

PERSPECTIVAS DE UTILIZACIÓN DE PLANTAS MEDICINALES TRADICIONALES EN QUIMIOPREVENCIÓN. MATRICARIA CHAMOMILLA Y SUS FENOLES

**Anter J.¹, Romero-Jiménez M.¹, Analla M.², Muñoz-Serrano A.¹
y Alonso-Moraga A.¹**

¹ Departamento de Genética, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba, Spain.

² Département de Biologie, Université Abdelmalek Essaâdi, Faculté de Sciences, B.P.2121, 93002 Tétouan, Morocco.

Correo de contacto: ge1almoa@uco.es

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales representan la mayor fuente de principios activos utilizados para extraer nuevas moléculas utilizados hoy día por las empresas farmacéuticas.

La manzanilla es una planta medicinal muy conocida y utilizada desde antiguo. Es una hierba muy apreciada que crece en terrenos secos y soleados, en márgenes de caminos y sembrados de la mayor parte de Europa. Los principios activos de la manzanilla son los responsables de conferirle numerosas propiedades. Entre ellos se encuentran: aceite esencial, flavonoides, cumarinas... y sales minerales (8-11%). Los extractos de esta planta exhiben muchas actividades: antiinflamatoria, antiséptica, antiinflamatoria, analgésica y cicatrizante.

Los fenoles son metabolitos secundarios de las plantas que tienen una actividad antioxidante que les confiere la capacidad de inactivar varias enzimas. Los fenoles actúan también inhibiendo los radicales libres, la iniciación, la promoción y la progresión de tumores. Los fenoles mayoritarios de la manzanilla son la Apigenina y el Bisabolol. La Apigenina y el Bisabolol inhi-

ben la promoción de los tumores e inducen la apoptosis en células cancerosas. La utilización de ensayos de citotoxicidad y genotoxicidad a corto plazo constituye un medio eficaz y rápido para la evaluación de las actividades de las moléculas (simples o complejas) susceptibles de ser tumorigénicas, genotóxicas o antígenotóxicas.

El objetivo de este trabajo es la evaluación de las actividades genotóxica, antígenotóxica y citotóxica de extractos de manzanilla y de dos de sus fenoles mayoritarios (Apigenina y Bisabolol). Para ello, hemos utilizado dos aproximaciones: el test de mutaciones y recombinaciones somáticas en *Drosophila melanogaster* y el ensayo de crecimiento y viabilidad en células de leucemia humana HL-60.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se usaron dos tipos de presentación de muestra de *M. chamomilla* : infusiones de la planta, preparada hirviendo bolsas comerciales, y la planta completa pulverizada con nitrógeno líquido y tamizada. Los fenoles mayoritarios de la manzanilla fueron adquiridos en Sigma y filtrados previamente.

1-Test de mutaciones y recombinaciones somáticas de *Drosophila* (SMART)

Se han usado las siguientes líneas de *Drosophila melanogaster*, con marcadores genéticos en el brazo izquierdo del cromosoma 3:

- 1.- *flr³/In(3LR)TM3, ri p^p sep bx^{34e} es Bd^x* (abreviadamente *flr³/TM3, Bd^x*).
- 2.- *mwh/mwh*,

Este ensayo está basado en la pérdida de heterocigosidad para estos dos marcadores, lo que se traduce fenotípicamente en la aparición de pelos mutados al nivel de las alas de *Drosophila* (Graf, 1984). Las pruebas de genotoxicidad fueron llevadas a cabo siguiendo el protocolo general de Graf. Larvas heterocigóticas de 72h se transfirieron a viales de tratamiento con las diferentes concentraciones de la sustancia a ensayar. Los tests de antígenotoxicidad fueron realizados añadiendo el agente mutagénico (Peróxido de Hidrógeno) a diferentes concentraciones fisiológicas de los extractos de *M. chamomilla* y sus fenoles.

Después de emerger, sólo los adultos transeheterocigotos *mwh/flr3* se montan en portas y analizados al microscopio fotónico. Los resultados del test SMART se expresan como frecuencia relativa del número de manchas por ala. El análisis de los datos está basado en la comparación de las fre-

cuencias observadas entre las series tratadas y los controles. Se utilizó un procedimiento de multidecisión para determinar si los resultados eran positivos, negativos o por el contrario no se podían establecer conclusiones dependiendo de la frecuencia con la que se presentaban las manchas en las alas (Frei and Würgler, 1988). En este trabajo se utilizó el test X^2 para comparar los controles y los tratados.

2-Test de inhibición del crecimiento tumoral

Para la evaluación de la citotoxicidad se utilizó el ensayo de crecimiento y viabilidad celular en células de leucemia humana HL-60. Se establecieron cultivos con 100.000 células/ml, en cuyo medio de cultivo se había disuelto a diferentes concentraciones el extracto de *M. chamomilla* y su infusión. Las concentraciones de los fenoles abarcaban las concentraciones a las que se encuentran en la planta.

La actividad tumoricida de las diferentes plantas y compuestos fenólicos fue determinada siguiendo el crecimiento de los cultivos celulares durante 72h, usando una coloración diferencial con azul de tripán para diferenciar las células vivas de las muertas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el estudio de genotoxicidad de *Matricaria chamomilla* y de sus fenoles mayoritarios (Apigenina y Bisabolol) muestran que tanto los extractos como los fenoles no son genotóxicos en SMART a la dosis más baja probada. Con respecto a los resultados de antigenotoxicidad se ha visto que esta planta y sus fenoles exhibieron unos claros efectos antigenotóxicos frente al peróxido de hidrógeno, un agente mutágeno que produce daños en el DNA. Puesto que los tratamientos se realizaron combinando al mismo tiempo el mutágeno y las distintas infusiones es apropiado interpretar la reducción de las tasas de mutación como efecto desmutagénico (Romero-Jiménez, 2005). Los efectos antioxidantes de los extractos acuosos de *M. chamomilla* se conocen bien y se relacionan con su contenido fenólico (Trouillas, 2003); su efecto desmutagénico podría ser debido, entre otros, a un compuesto como el μ -Bisabolol, o la Apigenina con actividad antitumoral o al conjunto de los fenoles de esta planta. Su aceite resultó antigenotóxico en el análisis de intercambio entre cromátidas hermanas (Hernandez-Ceruelos, 2002).

Los resultados de inhibición obtenidos se pueden explicar por un sinergismo entre su contenido fenólico y el peróxido de Hidrógeno debido a la capacidad de los fenoles de atrapar especies reactivas de oxígeno como se

ha observado en experimentos anteriores realizados con fenoles contenidos en el aceite de oliva virgen extra (Campos Sánchez, 2003).

Los resultados de crecimiento relativo respecto al control de células HL-60 tratadas tanto en infusión como en planta completa, se presentan en las figuras (). Observamos que todas afectan al crecimiento tumoral de forma que lo inhiben, originando unas curvas típicas de inhibición del crecimiento celular. Se ve que *M. chamomilla* inhibe la proliferación de las células HL-60, siendo la DL50 en planta completa aproximadamente 10 veces mayor que en la infusión. Sus extractos acuosos no son capaces de inhibir la proliferación de células de melanoma de Ratón (Trouillas, 2003). Respecto a sus componentes, el μ -Bisabolol induce apoptosis en células de glioma de rata (Carretero, 2001) y la Apigenina es citotóxica para células cancerosas y tumoricidas de células de la piel en ratón e inhibe el crecimiento de fibroblastos y la agregación paquetería (Harbone, 2000). Por tanto, las presentaciones de la muestra en infusión y planta completa usadas por nosotros sí son eficaces frente a células cancerosas HL-60 y sugerimos que su contenido en μ -Bisabolol y Apigenina podría ser la causa de su actividad citotóxica.

Figura 1. Resultados de genotoxicidad y antigenotoxicidad.

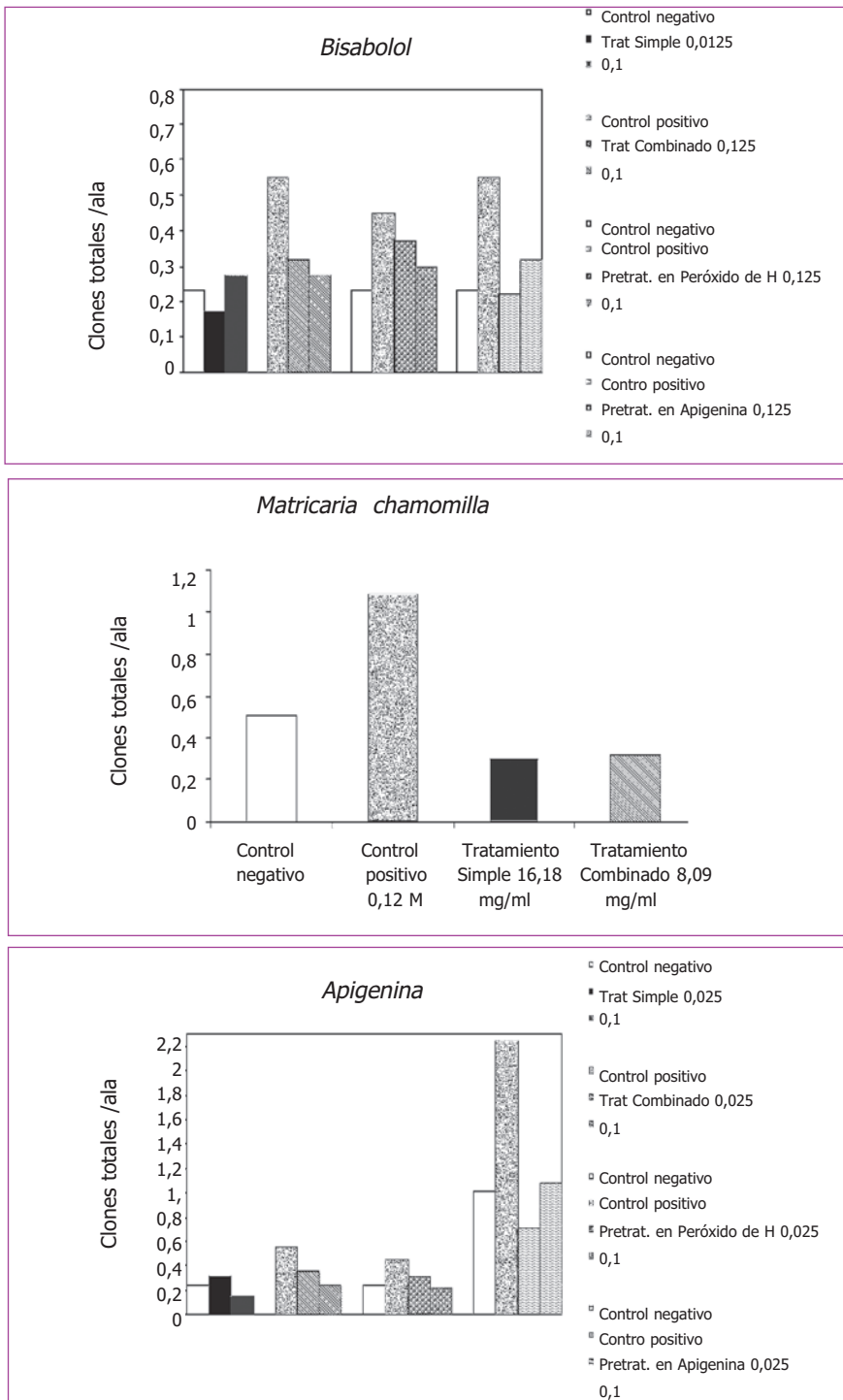
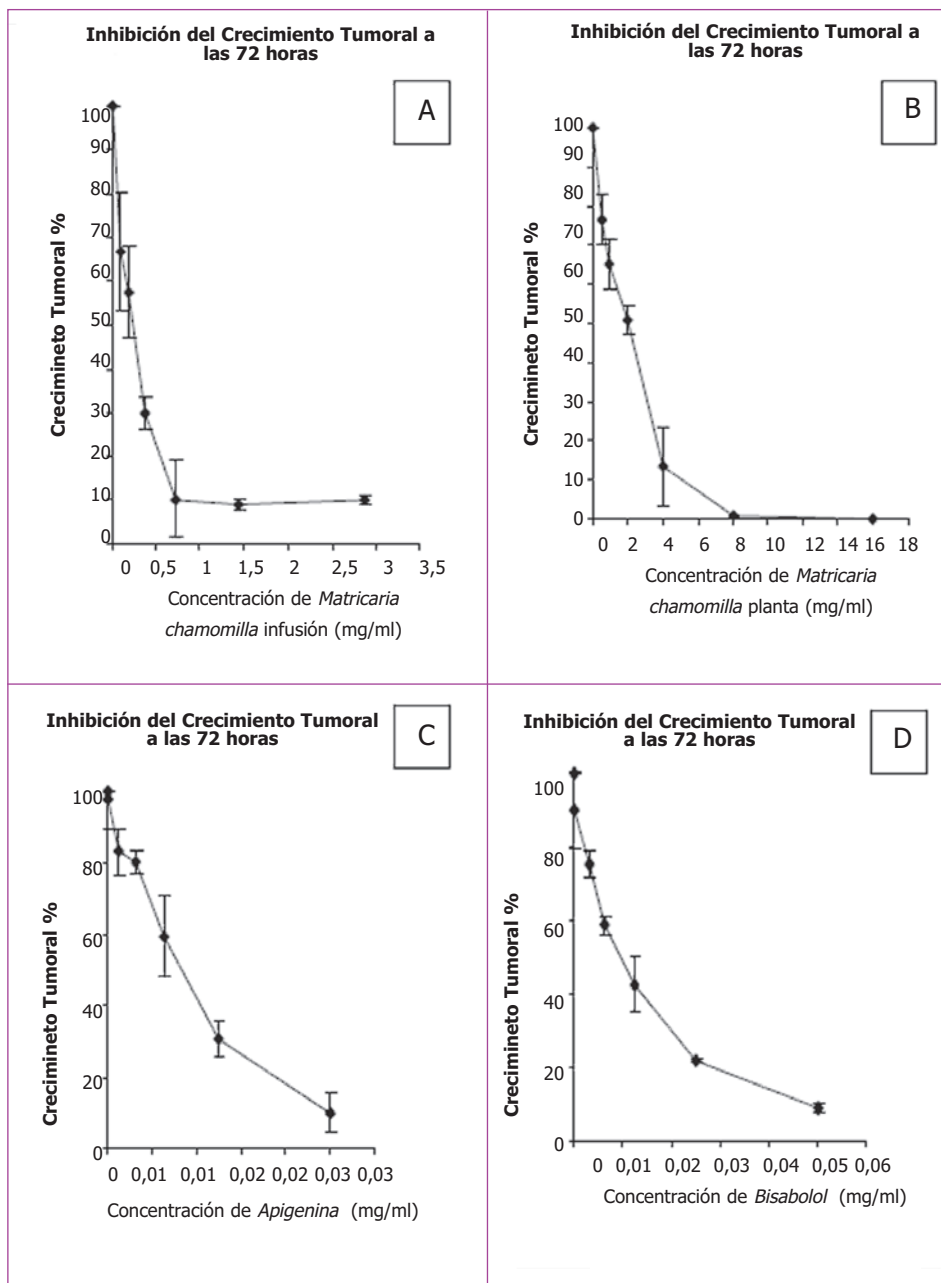


Figura 2. Inhibición del crecimiento tumoral de células HL60 a las 72 horas por: A) infusión de *Matricaria chamomilla*, B) Extracto de *Matricaria chamomilla*, C) Apigenina, D) Bisabolol.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Campos Sánchez, J. 2003. Evaluación Genotóxica del aceite de oliva y de los subproductos derivados de su elaboración. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba, Dpto. De Genética.
- Carretero, E. 2001. Alcaloides: derivados del triptófano y otros alcaloides (III). *Panorama Actual Med.* 25(243), 442-449.
- Cavalieri, E., Mariotto, S., Fabrizi, C., *et al.* 2004. Alpha-Bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315 (3), 589-594.
- Frei H, Würzler F E (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat. Res.*, 203: 297-308.
- Graf U, Würzler F E, Katz A J, Frei H, Juon H, Hall C B, Kale P G. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.*, 6: 153-188.
- Harbone, J.B. y Williams, C.A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry.* 55, 481-504.
- Hernandez-Ceruelos, A., Magrinal-Bujaidar, E., de la Cruz, C. 2002. Inhibitory effect of chamomille essential oil on the sister chromatid exchanges induced by daunorubicin and methyl methanesulfonate in mouse bone marrow. *Toxicol. Lett.* 135, 103-110.
- Romero-Jiménez, M., Campos-Sánchez, J., Analla, M. *et al.* 2005. Genotoxicity and antigenotoxicity of some traditional medicinal herbs. *Mutat. Res.* 585, 147-155.
- Sastry P S, Rao K S (2001a) Apoptosis and the nervous system. *J. Neurochem.*, 74: 1-20.
- Trouillas, P., Calliste, C-A., Allais, D-P., *et al.* 2003. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in Limousin countryside as herbal teas. *Food Chem.* 80, 399-407.