Plantago spp.* o compuestos aislados por duplicado, ( a la concentración de, 100 µg/mL o 20 µg/mL respectivamente), de forma simultánea con 20 µL de TPA (sol stock<sup>59</sup>, 0,4 mM en DMSO), incubando de nuevo durante 6 horas en las mismas condiciones que anteriormente. Los ensayos son realizados frente a un control DMSO y otro con TPA.

---

<sup>59</sup> La solución stock debe alicuotarse en viales protegidos de la luz y almacenarlos a -80 °C. no es conveniente la reutilización una vez descongelado para diferentes experimentos.

Transcurrido este tiempo, las células se lavan con PBS libre de calcio y magnesio decantando previamente el medio, y se congela inmediatamente manteniendo las placas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta que se lleve a cabo el ensayo de la actividad ODC<sup>60</sup> (Schipper y Verhofstad 2002).

Para la determinación de la actividad enzimática ODC se siguió la técnica descrita por Lichti y Gottesman (1982), ensayando directamente en las placas de 24 pocillos. Las células congeladas fueron lisadas, ya que la mayor cantidad de ODC se localiza en el citoplasma y núcleo, para ello, bastó con introducir las placas congeladas en un baño termostatzado a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 2 min. La lisis es originada por el cambio brusco de temperatura.

A continuación, se añade a cada pocillo la mezcla de sustrato y cofactores, constituida por 200  $\mu\text{L}$  que contiene 2  $\mu\text{L}$  de L-[1- $^{14}\text{C}$ ] ornitina, 50  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato sódico, 16  $\mu\text{L}$  de EDTA, 10  $\mu\text{L}$  de ditiotreitól, 4  $\mu\text{L}$  de piridoxal fosfato y 118  $\mu\text{L}$  de L-ornitina fría.

A continuación las placas son cubiertas con papel de parafina donde previamente se han realizado unos orificios que corresponden con el centro de cada pocillo, presionando para formar una oquedad sobre cada pocillo. Cada oquedad es cubierta por un disco de papel Whatmann de 1,27 cm de diámetro, y se añade a cada uno 30  $\mu\text{L}$  de NaOH 1N, consiguiendo la humectación de cada filtro.

Las placas son cubiertas con una nueva capa de papel de parafina esta vez intacta. Todo el sistema, se cubre con la correspondiente cubierta de la placa y se asegura con bandas de goma.

El [ $^{14}\text{C}$ ]  $\text{CO}_2$  liberado es capturado por los discos de papel durante la incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  1 hora y en agitación continua.

Tras este tiempo, la reacción es detenida por adición de 50  $\mu\text{L}$  de TCA 5N a cada pocillo con ayuda de una jeringa de insulina, punzando con ésta cerca del borde de cada pocillo a través de los pliegues de parafina. A continuación, se vuelve a sellar todo con cinta adhesiva, se cubre y se vuelve a asegurar con las bandas elásticas. Las placas se vuelven a depositar en el incubador, en agitación, por otra hora más, para permitir la absorción de [ $^{14}\text{C}$ ]  $\text{CO}_2$  por la solución de NaOH que previamente se añadió a los discos de papel.

Los discos de papel fueron depositados en una placa de plástico de 24 pocillos para la medida de la radioactividad captada mediante un contador de centelleo.

En el caso de que se obtengan resultados positivos, (inhibición de ODC, por tanto, reducción de los niveles de radioactividad), se procede a la determinación de la concentración proteica en cada

---

<sup>60</sup> La vida media de ODC es de minutos a una hora, siendo la enzima con menor vida media de las enzimas conocidas.

pocillo, al tener que expresarse los resultados en función de la cantidad de proteína, ya que puede que la muestra induzca muerte celular también.

La concentración total de proteínas se determinó mediante la técnica de Lowry (1951). La densidad óptica se leyó a 660 nm en placas de 96 pocillos, utilizándose albúmina sérica bovina como patrón.

Los resultados del ensayo se calcularon como  $\text{nmol } ^{14}\text{CO}_2/\text{mg proteína/hora}$  y expresados como porcentaje en relación con los controles (DMSO y TPA). A partir de las curvas dosis respuesta, se calcula la  $\text{IC}_{50}$ .

Para realizar estos cálculos hay que realizar conversión de unidades, ya que la lectura de radioactividad es proporcionada por el lector como dpm (desintegraciones por minuto).

$$1\text{bq}=1 \text{ desintegración/segundo (dps)}=2,7 \times 10^{-11} \text{ Ci}=60 \text{ desintegraciones/minuto (d.p.m.).}$$

Primero se transforman las dpm en Ci, y a continuación, teniendo en cuenta la actividad específica de la ornitina radiactiva, 55 mCi/mmol, se realiza la última transformación de Ci a mmoles.

### **III.4.5. ACTIVIDAD ESTROGÉNICA-ANTIESTROGÉNICA**

#### **III.4.5.1.- DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD POR AFINIDAD A LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS**

Fundamento de la técnica:

Determinados compuestos, como los fitoestrógenos, han mostrado ofrecer protección frente a tumores dependientes de estrógeno, o enfermedades cardíacas. La mayoría de los fitoestrógenos se unen a los receptores estrogénicos con menor afinidad que el estradiol (Stahl *et al.*, 1998), y son débilmente estrogénicos (Markaverich y Gregory 1993; Sathyamoorthy *et al.*, 1994). El descenso de incidencia de cáncer de mama en mujeres asiáticas, con una dieta rica en soja, que contiene una cantidad importante de fitoestrógenos (Messina *et al.*, 1994) ha sido asociado con la capacidad de éstos de antagonizar los efectos del estradiol (Makela *et al.*, 1995). Puede que estos compuestos ejerzan su acción vía unión a receptores estrogénicos o por una vía independiente (Le Bail *et al.*, 2000; Zava y Duwe 1997).

Material

- Receptores humanos recombinantes ER- $\alpha$  (contenido específico 5000 pmol/mg; 0,44 mg/mL proteína), ER- $\beta$  (contenido específico, 6098 pmol/mg; 0,36 mg/mL proteína), obtenidos por PanVera Co. (Madison).
- Muestras: Extractos metanólicos de *Plantago spp.* y compuestos aislados.
- Tubos eppendorf 1,5 mL
- Microcentrífuga.
- Viales y contador de centelleo líquido.

Reactivos

- Hidroxiapatita.
- Alcohol etílico 96°.
- Tampón TE [50 mM Tris-HCl (pH 7,4) y 1mM EDTA]
- [2,4,6,7-<sup>3</sup>H] estradiol (E<sub>2</sub>) (25  $\mu$ M; 83 Ci/mmol.) y 17- $\beta$ -estradiol.
- Tampón de unión [10 mM-Tris-HCl (pH 7,5); 10% glicerol, 2mM ditiotreitol y 1mg/mL albúmina bovina sérica]

- Tampones de lavado de receptores:
  - α: 40 mM tris-HCl, (pH 7,5), 100 mM KCl, 1mM EDTA y 1 mM EDTA
  - β: 40 mM tris-HCl (pH 7,5)
- Líquido de centelleo Cytoscint®

#### Descripción de la técnica:

Para determinar la unión del estradiol con los receptores, se siguió el protocolo de Obourn y cols. (Obourn *et al.*, 1993) modificado por Bhat y Pezzuto (Bhat y Pezzuto 2001).

Se prepararon, 24 h previas al ensayo, una emulsión de hidroxapatita 50% v/v (utilizando 10 g de hidroxapatita/60 mL de tampón TE), manteniéndola a 4°C, el tampón de unión a receptores estrogénicos, así como los tampones de lavado del receptor estrogénico ER-α y ER-β.

“La mezcla de reacción” consiste en 5 μL del receptor estrogénico en el tampón de unión al 1:20, 5μL de una solución preparada con (3,2 μL de estradiol marcado [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>, 98,4 μL etanol y 98,4 μL de tampón de unión ER), completando hasta 95 μL con tampón de unión.

Para los estudios de unión a los receptores estrogénicos, se añadieron a 95 μL de “la mezcla de reacción”, 5 μL de las muestras a ensayar (extractos metanólicos de *Plantago spp.*, y compuestos aislados, 4 mg/mL en DMSO), así como estradiol. Las muestras fueron ensayadas por duplicado.

La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, durante 2 h. A continuación, se añaden 100 μL de hidroxapatita al 50%, y los tubos se mantuvieron en hielo durante 15 min, centrifugando cada 5 min. Se añade 1 mL de los respectivos tampones de lavado en los tubos, se agitan y centrifugan a 2000x g durante 5 min. El sobrenadante es desechado, repitiéndose este proceso de lavado 3 veces.

El precipitado (hidroxapatita con estradiol) se resuspende en 200 μL de etanol, y se transfiere a viales añadiendo 4 mL de Cytoscint (líquido de centelleo), para el conteo de la radioactividad (desintegraciones por minuto).

Todos los ensayos se llevaron a cabo frente a un blanco, sin receptor.

Paralelamente, se prepara un control con “la mezcla de reacción” y un exceso de estradiol (300 veces superior) para determinar la unión no específica.

El porcentaje de estradiol marcado que se une al receptor es determinado como:

$$\% \text{ Unión} = \left( \frac{(\text{dpm muestra} - \text{dpm blanco})}{(\text{dpm DMSO} - \text{dpm blanco})} \right) - 1 \times 100$$

Representándose los % de unión obtenidos para cada muestra.

#### III.4.5.2.- DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD EN LA LÍNEA CELULAR DE ISHIKAWA.

Fundamento de la técnica:

Clásicamente, la actividad estrogénica se ha ensayado *in vivo* con roedores, o bien, a partir de receptores aislados de levaduras. La utilización de receptores aislados tienen la ventaja de la rapidez, pero, los datos obtenidos no indican si un compuesto que interacciona con el receptor mimetiza o inhibe la respuesta biológica, sin embargo, con la línea Ishikawa (carcinoma de endometrio humano) esto se puede diferenciar, al mismo tiempo que se puede ensayar la citotoxicidad en esta línea tumoral. En esta línea celular, la expresión y actividad de la enzima fosfatasa alcalina está bajo estricto control estrogénico a nivel transcripcional (Albert *et al.*, 1990). Estradiol origina un incremento en la actividad de la enzima fosfatasa alcalina en células de Ishikawa, y su respuesta puede ser inhibida por antiestrógenos (Pisha y Pezzuto 1997) Esta enzima cataliza la formación de p-nitrofenol a partir de p-nitrofosfato.

Material

- Línea celular de **Ishikawa**<sup>61</sup> (carcinoma de endometrio humano), proporcionada por Department of Medicinal Chemistry, de School of Pharmacy of UIC (Universidad de Illinois en Chicago).
- Muestras: Extractos metanólicos de *Plantago spp.* y compuestos aislados.
- Incubador, Campana de flujo laminar.
- Frascos de cultivo celular (75 y 125 cc), Botellas estériles de vidrio pyrex (125, 500, mL)
- Tubos de centrifuga 50 mL estériles. Centrifuga baja velocidad.
- pH metro. Hematocitómetro.
- Pipetas, Puntas micropipetas, Micropipetas, Micropipeta multicanal.
- Filtros Millipack® 0,22 µm.

<sup>61</sup> Es de destacar que tras 30 subcultivos, las células pueden perder su capacidad de inducción de la enzima fosfatasa alcalina, por tanto, es conveniente conservar células que no hayan sido subcultivadas en nitrógeno líquido.

- Placas de cultivo de 96 pocillos.
- Lector ELISA con filtros de 515 y 405 nm Mod. BT 2000 con Kin Calc 1.1200

#### Reactivos

- Medio DMEM/F12 y DMEM/F12 libre de rojo fenol
- Suero bovino fetal (FBS). Piruvato sódico (100 mM)
- Penicilina G sódica (10 U/mL)-sulfato de Estreptomicina (10 µg/mL)-Anfotericina B (0,25 µg/mL).
- Carbón activo. Dextrano. GlutaMAX-1
- Cloruro sódico. Cloruro potásico. Fosfato sódico dibásico. Fosfato potásico monbásico
- HCl 1 N, NaOH 1 M y CO<sub>3</sub>HNa.
- Tripsina-EDTA (0.25% tripsina, 1mM EDTA)
- PBS (Tampón salino-fosfato de Dulbecco, sin calcio ni magnesio).
- Metanol. Dimetil sulfóxido (DMSO)
- 17- β-estradiol. Tamoxifeno
- Trizma Base. Tritón X-100. Nitrofenolfosfato
- Ácido tricloroacético (TCA) 20%.
- Ácido acético (1%). Sulforhodamina B (0,4% en ácido acético al 1%).

#### Descripción de la técnica (Pisha y Pezzuto 1997):

Cuando las células son tratadas, en medio libre de estrógenos con los compuestos, sin presencia de estradiol, el incremento de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina, indicará que tienen actividad estrogénica. Si por el contrario, no se induce dicha actividad, y además, disminuye la actividad de la enzima cuando las células son tratadas con los compuestos en presencia de estradiol, significará que el compuesto se comporta como antagonista estrogénico. Por último, si el compuesto en presencia de estradiol, induce la actividad de la enzima fosfatasa, indicará que el compuesto muestra un efecto sinérgico con éste.

#### *-Preparación de las soluciones:*

Para eliminar cualquier traza de estrógeno del suero bovino fetal (FBS), se añade a 500 mL de FBS, 1 g de carbón activo y 0,1 g de dextrano y se mezcla. Se calienta la solución a 60 °C durante 30

min, agitando de vez en cuando. Dejándose enfriar a temperatura ambiente. El precipitado de carbón activo y dextrano se separa por centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos a 38 °C; se repite el proceso con el sobrenadante obtenido.

El sobrenadante obtenido se esteriliza por filtración y se distribuye en alícuotas de 50 mL conservándose a -20°C.

#### *-Medios de cultivo*

Medio de mantenimiento: El medio DMEM/F12 se suplementa con 10% de FBS inactivado por calor (50 mL), piruvato sódico (5 mL), penicilina-estreptomicina (5 mL) y glutaMAX-1 (5 mL). Se conserva a 4°C.

Medio de ensayo- libre de estrógenos. El medio DMEM/F12 libre de rojo fenol se suplementa con 10% FBS libre de estrógenos (50 mL), piruvato sódico (5 mL) penicilina G-estreptomicina-anfotericina B (5 mL) y glutaMAX-1 (5 mL). También se mantiene a 4°C.

Tampón Tris-HCl: A 1 L de agua desionizada y destilada se añade 12,1 g de Trizma (0,1 M) y se ajusta el pH a 9,8.

#### *-Cultivo celular*

La línea celular de Ishikawa fue cultivada en monocapa a 37°C bajo 5% CO<sub>2</sub> en medio de mantenimiento, renovando éste cada 3 días, hasta que las células hayan alcanzado el 80%-90 % de confluencia, momento óptimo para realizar el experimento. 24 horas previas a la realización del ensayo, se cambia el medio por el libre de estrógenos.

Para despegar la monocapa celular del frasco de cultivo, se procede primero al lavado con PBS libre de calcio y magnesio repetidas veces, y a continuación se trata con tripsina-EDTA (0,05%)<sup>62</sup>. Se incuba 5 minutos a 37°C. Tras este tiempo, se resuspende con medio para proceder al conteo y determinar la concentración celular.

Para ensayar la actividad estrogénica-antiestrogénica, es necesaria una concentración celular de  $26 \times 10^6$  células/mL (concentración final  $5 \times 10^4$  células /pocillo). Para cada ensayo de inducción, hay que hacer el correspondiente de citotoxicidad. ( $5 \times 10^6$  células /mL, concentración final,  $10^3$  células /pocillo), teniendo en cuenta que el ensayo de citotoxicidad tiene placa cero.

---

<sup>62</sup> Hay que tener en cuenta que, trazas de medio con FBS pueden interferir en la acción de la tripsina, de ahí la importancia de lavar cuidadosamente con PBS.

Se añade 190  $\mu$ L de la correspondiente solución de células a los pocillos y se incuban durante 24 horas a 37°C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>.

*-Preparación e inoculación de las muestras:*

Las muestras a ensayar (extractos metanólicos de *P. afra*, *P. bellardii*, *P. coronopus*, *P. lagopus*, *P. lanceolata* y *P. serraria* y compuestos aislados) se disuelven en DMSO a la concentración de 4 mg/mL. Las concentraciones finales ensayadas, en el caso de los extractos son 20, 10 y 5  $\mu$ g/mL, y para los compuestos, 20, 10, 5 y 2,5  $\mu$ g/mL. La concentración final de DMSO en este ensayo ha de ser inferior a 0,1%.

Cada placa de ensayo de actividad estrogénica, debe tener un control celular (blanco), otro con el disolvente (DMSO), un control con estrógeno y otro con antiestrógeno, tamoxifeno. Para la determinación de la actividad antiestrogénica, las diluciones de las muestras y controles en este último caso, deben realizarse con medio suplementado con estrógeno ( $2 \times 10^{-8}$  M).

Se añaden 10  $\mu$ L de cada una de las muestras a los 190  $\mu$ L de medio con células previamente preparado, por triplicado. Las placas se incuban a 37°C bajo atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>, durante 4 días.

Transcurrido este tiempo, se procede al análisis de las mismas.

*-Medida de inducción:*

Eliminar el medio de las placas mediante un rápido volteado. Se lavan las placas 3 veces con PBS no estéril, dejándolas secar para suprimir las trazas de PBS, y se añaden 50  $\mu$ L solución de Triton X-100 (0,1 % en tampón Tris-HCl 0,1 M). Pueden almacenarse a -80 °C hasta que se mida la inducción ya que las células son estables durante varias semanas.

Dejar que las placas alcancen la temperatura ambiente, empleando un baño termostático a 37°C. Se añaden 150  $\mu$ L de sustrato nitrofenilfosfato (1 mg/mL en tampón Tris-HCl 0,1 M ) a cada pocillo, se agita durante 30 segundos y se lee la absorbancia en un lector automático de placas de forma cinética, obteniendo una lectura cada 15 seg y 10 seg de agitación entre lecturas, hasta obtener 16-20 lecturas de las placas (8 minutos).

El soporte informático acoplado al lector automático de placa permite calcular la cinética de formación de p-nitrofenol. Para las determinaciones de la actividad estrogénica, se calcula el porcentaje de formación de p-nitrofenol inducido por las muestras, comparándolo con el inducido por el control de estrógenos, utilizando la ecuación siguiente:

$$\% \text{ Inducción} = \left( \frac{(\text{D.O. de la muestra} - \text{D.O. del DMSO})}{(\text{D.O. de estrógeno} - \text{D.O. del DMSO})} \right) \times 100$$

La CE<sub>50</sub> se calcula en las muestras que posean un porcentaje de inducción > 50%

Para la actividad antiestrogénica, se calcula la reducción del porcentaje de inducción de formación de p-nitrofenol comparándolo con el control DMSO, utilizando la ecuación:

$$\% \text{ Inducción} = \left( \frac{(\text{D.O. de la muestra} - \text{D.O. de células})}{(\text{D.O. del DMSO} - \text{D.O. de células})} \right) \times 100$$

Al igual que en el caso anterior, se calculará la CI<sub>50</sub> en las muestras que muestren un porcentaje de inhibición de la inducción > 50%.

*-Ensayo de citotoxicidad.*

La citotoxicidad y % de crecimiento celular se determinó utilizando la técnica del SRB. (Ver apartado III.5.1.)

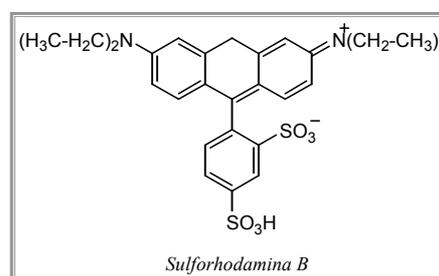
### III.5. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

#### III.5.1. CULTIVOS CELULARES. TEST DE LA SULFORHODAMINA B (SRB).

Fundamento de la técnica:

El NCI (Instituto Nacional del Cancer en EEUU) desarrolló un método de ensayo *in vitro* para compuestos antitumorales basándose en la tinción con sulforhodamina B (SRB). Este método mide el contenido proteico celular de cultivos adherentes o en suspensión en placas de 96 pocillos, según la técnica descrita por Monks y cols (1991). El SRB es un colorante aminoxanteno de color rosa, con dos grupos sulfónicos (Skehan *et al.*, 1990). Estos grupos sulfónicos que se unen de forma electrostática con los residuos de los aminoácidos básicos de las proteínas en condiciones ligeramente ácidas.

Material:



- Líneas celulares tumorales humanas:
  - **TK-10** (adenocarcinoma renal), **MCF-7** (adenocarcinoma de mama), **UACC-62** (melanoma), proporcionadas por el Dr. Cragg, del Departamento de Productos Naturales del NCI (Instituto Nacional del Cáncer, Maryland, EEUU).
  - **Col-2** (carcinoma de colon) y **Lu-1** (carcinoma de pulmón), establecida por el Department of Surgical Oncology, del College of Medicine of UIC (Universidad de Illinois en Chicago).
  - **KB** (carcinoma epidermoide de boca), **LNCaP** (carcinoma de próstata dependiente de hormonas) e **Ishikawa** (carcinoma de endometrio humano) obtenidas de la colección americana de cultivos y proporcionadas por Universidad de Illinois en Chicago, (UIC).
  - **COLR-23** (carcinoma humano de pulmón), proporcionada por King's College (Londres)
- Muestras: Extractos metanólicos de *Plantago spp.* y compuestos aislados.
- Incubador. Campana de flujo laminar.
- Frascos de cultivo celular (75 y 125 cc). Botellas estériles de vidrio pyrex (125, 500, mL)
- Tubos de centrifuga 50 mL estériles. Centrifuga baja velocidad.
- pH metro. Hematocitómetro.
- Pipetas, Puntas micropipetas, Micropipetas, Micropipeta multicanal.
- Filtros Millipack 0,22 µm.
- Tubos eppendorf 1,5 mL.

- Placas de cultivo de 96 pocillos.
- Espectrofotómetro automático de placa: Lector ELISA con filtros 495 ó 515 (modelo BT 2000, Fisher Biotech) y modelo Multiskan Ex 355 (Labsystems)

#### Reactivos

- Medio MEME: Medio mínimo esencial con sales de Earle y L-glutamina.
- Medio DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco, alto en glucosa con L-glutamina y 110 mg de piruvato sódico.
- Medio RPMI 1640: Medio libre de rojo fenol.
- Medio DMEM/F12 y DMEM/F12 libre de rojo fenol
- Suero bovino fetal (FBS).
- Suero bovino y de ternera (BCS)
- Suero bovino fetal libre de hormonas (HS-FBS)
- Piruvato sódico (100 mM)
- Penicilina G (10 U/mL)-sulfato de Estreptomicina (10 µg/mL)-Anfotericina B (0,25 µg/mL).
- PenicilinaG-Estreptomicina (PS)
- Penicilina G-Estreptomicina-Fungizona (PSF)
- Carbón activo, Dextrano, GlutaMAX-1
- Cloruro sódico, Cloruro potásico, fosfato sódico dibásico, fosfato potásico monbásico.
- HCl 1 N, NaOH 1 M y CO<sub>3</sub>HNa.
- Tripsina-EDTA (0.25% tripsina, 1mM EDTA)
- PBS (Tampón salino-fosfato de Dulbecco, sin calcio ni magnesio).
- Metanol, dimetil sulfóxido (DMSO)
- Gentamicina (50 µg/mL) 0.1% (G)
- Etopósido, 17- β-estradiol, testosterona.
- Ácido tricloroacético al 20% y 50% (TCA).
- Ácido acético glacial (1%), Sulforhodamina B (0,4% en ácido acético al 1%).
- Tampón Tris base [tris(hidroximetil)aminometano] 10mM

Descripción de la técnica

-Preparación de soluciones.

Línea celular	Medio	Suero	NaHCO <sub>3</sub> (g/L)	NAA (mL/L)	Antibiótico (10 mL/L)	Otros
<b>TK-10</b>	RPMI 1640	FBS (20%)	-	Glutamina (2mM)	PS	-
<b>MCF-7</b>	RPMI 1640	FBS (20%)	-	Glutamina (2mM)	PS	-
<b>UACC-62</b>	RPMI 1640	FBS (20%)	-	Glutamina (2mM)	PS	-
<b>Col-2</b>	MEME	FBS 10%	2,2	10	PSF	-
<b>LU-1</b>	MEME	FBS 10%	2,2	10	PSF	-
<b>KB</b>	DMEM	BCS	3,7	-	PSF	-
<b>LNCaP</b>	RPMI 1640	HF-FBS 10%	2,0	-	PSF	0,1 nM testosterona**
<b>Ishikawa</b>	DMEM/f12	FBS (10%)	-	-	-	Piruvato sódico (5 mL) GlutaMAX-1 (5 mL)
<b>JB-6</b>	EMEM	FBS (10%)	2,2	Glutamina (2mM)	G (25 µg/mL)	-
<b>CORL-23</b>	RPMI 1640	FBS (10%)	-	Glutamina (2mM)	PS	-

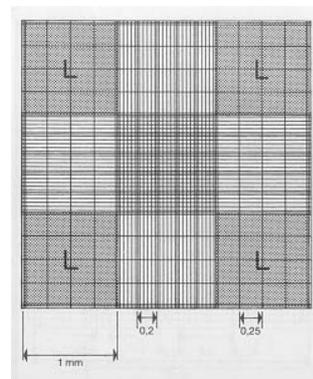
NAA: Aminoácidos no esenciales MEM.

-Cultivo celular:

Las líneas celulares fueron cultivadas en monocapa a 37°C bajo 5% CO<sub>2</sub> en su medio correspondiente, renovando éste cada 3 días, hasta que las células alcanzaron el 80%-90 % de confluencia, momento óptimo para realizar el experimento.

Para despegar la monocapa celular del frasco de cultivo, se procede primero al lavado con PBS libre de calcio y magnesio repetidas veces, y a continuación se trata con tripsina-EDTA (0,05%)<sup>63</sup>. Se incubó 5 minutos a 37°C. Tras este tiempo, se resuspende con medio para proceder al conteo y determinar la concentración celular.

Para determinar la densidad de las células se emplean diferentes técnicas, desde la simple cámara de conteo celular o hematocitómetro, de la que existen numerosas variantes, (cámara de Neubauer), hasta equipos automáticos de conteo celular como el "Counter Coulter". Una cámara de conteo celular es un dispositivo en el que se coloca una muestra de la suspensión a medir. El dispositivo presenta unas señales



<sup>63</sup> Hay que tener en cuenta que, trazas de medio con FBS pueden interferir en la acción de la tripsina, de ahí la importancia de lavar cuidadosamente con PBS.

que determinan un volumen conocido ( $\mu\text{L}$ ). Al contar bajo el microscopio el número de partículas presentes en ese volumen se puede determinar la densidad de partículas en la suspensión de origen.

Tras el conteo, se hacen las diluciones oportunas para lograr las apropiadas densidades de células, según la línea celular. (ver tabla), sembrando 100  $\mu\text{L}$  de solución celular en cada pocillo. Las placas son preincubadas durante 24 h a 37°C

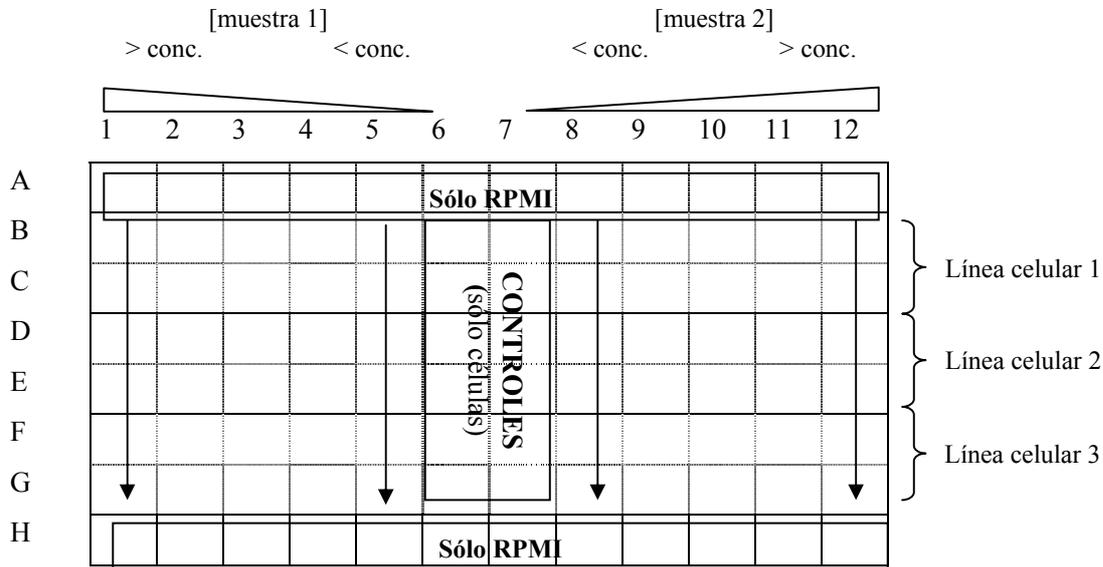
Línea celular	Densidad de células por pocillo (células/mL)
TK-10	$15 \times 10^4$
MCF-7	$5 \times 10^4$
UACC-62	$100 \times 10^4$
Col-2	$6-7 \times 10^4$
Lu-1	$5 \times 10^4$
KB	$3 \times 10^4$
LNCaP	$6-7 \times 10^4$
Ishikawa	$5 \times 10^6$
JB6	$8 \times 10^4$
CORL- 23	$1 \times 10^4$

*-Preparación e inoculación de las muestras.*

Se debe realizar una placa extra de referencia, de células inoculadas e incubadas (24 h) y fijadas con TCA justo antes del tratamiento con los compuestos, que se le conoce como placa a tiempo cero.

Las muestras se solubilizaron inicialmente en DMSO a la concentración de 40 mg/mL (extractos) y 40 mM (compuestos aislados). Los extractos no fueron filtrados ni esterilizados, pero la contaminación microbiana fue controlada mediante la adición de gentamicina en el medio (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Los extractos y compuestos son ensayados a cinco diluciones seriadas logarítmicamente en el medio correspondiente (250, 25, 2,5, 0,25 y 0,025  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para los extractos y  $10^{-4}$  M,  $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M y  $10^{-8}$  M). Hay que tener en cuenta que, la concentración final de DMSO nunca debe ser superior al 0,25% (v/v).

Tras la preparación de estas diluciones de las muestras en estudio, se añaden 100  $\mu\text{L}$  de cada una a los pocillos correspondientes, de acuerdo con el esquema mostrado a continuación. El volumen final en cada pocillo será, por tanto de 200 $\mu\text{L}$ . Cada concentración es ensayada por duplicado o triplicado.



La incubación se llevará a cabo durante 2 días a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 100 % de humedad relativa.

Terminado el periodo de tratamiento, se procede a la fijación de las células al soporte de la placa, mediante la adición de 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) 50% en frío (4°C). Las placas se incubaron a esta temperatura durante 1 hora y después, se lavó 5 veces con agua para eliminar los restos del ácido y otras sustancias. Las placas fueron secadas al aire y almacenadas a 4 °C hasta su uso.

Las células, una vez fijadas con TCA, se tiñen con SRB 0,4% (p/v) en 1% de ácido acético durante 30 minutos. Tras este periodo, el SRB fue eliminado y los cultivos se lavaron con ácido acético al 1% para eliminar restos de colorante. Tras el secado óptimo el colorante unido a las proteínas fue solubilizado en tampón Tris Base 10 mM durante 5 minutos en agitación.

A continuación se procedió a la lectura de las densidades ópticas mediante un lector de placa, a las longitudes de onda 495 ó 515, ya que se ha descrito que en el rango de 490-530 nm, la densidad óptica (DO) del colorante conserva linealidad con respecto a la concentración.

*-Cálculo de datos*

Las densidades ópticas obtenidas, nos permiten analizar tres medidas:

-T<sub>0</sub>: DO a tiempo cero. Está relacionado con el número de células en la placa cero, donde sólo hay células tumorales en medio RPMI incubadas 24 horas.

-C : DO del control. Da idea del número de células tumorales no tratadas tras 48 horas de incubación. Se mide en la placa problema. (Columnas 6 y 7).

-T :DO de las células tratadas con los compuestos a las diferentes diluciones tras 48 horas de incubación. Se mide en la placa problema. (Columnas 1-5 y 8-12).

Utilizando estos parámetros, podemos calcular la respuesta celular como: estimulación de crecimiento, no efecto o inhibición del crecimiento.

- 1.- Si  $T > C$ , el extracto ha estimulado el crecimiento.
- 2.- Cuando  $T = C$ , no existe efecto por parte del extracto.
- 3.- Inhibición del crecimiento, si  $T_0 > T < C$ .
- 4.- Inhibición total del crecimiento, cuando  $T_0 = T$
- 5.- Crecimiento negativo, es decir, muerte celular neta, si  $T > T_0$ .

Para cada línea celular, se puede crear una curva dosis-respuesta, representando % de crecimiento celular ( $M \pm \delta$ ) frente a las concentraciones ensayadas. El % de crecimiento celular, se calcula según la fórmula:

$$\% \text{ Crecimiento} = \frac{(\text{DO de las células tratadas} - \text{DO de células tiempo cero})}{(\text{DO del control (DMSO)} - \text{DO de células tiempo cero})} \times 100$$

En la curva de crecimiento se pueden calcular por interpolación, los siguientes parámetros:

IC<sub>50</sub> : Concentración de muestra que produce una inhibición del crecimiento en un 50 % respecto al control.

ITC : Concentración de muestra que inhibe totalmente el crecimiento.

CL<sub>50</sub> : Concentración de muestra que reduce a la mitad el número de células inoculadas, (concentración letal 50).

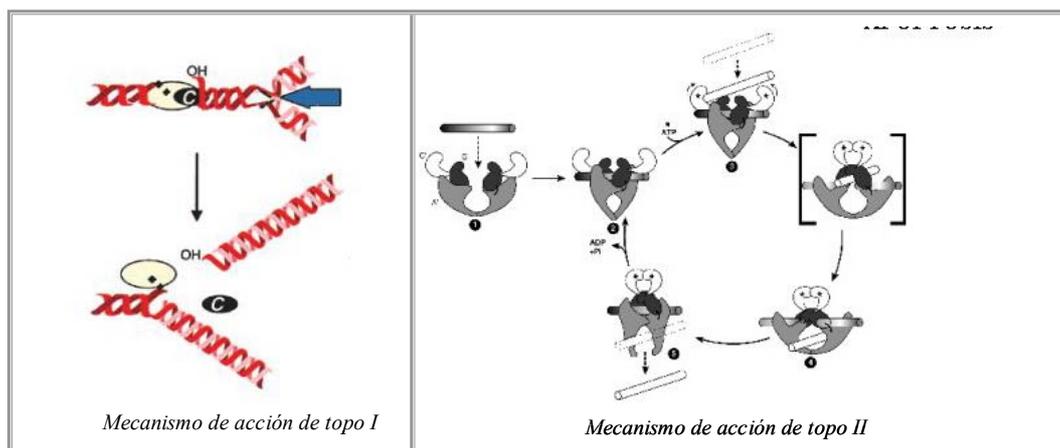
Los valores son calculados para cada uno de estos parámetros, en el caso que estos valores superen la concentración máxima de muestra ensayada, el valor es expresado como “mayor” (>) (Monks *et al.*, 1991).

### III.5.2. Venenos de Topoisomerasas.

Fundamento de la técnica:

Las topoisomerasas son enzimas nucleares, indispensables para la viabilidad celular, que se encargan de llevar a cabo los cambios topológicos que sufre el ADN superenrollado en procesos celulares. Dichos cambios los efectúan a través de cortes transitorios de los enlaces fosfodiéster en una o en las dos cadenas, y posterior sellado (Cozzarelli, 1980; Liu *et al.*, 1983; Wang, 1985; Wang, 1987; Zhang *et al.*, 1990).

En el hombre, se han descrito dos tipos, basándose en las diferencias en su mecanismo de acción, la topo I, que rompe una hebra de la doble hélice del ADN haciendo pasar la segunda a través de la mella de forma intacta, y la topo II, que rompe las dos cadenas, permitiendo el paso una doble cadena de ADN intacta a través de la rotura. En ambos casos, posteriormente el ADN es sellado.



Las células cancerosas tienen alteradas la capacidad de proliferación y diferenciación celular, y muestran elevados niveles de estas enzimas (Malonne y Atassi 1997; Pelech y Sanghera 1992).

Los venenos de topoisomerasas son uno de los últimos grupos de agentes antitumorales incluidos en la terapia oncológica. Son capaces de estabilizar los complejos de rotura transitorios que se forman cuando las topoisomerasas actúan sobre la doble hélice de ADN.

Material:

- Topoisomerasas I y II (TopoGen Inc.).
- Micropipetas
- Tubos eppendorf 1,5 mL.

- Baño termostático.
- Agitador mecánico
- Centrífuga
- Cubeta de electroforesis y fuente de voltaje.

Reactivos:

- ADN superenrollado.
- H<sub>2</sub>O ultrapura.
- Tampón de reacción (pH=8, ATP 0,5 mM)
- Dodecil sulfato sódico (SDS)
- Proteinasa K (2 mg/mL)
- Azul de bromofenol
- Mezcla cloroformo/alcohol isoamílico (24:1)
- Agarosa
- Tampón Tris-acetato-EDTA.
- Bromuro de etidio.

Descripción de la técnica:

Seguimos los protocolos descritos por Constantinou y cols. (1995) y Capranico y cols (1997).

Se preparó, en hielo, una mezcla de reacción consistente en 0,25 µg de ADN superenrollado, 2 µL de tampón de reacción [para topo I: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,15 M NaCl, 0,1% BSA, 0,1 mM espermidina, 5% glicerol (pH 8); para topo II: 30 mM Tris-HCl, pH 7.6, 60 mM NaCl, 15 mM mercaptoethanol, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM ATP], compuesto problema disuelto en 2 µL de DMSO/H<sub>2</sub>O (2,5%), 2,5 µL de Topo I (5 unidades) o 2µl de topo II (4 unidades) y H<sub>2</sub>O destilada hasta completar un volumen final de 20 µL. Las concentraciones ensayadas fueron 100 y 50 µM para los compuestos aislados. Los ensayos fueron realizados frente a los patrones camptotecina y etopósido para los ensayos de topo I y topo II, respectivamente.

A continuación, las muestras se incuban a 37°C durante 30 min. La reacción se detiene mediante la adición de 2 µL de SDS (dodecil sulfato sódico) al 10%, y 2 µL de proteinasa K (20 µg/mL), incubando, durante 30 min. a 37°C para la topo I y 15 min. para la topo II.

Las muestras fueron extraídas con una mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico (24:1) y 2 µL de azul de bromofenol y dispuestas sobre un gel de agarosa al 1%, y sometidas a electroforesis durante 6 h a 1,5 V/cm, en un tampón Tris-acetato-EDTA con bromuro de etidio (0.5 µg/mL).

Los geles de agarosa son fotografiados con cámara Polaroid bajo una fuente de luz ultravioleta, y los complejos de rotura inducidos, ADN-lineal y ADN-circular abierto, son cuantificados mediante densitometría utilizando un software tipo Image J. Los resultados fueron expresados como porcentaje de “complejos de rotura” (para topo I, circular abierto y para topo II lineal y circular abierto) en relación con el ADN total, y comparándolo con el control positivo.

### **III.5.3. ENSAYO DE INDUCCIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR (LÍNEA HL-60)**

Fundamento de la técnica

El cáncer puede ser descrito como una enfermedad en la que hay un desequilibrio entre la proliferación y la diferenciación celular. Este concepto ha derivado en una de las estrategias propuesta para el tratamiento del cáncer, la inducción de la diferenciación de las células malignas, de esta forma, su capacidad proliferativa se ve limitada (Degos, 1990; Kong *et al.*, 1988). Por tanto, compuestos capaces de inducir la diferenciación, podrían considerarse como sustancias antitumorales porque inducen la diferenciación de células neoplásicas a normales.

La línea HL-60, establecida a partir de pacientes con leucemia mieloide aguda, proporciona un modelo *in vitro* único para el estudio de los procesos celulares y moleculares de la proliferación y diferenciación de células normales y leucémicas (Birnie, 1988; Collins *et al.*, 1978; Collins, 1987; DeLuca, 1988; Koefler *et al.*, 1985; Ostrem *et al.*, 1987; Tanaka *et al.*, 1982). Con esta línea celular, la diferenciación puede ser inducida hacia la línea monocítica/macrófaga o granulocítica/linfocítica, tras el tratamiento con diferentes sustancias, como compuestos polares (Collins *et al.*, 1978), interferón (Fisher y Grant 1985; Harris *et al.*, 1985), ésteres de forbol (Fibach *et al.*, 1984; Hirai *et al.*, 1985), retinoides (Breitman *et al.*, 1980; Reiss *et al.*, 1985), 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> (Koefler *et al.*, 1984; Studzinski *et al.*, 1985), 6-tioguanina (Ishiguro *et al.*, 1984) y otras sustancias. Recientes avances en el tratamiento de leucemia incluye el uso de sustancias inductoras de la diferenciación como ácido retinoico, vitamina D<sub>3</sub> (Degos *et al.*, 1985; Gold *et al.*, 1983; Koefler *et al.*, 1985), observándose una remisión completa (Huang *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 1992).

Por tanto, este ensayo proporciona un modelo válido para la evaluación preclínica de posibles sustancias anticancerosas.

El fenotipo de las células HL-60 diferenciadas se caracteriza por una inhibición del crecimiento, incremento de la adherencia, pérdida de receptores de membrana, incremento de marcadores de monocitos, inducción de las esterasas, y fosforilación de determinadas proteínas (Collins, 1987; DeLuca, 1988; Ostrem *et al.*, 1987).

Mediante la observación de las propiedades celulares, como la capacidad de reducir azul de tetrazolio (NBT) (indicativa de la diferenciación celular en las líneas granulocítica y linfocítica), la presencia de esterasas no específicas (maduración en la línea monocítica/macrófaga) o el descenso de la incorporación de [<sup>3</sup>H] timidina, se evaluó la capacidad de las muestras para inducir la diferenciación celular.

#### Material:

- Línea **HL-60** (leucemia mieloide aguda) proporcionada por la Colección de Cultivos Americanos (Rockville, Madison, EEUU).
- Muestras: Extractos metanólicos de *Plantago spp.* y compuestos aislados (40 mg/mL y 40 mM en DMSO, respectivamente).
- Incubador, Campana de flujo laminar.
- Frascos de cultivo celular (75 y 125 cc), Botellas estériles de vidrio pyrex (125, 500, mL)
- Tubos de centrifuga 15 mL y 50 mL estériles, centrifuga baja velocidad.
- pH metro y hematocitómetro.
- Pipetas, Puntas micropipetas, Micropipetas, Micropipeta multicanal.
- Filtros Millipack 0,22 µm.
- Tubos eppendorf 1,5 mL.
- Placas de cultivo de 24 y de 96 pocillos.
- Contador de centelleo para placas de 96 pocillos, TOMTECH Harvester 96 ®.
- Portas de vidrio.

#### Reactivos

- Medio RPMI 1640: Medio libre de rojo fenol.
- Suero de ternera inactivado (FCS), Piruvato sódico (100 mM)
- Penicilina G sódica (10 U/mL)-sulfato de estreptomycin (10 µg/mL)
- Cloruro sódico, Cloruro potásico, fosfato sódico dibásico, fosfato potásico monobásico.
- HCl 1 N, NaOH 1 M y NaHCO<sub>3</sub>.
- PBS (Tampón salino-fosfato de Dulbecco, sin calcio ni magnesio).

- Metanol, dimetil sulfóxido (DMSO)
- Solución salina de Hanks (HBSS): [solución salina tamponada de Hanks (1L) con NaHCO<sub>3</sub> (0,35 g) (pH=7)],
- Azul tripán
- <sup>3</sup>H-Timidina (0,5 µCi/mL, actividad específica, 65 Ci/mmol)
- Líquido de centelleo y filtros Microbeta™ (Wallac, Finlandia)
- TPA (400 µM)
- Solución NBT-TPA [2 mg/mL NBT (azul nitro tetrazolio) y 1 µg/mL de TPA en PBS].
- Safranina O (0,3 % p/v en MeOH)
- Kit α-Naphtil acetato esterasa (esterasa no específica, NSE) (91-A) y naphtol As-D cloroacetato esterasa (esterasa específica, SE) (91-C) (Sigma, St. Louis)
- Citrato acetona formaldehido
- Vitamina D<sub>3</sub> (1,25-dihidroxi-colecalciferol) (10<sup>-6</sup> M)
- Reactivo de Wright Giemsa.

Descripción de la técnica:

Para ensayar la capacidad de las muestras para inducir la diferenciación celular, se utilizó el protocolo descrito por Suh y cols. (Suh *et al.*, 1995).

*-Preparación de soluciones:*

Medio de cultivo: El medio RPMI 1640 se suplementa con 10 % de CFS inactivado por calor (50 mL), penicilina-estreptomocina (5 mL). Se conserva a 4°C.

*-Cultivo celular:*

La línea celular HL-60 fue cultivada en suspensión a 37°C bajo atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% en medio el medio de cultivo, renovando éste cada 3 días, hasta que las células hayan alcanzado el 80%-90 % de confluencia, momento óptimo para realizar el experimento. Las células son subcultivadas dos veces por semana, aproximadamente, a la densidad de 2 x 10<sup>5</sup> células/mL.

Para el ensayo, las células HL-60 fueron diluidas a la concentración de 1,2 x 10<sup>5</sup> células /mL (2 mL/pocillo) y preincubadas durante 18 horas en placas de 24 pocillos.

*-Preparación e inoculación de las muestras:*

Las muestras a ensayar (extractos metanólicos de *Plantago spp.* y compuestos aislados) se disuelven en DMSO a la concentración de 4 mg/ mL. Se añaden 2 µL de cada una de las muestras a los 2 mL de medio con células previamente preparado, por duplicado. Las concentraciones finales ensayadas, en el caso de los extractos es 4 µg/mL, y para los compuestos, 4, 2, 1, 0.5 y 0,25 µg/mL. La concentración final de DMSO en este ensayo ha de ser inferior a 0,1%. Los valores del control fueron tratados sólo con la misma concentración de DMSO. Los ensayos se realizaron frente al patrón Vitamina D<sub>3</sub> (1,25-dihidroxi-colecalciferol) (10<sup>-6</sup> M).

Las placas se incuban a 37°C bajo atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> durante 4 días.

Transcurrido este tiempo, se procede al análisis de las mismas.

*-Medida de inducción de la diferenciación:*

Las células fueron analizadas para determinar en primer lugar, su viabilidad y proliferación celular, y a continuación, el porcentaje que exhibe marcadores morfológicos, funcionales y enzimáticos de las células diferenciadas, como la tinción con Wright Giemsa para apreciar la morfología de las células diferenciadas frente a las que no, el ensayo NBT (azul nitro tetrazolio), y la actividad NSE/SE (esterasas no específica/específica).

1. Determinación de la viabilidad celular (Coligan *et al.*, 1995)

La viabilidad celular fue monitorizada mediante la exclusión de Azul Tripán. Para ello, las suspensiones de células tras tratamiento (100 µL) son mezcladas con 250 µL de solución de tripan blue y 150 µL de HBSS incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente realizando el conteo con un hematocitómetro bajo el microscopio de las células viables, (transparentes y refringentes) y de las que no viables, (teñidas de azul).

2. Determinación de la proliferación celular

El nivel de proliferación celular de la línea HL-60 fue medido mediante la determinación de la incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina en el ADN.

Para ello, 100 µL de células tratadas se depositaron en una placa de 96 pocillos por duplicado, añadiéndose 100 µL [<sup>3</sup>H]timidina, y se incuban durante 16 horas a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Transcurrido este periodo, las células fueron recuperadas en filtros de fibra de vidrio, utilizando

TOMTEC Harvester 96<sup>®</sup>. La radiactividad de los filtros fue medida utilizando un contador de líquido de centelleo (Microbeta<sup>™</sup>) tras la adición del fluido de centelleo (expresado en desintegraciones por

$$\% \text{ Incorporación de } [^3\text{H}] \text{ timidina} = \frac{(\text{dpm de la muestra})}{(\text{dpm del DMSO})} \times 100$$

minuto, dpm). Finalmente, el porcentaje de incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina por 10<sup>6</sup> células fue calculado según la siguiente fórmula:

### 3. Ensayos de diferenciación celular:

Estos tres últimos ensayos son realizados en portas, por lo que, en primer lugar, hay que recuperar las células del medio. Para ello, las soluciones de las células (10<sup>6</sup> células) son centrifugadas a 2000 rpm durante 10 min, lavando por duplicado con PBS, y resuspendiendo el precipitado de células en 100 µL de PBS. Se deposita una gota en los portas para el caso de NSE/SE y Wright Giemsa. Para el ensayo NBT, se emplea el remanente de la solución de células.

#### a) Determinación de la morfología celular:

Alícuotas de la suspensión de células tratadas (100µL, 2 x 10<sup>5</sup> células/mL), fueron utilizadas para preparar las muestras. Una vez depositadas las muestras en los portas, y secadas, las preparaciones se fijaron en metanol 100% por 1 minuto y teñido durante 3 min en Wright-Giemsa en metanol. Las muestras se observaron al microscopio para detectar los cambios morfológicos de la diferenciación celular (descenso del radio núcleo/citoplasma, presencia de gránulos específicos, etc.)

#### b) Evaluación de la reducción de azul nitro tetrazolio (NBT):

Este ensayo fue empleado para evaluar la capacidad de las células tratadas con la muestra para producir superóxido cuando son estimuladas con 12-*O*-decanoilforbol 13 acetato (TPA). Una mezcla 1:1 (v/v) de suspensión de células (10<sup>6</sup> células) y solución TPA/NBT fue incubado a 37 °C durante 1 hora. A continuación, las células fueron depositadas en portas de cristal y se tiñeron las preparaciones con safranina O (0,3% p/v) en metanol. Las células diferenciadas reducen NBT formándose depósitos intracelulares de color negro-azulado correspondiente al formazán, mientras que las no lo son, se tiñen de color rojo-rosado. Las muestras fueron examinadas al microscopio, realizando un conteo de al menos 200 células por

muestra (en duplicado). Los resultados fueron expresados como porcentaje de células diferenciadas frente al total.

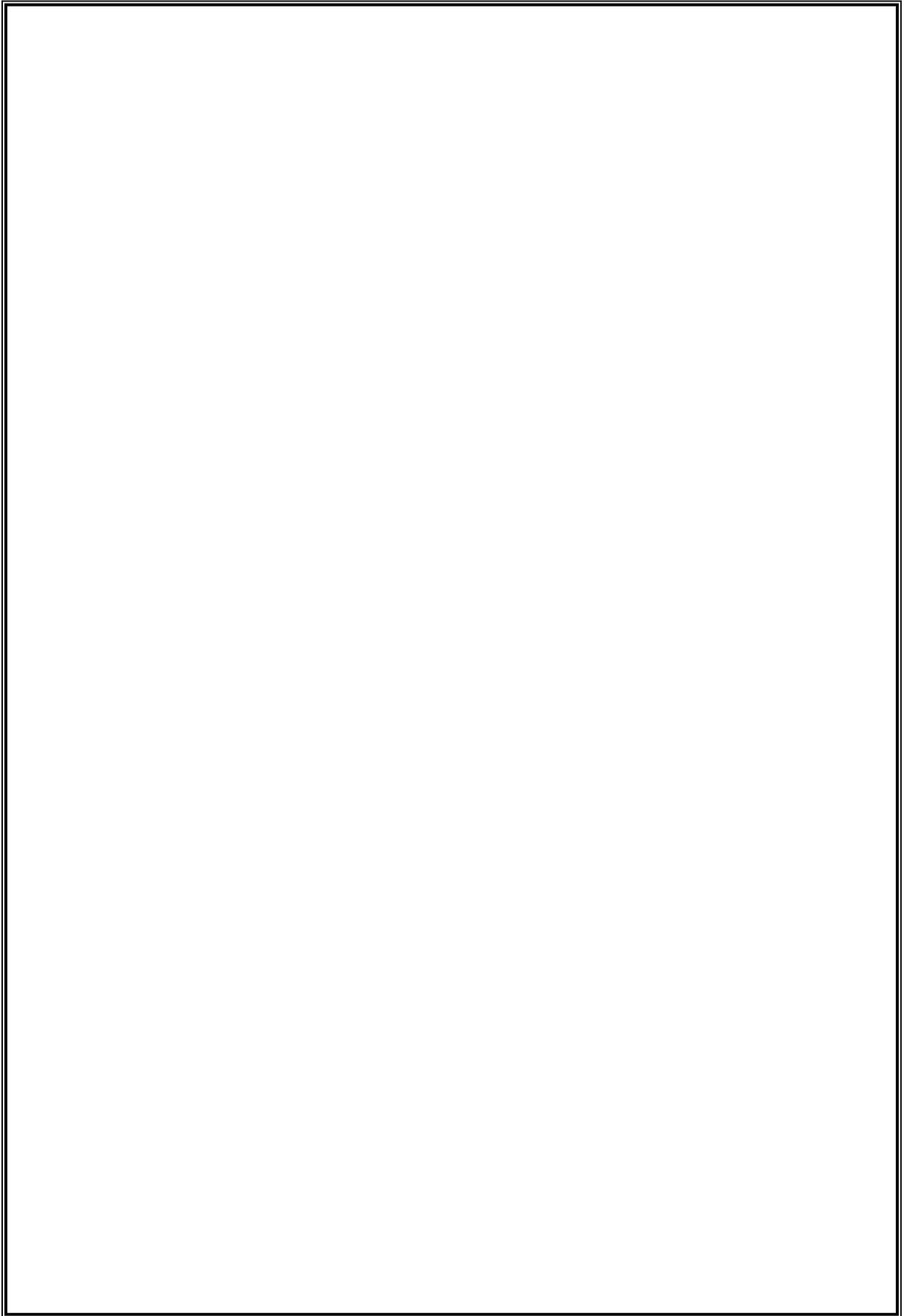
c) Evaluación de la inducción de las esterases no específica y específica (NSE/SE):

Los ensayos para la actividad de las enzimas  $\alpha$ -naftil-acetato esterasa (esterasa no específica, NSE) y naftil-AS-D cloroacetato esterasa (esterasa específica ácida, SE), fueron llevados a cabo utilizando kits citoquímicos de Sigma Chemical Co. (91-A y 91-C), y se realizaron preparaciones en portas. Las células fueron examinadas al microscopio, realizando un conteo de, al menos, 200 células por muestra (por duplicado). Las células diferenciadas hacia monocitos son teñidas de color negro, y para granulocitos, rojas. Las células no diferenciadas se observan de color blanco. Los resultados fueron expresados como porcentaje de células diferenciadas frente al total.

### III.6. ANALISIS ESTADÍSTICO

Los resultados han sido expresados como la media aritmética  $\pm$  desviación estándar ( $M \pm \delta$ ), y la significación de las diferencias entre las muestras ha sido evaluada utilizando ensayo de la varianza ANOVA y post-test de student-Newman-Keuls, considerándose significativo a partir de  $p < 0,05$ , y en el caso de la comparación con controles, mediante el test de t-Student..

Los valores de  $IC_{50}$  fueron calculados utilizando el soporte informático GraphPadPrism, ajustando la curva a la ecuación de regresión no lineal adecuada para cada ensayo (respuesta sigmoideal dosis-respuesta o inhibición de crecimiento). Los valores mostrados están comprendidos en el rango del 95% de intervalo de confianza.



*El hombre se descubre cuando se mide con un obstáculo.  
A. Saint-Exupery.*

#### **IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



#### IV.1. RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS.

Seleccionado el método de extracción, se obtuvieron los correspondientes extractos metanólicos y n-hexánicos de cada especie. Los extractos metanólicos, fueron de color oscuro y textura viscosa. Los extractos n-hexánicos, mostraron aspecto céreo, color verdoso excepto en *P. afra*, de color amarillo pálido.

Los rendimientos de los extractos obtenidos a partir de  $50 \pm 1$  g de material vegetal de cada especie expresados en % (p/p) son mostrados en la tabla X.

	Extractos (% p/p)	
	Metanólicos	n-Hexánicos
<i>P. afra</i>	18,04	1,40
<i>P. bellardii</i>	15,96	0,53
<i>P. coronopus</i>	21,32	1,43
<i>P. lagopus</i>	19,46	2,93
<i>P. lanceolata</i>	29,13	1,56
<i>P. serraria</i>	24,17	2,54

Tabla X: Rendimiento de los extractos obtenidos.

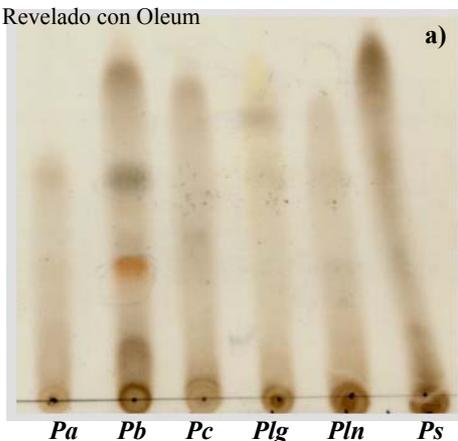
#### IV.2. ENSAYOS CUALITATIVOS

Los extractos metanólicos y n-hexánicos, fueron estudiados por cromatografía en capa fina (CCF) y reacciones coloreadas. A continuación, se muestran en la figura 6 a) y b), algunas de las CCF de los extractos metanólicos y n-hexánicos, en cromatofolios de Silicagel 60 F<sub>254</sub>, y empleando como Fm, AcOEt: MeOH: H<sub>2</sub>O (80:5:5, 2 recorridos) para eluir los extractos metanólicos y n-Hex: AcOEt (8:2) para los extractos n-hexánicos. Las placas fueron reveladas con óleum.

*AcOEt: MeOH: H<sub>2</sub>O(80:5:5)*

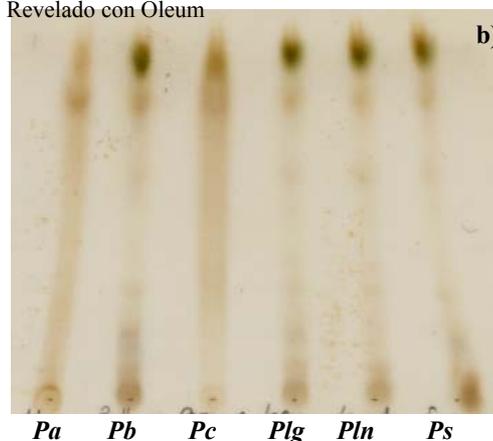
2 recorridos

Revelado con Oleum



*n-Hex:AcOEt (8:2)*

Revelado con Oleum



**Figura 6. a )** CCF de los extractos metanólicos; *Fm*, *AcOEt: MeOH: H<sub>2</sub>O (80:5:5)*; **b)** CCF de los extractos *n*-hexánicos; *Fm*: *n-Hex: AcOEt (8:2)*. *Pa*: *P. afra*; *Pb*: *P. bellardii*; *Pc*: *P. coronopus*; *Plg*: *P. lagopus*; *Pln*: *P. lanceolata*; *Ps*: *P. serraria*.

### IV.3. FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE LOS EXTRACTOS. DESCRIPCIÓN DE LOS COMPUESTOS AISLADOS.

Tomando como referencia la revisión bibliográfica y los resultados obtenidos del estudio cualitativo, seleccionamos para su fraccionamiento cromatográfico los extractos metanólicos de *P. bellardii*, *P. lagopus* y *P. serraria*.

#### IV.3.1. Extracto metanólico de *P. bellardii*.

##### IV.3.1.1. Resultados

El extracto metanólico fue cromatografiado en columna de sílice (Columna B1), Partimos de 3,20 g de extracto metanólico de *P. bellardii*, que una vez disuelto en metanol, fue mezclado con silicagel 0,2-0,5 mm, formando una cabeza que se montó en una columna de vidrio de 3,50 x 50 cm. Los eluyentes utilizados fueron *AcOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O (80:3:3; 80:5:5; 80:10:5)* y *MeOH*.

Se recogieron 220 fracciones, de volumen comprendido entre 25 mL y 100 mL. Se agruparon de acuerdo con su comportamiento en CCF. El revelado se realizó con solución de *AlCl<sub>3</sub>* y oleum.

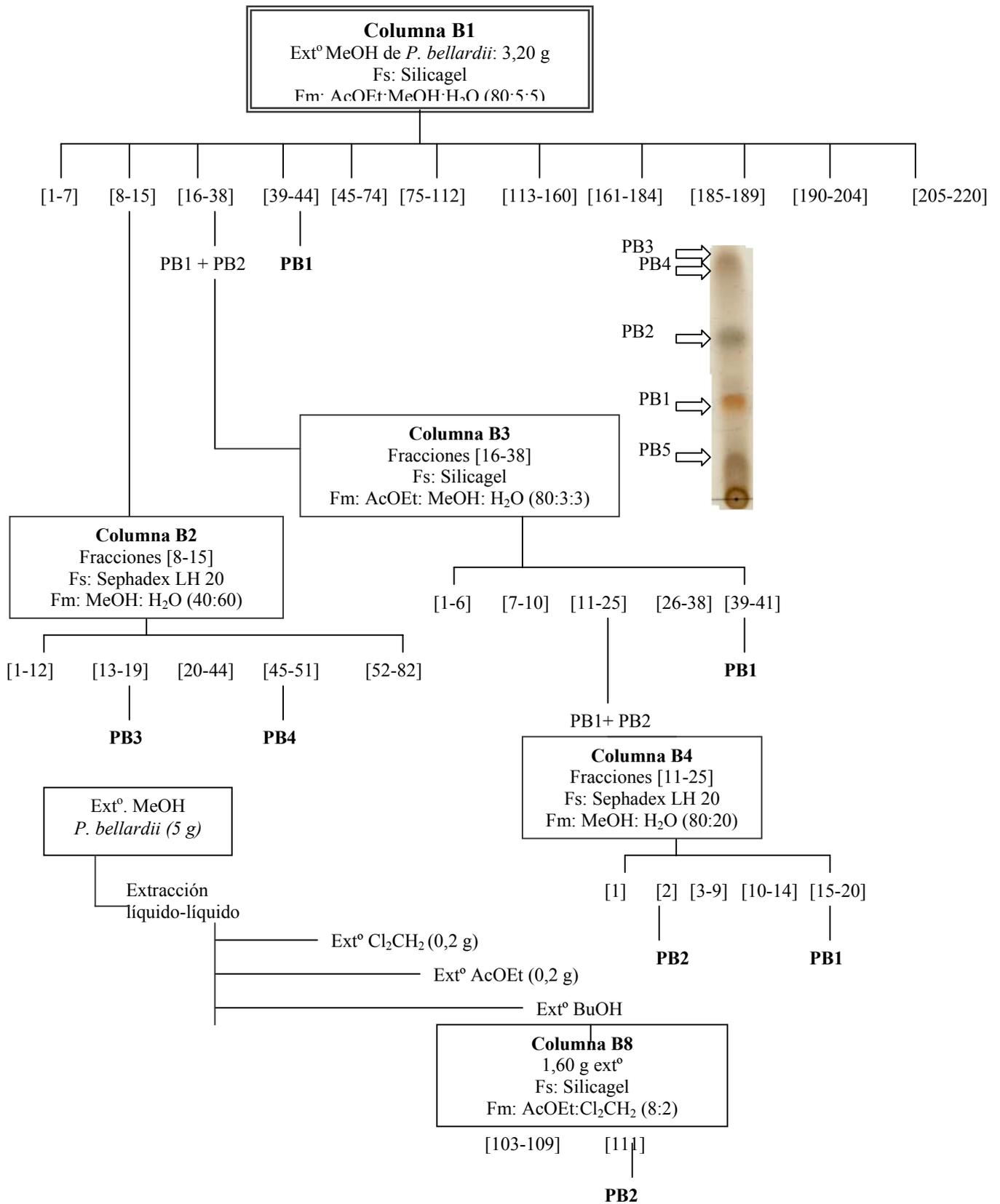
De las fracciones [45-62] cristalizó en metanol, un compuesto de color amarillo en forma de agujas y que se organizaba en forma de estrella. Fue denominado como PB1. La cantidad aislada en estas fracciones fue  $(17,9 \pm 0,1)$  mg.

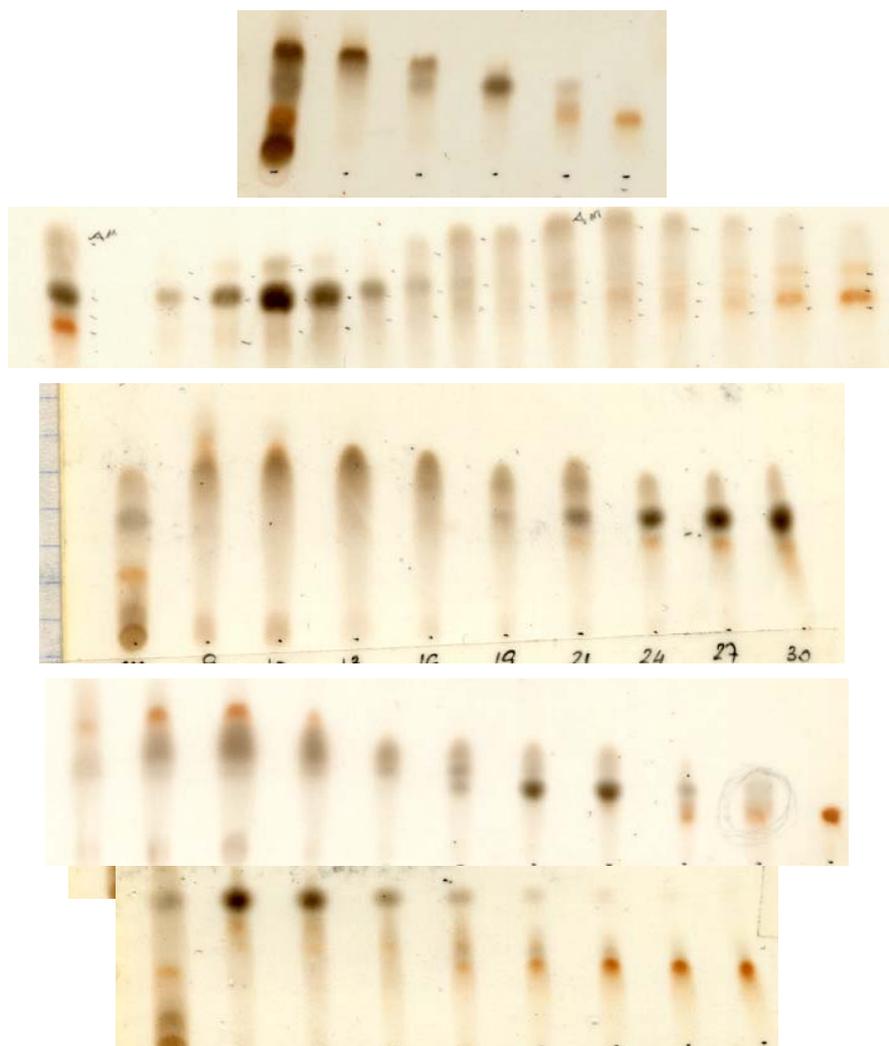
Realizamos una segunda columna en Sephadex LH20 (Columna B2) a partir de las fracciones [8-15] de la columna B1, y se aislaron dos compuestos puros, PB3 y PB4, que no se identificaron por obtenerse en cantidad insuficiente, únicamente detectamos su naturaleza flavonoide para PB4.

La fracción [16-38] se estudia cromatográficamente, y se realizan las columnas B3 y B4, pero en ellas no se obtiene el compuesto PB2 en cantidad, por lo que optamos por realizar una extracción selectiva líquido-líquido a partir del extracto metanólico, en ampolla de decantación con disolventes de diferente polaridad ( $\text{Cl}_2\text{CH}_2$ , AcOEt, BuOH), obteniendo los extractos correspondientes. Tras el estudio cromatográfico de ellos, aislamos PB2 del extracto butanólico por CC (Col. B8).

De la fracción [111] de la columna B8, se consiguió aislar un compuesto de color blanco, de aspecto pulverulento, que fue denominado como PB2. La cantidad aislada en estas fracciones fue  $8,0 \pm 0,1$  mg.

A continuación, se resume en un esquema el fraccionamiento cromatográfico del extracto metanólico de *P. bellardii*.





**Figura 7 :** Cromatografía en capa fina (CCF) de diferentes fracciones obtenidas (CC) del extracto metanólico de *P. bellardii*.

### Identificación del compuesto PB1

El punto de fusión y los datos espectroscópicos del compuesto PB1 fueron los siguientes:

**PF:**  $195 \pm 1$  °C

**UV  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm):**

MeOH: 255, 264 sh, 299 sh, 357

MeONa: 270, 330, 410

AlCl<sub>3</sub>: 268, 297 sh, 370 sh, 401

AlCl<sub>3</sub>+HCl: 272, 293 sh, 362 sh, 387

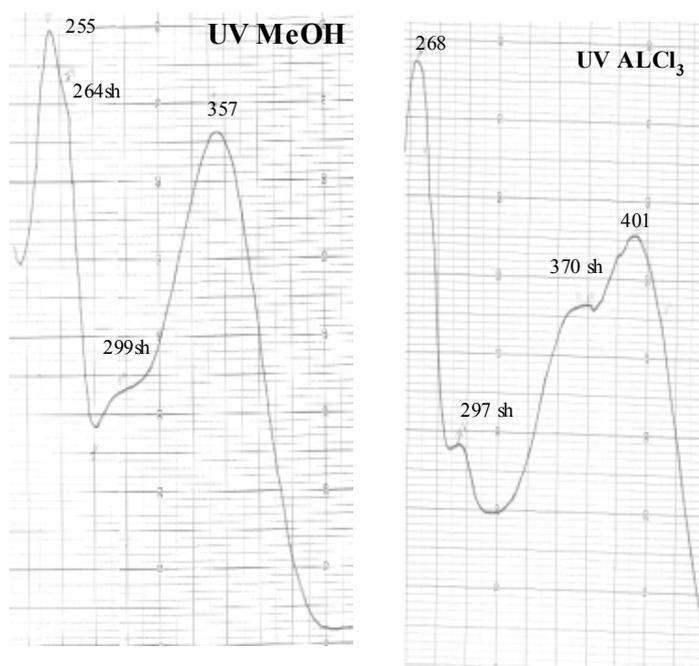
NaOAc (2min): 269, 331, 369 sh, 396

NaOAc (5-10 min): 269, 335 sh, 369 sh, 389

NaOAc + HBO<sub>3</sub> (proc. I) 258, 310, 376

Los valores de los desplazamientos químicos de los espectros <sup>1</sup>H-RMN ( MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) y <sup>13</sup>C-RMN (MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) se exponen en la tabla XI.

**FAB-EM m/z (%):** 633 (3,12%) (M<sup>+</sup>+Na<sup>+</sup>)

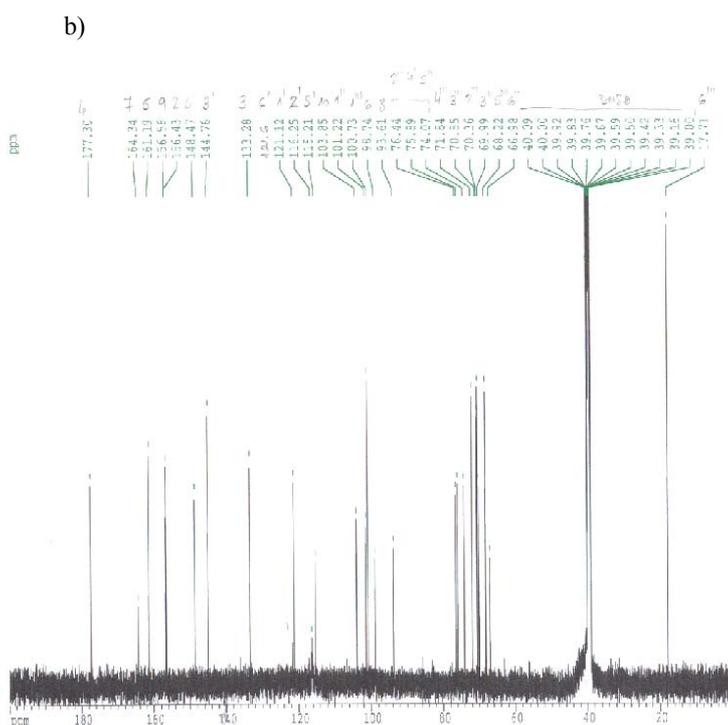
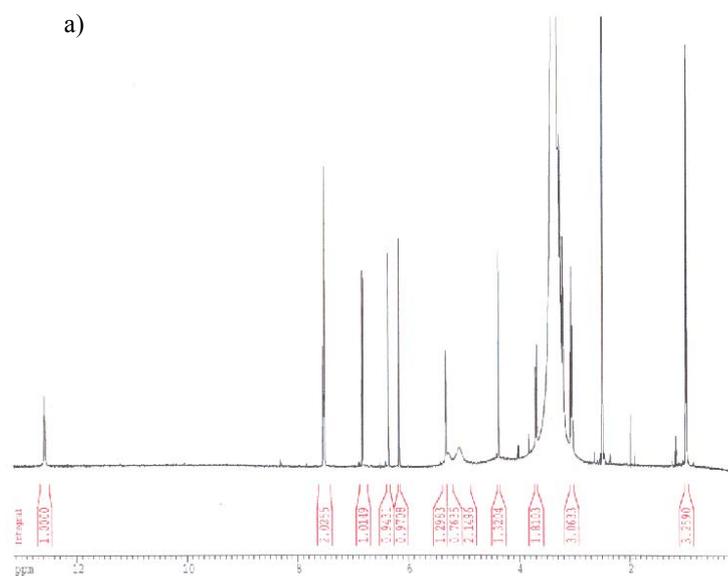


**Figura 8:** Espectros UV del compuesto PB1 en MeOH y con AlCl<sub>3</sub>

	POSICIÓN	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C
Genina	2		156.43
	3		133.28
	4		177.30
	5		161.19
	6	6,17 d	98.74
	7		164.34
	8	6,36 d	93.61
	9		156.56
	10		103.85
	1'		121.12
Azúcar 1	2'	7,51 d	116.25
	3'		144.76
	4'		148.47
	5'	6,82 d	115.21
	6'	7,54 dd	121.57
	1''	5,32 t	101.22
	2''	3,20 d	76.44
	3''	3,06 t	69.99
	4''	3,25 d	75.89
	5''	3,20 d	74.07
Azúcar 2	6''	3,69 d b	66.98
	1'''	3,30 d a	100.73
	2'''	4,37	70.36
	3'''	3,40 dd	70.55
	4'''	3,30 dd	71.84
	5'''	3,06 t	68.22
	6'''	3,30 t	17.71
		0,97 d	

**Tabla XI:** Desplazamientos químicos de los espectros <sup>1</sup>H-RMN (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) y <sup>13</sup>C-RMN (50 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) del compuesto PBI.

F. bellardi  
Fraccion 4'  
DMSO 303k



F. bellardi  
Fraccion 4'  
DMSO 303k  
13C

Figura 9: Espectros a)  $^1\text{H}$ -RMN y b)  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto PBI.

**Identificación del compuesto PB2**

Los datos físicos y espectroscópicos del compuesto PB2 fueron los siguientes:

**PF:** 163-164 °C

**UV: (MeOH):  $\lambda$  máx=** 235 nm

Los valores de los desplazamientos químicos de los espectros  $^1\text{H-RMN}$  ( MHz, DMSO- $d_6$ ) y  $^{13}\text{C-RMN}$  (MHz, DMSO- $d_6$ ) se exponen en la tabla XII.

**FAB-EM m/z (%)**: 411 ( $\text{M}^+\text{Na}^+$ )

**IE-EM m/z (5)**: 209 ( $\text{M}^+\text{H}^+$ )

	POSICIÓN	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
Genina	1	4,90 dd	99,0
	3	7,51 m	153,
	4		108,0
	5	2,57	20,5
	6	2,28	31,2
	7	5,90 dd	129,0
	8		143,0
	9	2,93	48,0
	10	4,20	61,0
	11		171,0
		-CH <sub>3</sub>	3,65
	-OH	2,0	
Azúcar1	1'	4,71 d	99,0
	2'	3,20 dd	75,1
	3'	3,34 t	73,0
	4'	3,63 dd	69,1
	5'		74,7
	6'		65,5

**Tabla XII:** Desplazamientos químicos de los espectros  $^1\text{H-RMN}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ ) y  $^{13}\text{C-RMN}$  (50 MHz, DMSO- $d_6$ ) del compuesto PB2.

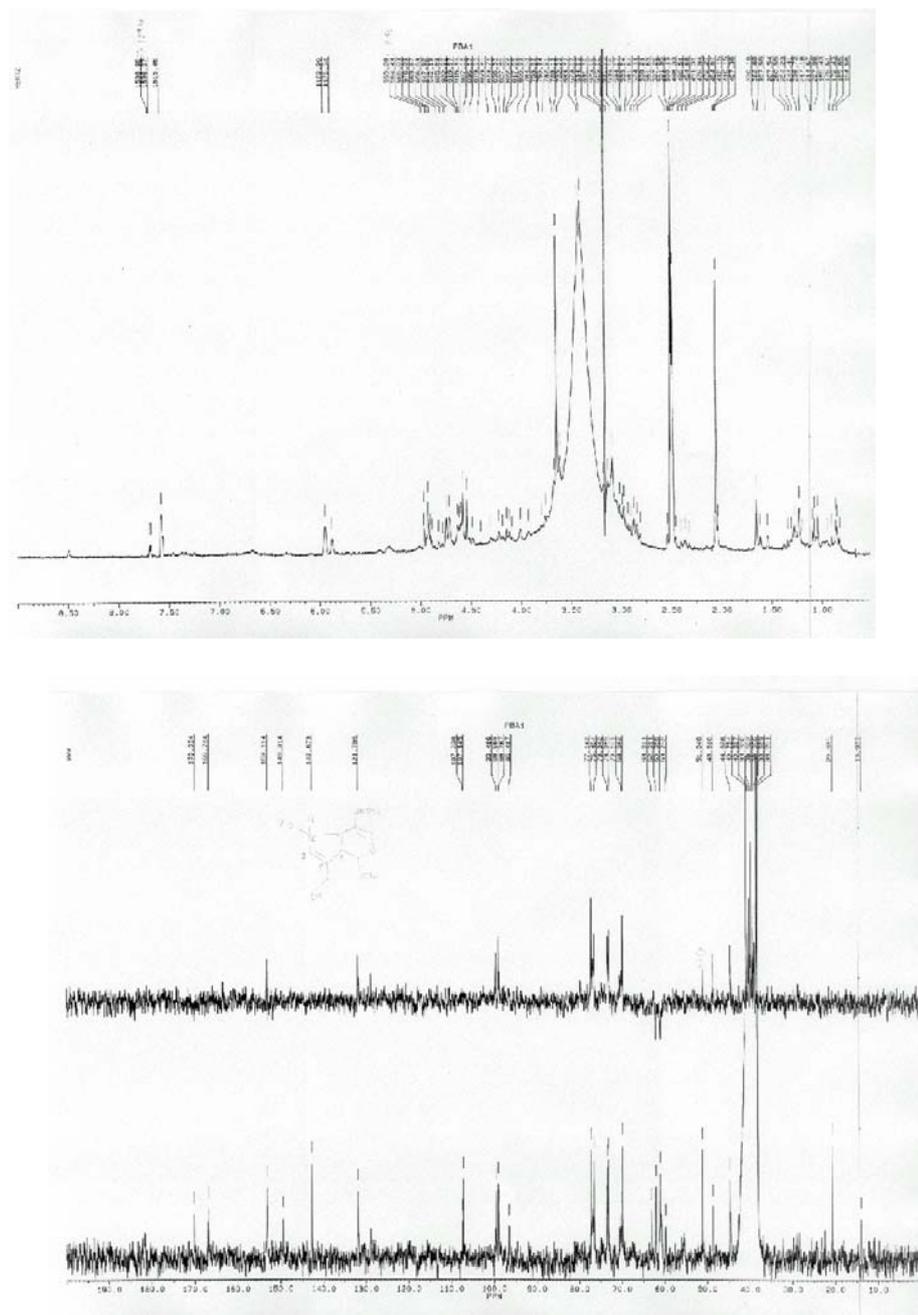


Figura 10: Espectros  $^1\text{H-RMN}$  del compuesto PB2.

## IV.3.1.2. Discusión de resultados

El PF y las reacciones coloreadas, orientan de la naturaleza de flavonoide del compuesto PB1. PB1 presenta un espectro de masas (FAB) cuyo ión molecular  $(M+Na)^+$  se muestra a  $m/z$  633 (por tanto,  $M^+ = 610$ ), correspondiendo con la fórmula empírica:  $C_{27}H_{30}O_{16}$

Su espectro UV es el típico de un flavonol, con una banda I comprendida entre 352-385 nm ( $\lambda=357$  nm) y una banda II con sobrehombro [ $\lambda=255$  nm,  $\lambda=264$  nm (sh)]. Este sobrehombro orienta sobre la presencia de radicales hidroxilo en posiciones 3' y 4' en el anillo B.

La adición de diferentes reactivos pone de manifiesto de la presencia/ ausencia de grupos hidroxilo en la molécula. Con MeONa, al producirse un efecto batocrómico en la banda I, indica la posible existencia de hidroxilos en posiciones 3, 7 y 4', ya que este reactivo ioniza de forma preferente a los radicales que se localizan en estas posiciones.

La adición de  $AlCl_3$  revela hidroxilaciones en 3' y 4', debido al efecto batocrómico de la banda I detectado tras la posterior adición de HCl y en 5' por la disminución en la intensidad de la banda. Esto es debido a que  $AlCl_3$  forma complejos estables en ácido con los radicales 4-ceto-5-hidroxilo y 4-ceto-3-hidroxilo, y complejos lábiles con cualquier otro radical *o*-dihidroxilo. Por tanto, el efecto batocrómico resultante en la banda I representa el efecto combinado de ambos efectos. La adición posterior de HCl degrada los complejos lábiles, produciendo un efecto hipsocrómico en la banda I.

Con los dos últimos reactivos, AcONa y AcONa+ $HBO_3$ , se confirma que el grupo hidroxilo en posición 7 está de forma libre, al apreciarse un efecto batocrómico en la banda II. Esto es debido a que este reactivo solamente es capaz de ionizar a los grupos hidroxilo más ácidos (7-OH) (Markham y Mabry 1975).

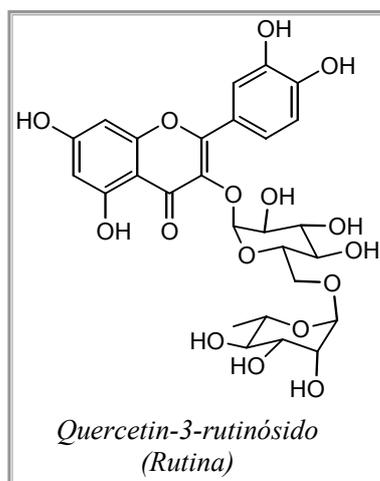
La espectroscopía  $^1H$ -RMN se utiliza, en el caso de los flavonoides, para definir principalmente las relaciones entre los protones de los anillos aromáticos, y, por tanto, sus sustituciones, así como para determinar el número de azúcares y su modo de unión a la genina. El rango comprende 0-14 ppm. La parte del espectro que proporciona mayor información es la situada entre 6 y 8 ppm. H-6 y H-8 generalmente aparecen en 6,0-6,4 y 6,3-6,9 ppm respectivamente (en el caso de PB1, 6,17 y 6,36 ppm), localizando los anillos aromáticos por los dobles dobletes (de la posición 6'). También es útil para identificar los azúcares que se unen a la genina. Las señales de los protones correspondientes a los azúcares aparecen entre 3-4 ppm, siendo característica la señal a 4,3 ppm del H-1 de ramnosa, y la unión es mediante enlace tipo  $\beta$  al mostrar un acoplamiento 7-8 Hz.

En el espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN, se identifican el número de carbonos que contiene la molécula. Además, proporciona información sobre los *O*- y *C*- heterósidos, los enlaces de unión interglucosídicos y la naturaleza y posición de las funciones ácidas.

Para los flavonoles y flavonas, las señales aparecen en el rango de 90-185 ppm. Las señales aparecen en función de la densidad electrónica, así, carbonos con baja densidad, como los carbonilos o los carbonos aromáticos oxigenados, resuenan a bajo campo (130-185 ppm), mientras que los hidrocarburos y otros carbonos alifáticos, aparecen en campo alto, 0-110 ppm. La señal del carbono del grupo ceto en posición 4 es característica 169-183 ppm (en el caso de PB1, 177)

Mediante los datos obtenidos por RMN, COSY, relación entre H vecinos, HCQC, relación C-H, se corrobora que la molécula posee dos azúcares, siendo uno de ellos ramnosa y el otro glucosa. Se detecta un acoplamiento a larga distancia entre posiciones 6 y 8.

Todos estos datos anteriormente descritos indican que el compuesto PB1 es un heterósido de flavonol, que ha sido identificado como quercetin 3-*O*- $\beta$ -glucosil-1-6- $\alpha$ -ramnosil también conocido como **quercetin-3-*O*-rutinósido** o rutina.

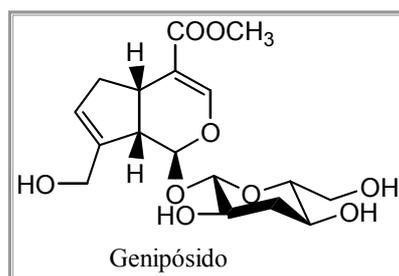


Las reacciones coloreadas orientan de la naturaleza de iridoide del compuesto PB2. Éste, en el espectro de masas (FAB), muestra un ión molecular  $(M+Na)^+$  a  $m/z$  411 (por tanto,  $M^+ = 388$ ), y el impacto de masas,  $(M+H)^+$  a  $m/z$  209 (dato que corresponde a la diferencia entre el ión molecular del FAB y el peso molecular de una molécula de glucosa), por lo que el peso molecular de la genina es 209. La fórmula empírica corresponde a una molécula  $C_{17}H_{29}O_9$ .

El espectro UV de este compuesto en MeOH muestra una sola banda de absorción a 235 nm, orientándonos la relativa presencia de enlaces conjugados.

En el caso de la espectroscopía RMN, se revelan las posiciones de los C e H mediante  $^1H$ -RMN y  $^{13}C$ -RMN, así como que la molécula está constituida por una genina y una molécula de azúcar.

Todos estos datos experimentales, además de los bibliográficos, indican que el compuesto PB2 es un heterósido de un iridoide, que ha sido identificado como **genipósido**.



### IV.3.2. Extracto metanólico de *P. lagopus*.

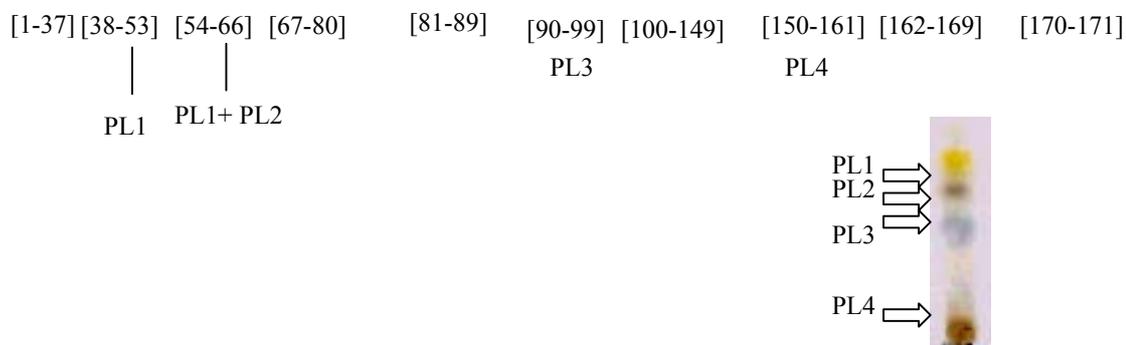
#### IV.3.2.1. Resultados

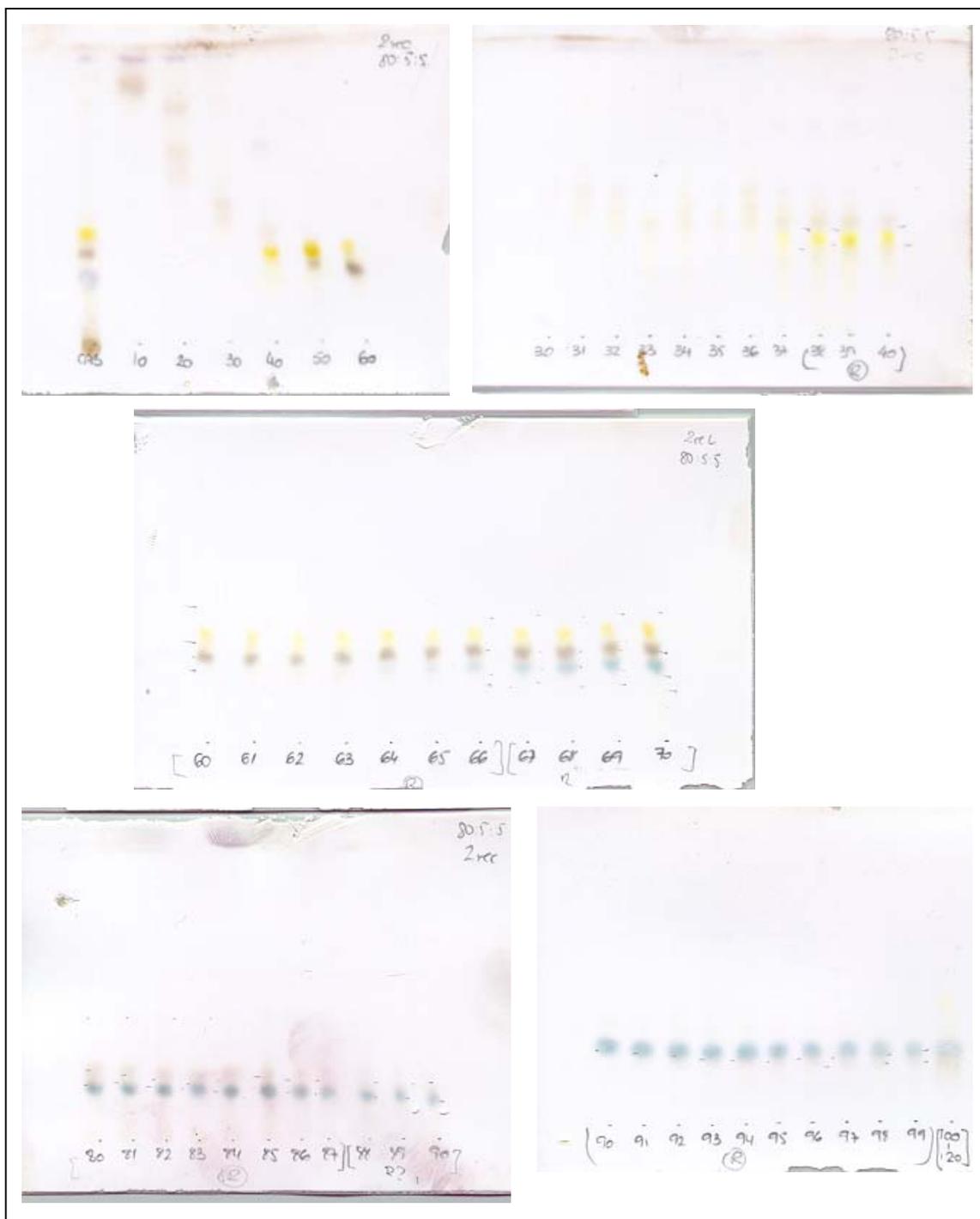
El extracto metanólico fue estudiado por CCF para la posterior separación de sus componentes por cromatografía en columna de silicagel.

Partimos de 4.5 g de extracto metanólico de *P. lagopus*, que una vez disuelto en metanol, fue mezclado con silicagel 0.2-0.5 mm, formando una cabeza, que se montó en una columna de vidrio de 3.50 x 50 cm. Los eluyentes utilizados fueron acetato de etilo/ metanol/ agua (80:3:3; 80:5:5; 80:10:5) y metanol.

Se recogieron 171 fracciones, de volumen comprendido entre 25 ml y 100 ml (a partir de la fracción 140). Se agruparon de acuerdo con su comportamiento en CCF. El revelado se realizó con solución de  $AlCl_3$  y óleum.

<b>Columna L1</b> Ext° MeOH (4,5 g) Fs: Silicagel Fm: AcOEt: MeOH: H <sub>2</sub> O (80:3:3)
---





**Figura 11** : Cromatografía en capa fina (CCF) de diferentes fracciones obtenidas (CC) del extracto metanólico de *P. lagopus*.

De las fracciones 38-53 cristalizó en agujas un compuesto de color amarillo claro. Los cristales se disponían en forma de roseta o glóbulos. Se obtuvieron  $43,6 \pm 0,1$  mg por sucesivas recristalizaciones en MeOH y fue denominado como PL1. La elucidación estructural se realizó por métodos espectroscópicos y constantes físicas.

#### Identificación del compuesto PL1

Los datos espectroscópicos y el punto de fusión del compuesto PL1 fueron los siguientes:

**PF:**  $260 \pm 1$  °C

#### UV $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)

MeOH: 253, 264 sh, 347.

MeONa: 263, 391.

AlCl<sub>3</sub>: 270, 329, 425.

AlCl<sub>3</sub>+HCl: 272, 293 sh, 362 sh, 387.

NaOAc 2min.: 258, 315, 404.

NaOAc 5-10 min.: 258, 315, 404.

NaOAc + HBO<sub>3</sub> proc. I: 258, 315, 404.

Los valores de los desplazamientos químicos de los espectros <sup>1</sup>H-RMN ( MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) y <sup>13</sup>C-RMN (MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) se exponen en la tabla XIII.

**FAB-EM** m/z (%): 449 (17%) (M<sup>+</sup>+H<sup>+</sup>)

	POSICIÓN	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C
Genina	2	165	
	3	103	6.75
	4	182	
	5	157	
	6	95	6.8 d
	7	163	
	8	100	6.5 d
	9	161	
	10	105	
	1'	122	5.1 d
Azúcar 1	2'	154	7.4 d
	3'	146	
	4'	150	
	5'	156	6.9 d
	6'	119	7.5 dd
	1''	100	
	2''	73	3.2 dd
	3''	77	3.3 dd
	4''	70	3.1 t
	5''	78	3.4 dd
6''	61	3.7 d	
			3.45 dd

**Tabla XIII:** Desplazamientos químicos de los espectros <sup>1</sup>H-RMN (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) y <sup>13</sup>C-RMN (50 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) del compuesto PL1.

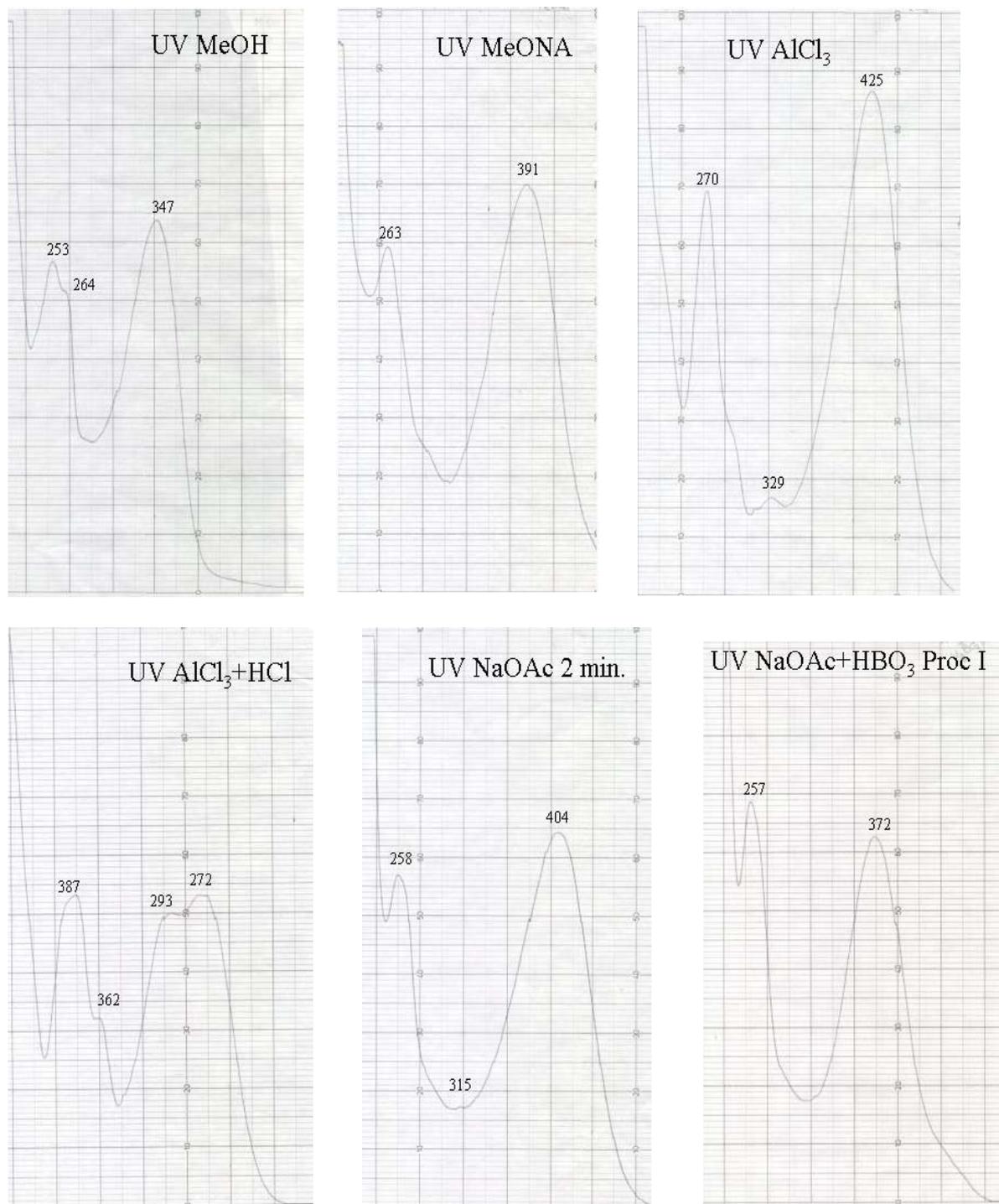


Figura 12: Espectros UV del compuesto PL1.



Figura 13: Espectros  $^1\text{H-NMR}$  y  $^{13}\text{C-NMR}$  del compuesto PL1.

#### IV.3.2.2. Discusión de resultados

El PF y las reacciones coloreadas orientan de la naturaleza flavonoide del compuesto PL1. Presenta un espectro UV típico de una flavona, con una banda I comprendida entre 304-350 nm ( $\lambda=347$  nm) y una banda II con un sobrehombro ( $\lambda=253$  nm; sh  $\lambda=264$  nm). Este sobrehombro indica la existencia de grupos hidroxilo en 3' y 4'. La  $\lambda=253$  nm de la banda II revela de otro grupo OH en posición 7.

La adición de diferentes reactivos orienta otros posibles grupos hidroxilo en la molécula. Con MeONa, deducimos la glicosilación en posición 7, al desaparecer el pico en 320-330 nm, y el efecto batocrómico en la banda I corrobora la presencia de OH en 4'.

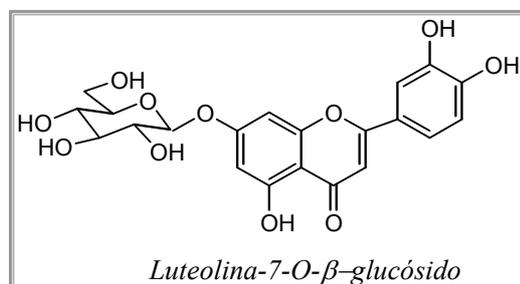
Con la adición de  $AlCl_3$  y HCl se pone de manifiesto la existencia de un grupo hidroxilo en 5, debido al efecto batocrómico y la disminución de la intensidad en la banda I.

Con los dos últimos reactivos, AcONa y AcONa+ $HBO_3$ , confirmamos que el grupo hidroxilo en 7 está sustituido (por el efecto batocrómico que experimenta la banda I) y que el anillo B está dihidroxilado.

El espectro de masas (FAB) muestra el ión molecular  $(M+H)^+$  a m/z 449 (por tanto,  $M^+ = 448$ ), resultado que está en concordancia con el peso molecular calculado para la genina (285) más la hexosa (163).

Los espectros RMN corroboran el tipo de unión entre la genina y el azúcar y se identifica el tipo de azúcar, glucosa.

Los datos espectroscópicos anteriormente descritos así como los bibliográficos, indican que el compuesto PL1 es un glucósido de flavona, que ha sido identificado como **luteolina-7-O- $\beta$ -glucósido**.



**IV.3.3. Extracto metanólico de *P. serraria*.**

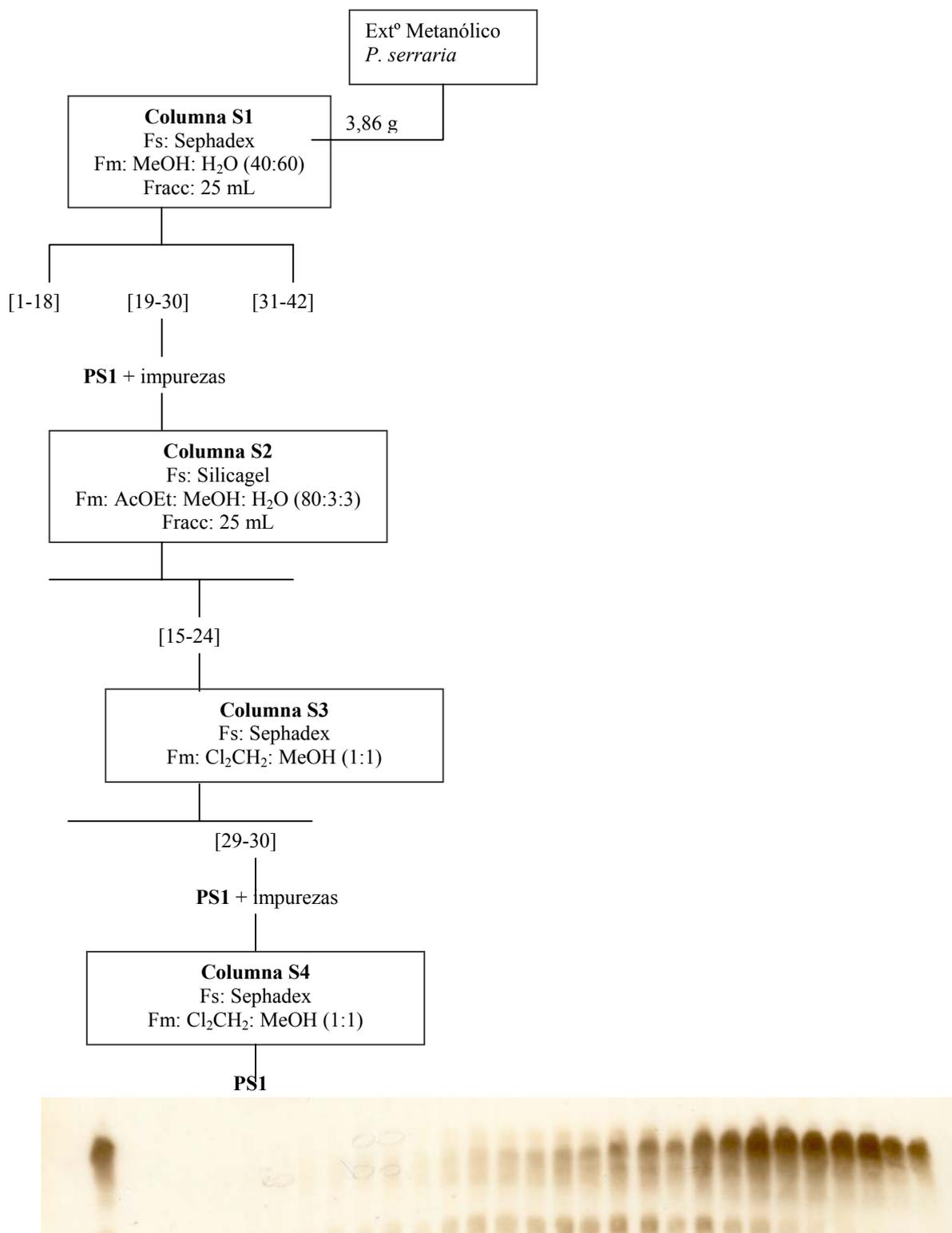
IV.3.3.1. Resultados

El extracto metanólico (3,86 g) de *P. serraria*, fue cromatografiado en Sephadex LH-20, columna de vidrio de 3,50 x 50 cm. (Columna S1). El eluyente utilizado fue MeOH/H<sub>2</sub>O (40:60).

Se recogieron 42 fracciones, de 25 mL. Se agruparon de acuerdo con su comportamiento en CCF. El revelado se realizó con solución de AlCl<sub>3</sub> y oleum.

Realizamos una segunda columna en Silicagel (S2) (Fm: AcOEt/MeOH/ H<sub>2</sub>O: 80:3:3) a partir de las fracciones [19-30] de la columna S1. La fracción [15-24] se estudia cromatográficamente en Sephadex LH-20 (Columnas S3 y S4) y utilizando Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>:MeOH (1:1) como fase móvil.

A continuación, se resume en un esquema del de aislamiento de los compuestos mayoritarios en el extracto metanólico de *P. serraria*.



De las fracciones [29-30] de la columna S3 se aisló un compuesto de naturaleza no cristalina, y color anaranjado, denominado PS1.

#### **Identificación del compuesto PS1.**

Los datos espectroscópicos y el punto de fusión del compuesto PS1 fueron los siguientes:

**PF:** 145-149 °C

**UV  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm)**

MeOH: 220, 244 sh, 281, 313 sh, 330

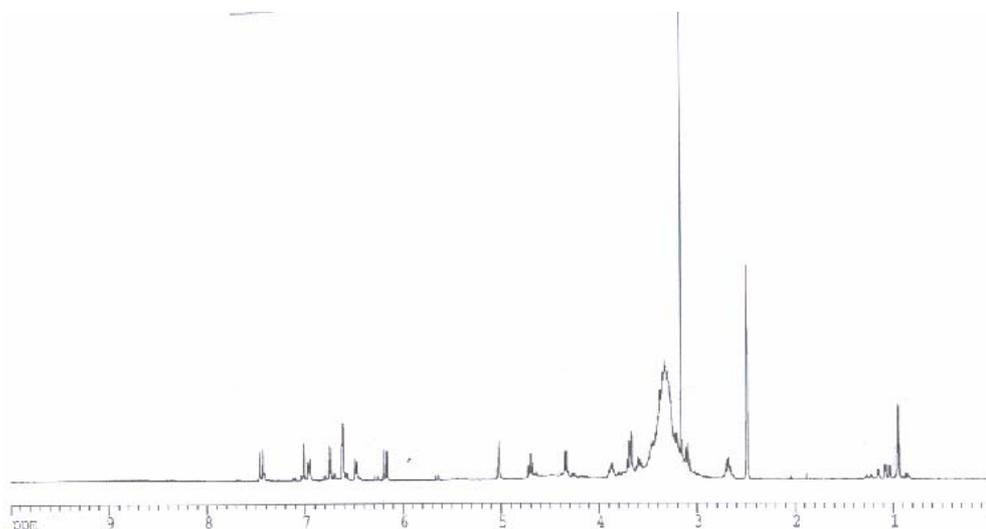
Los valores de los desplazamientos químicos de los espectros  $^1\text{H-RMN}$  ( MHz, DMSO- $d_6$ ) y  $^{13}\text{C-RMN}$  (MHz, DMSO- $d_6$ ) se exponen en la tabla XIV.

**FAB-EM m/z (%):**(17%) ( $M^+ + H^+$ )

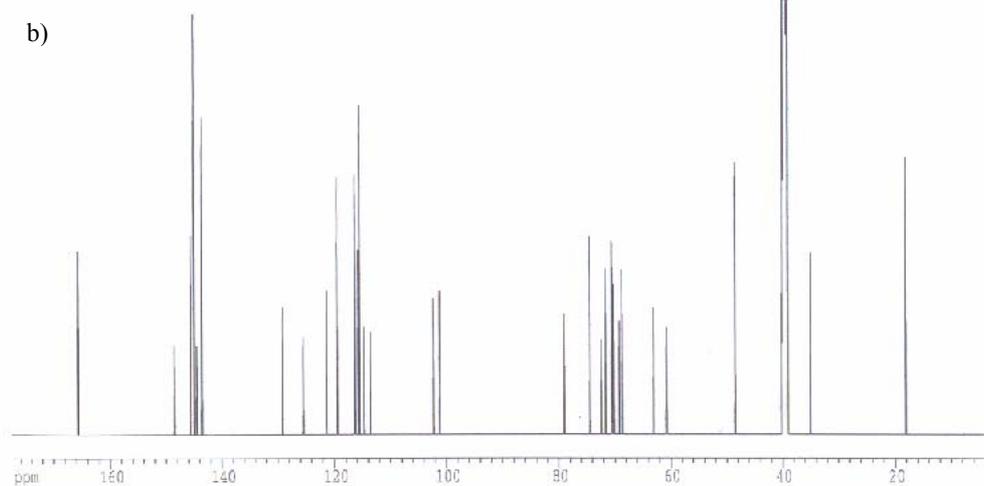
	POSICIÓN	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
Radical Cinamoil	1		165,60
	2	6,16 (d)	113,51
	3	7,42 (d)	145,53
	4		125,41
	5	7,01	114,64
	6		148,49
	7		145,445
	8	6,75	115,72
	9	6,94	121,29
Radical Hidroxitirosol	1'	3,9 (a) 3,6 (b)	70,149
	2'	2,7	74,453
	3'		34,93
	4'	6,61	116,25
	5'		143,48
	6'		144,93
	7'	6,63	115,41
	8'	6,48	119,44
Azúcar central	1''	4,4	102,24
	2''	3,2	74,45
	3''	3,7	79,01
	4''	4,7	69,12
	5''	3,5	72,40
	6''	3,4 (a) 3,3 (b)	60,70 (T)
Azúcar complementario	1'''	5,0	101,11
	2'''	3,7	70,42 (D)
	3'''	3,3	70,34
	4'''	3,0	71,60 (D)
	5'''	3,4	68,62
	6'''	0,9	18,04

**Tabla XIV:** Desplazamientos químicos de los espectros  $^1\text{H}$ -RMN (200 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) y  $^{13}\text{C}$ -RMN (50 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) del compuesto PSI.

a)



b)



**Figura 14:** Espectros a)  $^1\text{H-RMN}$  y b)  $^{13}\text{C-RMN}$  del compuesto PSI.

IV.3.3.2. Discusión de resultados.

El espectro UV muestra absorción en el rango 230-330 nm. Este dato indica la naturaleza fenólica del compuesto PS1, y la posesión de una insaturación fuera del anillo aromático.

EL espectro UV de ésteres fenilpropanoides azucarados muestran una banda de absorción máxima, en las regiones 290-300 y 325-345 nm, dependiendo de los sustituyentes de los radicales cinámico y feniletilo. Generalmente, el radical fenilpropanoide de los conjugados cinámicos es el que contribuye de forma significativa a la absorción UV, de ahí que el espectro sea similar a los correspondientes ácidos cinámicos libres. Así, se pueden diferenciar los diferentes ácidos fenoles, ya que cada uno presenta diferente absorbancia: 280-290 nm para cinamoil, 310-315 para p-cumaril, 320-325 para feruloil y 330-335 para cafeoil. Además, los espectros de ésteres del ácido cafeico y ferúlico normalmente muestran un hombro característico sobre 295-300 nm. En el caso de PS1, al presentar  $\lambda$  máx a 330 y sobrehombro a 313 nos orienta de que posee el radical cafeico.

En el caso del espectro  $^1\text{H}$  RMN, la presencia de residuos E-cinamoil muestra un par de dobletes correspondientes al doble enlace en posición  $\alpha$ - $\beta$ , sobre 6,15- 6,64 (H-2, =CH-CO) y 7,43- 7,81 (H-3, Ar-CH=) ppm, con una constante de acoplamiento de 16 Hz. En los ésteres feniletil glicósidos, donde el doble enlace  $\alpha$ - $\beta$  es saturado, una señal adicional aparece en la región 2,6- 4 ppm. Como los dos protones en posición 3 son equivalentes y resuenan alrededor de 2,60-279 ppm, se desdoblan en un triplete por los dos hidrógenos en posición 2 adyacentes. El H en posición 1 no es equivalente apareciendo su señal en forma de multiplete alrededor de 3,5-3,95 ppm. En el caso de ésteres cafeicos de glicósidos 3,4-dihidroxifeniletilo, se observan dos sistemas aromáticos en el espectro, y las señales de los protones del radical feniletilo, son normalmente de menor intensidad que los correspondientes a la parte cafeica.

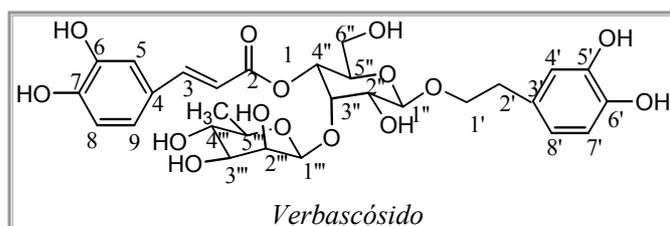
La formación de enlaces de tipo éster induce señales a bajo campo para los protones vecinos a carbonos. El análisis de RMN de protones de conjugados del ácido cinámico es normalmente difícil, especialmente en el caso de complejos ésteres de glucósidos de feniletilo, debido al extenso solapamiento de señales. Por tanto, el uso de espectrometría de RMN a alto campo (300-400 MHz) y técnicas doble dimensión (2D HRMN homonuclear; correlación con  $^{13}\text{C}$ ) es necesario para una asignación inequívoca de las señales.

La asignación de uniones estructurales se confirmaron mediante espectros en 2D (COSY, CH.correlación).

La espectroscopía RMN C es muy útil en la elucidación estructural de conjugados cinámicos, especialmente, en la determinación de la posición de unión del cinámico y el residuo feniletilo del radical de carbohidrato del fenilpropanoide.

La glicosilación de un grupo hidroxilo de un azúcar induce un efecto bajo campo de 5-10 ppm en la señal del carbono unido a él. En el caso de C-6, está acompañado por un efecto a alto campo del C-5 de 1.5-2.7 ppm. Una mayor confirmación sobre la posición de la glicosilación puede obtenerse tras preparaciones con derivados acetilados, donde todos los carbonos originalmente poseen radicales hidroxilo libres se mueven a mayor campo sobre 1.5-4 ppm en el espectro.

Los datos espectroscópicos anteriormente descritos indican que el compuesto PS1 es un derivado glucosilado fenilpropanoide, que ha sido identificado como **verbascósido** o acteósido.



## IV.4. DETERMINACIONES COLORIMÉTRICAS.

### IV.4.1. RESULTADOS

#### -DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES

Esta técnica está basada en el método de Folin-Ciocalteu, que se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol formándose complejos fosfomolibdico-fosfotungstico (Peterson, 1979). La transferencia de electrones a pH básico reduce a los complejos fosfomolibdico fosfotungstico dando lugar a cromógenos de color azul intenso, siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Bray y Thorpe 1954; Julkunen-Tiitto, 1985),

La absorbancia del color azul producido se mide con el espectrofotómetro a 750 nm. El contenido de fenoles de cada extracto es expresado como % de fenoles en extracto y mg/g de peso seco de la planta, como media  $\pm$  desviación estándar ( $M \pm \delta$ ) (n=3) (tabla XV y figura 16), basándose en la curva de calibrado del patrón, ácido protocatéquico, de ahí que se utilice el término “unidades de ácido protocatéquico equivalentes” (UAP) por gramo de extracto o materia vegetal desecada.

El patrón seleccionado fue ácido protocatéquico, (ácido 3,4-dihidroxibenzoico), al ser más similar a los radicales orto-dihidroxi de los flavonoides aislados así como de los heterósidos fenilpropanoicos, en lugar de utilizar ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) que es empleado en bibliografía.

La curva de calibrado fue realizada empleando concentraciones seriadas de ácido protocatéquico comprendidas en el rango 0,02-0,002 mg/mL (n=6) por triplicado. Los valores de absorbancia obtenidos (U.A) fueron representados frente a la concentración final ensayada (mg/mL), ajustándose los puntos a la recta mediante el método de los mínimos cuadrados, comprobando el rango de concentraciones que cumplía la linealidad (0,012-0,002 mg/mL,  $R^2= 0,9981$ ). La ecuación de la recta resultante ( $y = 116,61x - 0,0076$ ) (figura 15) fue empleada para el posterior cálculo de la concentración de fenoles para los extractos y en planta desecada (tabla XV y figura 16).

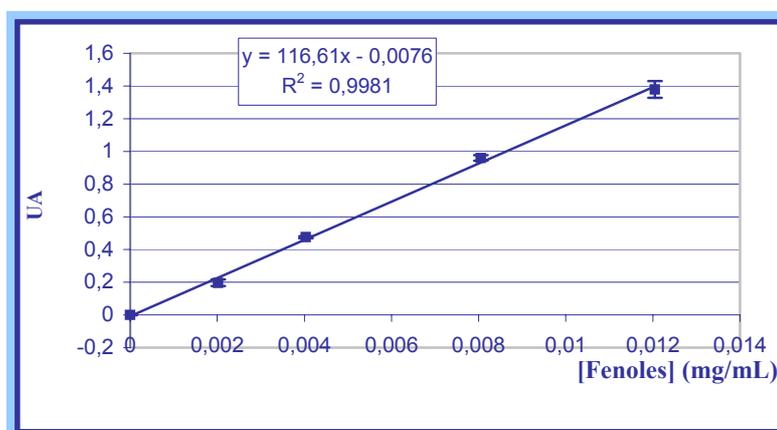


Figura 15: Curva de calibrado para la determinación de fenoles.

Extractos	% Fenoles en extractos (UAP)	mg fenoles/ g planta seca
<i>P. afra</i>	$4,84 \pm 0,39^a$	$8,73 \pm 0,71^a$
<i>P. bellardii</i>	$8,54 \pm 0,53^b$	$14,48 \pm 0,89^b$
<i>P. coronopus</i>	$7,11 \pm 0,37^c$	$15,16 \pm 0,79^c$
<i>P. lagopus</i>	$5,44 \pm 0,32^a$	$10,59 \pm 0,62^a$
<i>P. lanceolata</i>	$8,16 \pm 0,45^b$	$23,77 \pm 1,33^b$
<i>P. serraria</i>	$16,83 \pm 0,88^d$	$40,67 \pm 2,12^d$

Tabla XV: Contenido en fenoles totales de los extractos metanólicos de *Plantago* spp. Los resultados se expresan como ( $M \pm \delta$ ,  $n=3$ ). Los valores con distinto superíndice para cada columna, son significativamente diferentes entre sí (ANOVA- test Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ).

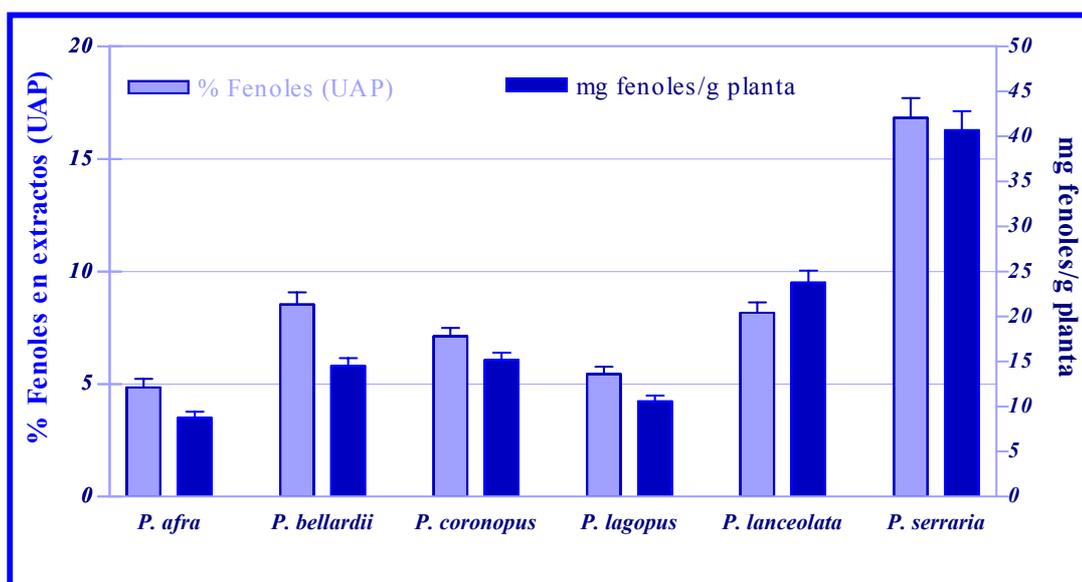


Figura 16: Porcentaje de fenoles totales en los extractos metanólicos y mg de fenoles/ g planta de *Plantago* spp.

Los resultados obtenidos (tabla XV y figura 16) fueron comparados realizando un estudio estadístico mediante ANOVA test de student-Newman-Keuls,  $p < 0,05$ , mostrando que el extracto metanólico de *P. serraria* es significativamente diferente al resto ( $p < 0,001$ ). El orden de los extractos, de mayor a menor, indicando entre paréntesis si la diferencia es significativa con respecto a la especie que le prosigue, es el siguiente:

*P. serraria* ( $p < 0,001$ ) > *P. bellardii* (n.s.) > *P. lanceolata* ( $p < 0,05$ ) > *P. coronopus* ( $p < 0,01$ ) > *P. lagopus* (n.s.) > *P. afra*.

Y al comparar el contenido de fenoles totales por g de planta, el orden y la significación estadística es:

*P. serraria* ( $p < 0,001$ ) > *P. bellardii* (n.s.) > *P. lanceolata* ( $p < 0,01$ ) > *P. coronopus* ( $p < 0,01$ ) > *P. lagopus* (n.s.) > *P. afra*.

#### -DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES

La determinación de flavonoides fue realizada según la técnica de Lamaison (Lamaison y Carnat 1990).

Las curvas de calibrado fueron calculadas empleando diferentes concentraciones de dos flavonoides de referencia, luteolina-7-glucósido para *P. afra*, *P. coronopus*, *P. lagopus*, *P. lanceolata*, mientras que para *P. bellardii*, rutina.

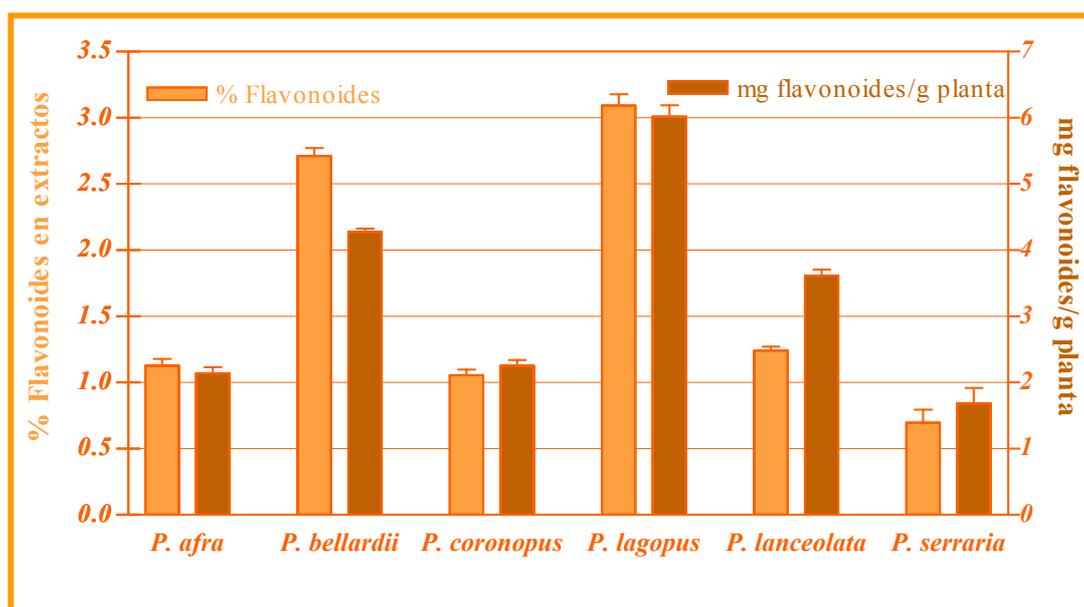
Las curvas de calibrado fueron realizadas empleando concentraciones seriadas del flavonoide correspondiente comprendidas en el rango 100-3,12  $\mu\text{g/mL}$  por cuadruplicado. Los valores de absorbancia obtenidos fueron representados frente a la concentración final ensayada, ajustándose los puntos a la recta mediante el método de los mínimos cuadrados, comprobando el rango de concentraciones que cumplía la linealidad. Las ecuaciones de la recta resultantes fueron empleadas para el posterior cálculo de la concentración de flavonoides para los extractos. Para verificar la precisión del método, se midieron concentraciones conocidas (diferentes de las constituidas por la curva de calibrado) de los patrones y se calculó el rendimiento siguiendo la ecuación de la recta. Las concentraciones ensayadas fueron 200 y 60  $\mu\text{g/mL}$  (por cuadruplicado), el rendimiento se expresa como el promedio de éstos valores.

Luteolina-glucósido			Rutina		
Ecuación recta	R <sup>2</sup>	Rendimiento (%)	Ecuación recta	R <sup>2</sup>	Rendimiento (%)
y= 0,0302x- 0,076	0,9941	98,05 ± 5,22	y= 0,0149x + 0,0226	0,9986	109,4

Los resultados obtenidos para las muestras fueron:

Extractos	% flavonoides en extractos	mg flavonoides totales/g planta seca
<i>P. afra</i>	1,12 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,13 ± 0,09 <sup>a</sup>
<i>P. bellardii</i>	2,71 ± 0,05 <sup>b</sup>	4,27 ± 0,04 <sup>b</sup>
<i>P. coronopus</i>	1,05 ± 0,04 <sup>a</sup>	2,25 ± 0,08 <sup>a</sup>
<i>P. lagopus</i>	3,09 ± 0,08 <sup>c</sup>	6,01 ± 0,16 <sup>c</sup>
<i>P. lanceolata</i>	1,24 ± 0,03 <sup>d</sup>	3,61 ± 0,08 <sup>d</sup>
<i>P. serraria</i>	0,69 ± 0,09 <sup>c</sup>	1,68 ± 0,23 <sup>c</sup>

**Tabla XVI:** Contenido en flavonoides totales de los extractos metanólicos de *Plantago* spp. Los resultados se expresan como ( $M \pm \delta$ , n=3) Los valores con distinto superíndice, para cada columna, son significativamente diferentes entre sí (ANOVA- test Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ).



**Figura 17:** Porcentaje de flavonoides totales en los extractos metanólicos y mg de flavonoides/ g de planta de *Plantago* spp .

Los resultados obtenidos (tabla XVI y figura 17) para cada especie fueron comparados realizando un estudio estadístico mediante ANOVA test de student-Newman-Keuls,  $p < 0,05$ , mostrando

que el extracto metanólico de *P. lagopus* es significativamente superior al resto ( $p < 0,001$ ). El orden de los extractos, de mayor a menor, indicando entre paréntesis si la diferencia es significativa con respecto a la especie que le prosigue, es el siguiente:

*P. lagopus* ( $p < 0,001$ ) > *P. bellardii* ( $p > 0,001$ ) > *P. lanceolata* ( $p < 0,05$ ) > *P. afra* (*n.s.*) > *P. coronopus* ( $p < 0,001$ ) > *P. serraria*

Y al comparar el contenido de flavonoides totales por g de planta, el orden y la significación estadística es:

*P. lagopus* ( $p < 0,001$ ) > *P. bellardii* ( $p > 0,001$ ) > *P. lanceolata* ( $p < 0,001$ ) > *P. coronopus* (*n.s.*) > *P. afra* ( $p < 0,001$ ) > *P. serraria*

#### - DETERMINACIÓN DE FENILPROPANOIDES TOTALES

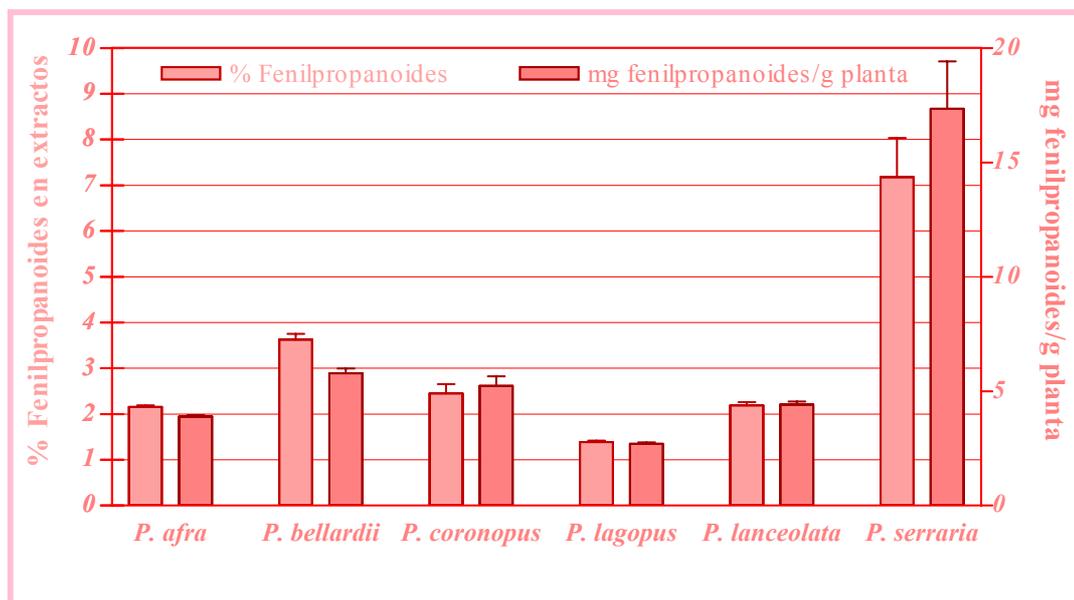
La determinación de fenilpropanoides fue llevada a cabo mediante la técnica de Arnow (1937).

La curva de calibrado fue realizada empleando concentraciones seriadas de verbascósido (fenilpropanoide aislado) comprendidas en el rango 20-0,31  $\mu\text{g/mL}$  por triplicado ( $n=7$ ). Los valores de absorbancia obtenidos fueron representados frente a la concentración final ensayada, ajustándose los puntos a la recta mediante el método de los mínimos cuadrados, comprobando el rango de concentraciones que cumplía la linealidad (10-0,31  $\mu\text{g/mL}$ ,  $R^2 = 0,9963$ ). La ecuación de la recta resultante,  $y = 11674x - 0,0301$ , fue empleada para el posterior cálculo de la concentración de fenilpropanoides en cada uno de los extractos.

Los resultados obtenidos para las muestras fueron:

Extractos	% fenilpropanoides en extractos	mg de fenilpropanoides/g planta desecada
<i>P. afra</i>	$2,15 \pm 0,03^a$	$3,88 \pm 0,06^a$
<i>P. bellardii</i>	$3,62 \pm 0,13^b$	$5,78 \pm 0,21^a$
<i>P. coronopus</i>	$2,45 \pm 0,20^c$	$5,22 \pm 0,42^a$
<i>P. lagopus</i>	$1,38 \pm 0,03^d$	$2,70 \pm 0,06^b$
<i>P. lanceolata</i>	$2,18 \pm 0,06^a$	$4,40 \pm 0,13^a$
<i>P. serraria</i>	$7,17 \pm 0,85^c$	$17,34 \pm 2,06^c$

**Tabla XVII:** Contenido en fenilpropanoides totales de los extractos metanólicos de *Plantago* spp. Los resultados se expresan como ( $M \pm \delta$ ,  $n=3$ ). Los valores con distinto superíndice, para cada columna, son significativamente diferentes entre sí (ANOVA- test Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ).



**Figura 18:** Porcentaje de fenilpropanoides totales en los extractos metanólicos y mg de fenilpropanoides/g de planta de *Plantago* spp.

Los resultados obtenidos (tabla XVII y figura 18) fueron comparados realizando un estudio estadístico mediante ANOVA test de student-Newman-Keuls,  $p < 0,05$ , mostrando que el contenido de fenilpropanoides totales del extracto metanólico de *P. serraria* es significativamente diferente al resto ( $p < 0,001$ ). El orden de los extractos, de mayor a menor, indicando entre paréntesis si la diferencia es significativa con respecto a la especie que le prosigue, es el siguiente:

*P. serraria* ( $p < 0,001$ ) > *P. bellardii* ( $p < 0,01$ ) > *P. coronopus* ( $p < 0,05$ ) > *P. lanceolata* (*n.s.*) > *P. afra* ( $p < 0,05$ ) > *P. lagopus*. *P. lagopus* es significativamente diferente a *P. bellardii* ( $p < 0,01$ ) y *P. coronopus* ( $p < 0,05$ ).

Y al comparar el contenido de fenilpropanoides totales por g de planta, el orden y la significación estadística es:

*P. serraria* ( $p < 0,001$ ) > *P. bellardii* (*n.s.*) > *P. coronopus* (*n.s.*) > *P. lanceolata* (*n.s.*) > *P. afra* (*n.s.*) > *P. lagopus*. *P. lagopus* es significativamente diferente a *P. bellardii* ( $p < 0,01$ ) y *P. coronopus* ( $p < 0,05$ ).

- DETERMINACIÓN DE IRIDOIDES TOTALES.

La determinación cuantitativa de iridoides fue realizada según diferentes técnicas, vainillina etanólica, reactivo de Trim-Hill, y AcOH:HCl (1:1).

Las curvas de calibrado fueron realizadas empleando concentraciones seriadas de aucubina por triplicado (n=6). Los valores de absorbancia obtenidos para cada método fueron representados frente a la concentración final ensayada, ajustándose los puntos a la recta mediante el método de los mínimos cuadrados, comprobando el rango de concentraciones que cumplía la linealidad. Las ecuaciones de la recta resultantes fueron empleadas para el posterior cálculo de la concentración de iridoides, expresados como aucubina, para los extractos. En la tabla XVIII, se muestran el rango de concentraciones ensayadas, el rango que cumple la linealidad, las ecuaciones de las rectas obtenidas así como el coeficiente de regresión lineal,  $R^2$ .

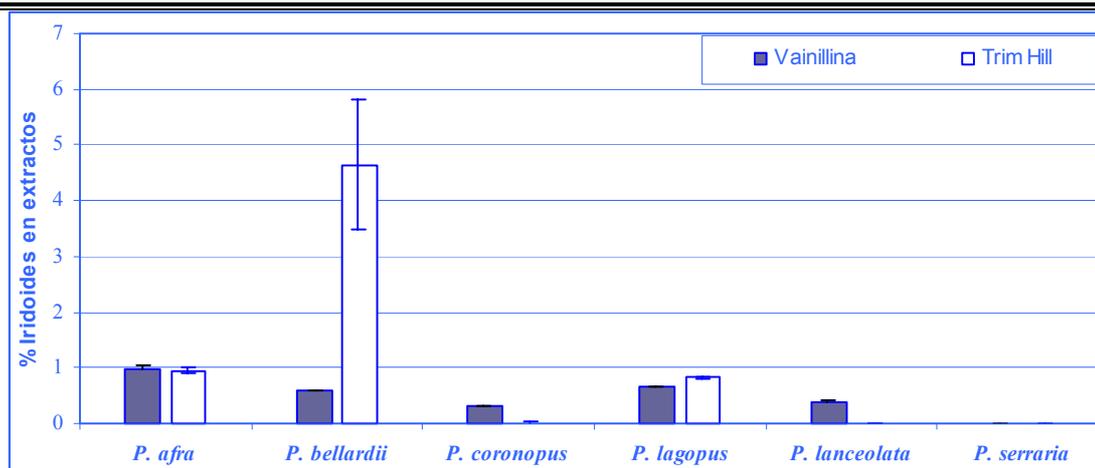
Método	Rango concentraciones ensayadas	Linealidad	Ecuación curva	$R^2$
Vainillina	21,70-0,70 $\mu\text{g/mL}$	10,90-1,40 $\mu\text{g/mL}$	$y= 52,467x-0,0375$	0,9971
Trim-Hill	48,80- 4,90 $\mu\text{g/mL}$	39,00- 4,90 $\mu\text{g/mL}$	$y= 9,5121x + 0,0104$	0,996

**Tabla XVIII:** Ecuaciones de las rectas de calibrado obtenidas para cada reactivo.

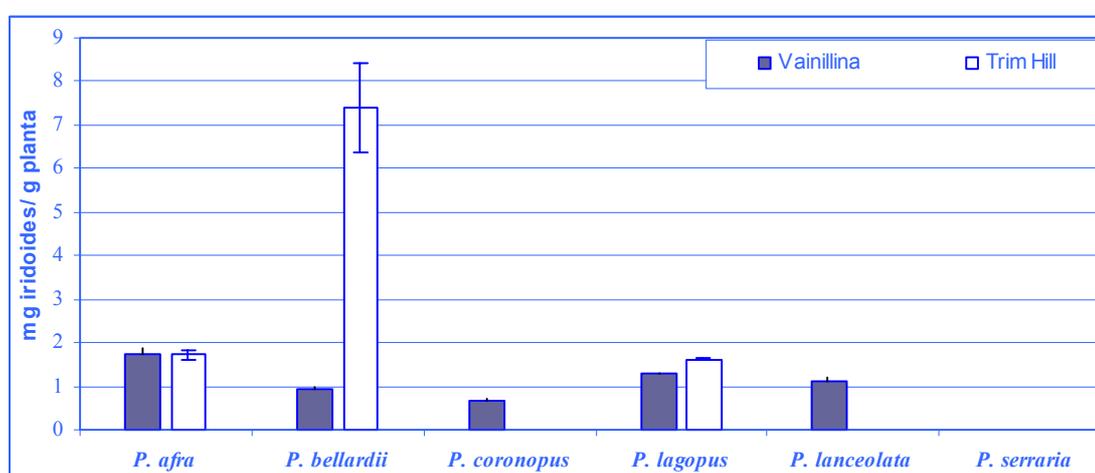
Los resultados obtenidos para las muestras, expresados como porcentaje de iridoides en extractos y mg de iridoides (aucubina)/ g de planta se muestra en la tabla XIX y figuras 19 y 20 ( $M \pm \delta$ , n=3)

Extractos	% Iridoides(aucubina) en extractos		mg iridoides(aucubina)/g planta seca	
	Vainillina etanólica	Reactivo Trim-Hill	Vainillina etanólica	Reactivo Trim-Hill
<i>P. afra</i>	<b>0,97 <math>\pm</math> 0,05<sup>a</sup></b>	<b>0,95 <math>\pm</math> 0,06<sup>a</sup></b>	<b>1,75 <math>\pm</math> 0,10<sup>a</sup></b>	<b>1,72 <math>\pm</math> 0,11<sup>a</sup></b>
<i>P. bellardii</i>	<b>0,59 <math>\pm</math> 0,02<sup>b</sup></b>	<b>4,63 <math>\pm</math> 1,16<sup>b</sup></b>	<b>0,94 <math>\pm</math> 0,02<sup>b</sup></b>	<b>7,39 <math>\pm</math> 1,02<sup>b</sup></b>
<i>P. coronopus</i>	<b>0,32 <math>\pm</math> 0,01<sup>c</sup></b>	<b>n.d.</b>	<b>0,67 <math>\pm</math> 0,02<sup>c</sup></b>	<b>n.d.</b>
<i>P. lagopus</i>	<b>0,66 <math>\pm</math> 0,01<sup>d</sup></b>	<b>0,83 <math>\pm</math> 0,01<sup>a</sup></b>	<b>1,29 <math>\pm</math> 0,02<sup>d</sup></b>	<b>1,61 <math>\pm</math> 0,03<sup>a</sup></b>
<i>P. lanceolata</i>	<b>0,38 <math>\pm</math> 0,03<sup>e</sup></b>	<b>n.d.</b>	<b>1,09 <math>\pm</math> 0,09<sup>e</sup></b>	<b>n.d.</b>
<i>P. serraria</i>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>

**Tabla XIX:** Contenido en iridoides de los extractos metanólicos de *Plantago* spp. determinado mediante el empleo las dos técnicas. Los resultados mostrados se expresan como ( $M \pm \delta$ , n=3). Los valores con distinto superíndice, para cada columna, son significativamente diferentes entre sí (ANOVA- test Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ). n.d.: No detectado.



**Figura 19:** Porcentaje de iridoides totales en extractos metanólicos de *Plantago* spp, empleando dos reactivos.



**Figura 20:** mg de iridoides / gramo de planta.

Los resultados obtenidos (tabla XIX y figuras 19 y 20) fueron comparados realizando un estudio estadístico mediante ANOVA test de student-Newman-Keuls,  $p < 0,05$ . A continuación, se muestra el orden de mayor a menor, del contenido en iridoides de los extractos metanólicos de *Plantago* spp, indicando si la diferencia es significativa con respecto al que le prosigue.

-Vainillina:

*P. afra* ( $p < 0,01$ ) > *P. lagopus* ( $p < 0,01$ ) > *P. bellardii* ( $p < 0,001$ ) > *P. lanceolata* ( $p < 0,05$ ) > *P. coronopus*. En *P. serraria* no se detectaron iridoides por este método.

-Trim-Hill:

*P. bellardii* ( $p < 0,001$ ) > *P. afra* (n.s.)  $\geq$  *P. lagopus*. En el resto de los extractos, correspondientes a *P. coronopus*, *P. lanceolata* y *P. serraria*, no se detectaron iridoides empleando este reactivo.

Y si se compara el contenido de iridoïdes totales /g de planta, el orden y significación estadística es:

-Vainillina:

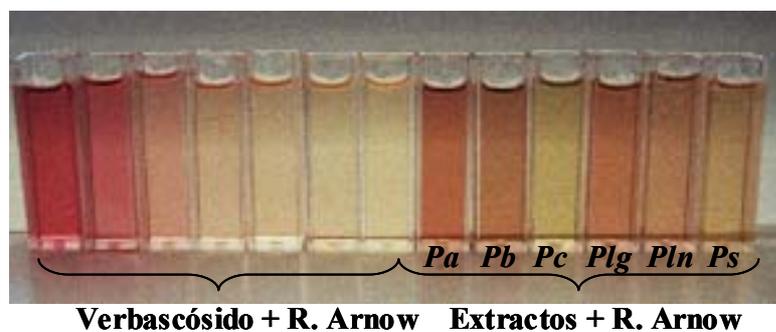
*P. afra* ( $p < 0,001$ ) > *P. lagopus* ( $p < 0,01$ ) > *P. lanceolata* ( $p < 0,5$ ) > *P. bellardii* ( $p < 0,001$ ) > *P. coronopus*.

-Trim-Hill:

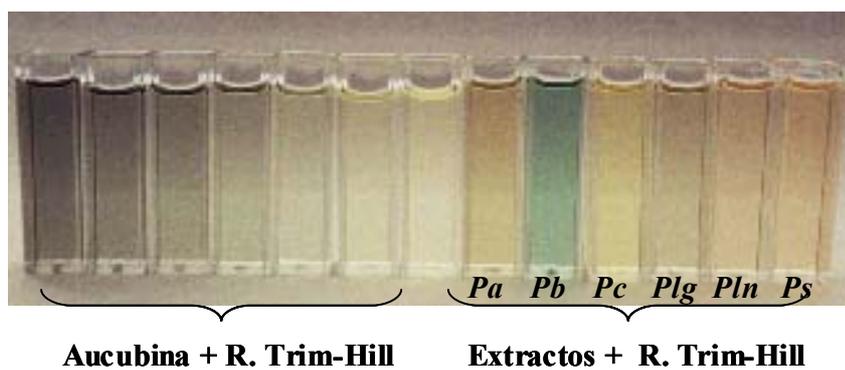
*P. bellardii* ( $p < 0,001$ ) > *P. afra* (n.s.)  $\geq$  *P. lagopus*.

Reacciones coloreadas:

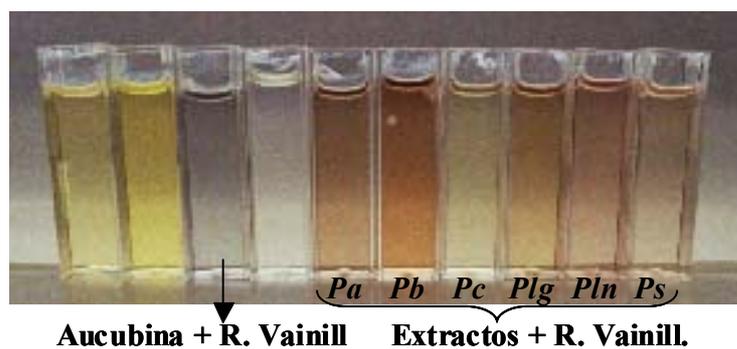
#### Determinación de Fenilpropanoides: Reactivo de Arnow



#### Determinación de Iridoides: Reactivo de Trim-Hill



#### Determinación de Iridoides: Reactivo de Vainillina etanólica



**Figura 21:** Diferentes reacciones coloreadas. Pa, *P. afra*; Pb, *P. bellardii*; Pc, *P. coronopus*; Plg, *P. lagopus*; Pln, *P. lanceolata*; Ps; *P. serraria*.

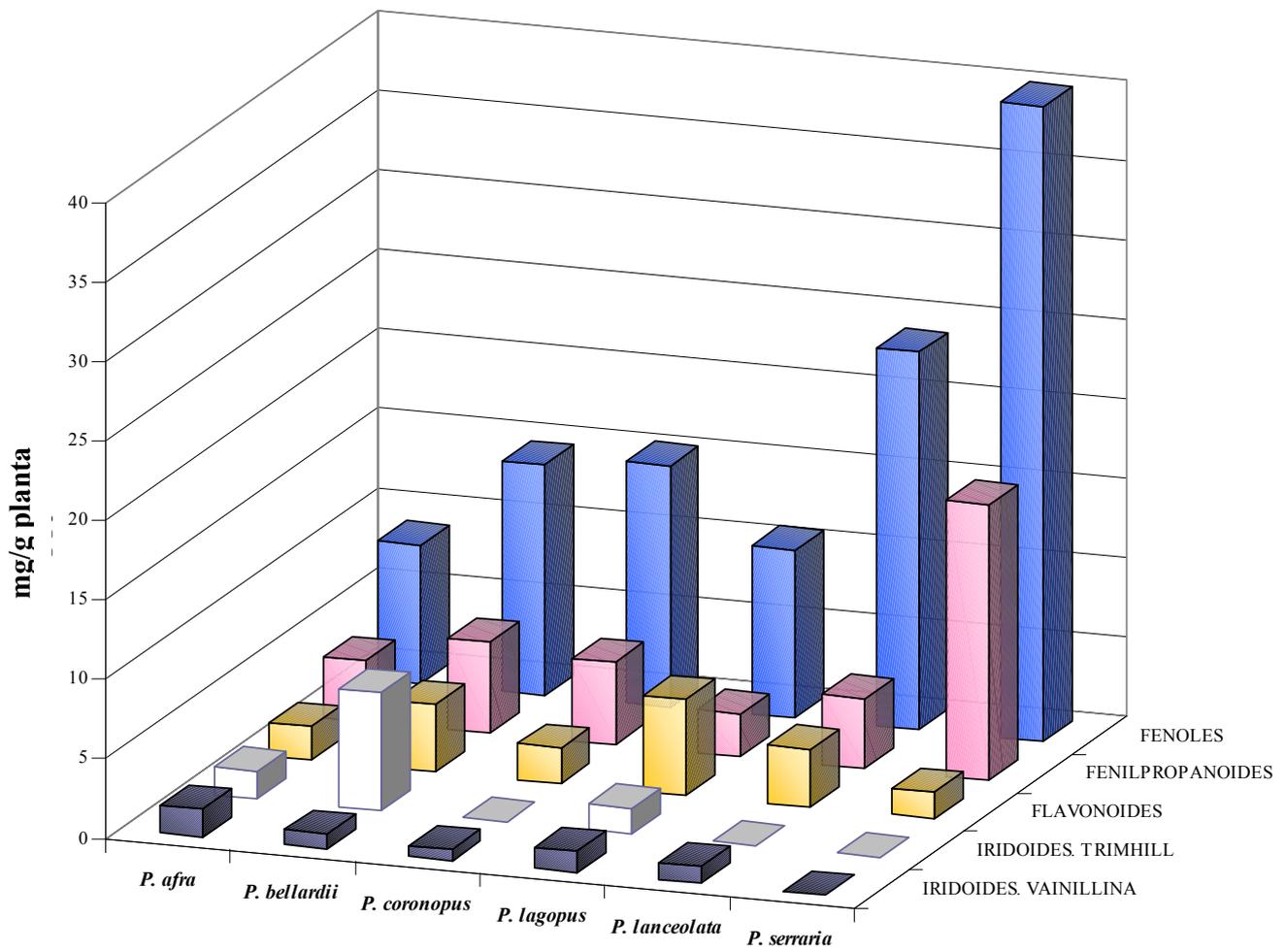


Figura 22: Representación gráfica de los resultados del estudio colorimétrico de los extractos metanólicos de *Plantago* spp.

#### IV.5. DETERMINACIONES CROMATOGRÁFICAS (HPLC).

Se cuantificaron los dos flavonoides (luteolina-7-glucósido y rutina) y el fenilpropanoide, verbascósido, aislados de los extractos de *Plantago spp.*

a) Optimización de las condiciones de separación.

La elección de las condiciones de experimentación se fundamentó en la necesidad de obtener cromatogramas con una resolución mayor de picos adyacentes.

Se probaron diferentes mezclas de agua y metanol como fase móvil, así como el tipo de elución (en gradiente e isocrático), y el empleo de diferentes ácidos en la fase acuosa, para reducir la ionización de los grupos fenoles. Finalmente, las condiciones experimentales seleccionadas fueron: elución isocrática agua (5% ácido fórmico):metanol (70:30 o 74:26) y con flujo de 0,8 mL/min. al conseguirse una mejor resolución del par crítico luteolina-7-glucósido-rutina.

Se verificó que los extractos no poseían las geninas correspondientes a los flavonoides aislados, por lo que el tiempo de análisis se redujo a aproximadamente, 20-25 min.

Los cromatogramas fueron registrados a  $\lambda = 340$ , al ser una longitud de onda en la que absorben tanto verbascósido como los dos flavonoides.

Bajo estas condiciones, verbascósido, eluye a  $t_R = 7,1-7,3$  min, luteolina-7-glucósido, a  $t_R = 10,9$  min, y rutina a  $t_R = 12,3$  min aprox. (figura 24).

b) Ecuaciones de regresión

El análisis de regresión lineal para cada uno de los compuestos fenólicos fue realizado mediante el método de estándar externo, empleando diferentes diluciones de una mezcla constituida por los tres compuestos a analizar (diluciones seriadas 1:2 iniciando con 500  $\mu\text{g/mL}$ ), representando el área del pico de cada analito frente a la concentración. Los resultados obtenidos se muestran en la tablaXX, donde se expresa, el rango de linealidad, la ecuación de la recta ajustada por el método de los mínimos cuadrados, donde “y” es el área del pico y “x” es la concentración de cada compuesto; el coeficiente de regresión lineal  $R^2$ , el límite de detección y cuantificación a 340 nm, para cada uno de los compuestos.

	Verbascósido	Luteolina glucósido	Rutina
n	8	8	8
Rango concentraciones ( $\mu\text{g/mL}$ )	500-3,90	500-3,90	500-3,90
Ecuación recta	$y=32030x-56372$	$y=37201x + 433427$	$y=73526x- 281837$
$R^2$	0,9974	0,9982	0,9998
Límite detección (LOD) ( $\mu\text{g/mL}$ )	13,94	13,76	3,88
Límite cuantificación (LOQ) ( $\mu\text{g/mL}$ )	69,27	41,85	11,80

**Tabla XX:** Relación lineal entre el área de pico y concentración ( $n=8$ ). En la ecuación de regresión lineal,  $x$  se refiere a la concentración de cada compuesto ( $\mu\text{g/mL}$ ), y el área del pico, y  $R^2$ , el coeficiente de correlación lineal de la ecuación.

c) Ensayo para determinar la adecuación del sistema.

El ensayo de rendimiento o recuperación de cada uno de los compuestos fue llevado a cabo mediante la adición de patrones (a concentraciones conocidas, en diferentes rangos de la curva) a soluciones de extractos. El rendimiento medio para cada uno de los compuestos se muestra en la tabla XXI.

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rendimiento (%)		
	Verbascósido	Luteolina glucosido	Rutina
50	97-98	98,3-98,7	
100	105	88	98
400	94,5	88-98	80

**Tabla XXI:** Rendimiento obtenido de los diferentes compuestos en las condiciones experimentales descritas.

El ensayo de precisión fue realizado mediante la adición de la misma muestra cinco veces, mostrando que la desviación estándar relativa del área de pico para cada muestra era:  $<6\%$ , valor incluido en el rango exigido por la IUPAC y Comisión ICH para considerar un método analítico válido.

En el caso de la prueba de estabilidad, las muestras fueron analizadas durante 3 días consecutivos, viendo que los analitos eran estables durante este periodo almacenados a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  en metanol.

d) Aplicación

Un volumen de  $10\text{ }\mu\text{L}$  de cada una de las muestras (extractos metanólicos) fue inyectado en el sistema. Los picos obtenidos en el cromatograma fueron identificados comparando el tiempo de retención con los patrones, así como mediante el método de la adición interna, es decir, añadiendo una

concentración conocida de patrones a cada muestra y calculando la diferencia de área entre los picos antes y después de la adición.

El contenido de los tres compuestos en las muestras fue calculado empleando las rectas de regresión previamente mostradas. Los porcentajes de cada compuestos para cada una de las muestras, expresados como porcentaje en cada extracto y como contenido en mg / g de planta desecada, se muestran en las tablas XXII y XXIII..y figura 23. Las determinaciones fueron realizadas por duplicados durante 3 días consecutivos, ( $M \pm \delta$ ).

Muestras	Contenido (% en extracto)		
	Verbascósido	Luteolina-glucósido	Rutina
<i>P. afra</i>	2,67 ± 0,27 <sup>a</sup>	n.d.	n.d
<i>P. bellardii</i>	5,57 ± 0,56 <sup>a</sup>	n.d.	1,80 ± 0,29
<i>P. coronopus</i>	4,12 ± 1,01 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.
<i>P. lagopus</i>	1,46 ± 0,45 <sup>a</sup>	3,33 ± 0,07 <sup>a</sup>	n.d.
<i>P. lanceolata</i>	4,16 ± 1,31 <sup>a</sup>	1,37 ± 0,25 <sup>b</sup>	n.d.
<i>P. serraria</i>	21,18 ± 6,11 <sup>b</sup>	n.d	n.d.

**Tabla XXII:** Contenido en verbascósido, luteolina-7-glucósido y rutina de los extractos metanólicos de *Plantago* spp. Los resultados mostrados se expresan como ( $M \pm \delta$ ,  $n=3$ ). Los valores con distinto superíndice, para cada columna, son significativamente diferentes entre sí (ANOVA- test Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ). n.d.: No detectado.

Muestras	Contenido (mg/g planta seca)		
	Verbascósido	Luteolina-glucósido	Rutina
<i>P. afra</i>	4,82 ± 0,50	n.d.	n.d
<i>P. bellardii</i>	8,88 ± 0,89	n.d.	2,86 ± 0,46
<i>P. coronopus</i>	8,78 ± 2,16	n.d.	n.d.
<i>P. lagopus</i>	2,83 ± 0,88	6,48 ± 0,14	n.d.
<i>P. lanceolata</i>	12,12 ± 3,82	4,01 ± 0,73	n.d.
<i>P. serraria</i>	51,19 ± 14,77	n.d	n.d.

**Tabla XXIII:** Contenido en verbascósido, luteolina-7-glucósido y rutina en la planta desecada.

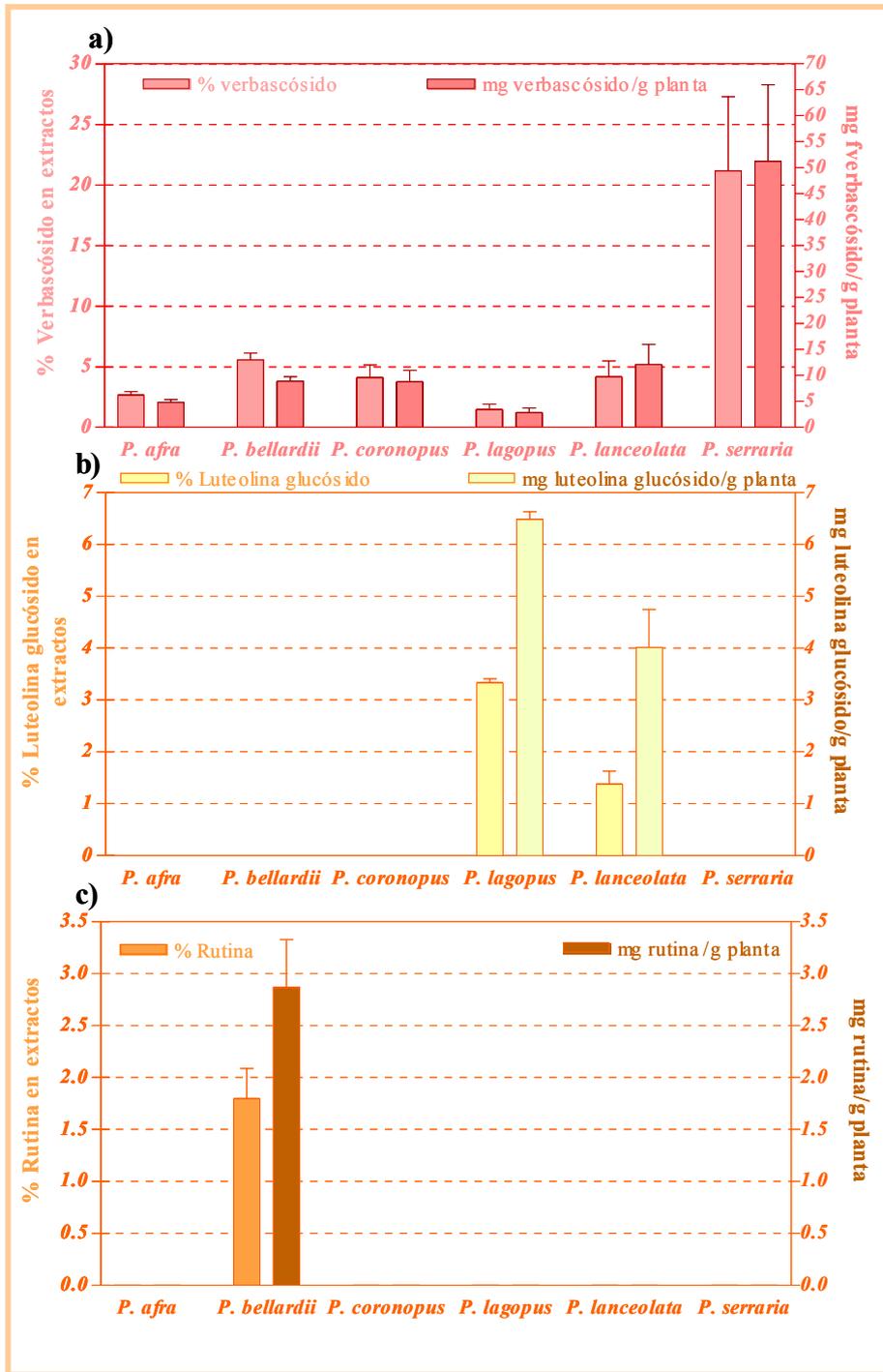


Figura 23: Porcentajes de a) verbascosido, b) luteolina-7glucósido y c) rutina en extractos metanólicos de *Plantago* spp y mg/g planta desecada.

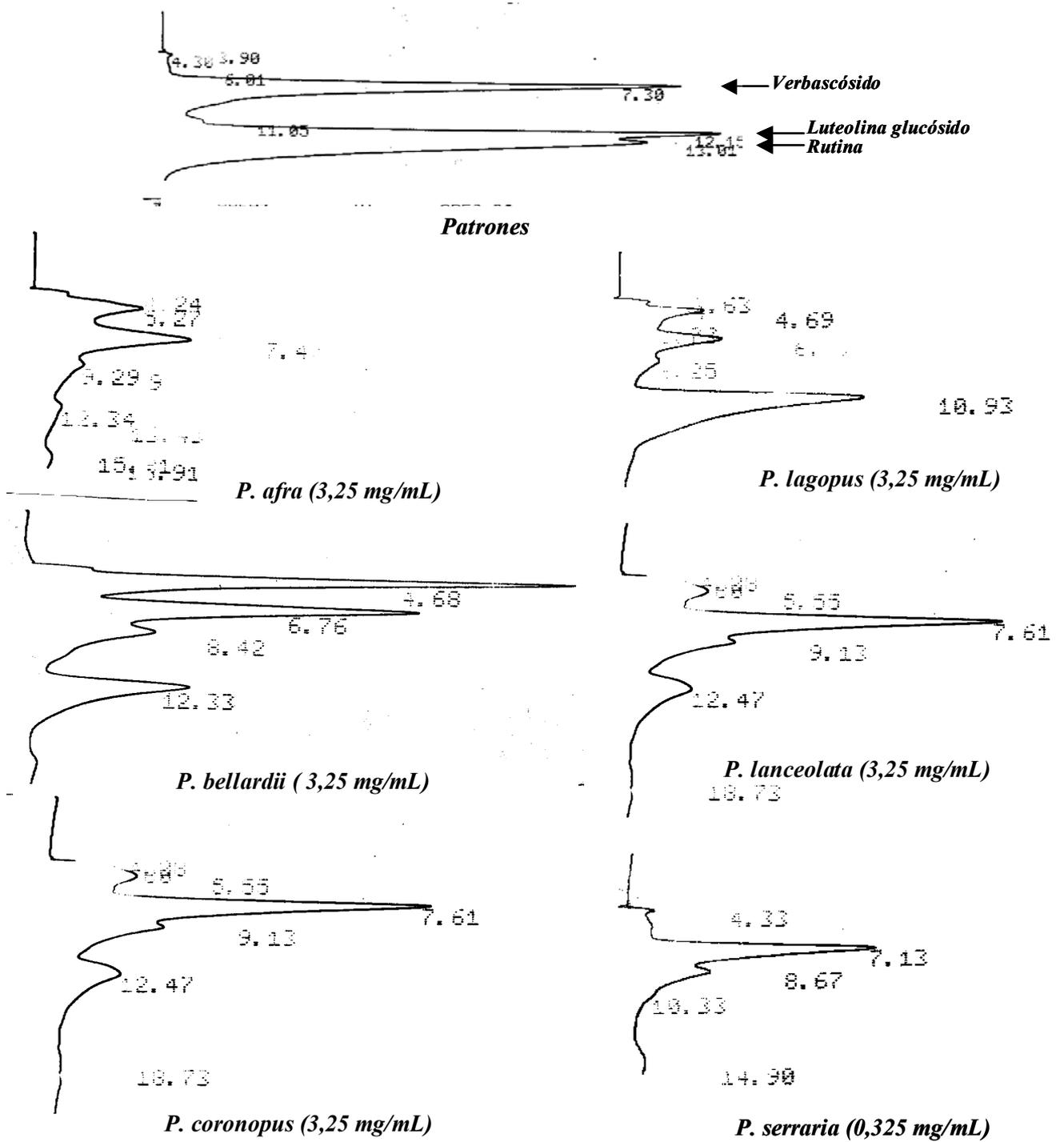


Figura 24: Cromatogramas por HPLC de extractos metanólicos de *Plantago* spp,  $\lambda=340$  nm

-Aucubina y genipósido.

a) Optimización de las condiciones de separación.

La elección de las condiciones de experimentación, en este caso, fue basada en la necesidad de detectar ambos compuestos, ya que presentan una absorción en el UV muy baja, (genipósido,  $\lambda_{\text{máx}}=235$  nm, aucubina,  $\lambda_{\text{máx}}=215-205$ ). En el caso de aucubina, la fase óptima elegida fue agua:acetonitrilo (98:2). En el caso de genipósido, no logramos hacer un cuantitativo, al carecer de cantidad para la recta de calibrado, aunque sí pudimos identificar el pico en los extractos.

b) Ecuaciones de regresión

El análisis de regresión lineal para cada uno de los compuestos terpénicos fue realizado mediante el método de estándar externo, empleando diferentes diluciones de aucubina, representando el área del pico de cada analito frente a la concentración. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla XXIV, donde se expresa, la ecuación de la recta ajustada por el método de los mínimos cuadrados, donde x es la concentración de cada compuesto, e y el área del pico; el coeficiente de regresión lineal  $R^2$ , el rango de linealidad, el límite de detección y cuantificación detectado a 205 nm, para aucubina.

	<b>Aucubina</b>
n	8
Rango concentraciones ensayado ( $\mu\text{g/mL}$ )	2000-15.62
Ecuación recta	$y=4386.3x + 63443$
$R^2$	0,9994
Límite detección (LOD) ( $\mu\text{g/mL}$ )	61,12

**Tabla XXIV:** Relación lineal entre el área de pico y concentración ( $n=8$ ). En la ecuación de regresión lineal, x se refiere a la concentración de cada compuesto ( $\mu\text{g/mL}$ ), y, el área del pico, y  $R^2$ , el coeficiente de correlación lineal de la ecuación.

c) Ensayo para determinar la adecuación del sistema.

El ensayo de rendimiento o recuperación de cada uno de los compuestos fue llevado a cabo mediante la adición de patrones (a diferentes concentraciones conocidas, en diferentes rangos de la curva) a soluciones de extractos. El rendimiento medio para aucubina fue del 98.5 %

En el caso de la prueba de estabilidad, las muestras fueron analizadas durante 3 días consecutivos, viendo que los analitos eran estables durante este periodo almacenados a  $-20$  °C en metanol.

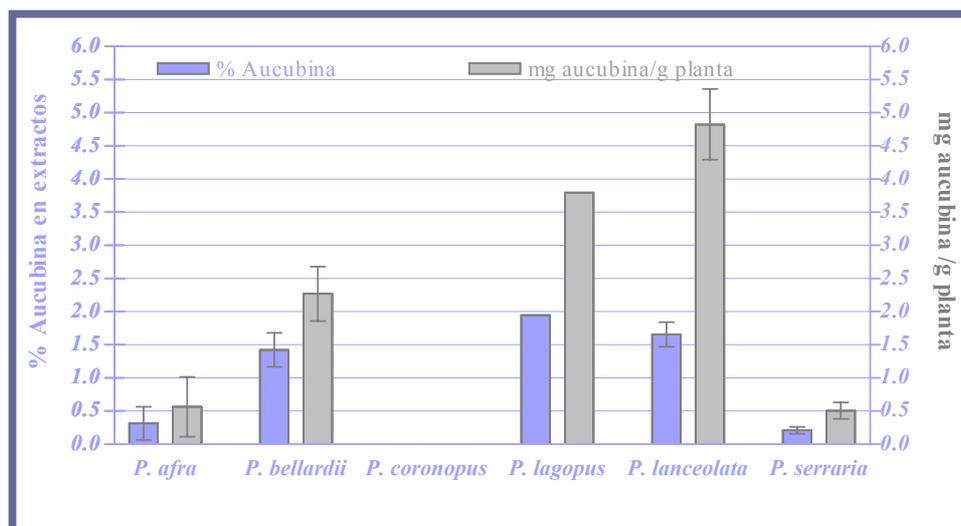
## d) Aplicación

Un volumen de 10  $\mu\text{L}$  de cada una de las muestras (extractos metanólicos) fue inyectada en el sistema. Los picos obtenidos en el cromatograma fueron identificados comparando el tiempo de retención con el patrón, así como mediante el método de la adición interna, es decir, añadiendo una concentración conocida de aucubina a cada muestra y calculando la diferencia de área entre los picos antes y después de la adición.

El contenido de los dos compuestos en las muestras fue calculado empleando las rectas de regresión previamente mostradas. Los porcentajes de cada compuestos para cada una de las muestras, expresados como % de aucubina en extractos y contenido en mg por g de planta seca, se muestran en la tabla XV y figura 25. Las determinaciones fueron realizadas por duplicados durante 3 días consecutivos.

Muestras	% Aucubina en extractos	mg aucubina/g planta
<i>P. afra</i>	$0,31 \pm 0,24^a$	$0,56 \pm 0,45$
<i>P. bellardii</i>	$1,42 \pm 0,25^b$	$2,27 \pm 0,40$
<i>P. coronopus</i>	n.d.	n.d.
<i>P. lagopus</i>	$1,95 \pm n.s.^a$	$3,79 \pm n.s$
<i>P. lanceolata</i>	$1,65 \pm 0,18^c$	$4,82 \pm 0,53$
<i>P. serraria</i>	$0,21 \pm 0,05^{*a}$	$0,50 \pm 0,12^a$

**Tabla XV:** Contenido en aucubina de los extractos metanólicos de *Plantago* spp.. Los resultados mostrados se expresan como ( $M \pm \delta$ ,  $n=3$ ). Los valores con distinto superíndice, para cada columna, son significativamente diferentes entre sí (ANOVA- test Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ). n.d.= no detectado. \*: El valor obtenido es inferior al LOD.



**Figura 25:** Porcentajes de aucubina en extractos metanólicos de *Plantago* spp.

## IV.6. ENSAYOS DE QUIMIOPREVENCIÓN

### IV.6.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

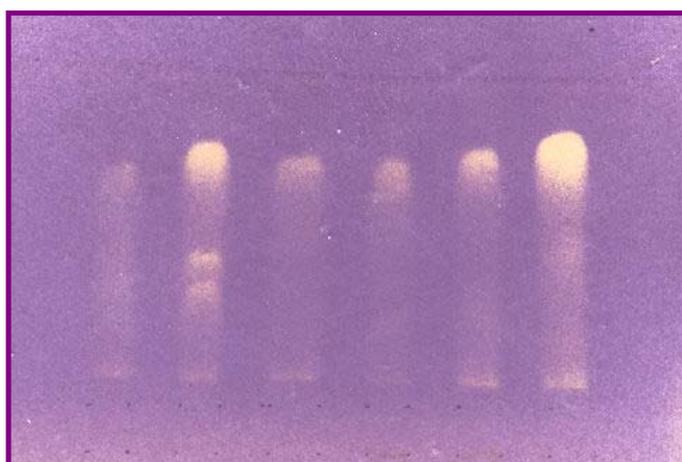
#### IV.6.1.1. Resultados

##### -Actividad antirradicalaria frente al DPPH

###### a) Ensayo cualitativo.

Los extractos metanólicos de las diferentes especies de *Plantago* fueron cromatografiados en capa fina con diferentes fases móviles y revelados con una solución de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracilo).

Como se muestra en la figura 26, todos los extractos de *Plantago spp.* muestran poseer algún compuesto con capacidad antioxidante.



**Figura 26 :** Cromatograma (CCF) de extractos metanólicos de *Plantago spp.* (Fm: BuOH:H<sub>2</sub>O: ácido acético 60:35:15). Revelador: Solución al 0,2 % de DPPH en metanol.

###### b) Ensayo cuantitativo.

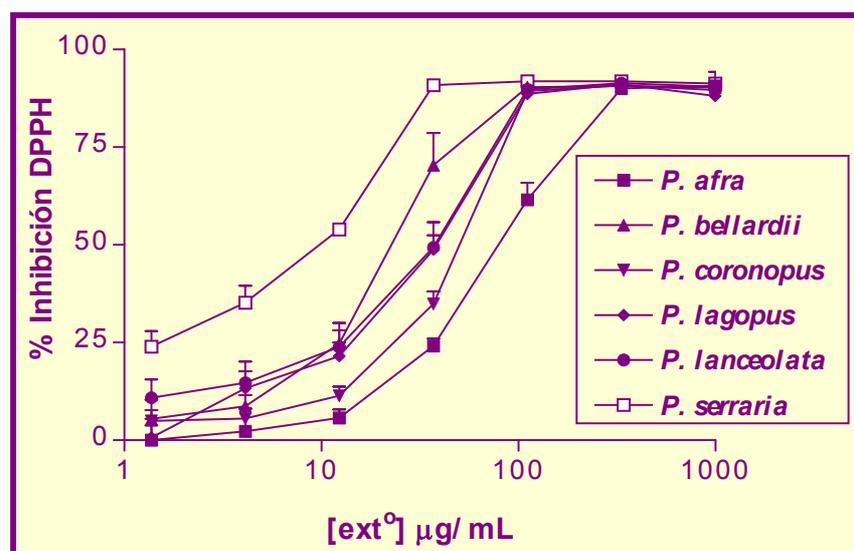
La actividad antirradicalaria fue valorada por colorimetría a  $\lambda=540$  nm mediante reacción de las muestras disueltas en MeOH o DMSO con el radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH<sup>•</sup>) en placas de 96 pocillos tras incubar durante 30 minutos. Fue comparada con el control disolvente, (0% de actividad antirradicalaria) y, además, se hizo un ensayo paralelo con ácido ascórbico como patrón.

Los datos obtenidos (tabla XXVI) fueron representados gráficamente (figura 27), en abscisas concentración de las muestras ensayadas y en ordenadas, el promedio del porcentaje de reducción del radical DPPH de cuatro ensayos realizados, calculando la IC<sub>50</sub>, (concentración necesaria para reducir al 50% el radical DPPH) (tabla XXVII y figura 28).

La diferencia significativa entre grupos en cada ensayo fue realizado mediante ANOVA test de student-Newman-Keuls,  $p < 0,05$ .

Concentración de extractos ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Inhibición del radical DPPH					
	<i>P. afra</i>	<i>P. bellardii</i>	<i>P. coronopus</i>	<i>P. lagopus</i>	<i>P. lanceolata</i>	<i>P. serraria</i>
1000	90,72 $\pm$ 0,67	90,30 $\pm$ 0,75	89,61 $\pm$ 1,94	88,16 $\pm$ 2,05	90,49 $\pm$ 3,75	91,30 $\pm$ 0,37
333,33	90,03 $\pm$ 0,41	90,63 $\pm$ 0,44	90,79 $\pm$ 0,82	91,12 $\pm$ 0,66	91,33 $\pm$ 0,26	91,87 $\pm$ 0,47
111,11	61,55 $\pm$ 4,34	90,39 $\pm$ 0,35	89,41 $\pm$ 0,62	88,65 $\pm$ 0,53	89,76 $\pm$ 0,44	91,87 $\pm$ 0,18
37,04	24,09 $\pm$ 1,82	70,37 $\pm$ 8,21	34,82 $\pm$ 3,26	48,75 $\pm$ 6,76	49,40 $\pm$ 6,41	90,84 $\pm$ 0,40
12,34	5,73 $\pm$ 2,14	24,67 $\pm$ 3,47	11,34 $\pm$ 2,37	21,52 $\pm$ 3,48	23,84 $\pm$ 6,20	53,95 $\pm$ 1,05
4,12	2,25 $\pm$ 5,89	8,68 $\pm$ 2,82	5,56 $\pm$ 2,46	13,27 $\pm$ 4,39	14,71 $\pm$ 5,42	35,22 $\pm$ 4,32
1,37	-1,17 $\pm$ 3,77	5,41 $\pm$ 4,92	4,96 $\pm$ 2,72	0,74 $\pm$ 4,75	10,85 $\pm$ 4,73	23,95 $\pm$ 3,97

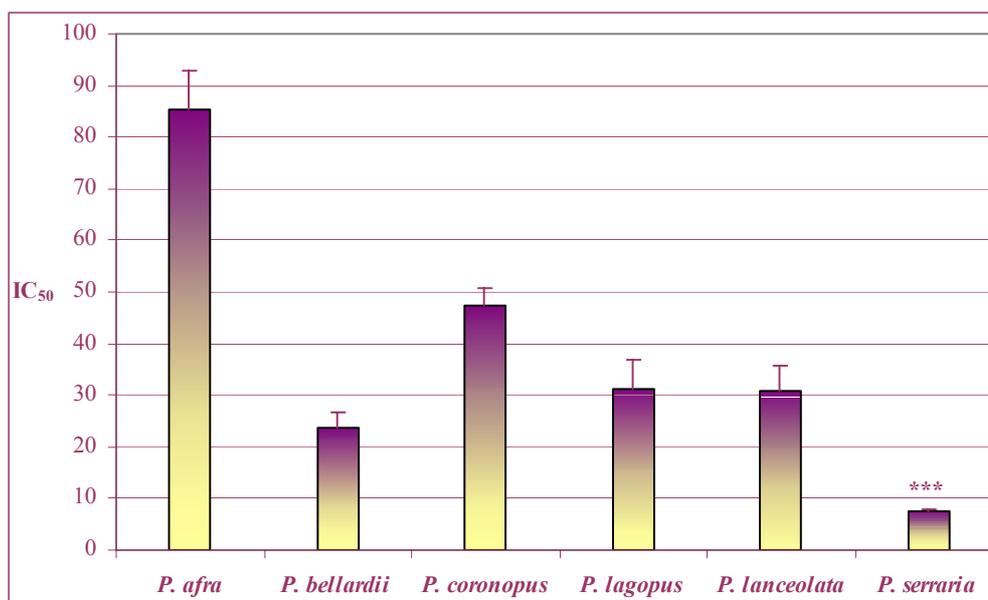
**Tabla XXVI:** Actividad antirradicalaria de los extractos metanólicos de *Plantago* spp, expresados como ( $M \pm \delta$ ,  $n=3$ ).



**Figura 27:** Curvas dosis-respuesta (% inhibición DPPH)

Extractos metanólicos	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
<i>P. afra</i>	85,22 ± 7,56 <sup>a</sup>
<i>P. bellardii</i>	23,70 ± 2,99 <sup>b</sup>
<i>P. coronopus</i>	47,43 ± 3,42 <sup>c</sup>
<i>P. lagopus</i>	31,31 ± 5,55 <sup>b</sup>
<i>P. lanceolata</i>	30,86 ± 4,66 <sup>b</sup>
<i>P. serraria</i>	7,60 ± 0,46 <sup>d</sup>

**Tabla XXVII:** Valores de IC<sub>50</sub> (µg/mL) de los extractos metanólicos de *Plantago spp*, expresados como ( $M \pm \delta$ ,  $n=3$ ). Los valores con distinto superíndice, para cada columna, son significativamente diferentes entre sí (ANOVA- test Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ).



**Figura 28:** Representación gráfica de los valores de IC<sub>50</sub> ( $M \pm \delta$  en µg/mL,  $n=3$ )

Los compuestos aislados se ensayaron en idénticas condiciones experimentales que para el caso de los extractos. Todos los valores son expresados como  $M \pm \delta$ ,  $n=3$ . En la figura 29 se muestran los % de inhibición frente al DPPH a las diferentes concentraciones ensayadas medidas tras 30 minutos de incubación con el radical. En la tabla XXVIII y figura 30, se muestran los valores IC<sub>50</sub> expresados en µM.

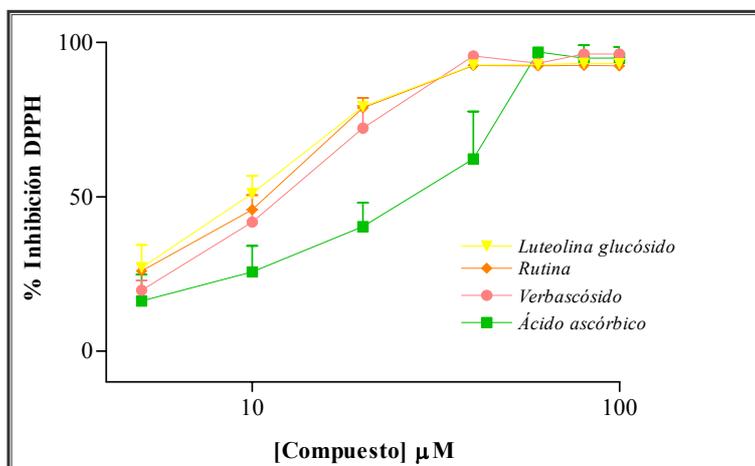


Figura 29: Curvas dosis respuesta (% Inhibición DPPH)

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM)
Aucubina	n.a.
Genipósido	n.a.
Luteolina glucósido	8,98 ± 1,40 <sup>a***</sup>
Rutina	9,75 ± 0,87 <sup>a***</sup>
Verbascósido	11,52 ± 1,60 <sup>a***</sup>
Ácido ascórbico	24,19 ± 4,21

Tabla XXVIII: Valores de IC<sub>50</sub> (μM) de los compuestos aislados. n.a.: No activo. Los valores con distinto superíndice, para cada columna, son significativamente diferentes entre sí (ANOVA- test Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ) \*\*\*,  $p < 0,001$  vs patrón.

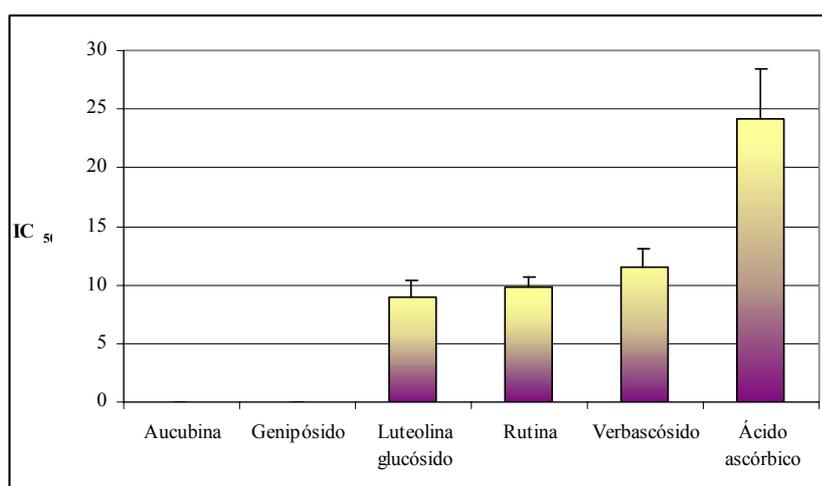


Figura 30: Representación gráfica de los valores de IC<sub>50</sub> (μM).

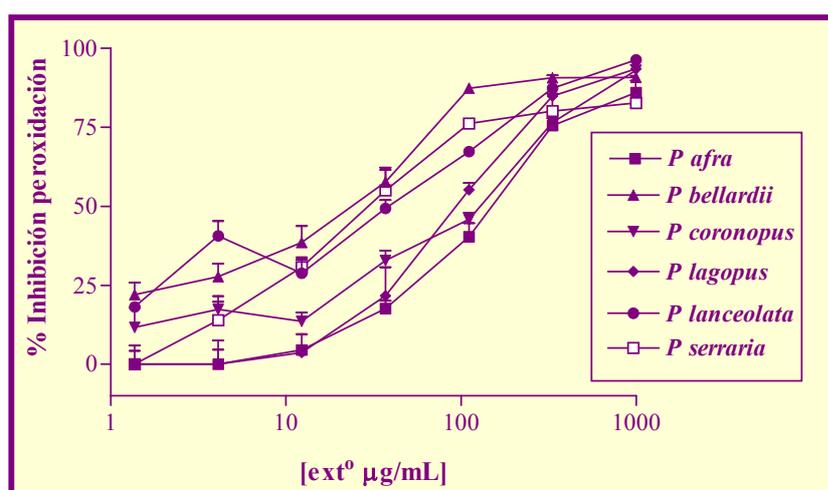
-Inhibición de la peroxidación lipídica microsomal. Test TBA.

Los extractos metanólicos de *Plantago spp.* fueron ensayados para determinar la capacidad de inhibición la peroxidación lipídica inducida en liposomas de cerebro bovino. La peroxidación fue iniciada mediante la adición de vitamina C e ión ferroso, y fue medida por espectrofotometría mediante el test del ácido tiobarbitúrico.

Los valores de porcentaje de inhibición (tabla XXIX) son representados frente a las concentraciones ensayadas, obteniéndose la correspondiente curva dosis-respuesta (figura 31). A partir de ésta, se calcula su IC<sub>50</sub>, es decir, la concentración en µg/mL de muestra que inhibe la formación de MDA y otros metabolitos en un 50% (tabla XXX y figura 32). Los valores son expresados como M ± δ (n=4).

Concentración de extractos (µg/mL)	% Inhibición de peroxidación lipídica					
	<i>P.afra</i>	<i>P. bellardii</i>	<i>P. coronopus</i>	<i>P. lagopus</i>	<i>P. lanceolata</i>	<i>P. serraria</i>
1000	86,01 ± 5,30	90,78 ± 0,43	93,06 ± 1,66	93,55 ± 1,19	96,40 ± 0,42	82,75 ± 6,99
333,33	75,57 ± 2,29	90,66 ± 1,05	76,49 ± 1,14	84,90 ± 1,10	87,36 ± 4,13	80,15 ± 5,49
111,11	40,41 ± 4,30	87,36 ± 0,45	45,91 ± 2,10	55,22 ± 2,22	67,28 ± 0,57	76,25 ± 0,63
37,04	17,66 ± 2,43	57,72 ± 4,58	32,88 ± 3,13	21,70 ± 9,07	49,36 ± 2,64	55,07 ± 6,43
12,34	4,56 ± 1,44	38,55 ± 5,22	13,60 ± 2,85	3,67 ± 5,91	28,85 ± 4,14	30,72 ± 3,14
4,12	-2,89 ± 4,57	27,75 ± 4,09	17,37 ± 4,16	-0,21 ± 7,54	40,61 ± 4,71	14,01 ± 5,69
1,37	0,85 ± 1,28	22,05 ± 3,82	11,69 ± 6,08	0,05 ± 5,94	18,14 ± 0,89	-1,18 ± 4,22

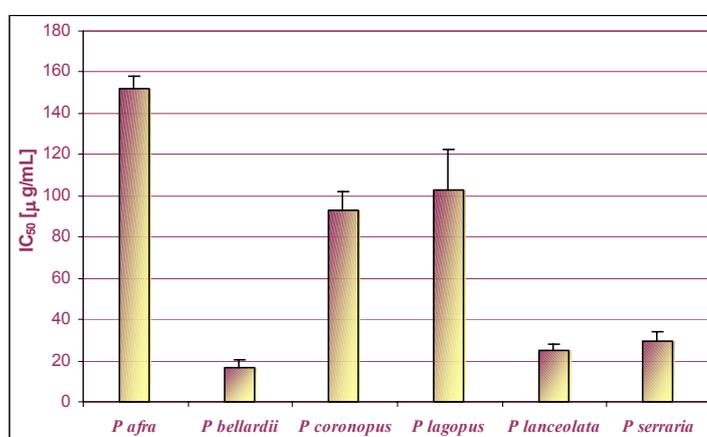
**Tabla XXIX:** Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de *Plantago spp.*



**Figura 31:** Curvas dosis-respuesta (% inhibición de la peroxidación lipídica)

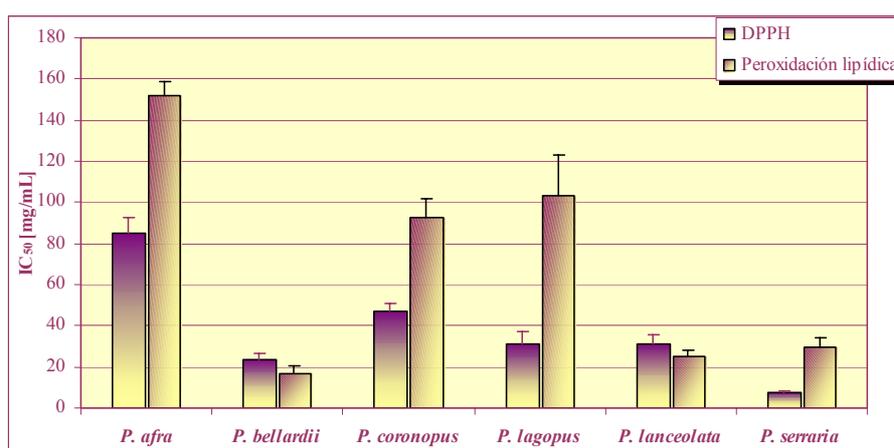
Extractos metanólicos	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
<i>P. afra</i>	152,21 ± 6,14 <sup>a</sup>
<i>P. bellardii</i>	17,01 ± 3,26 <sup>b</sup>
<i>P. coronopus</i>	92,91 ± 9,03 <sup>c</sup>
<i>P. lagopus</i>	103,09 ± 19,76 <sup>c</sup>
<i>P. lanceolata</i>	24,69 ± 3,05 <sup>b</sup>
<i>P. serraria</i>	29,84 ± 4,17 <sup>b</sup>

**Tabla XXX:** Valores de IC<sub>50</sub> (µg/mL) de los extractos metanólicos de *Plantago spp.* Los valores con distinto superíndice, para cada columna, son significativamente diferentes entre sí (ANOVA- test Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ).



**Figura 32:** Representación gráfica de los valores de IC<sub>50</sub> (µg/mL).

En la figura 33 resumimos los valores de IC<sub>50</sub> calculados para la actividad antirradicalaria e inhibición de la peroxidación lipídica de los extractos metanólicos de *Plantago spp.*



**Figura 33:** Representación gráfica de los valores de IC<sub>50</sub> (µg/mL) para la inhibición del radical DPPH y la peroxidación lipídica.

#### IV.6.1.2. Discusión de resultados.

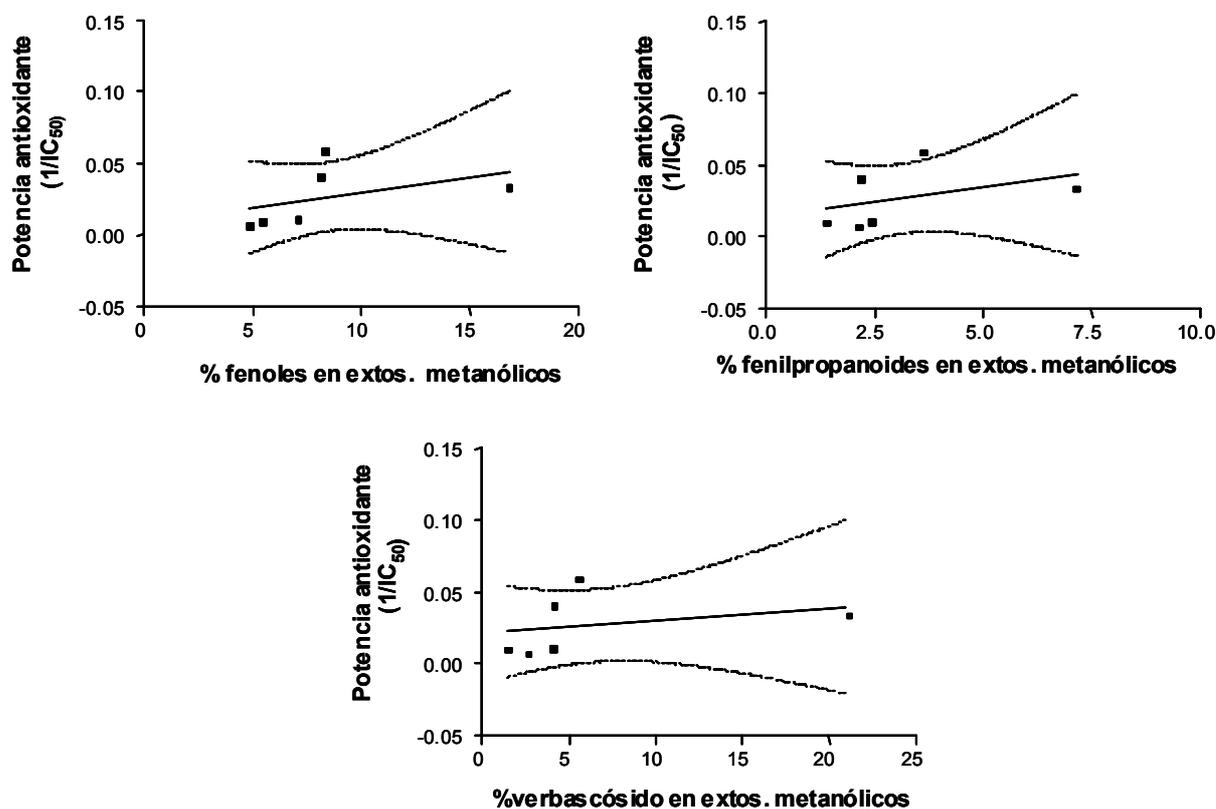
Los resultados obtenidos muestran que todos los extractos metanólicos de *Plantago spp.* ensayados presentan actividad antioxidante. Analizando los valores de IC<sub>50</sub>, el orden establecido de potencia es el siguiente: *P. serraria* (p<0,001) > *P. bellardii* (n.s.) ≈ *P. lanceolata* (p<0.001.) > *P. lagopus* (p<0,001) > *P. coronopus* (p< 0,001) > *P. afra*, tanto frente al radical DPPH como en la peroxidación lipídica.

En relación con los compuestos aislados, la actividad antirradicalaria calculada como IC<sub>50</sub>, expresados en μM, muestran que luteolina glucósido, rutina y verbascósido son significativamente más activos que el patrón ácido ascórbico (p <0,001), no existiendo diferencia significativa entre ellos. Si los valores se expresan en μg/mL, luteolina glucósido es el más activo no mostrando diferencia significativa con ácido ascórbico, sin embargo, rutina y verbascósido, son significativamente menos activos que ácido ascórbico o luteolina glucósido ( p< 0,05 y p< 0,01 respectivamente). Además, los compuestos tratados con DPPH fueron analizados en periodos de 5 min, comprobándose que, la actividad antioxidante se iniciaba de forma instantánea, estabilizándose el valor de IC<sub>50</sub> a partir de 30 min de incubación para el ácido ascórbico, mientras que para el resto de los compuestos, se estabilizaban a los 15 min.(p>0,05). También se comprobó que esta actividad antirradicalaria permanecía durante el tiempo (hasta 90 min de análisis).

Cos y colaboradores (Cos *et al.*, 2001), estudió la peroxidación lipídica de flavonoides, como rutina, quercetina y luteolina, encontrando una actividad marcada para luteolina (0,69 ± 0,01 μM) y quercetina (0,95 ± 0,04 μM); por el contrario, la rutina mostró una IC<sub>50</sub> de 26,5 ± 0,9 μM, lo que confirmó que la glicosilación de los grupos hidroxilos tiene una influencia negativa en la actividad antioxidante. También concluye que la presencia de la insaturación entre C-2 y C-3, y un grupo carbonilo en posición 4 es importante para la actividad. La introducción de grupos hidroxilo en posición 5 y 7 incrementan la actividad inhibitoria, así como también en posición 3' o 6. que contribuyen mas que en hidroxilo en posición 4'. Además, los flavonoles son, en términos generales, más activos que sus correspondientes flavonas (Hohmann *et al.*, 1999; Fejes *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002).

La mayoría de los estudios concluyen que el radical catecol o pirogalol en el anillo B y un grupo hidroxilo libre en posición 3, son esenciales para una elevada actividad antirradicalaria. La diana para los radicales es la estructura orto-dihidroxilo en el anillo B. Pero, a nivel de inhibición de la peroxidación lipídica, no siempre se cumple esta regla, indicando que existen otros factores a los que se debe esta actividad.

Se encontró una relación directa entre la actividad antirradicalaria y la cantidad en los extractos, de fenoles totales ( $R^2 = 0,9465$ ), fenilpropanoides ( $R^2 = 0,895$ ) y verbascósido ( $R^2 = 0,9479$ ), no encontrando una relación similar con el contenido total de flavonoides e iridoides (figura 34).



**Figura 34:** Correlación entre la potencia antirradicalaria y el porcentaje de fenoles, fenilpropanoides y verbascósido en los extractos metanólicos de *Plantago spp.*

A la vista de los resultados obtenidos, en la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de *Plantago spp.* juega un papel importante el contenido en fenilpropanoides, como justifica el alto contenido en verbascósido de *P. serraria*. Estos datos concuerdan con los resultados mostrados por diferentes autores que describen a verbascósido como un compuesto activo frente a diferentes ensayos antioxidantes, tanto de actividad antirradicalaria (Wang *et al.*, 1996) como de inhibición de la peroxidación lipídica (Zhou y Zheng 1991; Xiong *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1997a; 1998; Seidel *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2003). A esta potente actividad se le atribuye los efectos protectores frente a las lesiones del ADN (Li *et al.*, 1996; 1997b; 1997c; 1999a; Shi *et al.*, 1999b; 2000; 2000).

#### **IV.6.2. ENSAYO DE INDUCCIÓN DE LA ENZIMA QUINONA REDUCTASA (QR).**

##### IV.6.2.1. Resultados

La inducción de la actividad de la enzima quinona reductasa (QR) por los diferentes extractos y compuestos aislados fue realizado en células Hepa 1c1c7 mediante la determinación de formación de azul formazán, a partir de MTT. Las células de hepatoma murino crecieron durante 24 horas y fueron expuestas a las muestras por 48 horas más. La actividad QR fue medida y comparada con el control para calcular el radio de la actividad de la enzima.

$$- \% \text{ Inducción de la enzima QR} = \left( 1 - \frac{\text{Actividad específica QR en la muestra}}{\text{Actividad específica QR en DMSO}} \right) \times 100$$

Donde, la actividad enzimática específica QR = actividad enzimática/supervivencia, y la actividad enzimática = (DO muestra-DO blanco) x 3247/5.

Con los porcentajes de inducción, se genera una curva y se calculan las concentraciones requeridas para inducir un incremento del 50% y del 100% de la enzima QR. Esta última se denomina como CD (concentración que dobla la inducción de QR), parámetro utilizado para comparar entre sí a los diferentes compuestos activos.

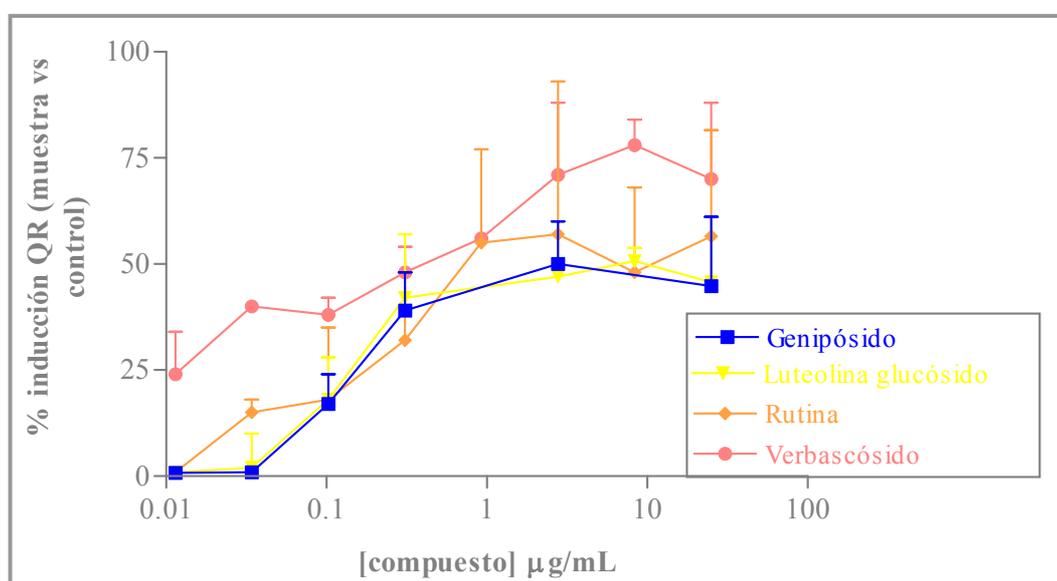
Los extractos, ensayados por duplicado, no mostraron una inducción de la actividad de la enzima quinona reductasa a las concentraciones ensayadas (160, 80, 40, 20, 10 µg/mL).

Los resultados de la densidad celular total y la densidad de viabilidad celular, en la línea Hepa 1c1c7 expuestas a los extractos a diferentes concentraciones, fueron, en todos los casos, comparable con los resultados observados para sus respectivos controles (DMSO 0,1%). Por tanto, no hay evidencia de efectos citotóxicos por ninguno de los extractos ensayados en la línea Hep 1c1c7.

En el caso de los compuestos aislados, se ensayaron por triplicado, utilizando diferentes concentraciones (25, 8.3, 2.7 ,0.92, 0.31, 0.10, 0.03, 0.01 µg/mL), (tabla XXXI y figura 35); Las que inducen un incremento del doble en la actividad de la QR fueron superiores a las dosis ensayadas, por lo que no se pudo calcular el parámetro CD (concentración requerida para doblar la actividad de la enzima quinona reductasa). Como se detectó una inducción de la actividad de la enzima QR con respecto al control, se calculó la concentración que incrementaba la actividad de la enzima QR en un 50%.

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Inducción de la actividad QR (muestra vs control)			
	Genipósido	Luteolina gluc.	Rutina	Verbascósido
25	44 $\pm$ 16	45 $\pm$ 15	56 $\pm$ 25	70 $\pm$ 18
8,33	58 $\pm$ 9	50 $\pm$ 3	48 $\pm$ 20	78 $\pm$ 6
2,77	50 $\pm$ 10	47 $\pm$ 3	57 $\pm$ 36	71 $\pm$ 17
0,92	25 $\pm$ 1	29 $\pm$ 3	55 $\pm$ 22	56 $\pm$ 1
0,31	39 $\pm$ 9	42 $\pm$ 15	32 $\pm$ 16	48 $\pm$ 6
0,10	17 $\pm$ 7	18 $\pm$ 10	18 $\pm$ 17	38 $\pm$ 4
0,03	n.a	2 $\pm$ 8	15 $\pm$ 3	40 $\pm$ 10
0,01	n.a	n.a	n.a	24 $\pm$ 10

**Tabla XXXI:** Porcentajes de inducción de la actividad de la enzima QR de los compuestos aislados. ( $M \pm \delta$ ,  $n=3$ ) n.a: no activo.



**Figura 35:** Curva dosis-respuesta de la inducción de la actividad QR por los diferentes compuestos aislados.

La tabla XXXII resume muestra las concentraciones que incrementan la actividad de la enzima QR en un 50% sobre el control, expresadas en  $\mu\text{g/mL}$ . Los valores entre paréntesis representan las concentraciones de cada compuesto expresadas en  $\mu\text{M}$ . También se indica el radio de inducción máxima a la mayor concentración ensayada (25  $\mu\text{g/mL}$ ).

Compuestos	Concentración requerida para incrementar la actividad de QR en 50%	% de inducción máxima frente a concentración ensayada
<i>Genipósido</i>	> 25 (>64,4)	44 (64,4)
<i>Luteolina glucósido</i>	>25 (>55,8)	45 (55,8)
<i>Rutina</i>	0,80 (1,32)	56 (40,9)
<i>Verbascósido</i>	0,47 (0,80)	78 (40,1)
<i>Bromoflavona</i>	no calculado	532 (2 µM)

**Tabla XXXII:** Valores de la concentración requerida de compuestos aislados para incrementar la actividad QR en un 50% y porcentajes de inducción máxima.

Verbascósido es el que muestra mayor actividad inductora de la enzima QR, de forma dosis dependiente, que se puede apreciar en la tabla con la curva dosis respuesta.

Además, como en el rango de concentraciones utilizado ninguno de los compuestos ha mostrado efecto citotóxico o que retarde el crecimiento de las células Hep1c1c7, la inducción de QR debe ser considerada como un efecto propio del compuesto, y no como respuesta celular ante el estrés.

#### IV.6.2.2. Discusión de resultados.

La inducción de enzimas detoxificantes de fase II es una de las estrategias mejor establecidas y efectivas para la protección de organismos frente a los efectos tóxicos de diversas moléculas.

Los extractos metanólicos de *Plantago spp.* no mostraron capacidad de inducir la enzima Quinona Reductasa (QR) a las concentraciones ensayadas (10-160 µg/mL); Tampoco hay evidencia de citotoxicidad en células Hepa 1c1c7.

De los compuestos ensayados, verbascósido es el que induce a la enzima en mayor proporción, posiblemente debido a sus dos grupos catecoles. En bibliografía no se han descrito como inductores de QR a los fenilpropanoides. Por el contrario, hay numerosos estudios sobre flavonoides relacionando la estructura con la actividad inductora de QR. Así, de los flavonoides estudiados por nosotros, rutina heterósido de quercetina, a las dosis ensayadas, incrementa la actividad enzimática en un 50% (40 µM), mientras que su genina, a la dosis 13 µM, es capaz de doblar su actividad.(Uda *et al.*, 1997). Williamson y colaboradores también estudian los glucósidos de quercetina como inductores de la enzima QR, mostrando que sólo la genina y 4'-glucósido son capaces de inducir a ésta (Williamson *et al.*, 1996). Este autor considera que la rutina, a la concentración de 100 µM, no induce a la enzima QR.

Se ha descrito la actividad inductora de luteolina, que a la dosis de 0,5 µg/mL (1,7 µM) la actividad de QR en un 24 % (Kwon *et al.*, 2003), sin embargo, nuestros resultados calculados para el heterósido de luteolina, luteolina-7-glucósido, muestran que ese porcentaje de inducción se alcanza a 0,31 µM (0,11 µg/mL), por lo que parece tener mayor efecto que su genina, aunque sería necesario completar este ensayo bajo las mismas condiciones experimentales.

En la revisión publicada por Talalay y cols., (1995) muestra que, todos los inductores de esta enzima muestran una característica estructural común, se comportan como bases de Shift, grupo en el que están incluidos los flavonoides y fenilpropanoides.

### IV.6.3. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA TRANSFORMACIÓN CELULAR (LÍNEA JB6) POR TPA.

#### IV.6.3.1. Resultados.

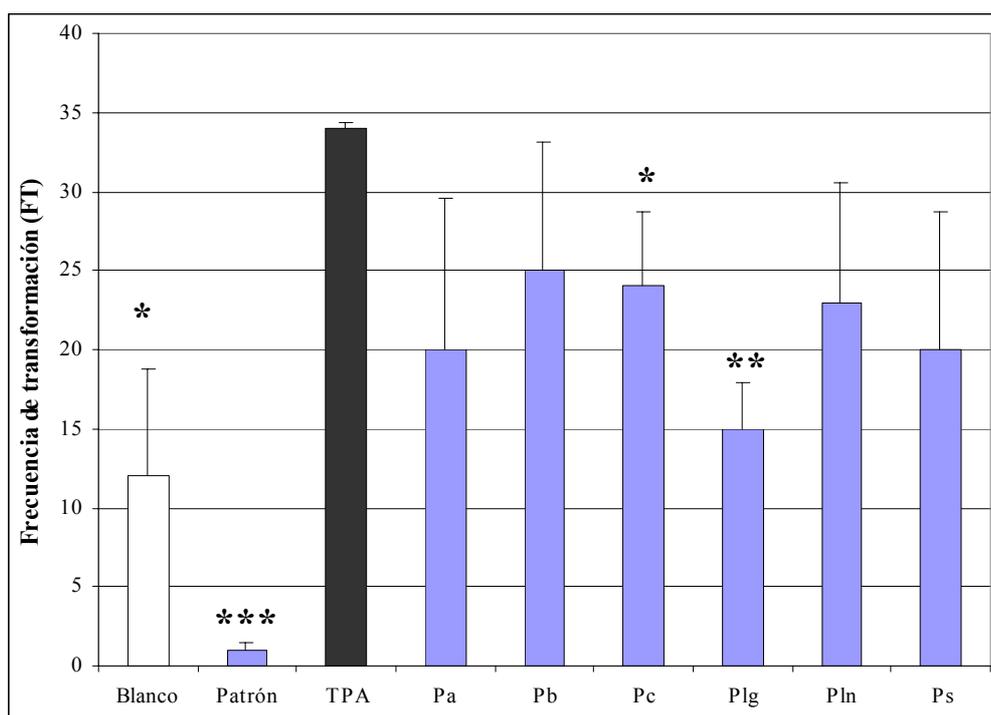
Se determina la inhibición de la transformación de células epidérmicas de ratón (JB6), inducida por TPA, en células tumorales.

Se ensayaron los extractos metanólicos de *Plantago spp.* a la concentración de 4 µg/mL. Tras 14 días de tratamiento, se procedió al conteo de las colonias tumorales, al cálculo de la frecuencia de transformación y al porcentaje de inhibición de la transformación, comparando con el control (TPA) y utilizando como patrón ácido 13-cis-retinoico (1 µM).

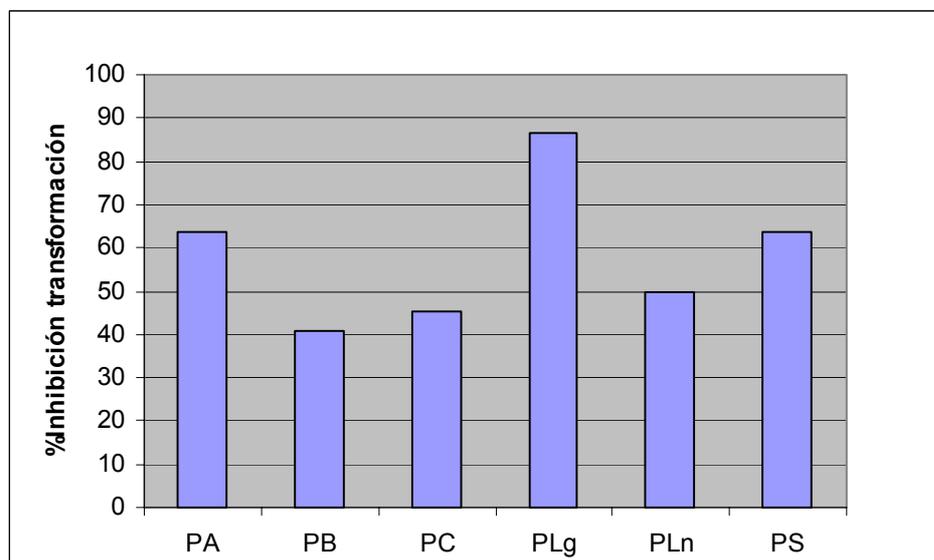
En la tabla XXXIII y figuras 36 y 37, se muestran los valores calculados ( $M \pm \delta$ , n=3) de la frecuencia de transformación y porcentajes de inhibición de la transformación para los extractos metanólicos de *Plantago spp.*

Muestras	Frecuencia de transformación celular (FT)	Porcentaje de inhibición de transformación celular (%I)
Blanco (DMSO)	12 ± 6,8 *	100
Control (TPA)	34 ± 0,38	0
Patrón (Ácido retinoico)	1 ± 0,5 ***	127
<i>P. afra</i>	20 ± 9,5	63,6
<i>P. bellardii</i>	25 ± 8,1	40,9
<i>P. coronopus</i>	24 ± 4,7 *	45,4
<i>P. lagopus</i>	15 ± 2,8 **	86,3
<i>P. lanceolata</i>	23 ± 7,5	50
<i>P. serraria</i>	20 ± 8,6	63,6

**Tabla XXXIII:** Valores de FT y porcentaje de inhibición de la transformación celular de los extractos de *Plantago spp.* Los valores obtenidos fueron comparados estadísticamente mediante ANOVA vs tratamiento con TPA. (\*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$  vs el tratamiento con TPA sin agente inhibidor).



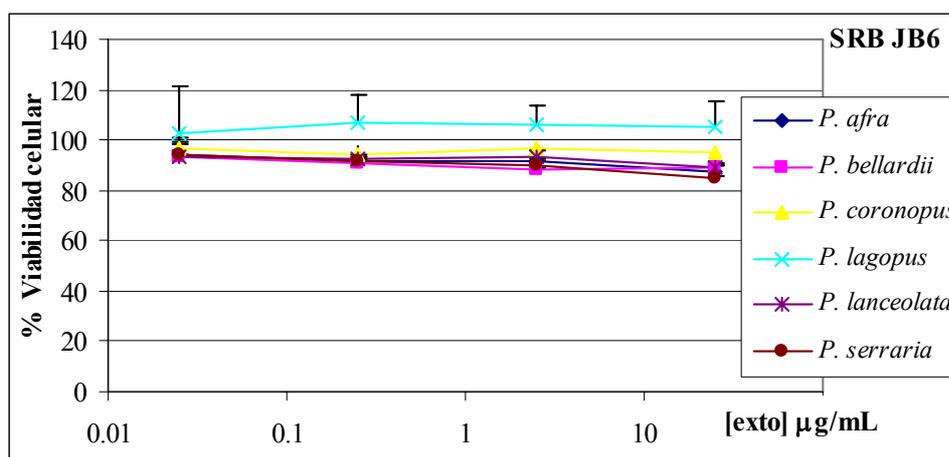
**Figura 36:** Frecuencia de transformación (FT) de los extractos metanólicos de *Plantago* spp. (\*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ ; vs el tratamiento con TPA sin agente inhibidor por t-student). Pa: *P. afra*, Pb: *P. bellardii*; Pc: *P. coronopus*; Plg: *P. lagopus*; Pln: *P. lanceolata*; Ps: *P. serraria*.



**Figura 37:** Porcentaje de inhibición de la transformación celular de los extractos. PA: *P. afra*, PB: *P. bellardii*; PC: *P. coronopus*; PLg: *P. lagopus*; PLn: *P. lanceolata*; PS: *P. serraria*.

Paralelo al ensayo de la inhibición de la transformación celular inducida por TPA, se determinó la viabilidad celular, o el % de supervivencia ejercido por cada uno de los extractos, para ver si la reducción de la frecuencia de transformación se debía a un efecto citotóxico o a que el compuesto,

*per se* es responsable de esta actividad. La viabilidad celular fue ensayada a las dosis 250, 25, 2.5, 0.25, 0.025  $\mu\text{g/mL}$ , y fue realizada mediante la técnica del SRB. En la figura 38 se muestran los % de crecimiento a cada una de las concentraciones ensayadas para cada extracto, (como  $M \pm \delta$ ,  $n=3$ ).



**Figura 38:** Citotoxicidad en la línea celular JB6 de los extractos de *Plantago spp.*

A continuación, en la tabla XXXIV se compara la actividad quimiopreventiva (% de inhibición de transformación celular a 4  $\mu\text{g/mL}$ ) con la actividad citotóxica (% de viabilidad celular a 4  $\mu\text{g/mL}$ ) para los diferentes extractos de *Plantago spp.* A mayor radio, mayor interés como quimiopreventivo. Los extractos, estarían ordenados, por tanto, en función de su interés quimiopreventivo como *P. lagopus* >>> *P. afra*  $\geq$  *P. serraria* > *P. lanceolata* > *P. coronopus* > *P. bellardii*.

	% Frecuencia de transformación celular	% Viabilidad celular	Viabilidad/Frecuencia de transformación
<i>P. afra</i>	36.3	90.75	2.5
<i>P. bellardii</i>	59.1	88.61	1.5
<i>P. coronopus</i>	54.5	95.69	1.7
<i>P. lagopus</i>	13.6	105.02	7.7
<i>P. lanceolata</i>	50	92.48	1.8
<i>P. serraria</i>	36.3	87.98	2.4

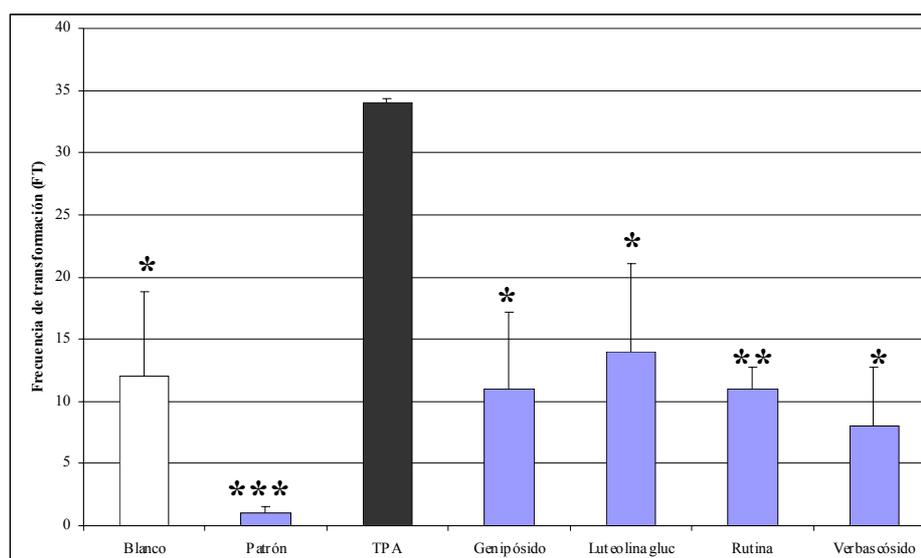
**Tabla XXXIV:** Comparación actividad quimiopreventiva frente a la citotoxicidad para los extractos metanólicos de *Plantago spp.*

Los compuestos aislados de los extractos fueron ensayados, por triplicado, a las concentraciones de 4, 2, 1 y 0.5  $\mu\text{g/mL}$ , calculándose los respectivos parámetros de frecuencia de transformación y porcentajes de inhibición de la transformación celular.

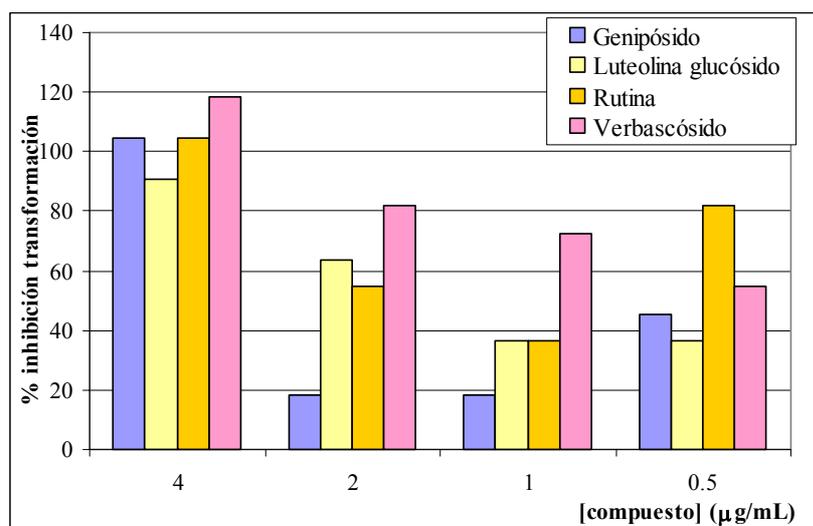
Los resultados obtenidos para cada compuesto, a la mayor dosis ensayada, 4  $\mu\text{g/mL}$ , se muestran en la tabla XXXV y figura 39. Los % de inhibición de la transformación celular a todas las concentraciones ensayadas, se recogen en la figura 40.

Compuestos aislados (4 $\mu\text{g/mL}$ )	Frecuencia de transformación celular (FT)	Porcentaje de inhibición de transformación celular (%I)
DMSO	12 $\pm$ 6 *	100
TPA	34 $\pm$ 0,3	0
Genipósido (10,30 $\mu\text{M}$ )	11 $\pm$ 6 *	104,5 $\pm$ 5,6
Luteolina-7-glucósido (8,92 $\mu\text{M}$ )	14 $\pm$ 7 *	87,9 $\pm$ 5,2
Rutina (6,55 $\mu\text{M}$ )	11 $\pm$ 1 **	112,4 $\pm$ 28,3
Verbascósido (6,40 $\mu\text{M}$ )	8 $\pm$ 4 *	123,8 $\pm$ 17,8

**Tabla XXXV:** Valores de frecuencia de transformación (FT) y % de inhibición de transformación inducida por los diferentes compuestos aislados expresados como  $M \pm \delta$  ( $n=3$ ) a la concentración de 4  $\mu\text{g/mL}$  y entre paréntesis, la concentración en  $\mu\text{M}$ . (\*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ , vs el tratamiento con TPA sin agente inhibidor por *t*-student doble cola).

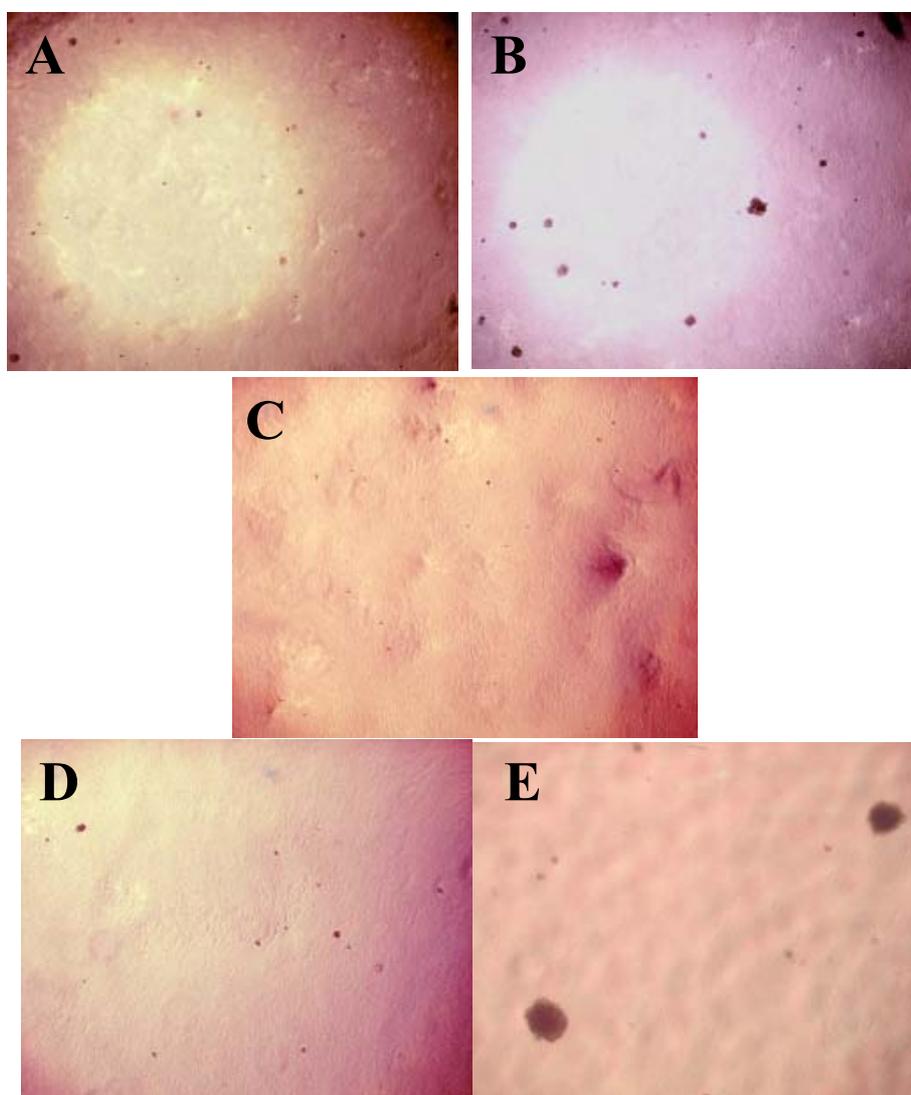


**Figura 39:** Frecuencia de transformación (FT) inducida por los compuestos aislados (\*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ , vs el tratamiento con TPA sin agente inhibidor por *t*-student doble cola).



**Figura 40:** Porcentaje de inhibición de la transformación celular de los compuestos aislados (4, 2, 1 y 0.5 µg/mL)

Al aplicar a los resultados obtenidos para cada compuesto ANOVA-test Newman, no se encontraron diferencias significativas. A pesar de ello, al observar el número y el tamaño de las colonias inducidas por TPA en las células JB6 y tratadas con cada compuesto, nos conduce a pensar que, genipósido, es el menos activo de los cuatro compuestos ensayados (figura 41).



**Figura 41:** Células y colonias JB6 tras 14 días de tratamiento. A. Control (DMSO), B (TPA+DMSO), C (TPA+ácido retinoico), D(TPA + verbascósido) E (TPA+ genipósido 2 µg/mL)

Al igual que se realizó con los extractos, se determinó la viabilidad celular mediante la técnica del SRB de los compuestos. Los compuestos fueron ensayados a las dosis de 20, 2, 0,2, 0,02 y 0,002 µM. En la figura 42 se representa el % de crecimiento frente a las diferentes concentraciones para cada compuesto ( $M \pm \delta$ ,  $n=3$ ). Los % de crecimiento fueron comparados frente al control (DMSO) mediante ANOVA. y test Newman. (\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ )

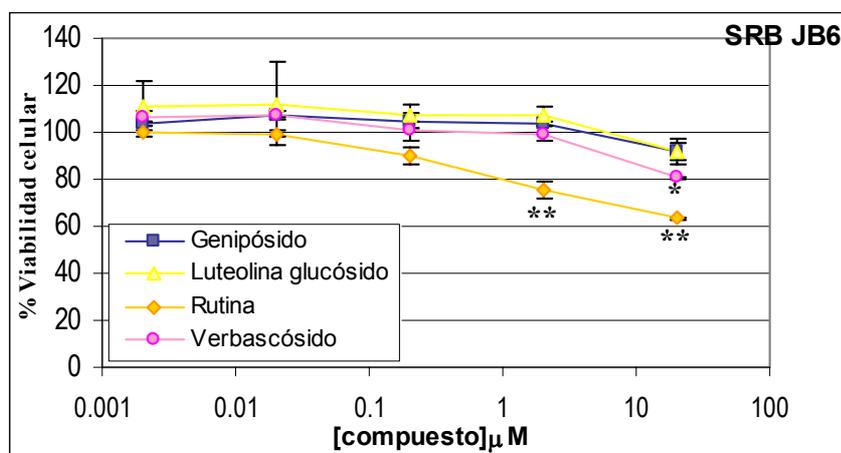


Figura 42: Citotoxicidad en la línea celular JB6 de los compuestos aislados (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  vs control).

En la siguiente tabla figuran los % de viabilidad calculados para cada compuesto a las concentraciones ensayadas. Además, se calculó el radio viabilidad/ $CI_{50}$ , (dosis máxima a la cual no se detecta efecto en la viabilidad celular / la concentración que inhibe el 50% de la transformación celular), comparando de esta forma, la actividad citotóxica frente a la quimiopreventiva. A mayor radio, mayor interés como quimiopreventivo. Los compuestos, estarían ordenados, desde el punto de vista del interés quimiopreventivo (actividad vs citotoxicidad) como verbascósido  $\geq$  luteolina glucósido > genipósido > rutina.

Concentración ensayada ( $\mu\text{g/mL}$ )	%Viabilidad celular			
	Genipósido	Luteolina glucósido	Rutina	Verbascósido
4	97.2	98.2	64.3	89.8
2	100.9	103.1	71.2	95.95
1	103.1	106.3	79.9	100.1
0.5	104.2	108.2	88.1	102.5
<b>Viabilidad/<math>CI_{50}</math></b>	<b>1.47</b>	<b>2.67</b>	<b>0.67</b>	<b>4</b>

Tabla XXXVI: Porcentajes de viabilidad celular y radio viabilidad/ $CI_{50}$  en la línea JB6 para los compuestos aislados.

#### IV.6.3.2. Discusión de resultados.

Los extractos y compuestos aislados mostraron actividad como inhibidores de la transformación celular inducida por TPA, siendo el extracto metanólico de *P. lagopus* el que muestra mayor actividad y verbascósido y luteolina glucósido los más activos. Ninguno de los compuestos, excepto rutina, afectan, a las dosis ensayadas, el crecimiento celular de la línea JB6, por lo que la

actividad inhibitoria de la transformación se debe a un efecto directo del compuesto, y no a su citotoxicidad.

Intentando buscar relación entre la actividad mostrada por los extractos y la de los compuestos aislados a partir de ellos, el que *P. lagopus* y *P. serraria* tengan mayor actividad puede deberse a su alto contenido en luteolina glucósido y verbascósido respectivamente; por otra parte, la ligera citotoxicidad de *P. bellardii*, podría relacionarse a su contenido en rutina, único que la contiene, y, por tanto, presente el menor radio de quimioprevención.

Dado que el tratamiento de las células JB6 con TPA conlleva a la generación de ROS. Un posible mecanismo por el que se pudiera revertir la transformación celular, sería básicamente, en primer lugar, el bloqueo de la actividad de ROS. La potente actividad antioxidante de verbascósido y luteolina-7-glucósido podrían contribuir al efecto inhibitor sobre la transformación celular inducida por TPA, aunque serían necesarios estudios más extensos para elucidar otros posibles mecanismos de acción implicados.

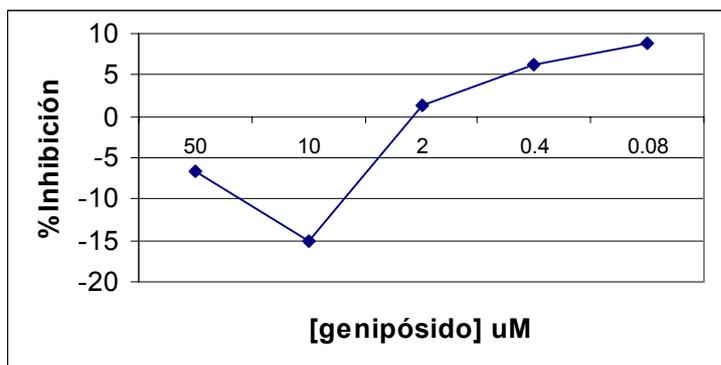
#### IV.6.4. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA INDUCCIÓN DE ORNITINA DESCARBOXILASA (ODC) POR TPA.

##### IV.6.4.1. Resultados

Para conocer si la inhibición de la transformación celular inducida por TPA mostrada por los compuestos aislados era debida a una inhibición de la enzima ODC, se realizó este ensayo. La enzima ODC se estimula por acción del TPA, pero, no siempre es inhibida cuando un compuesto muestra actividad inhibidora de la transformación celular.

Nuestros ensayos fueron realizados primero, en la línea JB6. En primer lugar, los extractos y compuestos, fueron ensayados a una sola dosis, 100 y 20  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. De los extractos ensayados, sólo mostró actividad inhibitoria el extracto metanólico de *P. lanceolata*, con un  $16,25 \pm 2,1$  % a la dosis de 100  $\mu\text{g/mL}$ . No podemos encontrar una relación entre la actividad y la composición que contiene.

De los compuestos ensayados, (genipósido, rutina y verbascósido), sólo genipósido inhibió ligeramente a la enzima ODC. En la gráfica se muestran los % de inhibición de la inducción de la enzima ODC por TPA en células JB6 por el compuesto genipósido, a las diferentes dosis ensayadas. Es de destacar cómo a menor concentración desarrolla una inhibición mayor.



**Figura 43:** Curva dosis respuesta de la inhibición de la inducción de la enzima ODC por genipósido.

Al ser la inhibición menor de un 50%, no se prosiguió con su estudio. El resto de los compuestos ensayados, no mostraron actividad inhibitoria frente a la inducción de esta enzima.

#### IV.6.4.2. Discusión de resultados

Los resultados obtenidos hacen pensar, en primer lugar, que la inhibición de la transformación celular no es debida a una inhibición de la enzima ODC. En segundo lugar, los heterósidos de flavonoides, rutina y luteolina glucósido, conservan el comportamiento de sus geninas, no inhibiendo a la enzima ODC a las dosis ensayadas, al menos, en un 50%.

Genipósido ha sido descrito como inhibidor de esta enzima cuando es aplicado vía tópica en ratones durante 20 días, junto con TPA, previa iniciación con benzopiroeno, reduciendo la incidencia de tumores (Lee *et al.*, 1995).

**IV.6.5. ACTIVIDAD ESTROGÉNICA Y ANTIESTROGÉNICA**

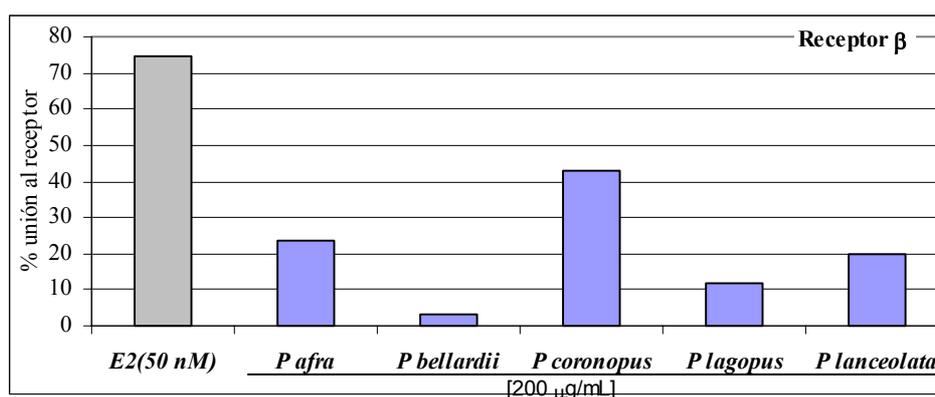
IV.6.5.1. Determinación de actividad por afinidad de los receptores estrogénicos.

-Resultados.

En primer lugar, fue ensayado la unión a receptores  $\beta$ -estrogénicos (ER- $\beta$ ) de los extractos metanólicos procedentes de *Plantago spp.*, a la concentración de 200  $\mu\text{g/mL}$ . (Tabla XXXVII y figura 44 )

Muestras	% Unión al receptor ER- $\beta$
Patrón (Estradiol)	74,6
<i>P. afra</i>	23,5
<i>P. bellardii</i>	3,0
<i>P. coronopus</i>	43,2
<i>P. lagopus</i>	11,9
<i>P. lanceolata</i>	20,1
<i>P. serraria</i>	n.e.

**Tabla XXXVII:** Porcentajes de unión al receptor  $\beta$  (ER- $\beta$ ) de los extractos metanólicos de *Plantago spp.* n.e. no ensayado.

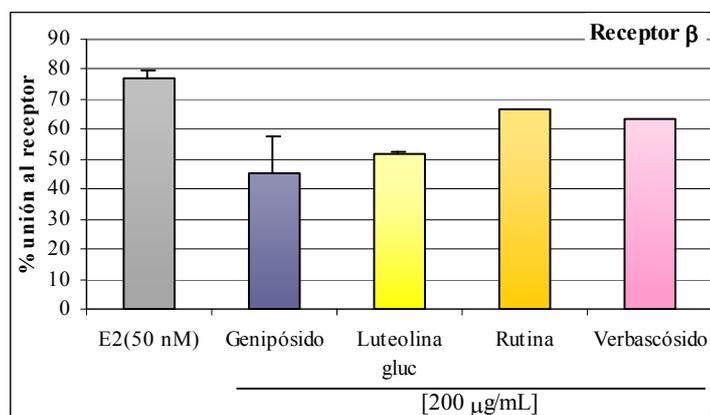


**Figura 44:** Valores de porcentaje de unión al receptor  $\beta$  de los extractos metanólicos de *Plantago spp.*

Siguiendo el mismo protocolo, fue ensayada la unión de los compuestos a la dosis de 200 $\mu$ g/mL a los receptores  $\beta$ . Los resultados del % de unión al receptor  $\beta$  se muestran en la tabla XXXVIII y figura 45.

Muestras	% Unión al receptor ER- $\beta$
Patrón (Estradiol)	76,9
Genipósido	45,5
Luteolina-glucósido	51,9
Rutina	66,5
Verbascósido	63,4

**Tabla XXXVIII:** Porcentajes de unión al receptor  $\beta$  (ER- $\beta$ ) de los compuestos aislados.

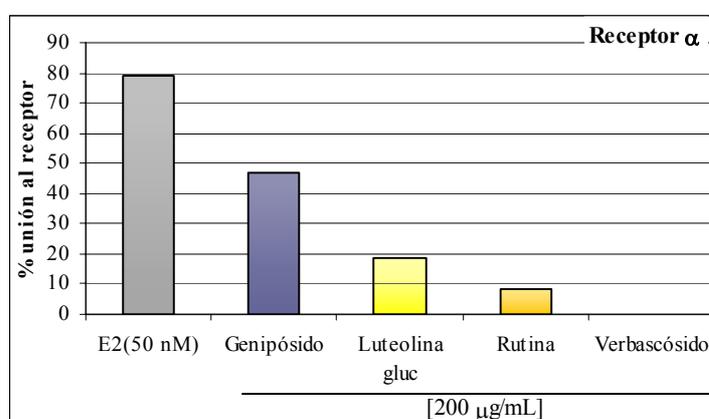


**Figura 45:** Valores de porcentaje de unión al receptor  $\beta$  de los compuestos aislados.

De igual forma, fue ensayada la unión de los compuestos a la dosis de 200µg/mL a los receptores  $\alpha$ . Los resultados del % de unión al receptor  $\alpha$  se muestran en la tabla XXXIX y figura 46.

Muestras	% Unión al receptor ER- $\alpha$
Patrón (Estradiol)	74,1
Genipósido	46,9
Luteolina-glucósido	18,3
Rutina	8,64
Verbascósido	0

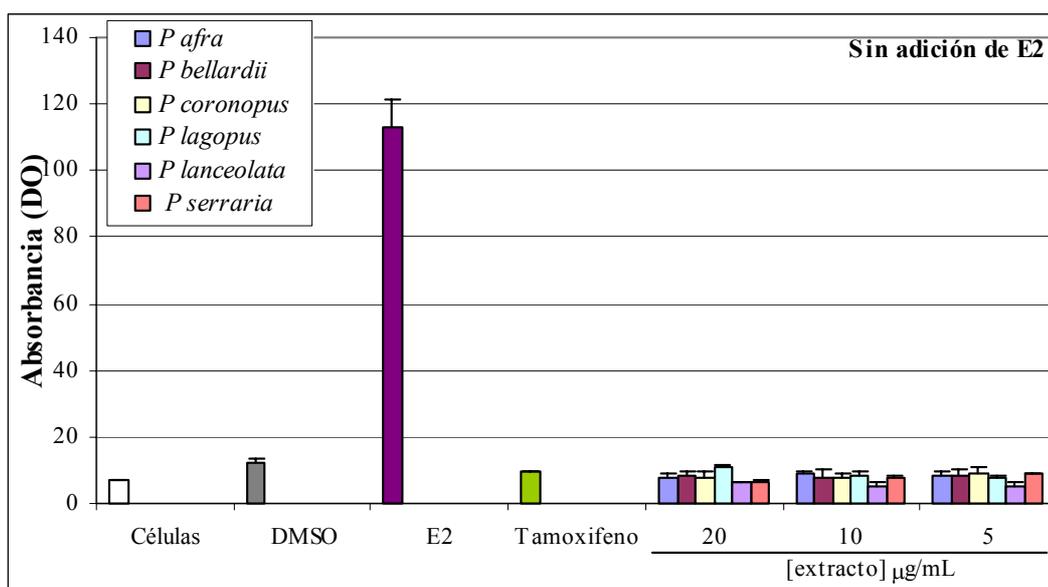
**Tabla XXXIX:** Porcentajes de unión al receptor  $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) de los compuestos aislados.



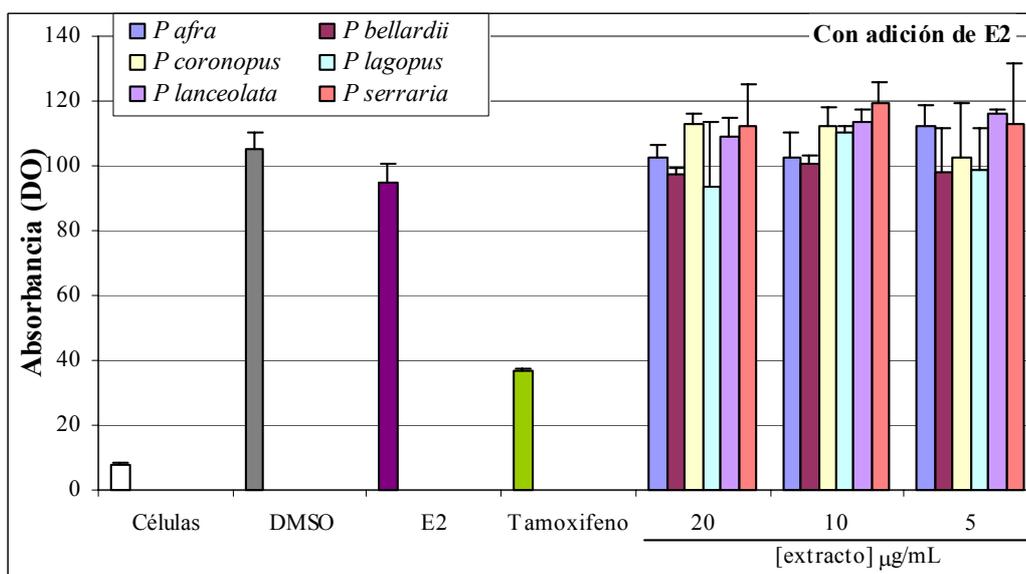
**Figura 46:** Valores de porcentaje de unión al receptor  $\alpha$  de los compuestos aislados.

#### IV.6.5.2. Determinación de la actividad en la línea celular de Ishikawa.

En primer lugar, se ensayaron los extractos a tres concentraciones (20, 10 y 5 µg/mL), en ausencia y presencia de estradiol. Se midió la absorbancia cada 15 segundos, calculándose la pendiente de la curva de la cinética de la absorbancia. En las figuras 47 y 48, se representa la cinética de formación de p-nitrofenol por la enzima fosfatasa alcalina de las muestras ensayadas, tanto en un medio libre de estrógenos (figura 47) como en un medio con estrógenos (figura 48). Como patrones se utilizaron estradiol (E2) y tamoxifeno.



**Figura 47:** Cinética de formación de *p*-nitrofenol por la enzima fosfatasa alcalina de los extractos metanólicos de *Plantago* spp. en un medio libre de estrógenos.

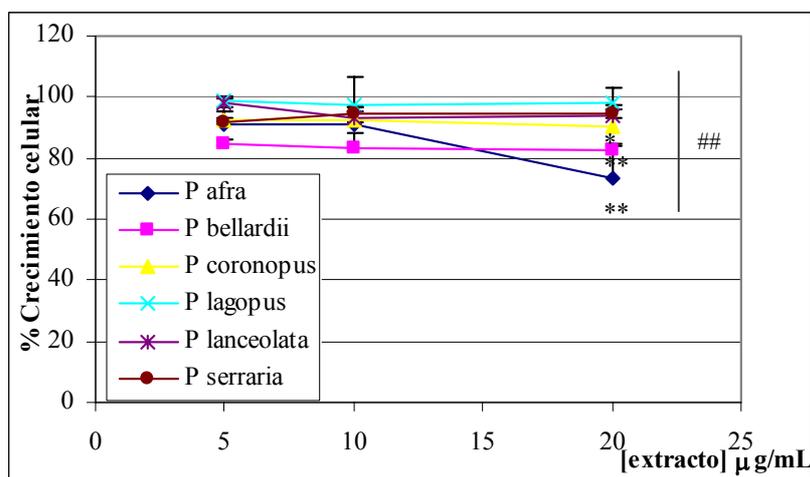


**Figura 48:** Cinética de formación de *p*-nitrofenol por la enzima fosfatasa alcalina de los extractos metanólicos de *Plantago* spp. en un medio con estrógenos.

Tal y como se observa en las figuras 47 y 48, los extractos no indujeron significativamente la actividad de la enzima fosfatasa alcalina cuando se administraron solos a ninguna de las concentraciones ensayadas, por lo que no poseen actividad estrogénica (figura 47). Cuando las células

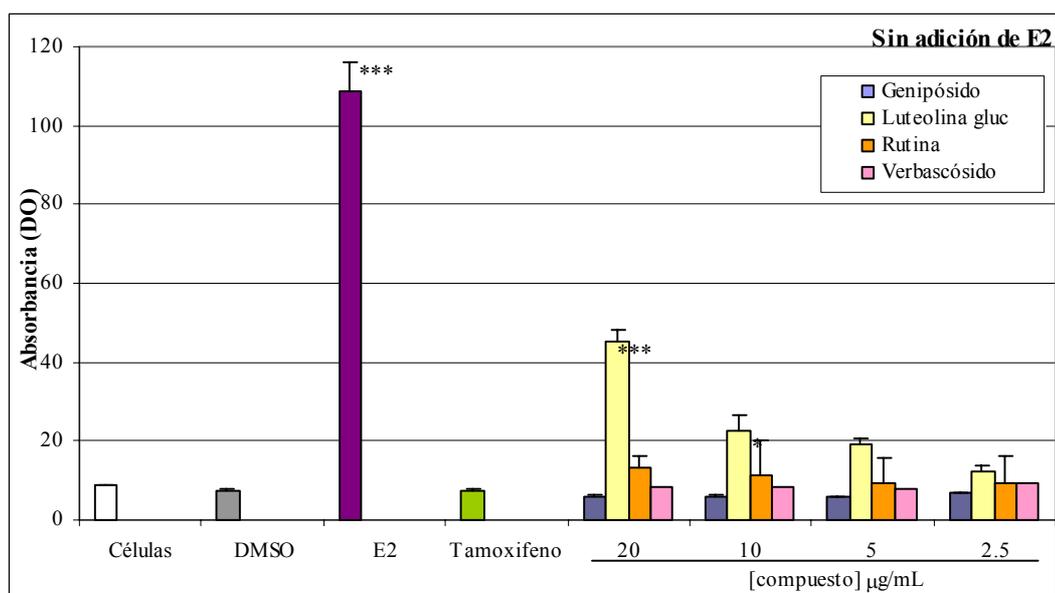
fueron tratadas con los extractos en un medio enriquecido con estrógenos (1nM), se detectó un aumento de la actividad, indicando que tampoco muestran actividad antiestrogénica (figura 48). Tal y como se puede ver con los controles, tamoxifeno, antagonista estrogénico, no induce a la enzima fosfatasa alcalina en un medio libre de estrógenos (figura 47) e inhibe la inducción de ésta en un medio con estrógenos (figura 48). Al no mostrar actividad, no se calcularon los % de inducción de la enzima fosfatasa alcalina.

Paralelamente, se determinó la viabilidad celular mediante la técnica del SRB, en células tratadas sólo con los extractos, estradiol y tamoxifeno (figura 49). Los extractos no afectaron a la viabilidad celular, ni tampoco se detecta un incremento en la proliferación celular, tal y como se apreció en el tratamiento sólo con estradiol. (% crecimiento celular =  $115,4 \pm 6,8$ )

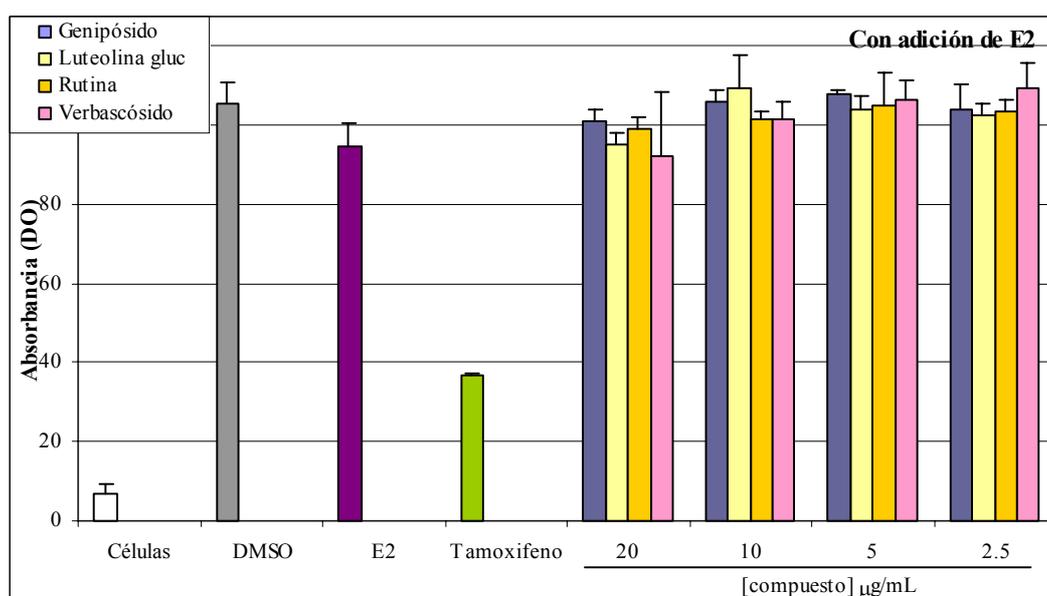


**Figura 49:** Curvas dosis-respuesta de crecimiento celular de los extractos metanólicos de *Plantago* spp en células Ishikawa. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$  vs control; ##,  $p < 0,01$  vs estradiol (ANOVA-test Dunnett).

En las mismas condiciones experimentales, se ensayaron, por triplicado, los compuestos aislados, a las dosis de 20, 10, 5 y 2.5  $\mu\text{g/mL}$ . Los valores de la cinética de formación de *p*-nitrofenol a por la enzima fosfatasa alcalina de los compuestos aislados se muestran en las figuras 50 (medio libre de estrógenos) y 51 (medio con estrógenos).



**Figura 50:** Cinética de formación de *p*-nitrofenol por la enzima fosfatasa alcalina de los compuestos aislados en un medio libre de estrógenos.

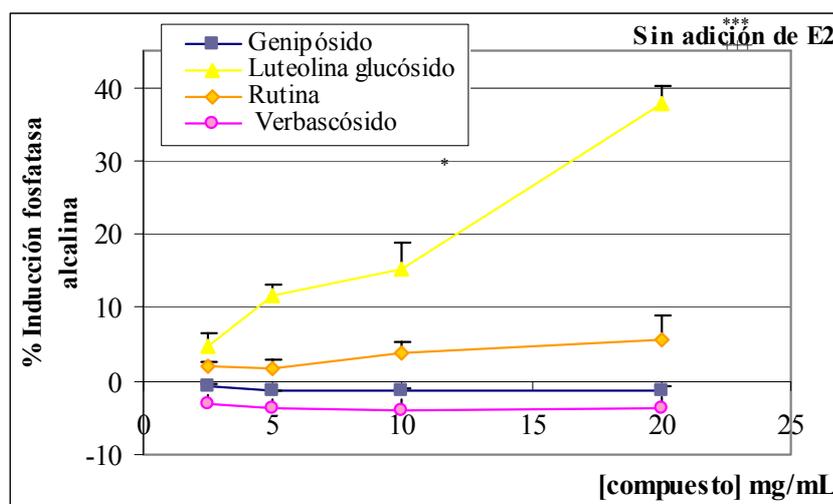


**Figura 51:** Cinética de formación de *p*-nitrofenol por la enzima fosfatasa alcalina de los compuestos aislados en un medio con estrógenos.

A continuación se calcularon los porcentajes de inducción de la enzima fosfatasa alcalina (tabla XL y figura 52) así como los % de inhibición de la inducción de ésta (tabla XLI y figura 53) por los diferentes compuestos a partir de los valores obtenidos en el tratamiento con un medio libre de estrógenos (figura 49), y con estrógenos (figura 50), respectivamente.

[compuesto] µg/mL	% Inducción de fosfatasa alcalina			
	Genipósido	Luteolina glucósido	Rutina	Verbascósido
20	n.a.	37.6 ± 2.5 ***	5.6 ± 3.1	n.a.
10	n.a.	15.3 ± 3.7 *	3.8 ± 1.6	n.a.
5	n.a.	11.6 ± 1.4	1.7 ± 1.0	n.a.
2.5	n.a.	4.9 ± 1.6	1.9 ± 0.8	n.a.

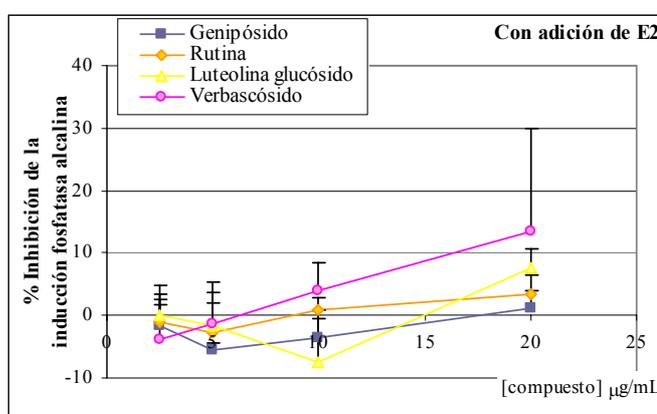
**Tabla XL:** Porcentajes de inducción de la enzima fosfatasa alcalina por los compuestos aislados. n.a.: no activo  
\*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  vs control (ANOVA).



**Figura 52:** % de inducción de fosfatasa alcalina por los compuestos aislados. \*,  $p < 0,05$ ;  $p < 0,001$  vs control; +++,  $p < 0,001$  vs resto de los compuestos.

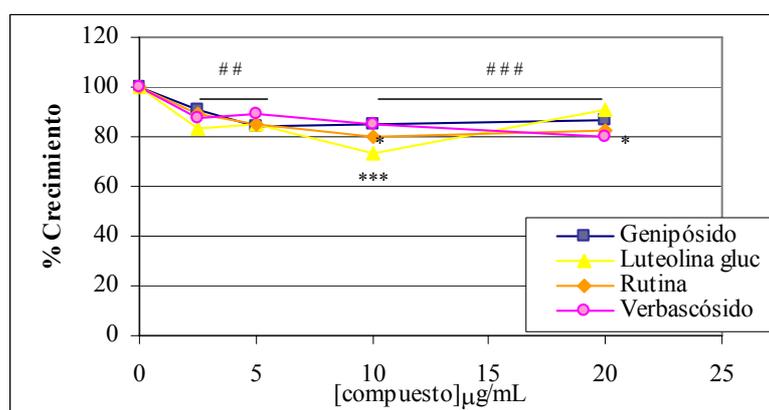
[compuesto] $\mu\text{g/mL}$	% Inhibición de inducción fosfatasa alcalina			
	Genipósido	Luteolina glucósido	Rutina	Verbascósido
20	n.a.	$7.6 \pm 3.0$	$3.3 \pm 3.1$	$13.4 \pm 16.6$
10	n.a.	n.a.	$0.9 \pm 1.0$	$3.8 \pm 4.6$
5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2.5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

**Tabla XLI:** Porcentajes de inhibición de la enzima fosfatasa alcalina por los compuestos aislados. n.a.: no activo



**Figura 53:** % de inhibición de la inducción de la enzima fosfatasa alcalina por los compuestos aislados.

Al igual que en caso de los extractos, también se calcularon los % de crecimiento de las células de Ishikawa inducido por los compuestos en ausencia de estradiol a diferentes dosis (figura 54).



**Figura 54:** % de crecimiento de la línea de Ishikawa de los compuestos aislados. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  vs. control.; ##,  $p < 0,01$ ; ###,  $p < 0,001$ , vs. estradiol (E2) (ANOVA)

Como se puede apreciar, ninguno de los compuestos mostró una inducción en la proliferación celular, destacando que, luteolina-7-glucósido de forma más marcada, y rutina, indujeron una reducción en la viabilidad celular a la dosis de 10 µg/mL en un 20% aproximadamente.

Estradiol a la concentración de 1 nM estimula el crecimiento de las células de Ishikawa comparado con el control, mientras que los compuestos, tal y como se puede observar en la gráfica, antagonizan dicho efecto, y la supresión del crecimiento celular fue evidente en ausencia de estradiol.

#### -Discusión de resultados

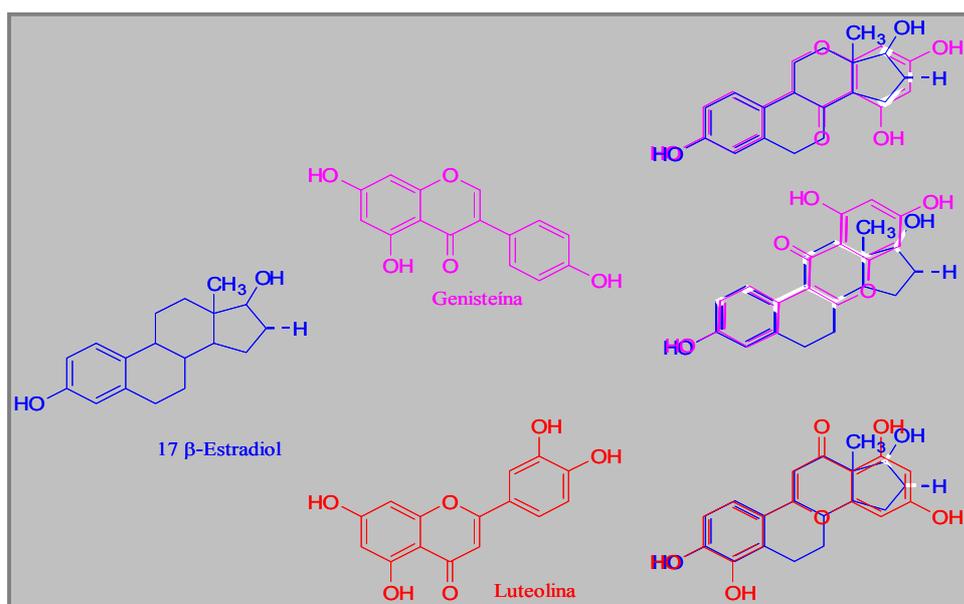
Analizando los resultados obtenidos, podría decirse que luteolina-7-glucósido muestra una actividad estrogénica significativamente mayor a rutina y genipósido, en ausencia de estradiol, pero, cuando se combina el tratamiento con éste, la actividad de la enzima es inhibida, lo que induce a pensar que luteolina glucósido, así como rutina, se comportan como agonistas parciales, es decir, su actividad dependerá de la concentración de estradiol que exista en el medio. Esto es corroborado con el hecho de que luteolina glucósido, a las dosis que induce la actividad de la enzima fosfatasa alcalina, inhibe la proliferación celular. Verbascósido y genipósido, en ausencia de estradiol, no muestran inducción de la actividad fosfatasa alcalina, y en presencia de estradiol, se incrementa aunque no de forma significativa, por lo que no sería concluyente pensar que tienen un efecto sinérgico con estradiol.

Han y cols. (2002), ensayan la actividad de unión a los receptores estrogénicos tipo  $\beta$ , para diferentes flavonoides, mostrando que la  $IC_{50}$  de luteolina es 0,5 µM, mientras que quercetina es débilmente activa a 50 µM. Además, estudiaron la interacción entre flavonoides y estrógenos, mostrando que luteolina y genisteína compiten con estradiol en su unión por el receptor ER  $\beta$ , pero la actividad estrogénica que muestran es menor que el propio estradiol o dietilstilbestrol, y por otro lado, suprimen débilmente la actividad de etinilestradiol. Tampoco interaccionan con la actividad de tamoxifeno. En el caso de la quercetina, ha mostrado unirse a los receptores tipo  $\beta$ . Este tipo de receptores está en tejidos normales y en diferentes tumores, como de mama, ovario, colorrectal, meninge, leucémico y melanoma.(Lamson y Brignall 2000).

Luteolina compite con  $^3H$ -estradiol por la unión a los receptores  $\beta$ , y mimetiza p-hidroxifenil-lactato. Al poseer grupos hidroxil-catecoles en anillos A y B, pueden formar quinonas capaces de unirse de forma covalente a proteínas. La unión con receptor estrogénico  $\beta$  es de tipo irreversible, por lo que se piensa que es de tipo covalente, y además, muestra una elevada afinidad (Markaverich y Gregory 1993). En nuestro caso, también se detecta una interacción del heterósido de luteolina,

luteolilna-7-glucósido, por los receptores estrogénicos, haciendo pensar que la glicosilación de luteolina mantiene dicha actividad.

En la figura 55 se muestra las similitudes entre la molécula de estradiol y la isoflavona genisteína y la flavona luteolina.



**Figura 55:** Comparación y similitudes de las estructuras de  $\beta$ -estradiol y luteolina y genisteína.

Estos flavonoides pueden tener una dualidad estrogénica y antiestrogénica de forma dosis dependiente, a través de la unión con ER, y en la inhibición de la proliferación e inducción de la diferenciación en células de mamíferos. Así, cuando luteolina y otros flavonoides son administrados solos, muestran propiedades estrogénicas, mientras que cuando se administran con estradiol muestran una leve actividad antiestrogénica *in vivo*.

Luteolina y quercetina, son capaces de inhibir la actividad estimulante de la proliferación celular inducida por estradiol en MCF-7 (Han *et al.*, 2001). Luteolina también muestra una marcada actividad estrogénica en línea BT-474 (cancer de mama) (Zand *et al.*, 2000). Estos resultados sugieren que sus actividades biológicas y fisiológicas son útiles para la prevención del cáncer, así como modificadores de la actividad estrogénica.

La actividad estrogénica de las isoflavonas fue descubierta en la década de los 40, cuando se observó que pastos de trébol ricos en isoflavonas, podrían inhibir la fertilidad de ovejas en Australia (Bennets *et al.*, 1946). Utilizando un ensayo de respuesta transcripcional dependiente del receptor

estrogénico, Misicek clasificó los flavonoides e isoflavonoides según su potencia: genisteína > kamferol > naringenina > apigenina > daidzeina > biochanina A > formonetina > luteolina > fisetina > catequina/taxifolina > hesperitina. (Miksicek, 1995).

La potencia estrogénica de todos los isoflavonoides y/o flavonoides es muy débil, del orden de  $10^3$ - $10^5$  veces menos que estradiol (Davis *et al.*, 1998). Pero, como las concentraciones de isoflavonas circulantes pueden ser hasta 100 veces mayor que el estradiol, flavonoides e isoflavonoides pueden desempeñar una actividad antiestrogénica, dependiendo del nivel de estógenos, pudiendo interactuar con los estrógenos endógenos a través de unión competitiva a los receptores estrogénicos (Birt *et al.*, 2001).

No hay datos bibliográficos sobre fenilpropanoides o iridoides y actividad estrogénica o unión a receptores estrogénicos.

## IV.7. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

### IV.7.1. CULTIVOS CELULARES. TEST SRB

#### IV.7.1.1.- Resultados.

Los resultados del ensayo de citotoxicidad de los extractos metanólicos de *Plantago spp.* y los compuestos aislados, en las líneas tumorales TK-10, MCF-7, UACC-62, Col-2, Lu-1, KB, LNCaP, CORL-23, se exponen en las tablas XLII-XLIII y XLIV-XLV, respectivamente. Los valores de citotoxicidad correspondientes a las líneas de Ishikawa y JB6 se han mostrado en las figuras 38, 42, 49 y 54. Los valores son representados como  $M \pm \delta$  (n=3).

Extractos metanólicos	Parámetros de inhibición	TK-10	MCF-7	UACC-62	Col-2
<i>P. afra</i>	IC <sub>50</sub>	>	76.1 ± 19.2	53.8 ± 16.0	>
	ITC	>	>	238.0 ± 117.2	>
	CL <sub>50</sub>	>	>	>	>
<i>P. bellardii</i>	IC <sub>50</sub>	86.3 ± 21.4	42.0 ± 2.7	34.7 ± 4.1	>
	ITC	>	87.4 ± 9.1	84.2 ± 7.9	>
	CL <sub>50</sub>	>	>	>	>
<i>P. coronopus</i>	IC <sub>50</sub>	>	32.6 ± 11.9	40.9 ± 5.8	>
	ITC	>	74.3 ± 14.1	89.9 ± 13.3	>
	CL <sub>50</sub>	>	169.4 ± 6.9	198.6 ± 34.3	>
<i>P. lagopus</i>	IC <sub>50</sub>	>	114.45 ± 20.24	66.1 ± 8.7	>
	ITC	>	>	244.5 ± 78.9	>
	CL <sub>50</sub>	>	>	>	>
<i>P. lanceolata</i>	IC <sub>50</sub>	>	47.1 ± 6.8	50.5 ± 11.1	>
	ITC	>	99.9 ± 1.5	>	>
	CL <sub>50</sub>	>	212.9 ± 22.1	>	>
<i>P. serraria</i>	IC <sub>50</sub>	>	55.1 ± 11.3	48.9 ± 8.1	>
	ITC	>	120.8 ± 16.2	118.2 ± 28.2	>
	CL <sub>50</sub>	>	274.4 ± 12.4	>	>

**Tabla XLII:** Concentración de extractos metanólicos ( $\mu\text{g/mL}$ ) que produce 50 % de inhibición del crecimiento (IC<sub>50</sub>), una inhibición total del crecimiento (ITC), y un 50% de muerte celular (CL<sub>50</sub>) en las líneas TK-10, MCF-7, UACC-62, Col-2. El signo > indica que la mayor dosis utilizada (250  $\mu\text{g/mL}$ ) no ha sido suficiente para provocar el efecto deseado.

Extractos metanólicos	Parámetros de inhibición	Lu-1	KB	LNCaP	CORL-23
<i>P. afra</i>	IC <sub>50</sub>	>	>	>	>
	ITC	>	>	>	>
	CL <sub>50</sub>	>	>	>	>
<i>P. bellardii</i>	IC <sub>50</sub>	>	>	>	39.5 ± 0.01
	ITC	>	>	>	>
	CL <sub>50</sub>	>	>	>	>
<i>P. coronopus</i>	IC <sub>50</sub>	>	>	>	120.9 ± 5.7
	ITC	>	>	>	>
	CL <sub>50</sub>	>	>	>	>
<i>P. lagopus</i>	IC <sub>50</sub>	>	>	>	>
	ITC	>	>	>	>
	CL <sub>50</sub>	>	>	>	>
<i>P. lanceolata</i>	IC <sub>50</sub>	>	>	246.6 ± 4.6	>
	ITC	>	>	>	>
	CL <sub>50</sub>	>	>	>	>
<i>P. serraria</i>	IC <sub>50</sub>	>	>	179.7 ± 4.1	16.9 ± 0.6
	ITC	>	>	>	>
	CL <sub>50</sub>	>	>	>	>

**Tabla XLIII:** Concentración de extractos metanólicos ( $\mu\text{g/mL}$ ) que produce 50 % de inhibición del crecimiento ( $IC_{50}$ ), una inhibición total del crecimiento (ITC), y un 50% de muerte celular ( $CL_{50}$ ) en las líneas Lu-1, KB, LNCaP, CORL-23. El signo > indica que la mayor dosis utilizada (250  $\mu\text{g/mL}$ ) no ha sido suficiente para provocar el efecto deseado.

Compuestos aislados	Parámetros de inhibición	TK-10	MCF-7	UACC-62	Col-2
Genipósido	IC <sub>50</sub>	>38.8	>38.8	>38.8	>7.8
	ITC				
	CL <sub>50</sub>				
Aucubina	IC <sub>50</sub>	>34.6	>34.6	32.1	n.e.
	ITC			>	
	CL <sub>50</sub>				
Luteolina-7-glucósido	IC <sub>50</sub>	27.8 ± 17.8	18.3 ± 4.2	9.3 ± 4.7	>9
	ITC	>	>	23.7 ± 5.5	
	CL <sub>50</sub>				
Luteolina	IC <sub>50</sub>	8.7 ± 9.8	21.4 ± 9.1	2.9 ± 2.6	n.e.
	ITC	>	>	>	
	CL <sub>50</sub>				
Rutina	IC <sub>50</sub>	12.2 ± 6.9	>61	22.0 ± 2.7	>12.2
	ITC	>		>	
	CL <sub>50</sub>				
Quercetina	IC <sub>50</sub>	13.4 ± 0.1	9.5 ± 3.0	1.86 ± 2.7	n.e.
	ITC	>	>	20.5	
	CL <sub>50</sub>				
Verbascósido	IC <sub>50</sub>	> 62.4	11.8 ± 0.7	16.1 ± 3.6	> 12.5
	ITC	>62.4	22.7 ± 0.4	38.8 ± 10.8	>12.5
	CL <sub>50</sub>	>62.4	43.6 ± 1.2	>62.4	>12.5

**Tabla XLIV:** Concentración de compuestos aislados de *Plantago* spp. y geninas ( $\mu\text{g/mL}$ ) que produce 50 % de inhibición del crecimiento ( $IC_{50}$ ), una inhibición total del crecimiento (ITC), y un 50 % de muerte celular ( $CL_{50}$ ) en las líneas TK-10, MCF-7, UACC-62, Col-2. El signo > indica que la mayor dosis utilizada no ha sido suficiente para provocar el efecto deseado.

Compuestos aislados	Parámetros de inhibición	Lu-1	KB	LNCaP	CORL-23
Genipósido	IC <sub>50</sub>	>7.8	>7.8	>7.8	n.e.
	ITC				
	CL <sub>50</sub>				
Aucubina	IC <sub>50</sub>	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
	ITC				
	CL <sub>50</sub>				
Luteolina-7-glucósido	IC <sub>50</sub>	>9	>9	>9	n.e.
	ITC				
	CL <sub>50</sub>				
Luteolina	IC <sub>50</sub>	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
	ITC				
	CL <sub>50</sub>				
Rutina	IC <sub>50</sub>	>12.2	>12.2	>12.2	>61
	ITC				
	CL <sub>50</sub>				
Quercetina	IC <sub>50</sub>	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
	ITC				
	CL <sub>50</sub>				
Verbascósido	IC <sub>50</sub>	> 62.4	11.8 ± 0.7	16.1 ± 3.6	> 12.5
	ITC	>62.4	22.7 ± 0.4	38.8 ± 10.8	>12.5
	CL <sub>50</sub>	>62.4	43.6 ± 1.2	>62.4	>12.5

**Tabla XLV:** Concentración de compuestos aislados de *Plantago* spp. y geninas ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) que produce 50 % de inhibición del crecimiento (IC<sub>50</sub>), una inhibición total del crecimiento (ITC), y un 50 % de muerte celular (CL<sub>50</sub>) en las líneas Lu-1, KB, LNCaP, CORL-23. El signo > indica que la mayor dosis utilizada no ha sido suficiente para provocar el efecto deseado.

#### IV.7.1.2.- Discusión de resultados.

Los seis extractos metanólicos de *Plantago* spp. muestran inhibición del crecimiento sobre las líneas celulares procedentes de adenocarcinoma mamario (MCF-7) y melanoma (UACC-62) a las concentraciones ensayadas. Sin embargo, ningún extracto metanólico, a excepción del procedente de *P. bellardii* (IC<sub>50</sub>= 86  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), mostró inhibición del crecimiento en células procedente de adenocarcinoma renal (TK-10). Los extractos metanólicos de *P. coronopus* y *P. bellardii* fueron los más activos en las líneas celulares tumorales MCF-7 y UACC-62 (IC<sub>50</sub> = 32 y 34  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente). El crecimiento en la línea celular MCF-7 fue totalmente inhibido por los extractos de *P. bellardii*, *P. coronopus*, *P. lanceolata* y *P. serraria* (ITC= 87, 74, 99 y 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente) y los extractos metanólicos de *P. afra*, *P. bellardii*, *P. coronopus*, *P. lagopus* y *P. serraria* mostraron una total inhibición del crecimiento en la línea celular UACC-62 (ITC= 238, 84, 89, 244 y 118  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente). Por otra parte, ninguno de los extractos ensayados mostraron una inhibición total del crecimiento en la línea celular TK-10. Además *P. coronopus*, *P. lanceolata*, y *P. serraria* en las células procedente de adenocarcinoma mamario (MCF-7) produjeron la muerte del 50% de las células (CL<sub>50</sub>), a las concentraciones de 169, 212 y 274  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente y en las células UACC-62. *P. coronopus* mostró una CL<sub>50</sub> a las dosis de 198  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Los protocolos establecidos por el NCI contemplan, que para que un extracto sea considerado citotóxico, el valor de  $IC_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$ . e  $IC_{50} < 4 \mu\text{g/mL}$  en el caso de los compuestos aislados.

Luteolina-7-glucosido, aislada del extracto metanólico de *P. lagopus*, y su genina, luteolina mostraron inhibición del crecimiento en las líneas celulares TK10, MCF-7 y UACC-62, mostrándose más activa la genina que el heterósido. El heterósido de flavona, luteolina-7-glucosido, presentó una mayor inhibición del crecimiento en la línea celular procedente de adenocarcinoma mamario (MCF-7) con una  $IC_{50} = 40 \mu\text{g/mL}$ , mientras que la genina de flavona, luteolina mostró una mayor inhibición del crecimiento en la línea celular de melanoma con una  $IC_{50} = 10 \mu\text{g/mL}$

Rutina, aislada del extracto metanólico de *P. bellardii*, inhibió el crecimiento de las líneas TK-10 y UACC-62, alcanzando la  $IC_{50}$  a las concentraciones de 12 y 22  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente, aunque a la máxima dosis ensayada, 61  $\mu\text{g/mL}$  no produce una inhibición total del crecimiento. Quercetina, la genina de este heterósido, ejerció un efecto citotóxico en las tres líneas celulares TK-10, MCF-7 y UACC-62, y al igual que el caso anterior, es más activo que su heterósido. Pero, tampoco, como la rutina, inhibe totalmente el crecimiento.

Verbascósido, fenilpropanoide aislado de *P. serraria*, mostró una inhibición del crecimiento en las líneas MCF-7 y UACC-62, con valores de  $IC_{50} = 11.8$  y 16.1  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente.

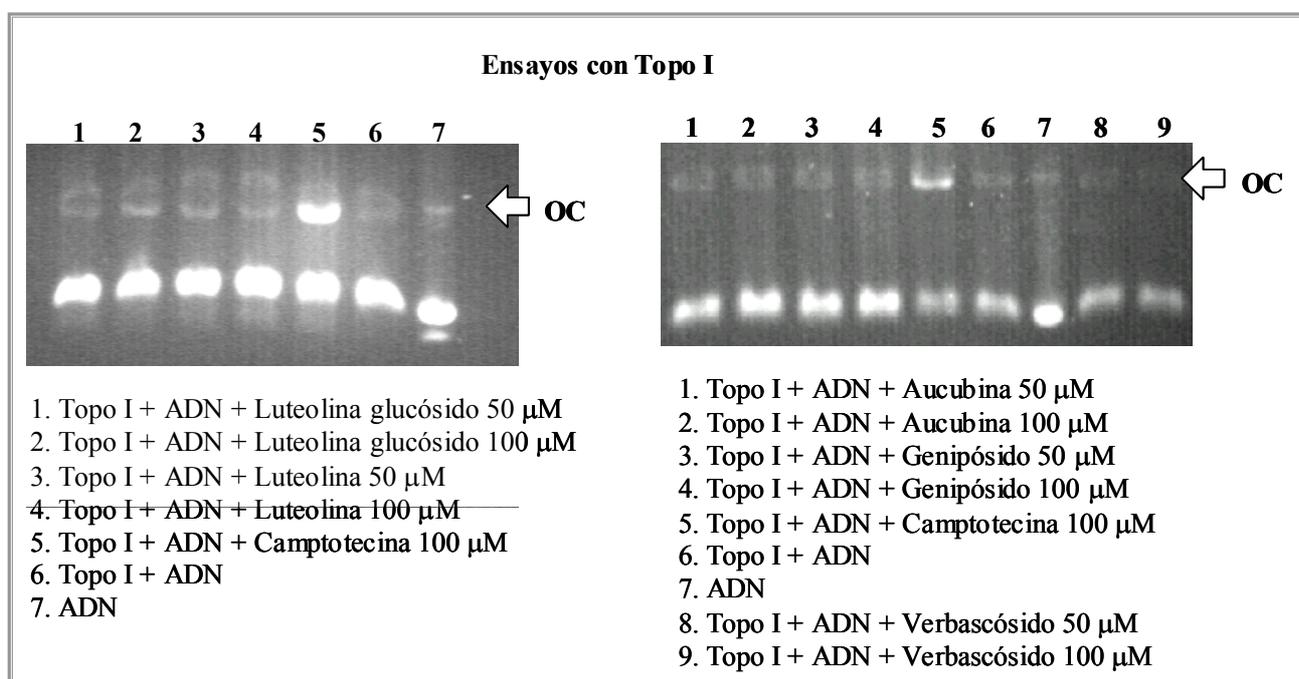
El iridoide aislado de *P. bellardii*, genipósido, así como el identificado en diferentes especies de *Plantago spp.*, aucubina, no fueron citotóxicos a las concentraciones ensayadas.

La inhibición del crecimiento en las líneas celulares MCF-7 y UACC-62, puede ser debido a la presencia del fenilpropanoide, verbascósido y al heterósido de flavona, luteolina-7-glucósido, y pudiendo contribuir la rutina, al efecto del extracto metanólico de *P. bellardii* sobre la línea celular TK-10. Aún así, los extractos de *Plantago spp.* y compuestos aislados pueden considerarse como no activos debido a los valores establecidos por el NCI, previamente mencionados.

#### IV.7.2. VENENOS DE TOPOISOMERASAS

##### IV.7.2.1.- Resultados

Los ensayos para estudiar la actividad veneno de topoisomerasa fue realizada mediante electroforesis y posterior cuantificación de las bandas de circular abierto (OC) y lineal con respecto al ADN total. Las imágenes de los gels obtenidos con los diferentes compuestos aislados de *Plantago spp.*, para la topo I y II se muestran en la figura 56 y 58 respectivamente.

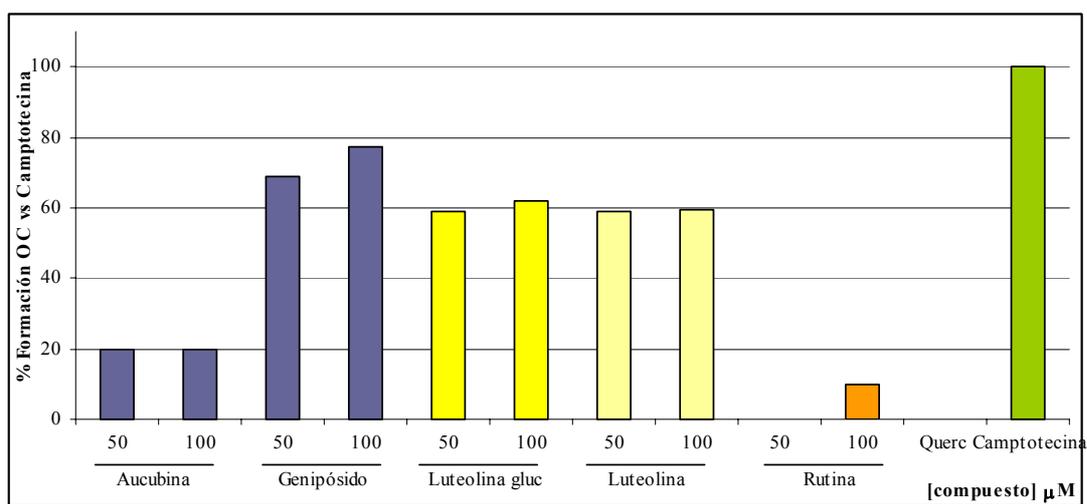


**Figura 56:** Geles de formación de complejos ADN-topo I de los compuestos aislados de *Plantago spp.*

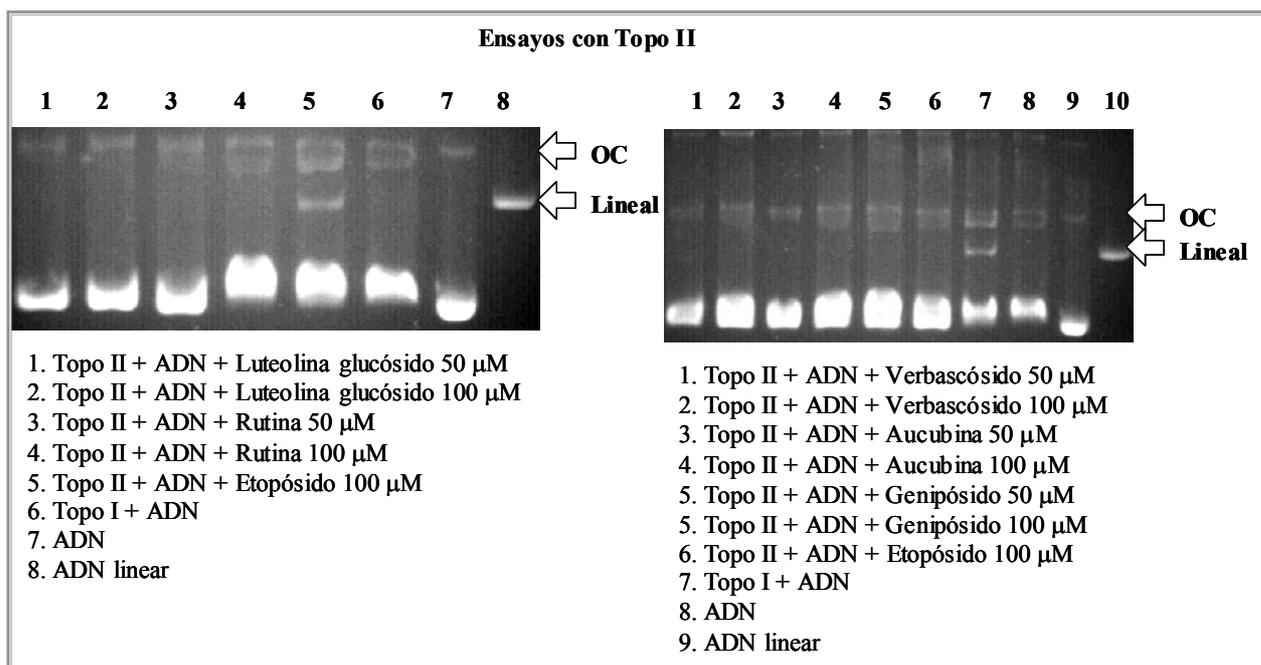
En la tabla XLVI y figura 57, se resumen los % de formación de OC en el ensayo de topo I que induce cada compuesto tomando como referencia al veneno de topo I, camptotecina.

Compuesto	% ADN OC vs Camptotecina.
Aucubina 50 $\mu$ M	19.6
Aucubina 100 $\mu$ M	19.6
Genipósido 50 $\mu$ M	69.1
Genipósido 100 $\mu$ M	77.5
Luteolina-7-gluc 50 $\mu$ M	58.8
Luteolina-7-gluc 100 $\mu$ M	62.0
Luteolina 50 $\mu$ M	59.0
Luteolina 100 $\mu$ M	59.4
Rutina 50 $\mu$ M	n.a.
Rutina 100 $\mu$ M	10
Quercetina 100 $\mu$ M	n.a.
Verbascósido 50 $\mu$ M	n.a.
Verbascósido 100 $\mu$ M	n.a.
Camptotecina	100

**Tabla XLVI:** % de formación de ADN lineal abierto (OC) por los compuestos con respecto a camptotecina. n.a., no activo.



**Figura 57:** % de OC ADN-topo I de los compuestos aislados de *Plantago spp.*



**Figura 58:** Geles de formación de complejos ADN-topo II de los compuestos aislados de *Plantago* spp.

Los compuestos ensayados no mostraron estabilización de los complejos de rotura OC y lineal en la topo II, por lo que no son activos como venenos de topoisomerasa II.

#### IV.7.2.2.- Discusión de resultados

El gel representado en la figura 56 muestra los efectos de la estabilización de luteolina-7-glucósido, luteolina, rutina, aucubina y genipósido a las concentraciones ensayadas de 50 y 100  $\mu\text{M}$ , induciendo la formación del complejo de rotura, ADN circular abierto (OC). Los ensayos fueron realizados frente a camptotecina, a 100  $\mu\text{M}$ , patrón en el ensayo de topoisomerasa I. El compuesto fenilpropanoide, verbascósido, así como quercetina, no mostraron actividad como venenos de topoisomerasa I.

Por otro lado, tal y como se observa en los geles de la figura 58, ninguno de los compuestos ensayados (luteolina glucósido, rutina, verbascósido, aucubina y genipósido) mostraron actividad como venenos de topoisomerasa II, ensayo realizado frente al patrón etopósido, al no inducir la estabilización de los complejos de rotura lineal y circular abierto.

En estudios anteriores, se ha demostrado la acción de flavonoides como venenos de topoisomerasa I y II, y cómo parece existir una relación estructura-actividad.

En el caso de los iridoides, no se han descrito anteriormente como venenos de topoisomerasa. Esta actividad mostrada, podría ser debida a que los iridoides, pueden abrir su anillo y generar dialdehidos, que reaccionan con grupos disulfuro, interaccionando, por tanto, con proteínas ricas en aminoácidos con grupos “S” como cisteína.

### IV.7.3. INDUCCIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR

#### IV.7.3.1. Resultados.

Las células HL-60 (leucemia mieloide aguda), tratadas con los extractos metanólicos de *Plantago spp.* a la concentración de 4 µg/mL fueron analizadas para determinar en primer lugar, su viabilidad y proliferación celular, mediante la inhibición de la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina (tabla XLVII), y a continuación, el porcentaje que exhibe marcadores morfológicos, funcionales y enzimáticos de las células diferenciadas, como el ensayo NBT (azul nitro tetrazolio), y la actividad NSE/SE (esterasas no específica/específica) (tabla XLVIII).

Muestras	% Viabilidad celular	% inhibición de incorporación de [ <sup>3</sup> H]-timidina
<i>P. afra</i>	92,7 ± 12,4	n.a.
<i>P. bellardii</i>	98,2 ± 11,4	n.a.
<i>P. coronopus</i>	80,7 ± 5,3	n.a.
<i>P. lagopus</i>	103,3 ± 8,5	14,0 ± 5,2
<i>P. lanceolata</i>	108,1 ± 26,9	30,9 ± 12,7
<i>P. serraria</i>	97,4 ± 9,5	51,5 ± 2,1
Vitamina D3	121,9 ± 11,6	95,2

**Tabla XLVII:** % de viabilidad celular y % inhibición de la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina de los extractos metanólicos de *Plantago spp.*

Muestra	%Diferenciación NBT	% Diferenciación NSE/SE
<i>P. afra</i>	42,5	18,7
<i>P. bellardii</i>	33,2	37,2
<i>P. coronopus</i>	28,9	47,1
<i>P. lagopus</i>	30,6	37,7
<i>P. lanceolata</i>	14,3	41,2
<i>P. serraria</i>	42,5	50,3
Vitamina D3	67,3	81,2

**Tabla XLVIII:** % de células inducidas a la diferenciación detectadas mediante el método NBT y NSE/SE de los extractos metanólicos de *Plantago spp.*

Siguiendo el mismo protocolo, las células, fueron tratadas también con los compuestos aislados de *Plantago spp.* a diferentes concentraciones (5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.31  $\mu\text{g/mL}$ ). Los resultados de % viabilidad celular y % de inhibición de incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-timidina se muestran en las tablas XLIX y L, respectivamente, y los % de células diferenciadas detectadas por los dos métodos, en la tabla LI y LII.

Concentraciones ensayadas	%Viabilidad celular			
	Genipósido	Luteolina gluc	Rutina	Verbascósido
5	101,6	60,3	196,8	66,7
2,5	85,7	114,3	241,3	104,8
1,25	111,1	152,9	165,1	107,9
0,625	82,5	174,6	215,9	111,1
0,3125	47,6	155,6	327,0	136,5

**Tabla XLIX:** % de viabilidad celular en la línea HL-60 de los compuestos aislados de *Plantago spp.*

	% Inhibición de incorporación de [ <sup>3</sup> H]-timidina			
Concentraciones ensayadas	Genipósido	Luteolina gluc	Rutina	Verbascósido
5	53.0	71,1	43,0	n.a.
2,5	15.8	81,3	52,7	27,7
1,25	46.2	60,7	35,9	33,9
0,625	41.9	50,7	61,9	29,2
0,3125	n.a.	48,1	71,5	55,2

**Tabla L:** % de inhibición de incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina en la línea HL-60 de los compuestos aislados de *Plantago spp.*

	% de diferenciación NBT (reducción de NBT)			
Concentraciones ensayadas	Genipósido	Luteolina gluc	Rutina	Verbascósido
5	51,1	64.2	53.5	55,1
2,5	65,1	62,3	44,9	51,5
1,25	58.5	59.6	50,7	52,1
0,625	65.0	60.4	54,0	59,9
0,3125	49.7	50.6	42,6	53,1

**Tabla LI:** % de diferenciación NBT en la línea HL-60 de los compuestos aislados de *Plantago spp.*

	% de diferenciación NSE/SE (actividad esterasas))			
Concentraciones ensayadas	Genipósido	Luteolina gluc	Rutina	Verbascósido
5	53,8	7,2	22,7	29,8
2,5	56,4	47,9	41,1	55,2
1,25	68,9	81,9	54,1	70,7
0,625	59,4	49,6	61,5	66,9
0,3125	55,8	52,5	72,8	67,6

**Tabla LII:** % de diferenciación NSE/SE en la línea HL-60 de los compuestos aislados de *Plantago spp.*

#### IV.7.3.2. Discusión de resultados.

De los extractos ensayados, *P. lagopus*, *P. lanceolata* y *P. serraria*, inhiben la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina en la línea HL-60, sin afectar a la viabilidad celular, es decir, detienen la proliferación celular sin ser tóxicos para las células. Además, los extractos ensayados inducen la diferenciación celular hacia ambas líneas, granulocítica-linfocítica (ensayo NBT) y monocítica-macrófaga (ensayo NSE/SE), aunque destaca el extracto metanólico de *P. lanceolata*, que induce la diferenciación predominantemente hacia la segunda. .

Los compuestos aislados también muestran una inhibición de la proliferación celular, aunque no se puede establecer una relación concentración dependiente. Esto mismo ocurre con la diferenciación hacia las líneas granulocítica-linfocítica y monocítica-macrófaga, siendo luteolina-7-glucósido y verbascósido los que muestran mayor actividad.

La quimioterapia convencional, se centra en destruir las células en búsqueda de una remisión hematológica completa. En los últimos años, sin embargo, diferentes sustancias no convencionales, selectivas antileucémicas, han sido desarrolladas, y éstas, funcionan a nivel de moléculas diana involucradas directamente en la patogénesis de la enfermedad. Por ejemplo, el ácido todo trans-retinoico (ATRA), ha revolucionado el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda, mostrando remisiones completas de la enfermedad sin mostrar alteraciones en la médula o incrementar la fibrinólisis.

La línea HL-60 fue establecida a partir de un paciente con leucemia mieloide aguda. En cultivo, esta línea puede ser inducida hacia su diferenciación finalizando en las células granulocíticas, por ácido retinoico, o hacia células monocíticas-macrófagas por vitamina D3.

Y más aún, los niveles de proliferación pueden ser determinados por la incorporación de timidina.

En bibliografía se han estudiado algunos flavonoides como inductores de la diferenciación de la línea HL-60.

Kawaii y cols, (1999), muestran que diferentes flavonoides, incluidos luteolina y quercetina, son activos, y que muestran un incremento en la actividad SE y en la reducción de NBT, induciendo similares porcentajes de monocitos y macrófagos.

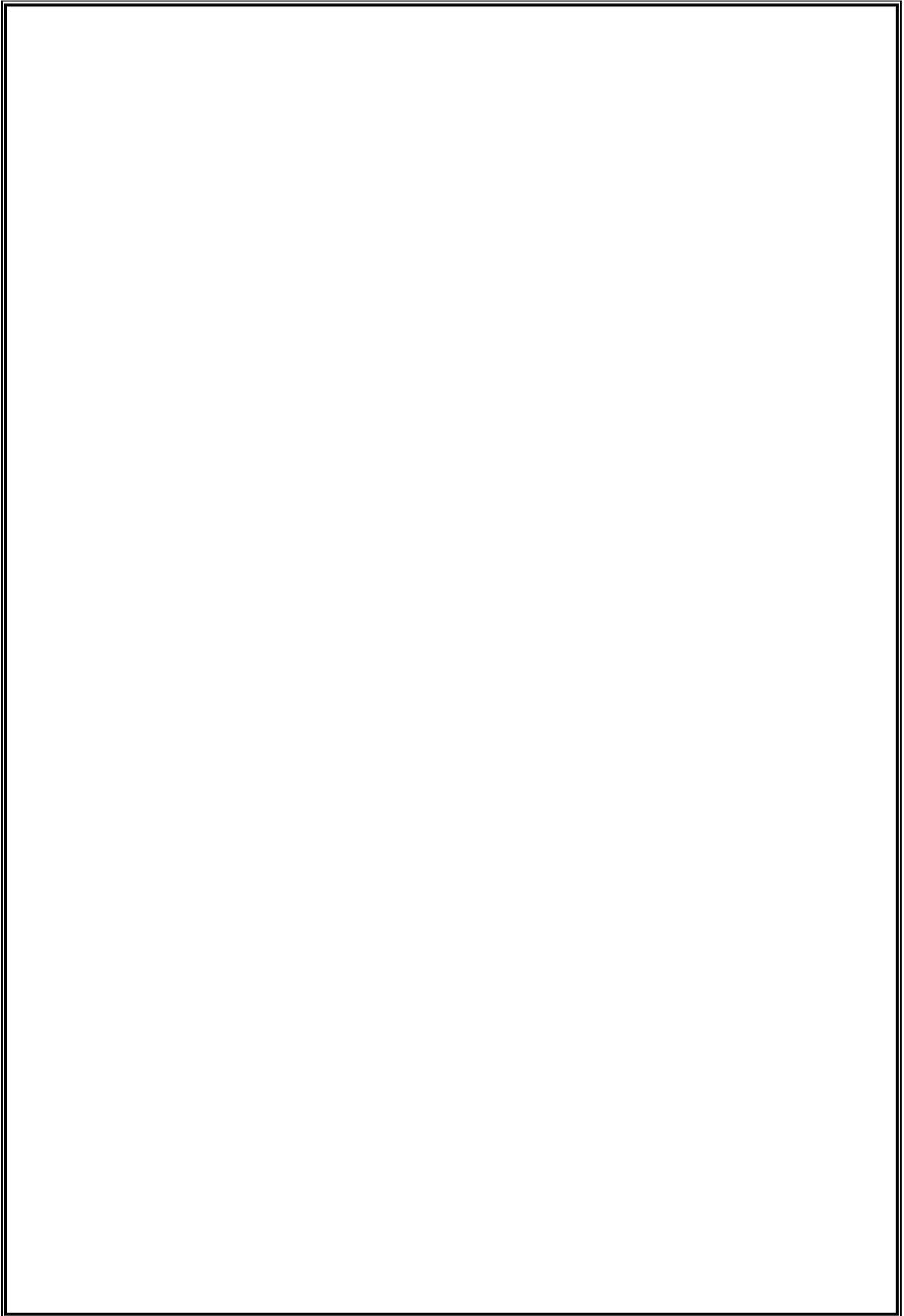
Luteolina fue uno de los flavonoides más potentes. induciendo más del 50% de la diferenciación celular a la dosis de 10  $\mu\text{M}$ , e inhiben la proliferación celular a la dosis de 40  $\mu\text{M}$ .

Estos autores realizan un estudio actividad farmacológica-estructura química, concluyendo que:

- Todos los flavonoides que poseen un radical *o*-catecol en el anillo B, muestran una potente actividad.
- Luteolina y quercetina poseen una actividad potente, mientras que los flavonoides que pierden este grupo hidroxilo en 3' (apigenina y kampferol, respectivamente) pierden actividad.
- Comparando los diferentes grupos de flavonoides, es importante la insaturación C2-C3.
- La hidroxilación en C3 reduce de forma significativa la actividad, y la glicosilación de este, anula totalmente su actividad (en nuestro caso, mostramos cómo los heterósidos muestran también inducción de la diferenciación celular)

En el caso de los glicósidos de fenilpropanoides, (Wang *et al.*, 1999) mostró la inducción de la diferenciación de la línea HL-60 por isoverbascósido, isómero del fenilpropanoide investigado en esta ocasión.

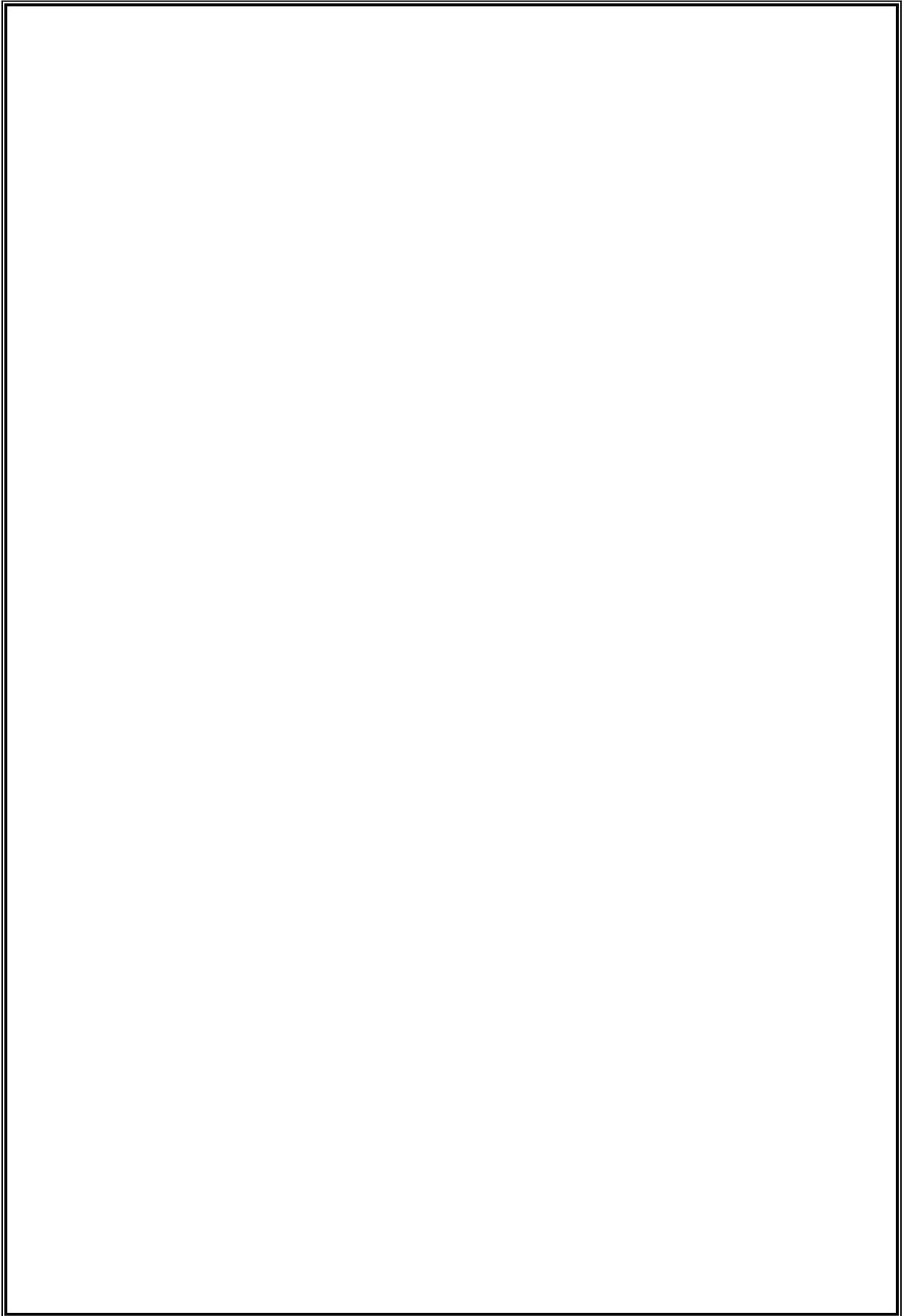
Aunque no se saben aún con certeza los mecanismos moleculares, se sabe que están implicados receptores retinoicos, o que algunos genes están involucrados en el desarrollo de diferentes tipos malignos de leucemia, relacionados con la diferenciación y la apoptosis.



## **V.- CONCLUSIONES**

- 1) Los extractos metanólicos de las hojas de las especies de *Plantago* estudiadas (*P. afra*, *P. bellardii*, *P. coronopus*, *P. lagopus*, *P. lanceolata*, *P. serraria*) destacan por su riqueza en compuestos fenólicos, entre ellos, flavonoides y fenilpropanoides. Además, los extractos correspondientes a *P. afra*, *P. bellardii*, *P. lagopus* y *P. lanceolata* contienen iridoides.
- 2) Los flavonoides identificados fueron: Luteolina-7-glucósido en *P. lagopus* y *P. lanceolata*, y rutósido en *P. bellardii*; esta última especie es, hasta el momento, la única del género *Plantago*, de donde se ha aislado un derivado de flavonol.
- 3) El fenilpropanoide, verbascósido, aislado de *P. serraria*, ha sido identificado en todas las especies de *Plantago* estudiadas.
- 4) Del extracto metanólico de *P. bellardii* se aisló el compuesto iridoide genipósido, no identificado antes en el género *Plantago*. En los extractos procedentes de *P. afra*, *P. bellardii*, *P. lagopus* y *P. lanceolata* fue identificado otro iridoide, la aucubina.
- 5) Actividad antirradicalaria, frente al DPPH, la presentaron todos los extractos metanólicos de *Plantago spp.* estudiados (*P. serraria* > *P. bellardii* > *P. lagopus* > *P. lanceolata* > *P. coronopus* > *P. afra*), mientras que la inhibición de la peroxidación lipídica sólo la mostraron tres de ellos (*P. bellardii* > *P. serraria* > *P. lanceolata*).
- 6) Existe una relación directa de la actividad antirradicalaria con el contenido de fenilpropanoides/flavonoides/fenoles totales, destacando verbascósido, rutósido y luteolina-7-glucósido.
- 7) De los extractos metanólicos y compuestos aislados de *Plantago spp.*, solamente verbascósido se puede considerar como inductor de la enzima detoxificante Quinona-Reductasa (QR).
- 8) En relación al ensayo de inhibición de la transformación celular, la mayor actividad la mostró el extracto metanólico de *P. lagopus*, con alto contenido en luteolina-7-glucósido, y *P. serraria*, con riqueza en verbascósido. La implicación en la actividad de la enzima Ornitina-Decarboxilasa (ODC) fue descartada.
- 9) Todos los compuestos aislados (flavonoides, fenilpropanoides e iridoides) se unieron al receptor  $\beta$ -estrogénico, aunque sólo presentaron actividad estrogénica, sin proliferación de las células Ishikawa, los dos flavonoides (luteolina-7-glucósido y rutósido).

- 10) Los resultados de citotoxicidad, en diferentes líneas tumorales, fueron negativos tanto para los extractos como para los compuestos aislados ensayados.
- 11) Los flavonoides (luteolina-7-glucósido, rutósido y la genina luteolina), e iridoides (genipósido y aucubina), se comportaron como “venenos” de Topoisomerasa I.
- 12) La diferenciación celular, en la línea HL-60, fue inducida por todos los compuestos aislados, destacando luteolina-7-glucósido y verbascósido, sin poder establecer una relación dosis-efecto.
- 13) De las anteriores conclusiones, a su vez se concluye, el interés quimiopreventivo del extracto metanólico de *P. serraria* y del fenilpropanoide aislado del mismo, verbascósido.



## **VI.- BIBLIOGRAFÍA**

- 1.- ABE, F.; NAGAO, T.; OKABE, H. "Antiproliferative constituents in plants 9. Aerial parts of *Lippia dulcis* and *Lippia canescens*." *Biol Pharm Bull* **25**: 920-922, (2002).
- 2.- ABEYSEKERA, A.M.; DE SILVA, K.T.D.; DE SILVA, S.R.P.; SIRIMANNE, V.D.P.; LABADIE, R.P.; VAN DEN BERG AJJET "Inhibition of chemiluminescence generated by zymosan-activated polymorphonuclear leucocytes by phenolic constituents of *Vernonia cinera*." *Fitoterapia* **70**: 317-319, (1999).
- 3.- ABZALOV, A.A. "Pigment levels and activity of some oxidases in herbaceous winter-blooming plants in the uzbekistan botanical garden." *Tr Tashk Skh Inst.* **26**: 145, (1971).
- 4.- ADAMCZYK, M.; RATZ, H.; HOSE, S.; MARCHESAN, M.; PAPER, D.H.; FRANZ, G.; WOLF-HEUSS, E.; ENGEL, J. "Quantitative determination of the iridoid glycosides aucubin and catalpol in *Plantago lanceolata* L. extracts by HPTLC and HPLC." *Journal of Planar Chromatography Mod.TLC.* **11**: 374-378, (1998).
- 5.- ADLER, L.S.; SCHMITT, J.; BOWERS, M.D. "Genetic variation in defensive chemistry in *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae) and its effect on the specialist herbivore *Juconia coenia* (Nymphalidae)." *Oecologia* **101**: 75-85, (1995).
- 6.- ADZET, T.; CAMARASA, J.; LAGUNA, J.C. "Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds from *Cynara scolymus* against CCl<sub>4</sub> toxicity in isolated rat hepatocytes." *J Nat Prod* **50**: 612-617, (1987).
- 7.- AFIFI, M.S.; SALAMA, O.M.; MAATOOQ, G.T. "Phytochemical study of two plantago species. Part II. Iridoid glucosides." *Mansoura Journal of Pharmaceutical Sciences* **6**: 16-25, (1990).
- 8.- AFIFI, M.S.A.; AHMED, M.M.; PEZZUTO, J.M.; KINGHORN, D.K. "Cytotoxic flavonolignans and flavones from *Verbascum sinaiticum* leaves." *Phytochemistry* **34**: 839-841, (1993).
- 9.- AHERNE, S.A. y O'BRIEN, N.M. "Protection by the flavonoids myricetin, quercetin and rutin against hydrogen peroxide-induced DNA damage in Caco-2 and Hep G2 cells." *Nutr Cancer* **34**: 160-166, (1999).
- 10.- AHMAD, M.; RIZWANI, G.H.; AFTAB, K.; AHMAD, V.U.; GILAMO, A.H.; AHMAD, S.P. "Acteoside: a new antihypertensive drug." *Phytother Res* **9**: 525-527, (1995).
- 11.- AKBAY, P.; CALIS, I.; UNDERGER, U.; BASARAN, N.; BASARAN, A.A. "In vitro immunomodulatory activity of verbascoside from *Nepeta ucrainica* L." *Phytother Res* **16**: 593-595, (2002).
- 12.- AKCOS, Y.; EZER, N.; CALIS, I.; DEMIRDAMAR, R.; TEL, B.C. "Polyphenolic compounds of *Sideritis lycia* and their anti-inflammatory activity." *Pharmaceutical Biology* **37**: 118-122, (1999).
- 13.- AKTAY, G.; DELIORMAN, D.; ERGUN, E.; ERGUN, F.; YESILADA, E.; CERVIK, C. "Hepatoprotective effects of turkish folk remedies on experimental liver injury." *Journal of Ethnopharmacology* **73**: 121-129, (2000).
- 14.- AL-SHAMMA, A. y MITSCHER, L.A. "Comprehensive survey of indigenous iraqi plants for potential economic value. I. Screening results of 327 species for alkaloids and antimicrobial agents." *Journal of Natural Products.* **42**: 633-642, (1979).
- 15.- ALBERT, J.L.; SUNDSTROM, S.A.; LYTTLE, C.R. "Estrogen regulation of placental alkaline phosphatase gene expression in a human endometrial adenocarcinoma cell line." *Cancer Res* **50**: 3306-3310, (1990).
- 16.- ALI, S. y COOMBES, R.C. "Endocrine-reponsive breast cancer and strategies for combating resistance." *Nature Rev* **2**: 101-112, (2002).

- 17.- ALKOFABI, A.; BATSHOUN, R.; OWAIS, W.; NAJIB, N. "Biological activity of some Jordanian medicinal plant extracts." *Fitoterapia* **67**: 435-442, (1996).
- 18.- ANDARY, C.; MOTTE-FLORAC, M.E.; GARGADENNEC, A.; WYLDE, R.; HEITZ, A. "Cafeic acid esters in the genus *Plantago*. Identification and chemotaxonomic value." *Plants Medicinal and Phytotherapy* **22**: 17-22, (1988a).
- 19.- ANDARY, C.; MOTTE-FLORAC, M.E.; GARGADENNEC, R.; WYLDE, R.; HEITZ, A. "Les esters caféiques du genre *Plantago*. Identification et valeur chimiotaxinomique" *Plantes médicinales et Phytothérapie* **22**: 17-22, (1988b).
- 20.- ANDRZEJEWSKA-GOLEC, E. "A taxonomic study of *Plantago* subgenus *Psyllium* (Miller) Harms." *Botanical Journal of the Linnean Society* **108**: 107-113, (2003).
- 21.- ANDRZEJEWSKA-GOLEC, E.; OFTERDINGER-DAEGLER, S.; CALIS, I.; SWIATEK, L. "Chemotaxonomic aspects of iridoids occurring in *Plantago* subgen. *Psyllium* (Plantaginaceae)." *Plant Systematics and Evolution* **185**: 85-89, (1993).
- 22.- ANDRZEJEWSKA-GOLEC, E. y SWIATEK, L. "Badania chemotaxonomiczne rodzaju *Plantago*, I Analiza frakcji irididow." *Herba Polonica* **30**: 9-16, (1984a).
- 23.- ANDRZEJEWSKA-GOLEC, E. y SWIATEK, L. "Chemotaxonomic investigations on the genus *Plantago*. I. Analysis of iridoid fractions." *Herba Polonica* **30**: 9-16, (1984b).
- 24.- ANTEROLA, A.M. y LEWIS, N.G. "Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity." *Phytochemistry* **61**: 221-294, (2002).
- 25.- ARNALLAL, M.; BRONNER, C.; BRIANCON, F.; HAAG, M.; ANTON, R.; LANDRY, Y. "Inhibition of mast cell histamine release by flavonoids and biflavonoids." *Planta Med* **51**: 16-21, (1985).
- 26.- ARNOW, L.E. "Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxifenilalanin-tirosin mixtures." *J Biol Chem* **78**: 531-537, (1937).
- 27.- AVILA, J.G.; DE LIVERANT, J.G.; MARTÍNEZ, A.; MARTÍNEZ, G.; MUÑOZ, J.L.; ARCINIEGAS, A.; ROMO DE VIVAR, A. "Mode of action of *Buddleja cordata* verbascoside against *Staphylococcus aureus*." *J Ethnopharmacol* **66**: 75-78, (1999).
- 28.- BAKER, M.E. "Evolution of regulation of steroid-mediated intercellular communication in vertebrates: insights from flavonoids, signals that mediate plant-rhizobia symbiosis." *J Steroid Biochem Mol Biol* **41**: 301-308, (1992).
- 29.- BALBAA, S.I.; KARAWYA, M.S.; AFIFI, M.S. "Pharmacognostical study of the seeds of certain *Plantago* species growing in Egypt." *UAR J.Pharm.Sci.* **12**: 35-52, (1971).
- 30.- BALDO, B.A.; CHENSEE, Q.J.; HOWDEN, M.E.H.; SHARP, P.J. "Allergens from plantain (*Plantago lanceolata*). Studies with pollen and plant extracts." *Int Arch Allergy Appl Immunol* **68**: 295-304, (1982).
- 31.- BARTHOLOMAEUS, A. y AHOKAS, J. "Inhibition of P-450 by aucubin: is the biological activity of aucubin due to its glutaraldehyde-like aglycone?" *Toxicology Letters* **80**: 75-83, (1995).
- 32.- BATES, R.B.; EISENBRAUN, E.J.; MCELVAIN, S.M. *J.Am.Chem.Soc.* **80**: 3420-3424, (1958).
- 33.- BEAR, W.L. y TEEL, R.W. "Effects of citrus flavonoids on the mutagenicity of heterocyclic amines and on cytochrome p450 1A2 activity." *Anticancer Res* **20**: 3609-3614, (2000).

- 34.- BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J.; LORENTE, J.; ORTUÑO, A.; DEL RÍO, J.A. "Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves." *Food Chemistry* **68**: 457-462, (2000).
- 35.- BENNETS, H.W.; UNDERWOOD, E.J.; SHIER, F.L. "A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in western Australia." *Aust Vet J* **22**: 2-12, (1946).
- 36.- BERMEJO BENITO, P.; DÍAZ LANZA, A.M.; SILVÁN SEN, A.M.; DE SANTOS GALINDEZ, J.; FERNÁNDEZ MATELLANO, L.; SANZ GÓMEZ, A.; ABAD MARTÍNEZ, M.J. "Effects of some iridoids from plant origin on arachidonic acid metabolism in cellular system." *Planta Medica* **66**: 324-328, (2000).
- 37.- BERMEJO, P.; ABAD, M.J.; DÍAZ, A.M.; FERNÁNDEZ, L.; SANTOS, J.D.; SÁNCHEZ, S.; VILLAESCUSA, L.; CARRASCO, L.; IRURZUN, A. "Antiviral activity of seven iridoids, three saikosaponins and one phenylpropanoid glycoside extracted from *Bupleurum rigidum* and *Scrophularia scorodonia*." *Planta Med* **68**: 106-110, (2002).
- 38.- BEUTLER, J.A.; HAMEL, E.; VLIETINCK, A.J.; HAEMERS, A.; RAJAN, R.; ROIMAN, J.N.; CARDELINA, J.H.; BOYD, M.R. "Structure-activity requirements for flavone cytotoxicity and binding to tubulin." *J Med Chem* **41**: 2333-2338, (1998).
- 39.- BHAT, K.P. y PEZZUTO, J.M. "Resveratrol exhibits cytostatic and antiestrogenic properties with human endometrial adenocarcinoma (Oshikawa) cells." *Cancer Res* **61**: 6137-6144, (2001).
- 40.- BIANCO, A.; GUISO, M.; PASSACANTILLI, P. "Iridoid and phenylpropanoid glycosides from new sources." *Journal of Natural Products*. **47**: 901-902, (1984).
- 41.- BIRNIE, G.D. "The HL-60 cell line: A model system for studying human myeloid cell differentiation." *Br J Cancer* **58**: 41-45, (1988).
- 42.- BIRT, D.F.; HENDRICH, S.; WANG, W. "Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids." *Pharmacol Terap* **90**: 157-177, (2001b).
- 43.- BIRT, D.F.; HENDRICH, S.; WANG, W. "Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids." *Pharmacol Terap* **90**: 157-177, (2001a).
- 44.- BISHOP, J.M. y WEINBERG, R.A. "Molecular Oncology." *Scientific American* (1996).
- 45.- BLUMENTHAL, M.; BUSSE, W.R.; GOLDBERG, A.; GRUENWALD, J.; HALL, T.; RIGGINS, C.W.; RISTER, R.S. *The Complete German Commission E Monographs. Therapeutic guide to herbal medicines*. Austin, American Botanical Council. (1998).
- 46.- BOJE, K.; LECHTENBERG, M.; NAHRSTEDT, A. "New and known iridoid- and phenylethanoid glycosides from *Harpagophytum procumbens* and their *in vitro* inhibition of human leukocyte elastase." *Planta Med* **69**: 820-825, (2003).
- 47.- BOUDET, A.M.; LAPIERRE, C.; GRIMA-PETTENATI, J. "Tansley review No. 80. Biochemistry and molecular biology of lignification." *New Phytologist* **129**: 203-236, (1995).
- 48.- BOUQUELOT, E. y HÉRISSEY, H. *Ann.Chim.(Phys)*. **8**: 289, (1905).
- 49.- BOWERS, M.D. y STAMP, N.E. "Effects of plant age, genotype and herbivory on *Plantago* performance and chemistry." *Ecology* **74**: 1778-1791, (1993).
- 50.- BOWERS, M.D. y STAMP, N.E. "Fate of host-plant iridoid glycosides in lepidopteran larvae of *Nymphalidae* and *Arctiidae*." *23* **12**: 2965, (1997).

- 51.- BRAUTIGAM, M. y FRANZ, G. "Structural features of *Plantago lanceolata* mucilage." *Planta Medica* **51**: 293-297, (1985).
- 52.- BRAY, H.C. y THORPE, W.V. *Meth Biochem Anal* **1**: 27-52, (1954).
- 53.- BREITMAN, T.R.; SELONIC, S.E.; COLLINS, S.J. "Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid." *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 2936-2940, (1980).
- 54.- BROWN, D.J. y DATTNER, A.M. "Phytherapeutic approaches to common dermatologic conditions" *Arch.Dermatol.* **134**: 1401-1404, (1998).
- 55.- BRUNETON, J. *Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes Medicinales.* Tec and Doc. 106-111, (1999).
- 56.- BRUNETON, J. "Iridoides" *Pharmacognosie...* Tec and Doc. 589-611, (2000).
- 57.- BRUNETON, J. *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales* Zaragoza , Acribia S.A. 242, (2001a).
- 58.- BRUNETON, J. *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales.* Zaragoza , Acribia S.A. 229-231, (2001b).
- 59.- BRYAN, M.T.; ENGLEZOU, A.; DALLA-POZZA, L.; DUNHAM, M.A.; REDDEL, R.R. "Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines." *Nat Med* **3**: 1271-1274, (1997).
- 60.- CÁCERES, A.; GIRÓN, L.M.; ALVARADO, S.R.; TORRES, M.F. "Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases." *Journal of Ethnopharmacology* **20**: 223-237, (1987).
- 61.- CADENAS, E. "Basic mechanisms of antioxidant activity." *Biofactors* **6**: 391-397, (1997).
- 62.- CALABOZO, B.; DUFFORT, O.; CARPIZO, J.A.; BARBER, D.; POLO, F. "Monoclonal antibodies against the major allergen of *Plantago lanceolata* pollen, Pla 1 1: affinity chromatography purification of the allergen and development of an ELISA method for Pla 1 1 measurement" *Allergy* **56**: 429-435, (2001).
- 63.- CALDES, G.; PRESCOTT, B.; LING, J.R. "A potent antileukemic substance present in *Globularia alypum*." *Planta Medica* **27**: 72-76, (1975).
- 64.- CALIS, I.; KIRMIZIBEKMEZ, H.; RUEGGER, H.; STRICHER, O. "Phenylethanoid glycosides from *Globularia trichosantha*." *J Nat Prod* **62**: 1165-1168, (1999).
- 65.- CALTAGIRONE, S.; RANELLETTI, F.O.; RINELLI, A.; MAGGIANO, N.; COALSANTE, A.; MUSIANI, P.; AJELLO, F.B.; PIANTELLI, M. "Interaction with tipe II estrogen binding sites and antiproliferative activity of tamoxifen and quercetin in human non-small-cell lung cancer." *Am J Resp Cell Mol Biol* **17**: 51-59, (1997).
- 66.- CAMPBELL, D.R. y KURZER, M.S. "Flavonoid inhibition of aromatase enzyme activity in human preadipocytes." *J Steroid Biochem Mol Biol* **46**: 381-388, (1993).
- 67.- CAÑIGUERAL, S.; VILA, R.; WICHTL, M. *Plantas Medicinales y Drogas Vegetales para infusión y tisana. Manual para Farmacéuticos y Médicos* Milán , OEMF International srl. 400-420, (1998).
- 68.- CAPASSO, A.; DI GIANNUARIO, A.; PIERETTI, S.; NICOLETTI, M. "Platelet aggregation induced by calceolarioside A in vitro: role of platelet intracellular calcium." *Planta Med* **59**: 337-339, (1993a).

- 69.- CAPASSO, A.; PIERETTI, S.; GIANNUARIO, A.D.; NICOLETTI, M. "Pharmacological study of phenylpropanoid glycosides: platelet aggregation and blood pressure studies in rabbits and rats." *Phytother Res* **7**: 81-83, (1993b).
- 70.- CAPRANICO, G.; BINASCHI, M.; BORMEGTTO, M.E.; ZUNINO, F.; PALLUMBO, M. "A protein-mediated mechanism for the DNA sequence-specific action of topoisomerase II poison." *Elsevier Sci.Ltd.* **28**: 323-329, (1997).
- 71.- CARRETERO, E. "Glúcidos (IV): Mucílagos" *Panorama Actual del Medicamento* **23**: 953-957, (1999).
- 72.- CASAGRANDE, F. y DARBON, J.M. "Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1." *Biochem Pharmacol* **61**: 1205-1215, (2001).
- 73.- CASTILLO, M.A. y CASTELLS, R.C. "Initial evaluation of quantitative performance of chromatographic methods using replicates at multiple concentrations." *J Chromatogr A* **921**: 121-133, (2001).
- 74.- CAVIN A.; HOSTETTMAN, K.; DYATMYKO, W.; POTTERAT, O. "Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispus*." *Planta Med.* **64**: 393-396, (1998).
- 75.- CHANDER, R.; KAPOOR, N.K.; DHAWAN, B.N. "Effect of Picroliv on glutathione metabolism in liver and brain of *Mastomys natalensis* infected with *Plasmodium berghei*." *Indian Journal of Experimental Biology* **30**: 711-714, (1992a).
- 76.- CHANDER, R.; KAPOOR, N.K.; DHAWAN, B.N. "Picroliv, Picroside-I and kutkoside from *Picrorhiza kurroa* are scavengers of superoxide anions." *Biochemical Pharmacology* **44**: 180-183, (1992b).
- 77.- CHANDER, R.; KAPOOR, N.K.; DHAWAN, B.N. "Picroliv affects gamma-glutamyl cycle in liver and brain of *Mastomys natalensis* infected with *Plasmodium berghei*." *Indian Journal of Experimental Biology* **32**: 324-327, (1994).
- 78.- CHANG, I.M. "Antiviral activity of aucubin against hepatitis B virus replication." *Phytotherapy Research* **11**: 189-192, (1997).
- 79.- CHANG, I.M. "Liver-protective activities of aucubin derived from traditional oriental medicine." *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* **102**: 189-204, (1998).
- 80.- CHANG, I.M. "Liver-protective activities of aucubin derived from traditional oriental medicine." *Emerging drugs.Molecular aspects of Asian Medicines.* **1**: 109-124, (2001).
- 81.- CHANG, I.M.; RYU, J.C.; PARK, Y.C.; YUN, H.S.; YANG, K.H. "Protective activities of aucubin against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice." *Drug.Chem.Toxicol.* **6**: 443-453, (1983).
- 82.- CHANG, I.M. y YAMAURA, Y. "Aucubin: a new antidote for poisonous *Amanita* mushrooms." *Phytotherapy Research* **7**: 53-56, (1993).
- 83.- CHANG, L.M.; YUN, H.S.; KIM, Y.S.; AHN, J.W. "Aucubin: potential antidote for  $\alpha$ -amanitin poisoning." *J.Toxicol.Clin.Toxicol.* **22**: 77-85, (1984).
- 84.- CHANG, Y.C.; TSENG, T.H.; LEE, M.J.; HSU, J.D.; WANG, C.J. "Induction of apoptosis by penta-acetyl geniposide in rat C6 glioma cells." *Chemico-Biological Interations* **141**: 243-245, (2002).
- 85.- CHEN, J.C.; CHUNG, J.G.; LIN, K.M. "Effects of luteolin on arylamine N-acetyltransferase activity in human liver tumour cells." *Cytobios* **102**: 95-106, (2000).

- 86.- CHEN, J.L.; BLANC, P.; STODDART, C.A.; BOGAN, M.; ROZHON, E.J.; PARKINSON, N.; YE, Z.; COOPER, R.; BALICK, M.; NANAKORN, W.; KERMAN, M.R. "New iridoids from the medicinal plant *Barleria prionitis* with potent activity against respiratory syncytial virus." *J Nat Prod* **61**: 1295-1297, (1998).
- 87.- CHEN, R.C.; SU, J.H.; YANG, S.M.; LI, J.; WANG, T.J.; ZHOU, H. "Effect of isoverbascoside, a phenylpropanoid glycoside antioxidant, on proliferation and differentiation of human gastric cancer cell." *Acta Pharmacol Sin* **23**: 997-1001, (2002).
- 88.- CHEN, Y.C.; SHEN, S.C.; LEE, W.R.; HOU, W.C.; YANG, L.L.; LEE, T.J. "Inhibition of nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide induced inducible NOS and cyclooxygenase-2 gene expressions by rutin, quercetin and quercetin pentaacetate in RAW 264.7 macrophages." *J Cell Biochem* **82**: 537-548, (2001).
- 89.- CHENG, J.; CHEN, Y.R.; SHENG, G.Z.; HOU, L.G. "Quantitative determination of aucubin in asiatic plantain (*Plantago asiatica*) by HPTLC." *Chung Ts'ao Yao* **23**: 459-460, (1992).
- 90.- CHEUNG, H.Y.; LAI, W.P.; CHEUNG, M.S.; LEUNG, F.M.; HOOD, D.J.; FONG, W.F. "Rapid and simultaneous analysis of some bioactive components in *Eucommia ulmoides* by capillary electrophoresis." *Journal of Chromatography A* **989**: 303-310, (2003).
- 91.- CHIANG, L.C.; CHIANG, W.; CHANG, M.Y.; NG, L.T.; LIN, C.C. "Antileukemic activity of selected natural products in Taiwan." *American Journal of Chinese Medicine* **31**: 37-46, (2003b).
- 92.- CHIANG, L.C.; CHIANG, W.; CHANG, M.Y.; NG, L.T.; LIN, C.C. "Antileukemic activity of selected natural products in Taiwan." *Am J Chin Med* **31**: 37-46, (2003a).
- 93.- CHIANG, L.C.; NG, L.T.; CHIANG, W.; CHANG, M.Y.; LIN, C.C. "Immodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species." *Planta Med* **69**: 604, (2003c).
- 94.- CHIANG, L.C.; NG, L.T.; CHIANG, W.; CHANG, M.Y.; LIN, C.C. "Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species." *Planta Med* **69**: 600-604, (2003d).
- 95.- CHOWDHURY, A.R.; SHARMA, S.; MANDAL, S.; GOSWAMI, A.; MUKHOPADHYAY, S.; MAJUMDER, H.K. "Luteolin, an emerging anti-cancer flavonoid, poisons eukaryotic DNA topoisomerase I." *Biochem J* **366**: 653-661, (2002).
- 96.- CHU, S.C.; HSIEH, Y.S.; LIN, J.Y. "Inhibitory effects of flavonoids on Maloney murine leukemia virus reverse transcriptase activity." *J Nat Prod* **55**: 179-183, (1992).
- 97.- CIRCOSTA, C.; OCCHIUTO, F.; RAGUSA, S.; TROVATO, A.; TUMINO, G.; BRIGUGLIO, F.; DE PASQUALE, A. "A drug used in traditional medicine: *Harpagophytum procumbens* D.C. II Cardiovascular activity." *Journal of Ethnopharmacology* **11**: 259-274, (1984).
- 98.- COLBURN, N.H.; FORMER, B.F.; NELSON, K.A.; YUSPA, S.H. "Tumour promoter induces anchorage independence irreversibly." *Nature* **281**: 589-591, (1979).
- 99.- COLIGAN, J.E.; KRUISBECK, A.M.; MARGULIES, D.H.; SHEVACH, E.M.; STROBER, W. *Current protocols in immunology*. Nueva York, Wiley., (1995).
- 100.- COLLINS, S.J. "The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: Proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression." *Blood* **70**: 1233-1244, (1987).

- 
- 101.- COLLINS, S.J.; RUSCETTI, F.W.; GALLAGHER, R.E.; GALLO, R.C. "Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds." *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 2458-2462, (1978).
- 102.- COMPADRE, C.M.; ROBBINS, E.F.; KINGHORN, A.D. "The intensely sweet herb, *Lippia dulcis* Trev.: historical uses, field inquiries, and constituents." *J Ethnopharmacol* **15**: 89-106, (1986).
- 103.- CONSEIL, G.; BAUBICHON-CORTAY, H.; DAYAN, G.; JAULT, J.M.; BARRON, D.; DI PIETRO, A. "Flavonoids: a class of modulators with bifunctional interactions at vicinal ATP-and steroid-binding sites on mouse P-glycoprotein." *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9831-9836, (1998).
- 104.- CONSEJO GENERAL DE COLEGIOS OFICIALES DE FARMACÉUTICOS. Catálogo de Plantas Medicinales 1. 2001. Madrid, Einsa.
- 105.- CONSTANTINO, A.; MEHTA, R.; RUNYAN, C. "Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationship." *J.Nat.Prod.* **58**: 217-225, (1995).
- 106.- COON, N. *Using plants for healing* Nashville: Heartside Press. (1963).
- 107.- COS, P.; CALOMME, M.; SINDAMBIWE, J.-B.; DE BRUYNE, T.; CIMANGA, K.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J.; VANDEN BERGHE, D. "Cytotoxicity and lipid peroxidation-inhibiting activity of flavonoids." *Planta Med* **67**: 515-519, (2001).
- 108.- COZZARELLI, N.R. *Science* **207**: 953-960, (1980).
- 109.- CRONQUIST, A. *An integrated system of classification of flowering plants*. Nueva York , Columbia University Press. (1981).
- 110.- CUENDET, M.; HOSTETTMAN, K.; POTTERAT, O. *Helv.Chim.Acta* **80**: 1144-1152, (1997).
- 111.- DAELS-RAKOTOARISON, D.A.; SEIDEL, V.; GRESSIER, B.; BRUNET, C.; TILLEQUIN, F.; BAILLEUL, F.; LUYCKX, M.; DINE, T.; CAZIN, M.; CAZIN, J.C. "Neurosedative and antioxidant activities of phenylpropanoids from *Ballota nigra*." *Arzneimittelforschung* **50**: 16-23, (2000).
- 112.- DAHLGREN, G. *The last Dahlgrenogram. System of Classification of the Dicotyledons*. Edinburgh , Edinburgh University Press. (1989).
- 113.- DARIAS, V.; BRAVO, L.; BARQUIN, E.; HERRERA, D.M.; FRAILE, C. "Contribution to the ethnopharmacological study of the Canary Islands." *Journal of Ethnopharmacology* **15**: 169-193, (1986).
- 114.- DARIAS, V.; BRAVO, L.; RABANAL, R.; SÁNCHEZ-MATEO, C.; GONZÁLEZ LUIS, R.M.; HERNÁNDEZ PÉREZ, A.M. "New contribution to the ethnopharmacological study of the Canary Islands" *Journal of Ethnopharmacology* **25**: 77-92, (1989).
- 115.- DARROW, K. y BOWERS, M.D. "Phenological and population variation in iridoid glycosides of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae)." *Biochemical Systematics and Ecology* **25**: 1-11, (1997).
- 116.- DAVIS, S.R.; MURKIES, A.L.; WILCOX, G. "Phytoestrogens in clinical practice." *Integr Med* **1**: 27-34, (1998).
- 117.- DE FEO, V.; AMBROSIO, F.; SENATORE, F. "Traditional phytotherapy in Casertaa province, Campania, southern Italy" *Fitoterapia* **63**: 337-348, (1992).

- 118.- DE FEO, V. y SENATORE, F. "Medicinal plants and phytotherapy in the amalfitan coast, Salerno province, Campania, Southern Italy." *Journal of Ethnopharmacology* **39**: 39-51, (1993).
- 119.- DEBRAUWER, L.; MAILLARD, C.; BABADJAMIAN, A.; VIDAL-OLLIVIER, E.; LAGET, M.; SALMONA, G.; AFZAL-RAFFI, Z. "Study in the chemical constituents of *Plantago cynops* L. and antibacterial evaluation of verbascoside." *Pharm Acta Helv* **64**: 183-187, (1989).
- 120.- DECAISNE, J. "Plantaginaceae" In Candolle AP (Ed.) *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis*. Paris, 1, (1852).
- 121.- DEEPAK, M. y HANDA, S.S. "Antiinflammatory activity and chemical composition of extracts of *Verbena officinalis*." *Planta Medica* **66**: 709-713, (2000).
- 122.- DEEPARK, M. y HANDA, S.S. "Antiinflammatory activity and chemical composition of extracts of *Verbena officinalis*." *Phytother Res* **14**: 463-465, (2000).
- 123.- DEGOS, L. "Differentiating agents in the treatment of leukemia." *Leukemia Res* **14**: 717-719, (1990).
- 124.- DEGOS, L.; CASTAIGNE, S.; TILLY, H.; SIGAUZ, F.; DANIEL, M.T. "Treatment of leukemia with low-dose AraC: A study of 160 cases." *Sem Oncol (Suppl 3)* **12**: 196-199, (1985).
- 125.- DEIANA, M.; ROSA, A.; CASU, V.; COTTIGLIA, F.; BONSIGNORE, L.; DESSI, M.A. "Chemical composition and antioxidant activity of extracts from *Daphne gnidium* L." *J Am Oil Chem Soc* **80**: 65-70, (2003).
- 126.- DELUCA, H.F. "The vitamin D story: A collaborative effort of basic science and clinical medicine." *FASEB J* **2**: 224-226, (1988).
- 127.- DEMIDOV, V.A. "Biological antiseptics in certain plants." *Bor'ba Poteryami V Zhivotnovodstve* **200**, (1963).
- 128.- DEPINHO, R.A. "The age of cancer." *Nature* **408**: 248-254, (2000).
- 129.- DESCHNER, E.E.; RUPERTO, J.F.; WONG, G.; NEWMARK, H.L. "Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia." *Carcinogenesis* **12**: 1193-1196, (1991).
- 130.- DESCHNER, E.E.; RUPERTO, J.F.; WONG, G.Y.; NEWMARK, H.L. "The effect of dietary quercetin and rutin on AOM-induced acute colonic epithelial abnormalities in mice fed a high-fat diet." *Nutr Cancer* **20**: 199-204, (1993).
- 131.- DESTA, B. "Ethiopian traditional herbal drugs. Part II: Antimicrobial activity of 63 medicinal plants." *Journal of Ethnopharmacology* **39**: 129-139, (1993).
- 132.- DESTA, B. "Ethiopian traditional herbal drugs. Part I: Studies on the toxicity and therapeutic activity of local taenicidal medications." *Journal of Ethnopharmacology* **45**: 27-33, (1995).
- 133.- DHAWAN, B.N. "Picroliv-a new hepatoprotective agent from an Indian medicinal plant, *Picrorhiza kurroa*." *Medicinal and Chemical Research* **5**: 595-605, (1995).
- 134.- DHAWAN, B.N.; PATNAIK, G.K.; RASTOGI, R.P.; SINGH, K.K.; TANDON J.S. "Screening of indian plants for biological activity. VI." *Indian Journal Experimental Biology* **15**: 208-219, (1977).
- 135.- DIDRY, N.; SEIDEL, V.; DUBREUIL, L.; TILLEQUIN, F.; BAILLEUL, F. "Isolation and antibacterial activity of phenylpropanoid derivatives from *Ballota nigra*." *J Ethnopharmacol* **67**: 197-202, (1999).

- 136.- DIXON, R.A. y PAIVA, N.L. "Stress-induced phenylpropanoid metabolism." *Plant Cell* **7**: 1085-1097, (1995).
- 137.- DJERASSI, C.; NAKANO, T.; JAMES, A.N.; ZALKOW, L.H.; EISENBRAUN, E.J.; SCHOOLERY, J.N. *J.Org.Chem.* **26**: 1192-1206, (1961).
- 138.- DONRBERGER, K. y LICH, H. "Screening for antimicrobial and presumed cancerostatic plant metabolites." *Pharmazie* **37**: 215-221, (1982).
- 139.- DREWA, G.; SCHACHTSCHABEL, D.O.; PALGAN, K.; GRAZANKA, A.; SUJKOWSKA, R. "The influence of rutin on the weight, metastasis and melanin content of B16 melanotic melanoma in C57BL/6 mice." *Neoplasma* **45**: 266-271, (1998).
- 140.- DUCKETT, S. "Plantain leaf for poison ivy." *New England Journal of Medicine* **303**: 583, (1980).
- 141.- DUFF, R.B.; BACON, J.S.D.; MUNDIE, C.M.; FARMER, V.C.; RUSSELL, J.D.; FORRESTER, A.R. "Catalpol and methylcatalpol: naturally occurring glycosides in *Plantago* and *Buddleja* species." *Biochemical Journal* **96**: 1-5, (1965).
- 142.- DUTHIE, S.J. y DOBSON, V.L. "Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attacks in vitro." *Eur J Nutr* **38**: 28-34, (1999).
- 143.- DWIVEDI, Y.; RASTOGI, R.; CHANDER, R.; SHARMA, S.K.; KAPOOR, N.K.; GARG, N.K.; DHAWAN, B.N. "Hepatoprotective activity of Picroliv against carbon tetrachloride-induced liver damage in rats." *Indian Journal of Medicinal Research* **92**: 195-200, (1990).
- 144.- DWIVEDI, Y.; RASTOGI, R.; MEHROTRA, R.; GARG, N.K.; DHAWAN, B.N. "Picroliv protects against aflatoxin B1 acute hepatotoxicity in rats." *Pharmacological Research* **27**: 189-199, (1993).
- 145.- EDENHARDER, R. y GRUNHAGE, D. "Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102." *Mutation Res Genetic toxicology and environmental mutagenesis* **540**: 1-18, (2003).
- 146.- EDENHARDER, R.; VON PETERSDORFF, I.; RAUSCHER, R. "Antimutagenic effects of flavonoids, chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino-3-methylimidazol (4,5-f) quinolina (IQ) and other heterocyclic amine mutagens from cooked food." *Mutat Res* **287**: 261-274, (1993).
- 147.- EDWARDS, J.M. "Antineoplastic activity and cytotoxicity of flavones, isoflavones, and flavanones." *J Nat Prod* **42**: 85-91, (1979).
- 148.- ELANGOVA, V.; SEKAR, N.; GOVINDASAMY, S. "Chemopreventive potential of dietary bioflavonoids against 20-methylcholanthrene-induced tumorigenesis." *Cancer Lett* **87**: 107-113, (1994).
- 149.- ELATTAR, T.M. y VIRJI, A.S. "Modulating effect of resveratrol and quercetin on oral cancer cell growth and proliferation." *Anticancer Drugs* **10**: 187-193, (1999).
- 150.- EMMANUEL, L.E. y PAPAVALION, M. "Investigation of *Plantago coronopus*." *Arch.Pharm.(Weinheim)* **258**: 147, (1920).
- 151.- ENMARK, E. y GUSTAFSSON, J.A. "Oestrogen receptors-an overview." *J Intern Med* **246**: 133-138, (1999).
- 152.- ERNSTER, L.; ESTABROOK, R.W.; HOCHSTEIN, P.; ORRENIUS, S. *Chem Scr* **27**: 1-207, (1987).

- 153.- ERSOZ, T.; ALIPIEVA, K.I.; YALCIN, F.N.; ALBAY, P.; HANDJIEVA, N.; DONMEZ, A.A. "Physocalycoside, a new phenylethanoid glycoside from *Phlomis physocalyx* Hub.-Mor." *Z Naturforsch [c]* **58**: 471-476, (2003).
- 154.- EVENARI, M.; SHANAN, L.; TADMOR, N. *The Neglev. The challenge of a desert* Cambridge , Harvard University Press. -438, (1982).
- 155.- FAVREAU, L.V. y PICKETT, C.B. *J Biol Chem* **268**: 19875-19881, (1993).
- 156.- FEJES, S.Z.; BLAZOVICS, A.; LEMBERKOVICS, E.; PETRI, G.; SZOKE, E.; KERY, A. "Free radical scavenging and membrane protective effects of methanol extracts from *Anthriscus cerefolium* L. (Hoffm.) and *Petroselinum crispum* (Mill.) Nym ex A.W.Hill." *Phytother Res* **14**: 362-365, (2000).
- 157.- FELKLOVA, M. "Antibacterial properties of *Plantago lanceolata* extracts." *Pharm Zh* **97**: 61-65, (1958).
- 158.- FERRANDINA, G.; ALMADORI, G.; MAGGIANO, N.; LANZA, P.; FERLINI, C.; CATTINI, P.; PIANTELLI, M.; SCAMBIA, G.; RANELLETI, F.O. "Growth-inhibitory effect of tamoxifen and quercetin and presence of type II estrogen binding sites in human laryngeal cancer cell lines and primary laryngeal tumors." *Int J Cancer* **77**: 747-754, (1998).
- 159.- FIBACH, E.; AGRANAT, I.; ROCHMILEWITZ, E.A. "Differentiation of human myeloid leukemic cells by phorbol esters: correlation with tumor promotion." *Int J Cancer* **34**: 451-457, (1984).
- 160.- FIDLER, I.J.; SINGH, R.K.; YONEDA, J. "Critical determinants of neoplastic angiogenesis." *Cancer J* **6**: S225-S236, (2000).
- 161.- FISHER, H. y ORTH, H. *Die Chemie des pyrrols*. Leipzig , Akademishce Verlagsgesellschaft. 67, (1934).
- 162.- FISHER, P.B. y GRANT, S. "Effects of interferon on differentiation of normal and tumor cells." *Pharmac Ther* **27**: 143-166, (1985).
- 163.- FIZ, M.P.V.; LANZA, A.M.D.; MATELLANO, L.F. "Polyphenolic compounds from *Plantago lagopus* L." *Z Naturforsch C* **55**: 877-880, (2000).
- 164.- FOLIN, O. y CIOCALTEU, V. *J Biol Chem* **73**: 627, (1927).
- 165.- FOLKMAN, J. "The role of angiogenesis in tumor growth." *Semin Cancer Biol* **3**: 65-71, (1992).
- 166.- FONS, F.; GARGADENNEC, A.; GUEIFFIER, A.; ROUSSEL, J.L.; ANDARY, C. "Effects of cinnamic acid on polyphenol production in *Plantago lanceolata*." *Phytochemistry* **49**: 697-702, (1998a).
- 167.- FONS, F.; GARGADENNEC, A.; GUEIFFIER, A.; ROUSSEL, J.L.; ANDARY, C. "Modification of antioxidant polyphenol compound profile in *Plantago lanceolata* culture" *Riv.Ital.Ezzenze Profumi Piante Offic.Aromi Saponi Cosmet AE* 308-313, (1998b).
- 168.- FONT QUER, P. *Plantas Medicinales. El Dioscórides Renovado* Barcelona , Labor S.A. 719-725, (1976).
- 169.- FONT QUER, P. *Diccionario de Botánica* Barcelona , Editorial Labor S.A. (1993).

- 170.- FOTSIS, T.; PEPPER, M.S.; AKTAS, E.; BREIT, S.; RASKU, S.; ADLERCREUTZ, H.; WAHALA, K.; MONTESANO, R.; SCHWEIGERER, L. "Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis." *Cancer Res* **57**: 2916-2921, (1997).
- 171.- FOTSIS, T.; PEPPER, M.S.; MONTESANO, R.; AKTAS, E.; BREIT, S.; SCHWEIGERER, L.; RASKU, S.; WAHALA, K.; ADLERCREUTZ, H. "Phytoestrogens and inhibition of angiogenesis." *Baillieres Clin Endocrinol Metab* **12**: 649-666, (1998).
- 172.- FRATI-MUNARI, A.C.; FLORES-GARDUNO, M.A.; ARIZA-ANDRACA, R.; ISLAS- ANDRADE, S.; CHAVEZ-NEGRETE, A. "Efecto de diferentes dosis de mucílago de *Plantago psyllium* en la prueba de tolerancia a la glucosa" *Archivos de Investigación Médica (Méx.)* **20**: 147-152, (1989).
- 173.- FUJITA, T.; SEZIK, E.; TABATA, M.; YESILADA, E.; HONDA, G.; TAKEDA, Y.; TAANKA, T.; TAKAISHI, Y. "Traditional medicine in Turkey VII. Folk medicine in middle and west black sea regions." *Economic Botany* **49**: 422, (1998).
- 174.- GADDIPATI, J.P.; MADHAVAN, S.; SIDHU, G.S.; SINGH, A.K.; SETH, P.; MAHESHWARI, R.K. "Picroliv-a natural product protects cells and regulates the gene expression during hypoxia/reoxygenation" *Molecular and Cellular Biochemistry* **194**: 271-281, (1999).
- 175.- GAO, J.J.; IGALASHI, K.; NUKINA, M. "Radical scavenging activity of phenylpropanoid glycosides in *Caryopteris incana*." *Biosci Biotechnol Biochem* **63**: 983-988, (1999).
- 176.- GAO, K.; FAN, B.T.; EL FASSI, N.; ZAKRZEWSKA, K.; JIA, Z.; ZHENG, R.; PANAYE, A.; COUESNON, T.; DOUCET, J.P. "Comparative study of activities between verbascoside and rutin by docking method." *QSAR Comb Sci* **22**: 18-28, (2003).
- 177.- GARCÍA, D.; FERNÁNDEZ, A.; SÁENZ, T.; AHUMADA, C. "Antiinflammatory effects of different extracts and harpagoside isolated from *Scrophularia frutescens* L." *Il Farmaco* **51**: 443-446, (1996).
- 178.- GARCÍA, J.J.; FERNÁNDEZ, N.; DÍEZ, M.J.; SAHAGÚN, A.; GONZÁLEZ, A.; ALONSO, M.L.; PRIETO, C.; CALLE, A.P.; SIERRA, M.J. "Influence of two dietary fibers in the oral bioavailability and other pharmacokinetic parameters of ethinyloestradiol" *Contraception* **62**: 253-257, (2000).
- 179.- GARCÍA, R.; GONZÁLEZ, C.A.; AGUDO, A.; RIBOLI, E. "High intake of specific carotenoids and flavonoids does not reduce the risk of bladder cancer." *Nutr Cancer* **35**: 212-214, (1999).
- 180.- GARCÍA-CLOSAS, R.; AGUDO, A.; GONZÁLEZ, C.A.; RIBOLI, E. "Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of lung cancer in women in Barcelone, Spain." *Nutr Cancer* **32**: 154-158, (1998).
- 181.- GARCÍA-CLOSAS, R.; GONZÁLEZ, C.A.; AGUDO, A.; RIBOLI, E. "Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain." *Cancer Causes Control* **10**: 71-75, (1999).
- 182.- GARCÍA-ORTIZ, J.C.; VENTAS, P.; COSMES, P.; LÓPEZ-ASUNSOLO, A. "An immunoblotting analysis of cross-reactivity between melon, and *Plantago* and grass pollens." *J.Investig.Allergol.Clin.Immunol.* **6**: 378-382, (1996).
- 183.- GINER, R.M.; VILLALBA, M.L.; RECIO, M.C.; MANEZ, S.; CERDA-NICOLAS, M.; RÍOS, J. "Anti-inflammatory glycoterpenoids from *Scrophularia auriculata*." *European Journal of Pharmacology.* **389**: 243-252, (2000).
- 184.- GOLD, E.J.; METTELSMANN, R.H.; ITRI, L.M.; GEE, T.; ARLIN, Z.; KEMPIN, S.; CLAKSON, B.; MOORE, M.A.S. "Phase I clinical trial of 13-*cis*-retinoic acid in myelodysplastic syndromes." *Cancer Treat Rep* **69**: 1399-1407, (1983).

- 185.- GONGORA.L.; GINER, R.M.; MANEZ, S.; RECIO, M.C.; RÍOS, J.L. "Phagnalon rupestre as a source of compounds active on contact hypersensitivity." *Planta Med* **68**: 561-564, (2002).
- 186.- GONZÁLEZ-TEJERO, M.R.; MOLERO-MESA, J.; CASARES-PORCEL, M.; LIROLA, M.J.M. "New contributions to the ethnopharmacology of Spain." *Journal of Ethnopharmacology* **45**: 157-163, (1995).
- 187.- GORENFLOT, R. y BOURDU, R. "Criteres biochimiques et taxonomie experimentale du genere *Plantago*" *Rev.Cytol.Biol.Végétales* **25**: 349-360, (1962).
- 188.- GRACE, S.C. y LOGAN, B.A. "Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway." *Philosophical transactions of the Royal society of London*. **355**: 1499-1500, (2000).
- 189.- GREENWALD, P.; NIXON, D.W.; MALONE, W.F.; KELLOFF, G.J.; STERN, H.R.; WITKIN, K.M. "Concepts in Cancer chemoprevention research." *Cancer* **65**: 1483-1490, (1990).
- 190.- GRELA, E.R. "Influence of herbs mixture in pigs feeding on performance and som lipid parameters in blood and backfat" *Annales Universitatis Mariae Curie Sklodovska.Zootechnica* **18**: 243-250, (2000).
- 191.- GRICE, I.D.; GARHNAM, B.; PIERENS, G.; ROGERS, K.; TINDAL, D.; GRIFFITHS, L.R. "Isolation of two phenylethanoid glycosides from *Eremophila gilesii*." *J Ethnopharmacol* **86**: 123-125, (2003).
- 192.- GUIL-GUERRERO, J.L. "Nutritional composition of *Plantago* species (*P. major* L., *P. lanceolata* L., *P. media* L.)" *Ecology, Food and Nutrition* **40**: 482-495, (2001).
- 193.- GURIB-FAKIM, A.; SWERAJ, M.D.; GUEHO, J.; DULLOO, E. "Medicinal plants of Rodriguez" *International Journal of Pharmacognosy* **34**: 2-14, (1996).
- 194.- GUTTERIDGE, J.M.C. "Free radical damage to lipids, amino acids, carbohydrates and nucleic acids as determined by thiobarbituric acid reactivity." *Int J Biochem* **14**: 649-653, (1982).
- 195.- GUTTERMAN, Y. "Spring and summer daily temperatures 1 mm below the soil surface in three microhabitats in a flat natural loess area in the Neglev Dessert, Israel" *Journal of Arid Environments* **37**: 665-681, (1997).
- 196.- GUTTERMAN, Y.; SHEM-TOV, S.; GOZLAN, S. "The effect of post-maturation temperatures and duration on seed germinability of *Plantago coronopus* occurring in natural populations in the Negev Desert highlands, Israel" *Journal of Arid Environments* **38**: 451-463, (1998).
- 197.- HABS, M.; HABS, H.; BERGER, M.R.; SCHMAHL, D. "Negative dose-response study for carcinogenicity of orally administered rutin sulfate in Sprague-Dawley rats." *Cancer Lett* **23**: 103-108, (1984).
- 198.- HAHN, W.C. "Telomerase activation, cellular immortalization and cancer." *Ann Med* **33**: 123-129, (2001).
- 199.- HAHN, W.C. y WEINBERG, R.A. "Rules for making human tumor cells. Mechanisms of Disease. Review." *N Engl J Med* **347**: 1593-1603, (2002).
- 200.- HALLIER, H. "Über die Abgrenzung und Vervandschaft der einzelnen Sippen bei den Scrophylarineen." *Bulletin Herbar Boissier* **3**: 181-207, (1903).
- 201.- HALLIWELL, B. "How to characterize a biological antioxidant." *Free Rad Res Comms*. **9**: 1-32, (1990).
- 202.- HALLIWELL, B. "Antioxidant characterization: methodology and mechanism." *Biochem Pharmacol* **49**: 1341-1348, (1995).

- 203.- HALLIWELL, B. y GUTTERIDGE, J.M.C. *Role of free radicals and catalytic metal ions in human diseases: an overview*. Nueva York , Academic Press. 1-85, (1990).
- 204.- HAN, D.; TACHIBANA, H.; YAMADA, K. "Inhibition of environmental estrogen-induced proliferation of human breast carcinoma MCF-7 cells by flavonoids." *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **37**: 275-282, (2001a).
- 205.- HAN, D.; TACHIBANA, H.; YAMADA, K. "Inhibition of environmental estrogen-induced proliferation of human breast carcinoma MCF-7 cells by flavonoids." *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **37**: 275-282, (2001b).
- 206.- HAN, D.H.; DENISON, M.S.; TACHIBANA, H.; YAMADA, K. "Relationship between estrogen receptor-binding and estrogenic activities of environmental estrogens and suppression by flavonoids." *Biosci Biotechnol Biochem* **66**: 1479-1487, (2002a).
- 207.- HAN, D.-H.; DENISON, M.S.; TACHIBANA, H.; YAMADA, K. "Relationship between estrogen receptor-binding and estrogenic activities of environmental estrogens and suppression by flavonoids." *Biosci Biotechnol Biochem* **66**: 1479-1487, (2002b).
- 208.- HANAHAN, D. y FOLKMAN, J. "Patterns and emerging mechanism of the angiogenic switch during tumorigenesis." *Cell* **86**: 353-364, (1996).
- 209.- HANAHAN, D. y WEINBERG, R.A. "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**: 57-70, (2000).
- 210.- HANDJIEVA, N.; SAADI, H.; EVSTATIEVA, L. "Iridoid glucosides from *Plantago altissima* L., *Plantago lanceolata* L., *Plantago atrata* Hoppe and *Plantago argentea* Chaix." *Z Naturforsch.C* **46**: 963-965, (1991).
- 211.- HARBORNE, J.B. y WILLIAMS, C.A. "Comparative biochemistry of flavonoids. XIII.6-hidroxiluteolin and scutellarein as phyletic markers in higher plants." *Phytochemistry* **10**: 367-378, (1971).
- 212.- HARBORNE, J.B. y WILLIAMS, C.A. "Advances in flavonoid research since 1992. A review." *Phytochemistry* **55**: 481-504, (2000).
- 213.- HARLEY, C.B.; KIM, N.W.; PROWSE, K.R. "Telomerase, cell immortality, and cancer." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **59**: 307-315, (1994).
- 214.- HARMS, H. y REICHE, K. "Plantaginaceae" In Engler A and Prantl K (Eds.) *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*. Leipzig, Engelmann Publ., (1895).
- 215.- HARPUT, U.S.; SARACOGLU, I.; INOUE, M.; OGIHARA, Y. "Phenylethanoid and iridoid glycosides from *Veronica persica*." *Chem Pharm Bull* **50**: 869-871, (2002).
- 216.- HARRIS, P.E.; RALPH, P.; GABRILOVE, J.; WELTE, K.; KARMALI, R.; MOORE, M.A.S. "Distinct differentiation-inducing activities of  $\gamma$ -interferon and cytokine factors acting on the human promyelocytic leukemia cell line HL-60." *Cancer Res* **45**: 3090-3095, (1985).
- 217.- HATTORI, T.; FUJITSUKA, N.; SHINDO, S. "Effects of acteoside on mesangial proliferation in rat anti-Thy 1 nephritis." *Nippon Jinzo Gakkai Shi* **38**: 202-212, (1996).
- 218.- HAVSTEEN, B.H. "The biochemistry and medical significance of the flavonoids." *Pharmacol Terap* **96**: 67-202, (2002).
- 219.- HAYASHI, K.; NAGAMATSU, T.; ITO, M.; YAGITA, H.; SUZUKI, Y. "Acteoside, a component of *Stachys sieboldii* MIQ, may be a promising antinephritic agent (3): effect of acteoside on expression of

- intercellular adhesion molecule-1 in experimental nephritic glomeruli in rats and cultured endothelial cells." *Jpn J Pharmacol* **70**: 157-168, (1996).
- 220.- HAZANAGY, A. "Recent results with plantaginins folium (plantain leaves)." *Herba Hungara* **9**: 57-63, (1970).
- 221.- HAZNAGY, A.; TOTH, G.; BULA, E. "Apigenin-7-O-monoglucoside in the herbs *Plantago lanceolata*." *Pharmazie* **31**: 482, (1976).
- 222.- HE, Z.D.; HUANG, Y.; YAO, X.; LAU, C.W.; CHEN, Z.Y. "Purification of phenylethanoids from *Brandisia hancei* and the antiproliferative effects on aortic smooth muscle." *Planta Med* **67**: 520-522, (2001).
- 223.- HE, Z.D.; LAU, K.M.; BUT, P.P.H.; JIANG, R.W.; DONG, H.; MA, S.C.; FUNG, K.P.; YE, W.C.; SUN, H.D. "Antioxidative glycosides from the leaves of *Ligustrum robustum*." *J Nat Prod* **66**: 851-854, (2003).
- 224.- HE, Z.D.; LAU, K.M.; XU, H.X.; LI, P.C.; PUI-HAY BUT, P. "Antioxidant activity of phenylethanoid glycosides from *Brandisia hancei*." *J Ethnopharmacol* **71**: 483-486, (2000).
- 225.- HERBERT, J.M.; MAFFRAND, J.P.; TAOUBI, K.; AUGEREAU, J.M.; FOURASTE, I.; GLEYE, J. "Verbascoside isolated from *Lantana camara*, an inhibitor of protein kinase C." *J Nat Prod* **54**: 1595-1600, (1991).
- 226.- HERTOOG, M.G.; FESKENS, E.J.; HOLLMAN, P.C.; KATAN, M.B.; KROMHOUT, D. "Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen Elderly Study" *Nutr Cancer* **22**: 175-184, (1994).
- 227.- HIRAI, H.; MURAKAMI, T.; URABE, A.; TAKAKU, F. "Increased glucocorticoid receptor concentration in macrophage differentiation of myeloid leukemia cells with 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate." *Cancer Res* **45**: 2456-2461, (1985).
- 228.- HIRONO, I.; UENO, I.; HOSAKA, S.; TAKANASHI, H.; MATSUSHIMA, T.; SUGIMURA, T.; NATORI, S. "Carcinogenicity examination of quercetin and rutin in ACI rats." *Cancer Lett* **13**: 15-21, (1981).
- 229.- HIROSE, M.; TAKAHASHI, S.; OGAWA, K.; FUTAKUCHI, M.; SHIRAI, T. "Phenolics: blocking agents for heterocyclic amine-induced carcinogenesis." *Food Chem Toxicol* **37**: 985-992, (1999a).
- 230.- HIROSE, M.; TAKAHASHI, S.; OGAWA, K.; FUTAKUCHI, M.; SHIRAI, T.; SHIBUTANI, M.; UNEYAMA, C.; TOYODA, K.; IWATA, H. "Chemoprevention of heterocyclic amine-induced carcinogenesis by phenolic compounds in rats." *Cancer Lett* **143**: 173-178, (1999b).
- 231.- HOHMANN, J.; ZUPKO, I.; REDEI, D.; CSANYI, M.; FALKAY, G.; MATHE, I.; JANICSAK, G. "Protective effects of the aerial parts of *Salvia officinalis*, *Melissa officinalis* and *Lavandula angustifolia* and their constituents against enzyme-dependent and enzyme independent lipid peroxidation." *Planta Med* **65**: 576-578, (1999).
- 232.- HOLDSWORTH, D.K. "A preliminary study of medicinal plants of Easter Island, South Pacific." *International Journal of Pharmacognosy* **30**: 27-32, (1992).
- 233.- HOLLAND, M.B. y ROY, D. "Estrone-induced cell proliferation and differentiation in the mammary gland of the female Noble rat." *Carcinogenesis* **16**: 1955-1961, (1995).
- 234.- HOLLMAN, P.C.H. "Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects?" *J Sci Food Agric* **81**: 842-852, (2001).

- 235.- HORIUCHI, T.; FUJIKI, H.; HAKII, H.; SUGANUMA, M.; YAMASHITA, K.; SUGIMURA, T. "Modulation of phorbol ester receptor in mouse skin by application of quercetin." *Jpn J Cancer Res* **77**: 526-531, (1986).
- 236.- HOSE,S.; CARLE, R.; y WERNER, U. Composition for treatment or care of irritated or inflamed skin, containing an extract of dried or fresh plantain (*Plantago lanceolata*) in stick, roller or cream form for skin application. (702,956). 1996. (patente).
- 237.- HOSODA, S.; NAKAMURA, W.; HAYASHI, K. *J Biol Chem* **249**: 6423, (1974).
- 238.- HOSOKAWA, N.; HOSOKAWA, Y.; SAKAI, T.; YOSHIDA, M.; MARUI, N.; NOSHINO, H.; KAWAI, K.; AOIKE, A. "Inhibitory effect of quercetin on the synthesis of a possibly cell-cycle-related 17-kDa protein, in human cancer cells." *Int J Cancer* **45**: 1119-1124, (1990).
- 239.- HOUGHTON, P.J. "The sausage tree (*Kigelia pinnata*): ethnobotany and recent scientific work." *South African Journal of Botany* **68**: 14-20, (2002).
- 240.- HOUGHTON, P.J. y HIKINO, H. "Antihepatotoxic activity of extracts and constituents of *Buddleja* Species." *Planta Medica* **55**: 123-126, (1989).
- 241.- HOUGHTON, P.J. y RAMAN, A. *Laboratory handbook for the fractionation of natural extracts*. Londres, Chapman & Hall. 103-106, (1998).
- 242.- HOWART DELAPORTE, R.; MARTÍNEZ SÁNCHEZ, G.; CUELLAR CUELLAR, A.; GIULIANI, A.; PALAZZO DE MELLO, J.C. "Anti-inflammatory activity and lipid peroxidation inhibition of iridoid lamiide isolated from *Bouchea fluminensis* (Vell.) Mold. (Verbenaceae)." *Journal of Ethnopharmacology* **82**: 127-130, (2002).
- 243.- HSU, H.Y.; YANG, J.J.; LIN, S.Y.; LIN, C.C. "Comparisons of geniposidic acid and geniposide on antitumor and radioprotection after sublethal irradiation." *Cancer Letters* **113**: 31-37, (1997).
- 244.- HUANG, L.L.; SUNG, H.W.; TSAI, C.C.; HUANG, D.M. "Biocompatibility study of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking reagent." *J Biomed Mater Res* **42**: 568-576, (1998).
- 245.- HUANG, M.E.; YE, Y.C.; CHEN, S.R.; CHAI, J.R.; LU, J.X.; ZHAO, L.; GU, L.J.; WANG, Z.Y. "Use of all-*trans* retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia." *Blood* **72**: 567-572, (1988).
- 246.- HUANG, Y.T.; HWANG, J.J.; LEE, P.P.; KE, F.C.; HUANG, J.H.; HUANG, C.J.; KANDASWAMI, C.; MIDDLETON, E.Jr.; LEE, M.T. "Effects of luteolin and quercetin, inhibitors of tyrosine kinase, on cell growth and metastasis-associated properties in A431 cells overexpressing epidermal growth factor receptor." *J Pharmacol* **128**: 999-1010, (1999).
- 247.- HUNTER, T. "Cooperation between oncogenes." *Cell* **64**: 249-270, (1991).
- 248.- IBRAHIM, R. y BARRON, D. "Phenylpropanoids." *Methods in Plant Biochemistry. Vol.1*. Academic Press. 75-111, (1989).
- 249.- ICH "Harmonized Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: Methodology." *ICH* **4**: (1996).
- 250.- IFFERT, T.; SOLDAN, M.; MOELLER, A.; MASER, E. "Modulation of daunorubicin toxicity by liposomal encapsulation and use of specific inhibitors in vitro." *Toxicology* **144**: 189-195, (2000).

- 251.- IGILE, G.O.; OLESZEK, W.; JURZYSTA, M.; BURDA, S.; FAFUNSO, M.; FASANMADE, A.A. "Flavonoids from *Vernonia amygdalina* and their antioxidant activities." *J Agric Food Chem* **42**: 2445-2448, (1994).
- 252.- IMAWAZA, T.; NISHIKAWA, A.; FURUKAWA, F.; KASAHARA, K.; IKEDAA, T.; TAKAHASHI, M.; HIROSE, M. "Lack of carcinogenicity of gardenia blue colour given chronically in the diet to F344 rats." *Food Chem Toxicol* **38**: 313-318, (2000).
- 253.- INOUE, M.; SAKUMA, Z.; OGIHARA, Y.; SARACOGLU, I. "Induction of apoptotic cell death in HL-60 cells by acteoside, a phenylpropanoid glycoside." *Biol Pharm Bull* **21**: 81-83, (1998).
- 254.- INOUE, H. "Iridoids" In Charlwood BV and Banthorpe DV (Eds.) *Terpenoids*. Londres, Academic Press Limited. 99-143, (1991).
- 255.- ISHIGURO, K.; SCHWARTZ, E.L.; SARTORELLI, A.C. "Characterization of the metabolic forms of 6-thioguanine responsible for cytotoxicity and induction of differentiation of HL-60 acute promyelocytic leukemia cells." *J Cell Physiol* **121**: 383-390, (1984).
- 256.- ISHIGURO, K.; YAMAKI, M.; TAKAYI, S.; IKEDA, Y.; KAWAKANI, K.; ITO, K.; NOSE, T. "Studies on iridoid-related compounds, II. The structure and antimicrobial activity of aglucones of galioside and gardenoside." *Journal of Natural Products* **46**: 532-536, (1983).
- 257.- ISHII, R.; YOSHIKAWA, K.; MINAKATA, H.; KOMURA, H.; KADA, T. "Specificities of bio-antimutagens in plant kingdom." *Agr Biol Chem* **48**: 2587-2591, (1984).
- 258.- ISMAILOGLU, U.B.; SARACOGLU, I.; HARPUR, U.S.; SAHIN-ERDEMLI, I. "Effects of phenylpropanoid and iridoid glycosides on free radical-induced impairment of endothelium-dependence relaxation in rat aortic rings." *J Ethnopharmacol* **79**: 193-197, (2002).
- 259.- IWASHITA, K.; KOBORI, M.; YAMAKI, K.; TSUSHIDA, T. "Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B6 melanoma 4A5 cells." *Biosci Biotechnol Biochem* **64**: 1813-1820, (2000).
- 260.- JACKS, T. y WEINBERG, R.A. "Cell-cycle control and its watchman." *Nature* **381**: 643-644, (1996).
- 261.- JAEN J. *Hierbas Medicinales de Canarias* Gran Canaria , Caja de Canarias. 70-71, (1993).
- 262.- JAÉN, J. *Manual de Medicina Popular Canaria* Tenerife , Centro de la Cultura Popular Canaria. 17, (1992).
- 263.- JAEN, J. *Hierbas Medicinales de Canarias* Gran Canaria , Caja de Canarias. 70-71, (1993).
- 264.- JAISWAL, A.K. *J Biol Chem* **269**: 14502-14508, (1994).
- 265.- JENSEN, S.R. "Plant iridoids, their biosynthesis and distribution in angiosperms." In Harborne JB and Tomás-Barberán FA (Eds.) *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids*. Oxford, Clarendon Press. 133-158, (1991).
- 266.- JENSEN, S.R. "Systematic implications of the distribution of iridoids and other chemical compounds in the Loganiaceae and other families of the Asteridae." *Annals of Missouri Botanical Garden* **79**: 284-302, (1992).
- 267.- JENSEN, S.R.; FRANZYK, H.; WALLANDER, E. "Chemotaxonomy of the Oleaceae: iridoids as taxonomic markers. Review." *Phytochemistry* **60**: 213-231, (2002).

- 268.- JEONG, H.J.; KOO, H.N.; NA, H.J.; KIM, M.S.; HONG, S.H.; EOM, J.W.; KIM, K.S.; SHIN, T.Y.; KIM, H.M. "Inhibition of TNF- $\alpha$  and IL-6 production by aucubin through blockade of NF- $\kappa$ B activation in RBL-2H3 mast cells." *Cytokine* **18**: 252-259, (2002).
- 269.- JOLAD, S.D.; HOFFMANN, J.J.; WIEDHOPF, R.M.; COLE, J.R.; BATES, R.B.; KRIEK, G. *Tetrahedron Lett.* **46**: 4119, (1976).
- 270.- JONSSON, S. *Blomsterboken. Markens Urter, Lyng og Traer.* Oslo , Teknologisk Forlag. (1983).
- 271.- JOSE, J.K.; JOY, K.L.; KUTTAN, R. "Effect of *Embllica officinalis*, *Phyllanthus amarus* and *Picrorhiza kurroa* on N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis." *Cancer Letters* **136**: 11-16, (1999).
- 272.- JULKUNEN-TIITTO, R. "Phenolic constituents in the leaves of Northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics." *J Agric Food Chem* **33**: 213-217, (1985).
- 273.- KALANTARI, H. "Application of some of Iranian medicinal plants in the treatment of liver injury" *Saudi Medicinal Journal* **19**: 209-210, (1998).
- 274.- KAMEI, H.; KOJIMA, T.; KOIDE, T.; HASEGAWA, M.; UMEDA, T.; TERABA, K.; HASHIMOTO, Y. "Influence of OH group and sugar bonded to flavonoids on flavonoid-mediated suppression of tumor growth in vitro." *Cancer Biother Radio* **11**: 247-249, (1996).
- 275.- KANDASWAMI, C.; PERKINS, E.; DRZEWIECKI, G.; SOLONIUK, D.S.; MIDDLETON, E. "Differential inhibition of proliferation on human squamous cell carcinoma, gliosarcoma and embryonic fibroblast-like lung cells in culture by plant flavonoids." *Anticancer Drugs* **3**: 525-530, (1992).
- 276.- KANG, D.G.; LEE, Y.S.; KIM, H.J.; LEE, Y.M.; LEE, H.S. "Angiotensin converting enzyme inhibitory phenylpropanoid glycosides from *Clerodendron trichotumum*." *J Ethnopharmacol* **89**: 151-154, (2003).
- 277.- KANG, J.J.; WANG, H.W.; LIU, T.Y.; CHEN, Y.C.; UENG, T.H. "Modulation of cytochrome P-450-dependent monooxygenases, glutathione and glutathione S-transferase in rat liver by geniposide from *Gardenia jasminoides*" **35** 965, (1997).
- 278.- KAPADIA, G.J.; SHARMA, S.C.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; UEDA, S. "Inhibitory effect of iridoids on Epstein-Barr virus activation by a short-term in vitro assay for antitumor promoters." *Cancer Letters* **102**: 223-226, (1996).
- 279.- KARDOSOVA, A. "Polysaccharides from the leaves of *Plantago lanceolata* L. var *Libor*: An alpha-D-glucan." *Chem.Pap.* **46**: 127-130, (1992).
- 280.- KAWAII, S.; TOMONO, Y.; KATASE, E.; OGAWA, K.; YANO, M. "Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines." *Biosci Biotechnol Biochem* **63**: 896-899, (1999a).
- 281.- KAWAII, S.; TOMONO, Y.; KATASE, E.; OGAWA, K.; YANO, M. "Effect of citrus flavonoids on HL-60 cell differentiation." *Anticancer Res* **19**: 1261-1270, (1999b).
- 282.- KAWASHTY, S.A.; GAMAL-EL-DIN, E.; ABDALLA, M.F.; SALEH, N.A.M. "Flavonoids of *Plantago* species in Egypt" *Biochemical Systematics and Ecology* **22**: 729-733, (1994).
- 283.- KELLOFF, G.J. "Perspectives on cancer chemoprevention research and drug development." *Adv Cancer Res* **199**: (1999).
- 284.- KELLOFF, G.J.; HAWK, E.T.; KARP, J.E.; CROWELL, J.A.; BOONE, C.W.; STEELE, V.E.; LUBET, R.A.; SIGMAN, C.C. "Progress in clinical chemoprevention." *Seminars in Oncol.* **24**: 241-252, (1997).

- 285.- KERNAN, M.R.; AMARQUAYE, A.; CHEN, J.L.; CHAN, J.; SESIN, D.F.; PARKINSON, N.; YE, Z.; BARRETT, M.; BALES, C.; STODDART, C.A.; SLOAN, B.; BLANC, P.; LIMBACH, C.; MRISHO, S.; ROZHON, E.J. "Antiviral phenylpropanoid glycosides from the medicinal plant *Markhamia lutea*." *J Nat Prod* **61**: 564-567, (1998).
- 286.- KIM, D.H.; KIM, B.R.; KIM, J.Y.; JEONG, Y.C. "Mechanism of covalent adduct formation of aucubin to proteins." *Toxicology Letters* **114**: 181-188, (2000).
- 287.- KIM, H.J.; WOO, E.R.; SHIN, C.G.; HWANG, D.J.; PARK, H.; LEE, Y.S. "HIV-integrase inhibitory phenylpropanoid glycosides from *Clerodendron trichotomum*." *Arch Pharm Res* **24**: 286-291, (2001).
- 288.- KIM, H.J.; YU, Y.G.; PARK, H.; LEE, Y.S. "HIV gp41 binding phenolic components from *Fraxinus sieboldiana* var. *angustata*." *Planta Medica* **68**: 1034-1036, (2002).
- 289.- KIM, J.H.; KIM, S.H.; ALFIERI, A.A.; YOUNG, C.W. "Quercetin, an inhibitor of lactate transport and a hyperthermic sensitizer of HeLa cells." *Cancer Res* **44**: 102-106, (1984).
- 290.- KIM, N.W.; PIATYSZEK, M.A.; PROWSE, K.R. "Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer." *Science* **226**: 2011-2015, (1994).
- 291.- KIMURA, Y.; OKUDA, H.; ARICHI, S. "Effects of geniposide isolated from *Gardenia jasminoides* on metabolic alterations in high sugar diet-fed rats." *Chem Pharm Bull* **30**: 4444-4447, (1982).
- 292.- KLINGE, C.M. "Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors." *Steroids* **65**: 227-251, (2000).
- 293.- KLOCKARS, G.K.; BOWERS, M.D.; COONEY, B. "Leaf variation in iridoid glycoside content of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae) and oviposition of the buckeye, *Junonia coenia* (Nymphalidae)." *Chemoecology* **4**: 72-78, (1993).
- 294.- KNOWLES, L.M.; ZIGROSSI, D.A.; TAUBER, R.A.; HIGHTOWER, C.; MILNER, J.A. "Flavonoids suppress androgen-independent human prostate tumor proliferation." *Nutr Cancer* **38**: 116-122, (2000).
- 295.- KO, W.G.; KANG, T.H.; LEE, S.J.; KIM, Y.C.; LEE, B.H. "Effects of luteolin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human myeloid leukaemia cells." *Phytother Res* **16**: 295-298, (2002).
- 296.- KOBAYASHI, T.; NAKATA, T.; KUZUMAKI, T. "Effect of flavonoids on cell cycle progression in prostate cancer cells." *Cancer Lett* **176**: 17-23, (2002).
- 297.- KOEFFLER, H.P.; AMATRUDA, T.; IKEHAWA, N.; KOBAYASHI, Y.; DELUCA, H.F. "Induction of macrophage differentiation of human normal and leukemic myeloid stem cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its fluorinated analogues." *Cancer Res* **44**: 5624-5628, (1984).
- 298.- KOEFFLER, H.P.; YELTON, L.; PROKOCIMER, M.; HIRU, K. "Study of differentiation of fresh myelogenous leukemic cells by compounds that induce a human promyelocytic leukemic line (HL-60) to differentiate." *Leukemia Res* **9**: 73-81, (1985).
- 299.- KOHDA, H.; TANAKA, S.; YAMAOKA, Y.; YAHARA, S.; NOHARA, T.; TANIMOTO, T.; TANAKA, A. "Studies on lens-aldose-reductase inhibitor in medicinal plants. II. Active constituents of *Monochasma savatierii* Franch. et Maxim." *Chem Pharm Bull* **37**: 3153-3154, (1989).
- 300.- KONG, L.D.; WOLFENDER, J.L.; CHENG, C.H.; HOSTETTMANN, K.; TAN, R.X. "Xanthine oxidase inhibitors from *Brandisia hancei*." *Planta Med* **65**: 744-746, (1999).

- 301.- KONG, X.; FANUCCHI, M.P.; CHOU, T. "Antagonistic interactions of bexamethylene bisacetamide in combination with 1- $\beta$ -D-arabinofuranosyl-cytosine, adriamycin and harringtonine on the growth and differentiation of HL-60 cells *in vitro*." *Leukemia Res* **12**: 853-859, (1988).
- 302.- KONOSHIMA, T.; TAKASAKI, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H. "Cancer chemopreventive activity of an iridoid glycoside, 8-acetylharpagide, from *Ajuga decumbens*." *Cancer Letters* **157**: 87-92, (2000).
- 303.- KORDANA, S.; NOWAK, D.; DROZDZYNSKA, M. "Influence of NPK fertilization on the crop and content of aucubin in herb of narrow-leaved plantain (*Plantago lanceolata* L.)" *Herba Polonica* **44**: 183-187, (1998).
- 304.- KREBS, K.G.; HEUSSER, D.; WIMMER, H. "Spray reagents." In Sthal E (Ed.) *Thin-layer chromatography*. Berlin, Springer-Verlag. 854-909, (1969).
- 305.- KRIS-ETHERTON, P.M.; TAILOR, D.S.; SMICIKLAS-WRIGHT, H.; MITCHELL, D.C.; BEKHUIS, T.C.; SLONIM, A.B. "High-soluble fiber foods in conjunction with a telephone-based, personalized behaviour change support service result in favorable changes in lipids and lifestyle after 7 weeks." *Journal of the American Dietetic Association* **4**: 510, (2002).
- 306.- KROCHMAL, A. y KROCHMAL, C. *A guide to medicinal plants of the United States* Nueva York. (1973).
- 307.- KROMOEYER, A. *Arch.Pharmacol.* **160**: 27-39, (1862).
- 308.- KUHLMANN, M.K.; HORSCH, E.; BURKHARDT, G.; WAGNER, M.; KOHLER, H. "Reduction of cisplatin toxicity in cultured renal tubular cells by the bioflavonoid quercetin." *Aarch Toxicol* **72**: 536-540, (1998).
- 309.- KUMAZAWA, N.; OHTO, S.; ISHIZUKA, O.; SAKURAI, N.; KAMOGAWA, A.; SHINODA, M. "Protective effects of various methanol extracts of crude drugs on experimental hepatic injury induced by carbon tetrachloride in rats." *Yakugaku Zasshi* **110**: 950-957, (1990).
- 310.- KUNTZ, S.; WENZEL, U.; DANIEL, S. "Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines." *Eur J Nutr* **38**: 133-142, (1999).
- 311.- KUNVARI, M.; PASKA, C.; LASZLO, M.; ORFI, L.; KOVESDI, I.; EROS, D.; BOKONYI, G.; KERI, G.; GYURJAN, I. "Biological activity and structure of antitumor compounds from *Plantago media* L." *Acta Pharm Hung* **69**: 232-239, (1999).
- 312.- KUO, S.M.; LEAVITT, P.S.; LIN, C.P. "Dietary flavonoids interact with trace metals and affect metallothionein level in human intestinal cells." *Biol Trace Elem Res* **62**: 135-153, (1998).
- 313.- KURIA, K.A.; CHEPKWONY, H.; GOVAERTS, C.; ROETS, E.; BUSSON, R.; DE WITTE, P.; ZUPKO, I.; HOORNAERT, G.; QUIRYNEN, L.; MAES, L.; JANSSENS, L.; HOOGMARTENS, J.; LAEKEMAN, G. "The antiplasmodial activity of isolates from *Ajuga remota*." *Journal of Natural Products* **65**: 789-793, (2002).
- 314.- KWON, C.S.; KIM, J.H.; SON, K.H.; KIM, Y.K.; KIM, W.K.; KIM, J.S. "Induction of cellular quinone reductase by some flavonoids." *Food Sci Biotech* **12**: 649-653, (2003).
- 315.- KYRIAKOPOULOU, I.; MAGIATIS, P.; SKALTSOUNIS, A.L.; ALIGIANNIS, N.; HARVALA, C. "Samioside, a new phenylethanoid glycoside with free-radical scavenging and antimicrobial activities from *Phlomis samia*." *J Nat Prod* **64**: 1095-1097, (2001).

- 316.- LAMA, G.; ANGELUCCI, C.; BRUZZESE, N.; IACOPINO, F.; NORI, S.L.; D'ATRI, S.; TURRIZIANI, M.; BONMASSAR, E.; SICA, G. "Sensitivity of human melanoma cells to oestrogens, tamoxifen and quercetin: is there any relationship with type I and II oestrogen binding site expression?" *Melanoma Res* **8**: 313-322, (1998).
- 317.- LAMAISON, J.L. y CARNAT, A. "Teneur en principaux flavonoïdes des fleurs et des feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq. et de *Crataegus laevigata* (Poiret) D.C. (*Rosaceae*)" *Pharm.Acta Helv.* **65**: 315-320, (1990).
- 318.- LAMSON, D.W. y BRIGNALL, M.S. "Antioxidants and cancer III: Quercetin." *Alt Med Reviews* **5**: 196-208, (2000).
- 319.- LAROCCA, L.M.; PIANTELLI, M.; LEONE, G.; SICA, S.; TEOFILI, L.; PANICI, P.B.; SCAMBIA, G.; MANCUSO, S.; CAPELLI, A.; RANELLETTI, F.O. "Type II oestrogen binding sites in acute lymphoid and myeloid leukaemias: growth inhibitory effect of oestrogen and flavonoids." *Br J Haematol* **75**: 489-495, (1990).
- 320.- LEE, D.H.; CHO, I.G.; PARK, M.S.; KIM, K.N.; CHANG, I.M.; MAR, W.C. "Studies on the possible mechanism of protective activity against  $\alpha$ -amanitina poisoning by aucubin." *Archives of Pharmacal Research* **24**: 55-63, (2001).
- 321.- LEE, E.J.; KIM, S.R.; KIM, J.; KIM, Y.C. "Hepatoprotective phenylpropanoids from *scrophularia buergeriana* roots against CCl<sub>4</sub>-induced toxicity: action mechanism and structure-activity relationship." *Planta Med* **68**: 407-411, (2002a).
- 322.- LEE, L.T.; HUANG, Y.T.; HWANG, J.J.; LEE, P.P.; KE, F.C.; NAIR, M.P.; KANADASWAM, C.; LEE, M.T. "Blockade of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity by quercetin and luteolin leads to growth inhibition and apoptosis of pancreatic tumor cells." *Anticancer Res* **22**: 1615-1627, (2002b).
- 323.- LEE, M.J.; HSU, J.D.; WANG, C.J. "Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate- caused tumor promotion in benzo[ $\alpha$ ]pyrene- initiated CD-1 mouse skin by geniposide." *Anticancer Res* **15**: 411-416, (1995b).
- 324.- LEE, S.K.; SONG, L.; MATA-GREENWOOD, E.; KELLOFF, G.J.; STEELE, V.E.; PEZZUTO, J.M. "Modulation of in vitro biomarkers of the carcinogenic process by chemopreventive agents." *Anticancer Res* **19**: 35-44, (1999).
- 325.- LEE, Y.J.; CHANG, E.J.; KIM, H.J.; PARK, J.H.; CHOI, S.W. "Antioxidative flavonoids from leaves of *Carthamus tinctorius*." *Arch Pharm Res* **25**: 313-319, (2002c).
- 326.- LEE-HUANG, S.; ZHANG, L.; LIN HUANG, P.; CHANG, Y.T.; HUANG, P.L. "Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment." *Biochem Biophys Res Commun* **307**: 1029-1037, (2003).
- 327.- LEPORATTI, M.L. y PAVESI, A. "New or uncommon uses of several medicinal plants in some areas of central Italy." *Journal of Ethnopharmacology* **29**: 213-223, (1990).
- 328.- LEV, E. y AMAR, Z. "Ethnopharmacological survey of traditional drugs sold in the Kingdom of Jordan" *Journal of Ethnopharmacology* **82**: 131-145, (2002).
- 329.- LEVINE, A.J. "The cellular gatekeeper for growth and division." *Cell* **88**: 323-331, (1997).
- 330.- LI, J.; GE, R.C.; ZHENG, R.L.; LIU, Z.M.; JIA, Z.J. "Antioxidative and chelating activities of phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis striata*." *Zhongguo Yao Li Xue Bao* **18**: 77-80, (1997a).

- 331.- LI, J.; WANG, P.F.; ZHENG, R.; LIU, Z.M.; JIA, Z. "Protection of phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis* against oxidative hemolysis in vitro." *Planta Med* **59**: 315-317, (1993).
- 332.- LI, J.; ZHAO, Y.; WANG, B.; CUI, J. "Phenylethanoid glucosides from flos *Buddlejae*" *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **22**: 613-615, (1997b).
- 333.- LI, J.; ZHENG, Y.; ZHOU, H.; SU, B.; ZHENG, R. "Differentiation of human gastric adenocarcinoma cell line MGc80-3 induced by verbascoside." *Planta Med* **63**: 499-502, (1997c).
- 334.- LI, J.X.; XIN, D.; LI, H.; LU, J.F.; TONG, C.W.; GAO, J.N.; CHAN, K.M. "Effect of verbascoside on decreasing concentration of oxygen free radicals and lipid peroxidation in skeletal muscle." *Zhongguo Yao Li Xue Bao* **20**: 126-130, (1999a).
- 335.- LI, R.; BIANCHET, M.A.; TALALAY, P.; AMZEL, L.M. "The three-dimensional structure of NAD(P)H: quinone reductase, a flavoprotein involved in cancer chemoprevention and chemotherapy: Mechanism of the two-electron reduction." *Proc Natl Acad Sci* **92**: 8850, (1995).
- 336.- LI, W.; ZHENG, R.; JIA, Z.; ZOU, Z.; LIN, N. "Repair effect of phenylpropanoid glycosides on thymine radical anion induced by pulse radiolysis." *Biophysical Chemistry* **67**: 281-286, (1997d).
- 337.- LI, W.; ZHENG, R.; SU, B.; JIA, Z.; LI, H.; JIANG, Y.; YAO, S.; LIN, N. "Repair of dGMP hydroxyl radical adducts by verbascoside via electron transfer: a pulse radiolysis study." *Int J Radiat Biol* **69**: 481-485, (1996).
- 338.- LI, W.; ZOU, Z.; ZHENG, R.; WANG, C.; JIA, Z.; YAO, S.; LIN, N. "Fast repair of thymine-hydroxyl radical adduct by phenylpropanoid glycosides." *Radiat Phys Chem* **49**: 429-432, (1997e).
- 339.- LI, Y.; ISHIBASHI, M.; SATAKE, M.; OSHIMA, Y.; OHIZUMI, Y. "A new iridoid glycoside with nerve growth factor-potentiating activity, gelsemiol 6'-trans-caffeoyl-1 glucoside, from *Verbena littoralis*." *Chem Pharm Bull* **51**: 1103-1105, (2003).
- 340.- LI, Y.C.; HUNG, C.F.; YEH, F.T.; LIN, J.P.; CHUNG, J.G. "Luteolin-inhibited arylamine N-acetyltransferase activity and DNA-2-aminofluorene adduct in human and mouse leukemia cells." *Food Chem Toxicol* **39**: 641-647, (2001).
- 341.- LI, Y.M.; HAN, Z.H.; JIANG, S.H.; JIANG, Y.; YAO, S.D.; ZHU, D.Y. "Fast repairing of oxidized OH radical adducts of dAMP and dGMP by phenylpropanoid glycosides from *Scrophularia ningpoensis* Hermsl." *Acta Pharmacol Sin* **21**: 1125-1128, (2000a).
- 342.- LI, Y.M.; KAMO, S.; METORI, K.; KOIKE, K.; CHE, Q.M.; TAKAHASHI, S. "The promoting effect of eucommiol from *Eucommiae* Cortex on collagen synthesis." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **23**: 54-59, (2000b).
- 343.- LI, Y.M.; METORI, K.; KOIKE, K.; CHE, Q.M.; TAKAHASHI, M. "Improvement in the turnover rate of the stratum corneum in flase aged model rats by the administration of geniposic acid in *Eucommia ulmoides* Oliver leaf." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **22**: 582-585, (1999b).
- 344.- LI, Y.M.; SATO, T.; METORI, K.; KOIKE, K.; CHE, Q.M.; TAKAHASHI, S. "The promoting effects of geniposidic acid and aucubin in *Eucommia ulmoides* Oliver leaves on collagen synthesis." *Zi* **12**: 1310, (1998).
- 345.- LIAO, F.; ZHENG, R.L.; GAO, J.J.; JIA, Z.J. "Retardation of skeletal muscle fatigue by the two phenylpropanoid glycosides: verbascoside and martynoside from *Oedicularis plicata* maxim." *Phytother Res* **13**: 621-623, (1999a).

- 346.- LIAO, Y.H.; HOUGHTON, P.J.; HOULT, J.R. "Novel and known constituents from *Buddleja* species and their activity against leukocyte eicosanoid generation." *J Nat Prod* **62**: 1241-1245, (1999b).
- 347.- LIAW, J. y CHAO, Y.C. "Effect of in vitro and in vivo aerosolized treatment with geniposide on tracheal permeability in ovalbumin-induced guinea pigs." *European Journal of Pharmacology*. **443**: 115-121, (2001).
- 348.- LICHTI, U. y GOTTESMAN, M.M. *J Cell Physiol* **113**: 433-439, (1982).
- 349.- LIN, J.H.; LIN, Y.T.; HUANG, Y.J.; WEN, K.C.; CHEN, R.M.; UENG, T.H.; LIAO, C.H. "Isolation and cytotoxicity of flavonoids from *Daphnis genkwa* Flos" *J Food Drug Analysis* **9**: 6-11, (2001).
- 350.- LIN, Y.L.; HSU, J.D.; CHOU, F.P.; LEE, M.J.; SHIOW, S.J.; WANG, C.J. "Suppressive effect of penta-acetyl geniposide on the development of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase foci-induced by aflatoxin B<sub>1</sub> in rats." *Chemico-Biological Interactions* **128**: 115-126, (2000).
- 351.- LING, S.K.; TANAKA, T.; KOUNO, I. "Effects of iridoids on lipoxygenase and hyaluronidase activities and their activation by beta-glucosidase in the presence of amino acids." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **26**: 352-356, (2003).
- 352.- LIU, L.F.; ROWE, T.C.; YANG, L.; TEWEY, K.M.; CHEN, C.L. *J Biol Chem* **258**: 15365-15370, (1983).
- 353.- LIU, M.J.; LI, J.X.; GUO, H.Z.; LEE, K.M.; QIN, L.; CHAN, K.M. "The effects of verbascoside on plasma lipid peroxidation level and erythrocyte membrane fluidity during immobilization in rabbits: a time course study." *Life Sci* **73**: 883-892, (2003).
- 354.- LOKAR, L.C. y POLDINI, L. "Herbal remedies in the traditional medicine of the Venezia Giulia region. (North East Italy)." *Journal of Ethnopharmacology* **22**: 231-239, (1988).
- 355.- LONG, C.; MOULIS, C.; STANISLAS, E.; FOURASTÉ, I. "L'aucuboside et le catalpol dans les feullies de *Plantago lanceolata* L., *Plantago major* L., et *Plantago media* L." *Journal de Pharmacie de Belgique* **50**: 484-488, (1995).
- 356.- LÓPEZ-LÁZARO, M. "Flavonoids as anticancer agents: Structure-activity relationship study." *Curr Med Chem.-Anti-Cancer Agents* **2**: 691-714, (2002).
- 357.- LÓPEZ-LÁZARO, M.; GÁLVEZ, M.; MARTÍN-CORDERO, C.; AYUSO, M.J. "Cytotoxicity of flavonoids on cancer cell lines. Structure-Activity relationship." In Atta Ur Rahman (Ed.) *Natural Products Chemistry. Bioactive Natural Products. Part H*. Elsevier. 891-932, (2002).
- 358.- LÓPEZ-VÉLEZ, M.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, F.; DEL VALLE-RIVES, C. "The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine." *Crit Rev Food Sci Nutr* **43**: 233-244, (2003).
- 359.- LOWE, S.W. "Activation of p53 by oncogenes." *Endocr Relat Cancer* **6**: 45-48, (1999).
- 360.- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. "Protein measurement with the folin phenol reagent." *J Biol Chem* **193**: 265-275, (1951).
- 361.- LU, J.C.; FENG, X.Z.; SUN, Q.S.; LU, H.W.; MANABE, M.; SUGAHARA, K.; MA, D.S.; SAGARA, Y.; KODAMA, H. "Effect of six flavonoid compounds from *Ixeris sonchifolia* on stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation in human neutrophils." *Clin Chim Acta* **316**: 95-99, (2003).

- 362.- MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. *The systematic identification of flavonoids*. Nueva York, Springer-Verlag. 35-168, (1970).
- 363.- MAHMOUD, N.N.; CAROTHERS, A.M.; GRUNBERGER, D.; BILINSKI, R.T.; CHURCHILL, M.R.; MARTUCCI, C.; NEWMARK, H.L.; BERTAGNOLLI, M.M. "Plant phenolics decrease intestinal tumors in an animal model of familial adenomatous polyposis." *Carcinogenesis* **21**: 921-927, (2000).
- 364.- MAKSYUTINA, N.P. "Hydroxycinnamic acids from *Plantago major* y *Plantago lanceolata*." *Khim.Prir.Soedin* **76**: 824-825, (1971).
- 365.- MALAMAS, M. y MARSELOS, M. "The tradition of medicinal plants in Zagori, Epirus (northwestern Greece)." *Journal of Ethnopharmacology* **37**: 197-203, (1992).
- 366.- MALONNE, H. y ATASSI, G. "DNA topoisomerase targeting drugs: mechanisms of action and perspectives." *Anticancer Drugs* **8**: 811-822, (1997).
- 367.- MANN, J. "Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future." *Nature Rev* **2**: 143-148, (2002).
- 368.- MARAK, H.B.; BIERE, A.; VAN DAMME, J.M.M. "Systemic, genotype-specific induction of two herbivore-deterrent iridoid glycosides in *Plantago lanceolata* L. in response to fungal infection by *Diaporthe adunca* (ob.) Niessel." *Journal of Chemical Ecology* **28**: 2429-2448, (2002a).
- 369.- MARAK, H.B.; BIERE, A.; VAN DAMME, J.M.M. "Two herbivore-deterrent iridoid glycosides reduce the in-vitro growth of a specialist but not of a generalist pathogenic fungus of *Plantago lanceolata* L." *Chemoecology* **12**: 185-192, (2002b).
- 370.- MARCHSAN, M.; PAPER, D.H.; HOSE, S.; FRANZ, G. "Investigation of the antiinflammatory activity of liquid extracts of *Plantago lanceolata* L." *Phytotherapy Research* **12**: 33-34, (1998).
- 371.- MARKAVERICH, B.M. y GREGORY, R.R. "Preliminary assessment of luteolin as an affinity ligand for type II estrogen-binding sites in rat uterine nuclear extracts." *Steroids* **58**: 268-274, (1993).
- 372.- MARKHAM, K.R. "Flavones, flavonols and their glycosides." *Methods in plant biochemistry. Vol 1*. 197-235, (1989).
- 373.- MARKHAM, K.R. y MABRY, T.J. "UV-Vis and proton magnetic resonance spectroscopy of flavonoids." In Harborne JB and Mabry TJ (Eds.) *The Flavonoids*. Londres, Chapman & Hall. 45-78, (1975).
- 374.- MARKHAVERICH, B.M.; ROBERTS, R.R.; ALEJANDRO, M.A.; JOHNSON, G.A.; MIDDLEDITXH, B.S.; CLARK, J.H. "Bioflavonoid interaction with rat uterine type II binding sites and cell growth inhibition." *J Steroid Biochem* **30**: 71-78, (1988).
- 375.- MARTÍN, T.; VILLAESCUSA, L.; GASQUET, M.; DELMAS, F.; BARTOLOMÉ, C.; DÍAZ-LANZA, A.M.; OLLIVIER, E.; BALANSARD, G. "Screening for protozoocidal activity of spanish plants." *Pharmaceutical Biology* **36**: 56-62, (1998).
- 376.- MARTÍN-GUERRERO, P. *Las plantas medicinales de la provincia de Cádiz*. San Fernando, Diputación Provincial de Cádiz. 159, (1983).
- 377.- MARTÍN-NIZARD, F.; SAHPAZ, S.; FURMAN, C.; FRUCHART, J.C.; DURIEZ, P.; BAILLEUL, F. "Natural phenylpropanoids protect endothelial cells against oxidized LDL-induction cytotoxicity." *Planta Med* **69**: 207-211, (2003).

- 378.- MARTINEZ, C.; YANEZ, J.; VICENTE, V.; ALCARAZ, M.; BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J.; DÍAZ-LOZANO, J.A. "Effects of several polyhydroxylated flavonoids on the growth of B16F10 melanome, Melan-a melanocyte cell lines: influence of the sequential oxidation state of the flavonoid skeleton." *Melanoma Res* **13**: 3-9, (2003).
- 379.- MASAKI, H.; SAKAKI, S.; ATSUMI, T.; SAKURAI, H. "Active-oxygen scavenging activity of plant extracts." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **18**: 162-166, (1995).
- 380.- MASCOLO, N.; AUTORE, G.; CAPASSO, F.; MENGHINI, A.; FASULO, M.P. "Biological screening of italian medicinal plants for anti-inflammatory activity." *Phytotherapy Research* **1**: 28-31, (1987).
- 381.- MATSUKAWA, Y.; MARUI, N.; SAKAI, T.; SATOMI, Y.; YOSHIDA, M.; MATSUMOTO, K.; NISHINO, H.; AOIKE, A. "Genistein arrests cell cycle progression at G2-M." *Cancer Res* **53**: 1328-1331, (1993).
- 382.- MAY, G. y WILLUHN, G. "Antiviral activity of aqueous extracts from medicinal plants in tissue cultures." *Arzneim-Forsch* **28**: 1-7, (1978).
- 383.- MCCLOUD, E.S. y BERENBAUM, M. "Effects of enhanced UV-B radiation on a weedy forb (*Plantago lanceolata*) and its interactions with a generalist and specialist herbivore." *Entomologia Experimentalis et Applicata* **93**: 233-247, (1999).
- 384.- MCCORMICK, F. "Signalling networks that cause cancer." *Trends Cell Biol* **9**: M53-M56, (1999).
- 385.- MEHTA, V. y WHEELER, A.W. "IgE-mediated sensitization to English plantain pollen in seasonal respiratory allergy: identification and partial characterization of its allergenic components" *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.* **96**: 211-217, (1991).
- 386.- MENON, L.G.; KUTTAN, R.; KUTTAN, G. "Inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F10 melanoma cells by polyphenolic compounds." *Cancer Lett* **95**: 221-225, (1995).
- 387.- MENSAH, A.Y.; SAMPSON, J.; HOUGHTON, P.J.; HYLANDS, P.J.; WSTBROOK, J.; DUNN, M.; HUGHES, M.A.; CHERRY, G.W. "Effects of *Buddleja globosa* leaf and its constituents relevant to wound healing." *J Ethnopharmacol* **77**: 219-226, (2001).
- 388.- MERK, H.F. y JUGERT, F.K. "Cutaneous NAD(P)H: quinone reductase: a xenobiotica-metabolizing enzyme with potential cancer and oxidation stress-protecting properties." *Skin Pharmacol* **4**: 95-100, (1991).
- 389.- MIDDLETON, E.Jr.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIS, T.C. "The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer." *Pharmacol Rev.* **52**: 673-751, (2000).
- 390.- MIETHING, H.; HOLZ, W.G.; HANSEL, R. "HPLC determination of aucubin in drugs." *Pharm.Ztg.* **131**: 740-747, (1986).
- 391.- MIKSICEK, R.J. "Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity." *Proc Soc Exp Biol Med* **201**: 44-50, (1995).
- 392.- MILKWSKA-LEYECK, K.; FILIPEK, B.; STRZELECKA, H. "Pharmacological effects of lavandulifolioside from *Leonurus cardiaca*." *J Ethnopharmacol* **80**: 85-90, (2002).
- 393.- MILLER, J.C. y MILLER, J.N. *Statistics for Analytical Chemistry*. Londres , Horwood. (1988).

- 394.- MILLS, S. y BONE, K. *Principles and Practice of Phytotherapy. Modern Herbal Medicine* Londres , Churchill Livingstone. 26-204, (2000).
- 395.- MILLS.S. y BONE, K. *Principles and Practice of Phytotherapy. Modern Herbal Medicine* Londres , Churchill Livingstone. 26-204, (2000).
- 396.- MISRA, R. "Ovule in *Plantago*" *Current Science* **33**: 439, (1964).
- 397.- MITTAL, N.; GUPTA, N.; SAKSENA, S.; GOYAL, N.; ROY, U.; RASTOGI, A.K. "Protective effect of Picroliv from *Picrorhiza kurroa* against *Leishmania donovani* infections in *Mesocricetus auratus*." *Life Science* **63**: 1823-1834, (1998).
- 398.- MIURA, T.; NISHIYAMA, Y.; ICHIMARU, M.; MORIYASU, M.; KATO, A. "Hypoglycemic activity and structure-activity relationship of iridoidal glycosides." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **19**: 160-161, (1996).
- 399.- MIYAGOSHI, M.; AMAGAYA, S.; OGIHARA, R. "Choleretic actions iridoid compounds." *J.Pharmacobio-Dyn.* **11**: 186-190, (1988).
- 400.- MOERMAN, D.E. y FORD, R.I. *Medicinal plantas of Native América. Research Reports in Ethnobotany, contribution 2* Michigan , The Regents of the University of Michigan. 350-353, (1986).
- 401.- MOLGAARD, P. y RAVN, H. "Evolutionary aspects of caffeoyl ester distribution in Dicotyledons." *Phytochemistry* **27**: 2411-2421, (1988).
- 402.- MOLNAR, J.; BELADI, I.; DOMONKOS, K.; FOLDEAK, S.; BODA, K.; VECKENSTEDT, A. "Antitumor activity of flavonoids on NK/Ly ascites tumor cells." *Neoplasma* **28**: 11-18, (1981).
- 403.- MOLNAR, J.; GUNICS, G.; MUCSI, I.; KOLTAI, M.; PETRI, I.; SHOYAMA, Y.; MATSUMOTO, M.; NISHIOKA, I. "Antimicrobial and immunomodulating effects of some phenolic glycosides." *Acta Microbiol Hung* **36**: 425-432, (1989).
- 404.- MONASTYRSKAYA, B.I. y PETROPAVLOVSKAYA, A.A. "Hemostatic and wound-healing effects of plantain." *Farmakol.Toksikol.* **16**: 30-32, (1953).
- 405.- MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. "Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines." *J Nat Cancer Inst* **83**: 757-766, (1991).
- 406.- MOON, S.K.; CHO, G.O.; JUNG, S.Y.; GAL, S.W.; KWON, T.K.; LEE, Y.C.; MADAMANCHI, N.R.; KIM, C.H. "Quercetin exerts multiple inhibitory effects on vascular smooth muscle cells: role of ERK1/2, cell cycle regulation, and matrix metalloproteinasa-9" *Biochem Biophys Res Commun* **301**: 1069-1078, (2003).
- 407.- MOORE, B.D.; ISIDORO, E.; SEEMANN, J.R. "Distribution of 2-carboxyarabinitol among plants." *Phytochemistry* **34**: 703-707, (1993).
- 408.- MOORE, D.M.; WILLIAMS, C.A.; YATES, B. "Studies on bipolar disjunct species II." *Botaniska Notiser* **125**: 261-272, (1972).
- 409.- MORI, A.; NISHINO, C.; ENOKI, N.; TAWATA, S. "Cytotoxicity of plant flavonoids against HeLa cells." *Phytochemistry* **27**: 1017-1020, (1988).

- 410.- MOURIA, M.; GUKOVSKAYA, A.S.; JUNG, Y.; BUECHLER, P.; HINES, O.J.; REBER, H.A.; PANDOL, S.J. "Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome C release and apoptosis." *Int J Cancer* **98**: 761-769, (2002).
- 411.- MUELLER, S.O.; SCHMITT, M.; DEKANT, W.; STOPPER, H.; SCHLATTER, J.; SCHREIER, P.; LUTZ, W.K. "Occurrence of emodin, chrysophanol, and physicon in vegetables herbs and liquors. Genotoxicity and anti-genotoxicity of the anthraquinones and of the whole plants." *Food.Chem.Toxicol.* **37**: 481-491, (1999).
- 412.- MUNARI, A.C.F.; PINTO, W.B.; ANDRACA, C.R.A.; CASARRUBIAS, M. "Lowering glycemix index of food by acarbose and *Plantago psyllium* mucilage." *Archives of Medicinal Research* **29**: 137-141, (1998).
- 413.- MURAI, M.; TAMAYAMA, Y.; NISHIBE, S. "Phenylethanoids in the herb of *Plantago lanceolata* and inhibitory effect on arachidonic acid-induced mouse ear edema." *Planta Med* **61**: 479-480, (1995a).
- 414.- MURAI, M.; TAMAYAMA, Y.; NISHIBE, S. "Phenylethanoids in the herbs of *Plantago lanceolata* and inhibitory effect on arachidonic acid-induced mouse ear edema." *Planta Medica* **61**: 479-480, (1995b).
- 415.- NAGAO, T.; ABE, F.; OKABE, H. "Antiproliferative constituents in plants 7. Leaves of *Clerodendron bungei* and leaves and bark of *C. trichotomum*." *Biol Pharm Bull* **24**: 1338-1341, (2001).
- 416.- NAKAMURA, T.; NAKAZAWA, Y.; ONIZUKA, S.; SATOH, S.; CHIBA, A.; SEKIHASHI, K.; MIURA, A.; YASUGAHIRA, N.; SASAKI, Y.F. "Antimutagenicity of Tochu tea (an aqueous extract of *Eucommia ulmoides* leaves): 1. The clastogen-suppressing effects of Tochu tea in CHO cells and mice." *Mutation Research* **388**: 7-20, (1997).
- 417.- NIEMINEN, M.; SUOMI, J.; VAN-NOUHUYS, S.; SAURI, P.; RIEKKOLA, M.L. "Effect of iridoid glycoside content on oviposition host plant choice and parasitism in a specialist herbivore." *Journal of Chemical Ecology* **29**: 823-844, (2003).
- 418.- NISHIBE, S.; MURAI, M.; TAMAYAMA, Y. "Studies on constituents of plantaginins herba 7 flavonoids from *Plantago asiatica* and *P. histifolia*." *Natural Medicine* **49**: 340-342, (1995).
- 419.- NORO, Y.; HISATA, Y.; OKUDA, K.; KAWAMURA, T.; KASAHARA, Y.; TANAKA, T.; SAKAI, E.; NISHIBE, S.; SASAHARA, M. "Pharmacognostical studies of plantagins herba (VII) on the phenylethanoid contents of *Plantago* spp." *Shoyakugaku Zasshi* **45**: 24-28, (1991).
- 420.- NOVARETTI, R. y LEMORDANT, D. "Plants in the traditional medicine of the Ubaye valley." *Journal of Ethnopharmacology* **30**: 1-34, (1990).
- 421.- O'BRIEN, N.M.; WOODS, J.A.; AHERNE, S.A.; O'CALLAGHAN, Y.C. "Cytotoxicity, genotoxicity and oxidative reactions in cell-culture models: modulatory effects of phytochemicals." *Biochem Soc Trans* **28**: 22-26, (2000).
- 422.- O'PREY, J.; BROWN, J.; FLEMING, J.; HARRISON, P.R. "Effects of dietary flavonoids on major signal transduction pathways in human epithelial cells." *Biochem Pharmacol* **66**: 2075-2088, (2003).
- 423.- OBAYASHI, K.; IWAMOTO, A.; MASAKI, H. "Evaluation of plant extracts on depigmentation effect in cultured B16 melanoma cells." *J SCCJ* **30**: 153-160, (1996).
- 424.- OBOURN, J.D.; KOSZEWSKI, N.J.; NOTIDES, A.C. "Hormone- and DNA-binding mechanisms of the recombinant human estrogen receptor." *Biochemistry* **32**: 6229-6236, (1993).

- 425.- OHNO, T.; INOUE, M.; OGIHARA, Y.; SARACOGLU, I. "Antimetastatic activity of acteoside, a phenylethanoid glycoside." *Biol Pharm Bull* **25**: 666-668, (2002).
- 426.- OKAMOTO, H.; YOSHIDA, D.; MIZUSAKI, S. "Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced induction in Epstein-Barr virus early antigen in Raji cells." *Cancer Lett* **19**: 47-53, (1983).
- 427.- ORTIZ DE URBINA, A.V.; MARTÍN, M.L.; FERNÁNDEZ, B.; SAN ROMÁN, L.; CUBILLO, L. "In vitro antispasmodic activity of peracetylated penstemonoside, aucubin and catalpol." *Planta Medica* **60**: 512-515, (1994).
- 428.- OSBORNE, C.K.; ZHAO, H.; FUQUA, S.A. "Selective estrogen receptor modulators: structure, function, and clinical use." *J Clin Oncol* **18**: 3172-3186, (2000).
- 429.- OSTREM, V.K.; TANAKA, Y.; PRAHL, J.; DELUCA, H.F.; IKEKAWA, N. "24- and 26-Homo-1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: Preferential activity in inducing differentiation of human leukemia cells HL-60 *in vitro*." *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 2610-2614, (1987).
- 430.- OZAKI, A.; KITANO, M.; FURUSAWA, N.; YAMAGUCHI, H.; KURODA, K.; ENDO, G. "Genotoxicity of gardenia yellow and its components." *Food Chem Toxicol* **40**: 1603-1610, (2002).
- 431.- ÖZTÜRK, Y.; BASER, K.H.C.; AYDIN, S. Hepatoprotective plants in Turkey Base KHC. 641, 44-46. 1992. Anadolu University Publ. Proceedings of the 9th Symposium on Plant Drugs.
- 432.- PACHECO, P.; SIERRA, J.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; POTTER, C.W.; JONES, B.M.; MOSHREF, M. "Antiviral activity of Chilean medicinal plant extracts." *Phytotherapy Research* **7**: 415-418, (1993).
- 433.- PAPER, D. *Plantago lanceolata* extracts for angiogenesis inhibition. (01 34,169), 12. 2003. (patente)
- 434.- PARDO, F.; PERICH, F.; TORRES, R.; DELLE MONACHE, F. "Phytotoxic iridoid glucosides from the roots of *Verbascum thapsus*." *Journal of Chemical Ecology* **24**: 645-653, (1998).
- 435.- PARDO, F.; PERICH, F.; VILLARROEL, L.; TORRES, R. "Isolation of verbascoside, an antimicrobial constituent of *Buddleja globosa* leaves." *J Ethnopharmacol* **39**: 221-222, (1993).
- 436.- PARK, H.J.; JUNG, W.T.; BASNET, P.; KADOTA, S.; NAMBA, T. "Syringin 4-O-β-glucoside, a new phenylpropanoid glycoside, and costunolide, a oxidase inhibitor, from the stem bark of *Magnolia sieboldii*." *J Nat Prod* **59**: 1128-1130, (1996).
- 437.- PASCUAL-VILLALOBOS, M.J. y ROBLEDO, A. "Screening for anti-insect activity in Mediterranean plants" *Industrial Crops and Products* **8**: 183-194, (1998).
- 438.- PELECH, S.L. y SANGHERA, M.P. "MAP kinases: Charting the regulatory pathways." *Science* **257**: 1355-1356, (1992).
- 439.- PENG, J.N.; FENG, X.Z.; LI, G.Y.; LIANG, X.T. "Chemical investigations of genus *Hedyotis*. II. Isolation and identification of iridoids from *Hedyotis chrysotricha*." *Yao Xue Xue Bao* **32**: 908-913, (1997).
- 440.- PENNACCHIO, M.; SYAH, Y.M.; ALEXANDER, E.; GHISALBERTI, E.L. "Mechanism of action of verbascoside on the isolated rat heart: increases in level of prostacyclin." *Phyther Res* **13**: 254-255, (1999).
- 441.- PENNACCHIO, M.; SYAH, Y.M.; GHISALBERTI, E.L.; ALEXANDER, E. "Cardioactive compounds from *Eremophila* species." *Journal of Ethnopharmacology* **53**: 21-27, (1996).

- 442.- PETERSON, G.L. *Anal Biochem* **100**: 201-220, (1979).
- 443.- PETTIT, G.R.; HERALD, C.L.; ODE, R.H.; BROWN, P.; GUST, D.J.; MICHEL, C. "Antineoplastic agents. 69. The isolation of loliolide from an indian ocean opisthobranch mollusc." *Journal of Natural Products*. **43**: 752-755, (1980).
- 444.- PETTIT, G.R.; NUMATA, A.; TAKEMURA, T.; ODE, R.H.; NARULA, A.S.; SCHMIDT, J.M.; CRAGG, G.M.; PASE, C.P. "Antineoplastic agents, 107. Isolation of acteoside and isoacteoside from *Castilleja linariaefolia*." *J Nat Prod* **53**: 456-458, (1990).
- 445.- PHARM, H.C.; KOFFI, Y.; PHAM, H.C. "Comparative effect on TXA2 biosynthesis of products extracted from *Lippia multiflora* Moldenke leaves." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **34**: 83-88, (1988).
- 446.- PIERONI, A.; HEIMLER, D.; PIETERS, L.; VAN POEL, B.; VLIETINCK, A.J. "In vitro anti-complementary activity of flavonoids from olive (*Olea europaea* L.) leaves." *Pharmazie* **51**: 765-768, (1996).
- 447.- PIERONI, A.; NEBEL, S.; QUAVE, C.; MÜNZ, H.; HEINRICH, M. "Ethnopharmacology of *liakra*: traditional weedy vegetables of the Arbëreshë of the Vulture area in southern Italy" *Journal of Ethnopharmacology* **81**: 165-185, (2002).
- 448.- PIERONI, A.; PACHALI, P.; HUANG, Y.; VAN POEL, B.; VLIETINCK, A.J. "Studies on anti-complementary activity of extracts and isolated flavones from *Ligustrum vulgare* and *Phillyrea latifolia* leaves (Oleaceae)." *J Ethnopharmacol* **70**: 213-217, (2000).
- 449.- PIERONI, A. y PACHALY, P. "An ethnopharmacological study on common privet (*Ligustrum vulgare*) and phillyrea (*Phillyrea latifolia*)." *Fitoterapia* **71**: S89-S94, (2000).
- 450.- PIERRE, F.; TACHE, S.; PETIT, C.R.; VAN DER MEER, R.; CORPET, D.E. "Meat and cancer: haemoglobin and haemin in low-calcium diet promote colorectal carcinogenesis at the aberrant crypt stage in rats." *Carcinogenesis* **24**: 1683-1690, (2003).
- 451.- PILGER, R. "Plantaginaceae." In Engler A (Ed.) *Das Pflanzenreich IV*. Leipzig., Wilhelm Engelmann., (1937).
- 452.- PIOTRWSKA, H. "Materials for knowledge of the rare and endangered species of Poland. 1. *Plantago coronopus* L." *Fragmenta Floristica et Geobotanica (Cracow)* **33**: 447-454, (1989).
- 453.- PISHA, E. y PEZZUTO, J.M. "Cell-based assay for the determination of estroenic and anti-estroenic activities." *Methods in Cell Sci* **19**: 37-43, (1997a).
- 454.- PLACHCINSKA, J.; MATA CZ, D.; KRZYSZTOFIK, R.; DABROWA, A. "Influence of medicinal heerbs on the immune system I. Induction of endogenous interferon" *Fitoterapia* **55**: 346-348, (1984).
- 455.- POOLE, C.F.; GUNATILLEKA, A.D.; SETHURAMAN, R. "Contributions of theory to method development in solid-phase extraction." *J Chromatogr A* **885**: 17-39, (2000).
- 456.- POPOV, S.S.; MAREKOV, N.L.; EVSTATIEVA, L.N. "Cyclopentanoid monoterpenes from *Plantago* species." *Communications of the Department of Chemistry, Bulgarian Academy of Sciences*. **14**: 175-179, (1981).
- 457.- POPP, R. y SCHIMMER, O. "Induction of sister-chromatid exchanges (SCE), polyploidy, and micronuclei by plant flavonoids in human lymphocyte cultures. A comparative study of 19 flavonoids." *Mutat Res* **246**: 205-213, (1991).

- 458.- POST, J.F. y VARMA, R.S. "Growth inhibitory effects of bioflavonoids and related compounds on human leukemic CEM-C1 and CEM-C7 cells." *Cancer Lett* **67**: 207-213, (1992).
- 459.- PROCHASKA, H.J. *Arch Biochem Biophys* **267**: 529-538, (1988).
- 460.- PROCHASKA, H.J. y SANTAMARIA, A.B. "Direct measurement of NAD(P)H: Quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: A screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers." *Anal Biochem* **169**: 328-336, (1988).
- 461.- PROCHASKA, H.J. y TALALAY, P. "Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver." *Cancer Res* **48**: 4776-4782, (1988).
- 462.- PU, X.; SONG, Z.; LI, Y.; TU, P.; LI, H. "Acteoside from *Cistanche salsa* inhibits apoptosis by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion in cerebellar granule neurons." *Planta Med* **69**: 65-66, (2003).
- 463.- RAHN, K. "Nomenclatorial changes within the genus *Plantago* L. infraespecific taxa and subdivisions of the genus." *Botanisk Tidsskrift* **73**: 106-111, (1978).
- 464.- RAHN, K. "Trichoms within the Plantaginaceae." *Nordic Journal of Botany* **12**: 3-12, (1992).
- 465.- RAHN, K. "A phylogenetic study of the Plantaginaceae" *Botanical Journal of the Linnean Society* **120**: 145-198, (1996).
- 466.- RAJESHKUMAR, N.V. y KUTTAN, R. "Effect of iridoid glycoside Picroliv on the inhibition of hepato-carcinogenesis induced by N-nitrosodiethylamine." *Amala Research Bulletin* **19**: 74-81, (1999).
- 467.- RAJESHKUMAR, N.V. y KUTTAN, R. "Inhibition of N-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis by Picroliv." *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* **19**: 459-465, (2000).
- 468.- RAJESHKUMAR, N.V. y KUTTAN, R. "Protective effect of Picroliv, the active constituent of *Picrorhiza kurroa*, against chemical carcinogenesis in mice." *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis* **21**: 303-313, (2001).
- 469.- RAMANATHAN, R.; DAS, N.P.; TAN, C.H. "Effects of gamma-linolenic acid, flavonoids, and vitamins on cytotoxicity and lipid peroxidation." *Free Radic Biol Med* **16**: 43-48, (1994).
- 470.- RAMIREZ, V.R.; MOSTACERO, L.J.; GARCÍA, A.E.; MEJÍA, C.F.; PELÁEZ, P.F.; MEDINA, C.D.; MIRANDA, C.H. *Vegetales empleados en medicina tradicional norperuana*. Trujillo (Perú), Banco agrario del Perú y Nacl. Univ. Trujillo. 54, (1988).
- 471.- RANELLETTI, F.O.; RICCI, R.; LAROCCA, L.M.; MAGGIANO, N.; CAPELLI, A.; SCAMBIA, G.; BENEDETTI-PANICI, P.; MANCUSO, S.; RUMI, C.; PIANTELLI, M. "Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type-II estrogen-binding sites in human colon cancer cell lines and primary colorectal tumors." *Int J Cancer* **50**: 486-492, (1992).
- 472.- RASTOGI, R.; SAKSENA, S.; GARG, N.K.; DHAWAN, B.N. "Effect of Picroliv on antioxidant system in liver of rats after partial hepatectomy" *Phytotherapy Research* **9**: 364-367, (1995).
- 473.- RASTOGI, R.; SAKSENA, S.; GARG, N.K.; KAPOOR, N.K.; AGAWAL, D.P.; DHAWAN, B.N. "Picroliv protects against alcohol-induced chronic hepatotoxicity in rats." *Planta Medica* **62**: 283-285, (1996).
- 474.- RASTOGI, R.; SRIVASTAVA, A.K.; SRIVASTAVA, M.; RASTOGI, A.K. "Hepatocurative effect of picroliv and silymarin against aflatoxin B1 induced hepatotoxicity in rats." *Planta Medica* **66**: 709-713, (2000).

- 475.- RASZEJA, W. y GILLS, S. "Aucubin content of seeds of the *Plantago* genus." *Rozpr Wydz 3 Nauk Mat-Przyr Gdansk Tow Nauk* **9**: 195-200, (1973).
- 476.- RASZEJAM, W. y GILL, S. "Aucubin content of seeds of the *Plantago* genus." *Rozpr Wydz 3 Nauk Mat-Przyr Gdansk Tow Nauk* **9**: 195-200, (1973).
- 477.- RAVN, H. y BRIMER, L. "Structure and antibacterial activity of plantamajoside, a caffeic acid sugar ester from *Plantago major* subs *major*." *Phytochemistry* **27**: 3433-3437, (1988).
- 478.- RECIO, M.C.; GINER, R.M.; MÁNEZ, S.; RÍOS, J.L. "Structural considerations of the iridoids as anti-inflammatory agents." *60* 234, (1994).
- 479.- REISS, M.; MANIGLIA, C.A.; SARTORELLI, A.C. "Reversible effects of retinoid acid on glycosaminoglycan synthesis during differentiation of HL-60 leukemia cells." *Cancer Res* **45**: 2092-2097, (1985).
- 480.- REZK, M. "Seed structure as a phylogenetic criterion. A case of *Plantago* seed." *Egypt J.Bot.* **23**: 62, (1980).
- 481.- RÍOS, J.L.; RECIO, M.C.; VILLAR, A. "Antimicrobial activity of selected plants employed in the spanish mediterranean area." *Journal of Ethnopharmacology* **21**: 139-152, (1987).
- 482.- RÍOS, J.L.; SIMEÓN, S.; JIMÉNEZ, F.J.; ZAFRA-POLO, M.C.; VILLAR, A. "Reagents for screening medicinal plants by thin-layer chromatography. A review." *Fitoterapia* **LVII**: 153-162, (1986).
- 483.- RITTER, L.; DECKER, R.W.; MALEJKA-GIGANTI, D. "Reduction of nitro and 9-Oxo groups of enviromental nitrofluorenes by the rat mammary gland in vitro." *Chem Rees Toxicol* **13**: 793-800, (2000).
- 484.- RIVERA NÚÑEZ, D. y OBÓN DE CASTRO, C. *La guía de INCAFO de las plantas útiles y venenosas de la Península Ibérica y Baleares (excluidas medicinales)* Madrid, INCAFO, S.A. 897-901, (1991).
- 485.- RIVERA, D. y OBÓN, C. "The ethnopharmacology of Madeira and Porto Santo Islands, a review." *Journal of Ethnopharmacology* **46**: 73-93, (1995).
- 486.- RIZESCU, C.; TIUTIU, F.; POPESCU, V.; LEAHU, A.; y PARASCHIV, V. Healing, antiseptic and anti-inflammatory product for external use. (60,244). 1976. Rumanía.
- 487.- Ref Type: Patent
- 488.- RIZK, A.M.; HEIBA, H.I.; MA'AYERGI, H.A.; BATANOUNY, K.H. "Constituents of plants growing in Qatar" *Fitoterapia* **57**: 3-9, (1986).
- 489.- ROBERTS, D.C.K.T.A.S. y BENCKE, A. "The cholesterol-lowering effect of a breakfast cereal containing psyllium fibre" *Medical Journal of Australia* **161**: 660-664, (1994).
- 490.- RODRÍGUEZ, J.Y.; YANEZ, J.; VICENTE, V.; ALCARAZ, M.; BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J.; LORENTE, J.; LOZANO, J.A. "Effects of several flavonoids on the growth of B16F10 and SK-MEL-1 melanoma cell lines; relationship between structure and activity." *Melanoma Res* **12**: 99-107, (2002).
- 491.- RODRÍGUEZ-MORÁN, M.; GUERRERO-ROMERO, F.; LAZCANO-BURCIAGA, G. "Lipid and glucose lowering efficacy of *Plantago psyllium* in type II diabetes." *Journal of Diabetes Complications* **12**: 273-278, (1998).
- 492.- ROGINSKY, v. "Chain-breaking antioxidant activity of natural polyphenols as determined during the chain oxidation of methyl linoleate in Triton x-100 micelles." *Arch Biochem Biophys* **414**: 261-270, (2003).

- 493.- ROMANOVA, D. y VACHALKOVA, A. "UV spectrometric and DC polarographic studies on apigenin and luteolin." *Arch Pharm Res* **22**: 173-178, (1999).
- 494.- ROMERO, I.; PAEZ, A.; FERRUERO, A.; LUJAN, M.; BERENGER, A. "Polyphenols in red wine inhibit the proliferation and induce apoptosis of LNCaP cells." *BJU Int* **89**: 950-954, (2002).
- 495.- RONSTED, N.; GÖBEL, E.; FRANZYK, H.; JENSEN, S.R.; OLSEN, C.E. "Chemotaxonomy of *Plantago*. Iridoid glucosides and caffeoyl phenylethanoid glycosides." *Phytochemistry* **55**: 337-348, (2000).
- 496.- ROSS, J.A. y KASUM, C.M. "Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety." *Annu Rev Nutr* **22**: 19-24, (2002).
- 497.- RUEFF, J.; LAIRES, A.; BORBA, H.; CHAVECA, T.; GOMES, M.I.; HALPERN, M. "Genetic toxicology of flavonoids: the role of metabolic conditions in the induction of reverse mutation, SOS functions and sister-chromatid exchanges." *Mutagenesis* **1**: 179-183, (1986).
- 498.- RUI-CHUAN, C.; JIN-HUA, S.; GAO-LIANG, O.; KE-XIA, C.; JIN-QUAN, L.; XIAO-GUANG, X. "Induction of differentiation in human hepatocarcinoma cells by isoverbasoside." *Planta Med* **68**: 370-372, (2002).
- 499.- RUIZ, A.R.; DE LA TORRE, R.A.; ALONSO, N.; VILLAESCUSA, A.; BETANCOURT, J.; VIZOSO, A. "Screening of medicinal plants for induction of somatic segregation activity in *Aspergillus nidulans*." *Journal of Ethnopharmacology* **52**: 123-127, (1996).
- 500.- SAAD, S. "Palynological studies in the genus *Plantago* (Plantaginaceae)." *Pollen et Spores* **28**: 60, (1996).
- 501.- SADZUKA, Y.; SUGIYAMA, T.; SHIMOI, K.; KINAE, N.; HIROTA, S. "Protective effect of flavonoids on doxorubicin-induced cardiotoxicity." *Toxicol Lett* **92**: 1-7, (1997).
- 502.- SAHPAZ, S.; GARBACKI, N.; TITS, M.; BAILLEUL, F. "Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare*." *J Ethnopharmacol* **79**: 389-392, (2002).
- 503.- SAKAN, T.; MURAI, F.; ISOE, Y.; HYEON, S.B.; HAYASHI, Y. *Chem Abstr.* **71**: 53479k, (1969).
- 504.- SAKIHAMA, Y.; COHEN, M.F.; GRACE, S.C.; YAMASAKI, H. "Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants." *Toxicology* **177**: 67-80, (2002).
- 505.- SAMPAIO-SANTOS, M.I. y KAPLAN, M.A.C. "Biosynthesis significance of iridoids in chemosystematics." *Journal of the Brazilian Chemical Society* **12**: 144-153, (2001).
- 506.- SANG, S.; HE, K.; LIU, G.; ZHU, N.; CHENG, X.; WANG, M.; ZHENG, Q.; DONG, Z.; GHAI, G.; ROSEN, R.T.; HO, C.T. "A new unusual iridoid with inhibition of activator protein-1 (AP-1) from the leaves of *Morinda citrifolia*." *Org.Lett.* **3**: 1307-1309, (2001).
- 507.- SARACOGLU, I.; CALIS, I.; INOUE, M.; OGIHARA, Y. "Selective cytotoxic and cytostatic activity of some phenylpropanoid glycosides." *Fitoterapia* **68**: 434-438, (1997).
- 508.- SARACOGLU, I.; INOUE, M.; CALIS, I.; OGIHARA, Y. "Studies on constituents with cytotoxic and cytostatic activity of two Turkish medicinal plants *Phlomis armeniaca* and *Scutellaria salviifolia*." *Biol Pharm Bull* **18**: 1396-1400, (1995a).

- 509.- SARACOGLU, I.; INOUE, M.; CALIS, T.; OGIHARA, Y. "Studies on constituents with cytotoxic and cytostatic activity of two Turkish medicinal plants *Phlomis armeniaca* and *Scutellaria salviifolia*." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **18**: 1396-1400, (1995b).
- 510.- SARASWAT, B.; VISEN, P.K.; PATRAIK, G.K.; DHAWAN, B.N. "Ex vivo and in vivo investigations of Picroliv from *Picrorhiza kurroa* in an alcohol intoxication model in rats." *Journal of Ethnopharmacology* **66**: 263-269, (1999).
- 511.- SATH, P.; KUMAN, R.; MADHAVAN, S.; SINGH, A.K.; MANI, H.; BANAUDHA, K.K.; SHARMA, S.C.; KULSHRESHTHA, D.K.; MAHESHWARI, R.K. "Prevention of renal ischemia-reperfusion induced injury in rats by Picroliv." *Biochemical Pharmacology* **59**: 1315-1322, (1999).
- 512.- SAWA, T.; NAKAO, M.; AKAIKE, T.; ONO, K.; MAEDA, H. "Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: implications for the anti-tumor-promoter effect of vegetables." *J Agric Food Chem* **47**: 397-402, (1999).
- 513.- SCAMBIA, G.; RANELLETTI, F.O.; BENEDETTI-PANICI, P.; BONANNO, G.; DE VINCENZO, R.; PIANTELLI, M.; MANCUSO, S. "Synergistic antiproliferative activity of quercetin and cisplatin on ovarian cancer cell growth." *Anticancer Drugs* **1**: 45-48, (1990a).
- 514.- SCAMBIA, G.; RANELLETTI, F.O.; PANICI, P.B.; DE VINCENZO, R.; BONANNO, G.; FERRANDINA, G.; PIANTELLI, M.; BUSSA, S.; RUMI, C.; CIANGRIGLIA, M. "Quercetin potentiates the effect of adriamycin in a multidrug-resistant MCF-7 human breast-cancer cell line: P-glycoprotein as possible target." *Cancer Chemother Pharmacol* **34**: 459-464, (1994).
- 515.- SCAMBIA, G.; RANELLETTI, F.O.; PANICI, P.B.; PIANTELLI, M.; BONANNO, G.; DE VINCENZO, R.; FERRANDINA, G.; RUMI, C.; LAROCCA, L.M.; MANCUSO, S. "Inhibitory effect of quercetin on OVCA-433 cells and presence of type II oestrogen binding sites in primary ovarian tumor and cultured cells." *Br J Cancer* **62**: 942-946, (1990b).
- 516.- SCHAPOVAL, E.E.; VARGAS, M.R.; CHAVES, C.G.; BRIDI, R.; ZUANAZZI, J.A.; HENRIQUES, A.T. "Antiinflammatory and antinociceptive activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*." *J Ethnopharmacol* **60**: 53-59, (1998a).
- 517.- SCHAPOVAL, E.E.S.; WINTER DE VARGAS, M.; CHAVES, C.G.; BRIDI, R.; ZUANAZZI, J.A.; HENRIQUES, A.T. "Antiinflammatory and antinociceptive activities of extracts isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*." *Journal of Ethnopharmacology* **60**: 53-59, (1998b).
- 518.- SCHIMMER, O.; KRUGER, A.; PAULINI, H.; HAEFELE, F. "An evaluation of 55 commercial plant extracts in the ames mutagenicity test." *Pharmazie* **49**: 448-451, (1994).
- 519.- SCHIPPER, R.G. y VERHOFSTAD, A.A.J. "Distribution patterns of ornithine decarboxylase in cells and tissues: facts, problems, and postulates." *J Histochem Cytochem* **50**: 1143-1160, (2002).
- 520.- SCHMIDT, A. "Distribution of APS-sulfotransferase activity among higher plants." *Plant.Sci.Lett.* **5**: 407-415, (1975).
- 521.- SCHUNK, E. *Ann.Chem.* **66**: 174-243, (1848).
- 522.- SCOGIN, R. "The distribution of acteoside among angiosperms." *Biochem Systematics and Ecol* **20**: 477-480, (1992).

- 523.- SEIDEL, V.; VERHOLLE, M.; MALARD, Y.; TILLEQUIN, F.; FRUCHART, J.C.; DURIEZ, P.; BAILLEUL, F.; TEISSIER, E. "Phenylpropanoids from *Ballota nigra* L. inhibit *in vitro* LDL peroxidation." *Phytother Res* **14**: 93-98, (2000).
- 524.- SHAH, V.P.; MIDHA, K.K.; DIGHE, S.; MCGILVERAY, I.J.; SKELLY, J.P.; YACOBI, A.; LAYLOFF, T.; VISWANATHAN, C.T.; COOK, C.E.; MCDOWALL, R.D.; PITTMAN, K.A.; SPECTOR, S. "Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies." *J Pharm Sci* **81**: 309-312, (1992).
- 525.- SHARMA, S.; STUTZMAN, J.D.; KELLOFF, G.J.; STEELE, V.E. "Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis." *Cancer Res* **54**: 5848-5855, (1994).
- 526.- SHENG, G.Q.; ZHANG, J.R.; PU, X.P.; MA, J.; LI, C.L. "Protective effect of verbascoside on 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity in PC12 cells." *Eur J Pharmacol* **451**: 119-124, (2002).
- 527.- SHI, Y.; KANG, J.; LIN, W.; FAN, P.; JIA, Z.; YAO, S.; WANG, W.; ZHENG, R. "Fast repair of deoxynucleotide radical cations by phenylpropanoid glycosides (PPGs) and their analogs." *Biochim Biophys Acta* **1472**: 279-289, (1999a).
- 528.- SHI, Y.; LIN, W.; FAN, B.T.; JIA, Z.; YAO, S.; KANG, J.; WANG, W.; ZHENG, R. "Fast repair of hydroxy radical purine deoxynucleotide adducts by phenylpropanoid glycosides and their derivatives from Chinese herbs." *Biochim Biophys Acta* **1472**: 115-127, (1999b).
- 529.- SHI, Y.; LIN, W.; FAN, P.; JIA, Z.; YAO, S.; KANG, J.; WANG, W.; ZHENG, R. "Fast repair of TMP radical anions by phenylpropanoid glycosides (PPGs) and their analogs." *Rad Phys Chem* **58**: 131-138, (2000a).
- 530.- SHI, Y.; WANG, W.; FAN, B.; JIA, Z.; YAO, S.; ZHENG, R. "Fast repair of dAMP radical anions by phenylpropanoid glycosides and their analogs." *Biochim Biophys Acta* **1474**: 383-389, (2000b).
- 531.- SHIMOI, K.; SAKA, N.; KAJI, K.; NOZAWA, R.; KINAE, N. "Metabolic fate of luteolin and its functional activity at focal site." *Biofactors* **12**: 181-186, (2000).
- 532.- SHIONO, Y.; SHIONO, N.; SEO, S.; OKA, S.; YAMAZAKI, Y. "Effects of polyphenolic anthrone derivatives, resismycin and hypericin, on apoptosis in human megakaryoblastic leukemia CMK-7 cell line." *Z Naturforsch. Sección C* **57**: 923-929, (2002).
- 533.- SILVESTRE, S. "Plantaginaceae" In Valdés B, Talavera S, and Fernández-Galiano E (Eds.) *Flora Vascular de Andalucía Occidental*. Barcelona, Ketres Editora S.A. 475-481, (1987).
- 534.- SINGHAL, R.L.; YEH, Y.A.; PRAJA, N.; OLAH, E.; SLEDGE, G.V.; WEBER, G. "Quercetin down-regulates signal transduction in human breast carcinoma cells." *Biochem Biophys Res Commun* **208**: 425-431, (1995).
- 535.- SINHA, S.; MEHROTRA, J.; BALA, L.; JAISWAL, A.K.; DHAWAN, B.N. "Picroliv, the iridoid glycoside fraction of *Picrorhiza kurroa*, selectively augments human T cell response mycobacterial protein antigens." *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **20**: 579, (1998).
- 536.- SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BOKERSH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M.R. "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening." *J Nat Cancer Inst* **82**: 1107-1112, (1990).
- 537.- SO, F.V.; GUTHRIE, N.; CHAMBERS, A.F.; CARROLL, K.K. "Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess of estrogen." *Cancer Lett* **112**: 127-133, (1997).

- 538.- SPERANDIO, O.; FAN, B.T.; ZAKRZEWSKA, K.; JIA, Z.J.; ZHENG, R.L.; PANAYE, A.; DOUCET, J.P.; EL FASSI, N. "Theoretical study of fast repair of DNA damage by cistanoside C and analogs: mechanism and docking." *SAR QSAR Environ Res* **13**: 243-260, (2002).
- 539.- STEELE, V.E.; KELLOFF, G.J.; WILKINSON, B.P.; ARNOLD, J.T. "Inhibition of transformation in cultured rat tracheal epithelial cells by potential chemopreventive agents." *Cancer Res* **50**: 2068-2074, (1990).
- 540.- STUDZINSKI, G.P.; BHANDAL, A.K.; BRELVI, Z.S. "A system for monocytic differentiation of leukemic cells HL-60 by a short exposure to 1,25-dihydroxycholecalciferol." *Proc Soc Exp Biol Med* **179**: 288-295, (1985).
- 541.- SU, C.C.; CHEN, G.W.; YEH, C.C.; YANG, M.D.; HUNG, C.F.; CHUNG, J.G. "Luteolin induces N-acetylation and DNA adduct of 2-aminofluorene accompanying N-acetyltransferase activity and gene expression in human bladder cancer T24 cell line." *Anticancer Res* **23**: 355-362, (2003).
- 542.- SUDO, H.; KIJIMA, K.; OTSUKA, H.; IDE, T.; HIRATA, E.; TAKEDA, Y.; ISAJI, M.; KURASHINA, Y. "A collagen network formation effector from leaves of *Premna subscandens*." *Chem Pharm Bull* **47**: 1341-1343, (1999).
- 543.- SUH, N.; LUYENGI, L.; FONG, H.H.S.; KINGHORN, D.; PEZZUTO, J.M. "Discovery of natural product chemopreventive agents utilizing HL-60 cell differentiation as a model." *Anticancer Res* **15**: 233-240, (1995).
- 544.- SUNG, H.W.; CHANG, Y.; CHIU, C.T.; CHEN, C.N.; LIANG, H.C. "Crosslinking characteristics and mechanical properties of a bovine pericardium fixed with a naturally occurring crosslinking agent." *J.Biomed.Mater Res.* **47**: 116-126, (1999).
- 545.- SUZUKI, Y.; KONDO, K.; IKEDA, Y.; UMEMURA, K. "Antithrombotic effect of geniposide and genipin in the mouse thrombosis model." *Planta Medica* **67**: 807-810, (2001).
- 546.- TABATA, M.; SEZIK, E.; HONDA, G.; YESILADA, E.; FUKUI, H.; GOTO, K.; IKESHIRO, Y. "Traditional medicine in Turkey III. Folk medicine in east Anatolia, Van and Bitlis provinces." *International Journal of Pharmacognosy* **32**: 3-12, (1994).
- 547.- TAKAHASHI, T.; KOBORI, M.; SHINMOTO, H.; TSUSHIDA, T. "Structure-activity relationships of flavonoids and the induction of granulocytic-or monocytic-differentiation in HL60 human myeloid leukemia cells." *Biosci Biotechnol Biochem* **62**: 2199-2204, (1998).
- 548.- TAKASAKI, M.; KONOSHIMA, T.; KUROKI, S.; TOKUDA, H.; NISHINO, H. "Cancer chemopreventive activity of phenylpropanoid esters of sucrose, vanicoside B and lapathoside A, from *Polygonum lapathifolium*." *Cancer Lett* **173**: 133-138, (2001).
- 549.- TAKASAKI, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; KONOSHIMA, T. "Cancer chemopreventive agents (antitumor-promoters) from *Ajuga decumbens*." *Journal of Natural Products* **62**: 972-975, (1999).
- 550.- TAKEDA, T.; NARUKAWA, Y.; HADA, N. "Studies on the constituents of *Leonotis nepetaefolia*" *Chem Pharm Bull* **47**: 284-286, (1999).
- 551.- TALALAY, P. "The role of enzyme induction in protection against carcinogenesis." In Wattenberg L, Lipkin C, Boone W, and Kelloff GJ (Eds.) *Cancer chemoprevention*. Florida, Boca Raton. CRC Press Inc. 469-478, (1992).
- 552.- TALALAY, P. y BENSON, A.M. "Elevation of quinone reductase activity by anticarcinogenic antioxidants." *Advan Enzyme Regul* **20**: 287-300, (1982).

- 553.- TALALAY, P.; FAHEY, J.W.; HOLTZCLAW, W.D.; PRESTERA, T.; ZHANG, Y. "Chemoprevention against cancer by phase 2 enzyme induction." *Toxicol Lett* **82-83**: 173-179, (1995).
- 554.- TAM, W.Y.; CHEN, Z.Y.; HE, Z.D.; YAO, X.; LAU, C.W.; HUANG, Y. "Enhancement of contraction of rat mesenteric artery by acteoside:role of endothelial nitric oxide." *J Nat Prod* **65**: 990-995, (2002).
- 555.- TAMURA, Y. "Effects of temperature, shade, and nitrogen application on the growth and accumulation of bioactive compounds in cultivars of *Plantago lanceolata* L." *Japanesse Journal of Crop Science* **70**: 548-553, (2001).
- 556.- TAMURA, Y. y NISHIBE, S. "Changes in the concentrations of bioactive compounds in plantain leaves." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 2514-2518, (2002).
- 557.- TANAKA, H.; ABE, E.; MIYAURA, C.; KURIBAYASHI, T.; KONNE, K.; NISHI, Y.; SUDA, T. "1 $\alpha$ ,25-Dihydroxycholecalciferol and a human myeloid leukaemia cell line (HL-60)." *Biochem J* **204**: 713-719, (1982).
- 558.- TANDON, J.S.; SRIVASTAVA, V.; GURU, R.Y. "Iridoids: A new class of leishmanicidal agents from *Nyctanthes arbortristis*." *Journal of Natural Products* **54**: 1102-1104, (1991).
- 559.- TANDON, S.; RASTOGI, R.; SHUKLA, R.; KAPOOR, N.K.; SRIMAL, R.C.; DHAWAN, B.N. "Protective activity of Picroliv from *Picrorhiza kurroa* against myocardial ischemia induced by coronary ligation or isoproter-enol." *Medicinal Science Research* **23**: 515-518, (1995).
- 560.- TAO, L.; KRAMER, P.M.; WANG, W.; YANG, S.; LUBET, R.A.; STEELE, V.E.; PEREIRA, M.A. "Altered expression of c-myc, p16 and p27 in rat colon tumors and its reversal by short-term treatment with chemopreventive agents." *Carcinogenesis* **23**: 1447-1454, (2002).
- 561.- TARLE, D.; PETRICIC, J.; KUPINIC, M. "Antibiotic effect of aucubin, saponins and extract of plantain leaf-herba or folium plantaginins lanceolatae." *Farm Glas.* **37**: 351, (1981).
- 562.- TASKOVA, R.; EVSTATIEVA, L.; HANDKIEVA, N.; POPOV, S. "Iridoid patterns of genus *Plantago* L. and their systematic significance." *Zeitschrift für Naturforschung* **57c**: 42-50, (2002).
- 563.- TASKOVA, R.; MITOVA, M.; MIKHOVA, B.; DUDDECK, H. "Biactive phenolics from *Cartamus lanatus* L." *Z Naturforsch.Sección C* **58**: 704-707, (2003).
- 564.- TEOFILI, L.; PIERELLI, L.; IOVINO, M.S.; LEONE, G.; SCAMBIA, G.; DE VINCENZO, R.; BENEDETTI-PANICI, P.; MENICHELLOI, G.; MAERI, E.; PIANTELLI, M. "The combination of quercetin and cytosine arabinoside synergistically inhibits leukemic cell growth." *Leuk Res* **16**: 497-503, (1992).
- 565.- THORNE, R.F. "Proposed new realignments in the angiosperms." *Nordic Journal of Botany* **3**: 85-117, (1983).
- 566.- TOMÁS-BARBERAN, F.; GRAYER-BARKMAIJER, R.; GIL, M.; HARBORNE, J. "Distribution of 6-hydroxy-, 6-methoxy- and 8-hydroxyflavone glycosides in the Labiatae, the Scrophylariaceae and related families." *Phytochemistry* **27**: 2631-2645, (1988).
- 567.- TOTH, G.; HAZNAGY, A.; BULA, E. "Isolation and NMR-study of loliolid from *Plantago lanceolata* by means of a displacer." *Pharmazie* **31**: 51, (1976).
- 568.- TRIM, A.R. y HILL, R. "The preparation and properties of aucubin, asperuloside and some related glycosides." *Biochem J* **50**: 310-319, (1952b).

- 569.- TRIM, A.R. y HILL, R. "The preparation and properties of aucubin, asperuloside and some related glycosides." *Biochem.J.* **50**: 310-319, (1952a).
- 570.- TSENG, T.H.; CHU, C.Y.; WANG, C.J. "Inhibition of penta-acetyl geniposide on AFB<sub>1</sub>-induced genotoxicity in C3H10T<sub>1/2</sub> cells." *Cancer Letters* **62**: 233-242, (1992).
- 571.- UCHIYAMA, M. y MIHARA, M. "Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test." *Anal Biochem* **86**: 271-278, (1978).
- 572.- UDA, Y.; PRICE, K.R.; WILLIAMSON, G.; RHODES, M.J.C. "Induction of anticarcinogenic marker enzyme, quinone reductase, in murine hepatoma cells in vitro by flavonoids." *Cancer Lett.* **120**: 213-216, (1997).
- 573.- UEDA, S. y IWASHASHI, Y. "Production of anti-tumor-promoting iridoid glucosides in *Genipa americana* and its cell cultures." *Journal of Natural Products* **54**: 1677-1680, (1991).
- 574.- URIBE, M.; DIBILDOX, M.; MALPICA, S.; GUILLERMO E.; VILLALLOBOS, A.; NIETO, L.; VARGAS, F.; GARCÍA-RAMOS, G. "Beneficial effect of vegetable protein diet supplemented with psyllium plantago in patients with hepatic encephalopathy and diabetes mellitus" *Gastroenterology* **88**: 901-907, (1985).
- 575.- VELÁZQUEZ-FIZ, M.P.; DÍAZ-LANZA, A.M.; FERNÁNDEZ-MATELLANO, L. "Iridoids from *Plantago lagopus*." *Pharmaceutical Biology* **38**: 268-270, (2000a).
- 576.- VELÁZQUEZ-FIZ, M.P.; LANZA, A.M.D.; FERNÁNDEZ-MATELLANO, L. *Zeitschrift für Naturforschung* **55c**: 847-850, (2000b).
- 577.- WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E.M. *Plant Drug Analysis. A thin layer chromatography atlas.* Berlin, Springer-Verlag. 299-304, (1984).
- 578.- WANG, C. y KURZER, M.S. "Phytoestrogen concentration determines effects on DNA synthesis in human breast cancer cells." *Nutr Cancer* **28**: 236-247, (1997).
- 579.- WANG, C. y KURZER, M.S. "Effects of phytoestrogens on DNA synthesis in MCF-7 cells in the presence of estradiol or growth factors." *Nutr Cancer* **31**: 90-100, (1998).
- 580.- WANG, C.; MAKELA, T.; HASE, T.; ADLERCREUTZ, H.; KURZER, M.S. "Lignans and flavonoids inhibit aromatase enzyme in human preadipocytes." *J Steroid Biochem Mol Biol* **50**: 205-212, (1994).
- 581.- WANG, C.J.; CHU, C.Y.; TSENG, T.H.; LIN, J.K. "Penta-acetyl geniposide inhibits the growth and development of C-6 glioma cells in rats." *Cancer Letters* **70**: 113-118, (1993).
- 582.- WANG, C.J.; TSENG, T.H.; LIN, J.K. "Penta-acetyl geniposide: isolation, identification and primary effect on C6 glioma cells in vitro." *Anticancer Res* **12**: 911-916, (1992a).
- 583.- WANG, C.J.; WANG, S.W.; LIN, J.K. "Suppressive effect of geniposide on the hepatotoxicity and hepatic DNA binding of aflatoxin B<sub>1</sub> in rats." *Cancer Letters* **60**: 95-102, (1991).
- 584.- WANG, J.C. *Annu Rev Biochem* **54**: 665-697, (1985).
- 585.- WANG, J.C. *Biochim Biophys Acta* **909**: 1-9, (1987).
- 586.- WANG, P.; KANG, J.; ZHENG, R.; YANG, Z.; LU, J.; GAO, J.; JIA, Z. "Scavenging effects of phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis* on superoxide anion and hydroxyl radical by the spin trapping method (95)02255-4." *Biochem Pharmacol* **51**: 687-691, (1996a).

- 587.- WANG, P.; ZHENG, R.; GAO, J.; JIA, Z.; WANG, W.; YAO, S.D.; ZHANG, J.; LIN, N. "Reaction of hydroxyl radical with phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis* species: a pulse radiolysis study." *Sci China C Life Sci* **39**: 154-158, (1996b).
- 588.- WANG, S.; DE GROFF, V.L.; CLINTON, S.K. "Tomato and soy polyphenols reduce insulin-like growth factor-I-stimulated rat prostate cancer cell proliferation and apoptotic resistance in vitro via inhibition of intracellular signaling pathways involving tyrosine kinase." *J Nutr* **133**: 2367-2376, (2003).
- 589.- WANG, S.W.; LAI, C.Y.; WANG, C.J. "Inhibitory effect of geniposide on aflatoxin B1-induced repair synthesis in primary cultured rat hepatocytes." *Cancer Letters* **65**: 133-137, (1992b).
- 590.- WANG, T.J.; YANG, S.M.; HUANG, Z.P.; LI, Q.F.; ZHOU, H.; ZHENG, R.L.; JIA, Z.L. "Induced-differentiation and cytotoxicity of isoverbasoside on HL-60 cells" *Shi Yan Wu Xue Bao* **32**: 321-327, (1999).
- 591.- WARTENBERG, M.; BUDDLE, P.; DE MARCOS, M.; GRUNHECK, F.; TSANG, S.Y.; HUANG, Y.; CHEN, Z.Y.; HESCHELER, J.; SAUER, H. "Inhibition of tumor-induced angiogenesis and matrix-metalloproteinase expression in confrontation cultures of embryoid bodies and tumor spheroids by plant ingredients used in traditional chinese medicine." *Lab Invest* **83**: 87-98, (2003).
- 592.- WASSEL, G.; SAEED, A.; IBRAHIM, N.; EL-ERAQY, W. "Flavonoids of *Nelumbo nucifera* Gaertn and biological evaluation." *Egypt J Pharm Sci* **37**: 585-595, (1996).
- 593.- WATTENBERG, L.W. "Chemoprophylaxis of carcinogenesis: A review." *Cancer Res* **26**: 1520-1526, (1966).
- 594.- WEGENER, T. y KRAFT, K. "Plantain (*Plantago lanceolata* L.): anti-inflammatory action in upper respiratory tract infections" *Wien Med Wochenschr* **149**: 211-216, (1999).
- 595.- WEISSHAAR, B. y JENKINS, G.I. "Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation." *Curr Opin Plant Biol* **1**: 251-257, (1998).
- 596.- WILINGER, G. y DOBLER, S. "Selective sequestration of iridoid glycosides from their host plants in *Longitarsus* flea beetles." *Biochemical Systematics and Ecology* **29**: 335-346, (2001).
- 597.- WILLIAMS, R.T. "Comparative patterns of drug metabolism." *Fed Proc.* **26**: 1029-1039, (1967).
- 598.- WILLIAMSON, G.; PLUMB, G.W.; UDA, Y.; PRICE, K.R.; RHODES, M.J. "Dietary quercetin glycosides: antioxidant activity and induction of the anticarcinogenic phase II marker enzyme quinone reductase in Hepa1c17 cells." *Carcinogenesis* **17**: 2385-2387, (1996).
- 599.- WILLIS, J. *A Dictionary of the Flowering Plants and Ferns* Cambridge, UK, University Press. (1980).
- 600.- WOERDENBAG, H.J.; MERFORT, I.; PABREITER, C.M.; SCHIMDT, T.J.; WILLUHN, G.; UDEN, W.V.; PRAS, N.; KAMPINGA, H.H.; KONINGS, A.W.T. "Cytotoxicity of flavonoids and sesquiterpene lactones from *Arnica* species against the GLC4 and the COLO 320 cell lines." *Planta Med* **60**: 434-437, (1994).
- 601.- WONG, I.Y.; HE, Z.D.; HUANG, Y.; CHEN, Z.Y. "Antioxidative activities of phenylethanoid glycosides from *Ligustrum purpurascens*." *J Agric Food Chem* **49**: 3113-3119, (2001a).
- 602.- WONG, I.Y.; HUANG, Y.; HE, Z.D.; LAU, C.W.; CHEN, Z.Y. "Relaxing effects of *Ligustrum purpurascens* extract and purified acteoside in rat aortic rings." *Planta Med* **67**: 317-321, (2001b).
- 603.- WYSOKINSKA, H. y SKRZYPEK, Z. "Studies on iridoids of tissue cultures of *Penstemon serrulatus*: isolation and their antiproliferative properties." *Journal of Natural Products* **55**: 58-63, (1992).

- 604.- XAGORARI, A.; PAPAPETROPOULOS, A.; MAUROMATIS, A.; ECONOMOU, M.; FOTSIS, T.; ROUSSOS, C. "Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages." *J Pharmacol Exp Ther* **296**: 181-187, (2001).
- 605.- XIONG, Q.; HASE, K.; TEZUKA, Y.; NAMBA, T.; KADOTA, S. "Acteoside inhibits apoptosis in D-galactosamine and lipopolysaccharide-induced liver injury." *Life Sci* **65**: 421-430, (1999).
- 606.- XIONG, Q.; HASE, K.; TEZUKA, Y.; TANI, T.; NAMBA, T.; KADOTA, S. "Hepatoprotective activity of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*." *Planta Med* **64**: 120-125, (1998).
- 607.- XIONG, Q.; KADOTA, S.; TANI, T.; NAMBA, T. "Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*." *Biol Pharm Bull* **19**: 1580-1585, (1996).
- 608.- XIONG, Q.; TEZUKA, Y.; KANEKO, T.; LI, H.; TRAN, L.Q.; HASE, K.; NAMBA, T.; KADOTA, S. "Inhibition of nitric oxide by phenylethanoids in activated macrophages." *Eur J Pharmacol* **400**: 137-144, (2000).
- 609.- YALCIN, F.N.; ERSOZ, T.; AKBAY, P.; CALIS, I.; DONMEZ, A.A.; STICHER, O. "Iridoid and phenylpropanoid glycosides from *Phlomis samia*, *P. monocephala* and *P. carica*." *Turk J Chem* **27**: 295-305, (2003).
- 610.- YAMAHARA, J.; KITANI, T.; KOBAYASHI, H.; KAWAHARA, Y. "Studies on *Stachys sieboldii* MIQ. II. Anti-anoxia action and the active constituents." *Yakugaku Zasshi* **110**: 932-935, (1990).
- 611.- YAMAMOTO, M.; MIYAGOSHI, M.; OHTAKE, N.; AMAGAYA, S.; ISHIGE, A.; SASAKI, H.; KOMATSU, Y.; FUKUDA, K.; ITO, T.; TERASAWA, K. "Genipin, a metabolite derived from the herbal medicine Inchin-ko-to, and suppression of Fas-induced lethal liver apoptosis in mice." *Gastroenterology* **118**: 380-389, (2000).
- 612.- YAMANO, T.; TSUJIMOTO, Y.; NODA, T.; SHIMIZU, M.; OHMORI, M. "Hepatotoxicity of geniposide in rats." *Food Chem Toxicol* **28**: 515-519, (1990).
- 613.- YAMANO, T.; TSUJIMOTO, Y.; NODA, T.; SHIMIZU, M.; OHMORI, M.; MORITA, S.; YAMADA, A. "Hepatotoxicity of gadenia color in rats." *Toxicology Letters* **44**: 177-182, (1988).
- 614.- YAMASHITA, N. y KAWANISHI, S. "Distinct mechanisms of DNA damage in apoptosis induced by quercetin and luteolin." *Free Rad Res* **33**: 623-633, (2000).
- 615.- YAMASHITA, N.; TANEMURA, H.; KAWANISHI, S. "Mechanism of oxidative DNA damage induced by quercetin in the presence of Cu(II)." *Mutat Res* **425**: 107-115, (1999).
- 616.- YAMAUCHI, K.; FUJIMOTO, N.; KUWANO, S.; INOUE, H.; INOUE, K. "The mechanism of purgative action of geniposide, an iridoid glucoside of the fruit *Gardenia* in mice." *Planta Medica* **30**: 39-47, (1976).
- 617.- YAMAURA, Y. y CHANG, I.M. "Protective action against *Amanita* poisoning by iridoid glucoside, aucubin." *Czech.Mycology* **48**: 67-72, (1995).
- 618.- YAMAZAKI, M.; CHIBA, K.; MOHRI, T. "Neuritogenic effect of natural iridoid compounds on PC12h cells and its possible relation to signaling protein kinases." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **19**: 791-795, (1996).
- 619.- YAMAZAKI, M.; HIROTA, K.; CHIBA, K.; MOHRI, T. "Promotion of neuronal differentiation of PC12h cells by natural lignans and iridoids." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **17**: 1604-1608, (1994).

- 620.- YAMAZAKI, M.; SAKURA, N.; CHIBA, K.; MOHRI, T. "Prevention of the neurotoxicity of the amyloid  $\beta$ -protein by genipin." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **24**: 1454-1455, (2001).
- 621.- YANG, C.S.; LANDAU, J.M.; HUANG, M.-T.; NEWMARK, H.L. "Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds." *Annu Rev Nutr* **21**: 381-406, (2001).
- 622.- YANG, C.S.; SMITH, T.J.; HONG, J.Y. "Cytochrome P-450 enzymes as targets for chemoprevention against chemical carcinogenesis and toxicity: opportunities and limitations." *Cancer Res* **54**: 1982s-1986s, (1994).
- 623.- YANG, K.; LAMPRECHT, S.A.; LIU, Y.; SHINOZAKI, H.; LEUNG, D.; NEWMARK, H.; STEELE, V.E.; KELLOFF, G.J.; LIPKIN, M. "Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon." *Carcinogenesis* **21**: 1655-1660, (2000).
- 624.- YANOSHITA, R.; CHANG, H.W.; SON, K.H.; KUDO, I.; SAMEJIMA, Y. "Inhibition of lysoPAF acetyltransferase activity by flavonoids." *Inflamm Res* **45**: 546-549, (1996).
- 625.- YAZICIOGLU, A. y TUZLACI, E. "Folk medicinal plants of Trabzon (Turkey)." *Fitoterapia* **67**: 307-318, (1996).
- 626.- YEE, S.B.; LEE, J.H.; CHUNG, H.Y.; IM, K.S.; BAE, S.J.; CHOI, J.S.; KIM, N.D. "Inhibitory effects of luteolin isolated from *Ixeris sonchifolia* Hance on the proliferation of Hep G2 human hepatocellular carcinoma cells." *Arch Pharm Res* **26**: 151-156, (2003).
- 627.- YESILADA, E.; HONDA, G.; SEZIK, E.; TABATA, M.; FUJITA, T.; TANAKA, T.; TAKEDA, Y.; TAKAISHI, Y. "Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the inner Taurus mountains." *Journal of Ethnopharmacology* **46**: 133-152, (1995).
- 628.- ZAGARI, A. *Medicinal plants*. Tehran (Irán), Tehran University Publications. 969, (1992).
- 629.- ZAND, R.S.; JENKINS, D.J.; DIAMANDIS, E.P. "Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds." *Breast Cancer Res Treat* **62**: 35-49, (2000b).
- 630.- ZAND, R.S.; JENKINS, D.J.; DIAMANDIS, E.P. "Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds." *Breast Cancer Res Treat* **62**: 35-49, (2000a).
- 631.- ZHANG, F.; JIA, Z.; DENG, Z.; WEI, Y.; ZHENG, R.; YU, L. "In vitro modulation of telomerase activity, telomere length and cell cycle in MKN45 cells by verbascoside." *Planta Med* **68**: 115-118, (2002).
- 632.- ZHANG, H.; D'ARPA, P.; LIU, L.F. "A model for tumor cell killing by topoisomerase poisons." *Cancer Cells* **2**: 23-27, (1990).
- 633.- ZHANG, L.; NAKAYA, K.; YOSHIDA, T.; KUROIWA, Y. "Induction of bufalin of differentiation of human leukemia cells HL-60, U937, and ML1 toward macrophage/monocyte-like cells and its potent synergistic effect on the differentiation of human leukemia cells in combination with other inducers." *Cancer Res* **52**: 4634-4641, (1992).
- 634.- ZHENG, R.L.; WANG, P.F.; LI, J.; LIU, Z.M.; JIA, Z.J. "Inhibition of the autoxidation of linoleic acid by phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis* in micelles." *Chem Phys Lipids* **65**: 151-154, (1993).
- 635.- ZHOU, B.N.; BAHLER, B.D.; HOFMANN, G.A.; MATTERN, M.R.; JOHNSON, R.K.; KINGSTON, D.G. "Phenylethanoid glycosides from *Digitalis purpurea* and *Penstemon linarioides* with PKC $\alpha$ -inhibitory activity." *J Nat Prod* **61**: 1410-1412, (1998).

- 636.- ZHOU, Y.C. y ZHENG, R.L. "Phenolic compounds and an analog as superoxide anion scavengers and antioxidants." *Biochem Pharmacol* **42**: 1177-1179, (1991).
- 637.- ZONG, Y.Y. y CHE, C.T. "Glucosides from *Lagotis breviflora*." *Planta Medica* **61**: 585-586, (1995).

