

# ARTÍCULOS DE REVISIÓN REVIEW ARTICLES

---

## Propiedades biológicas de los tintes naturales

### *Biological properties of natural dyes*

TOLEDO DE OLIVEIRA T<sup>1</sup>, NAGEM T J<sup>2</sup>, ROCHA DA COSTA M<sup>1</sup>, MARCIANO DA COSTA L<sup>3</sup>, MAGALHÃES N M<sup>1</sup>, STRINGHETA P C<sup>1</sup>, QUEIROGA DE LIMA E<sup>1</sup>, KLING DE MORAES G H<sup>1</sup>, DA SILVA VIEIRA H<sup>2</sup>

<sup>1</sup>-Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. <sup>2</sup>-Departamento de Química da Universidade Federal de Ouro Preto, 35400-000, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil. <sup>3</sup>-Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

### RESUMEN

El propósito del presente trabajo es evaluar el aumento en el uso de colorantes naturales en la industria alimentaria y la posibilidad de desarrollar nuevos medicamentos gracias a sus diversas propiedades biológicas. La presente revisión aborda las principales actividades biológicas observadas en los carotenoides y las antocianinas y pone énfasis en el amplio uso del extracto de achiote o bija (*Bixa orellana L.*) y de la curcumina (*Curcuma longa*) en estas actividades.

**PALABRAS CLAVE:** Vegetales. Pigmentos. Bixina. Norbixina. Antocianina. Curcumina.

### ABSTRACT

*The aim of the present work is to evaluate the increase uses of natural colorants in the nourishing industry and in the promising of new medicines due its several biological properties. In this review the main biological activities observed in the carotenoids and the anthocyanins are boarded, with emphasis in the wide use of the urucum's extract from *Bixa orellana L.* and of curcumin from *Curcuma longa* in these activities.*

**KEY WORDS:** Plants. Pigments. Bixin. Norbixin. Anthocyanin. Curcumim.

### 1. INTRODUCCIÓN

La información sobre tintes naturales y las publicaciones sobre esta actividad biológica son escasas. No obstante, empieza a haber bibliografía sobre el efecto de los pigmentos vegetales en el control del colesterol.

Los pigmentos vegetales fenólicos como la antocianina, que a su vez son también flavonoides, son capaces de constituir formas complejas con iones metálicos. Poseen propiedades antioxidantes y la capacidad de adherirse a macromoléculas como las proteínas y los polisacáridos.

Los pigmentos vegetales carotenoides son precursores de la vitamina A. Desempeñan diversas funciones en el organismo, como la protección de la piel y la mucosa, desempeñan un papel fundamental en el mecanismo de visión y

### 1. INTRODUCTION

The information about natural dyes and publication of the biological activity is still limited, however the literature start publishing the effect of plant pigments in the control of the cholesterol.

The phenolic plant pigments as anthocyanins, which are also flavonoids, are able to form complex with metallic ions. They have antioxidant properties and abilities to bond to macromolecules such as proteins and polysaccharides.

The carotenoids plant pigments are vitamin A precursor. They have many functions in the organism, as protecting action on the skin and mucous, and pivotal role in the mechanism of vision and they are also important for reproduction organs.

también son importantes para los órganos reproductores.

El principal uso de los pigmentos vegetales se encuentra en la industria alimentaria, y la beta es uno de los más utilizados en todo el mundo.

## 2. PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS CAROTENOIDES:

Entre los carotenoides más importantes identificados en el plasma o en el suero se encuentran el beta-caroteno, el alfa-caroteno, el licopeno, la criptoxantina, la luteína y el zeaxantín. Las concentraciones séricas no dependen solamente de la dieta, sino también de factores como la destrucción en el tracto intestinal, la eficacia en la absorción y el metabolismo. En personas bien nutridas, aproximadamente el 1 % del total de carotenoides presentes en el organismo (100-150 mg) se encuentran en el suero<sup>1</sup>.

Los carotenoides se transportan en la sangre a través de las lipoproteínas (LDL, VLDL y HDL), y parece que su concentración es mayor en tejidos con un elevado número de receptores LDL y elevado índice de captación de lipoproteínas, tales como el hígado, las glándulas suprarrenales y los testículos<sup>1</sup>.

Además de su función como precursores de la vitamina A, a los carotenoides se les atribuyen otras actividades biológicas como, por ejemplo, el aumento de la comunicación en el hiato aniónico, la estimulación del sistema inmunológico y la actividad antioxidante<sup>2</sup>. Las propiedades específicas de los carotenoides se han tratado en el contexto de su acción preventiva frente al cáncer.

La vida aeróbica se asocia con las especies reactivas de oxígeno y diversos sistemas de defensa entre los que se encuentran los antioxidantes que toman parte en el proceso de detoxificación. Los carotenoides participan en la defensa antioxidante del organismo. Actúan principalmente en la desactivación del oxígeno molecular singlete y de los radicales de peróxido. El oxígeno singlete se produce durante la reacción de intercambio de energía, cuando del estado sensibilizado pasa al estado excitado mediante luz y posteriormente transfiere su energía al oxígeno en estado fundamental. Las porfirinas, las clorofilas, las riboflavinas o la bilirrubina son ejemplos de sensibilizadores endógenos del sistema biológico.

The main use of plant pigments is in food industries, and urucum is one of them more used all over the world.

## 2. BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE CAROTENOIDS:

The most important carotenoids identified in plasma or serum includes  $\beta$ -carotene, alfa-carotene, lycopene, cryptoxanthin and lutein with some zeaxanthin. The concentrations in the serum do not depend on the diet only, but also of factors as destruction in the gastrointestinal tract, efficiency of absorption and metabolism. In person well nourished, approximately 1% of the total of carotenoids of the body (100-150 mg) is found in the serum<sup>1</sup>.

The carotenoids are transported by blood through lipoproteins (LDL, VLDL and HDL), it seems to concentrate particularly in tissues with a great number of LDL receptors and a high rate of up take of lipoprotein such as in liver, adrenals and testicles<sup>1</sup>.

Besides the function as precursors of the vitamin A other biological activities has been attributed to the carotenoids, such as the increase of communication among the union gap, stimulation of the immunological system and antioxidant activity<sup>2</sup>. The carotenoids specific properties have been discussed in the context of its cancer preventive action.

The aerobic life is associated with reactive oxygen species and various defense systems among them the antioxidants are included and they take part in the detoxification process<sup>3</sup>. The carotenoids participate in the antioxidant defense of the organism. They act mainly in the deactivation of oxygen molecular singlet and in the peroxide radical. The oxygen singlet is produced in the reaction of energy exchange, when a sensitized is excited by light and subsequently transfers its energy to the oxygen in the fundamental state. The porphyrines, chlorophylls, bilirubin or riboflavines are examples of endogenous sensitizers in the biological system.

Since the study of Foote and Denny<sup>4,5</sup>, the  $\beta$ -carotene is able to remove the oxygen singlet. Other carotenoids such as lycopene, alfa-carotene and xanthophylls are also activated to remove oxygen singlet. The inactivation of oxygen singlet by carotenoids is produced mainly by a

Desde el estudio realizado por Foote y Denny<sup>4,5</sup>, se considera que el beta-caroteno es capaz de eliminar el singlete de oxígeno. Otros carotenoides como el licopeno, el alfa-caroteno y las xantófilas también se activan para la eliminación del oxígeno singlete. La inactivación del oxígeno singlete por los carotenoides se produce principalmente mediante la eliminación física. Este proceso está relacionado con la transferencia de energía de excitación del oxígeno singlete al carotenoide en estado fundamental, produciendo oxígeno en estado fundamental y un triplete de carotenoide. La energía del triplete de carotenoide se disipa a través de la interacción entre el carotenoide y el disolvente utilizado para su recuperación en el estado fundamental liberando energía térmica. Por tanto, el carotenoide permanece intacto durante el proceso de eliminación física y puede participar en otro ciclo de desactivación<sup>6</sup>.

La desactivación de los radicales de peróxido mediante carotenoides se debe a las reacciones químicas entre el radical y el carotenoide. El carotenoide se altera químicamente y sus productos son antioxidantes menos reactivos. La reacción química del radical peróxido-carotenoide no se debe dilucidar sin haber identificado diversos productos de la oxidación como, por ejemplo, los apocarotenoides y los epóxidos. El beta-carotenoide ha demostrado ser mejor oxidante cuando la presión de oxígeno es baja<sup>8</sup>. Se ha demostrado que los carotenoides actúan por sinergismo con otros antioxidantes<sup>9</sup>. Una combinación de beta-caroteno y alfa-tocoferol proporcionan una mayor protección frente a los pro-oxidantes que los compuestos individuales<sup>10</sup>.

La transformación de los fibroblastos por los carcinógenos es inhibida por los retinoides y los carotenoides y su actividad inhibidora se relaciona con la inducción de la comunicación entre las uniones comunicantes. Las uniones comunicantes son canales entre las membranas que permiten la difusión de las moléculas entre las células conectadas y están probablemente asociadas a un número de rutas de transmisión de señales. El beta-carotenoide y la cantaxantina se pueden utilizar para aumentar la comunicación entre las uniones comunicantes celulares. La cantaxantina, un carotenoide no precursor de la vitamina A, regula la comunicación entre las uniones comunicantes, pero se especula sobre si este compuesto influye directamente en el proceso o

physical elimination. This process is related to the transference of exciting energy of the oxygen singlet to the carotenoid in the fundamental state, producing oxygen in the fundamental state and a carotenoid triplet. The energy of the excited carotenoid dissipates through the interaction between carotenoid and the solvent which was used for its recovery in the fundamental state releasing thermal energy. Thus, carotenoid stays intact though the process of physical elimination and it can be introduced in other desactivation cycle<sup>6</sup>.

The deactivation of peroxide radicals by carotenoids is due to a chemical reactions between the radical and the carotenoid. The carotenoid is altered chemically and its products are antioxidants less reactive. In relation to the chemical reaction of carotenoid-peroxide radical, it should not be elucidated without being identified several products of the oxidation, as apocarotenoids, and carotenoid epoxide<sup>7</sup>. The  $\beta$ -carotenoid has been shown to be better oxidizer at low oxygen pressure<sup>8</sup>. It has been demonstrating that the carotenoids act by synergism with other antioxidants<sup>9</sup>. A combination of  $\beta$ -carotene and alfa-tocoferol provides a better protection against the pro-oxidant than the individual compounds<sup>10</sup>.

The transformation of fibroblasts by carcinogens are inhibited by retinoids and carotenoids, and their inhibitory ability is correlated to induce the communication among the gap junctions. The gap junctions are channels among the membranes that allow the diffusion of molecules among connected cells, and they are probably associated to a number of signal path.  $\beta$ -carotenoid and cantaxantine can be used to increase communication among the gap junctions of the cells. The cantaxantine, a carotenoid no-provitamin A, regulates the communication among gap junctions, but it is speculated if this compound influence directly in this process or it should be metabolized to active retinoids. Recently it has been demonstrated that at least one product of the metabolism of the cantaxantine is a very efficient inducers of the communication among the gap junctions in vitro<sup>11</sup>. It has been identified the 4-oxoretinoic acid as a product of the autoxidation of the cantaxantine with inductors properties of communication among the gap junctions compared to the retinoic acid. Thus, the carotenoids would act as precursors of the retinoids with several structures which could have interes-

si se debe metabolizar dando lugar a retinoides activos. Recientemente se ha demostrado que al menos uno de los productos derivados del metabolismo de la cantaxantina es un inductor muy eficaz de la comunicación entre las uniones comunicantes *in vitro*<sup>1</sup>. El ácido 4-oxoretinoico se ha identificado como un producto de la autooxidación de la cantaxantina con propiedades inductoras de la comunicación entre las uniones comunicantes en comparación con el ácido retinoico. Por tanto, los carotenoides actuarían como precursores de los retinoides con diversas estructuras, lo que podría tener interesantes propiedades fisiológicas. Los carotenoides no beta-caroteno no se han sometido a estudios de toxicidad detallados<sup>1</sup>. El efecto anticarcinogénico de los carotenoides en modelos de estudio *in vitro* e *in vivo* se revisó exhaustivamente en animales. A pesar del gran volumen de estudios, se debe dilucidar la relación entre la acción antioxidante de los carotenoides y su sorprendente rendimiento en diversos modelos animales con cáncer. Una posibilidad es que inhiba la actividad carcinogénica que puede tomar parte en las reacciones de oxidación<sup>1</sup>.

### 2.1.Extracto de bija:

La bija (*Bixa orellana L.*) es una especie originaria del sudeste asiático considerada una especie preciosa. A raíz de la prohibición del uso de pigmentos sintéticos en los principales países de Norteamérica y Europa, se buscaron alternativas naturales. El turmérico, además su uso principal como condimento, posee sustancias antioxidantes y antimicrobianas y sustancias colorantes (curcumina) que se pueden usar en cosmética, medicina e industria alimentaria y textil.

La bija (*Bixa orellana L.*) se cultiva en la mayoría de los estados de Brasil, principalmente en Paraíba, Pará, Bahia, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Piauí y Paraná. Brasil produce anualmente 12.000 toneladas de grano. Alrededor del 60 % de esta producción se utiliza como colorante y el resto se utiliza como pigmento y/o se exporta. La producción del colorante se realiza tanto de forma tradicional como en grandes fábricas. En el noreste de Brasil es donde se registra el mayor consumo de este condimento. Las industrias de los colorantes denominados bixina/norbixina/sal

ting physiological properties. The carotenoids no- $\beta$ -carotene does not have been submitted to detailed toxicity studies<sup>1</sup>. The anticarcinogenic effect of carotenoids "in vitro" and "in vivo" models were extensively revised for animals. In spite of the great number of studies, the connection between the carotenoids antioxidant function and their remarkable performance in many animal models with cancer need to be elucidated. One possibility is that they inhibit the procarcinogenic activity which can take part in oxidation reactions<sup>1</sup>.

### 2.1.Urucum extract:

The urucum (*Bixa orellana L.*) original species of the Asian Southeast, is considered a precious spice. With the prohibition of the use of synthetic pigments in the main countries of North America and Europe, natural alternatives have been sought. The turmeric, besides its main use as condiment, has anti-oxidant, anti-microbial and dye (curcumin) substances that can be used in the cosmetic, textile, medicinal and food areas<sup>12</sup>.

The urucum (*Bixa orellana L.*) is cultivated in almost all the Brazilian states, mainly in the state of Paraíba, Pará, Bahia, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Piauí and Paraná. The annual Brazilian production is 12000 ton of grains. About 60% of that production goes to the colorau industry and the remaining is supplied to the industry of urucum pigment and/or to export. The production of colorau is made from homemade conditions to big industries. The largest consumption of this condiment takes place in the Northeastern Brazil. The industries of coloring named bixin/norbixin/norbixate export or trade it in the internal market, the urucum pigment in different concentration to the food industries (mainly for dairy, sausage, macaroni, etc), cosmetic and pharmaceutical. The colored market is estimated in 20 to 25 thousand ton/year and it yields about 12 million US dollars annually, while the coloring yields about 4.8 million US dollars and the urucum powder and grains yield 1.4 million US dollars<sup>13,14</sup>.

The urucum can be known by several names, such as Annatto, Terra Orellana, Bixa Orellana, Roucou and Achiote. Starting from urucum grains, it can be obtained several types of coloring different to each other in terms of solubility and

de norbixina lo exportan o lo comercializan en el mercado interno, el pigmento en diferentes concentraciones se suministra a las industrias alimentaria (principalmente de lácteos, embutidos, pasta, etc.), cosmética y farmacéutica. Se estima que el mercado de los colorantes supone unas 20-25 mil toneladas al año, con unos ingresos de unos 12 millones de dólares estadounidenses anuales, el colorante alrededor de 4,8 millones y los granos y el polvo 1,4 millones<sup>13,14</sup>.

La bija es conocida por diversos nombres tales como achiote, terra orellana, bixa orellana y annatto. De sus granos, se pueden obtener diversos tipos de colorantes diferentes en términos de solubilidad y concentración de pigmentación. Entre esos tipos se encuentran la bixina, la norbixina y la sal de nobixina y los productos derivados del tratamiento térmico de la bixina.

Según Takahashi<sup>15</sup>, los extractos de bija son aceites o productos alcalinos obtenidos al eliminar la capa externa de los granos de bija mediante diversos procesos. Estos extractos se presentan en polvo, en pasta, en suspensión o en solución. Los extractos liposolubles de bija se obtienen mediante la extracción de la cubierta exterior de los granos por medio de: 1- la extracción directa de aceites y/o grasas comestibles; 2- la incorporación en los aceites y/o grasas comestibles del extracto obtenido a disolventes orgánicos (acetona, diclorometano, etanol, hexano, metanol, isopropanol, tricloroetileno), seguida de la eliminación del disolvente.

Quizás lo que convierte a la bija en uno de los materiales más interesantes para la extracción de pigmentos es la posibilidad de obtener de su grano tanto colorantes solubles en agua (hidrosolubles) como colorantes solubles en aceite (liposolubles) con sólo variar el disolvente de extracción.

La bixina es el pigmento natural de la semilla de la bija y representa el 80 % de todos los carotenoides presentes. A partir de la bixina es posible obtener otros pigmentos como la norbixina (liposoluble), la sal de norbixina (hidrosoluble) y diversos productos de la degradación térmica que presentan liposolubilidad y el color amarillento estable e ideal para la coloración de la pasta.

La sal de norbixina se obtiene mediante la extracción alcalina (con hidróxido sódico o potásico) de los pigmentos del grano de la bija. Esta extracción transforma la bixina en sal (sal

pigment concentration. Among them, one can name bixin, norbixin and norbixate salt and the products from thermo treatment of the bixin.

According to Takahashi<sup>15</sup>, urucum extracts are oily or alkaline products obtained by removing the external layer of the urucum grains by several processes. These extracts are presented as powder, paste, suspension or solution. The liposoluble extracts of urucum are prepared by extraction of the external layer of the grains by means of: 1- direct removal with oils and/or edible fats; 2- incorporation in oils and/or edible fats, of the extract obtained with organic solvents (acetone, dichloromethane, ethanol, hexane, methanol, isopropanol, trichloroethylene), after removal of those solvents.

Perhaps what turns the urucum one of the material more interesting for the extraction of pigments is the possibility to obtain from the same grain, coloring soluble in water (hydrosoluble) and coloring soluble in oil (liposoluble), just altering the extraction solvent.

The bixin is the natural pigment of the urucum seed, representing 80% of all the present carotenoids. Starting from bixin, it is possible to obtain other pigments, as norbixin (liposoluble), the salt of the norbixin (hydrosoluble) and products of thermal degradation that present liposolubility and the yellow color which is stable and ideal for use in macaroni.

The norbixin salt is obtained by the alkaline extraction (sodium or potassium hydroxide) of the pigments of the grain of urucum. This extraction transforms the bixin into a salt (norbixin salt), which in this form is soluble in alkaline aqueous solution. The salt of the norbixin is precipitated in the norbixin form by the neutralization of the solution (pH=7), that in this form is not soluble in water. Besides the norbixin salt, it is possible to increase solubility of bixin and norbixin in water using emulsifier such as polysorbates, propylene glycol and others. Those emulsions are important in the application of the pigment in foods with low pH, what in turn make impossible the use of the salt of norbixin. On the other hand, it is possible to increase the solubility in water as well as in oil by using emulsifier.

The main technological aspect that affects the use of salt of norbixin is solubility, pH and stability and the property of this pigment to bond to proteins. The water solubility of norbixin salt is

de norbixina), que es soluble en soluciones acuosas alcalinas. La sal de norbixina se precipita en forma de norbixina mediante la neutralización de la disolución (pH=7), que en esta forma no es soluble en agua. Además de la sal de norbixina, es posible aumentar la solubilidad en agua de la bixina y la norbixina utilizando emulsificantes como los polisorbatos, el glicol propilénico, etc. Estas emulsiones son importantes para la aplicación del pigmento en alimentos con un pH bajo, lo que hace posible el uso de la sal de norbixina. Por otro lado, es posible aumentar la solubilidad en agua y en aceite si se usa un emulsificante.

El principal aspecto tecnológico que afecta a la utilización de la sal de norbixina es la solubilidad, el pH, la estabilidad y la capacidad de sus pigmentos para adherirse a las proteínas. La solubilidad en agua de la sal de norbixina está relacionada con el pH de la disolución, restringiendo su uso a procesos de aplicación que no excedan ciertos límites. Sin embargo, este tipo de pigmento presenta la singular característica de adherirse a las proteínas, lo que es de gran interés para cierto tipo de productos<sup>16</sup>.

El extracto liposoluble de bija debe contener al menos un 0,2 % de carotenoides, expresados como bixina, mientras que el extracto hidrosoluble de bija debe contener al menos un 0,2 % de carotenoides, expresados como norbixina.

La fracción liposoluble es insoluble en agua y es poco soluble en etanol, mientras que la fracción hidrosoluble es soluble en agua y poco soluble en etanol.

Estos extractos producen con ácido sulfúrico concentrado un color azulado debido a la bixina o azul verdoso debido a la norbixina. El extracto liposoluble diluido en cloroformo presenta una absorción máxima de 470 y 501 nm. El extracto hidrosoluble diluido en agua presenta una absorción máxima de 453 y 483 nm.

Los extractos liposolubles de bija deberían especificar en la etiqueta el contenido total de carotenoides expresados en porcentaje de bixina. Los extractos hidrosolubles de bija deberían especificar en la etiqueta el contenido total de carotenoides expresados en porcentaje de norbixina. En ambos casos, también se deberían especificar las sustancias añadidas como vehículo. No se le puede atribuir al extracto de bija actividad precursora de vitamina A.

related to pH of the solution, making its restricted use, which the pigment application process do not exceed certain limits. However, this type of pigment presents the unique characteristic to bond to protein, turning it highly interesting for certain type of products<sup>16</sup>.

The liposoluble extract of urucum should contain at least 0.2% of carotenoids, expressed as bixin, while the urucum hydrosoluble extract should contain at least 0.2% of carotenoids, expressed as norbixin.

The liposoluble fraction is insoluble in water and it is not very soluble in ethanol and the hydrosoluble fraction is soluble in water and it is not very soluble in ethanol.

These extracts produce with concentrated sulfuric acid blue color due to bixin or greenish blue due to norbixin. The liposoluble extract diluted in chloroform gives maximum absorbance at 439, 470 and 501 nm. The hydrosoluble extract diluted in water gives maximum absorbance at 453 and 483 nm.

The liposoluble extracts of urucum should bring in the label the total content of carotenoids expressed in percentage of bixin. The hydrosoluble extract of urucum should bring in the label the total content of carotenoids expressed in percentage of norbixin. In both cases, it should be shown the substances added as vehicle. To the urucum extract can not be attributed provitamin A activity.

#### 2.1.1. Applications of urucum pigment:

The urucum coloring is broadly used as additive for food industry due to its versatility in obtaining liposoluble pigments to improve the attractiveness of food as butter, margarine, corn oil, desserts, cheeses, etc. The hydrosoluble pigments are added to cheeses, sausages, ice cream, cereals, beverage and sauces<sup>17, 18, 19</sup>.

With the objective of investigating the recommendation of the urucum use for cardiovascular problems, it was reported that after test with dogs, mice and rabbits it was demonstrated the efficiency of the urucum extract obtained by maceration of grains (composed for more than 80% bixin pigment). It was obtained significant reduction of cholesterol indexes. In the clinical tests, the results were confirmed in 10 days of consumption, instead of 15 days foreseen initially,

### 2.1.1. Aplicaciones del pigmento extraído de la bija:

El colorante extraído de la bija se utiliza en general como aditivo en la industria alimentaria debido a su versatilidad para la obtención de pigmentos liposolubles que mejoran el poder de atracción de la comida (mantequilla, margarina, aceite de maíz, postres, quesos, etc.). Los pigmentos hidrosolubles se añaden a quesos, embutidos, helados, cereales, bebidas y salsas<sup>17, 18, 19</sup>.

Con objetivo de investigar la recomendación del uso de la bija para el tratamiento de problemas cardiovasculares, se realizó un informe tras pruebas con perros, ratones y conejos que demostró la eficacia del extracto de bija obtenido de la maceración de los granos (compuesto por más del 80 % de pigmento de bixina). Se redujeron de forma significativa de los niveles de colesterol. En las pruebas clínicas, los resultados se confirmaron a los 10 días de la ingesta, en lugar de a los 15 días previstos inicialmente, ya que había pacientes con niveles de grasas en sangre por debajo de los normales. Los resultados confirmaron que los pigmentos pueden acelerar el metabolismo de las grasas, al ser responsables de la reducción de los triacilgliceroles y el colesterol del que, por algún mecanismo, sólo reduce la fracción mala<sup>20</sup>.

Morrison *et al.*<sup>20</sup>, en respuesta al incremento del uso de la medicina tradicional en los países del tercer mundo según la Organización Mundial de la Salud, realizaron un estudio preliminar y publicaron los resultados de los efectos de ciertas plantas medicinales antillanas en los niveles de azúcar en sangre en el perro. Una de las plantas que presentó un significativo efecto hipoglucémico fue seleccionada para un posterior estudio. Esta planta, la *Bixa orellana*, conocida en la región como annatto, se investigó para determinar si su efecto hipoglucémico se obtenía por mediación de insulina y también para estudiar si alguno de estos novedosos compuestos naturales podían complementar a los agentes hipoalergénicos orales en uso en la medicina clínica moderna. Los actuales agentes hipoalergénicos orales son derivados de las sulfonilureas, que actúan a través de la insulina, y derivados de las biguanidas, cuyos efectos no se producen por mediación de la insulina. El estudio universitario programado de un grupo de diabéticos cuestionó la eficacia de los agentes hipoalergénicos orales y, recién-

porque there were patients with levels of blood fat below normal. It is credited the results that pigment has the power to accelerate the fat metabolism, being responsible for reduction of triacylglycerols and cholesterol that, for some mechanism, only reduce the bad fraction of this last one<sup>20</sup>.

Morrison *et al.*<sup>20</sup> in response to the increased shown by the world Health Organization in the practice of traditional medicine on third world, countries, a preliminary study of the effects of some West Indian medicinal plants on blood sugar levels in the dog was carried out and reported. One of the plants found to have significant hypoglycemic effect was selected to further study. This plant, *Bixa orellana*, locally known as annatto, was investigated in order to determine if its hypoglycemic effect was insulin mediated and also to see whether any new natural compounds could be found to supplement the oral hypoglycemic agents already in use modern clinical medicine. The present oral hypoglycemic agents are the sulphonylurea derivatives, which act via insulin, and the biguanide derivatives whose effect is non-insulin mediated. The University group diabetes programmed survey has questioned the efficacy of oral hypoglycemic agents and, recently, the biguanides have been withdrawn in North America because of untoward side effects such as lactic acidosis. The high non compliance rate of insulin treated *diabetes mellitus* in the third world emphasizes the need for effective oral hypoglycemic agents. Local reports of the efficacy of its potential for therapeutic use must therefore be thoroughly investigated.

Morrison *et al.*<sup>21</sup> related the Annatto seed coat extract, which is commonly used in folklore in treating *diabetes mellitus*, as been investigated for its effects on blood sugar levels in the dog. An alkali soluble hyperglycemia inducing fraction was detected and detailed studies revealed toxic effects in the pancreas and liver accompanied by hyperglycemia and apparent tendency to increased insulin levels. Feeding riboflavin diminished the toxicity. The relevance of this finding points to a possible etiological role in the development of malnutrition related *diabetes mellitus* and also to the potential toxicity inherent in the widespread use of folklore medicines.

Tapliyal *et al.*, 2001<sup>22</sup> studied the mechanism of turmeric-mediated chemo prevention and to compare the chemopreventive efficacy of tume-

temente, las biguanidas han sido retiradas en Norteamérica debido a efectos tóxicos secundarios tales como la acidosis láctica. El elevado índice de *diabetes mellitus* no tratada con insulina en el tercer mundo resalta la necesidad de agentes hipoglucémicos orales. Por tanto, se deben investigar exhaustivamente los informes locales de la eficacia de su potencial para uso terapéutico.

Morrison *et al.*<sup>21</sup> relacionaron el extracto de la cubierta exterior de la semilla de la bija, utilizado de forma popular para el tratamiento de la *diabetes mellitus*, cuando investigaron sus efectos en los niveles de azúcar en sangre en el perro. Se detectó una fracción de álcali soluble inductora de hiperglucemia y, en estudios más detallados, se revelaron efectos tóxicos en el páncreas y en el hígado acompañados de hiperglucemia y de una aparente tendencia a incrementar los niveles de insulina. El consumo de riboflavina disminuyó la toxicidad. La importancia de estos resultados apuntan a un posible papel etiológico en el desarrollo de la *diabetes mellitus* relacionada con la desnutrición y también a la toxicidad potencial inherente al uso extendido de medicinas populares.

Tapliyay *et al.* 2001<sup>22</sup> estudiaron el mecanismo quimiopreventivo de la curcumina y compararon la eficacia de la curcumina frente al benzo[a]pireno (B(a)P) y la 4-metilnitrosamina-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK, un carcinógeno específico del tabaco), los efectos de la curcumina (C), de la demetoxicurcumina (dmC), la bisdemetoxicurcumina (bdmC), el isocianato de fenilo (PTIC) y el fenetil de isocianato (PEITC) en la dealquilación de la etoxiresorufina (ER) y la metoxiresorufina (MR) y la pentoxiresorufina (PR) por microsomas de hígado de rata (*in vitro*). En estas reacciones median principalmente las isoenzimas 1A1, 1A2 y 2B1 del citocromo P450 (CYP450), respectivamente. Los resultados sugirieron que la curcumina, como en el caso del fenetil de isocianato (PEITC), es apropiada para la inhibición de la activación de los carcinógenos metabolizados por las isoenzimas del citocromo P450, CYP 1A1, 1A2 y 1B2.<sup>[22]</sup> La incubación *in vitro* de los microsomas de hígado de rata con cada uno de los componentes mostró un descenso dosis-dependiente del monóxido de carbono ligado a los microsomas y también mostró una inhibición dosis-dependiente de la actividad de las isoenzimas CY1A1, 1A2 y 2B1, a juzgar

ric/curcumin against benzo[a] pirenene (B(a)P) and 4-methylnitrosamine-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK, a tobacco-specific carcinogen), the effects of turmeric/curcumin (C), demethoxycurcumin (dmC), bis-demethoxycurcumin (bdmC) and phenyl and phenethyl-isothiocyanates (PITC and PEITC) on the dealkylation of eethoxyresorufin(ER), and methoxyresofurin (MR) and pentoxyresofurin (PR) by rat liver microsomes ( *in vitro*) were done. These reactions are predominantly mediated by cytochrome P450 (CYP450) isoenzymes 1A1, 1A2 and 2B1, respectively. The results suggested that turmeric/curcumin as in the case of isothiocyanate, PEITC, are likely to inhibit activation of carcinogens metabolized by CYP450, isoenzymes, namely, CYP 1A1, 1A2 and 1B2.<sup>[22]</sup> *In vitro* incubation of rat liver microsomes with each of the compounds showed dose –dependent decrease in carbon monoxide binding to microsomes and also showed a dose dependent inhibition of CY1a1, 1a2, and 2b1 activity, as judged by a decrease in formation of resorufin from respective biochemical probes used. Both the isothiocyanates inhibited activity of CYP2B1 more readily than that of CYP1A1/1A2. pretreatment of rats with 1% turmeric through the diet resulted in a significant decrease in induction of B(a)P induced CYP 1a1 and 1a2 and phenobarbitone (PB) induced cyp2b1 in liver, lung and stomach, although the extent of the decrease was different.

### 3. ANTHOCIANYN

#### 3.1. Metabolism, toxicity and pharmacology

Anthocyanins preparations from berries orally administrated produced no abnormalities in rats at levels of 6-mg/Kg body weight for three months and caused no death in rats and mice at larger amounts of 20 gm/ Kg<sup>23</sup>. No teratogenic effect was found over three generations of rats, mice and rabbits and was better than rutin to enhance capillary resistance. In an acute toxicity study, rats fed with single doses of up to 2,5mg/Kg body weight of purple corn anthocyanins suffered no deaths<sup>24</sup>.

The physiological effect of anthocyanin is related to prevention of capillary fragility. Most work in this area has been done with pharma-



por un descenso en la formación de resorufina de las respectivas sondas bioquímicas utilizadas. Ambos isocianatos inhibieron la actividad de CYP2B1 más rápidamente que la de CYP1A1/1A2. El pretratamiento de ratas con un 1 % de curcumina en la dieta dio como resultado un descenso significativo en la inducción de CYP 1A1 y 1A2 por B(a)P y de CYP2B1 por fenobarbital en hígado, pulmones y estómago, aunque el grado de descenso fue diferente.

### 3. ANTOCIANINA

#### 3.1. *Metabolismo, toxicidad y farmacología*

Los preparados de antocianina procedentes de las bayas administrados de forma oral no provocaron ninguna anomalía en las ratas con una administración de 6 mg/kg de peso corporal durante tres meses y no se produjo la muerte de ninguna rata ni ratón con una administración de cantidades superiores a los 20 gm/kg<sup>23</sup>. No se encontraron efectos teratogénicos en tres generaciones de ratas, ratones y conejos y se incrementó la resistencia capilar de forma más destacada que con el uso de rutina. Durante un estudio de toxicidad aguda, las ratas fueron alimentadas con dosis únicas de hasta 2,5 mg/kg de peso corporal de antocianinas extraídas de maíz morado y no se registró ningún fallecimiento<sup>24</sup>.

El efecto fisiológico de la antocianina se relaciona con la prevención de la fragilidad capilar. La mayor parte de los trabajos llevados a cabo en esta área se realizaron con preparados que contenían extracto comercial de antocianinas de arándanos (*Vaccinium myrtillus L.*), fruto que se utiliza de forma muy extendida en el tratamiento de diversas afecciones microcirculatorias. Las antocianinas constan de 3-glucósidos, 3-galactósidos y 3-arabinosas en la mayoría de las antocianinas procedentes del *Vaccinium myrtillus L.* (VMA). Morazonini y Morazzoni<sup>[25]</sup> explican que el endotelio vascular genera endoperóxidos desde las prostaglandinas, una prostaciclina inestable (PGI<sub>2</sub>), que inhibe la agregación plaquetar y por lo tanto, previene las formaciones de trombos. Observaron que la administración oral de antocianinas extraídas del *Vaccinium myrtillus L.* en ratas macho aumentaba de forma considerable la actividad PGI<sub>2</sub> del tejido arterial. Este efecto *in vivo* concuerda con

ceutical preparations containing commercial extract of *Vaccinium myrtillus* anthocyanins, which are widely used to treat various microcirculation diseases. Anthocyanins consist of the 3-glucosides, 3-galactosides and 3-arabinosides of all the major anthocyanins (VMA) as a whole. Morazonini and Morazzoni<sup>[25]</sup> explain that the vascular endothelium generates from prostaglandin endoperoxides an unstable prostacyclin (PGI<sub>2</sub>), which inhibits platelet aggregation and thereby prevents the initial step of thrombus formation. They found that VMA administered orally to male rats significantly increased PGI<sub>2</sub>-like activity released from arterial tissue. This *in vivo* effect agrees with the previous finding that VMA stimulate the release of vasodilator prostaglandin when tested *in vitro* on isolated vascular tissues. Thus as well as inhibiting platelet aggregation, VMA appear to enhance physiological anti-aggregator mechanism, so indicating potential capacity for the prevention of thrombosis<sup>26</sup>.

Stringheta et al.<sup>27</sup> related the effects of presence of ferric (Fe<sup>+3</sup>), cupric (Cu<sup>+2</sup>) and SO<sub>2</sub> on anthocyanins stability at values of pH 2.0 and 3.0 with and without tannic acid as stabilizing agent. Maximum absorbance results demonstrated that using tannic acid as a complexion agent protected the anthocyanins against the Fe<sup>+3</sup> and Cu<sup>+2</sup> ions effects, but with sulfur dioxide had very little effect. The stabilization effect of tannic acid was maximum with the extract maintained at pH 3,0.

Anthocyanins from black currant juice had the reverse effect in promoting the oxidation of ascorbic acid. When flavonols and anthocyanins were both present simultaneously, a protective effect on ascorbic acid was noticed. They concluded that the protective action of flavonols was due to the interference in the free radical chain reaction in the auto oxidation of ascorbic acid. This study was undertaken to establish the possible action of flavonols to decrease velocity of oxidation of ascorbic acid and also anthocyanin breakdown, since ascorbic acid oxidation has a detrimental effect on anthocyanins<sup>27</sup>.

UVB induced hemolysis of rat erythrocytes: protective effect of procyanidins from grape seeds. Besides erythema and sunburn reactions UVB stress can promote erythrocyte extravasations from skin capillaries and hemolysis, and photosensitized hemoglobin can in turn lead to an overload of free radicals in dermis which exacerbates photo

el anterior al mostrar que las antocianinas extraídas del *Vaccinium myrtillus L.* estimulan la emisión de prostaglandina vasodilatadora durante la prueba *in vitro* en tejidos vasculares aislados. Por tanto, además de la inhibición de la agregación de las plaquetas, las antocianinas extraídas del *Vaccinium myrtillus L.* parecen mejorar el mecanismo fisiológico que impide la agregación, lo que indica una capacidad potencial para la prevención de la trombosis.

Stringheta *et al.*<sup>27</sup> describieron los efectos de la presencia de SO<sub>2</sub> e iones Fe<sup>+3</sup> y Cu<sup>+2</sup> en la estabilidad de las antocianinas con valores de pH 2.0 y 3.0 con y sin ácido tánico como agente disolvente. Los resultados de absorción máxima demostraron que la utilización del ácido tánico como agente protegía a las antocianinas frente a los efectos de los iones de Fe<sup>+3</sup> y Cu<sup>+2</sup>, pero que sobre el dióxido de azufre no tenía demasiado efecto. El efecto estabilizador del ácido tánico fue máximo con el extracto mantenido a pH 3.0.

Las antocianinas extraídas del zumo de grosella negra tuvieron el efecto contrario al estimular la oxidación del ácido ascórbico. Cuando los flavonoles y las antoniocinas estaban presentes al mismo tiempo, se advirtió un efecto protector del ácido ascórbico. Concluyeron que la acción protectora de los flavonoles se debió a la interferencia en la cadena de reacción de los radicales libres en la auto-oxidación del ácido ascórbico. Este estudio se realizó para establecer la posible acción de los flavonoles en el descenso de la velocidad de oxidación del ácido ascórbico y la descomposición de la antocianina, ya que la oxidación del ácido ascórbico tiene un efecto perjudicial en las antocianinas<sup>27</sup>.

UVB: hemólisis inducida de los eritrocitos de las ratas: efecto protector de las procianidinas de las semillas de uva. Además del eritema y las reacciones a las quemaduras solares, el estrés UVB puede potenciar las extravasaciones de eritrocitos de los capilares de la piel y la hemólisis. Por su parte, la hemoglobina fotosensible puede provocar una sobrecarga de radicales libres en la dermis que agrave el fotoenvejecimiento. Las procianidinas que preservan los fosfolípidos de la membrana, por su gran actividad antilipoperoxidante, deben mantener *in vivo* la integridad de los glóbulos rojos en los capilares subepidérmicos y contrarrestar de manera efectiva en la dermis la aparición/agravamiento del fotoenvejecimiento de la piel inducido por UVB.

damage. Procyanidins preserving membrane phospholipids, since their strong antilipoperoxidant activity, may maintain in vivo the integrity of RBC in sub-epidermal capillaries and effectively counteract in demis the onset/exacerbation of the UVB-induced skin photo damage<sup>28</sup>

Flavonoids and anthocyanins is increasing evidence that oxidative stress contributes to the neuropathological mechanism of disorders that include Alzheimer's, Parkinsons, Huntington's disease.<sup>29, 30, 31</sup>

Numerous flavonoids have been reported to affect cellular signaling processes, from kinases to transcription factors. In fact, oligomeric procyanidins from pine bark were found to prevent the activation of the proinflammatory transcription factor NF-κ B on ultraviolet (UV) exposure. The same procyanidins are also potent modulators of nitric oxide metabolism.<sup>32,33</sup>

To understand the protective mechanism afforded by PBE-supplemented cells, their basal gene expression profile was determined and compared to that of nonsupplement cells.

As expected, only a small proportion (83) genes of the 588 genes analyzed were detected in either group. However, of these 83 genes, 39 genes showed an expression significantly (more than two-fold) increased or decreased.

Interestingly, a group of overexpressed gene is involved in stress response. Thioredoxin peroxidase 2 plays an important role in eliminating peroxides generated during cellular metabolism and signaling cascades. This effect should be related to the increase of glutathione level in macrophage by PBE (extract bark of *Pinus maritima* is a mixture particularly rich in oligomeric procyanidins and other bioflavonoids such as taxifolin, catechin and epicatechin) by Rimbach and colleagues. The ultraviolet excision repair protein HHR23B is involved in nucleotide excision repair of deoxyribonucleic acid damage. Last, the heat shock protein HSP70 is generally expressed in response to a stress. However, antioxidants such as curcumin have been suggested expression of the inhibitor for helix-loop-helix protein id-3 is known to the desregulated in keratinocyte cell lines such as HaCaT. The increased dynein (light chain) d1cl expression points to the regulation of intracellular trafficking through cytoskeleton interaction.<sup>34, 35, 36, 37</sup>

Los flavonoides y las antocianinas constituyen una prueba más de que el estrés oxidativo contribuye al mecanismo neuropatológico de enfermedades entre las que se incluyen el Alzheimer, el Parkinson y la enfermedad de Huntington.

Se ha comunicado que numerosos flavonoides afectan a los procesos de señalización celular, desde las quinasas a los factores de transcripción. De hecho, se ha observado que las procianidinas oligoméricas de la corteza de pino previenen la activación del factor de transcripción proinflamatorio NF- $\kappa$ B en exposición a radiación ultravioleta (UV). Las mismas procianidinas son también potentes moduladores del metabolismo del óxido nítrico.<sup>32,33</sup>

Para comprender el mecanismo de protección ofrecido por las células con refuerzo MBE, se determinó su perfil de expresión génica elemental y se comparó con el de las células no reforzadas.

Como se esperaba, sólo una pequeña proporción de genes, 83 de los 588 analizados, se detectaron en cada grupo. Sin embargo, de esos 83 genes, 39 mostraron un aumento o disminución significativos (más del doble) en su expresión.

Curiosamente, un grupo de genes sobrepresados están involucrados en la respuesta de estrés. La tioredoxina peroxidasa 2 desempeña un importante papel en la eliminación de los peróxidos generados durante el metabolismo celular y las cascadas de señales. Este efecto se debe relacionar con el aumento del nivel de glutatión en las macrófagas debido al MBE (la corteza extraída del *Pinus maritime* es una mezcla especialmente rica en procianidinas oligoméricas y otros bioflavonoides como la taxifolina, la catequina y la epicatequina), estudio de Rimbach *et al.* La proteína reparadora de excisión UV HHR23B está involucrada en la reparación de la excisión de nucleótidos del ADN dañado. Por último, la proteína de estrés térmico HSP70 se expresa, por lo general, como respuesta a un estrés. No obstante, se ha sugerido que los antioxidantes como la curcumina actúan como inhibidores de la proteína id-3 hélice-giro-hélice, de la que se sabe que desregula las líneas celulares de queratinocitos tales como los HaCaT. La expresión DLCL de la cadena ligera de dineína señala la regulación del tráfico intracelular a través de la interacción del citosqueleto.<sup>34, 35, 36, 37</sup>

#### 4. CURCUMIN

*Curcuma longa* is a perennial herb widely cultivated in tropical regions of the Asia. Its rhizome is extensively used to impart colour and flavour to food as a power called turmeric. The pharmacodynamic studies has been performed with a anti-inflammatory activity, effects on the gastrointestinal system.

The data reviewed indicated that extracts of *Curcuma longa* exhibit anti-inflammatory activity after parenteral application in standard animal models used for testing anti-inflammatory activity. It turned out that curcumin and the volatile oil are at least in part responsible for this action. It appears that when orally administered, curcumin is far less active than after intra-peritoneal administration. This may be due to poor absorption. Data on histamine-induced ulcers are controversial, and studies on the secretor activity (HCl, pepsinogen) are still lacking. In vitro, curcumin exhibited antispasmodic activity. Since there was a protective effect of extracts of *Curcuma longa* on the liver and a stimulation of bile secretion in animals, she has been advocated for use in liver disorders in human but deserves further studies for more evidences. In addition, was observed anticoagulant activity, antifertility action, cardiovascular system, lipid metabolism, antibacterial effects, antifungal effects and antitumor activity<sup>38</sup>.

The turmeric anti-oxidant protein (TAP) had been isolated from the aqueous extract of turmeric. The anti-oxidant principle was found to be a heat stable protein. Trypsin treatment abolished the anti-oxidant activity. The anti-oxidant principle had an absorbance maximum at 280 nm. After gel filtration, the protein showed a 2-fold increase in anti-oxidant activity and showed 2 bands in the SDS-PAGE with approximate molecular weight range of 24000 Da. The protein showed a concentration dependent inhibitory effect on the promoter induced lipid peroxidation. A 50% inhibitory activity of lipid peroxidation was observed at a protein concentration of 50 $\mu$ g/mL. Ca<sup>2+</sup>-ATPase of rat brain homogenate was protected to nearly 50% of the initial activity from the lipid peroxidant induced inactivation by this protein. This protection of Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity was found to be associated with the prevention of loss of -SH groups<sup>39, 40</sup>.

#### 4. CURCUMINA

La *Curcuma longa* es una hierba perenne cultivada extensamente en regiones tropicales de Asia. Su rizoma se utiliza de manera muy extendida para dar color y sabor a las comidas en forma de un polvo llamado azafrán de las Indias o cúrcuma. Los estudios farmacodinámicos se realizaron con actividad antiinflamatoria y efectos sobre el sistema gastrointestinal.

Los datos revisados mostraron la actividad antiinflamatoria de los extractos de *Curcuma longa* tras su aplicación parenteral en modelos animales estándar para pruebas en laboratorio. Esto demostró que la curcumina y el aceite volátil son, al menos en parte, responsables de esta acción. Parece que cuando se administra de forma oral, la curcumina es bastante menos activa que tras una administración intraperitoneal. Esto se puede deber a la mala absorción. Los datos sobre úlceras inducidas por histamina son controvertidos y aún no existen estudios sobre la actividad secretora (HC1, pepsinógeno). *In vitro*, la curcumina presentó actividad antiespasmódica. La cúrcuma se recomendó en casos de trastornos hepáticos en humanos, ya que los extractos de *Curcuma longa* tuvieron un efecto protector en el hígado y estimularon la secreción de bilis en animales, pero serán necesarios estudios más profundos para conseguir un mayor número de pruebas. Además, también se observó en la *Curcuma longa* actividad anticoagulante, acción para control de la fertilidad, actividad antitumoral, efectos antifúngicos, efectos antibacterianos y efectos sobre el metabolismo de los lípidos y el sistema cardiovascular<sup>38</sup>.

La proteína antioxidante de la cúrcuma (TAP) se aisló del extracto acuoso de la cúrcuma. Se observó que el principio antioxidante era una proteína termoestable. El tratamiento con tripsina suprimió la actividad antioxidante. El principio antioxidante tuvo una absorción máxima a 280 nm. Tras la filtración en gel, la proteína duplicó su actividad antioxidante y presentó dos bandas en el SDS-PAGE con un rango de peso molecular aproximado de 24000 Da. La proteína mostró un efecto inhibitor dependiente de la concentración en la peroxidación lipídica inducida por la sustancia promotora. Se observó un 50 % de actividad inhibitora de la peroxidación lipídica en una concentración proteínica de 50mg/mL. La Ca<sup>2+</sup>-ATPasa del homogenato del cere-

Curcumin, a major yellow pigment of turmeric obtained from powdered rhizomes of the plant *Curcuma longa* Linn, is commonly used as coloring agent in foods, drugs and cosmetic. In this study we report that gavage administration of 200 mg/kg or 600 mg/kg. Curcumin effectively suppressed diethylnitrosamine (DEN) induced liver inflammation and hyperplasia in rats, as evidenced by histopathological examination. Immunoblotting analysis showed that curcumin strongly inhibited diethylnitrosamine mediated the increased expression of oncogenic p21<sup>ras</sup> and p53 proteins in liver tissues of rats. In cell-cycle-related proteins, curcumin selectively reduced the expression of proliferation cell nuclear antigen, cyclin E and p34<sup>cdc2</sup>, but not Cdk2 or cyclin D1. Moreover, CCM also inhibited the DEN-induced increase of transcriptional factor nf-kappa B. However, curcumin failed to affect DEN-induced c-juan and c-Fos expression. It has become widely recognized that the development of human hepatocellular carcinoma is a predominantly due to the chronic inflammation by virus, bacteria, or chemical. Our results suggest a potential role for curcumin in the prevention of human hepatocellular carcinoma<sup>41</sup>.

Curcuminoids (Curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin) were administered in rats and its absorption and metabolism were investigated by HPLC and LC-MS analysis. The conjugative enzyme activities for glucuronidation and sulfation of curcumin were found in liver, kidney and intestinal mucosa, showing that curcuminoids are absorbed from the alimentary tract and present in the general blood circulation, after largely being metabolized to the form of glucuronide and glucuronide/sulfate conjugates. (Asai, A.; Miyazawa, T. Occurrence of orally administered curcuminoid as glucuronide and glucuronide/sulfate conjugates in rat plasma,<sup>42</sup>.

Curcumin blocked cytokine-induced NF-kappa B activation and the subsequent downstream gene such as iNOs in macrophages and other immune cells. These studies suggest that curcumin prevents the carcinogenic process possibly by ameliorating the inflammation-related events<sup>43</sup>.

Studies on the chemo preventive efficacy of turmeric/curcumin(s) have shown them to possess both anti-initiating as well as anti-promoting activity in several experimental systems<sup>44, 45</sup>. Turmeric/curcumin(s) have been shown to inhi-

bro de rata se protegió hasta casi el 50 % de la actividad inicial de inactivación inducida por peroxidantes de los lípidos mediante esta proteína. Se observó que esta protección de la actividad  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasa estaba asociada con la prevención de pérdida de los grupos  $-\text{SH}$  <sup>39, 40</sup>.

La curcumina, uno de los principales pigmentos amarillos obtenido de los rizomas disecados de la planta *Curcum longa Linn*, se utiliza frecuentemente como agente colorante en alimentos, medicamentos y cosméticos. Este estudio se comunicó que la administración por sonda nasogástrica de 200 mg/kg ó 600 mg/kg. de curcumina suprimía de forma eficaz la inflamación del hígado y la hiperplasia inducida por la dietilnitrosamina (DEN) en ratas, como demostró el examen histopatológico. El análisis de inmunodetección (Immunoblotting) mostró que la curcumina inhibía significativamente la dietilnitrosamina y actuó de mediador en el aumento de la expresión de las oncoproteínas p21<sup>ras</sup> y p53 en los tejidos del hígado de las ratas. En las proteínas relacionadas con el ciclo celular, la curcumina redujo parcialmente la expresión de antígenos nucleares de proliferación, ciclina E y p34<sup>cdc2</sup>, pero no Cdk2 ni D1. Además, la curcumina también inhibió el incremento inducido por DEN del factor de transcripción NF-kappa B. No obstante, la curcumina no afectó a la expresión de c-Fos y c-juan inducida por DEN. Se ha reconocido ampliamente que el desarrollo del carcinoma hepatocelular se debe principalmente a la inflamación crónica causada por virus, bacterias o factores químicos. Nuestros resultados sugieren que la curcumina desempeña un papel fundamental en la prevención del carcinoma hepatocelular humano <sup>41</sup>.

Los curcuminoides (curcumina, demetoxicurcumina y bisdesmetoxicurcumina) se administraron en ratas y se investigó tanto la absorción como el metabolismo mediante análisis HPLC y CLMS. Se encontró actividad enzimática conjugada en la glucuronidación y la sulfatación de la curcumina en la mucosa intestinal, hígado y riñón, lo que demostró que los curcuminoides se absorben en el tracto alimentario y están presentes en el torrente sanguíneo, tras ser metabolizados en forma de conjugados de glucoronidos y sulfatos. (Asai, A.; Miyazawa, T. Occurrence of orally administered curcuminoid as glucuronide and glucuronide/sulfate conjugates in rat plasma, <sup>42</sup>.)

bit <sup>3</sup>H-B(a)P-derived DNA adducts in vitro by interfering with metabolic enzymes<sup>46</sup>. Pretreatment with turmeric/curcumin(s) has also been shown to result in reduced levels of benzo(a)pyrene (B(a)P)-derived DNA adducts in tissues of mice and rats <sup>[38, 39]</sup>. However, pretreatment did not show alterations in levels of total CYP450 or aryl hydroxylase activity in various tissues <sup>49</sup>.

Venkatesan<sup>50</sup> related pulmonary protective effects of curcumin against paraquat toxicity. An early feature of paraquat toxicity in the influx of inflammatory cells, releasing proteolytic enzymes and oxygen free radicals, which can destroy the lung epithelium and result in pulmonary fibrosis. Therefore, the ability to suppress early lung injury seems to be an appropriate therapy of pulmonary damage before the development of irreversible fibrosis. Here its show curcumin confers remarkable protection against paraquat injury <sup>50</sup>.

La curcumina bloqueó la activación NF- $\kappa$ B inducida por citocina y del consiguiente gen descendente ("downstream") como el iNOs en macrófagos y otras células del sistema inmune. Estos estudios sugieren que la curcumina previene el proceso carcinogénico, posiblemente al producir una mejora de los procesos relacionados con la inflamación.

Estudios sobre la eficacia quimiopreventiva de la curcumina demostraron que posee efectos anti-inductor y anti-promotor en diversos sistemas experimentales<sup>44, 45</sup>. Las curcuminas turméricas inhibieron los aductos-ADN derivados de <sup>3</sup>H-B(a)P *in vitro* al interferir con las enzimas metabólicas.

En el pretratamiento con curcumina también se obtuvieron resultados en relación con aductos-ADN derivados de niveles reducidos de benzo(a)pireno (B(a)P) en tejidos de ratones y ratas [38, 39]. Sin embargo, el pretratamiento no alteró los niveles de actividad hidroxilasa o CYP450 total en diversos tejidos<sup>49</sup>.

Venkatesan<sup>50</sup> describió los efectos protectores pulmonares de la curcumina frente a la toxicidad del Paraquat. Uno de los signos iniciales de la toxicidad del Paraquat es su entrada en las células inflamatorias y la liberación de enzimas proteolíticas y radicales libres derivados del oxígeno, que pueden destruir el epitelio pulmonar y provocar fibrosis pulmonar. Por lo tanto, la capacidad de eliminar el daño pulmonar de forma precoz parece ser una terapia adecuada para detener el desarrollo de la fibrosis irreversible. Queda demostrado el notable efecto protector de la curcumina frente a la intoxicación por Paraquat.

## BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Gerster H. Anticarcinogenic effect of common carotenoids. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 1993; 63(2):93-121.
2. Hossain MZ, Yamamoto T, Hertzberg EL, Uemura H, Murphy LJ, Nagy JI. Connexin43 in rat pituitary: localization at pituicyte and stellate cell gap junctions and within gonadotrophs. *Histochemistry* 1993; 100(1):53-64.
3. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 1993; 215(2):213-219.
4. Foote CS, Chang YC, Denny RW. Chemistry of singlet oxygen. X. Carotenoid quenching parallels biological protection. *Journal of the American Chemical Society* 1970; 92(17):5216-5218.
5. Foote CS, Chang YC, Denny RW. Chemistry of singlet oxygen. XI. Cis-trans isomerization of carotenoids by singlet oxygen and a probable quenching mechanism. *Journal of the American Chemical Society* 1970; 92(17):5218-5219.
6. Stahl W, Sies H. Physical quenching of singlet oxygen and cis-trans isomerization of carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1993; 691(31):10-19.
7. McClure TD, Liebler DC. Antioxidant reactions of beta-carotene: identification of carotenoid-radical adducts. *Chemical Research in Toxicology* 1996, 9(1):8-11.
8. Mordt RC, Walton JC, Graham W, Burton L, Hughes KU, Ingold D, Lindsay A. Exploratory study of  $\beta$ -carotene autoxidation. *Tetrahedron Letters* 1991, 32(33):4203-4206.
9. Burton GW, Ingold KU. beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* 1984; 224 (4649):569-573.

10. Palozza P, Krinsky NI. beta-Carotene and alpha-tocopherol are synergistic antioxidants. Archives of Biochemistry and Biophysics 1992; 297(1):184-187.
11. Hanusch M, Stahl W, Schulz WA, Sies H. Induction of gap junctional communication by 4-oxoretinoic acid generated from its precursor canthaxanthin. Archives of Biochemistry and Biophysics 1995; 317(2):423-428.
12. Cecílio Filho, A B. C Souza, R. J.; Braz, L. T.; TTavares, M. Curcuma: Planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais. Ciência Rural, Santa Maria, v. 30, (1), 171-175, 2000
13. São José AB, Souza IVB, Lírio DO, Vilares AS, Rebouças TNH, Morais OM. Rev. Bras. Cor. Nat 1992; 1:25-30.
14. Annon. 1987. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Food advisory Committee. Final report on the review of the coloring matter in food regulations 1973. FDAC/REP/4. London:HMSO
15. Takahashi MY. Monografias de Corantes Naturais para fins alimentícios. 2 ed., São Paulo, 1987, 118p.
16. Carvalho PRN. Rev. Bras. Cor. Nat. 1992; 1:244-45.
17. Prentice- Hernandez, C & Rusing. Os extratos de urucum (*Bixa orellana*) obtido utilizando o álcool etílico como solvente. Arquivos de Biologia e Tecnologia 1992; 35(1):63-74.
18. Takahashi MY, Yabiku HY, Martins MS. Levels of benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavour and some smoked foods. Food Additives and Contaminants 1993; 10(4):399-405.
19. Yabiku HY, Takahshi MY, Caruso MSF, Menezes CAS. Subsídios para o estabelecimento de metodologia para o controle de corantes naturais para alimentos. Rev. Inst. Adolfo Lutz 1986; 46(1/2):11-18.
20. Morrison EY, West ME. The effect of *Bixa orellana* (Annatto) on blood sugar levels in the anaesthetized dog. West Indian medical Journal 1985; 34: 38 n. 1, Jamaica.
21. Morrison EYS, Smith-Richardson SS, West M, Brooks SEH, Pascoe MDK, Fletcher FRCS. Toxicity of the hyperlycaemic inducing extract of the Annatto (*Bixa Orellana*) in the dog. W. J. Med. 1987; 36: 99-102.
22. Thapliyal, R. and Maru, G. B. Inhibition of cytochrome P450 isoenzymes by curcumins in vitro and in vivo Food Chemical Toxicology, v. 39, n. 6, 541-547, 2001.
23. Pourrat H, Bastide P, Dorier Pourrat A, Tronche P. Preparation et activite therapeutic de quelques glycosides d'anthocyanes. Chim. Ther 1967; 2: 33-38.
24. Otori, G (1973). Acute toxicity of coloring matter extracted from Maiz morado (San red No 5N). Unpublished report os San Ei Chem Ind dated 2/6/73.
25. Morazonni P, Magistretti MJ. Effects of *Vaccinium myrtillus* anthocynosides on prostacilin-like activity in rat arterial tissue. Fitoterapia 1986; 57: 11-14.
26. Timberlake CF, Henry BS. Anthocyanins as natural food colorants. In: Plant Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical Celular and medicinal properties. Alan R. Liss, 1988. p. 107-121.
27. Stringheta PC, Bobbio FO, Bobbio PA. The effect of tannic acid on the interaction between anthocyanin and copper, iron and sulfur dioxide. Cienc. Tecnol. Aliment 1995; 15(2):174-175.
28. Shrikhande JA, Franc FJ. Effect of flavonols on ascorbic acid and the anthocyanin stability in model systems. J. of Food Science 1974; 39:904-906.
29. Bastianeto, S.; Ramssamy, C.; Dore, S.; Christen, Y.; Poirier, J.; Quirion, R. The Ginkgo biloba extract (egb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by beta -amyloid. Eur. J. Neurosci 2000; 12(6): 1882-1890.
30. Ihsige K.; Schubert, D.; Sagara, Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanism. Free Radic. Biol. Med 2001; 30(4):433-446.
31. Oken, B. S.; Storzbach, D. M.; Kaye, J. A. The efficacy of Ginkgo biloba on cognitive function in Alzheimer disease. Arch. Neurol. 1998; 55(11):1409-1415.
32. Packer, L. Rimbach, G.; Virgili, F.; Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. Free Radic Biol. Med 1999, 27:704-724.
33. Park, Y, D.; Rimbach, G.; Saliou, C.; Valchi, G.; Packer, L. Activity of monomeric, dimeric, and trimeric flavonoids on NO production., TNF-alpha secretion, and NF-kappa B-dependent gene expression in RAW 2647 macrophages. FEBS Lett 2000; 465: 93-97.
34. Rihn B.; Saliou, C.; Botin, M. C.; Keith, G.; Packer, L.; from ancient remeies to modern therapeutics: pine bark uses in skin disorders revisited. Phytother Res. 2001: 15:76-78.
35. Rimbach, G.; Virgili, F.; Park, Y. C.; Packer, L. Effect of procyanidins from *Pinus maritima* on glutathione levels in endothelial cells challenged by 3-morpholinolinosydnonimine or activate macrophages. Redox Rep 12999; 4:171-177.
36. Sood, A.; Mathew, R.; Trachtman, H. Cytoprotective effect of curcumin in human proximal tubule epithelial cells exposed to shiga toxin. Biochem Biophys Res Commun 2001:283:36-41.
37. Langlands, K.; Down, G. A.; Kealey, TI. ID proteins are dynamically expresse in normal epidermis and dysregulated in squamous cell carcinoma. Cancer Res 2000; 60: 5929-5933.
38. Ammon HPT, Martin AW. Pharmacology of *Curcuma longa*. Review. Planta Medica 1991; 57:1-7.
39. Selvam R, Subramanian L, Gayathri R, Angayarkanni N. The antioxidant activity of turmeric (*Curcuma longa*). J. of Ethnopharmacology 1995; 47:59-67.
40. Shuang-En Chuang, Cheng-Ann-Lii Jen-Kun, Lin JK, Kuo Min-Liang. Inhibition by curcumin of diethylnitrosamine-induced hepatic hyperplasia, inflammation, cellular gene products and cell cycle-related proteins in rats. Food and Chemical toxicology 2000; 38(11):991-995.
41. Akira Asai, Life sciences, 67, 2785-2793, 2000)
42. Briouet I, Oshima H. Curcumin, an anti-tumor promoter and anti-inflammatory agent, inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages. Biochemical and Biophysical Research Communications 1995; 206:533-540.

43. Azuine MA, Bhide SV. Chemo preventive effect of turmeric against stomach and skin tumors induced by chemical carcinogens in Swiss mice. *Nutrition and Cancer* 1992; 17:77-83.
44. Rao CV, Rivenson A, Simi B, Reddy BS. Chemo prevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound. *Cancer Research* 1995; 55:259-266.
45. Mukundan MA, Chacko MC, Annapura VV, Krishnaswamy K. Effect of turmeric and curcumin on BP-DNA adducts. *Carcinogenesis* 1993; 14:493-496.
46. Krishnaswamy K, Gou VK, Sesikeran B, Mukundan MA, Krishana TP. Retardation of experimental tumor genesis and reduction in DNA adducts by turmeric and curcumin. *Nutrition and Cancer* 1998; 30: 163-166.
47. Singletary K, Macdonald C, Waltig B, Fischer C. inhibition of dimethylbenz(a) anthracene (DMBA)-induced mammary tumor genesis and DMBA-DNA adduct formation by curcumin. *Cancer Letters* 1996; 103:137-141.
48. Goud VK, Polasa K, Krishnaswamy K. Effects of turmeric on xenobiotic metabolizing enzymes. *Plant Foods for Human Nutrition* 1993; 44:87-92.
49. Venkatesan N. Pulmonary protective effects of curcumin against paraquat toxicity. *Life Sciences* 2000; 66(2):21-28.
50. Carini, M.; Aldini, G.; Bombardelli, E.; Morazoni, P.; Facino, R. M. UVB induced hemolysis of rat erythrocytes: protective effect of procyanidins from grape seeds. *Life Science* 67: (2000) 1799-1814.