

# Bioactividad de los extractos y aislamiento de los lignanos de las semillas de *Centaurea dealbata*

*Bioactivity of the extracts and the isolation of lignans from the seeds of *Centaurea dealbata**

SHOEB M,<sup>1</sup> JASPARS M,<sup>2</sup> MACMANUS SM,<sup>1</sup> THOO-LIN PK,<sup>3</sup> CELIK S,<sup>4</sup> SARKER SD<sup>5,\*</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, The Robert Gordon University, Schoolhill, Aberdeen AB10 1FR, Escocia, Reino Unido

<sup>2</sup>Marine Natural Products Laboratory, Department of Chemistry, University of Aberdeen, Meston Walk, Old Aberdeen, Aberdeen AB24 3UE, Escocia, Reino Unido

<sup>3</sup>School of Life Sciences, The Robert Gordon University, Aberdeen, Escocia, Reino Unido

<sup>4</sup>Department of Biology, Faculty of Science and Literature, Canakkale 18 Mart University, 17020 Canakkale, Turquía

<sup>5</sup>School of Biomedical Sciences, University of Ulster at Coleraine, Cromore Road, Coleraine BT52 1SA, Co. Londonderry, Irlanda del Norte, Reino Unido

Autor de contacto: s.sarker@ulster.ac.uk

## RESUMEN

La *Centaurea dealbata* Willd. (familia: Asteraceae) pertenece al género *Centaurea*, que comprende unas 500 especies. Para evaluar la actividad antioxidante y la toxicidad general de los extractos de n-hexano, diclorometano (DCM) y metanol (MeOH) de las semillas de *C. dealbata* se han utilizado, respectivamente, el ensayo DPPH y el ensayo de letalidad de gambas en salmuera. Tanto el extracto de DCM como el de MeOH presentaron niveles significativos de actividad antioxidante, con valores de  $RC_{50}$  de  $6,8 \times 10^{-2}$  y  $4,7 \times 10^{-2}$  mg/mL, respectivamente. Ninguno de los extractos presentó una toxicidad general significativa ( $LD_{50} = >1000$  mg/mL). Se observó que los tres principales componentes bioactivos del extracto de MeOH fueron los lignanos arctigenina, arctiina y matairesinósida. Las estructuras de estos lignanos se dilucidaron mediante análisis espectroscópicos exhaustivos y comparación directa con los datos respectivos publicados. Éste es el primer informe sobre la ocurrencia de arctiina y matairesinol en *C. dealbata*. También se presenta la distribución de estos lignanos dentro del género *Centaurea*.

PALABRAS CLAVE: *Centaurea dealbata*. Asteraceae. Ensayo de letalidad de gambas en salmuera. DPPH. Antioxidante. Lignano.

## ABSTRACT

*Centaurea dealbata* Willd. (Family: Asteraceae) belongs to the big genus *Centaurea* that comprises ca. 500 species. The n-hexane, dichloromethane (DCM) and methanol (MeOH) extracts of the seeds of *C. dealbata* have been assessed for antioxidant activity and general toxicity using, respectively, the DPPH assay, and the brine shrimp lethality assay. Both the DCM and the MeOH extract showed significant levels of antioxidant activities with an  $RC_{50}$  value  $6.8 \times 10^{-2}$  and  $4.7 \times 10^{-2}$  mg/mL, respectively. None of the extracts exhibited any significant general toxicity ( $LD_{50} = >1000$  mg/mL). Three major bioactive components of the MeOH extract were found to be the lignans, arctigenin, arctiin and matairesinósida. The structures of these lignans were elucidated by comprehensive spectroscopic analyses, and also by direct comparison with the respective published data. This is the first report on the occurrence of arctiin and matairesinol in *C. dealbata*. The distribution of these lignans within the genus *Centaurea* has also been presented.

KEY WORDS: *Centaurea dealbata*. Asteraceae. Brine Shrimp Lethality Assay. DPPH. Antioxidant. Lignan.

Fecha de recepción: 09-06-06

Fecha aceptación: 19-12-06

## INTRODUCCIÓN

La *Centaurea dealbata* Willd. (familia: Astera-ceae; sección: Psephellus), comúnmente conocida como “azulejo”, “azulejo persa” o “centaurée blanchâtre”, es una planta ornamental perenne de 75-100 cm de altura. Esta especie es originaria de Turquía y se distribuye también en otros países del Asia templada<sup>1,2</sup>. Investigaciones fitoquímicas anteriores de las raíces, las partes verdes y el cáliz (pero no las semillas) de *C. dealbata* revelaron la presencia de diversos derivados del acetileno, monotiofenos, aldehídos tetracíclicos, flavonas y un lignano, (-) –arctigenina<sup>3</sup>. Como parte de nuestros estudios continuados del género *Centaurea*<sup>4-10</sup>, publicamos ahora el resultado del estudio de la actividad antioxidante y la toxicidad general de los extractos de las semillas de *C. dealbata*, efectuados, respectivamente, mediante el ensayo DPPH y el ensayo de letalidad de gambas en salmuera, así como del aislamiento y la identificación de los tres principales lignanos bioactivos, arctigenina, arctiina y matairesinosida, en el extracto de metanol de las semillas de esta planta.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**General:** Los espectros UV se obtuvieron en mediante un espectrómetro Hewlett-Packard 8453 UV-vis. Los espectros de RMN se registraron en CD<sub>3</sub>OD en un espectrómetro de RMN Varian Unity INOVA 400 MHz (400 MHz para <sup>1</sup>H y 100 MHz para <sup>13</sup>C) utilizando el pico de disolvente residual como estándar interno. ESIMS y CIMS en un analizador triple de cuadrupolo Quattro II. La separación de HPLC se efectuó en un sistema Dionex prep-HPLC con un procesador de muestras automático Gynkotek GINA50 y un detector fotográfico de matriz de diodos Dionex UVD340S. Se utilizó una columna preparativa de HPLC Luna C18 (10 m x 250 mm x 21,2 mm). Para el fraccionamiento previo HPLC se utilizó un cartucho Sep-Pak DSC-18 Supelco 10 g. El espectro de HMBC se optimizó para un JH–C de amplio rango de 9 Hz y se realizó el experimento NOESY con un tiempo de mezclado de 0,8 s.

*Material de la planta:* Las semillas (100 g) de *Centaurea dealbata* se adquirieron a B & T World Seeds sarl, Pauquignan, 34210 Olonzac,

## INTRODUCTION

*Centaurea dealbata* Willd. (Family: Astera-ceae; section: Psephellus), commonly known as “Whitewash cornflower”, “Persian cornflower” or “centaurée blanchâtre” is an ornamental perennial plant (height 75-100 cm). This species is indigenous to Turkey and also distributed in a number of other countries of temperate Asia.<sup>1,2</sup> Previous phytochemical investigation on the roots, green parts and flower head, but not the seeds, of *C. dealbata* revealed the presence of a number of acetylene derivatives, monothiophenes, tetracyclic aldehydes, flavones and a lignan, (-) –arctigenin.<sup>3</sup> As a part of our on-going studies on the genus *Centaurea*,<sup>4-10</sup> we now report on the assessment of the extracts of the seeds of *C. dealbata* for antioxidant activity and general toxicity using, respectively, the DPPH assay, and the brine shrimp lethality assay, and also on the isolation and identification of three major bioactive lignans, arctigenin, arctiin and matairesinoside from the methanol extract of the seeds of this plant.

## MATERIALS AND METHODS

**General:** UV spectra were obtained using a Hewlett–Packard 8453 UV–Vis spectrometer. NMR spectra were recorded in CD<sub>3</sub>OD on a Varian Unity INOVA 400 MHz NMR Spectrometer 400 (400 MHz for <sup>1</sup>H and 100 MHz for <sup>13</sup>C) using the residual solvent peaks as internal standard. ESIMS and CIMS on a Quattro II triple quadrupole instrument. HPLC separation was performed in a Dionex prep-HPLC System coupled with Gynkotek GINA50 autosampler and Dionex UVD340S Photo-Diode-Array detector. A Luna C18 preparative HPLC column (10 m x 250 mm x 21.2 mm) was used. Sep-Pak DSC-18 Supelco 10 g cartridge was used for pre-HPLC fractionation. HMBC spectra were optimized for a long-range JH–C of 9 Hz and NOESY experiment was carried out with a mixing time of 0.8 s.

*Plant Materials:* The seeds (100 g) of *Centaurea dealbata* were purchased from the B & T World Seeds sarl, Pauquignan, 34210 Olonzac, France, and a voucher specimen (PHSH0003) has been kept in the herbarium of the Plant and Soil Science Department, University of Aberdeen, UK (ABD).

Francia, y un espécimen de catálogo (PHSH0003) se ha conservado en el herbario del Departamento de Ciencias de las Plantas y la Tierra de la Universidad de Aberdeen, Reino Unido (ABD).

**Extracción:** La extracción Soxhlet de las semillas, secas y molidas, de *C. dealbata* (100 g) se realizó, sucesivamente, con *n*-hexano, diclorometano (DCM) y metanol (MeOH). Los disolventes se eliminaron de los extractos utilizando un evaporador rotativo a una temperatura no superior a 45 °C.

**Aislamiento de los compuestos:** El extracto de MeOH (2.0 g) se fraccionó mediante el método de extracción de fase sólida, utilizando un cartucho de Sep-Pak C<sub>18</sub> (10 g) diluido con un gradiente de paso de 40, 60, 80 y 100% MeOH en agua (200 mL cada uno). El HPLC preparativo (diluido con un gradiente lineal agua:MeOH= 70:30 a 20:80 durante 50 minutos, seguido de 80% MeOH durante 10 minutos, 20 mL/minuto, detección a 220 nm) de la fracción de Sep-Pak, que se diluyó con 60% MeOH, obteniéndose matairesinosida (**1**, 13,9 mg, obtención = 0,0139%, *t<sub>R</sub>* = 15,6 min.), arctiina (**2**, 203,4 mg, obtención = 0,2034%, *t<sub>R</sub>* = 17,2 min.) y arctigenina (**3**, 8,2 mg, obtención = 0,0082%, *t<sub>R</sub>* = 20,7 min.).

Matairesinosida [**1**]. Resina,  $[\alpha]_D^{23}$  -48,8° (c 0,0022, MeOH); UV  $\lambda_{\text{máx}}$  (MeOH): 279, 222; ESIMS *m/z* 543 [M+Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) y <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): como datos publicados<sup>6</sup>.

Arctiina [**2**]. Resina,  $[\alpha]_D^{23}$  -55,3° (c 0,0033, MeOH); UV  $\lambda_{\text{máx}}$  (MeOH): 279, 225; CIMS *m/z* 552 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) y <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): como datos publicados<sup>6</sup>.

Arctigenina [**3**]. Resina,  $[\alpha]_D^{23}$  -42,6° (c 0,0015, MeOH); UV  $\lambda_{\text{máx}}$  (MeOH): 281, 220; ESIMS *m/z* 395 [M+Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) y <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): como datos publicados<sup>14,15</sup>.

**Ensayo de letalidad de gambas en salmuera:** Las huevas de gambas en salmuera se adquirieron a Water Life, Middlesex, Reino Unido. El bioensayo se realizó según el procedimiento publicado anteriormente<sup>11</sup>. Los valores de LD<sub>50</sub>

**Extraction:** The dried and ground seeds of *C. dealbata* (100 g) were Soxhlet-extracted, successively, with *n*-hexane, dichloromethane (DCM) and methanol (MeOH). The solvents were removed from the extracts using a rotary evaporator at a temperature not exceeding 45° C.

**Isolation of compounds:** The MeOH extract (2.0 g) was fractionated by solid-phase extraction method using a Sep-Pak C<sub>18</sub> (10 g) cartridge eluting with a step gradient: 40, 60, 80 and 100% MeOH in water (200 mL each). Preparative HPLC (eluted with a linear gradient- water: MeOH= 70:30 to 20:80 over 50 min followed by 80% MeOH for 10 min, 20 mL/min, detection at 220 nm) of the Sep-Pak fraction, which was eluted with 60% MeOH, yielded matairesinoside (**1**, 13.9 mg, yield = 0.0139%, *t<sub>R</sub>* = 15.6 min), arctiin (**2**, 203.4 mg, yield = 0.2034%, *t<sub>R</sub>* = 17.2 min) and arctigenin (**3**, 8.2 mg, yield = 0.0082%, *t<sub>R</sub>* = 20.7 min).

Matairesinoside [**1**]. Gum,  $[\alpha]_D^{23}$  -48.8° (c 0.0022, MeOH); UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH): 279, 222; ESIMS *m/z* 543 [M+Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) and <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): as published data.<sup>6</sup>

Arctiin [**2**]. Gum,  $[\alpha]_D^{23}$  -55.3° (c 0.0033, MeOH); UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH): 279, 225; CIMS *m/z* 552 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) and <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): as published data.<sup>6</sup>

Arctigenin [**3**]. Gum,  $[\alpha]_D^{23}$  -42.6° (c 0.0015, MeOH); UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH): 281, 220; ESIMS *m/z* 395 [M+Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) and <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): as published data.<sup>14,15</sup>

**Brine Shrimp Lethality assay:** Brine shrimp eggs were purchased from Water Life, Middlesex, UK. The bioassay was conducted following the procedure published previously.<sup>11</sup> LD<sub>50</sub>s were determined from the 24 h counts using the Probit analysis method.<sup>12</sup> Percentage mortalities were adjusted relative to the natural mortality rate of the control, following Abbots formula  $P = (Pi - C)/(1 - C)$ , where P denotes the observed non-zero mortality rate and C represents the mortality rate of the control.

se determinaron a partir de los recuentos de 24 h mediante el método de análisis de probit<sup>12</sup>. Los porcentajes de mortalidad se ajustaron en relación al índice de mortalidad natural, según la fórmula de Abbotts  $P = (P_i - C)/(1 - C)$ , donde P denota el índice de mortalidad observado distinto de cero y C representa el índice de mortalidad del control.

*Ensayo de DPPH:* El 2,2-Difenil-1-picrilhidracil (DPPH), fórmula molecular  $C_{18}H_{12}N_5O_6$ , se adquirió a Fluka Chemie AG, Bucks. La quercetina se obtuvo de Avocado Research Chemicals Ltd, Shore road, Heysham, Lancs. Se adoptó el método utilizado por Takao et al.<sup>13</sup> con las modificaciones adecuadas<sup>9</sup>. Se disolvió el DPPH (4 mg) en MeOH (50 mL) hasta obtener una concentración de 80 µg/mL.

*Ensayo cualitativo:* Los extractos del análisis y los lignanos [1-3] se colocaron en una placa de CCF y se les pulverizó con solución DPPH mediante un atomizador. Se dejó desarrollar durante 30 min. Se registraron los cambios de color (púrpura sobre blanco).

*Ensayo cuantitativo:* Los extractos de *n*-hexano y DCM se disolvieron en DCM, y el extracto de MeOH en MeOH, para obtener la concentración de análisis de 10 mg/mL. Los compuestos del análisis 1-3 se disolvieron en MeOH para obtener una concentración de 0,5 mg/mL en el caso de los lignanos. Se realizaron diluciones para obtener concentraciones de  $5 \times 10^{-2}$ ,  $5 \times 10^{-3}$ ,  $5 \times 10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-7}$ ,  $5 \times 10^{-8}$ ,  $5 \times 10^{-9}$ ,  $5 \times 10^{-10}$  mg/mL. Las soluciones diluidas (1,00 mL de cada una) se mezclaron con DPPH (1,00 mL) y se dejaron reposar durante 30 min. para que se produjera cualquier reacción. La absorbencia UV se registró a 517 nm. El experimento se realizó por triplicado y se registró la absorción media de cada concentración. Se siguió el mismo procedimiento para los controles positivos, quercetina y trolox.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis HPLC preparativo de fase inversa del extracto de metanos de las semillas de *C. dealbata* produjo tres lignanos de dibencilbutirolactona, que según los análisis espectroscópicos

*DPPH assay:* 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), molecular formula  $C_{18}H_{12}N_5O_6$ , was obtained from Fluka Chemie AG, Bucks. Quercetin was obtained from Avocado Research Chemicals Ltd, Shore road, Heysham, Lancs. The method used by Takao et al.<sup>13</sup> was adopted with suitable modifications.<sup>9</sup> DPPH (4 mg) was dissolved in MeOH (50 mL) to obtain a concentration of 80 µg/mL.

*Qualitative assay:* Test extracts, and the lignans [1-3] were applied on a TLC plate and sprayed with DPPH solution using an atomiser. It was allowed to develop for 30 min. The colour changes (purple on white) were noted.

*Quantitative assay:* The *n*-hexane and DCM extract were dissolved in DCM, and the MeOH extract in MeOH to obtain the test concentration 10 mg/mL. Test compounds 1-3 were dissolved in MeOH to obtain a concentration of 0.5 mg/mL for the lignans. Dilutions were made to obtain concentrations of  $5 \times 10^{-2}$ ,  $5 \times 10^{-3}$ ,  $5 \times 10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-7}$ ,  $5 \times 10^{-8}$ ,  $5 \times 10^{-9}$ ,  $5 \times 10^{-10}$  mg/mL. Diluted solutions (1.00 mL each) were mixed with DPPH (1.00 mL) and allowed to stand for half an hour for any reaction to occur. The UV absorbance was recorded at 517 nm. The experiment was performed in triplicate and the average absorption was noted for each concentration. The same procedure was followed for the positive controls, quercetin and trolox.

## RESULTS AND DISCUSSION

Reversed-phase preparative-HPLC analysis of the methanol extract of the seeds of *C. dealbata* afforded three dibenzylbutyrolactone lignans, which on the basis of comprehensive spectroscopic analyses (e.g. UV, ESIMS or CIMS, and 1D and 2D NMR), were characterised as matairesinoside [1], arctiin [2] and arctigenin [3]. Among the lignans, arctiin [1] was the major compound with a yield of 0.2034%.

All three compounds [1-3] exhibited characteristic UV absorption maxima of dibenzylbutyrolactone-type lignans. While a CIMS spectrum of 2 revealed the pseudomolecular ion  $[M+NH_4]^+$  at  $m/z$  552, the ESIMS spectra of 1 and 3 revealed the pseudomolecular ions  $[M+Na]^+$  at  $m/z$  543 and 395, respectively. On the basis of the pseu-

exhaustivos (UV, ESIMS o CIMS, y 1D y 2D NMR), se caracterizaron como matairesinosida [1], arctiina [2] y arctigenina [3]. Entre los lignanos, la arctiina [1] fue el compuesto mayor, con un rendimiento de 0,2034%.

Los tres compuestos [1-3] presentaron la característica absorción UV máxima de los lignanos de tipo dibencilbutirolactona. Si bien el espectro de CIMS de 2 reveló el ión pseudomolecular [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> a *m/z* 552, el espectro de ESIMS de 1 y 3 reveló los iones pseudomoleculares [M+Na]<sup>+</sup> a *m/z* 543 y 395, respectivamente. Tomando como base los picos de ión pseudomolecular, la fórmula molecular de 1-3 se pudo determinar como C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>O<sub>11</sub>, C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>O<sub>11</sub> y C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>O<sub>6</sub> respectivamente. Los espectros <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C NMR de 1-3 fueron idénticos a los publicados para matairesinosida [1]<sup>6</sup>, arctiina [2]<sup>6</sup> y arctigenina [3]<sup>14,15</sup>. Una combinación de análisis espectrales HMQC, HMBC, COSY y NOESY 2D NMR llevó a la asignación inequívoca de todas las señales <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C NMR de 1-3 y confirmó sin lugar a dudas sus identidades. Este es el primer estudio sobre el análisis fitoquímico del extracto de MeOH de las semillas de *C. dealbata*, y también del aislamiento de arctiina [2] y matairesinosida [1] de *C. dealbata*. La distribución de estos lignanos dentro del género *Centaurea* se resume en la Tabla 2. La coexistencia de estos lignanos en las especies de *Centaurea* puede tener alguna significación quimiotaxonómica.

domolecular ion peaks, the molecular formula of 1-3 could be worked out as C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>O<sub>11</sub>, C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>O<sub>11</sub> and C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>O<sub>6</sub>, respectively. The <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra of 1-3 were identical to those published for matairesinoside [1]<sup>6</sup>, arctiin [2]<sup>6</sup> and arctigenin [3]<sup>14,15</sup>. A combination of HMQC, HMBC, COSY and NOESY 2D NMR spectral analyses led to the unambiguous assignment of all <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR signals of 1-3 and confirmed unequivocally their identities. This is the first report on the phytochemical analysis of the MeOH extract of the seed of *C. dealbata*, and also on the isolation of arctiin [2] and matairesinoside [1] from *C. dealbata*. The distribution of these lignans within the genus *Centaurea* is summarised in Table 2. The co-occurrence of these lignans in the species of *Centaurea* might have some chemotaxonomic significance.

**TABLA 2.** Distribución de los lignanos 1-3 dentro del género *Centaurea*.  
**TABLE 2.** Distribution of lignans 1-3 within the genus *Centaurea*.

Especies <i>Species</i>	Lignanos <i>Lignans</i>			Referencias <i>References</i>
	1	2	3	
<i>C. affinis</i>	-	-	+	16
<i>C. alexandria</i>	-	+	-	17
<i>C. americana</i>	+	+	-	6
<i>C. calcitrapa</i>	-	-	+	16
<i>C. cuneifolia</i>	-	-	+	16
<i>C. dealbata</i>	-	+	+	Trabajo actual <i>Present work</i>
<i>C. isaurica</i>	-	+	-	16
<i>C. macrocephala</i>	+	+	+	6, 16
<i>C. melitensis</i>	-	+	-	17
<i>C. nicaensis</i>	-	-	+	6
<i>C. napifolia</i>	-	-	+	6
<i>C. nervosa</i>	-	-	+	16
<i>C. nigra</i>	+	+	-	6, 16
<i>C. phrygia</i>	-	-	+	16
<i>C. scabiosa</i>	+	-	-	6
<i>C. sclerolepis</i>	+	+	-	17
<i>C. scoparia</i>	-	-	+	6, 16
<i>C. solstitialis</i>	-	-	+	6, 16
<i>C. sphaerocephala</i>	-	+	+	6
<i>C. schischkinii</i>	+	+	+	4
<i>C. tweediei</i>	-	-	+	6, 16

En el ensayo DPPH, además del extracto de *n*-hexano, los otros dos extractos, DCM y MeOH, presentaron una actividad de barrido de radicales libres significativa (actividad antioxidante) con valores de  $RC_{50}$  de  $6,8 \times 10^{-2}$  y  $4, \times 10^{-2}$  mg/mL, respectivamente (Tabla 1). Todos los lignanos [1-3] aislados del extractos de MeOH presentaron una actividad de barrido de radicales libres significativa, y los valores de  $RC_{50}$  fueron idénticos a los publicados en la literatura<sup>4,6</sup>. La actividad antioxidante de 1-3, al igual que otros antioxidantes fenólicos naturales como los flavonoides, es consecuencia de la presencia de fracciones fenólicas en las estructuras. La actividad antioxidante de los productos fenólicos naturales se debe principalmente a sus propiedades redox, es decir, a su capacidad para actuar como agentes reductores, donantes de hidrógeno y receptores de singletes de oxígeno y, en cierta medida, podría deberse también a su potencial de quelación de metales.

In the DPPH assay, apart from the *n*-hexane extract, the other two extracts, DCM and MeOH, displayed significant free radical scavenging activity (antioxidant activity) with an  $RC_{50}$  value  $6.8 \times 10^{-2}$  and  $4.7 \times 10^{-2}$  mg/mL, respectively (Table 1). All lignans [1-3], isolated from the MeOH extract showed significant free radical scavenging activity and the  $RC_{50}$  values were identical to those published in the literature<sup>4,6</sup>. The antioxidant activity of 1-3, like any other natural phenolic antioxidants, e.g. flavonoids, is a consequence of the presence of the phenolic moieties in the structures. The antioxidant activity of phenolic natural products is predominantly due to their redox properties, i.e. the ability to act as reducing agents, hydrogen donors and singlet oxygen quenchers, and to some extent, could also be due to their metal chelation potential.

**TABLA 1.** Actividad antioxidante y toxicidad general de los extractos de *C. dealbata* y los lignanos aislados (1-3)

**TABLE 1.** Antioxidant activity and general toxicity of the extracts of *C. dealbata* and isolated lignans (1-3).

Compuestos/Extractos <i>Compounds/Extracts</i>	Ensayo de DPPH ( $RC_{50}$ en mg/mL) <i>DPPH assay (<math>RC_{50}</math> in mg/mL)</i>	Ensayo de letalidad de gambas en salmuera ( $LD_{50}$ en $\mu$ g/mL) <i>Brine Shrimp Lethality assay (<math>LD_{50}</math> in <math>\mu</math>mL)</i>
Extracto de <i>n</i> -Hexano <i>n-Hexane extract</i>	-	NE ND
Extractos de DCM <i>DCM extracts</i>	$6,8 \times 10^{-2}$	1100
Extractos de MeOH <i>MeOH extracts</i>	$4,7 \times 10^{-2}$	1100
<b>1</b>	$2,2 \times 10^{-3}$	16,0
<b>2</b>	$16,0 \times 10^{-2}$	98,0
<b>3</b>	$1,9 \times 10^{-2}$	2,0
Podofilotoxina <i>Podophyllotoxin</i>	NA	2,79
Quercetina (en MeOH) <i>Quercetin (in MeOH)</i>	$2,88 \times 10^{-5}$	NA
Trolox (en DCM) <i>Trolox (in DCM)</i>	$2,58 \times 10^{-3}$	NA

- = No se detectó ninguna actividad en las concentraciones del análisis;

NA = No aplicable

NE = No efectuado

- = *No activity detected at test concentrations;*

NA = *Not applicable*

ND = *Not done*

Para determinar la toxicidad general de los extractos y de los compuestos 1-3 se utilizó el ensayo de letalidad de gambas en salmuera, que ha demostrado ser un método de ensayo rápido y eficaz para la detección de compuestos con toxicidad general y actividad citotóxica potencial<sup>11</sup>.

The brine shrimp lethality assay, which has been proven to be an effective and rapid assay method to screen compounds for potential general toxicity and cytotoxic activity<sup>11</sup> was used to determine the general toxicity of the extracts as well as the compounds 1-3. However, owing to high

No obstante, debido al alto grado de lipofiliidad, el extracto de *n*-hexano no se pudo analizar en este ensayo. Aunque ninguno de los extractos ha presentado una toxicidad general significativa ( $LD_{50} = >1000$  mg/mL), los lignanos aislados [**1-3**] presentaron una toxicidad general considerable con las gambas en salmuera. Los valores de  $LD_{50}$  fueron idénticos a los publicados anteriormente<sup>4,6</sup>. La arctigenina [**3**] presente el mayor grado de toxicidad, con un valor de  $LD_{50}$  de 2  $\mu$ g/L, que resulta sorprendentemente inferior al del control positivo, podofilotoxina, un lignano citotóxico conocido. La glucosidación de **3**, produciendo arctiina [**2**], redujo considerablemente la toxicidad (~50 veces).

### CONCLUSIÓN

Tanto el extracto de DCM como el de MeOH fueron activos como antioxidantes, y la actividad del extracto de MeOH se debió principalmente a la presencia de lignanos del tipo dibencilbutirrolactona **1-3** en grandes cantidades.

### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dra. Lutfun Nahar (Coleraine, Reino Unido) sus valiosos comentarios durante la preparación de este manuscrito.

degree of lipophilicity, *n*-hexane extract could not be tested in this assay. While none of the extracts demonstrated any significant general toxicity ( $LD_{50} = >1000$  mg/mL), the isolated lignans [**1-3**] showed considerable general toxicity towards brine shrimps. The  $LD_{50}$  values were identical to those published previously<sup>4,6</sup>. Arctigenin [**3**] exhibited the highest degree of toxicity with a  $LD_{50}$  value of 2  $\mu$ g/L, which is surprisingly lower than that of the positive control, podophyllotoxin, a known cytotoxic lignan. The glucosidation of **3**, yielding arctiin [**2**], considerably reduced the toxicity (~50 times).

### CONCLUSION

Both the DCM and the MeOH extracts were active as antioxidants, and the activity of the MeOH extract was mainly due to the presence of dibenzylbutyrolactone type lignans **1-3** in high amounts.

### ACKNOWLEDGEMENT

Dr Lutfun Nahar (Coleraine, UK) is thanked for her valuable comments during the preparation of this manuscript.

### BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. GRIN Taxonomy Database. USDA, ARS, Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, Maryland, USA. 2006. Available on-line at: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?100749>
2. PANDORA Taxonomic Database. Flora Europaea, Royal Botanic Garden Edinburgh, UK. Available on-line at: <http://193.62.154.38/FE/fe.html>
3. Christensen LP, Lam J. Acetylenes and other constituents from *Centaurea* species. *Phytochemistry*. 1991; 30:3289-3292.
4. Shoeb M, Celik S, Jaspars M, Kumarasamy Y, MacManus SM, Nahar L, Thoo-Lin PK, Sarker SD. Isolation, structure elucidation and bioactivity of schischkiniin, a unique indole alkaloid from the seeds of *Centaurea schischkini*. *Tetrahedron*. 2005; 61: 9001-9006.
5. Sarker SD, Kumarasamy Y, Shoeb M, Celik S, Yucel E, Middleton M, Nahar L. Antibacterial and antioxidant activities of three Turkish species of the genus *Centaurea*. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*. 2005; 5: 246-250.
6. Shoeb M, Rahman MM, Nahar L, Jaspars M, MacManus S, Delazar A, Sarker SD. Bioactive lignans from the seeds of *Centaurea macrocephala*. *DARU*. 2004; 12: 87-93.
7. Kumarasamy Y, Nahar L, Cox PJ, Dinan LN, Ferguson CA, Finnie D, Jaspars M, Sarker SD. Biological activities of lignans from *Centaurea scabiosa*. *Pharm. Biol.* 2003; 41: 203-206.
8. Kumarasamy Y, Nahar L, Cox PJ, Jaspars M, Sarker SD. Screening seeds of Scottish plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacology* 2002; 83: 73-77.
9. Kumarasamy Y, Fergusson M, Nahar L, Sarker SD. Biological activity of moschamindole from *Centaurea moschata*. *Pharm. Biol.* 2002; 40: 307-310.
10. Sarker SD, Laird A, Nahar L, Kumarasamy Y, Jaspars M. Indole alkaloids from the seeds of *Centaurea cyanus* (Asteraceae). *Phytochemistry* 2001; 57: 1273-1276.

11. Meyer BN, Ferrigni RN, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, Mclaughlin JL. Brine shrimp: a convenient bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* 1982; 45: 31-34.
12. Finney DJ. *Probit Analysis*, 3<sup>rd</sup> edn, Cambridge University Press, Cambridge, 1971.
13. Takao T., Watanabe N, Yagi I, Sakata K. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Biosci. Biotech. Biochem* 1994; 58: 1780-1783.
14. Rahman, MMA, Dewic, PM, Jackson DE, Lucas J. Lignans of *Forsythia intermedia*. *Phytochemistry* 1990; 29: 1971-1980.
15. Nishibe S, Tsukamoto H, Hisada S. Effects of *O*-methylation and *O*-glucosylation on carbon-13 nuclear magnetic resonance chemical shifts of matairesinol, (+)-pinoresinol and (+)-epipinoresinol. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 1984; 32: 4653-4657.
16. ISI Web of Knowledge, 2006; Available on-line at: <http://portal.isiknowledge.com/portal.cgi?DestApp=WOS&Func=Frame>
17. Erdemgil Z, Rosselli S, Maggio AM, Raccuglia RA, Celik S, Michalska K, Kisiel W, Bruno M. An unusual pregnane derivative and dibenzylbutyrolactone lignans from *Centaurea sclerolepis*. *Polish Journal of Chemistry* 2006; 80: 647-650.