

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Farmacología



TESIS DOCTORAL

Estudio analítico y de la actividad antioxidante de "Rosmarinus officinalis" L. de la Península Ibérica

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Manal Abuashwashi

Directores

María Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado
Olga María Palomino Ruiz-Poveda

Madrid, 2018



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**Estudio analítico y de la actividad
antioxidante de *Rosmarinus officinalis* L.
de la península Ibérica**

TESIS DOCTORAL

MANAL ABUASHWASHI

MADRID, 2017



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

**Estudio analítico y de la actividad antioxidante de
Rosmarinus officinalis L. de la península Ibérica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Manal Abuashwashi

DIRECTORAS

María Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado

Olga María Palomino Ruiz-Poveda

Madrid, 2017



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacología

Dra Dña M^a María Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado, Profesora Titular, y Dra Dña Olga M^a Palomino Ruiz-Poveda, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN :

Que el trabajo de investigación titulado «**Estudio analítico y de la actividad antioxidante de *Rosmarinus officinalis* L. de la península Ibérica**», presentado por Dña Manal Abuashwashi ha sido realizado en este Departamento, bajo nuestra inmediata dirección y asesoramiento, reuniendo todos los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor en Farmacia.

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

Y para que conste a los efectos oportunos, lo firmamos en Madrid, a 18 de abril de 2017

Dra M^a Pilar Gómez-Serranillos

Dra Olga M^a Palomino

Agradecimientos

A lo largo de estos años he recibido el apoyo de muchas personas, por eso quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas que han contribuido a que esta Tesis Doctoral se haya podido llevar a cabo. En primer lugar, quisiera dar las gracias a Dios y a mi país, Libia, por darme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación.

A la Dra. M^a Emilia Carretero Accame, por aceptarme sin reparos como alumna y haberme dado la gran oportunidad de conocer de cerca el mundo de la investigación científica.

A mis directoras de tesis, la Dra. M^a Pilar Gómez-Serranillos por su dirección y asesoramiento. A la Dra. Olga M^a Palomino Ruiz-Poveda, por todo el interés mostrado hacia la presente Tesis Doctoral, así como por su amabilidad, por haberme brindado su ayuda en todo momento y poder contar siempre con su apoyo.

A todo el Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la UCM, y en especial a la directora, Dra Juana Benedí González, a la Dra. Sagrario Martín por su ayuda en las células y su apoyo; a la Dras Teresa Ortega, Paulina Bermejo, Paloma Bermejo, Karla Slowing, Beatriz de las Heras y Luis Miguel Bedoya del Olmo por sus constantes ánimos

A todos mis compañeros del Departamento por su acogida, y en especial a Ana del Castañar por su gran corazón y gran calidad humana y por estar siempre dispuesta a perder su valioso tiempo en ayudarme; a Carlos, por ser un buen compañero de laboratorio y por toda su ayuda durante estos años. Y por supuesto, gracias a Alba, Jorge, Vanesa, Firas, Elena, Víctor y Guillermo por vuestro ánimo y cariño. Así como al resto de compañeros que ya se fueron y dejaron huella como Eva, Tarek El Naggar, Tarek Essa, Nagla y María. Gracias a Rosa por tus ánimos llenos de cariño, a Jesús, Azucena y Nieves.

A mis amigas Namat, Ranim, Hana, Naziha, Shader, Shiela y Sara por ser mi apoyo incondicional, su cariño y comprensión.

A toda mi familia en Libia, especialmente a mi madre y mis hermanos.

Pero a quien realmente quiero agradecer y dedicar esta tesis es a mi pequeña familia, mi marido, y mis hijos, por su paciencia, amor, comprensión y por vivir conmigo todo lo bueno y lo malo de esta tesis.



*A la memoria de mi padre
Es largo y solitario el camino sin tí,
Pero te llevo en mis recuerdos,
Aunque no estés hoy conmigo*

ABREVIATURAS

AAPH	2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro
ANOVA	Análisis de la varianza
AUC	Área bajo la curva
BSA	Albúmina sérica bovina
CAT	Catalasa
CG	Cromatografía de gases
DCF	Diclorofluoresceína
DCFH	Diclorofluoresceína desacetilada
DCFH-DA	Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EA	Enfermedad de Alzheimer
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
EP	Enfermedad de Parkinson
FBS	Suero fetal bovino
ERNs	Especies reactivas de nitrógeno
EROs	Especies reactivas de oxígeno
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
HEPES	Ácido <i>N</i> -(2-hidroxietil) piperacina- <i>N'</i> -2'-etanosulfónico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IR	Índice redox

LO•	Radical alcoxilo
LOO•	Radical peroxilo
MDA	Malondialdehído
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-ilo]-2,5-difeniltetrazol
NEM	<i>N</i> -etilmaleimida
O₂•⁻	Radical superóxido
ONOO⁻	Anión peroxinitrito
OPT	Fluoróforo <i>o</i> -ptaldehido
ORAC	Capacidad de absorbción del radical oxígeno
PBS	Tampón fosfato salino
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonio
RL	Radical libre
rpm	Revoluciones por minuto
t_R	Tiempo de retención
DS	Desviación estándar
sd	Sin detectar
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
TRIS	Tris(hidroximetil aminometano)

INDICE

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1. SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	9
2.2. ESTRÉS OXIDATIVO.....	13
2.2.1. RADICALES LIBRES.....	13
2.2.2. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....	16
2.2.3. ESPECIES REACTIVAS DE NITRÓGENO.....	23
2.2.4. FUENTES DE PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES	24
2.2.5. SISTEMAS ANTIOXIDANTES.....	26
2.2.5.1. Sistema antioxidante no enzimático.....	27
2.2.5.2. Sistema antioxidante enzimático.....	30
2.2.6. Daño oxidativo a las biomoléculas.....	33
2.2.7. Daño oxidativo y enfermedades neurodegenerativas	36
2.3. <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	39
2.3.1. ESTUDIO BOTÁNICO	39
2.3.2. ESTUDIO FITOQUÍMICO.....	43
2.3.2.1. Compuestos polifenólicos.....	43
2.3.2.2. Aceite esencial.....	48

2.3.3. ESTUDIO ETNOFARMACOLOGICO.....	51
2.3.4. ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA.....	53
2.3.4.1. Preparaciones de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	53
2.3.4.2. Aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	58
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	61
3.1. MATERIAL.....	63
3.1.1. MATERIAL VEGETAL.....	63
3.1.1.1. <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	63
3.1.1.1.1. Aceite esencial.....	65
3.1.1.1.2. Extracto metanólico.....	65
3.1.2. MATERIAL CELULAR.....	65
3.1.2.1. Cultivo celular.....	65
3.1.2.2. Material de cultivo celular.....	66
3.1.2.3. Tóxico.....	66
3.2. MÉTODOS.....	68
3.2.1. HUMEDAD.....	68
3.2.2. ESTUDIO FITOQUÍMICO.....	68
3.2.2.2. Obtención del aceite esencial.....	68

3.2.2.2. Caracterización del aceite esencial por Cromatografía de gases (CG).....	69
3.2.2.3. Extracto metanólico.....	69
3.2.2.4. Caracterización de los extractos metanólicos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	70
3.2.2.5. Determinación del contenido total en compuestos fenólicos	70
3.2.3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA ...	72
3.2.3.1. Determinación de la actividad antioxidante: capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno (ORAC).....	72
3.2.3.2. Determinación del radical DPPH.....	74
3.2.4. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	76
3.2.4.1. Cultivos celulares.....	76
3.2.4.1.1. Preparación de las muestras.....	78
3.2.4.1.2. Tratamiento celular	79
3.2.4.2. Estudios sobre cultivos celulares	79
3.2.4.2.1. Estudio de viabilidad celular.....	79
3.2.4.2.2. Evaluación del daño celular.....	80
3.2.4.2.3. Estudio de la morfología celular.....	81
3.2.4.2.4. Actividad antiradicalaria.....	81
3.2.4.2.5. Preparación de los extractos celulares.....	82

3.2.4.2.6. Determinación de la concentración de las proteínas ...	83
3.2.4.2.7. Determinación de los niveles de glutatión.....	84
3.2.4.2.8 Determinación de los niveles de GSH.....	85
3.2.4.2.9. Determinación de los niveles de GSSG	86
3.2.4.2.10 Determinación de la actividad caspasa-3.....	87
3.2.4.2.11. Determinación de la peroxidación lipídica.....	88
3.2.4.2.12. Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes.....	89
3.2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	91
4. RESULTADOS.....	93
4.1 HUMEDAD.....	95
4.2. ACEITE ESENCIAL DE <i>Rosmarinus officinalis L.</i>	96
4.2.1. ESTUDIO FITOQUÍMICO.....	96
4.2.1.1. Rendimiento.....	96
4.2.1.2. Composición	97
4.2.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA....	104
4.2.2.1. Actividad antioxidante in vitro (ORAC).....	104
4.2.2.2. Determinación del radical DPPH.....	106
4.2.3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	108

4.2.3.1. Viabilidad celular	108
4.2.3.2. Evaluación del daño celular.....	109
4.2.3.3. Estudio de la morfología celular.....	110
4.2.3.4. Actividad antiradicalaria.....	111
4.2.3.5. Determinación de los niveles de glutatión.....	114
4.2.3.6. Determinación de la actividad caspasa-3.....	116
4.2.3.7. Peroxidación lipídica.....	117
4.2.3.8. Determinación de la actividad del enzima CAT.....	122
4.3. EXTRACTO METANÓLICO DE <i>R. officinalis</i> L.	123
4.3.1. ESTUDIO FITOQUÍMICO.....	123
4.3.1.1. Rendimiento.....	123
4.3.1.2. Composición.....	124
4.3.1.3. Contenido total en compuestos fenólicos.....	129
4.3.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA... ..	131
4.3.2.1. Actividad antioxidante in vitro (ORAC).....	131
4.3.2.2. Determinación del Radical DPPH.....	132
4.3.3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	134
4.3.3.1. Viabilidad celular	134
4.3.3.2. Evaluación del daño celular.....	135
4.3.3.3. Estudio de la morfología celular.....	136

4.3.3.4. Determinación de la actividad antiradicalaria.....	137
4.3.3.5. Determinación de los niveles de glutatión.....	139
4.3.3.6. Determinación de la actividad caspasa-3.....	141
4.3.3.7. Peroxidación lipídica.....	143
4.3.3.8. Determinación de la actividad del enzima CAT.....	146
5. DISCUSIÓN.....	149
6. CONCLUSIONES.....	161
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	165
RESUMEN	199
SUMMARY.....	209

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las plantas medicinales juegan un papel importante en el descubrimiento de nuevos fármacos y mecanismos de acción innovadores. Entre los diferentes mecanismos de acción estudiados, la actividad antioxidante es uno de los más seguidos en la actualidad, debido a la importancia del estrés oxidativo y los efectos perjudiciales de las especies reactivas de oxígeno en diversas patologías. Por ello, una de las principales vías de investigación es la búsqueda de moléculas capaces de prevenir o reducir la magnitud de estos mediadores de oxidación mediante interacción con diferentes dianas bioquímicas o farmacológicas.

Las reacciones de oxidación-reducción son procesos químicos esenciales en los sistemas biológicos para la obtención de productos necesarios en los procesos metabólicos celulares. Estas reacciones conllevan la transferencia de electrones y pueden generar compuestos conocidos como *especies reactivas de oxígeno* (ERO), entre las que se encuentran los radicales libres (RL) y moléculas derivadas del oxígeno con alta capacidad reactiva que participan en la formación de radicales.

En condiciones normales hay un equilibrio entre la producción y la eliminación de las moléculas nocivas. Sin embargo, en determinadas situaciones la producción de RL puede aumentar de forma descontrolada, dando lugar a lo que se conoce como *estrés oxidativo*. La oxidación de macromoléculas como las proteínas, lípidos y ADN puede conducir a la degeneración celular y muerte debido a un aumento en la liberación de factores inductores de apoptosis (Barnham *et al*, 2004; Emerit *et al*, 2004).

El estrés oxidativo está relacionado con la génesis y desarrollo de patologías que afectan a diferentes órganos y sistemas como el sistema nervioso central, el aparato cardiovascular y procesos inflamatorios, entre otros. El cerebro es un órgano especialmente sensible al estrés oxidativo debido a la gran proporción de ácidos grasos insaturados, su elevado metabolismo, la baja proporción de agentes antioxidantes y la baja regeneración celular. Las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson o la esclerosis lateral amiotrófica se encuentran directamente relacionadas con un incremento en el estrés oxidativo; además, el envejecimiento es el principal factor de riesgo para

el desarrollo de este tipo de patologías, junto con procesos infecciosos o toxicidad sobre el metabolismo (Gandhi *et al.*, 2012; Gutiérrez-Merino *et al.*, 2011; Halliwell, 2012; Taupin, 2010).

El Grupo de investigación “Farmacología de Productos Naturales” del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, aborda el estudio de la composición química, actividad farmacológica y mecanismo de acción de plantas medicinales y de principios activos aislados de las mismas. En concreto, se centra en el estudio de la actividad antioxidante, neuroprotectora, antiinflamatoria y anticancerígena mediante modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*.

La especie *Rosmarinus officinalis* L., Lamiaceae (Labiatae) (romero) es una planta aromática que crece de forma espontánea en toda la zona mediterránea. Las partes aéreas y el aceite esencial de romero se han utilizado en medicina tradicional desde la antigüedad para el alivio de la astenia, debilidad crónica, como carminativo y para mejorar la circulación sanguínea, entre otras aplicaciones (Laguna, 1968; Puerto, 2005).

La composición química de la hoja de romero es compleja; por un lado, es rica en compuestos polifenólicos con actividad antioxidante (Abuashwashi *et al.*, 2014; Collins *et al.*, 1987) y por otro, en aceite esencial de composición también compleja y variable en función de su origen geográfico, estado fenológico y momento de la recolección, que también muestra capacidad antioxidante (Abuashwashi *et al.*, 2014; Angioni *et al.*, 2004; Elamrani *et al.*, 2000; Napoli *et al.*, 2015; Palomino *et al.*, 2010; Porte *et al.*, 2000; Varela *et al.*, 2009).

El aceite esencial de romero ya se empleaba en la antigua Grecia para mejorar la memoria. En la Edad Media, la obra de Dioscorides “Materia Medica” (1555) describe el uso del aceite esencial con fines medicinales como tónico, estimulante, carminativo en casos de dispepsia, para el dolor de cabeza y tensión nerviosa (Laguna, 1968; Puerto, 2005); como aditivo en baños de agua caliente se ha aplicado en casos de cansancio y para estimular la circulación (Morton, 1977). En

la “Materia Medica” hindú (Nadkarni, 1999) se describe por sus acciones carminativa y estimulante. Por otro lado, la British Herbal Pharmacopoeia (BHP, 1983) incluye las indicaciones siguientes para el aceite esencial de romero: “estados depresivos con debilidad general y debilidad cardiovascular”. En la actualidad, el aceite esencial de romero se utiliza como tónico y para tratar la fatiga mental (Laybourne *et al.*, 2003).

Los aceites esenciales han demostrado poseer propiedades antioxidantes que resultan de aplicación en diferentes campos; en el caso de los alimentos, la oxidación es una de las principales causas de deterioro químico que puede producir enranciamiento, deterioro de calidad nutricional o propiedades organolépticas, e incluso problemas de seguridad alimentaria (Vicente *et al.*, 2012). Estas propiedades antioxidantes son también útiles en la prevención y tratamiento de diferentes patologías asociadas con el daño oxidativo (Porres *et al.*, 2010).

Además de sus usos tradicionales, publicaciones científicas han demostrado su interés como diurético, antidepresivo, antiespasmódico y en el tratamiento del resfriado, gripe y dolor reumático (Chandler, 1985; Erenmemisoglu, 1997). Recientemente se ha comprobado su eficacia en la mejoría de factores globales y secundarios relacionados con la memoria (Moss *et al.* 2003), así como su efecto hipotensor y mejoría de la calidad de vida de pacientes hipertensos (Fernandez *et al.* 2014).

Sin embargo, hasta el momento actual, no se ha determinado cuál es o son los compuestos activos responsables de las actividades biológicas observadas. Se han publicado estudios con el aceite esencial de romero que demuestran su actividad espasmolítica, así como la influencia de su composición en su actividad; en este sentido, el pineno ejerce un efecto estimulante (Taddei *et al.*, 1988). Así mismo, la actividad antioxidante depende de su contenido en diterpenos fenólicos (Schwarz *et al.*, 1992) y, como se recoge ampliamente en la literatura para otras especies vegetales, el aceite esencial de romero muestra una actividad antioxidante superior a la de tres de sus principales componentes aislados (1,8-cineol, α -pineno, β -pineno) (Wang *et al.*, 2012).

Como continuación a la línea de este Grupo de investigación, el presente trabajo de Tesis Doctoral tiene como OBEJTIVOS el estudio de la composición química del extracto metanólico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y del aceite esencial por Cromatografía de Gases (CG) obtenidos de muestras espontáneas de *R. officinalis* procedentes de distintas áreas geográficas de la Península Ibérica.

El estudio fitoquímico de esta especie se completa con la evaluación de su actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo*, sobre una línea celular de astrocitos humana (U-373 - human astrocyte glioblastoma), modelo celular aceptado para el estudio de su funcionalidad en condiciones fisiológicas y patológicas, con el fin de elucidar el mecanismo de acción de su capacidad antioxidante.

Dicha actividad se evalúa en primer lugar mediante la medida de su capacidad captadora de radicales libres *in vitro* (ORAC), seguido de diferentes ensayos *in vivo* en la línea celular de astrocitos U-373 encaminados a determinar su efecto directo y protector sobre la viabilidad celular y sobre los sistemas antioxidantes endógenos enzimáticos (CAT, GPx, GR) y no enzimáticos (glutación). En todos los ensayos se utiliza como control positivo un análogo hidrosoluble de la vitamina E, el Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico).

2. REVISIÓN BIBLOGRAFÍCA

2.1. SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El sistema nervioso central (SNC) está formado por dos tipos de células principales, neuronas y células gliales. La morfología de ambos tipos celulares es muy compleja, constando de un cuerpo celular del que parten numerosas ramificaciones entrelazadas entre sí para dar lugar a un entramado complejo denominado neuropilo (Delgado *et al.*, 1998) (Figura 1).

Así como la neurona es la unidad funcional y morfológica del sistema nervioso, las células gliales se consideran sus precursores y soporte metabólico y se dividen a su vez, en tres grandes grupos: oligodendroglia, ependimoglia y astroglia. (Araque *et Navarrete*, 2009). La relación entre estos tipos de células es fundamental para mantener la homeostasis cerebral. Las células gliales tienen como función servir de soporte a las neuronas, regular las funciones metabólicas del tejido nervioso y mantener los niveles de oxígeno y nutrientes, además de participar en procesos inflamatorios que defienden al SNC y lo ayudan a recuperarse frente a agresiones externas.

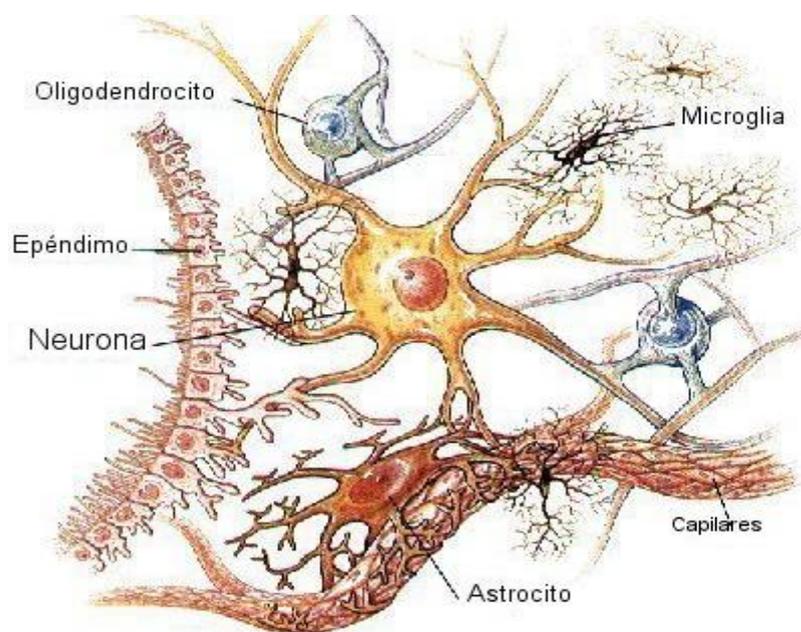


Figura 1. Tipos de células nerviosas (tomado de cell diagram.net)

Las células gliales constituyen el 80% de las células neurales (Figura 2), son uno de los tipos celulares más abundantes del SNC de los vertebrados, y juegan un papel muy importante durante el desarrollo, mantenimiento y regeneración del sistema nervioso adulto.

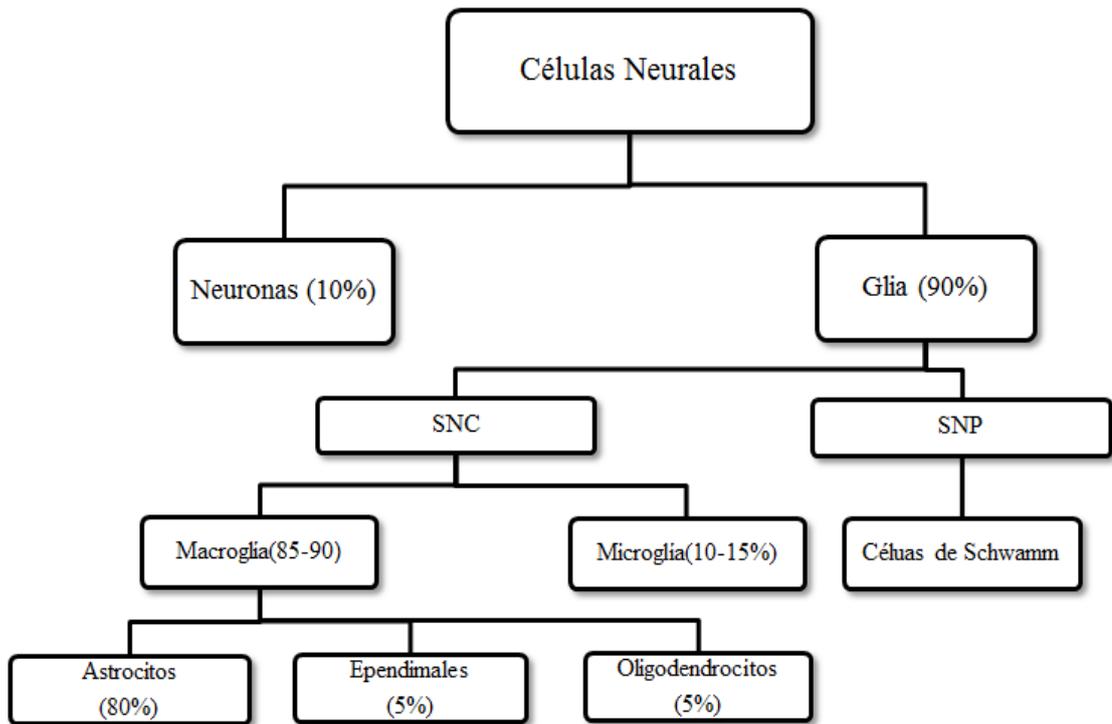


Figura 2. Tipos de células neurales

Las células gliales desempeñan papeles críticos en los procesos metabólicos vinculados con la actividad neuronal, tales como el flujo de sangre, la energía y la utilización de la glucosa (Magistretti, 2006). Durante la embriogénesis, la glía radial (GR) proporciona orientación física y química para la migración de las neuronas jóvenes, y sirve como precursor de células neurales multipotenciales, con capacidad de auto-renovación y de generar neuronas (Sanai *et al.*, 2004) y oligodendrocitos (Ventura *et Goldman*, 2007). Durante la sinaptogénesis, las células gliales y los factores neurotróficos derivados de la glía promueven la formación de sinapsis funcionales maduras (Ullian *et al.*, 2001), regulan los niveles de neurotransmisores en el espacio extracelular y el metabolismo

energético en el cerebro (Magistretti, 2006), y juegan un papel clave en la función sináptica (Haydon, 2001; Fields *et Stevens-Graham*, 2002).

Astroglía

Estas células nerviosas son de origen neuroectodérmico y se encuentran tanto en la sustancia gris como en la sustancia blanca y forman poblaciones distintas y características de cada centro nervioso. Se pueden detectar mediante anticuerpos frente a GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), proteína características de los filamentos intermedios en el citoplasma de los astrocitos y que es responsable de la forma característica de los mismos.

Los astrocitos son el tipo celular no neuronal más numeroso en el SNC y de mayor tamaño. El término astrocito ('astron', que significa estrella, y 'kytos', que significa un vaso hueco, posteriormente célula, es decir, una célula semejante a una estrella) (Verkhatsky, 2014), Santiago Ramón y Cajal, los describió como “células de formas estrelladas con un soma circunscrito al núcleo, con prolongación en sentido radial por la presencia de un proteína acidica fibrilar glial que permite la identificación de las células astrogiales con métodos de microscopia” (Montgomery, 1994)

En función de su morfología, se pueden clasificar en a) *astrocitos fibrosos o fibrilares*, presentes en la sustancia blanca y con pocas ramificaciones, núcleo regular, nucléolo poco patente y carioplasma bastante denso y b) *astrocitos protoplasmáticos*, localizados en la sustancia gris, con superficie del cuerpo y ramificaciones muy irregulares por encontrarse rodeados y en medio de gran cantidad de neuronas (Raivich *et al.*, 1999).

El citoplasma de los astrocitos presenta un retículo endoplasmático y un aparato de Golgi poco desarrollados, con mitocondrias grandes y muy abundantes. En la matriz citoplasmática hay cúmulos de glucógeno en sus ramificaciones, pero no en su cuerpo celular.

Los astrocitos fueron originalmente considerados como elementos pasivos del sistema nervioso, principalmente como células de apoyo a las neuronas, como estructuras de guía durante el desarrollo del cerebro, o como reguladores de la

homeostasis iónica (Banerjee *et Bhat*, 2007; Fuller S. *et al.*, 2009). Participan en numerosos procesos del desarrollo y la fisiología del sistema nervioso central, actuando como soporte metabólico de neuronas, en la supervivencia y diferenciación neuronal, guía neuronal, proliferación y sinaptogénesis, homeostasis, regulación de las concentraciones locales de iones y neurotransmisores y en el control de la circulación sanguínea cerebral local (Araque *et Navarrete*, 2010). Además, juegan un papel importante en la modulación de señalización neuronal (Gavillet *et al.*, 2008).

Los astrocitos suministran energía al SNC y la acumulan, participan en mecanismos de detoxificación y en la modulación del sistema inmune. Juegan un papel relevante en la lucha contra el estrés oxidativo por su papel en el metabolismo de antioxidantes como el glutatión y en la defensa frente a especies reactivas de oxígeno (ERO), ya que presentan los niveles más altos de antioxidantes en el cerebro. Cuando el sistema nervioso sufre una lesión, los astrocitos desempeñan una función de reparación al sufrir una serie de transformaciones morfológicas y funcionales que forman una “cicatriz” glial alrededor de la zona lesionada y la aíslan del resto del tejido nervioso.

Los astrocitos, a diferencia de las neuronas, son especialmente resistente a la oxidación porque poseen un sistema de defensa antioxidante muy potente: son capaces de regenerar glutatión y mantener niveles altos de glutatión reducido (GSH), además la actividad de los CAT y SOD es elevada., sus sistemas captadores de radicales libres previenen la generación de éstos catalizada por metales (Ahtiok *et al.*, 2006; Pertusa *et al.*, 2007; Wilson, 1997).

La principal característica que permite las funciones cerebrales de los astrocitos es su excitabilidad al calcio, que facilita la respuesta a señales de neuronas y astrocitos vecinos por medio de ondas de calcio a través de una red acoplada a los astrocitos, Esta acción es posible mediante la expresión de gran variedad de receptores hacia los principales neurotransmisores como glutamato o ATP. El calcio acumulado en el RE juega un papel importante en la excitabilidad: una elevación de la concentración de este ión en cultivos de astrocitos puede provocar respuestas neuronales (Aranque *et al.*, 1999; Kolkova *et al.*, 2006).

Los astrocitos participan en la mayoría de los procesos del SNC como puente en las comunicaciones sinápticas (Volterra *et* Meldolesi, 2005), en el control del flujo sanguíneo (Zonta *et al.*, 2003), como fuente de moléculas de señalización o moléculas diana para las señales neuronales. A través de las acciones del glutamato, ATP, adenosina y otros factores, los astrocitos pueden producir efectos excitatorios o inhibitorios en las células y fibras nerviosas (Volterra *et* Meldolesi, 2005).

En resumen, las principales funciones de los astrocitos son: favorecer el desarrollo cerebral; producir factores neurotróficos, mantener la glucosa como principal fuente de reserva energética, producir y liberar neurotransmisores, participar en la neurotransmisión, formar una barrera entre el cerebro y los vasos sanguíneos, angiogénesis y diferenciación del endotelio, formación de tejido de cicatrización después de pérdida neuronal, control de la homeostasis del potasio extracelular, participación en la migración neuronal y funciones de soporte (Takuma *et al.*, 2004).

2.2. ESTRÉS OXIDATIVO

2.2.1. RADICALES LIBRES

El estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre la producción de radicales libres y la capacidad de un sistema biológico para defenderse frente a ellos, es decir, detoxificar rápidamente los metabolitos intermedios y reparar los daños inducidos a las células (Darvesh, 2010). En definitiva, se produce una perturbación en el equilibrio pro-oxidante-antioxidante en favor del primero, dando lugar a un daño potencial (Sies, 1991).

En los organismos aerobios sanos, la producción de radicales libres se encuentra equilibrada y es neutralizada mediante los sistemas de defensa antioxidante endógenos. Se trata de un proceso inevitable, ya que la vida se desarrolla en un medio rico en oxígeno (Halliwell, 2007; Lü *et al.*, 2008). Las reacciones de oxidación-reducción son procesos químicos esenciales en los sistemas biológicos para la formación de productos necesarios en los procesos metabólicos celulares.

Estas reacciones conllevan la transferencia de electrones y pueden generar compuestos conocidos como especies reactivas de oxígeno (ERO), entre los que se encuentran los Radicales Libres (RL) y moléculas derivadas del oxígeno con alta capacidad reactiva que participan en la formación de radicales

Un RL es definido como una especie química independiente que posee uno o más electrones desapareados en su orbital más externo; es producto del metabolismo celular normal. Estos electrones aumentan la reactividad química de la molécula y generan una inestabilidad energética que explica su tendencia a reaccionar con otras moléculas para captar electrones (efecto oxidante); a su vez, esto provoca nuevas inestabilidades en estas otras moléculas y puede dar lugar a reacciones en cadena (Martínez *et al.*, 2003; Phaniendra *et al.*, 2015).

Existen gran cantidad de radicales libres implicados en el daño oxidativo, aunque la mayoría de ellos derivan de oxígeno o nitrógeno, siendo denominados en conjunto Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) y Especies Reactivas de Nitrógeno (ERN), respectivamente. También se han descrito Especies Reactivas de Cloro (ERC), Bromo (ERB) y Azufre (Estrela *et al.*, 1983; Fang *et al.*, 2002; Halliwell, 2006) (Figura (3)).

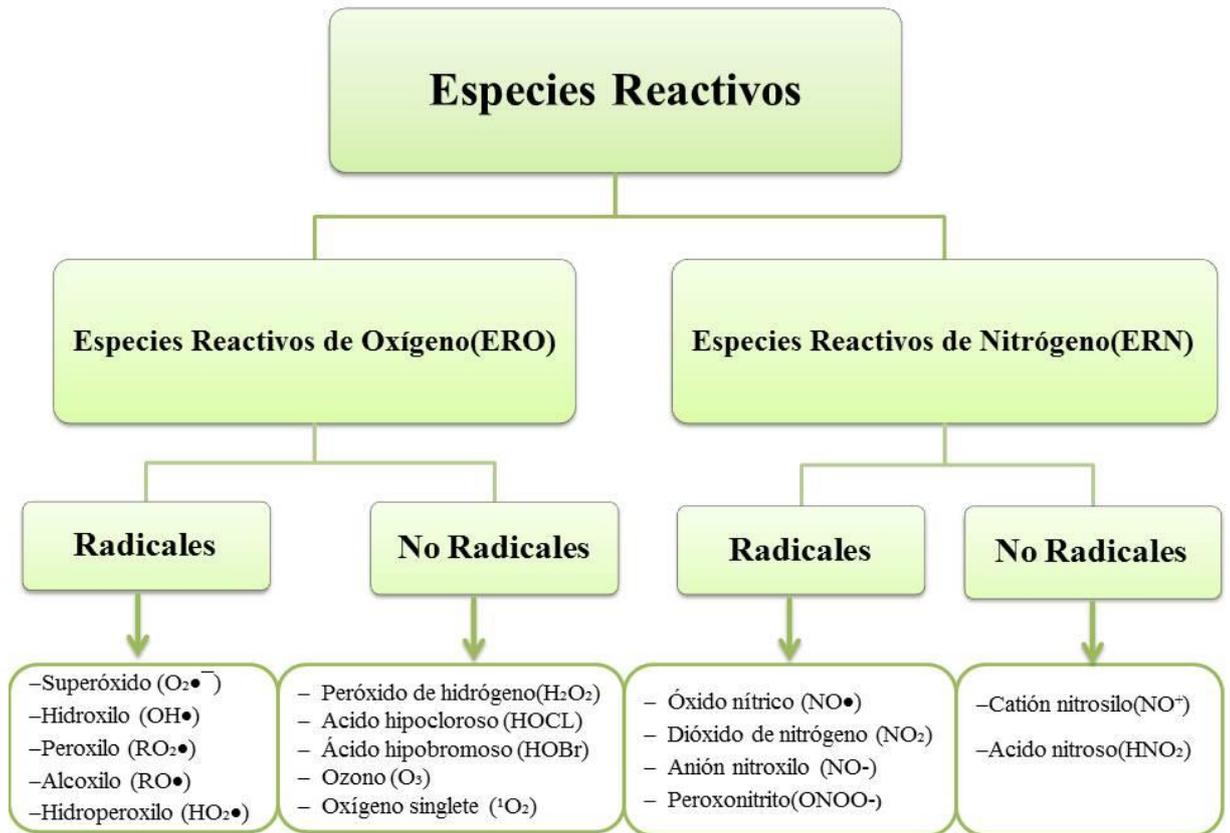


Figura 3. Principales Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (radicales y no radicales)

Muchas de las especies reactivas del oxígeno se originan en las mitocondrias, incluyendo radicales hidróxido y superóxido y peróxido de hidrógeno. El óxido nítrico (NO) es producido por los receptores de N-metil-D-aspartato glutamato en el sistema nervioso. Cuando sus receptores específicos se activan en exceso, se desencadena una entrada de Calcio que regula los niveles de NO y otras especies reactivas de oxígeno (Rahman *et al.*, 2012).

El incremento en RL afecta a diversos sistemas biológicos y biomoléculas tales como proteínas, lípidos, ADN y azúcares (Dasuri *et al.*, 2013). También contribuye a la muerte celular inducida por inhibidores de proteosoma en las células de leucemia y linfoma (Halliwell, 2006).

Los fosfolípidos de la membrana de los organismos aeróbicos están continuamente sometidos al efecto de sustancias oxidantes a partir de fuentes endógenas y exógenas. Por ello, las células están provistas de un sistema de defensa antioxidante constituido por compuestos antioxidantes como la vitamina E, que previenen el inicio del daño oxidativo, y un gran número de mecanismos encaminados a mantener la integridad de la membrana y su homeostasis mediante la reparación de los daños ya ocasionados (Valavanidis *et al.*, 2006).

Los RL están implicados en numerosas enfermedades neurodegenerativas, trastornos cardiovasculares, enfermedades inflamatorias y cáncer, entre otras (Wojtunik-Kulesza *et al.*, 2016). Sus consecuencias más inmediatas son la aparición de mutaciones, roturas en cromosomas, citotoxicidad, degeneración celular, etc. (Altiok *et al.*, 2006).

2.2.2. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Los radicales libres de oxígeno, más conocidos como especies reactivas de oxígeno (EROs), son derivados del oxígeno, con alta capacidad oxidante y reactiva. Se trata de un término colectivo que incluye tanto radicales libres de oxígeno como sustancias “no radicales” que son agentes oxidantes que se convierten fácilmente en radicales como es el caso del Peróxido de Hidrogeno (H_2O_2), el ozono (O_3) y otras moléculas (HOCl, HOBr) (Buonocore *et al.*, 2010). Así, todos los radicales de oxígeno son EROs, pero no todos los EROs son radicales de oxígeno (Halliwell, 2006).

El oxígeno recibe un electrón a partir de un sustrato y se transforma en el anión superóxido. Se trata de una oxidación agresiva que puede generar una serie de reacciones en cadena que provoquen, a su vez, la formación de otros radicales libres capaces de inducir la peroxidación lipídica, alteración de proteínas, rotura en la cadena de ADN, etc. Estos efectos alteran la integridad de la membrana celular, inactivan varios sistemas enzimáticos y provocan daños en la actividad genética, todo lo cual se traduce en la muerte celular (Buonocore *et al.*, 2010; Inoue *et al.*, 2000).

En los organismos vivos, sujetos a condiciones aerobias, más del 90% del oxígeno consumido se reduce a H_2O y por tanto, se inactiva como ERO, por el efecto de la citocromo oxidasa en el transporte de electrones. Un porcentaje inferior al 10% del oxígeno consumido se reduce vía sucesiva de un electrón que resulta en la conversión de oxígeno molecular al radical anión superóxido (O_2^-), seguido de la reducción de un electrón con la aceptación concomitante de dos protones para producir peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Lushchak, 2014).

En concentraciones bajas, los EROs son necesarios y beneficiosos para una funcionalidad fisiológica normal. Pueden proteger las células frente infecciones, destruyendo los agentes patógenos invasores; también actúan en puntos de inflamación; participan en la regulación del funcionamiento de las células cardíacas y vasculares y están involucradas en la regulación de las concentraciones intracelulares de calcio, en la fosforilación de las proteínas y activación del factor de transcripción (Valko *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2013).

Oxígeno singlete (1O_2)

El oxígeno singlete (1O_2) se genera a partir del oxígeno molecular y es una forma activa del oxígeno no considerada como un radical libre. Su vida media es muy corta, alrededor de 10 segundos, pero presenta capacidad de sustraer un protón (H^+) de un ácido graso insaturado, iniciando la reacción de peroxidación lipídica (Halliwell *et Gutteride*, 1989).

El oxígeno singlete no presenta electrones desapareados y su energía es superior a la del oxígeno en estado fundamental, en 23 kcal/mol. El oxígeno singlete oxida rápidamente una gran variedad de moléculas, incluido el ADN, siendo mucho más reactivo que el oxígeno triplete (Kanofsky, 1989).

Radical superóxido ($^{\bullet}O_2^-$)

El anión superóxido es el radical más importante; se forma a partir de procesos enzimáticos (reacción de autooxidación) y no enzimáticos (reacciones de transferencia de electrones al oxígeno molecular) (Phaniendra *et Jestadi*, 2015). Se trata de la base conjugada de un ácido débil, el radical perhidroxilo. El anión superóxido es capaz de atravesar membranas y ejercer un daño directo. Presenta

un electrón desapareado, muy reactivo, capaz de oxidar moléculas ricas en protones como los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Se considera el ERO primario, ya que, además del daño directo, es capaz de originar EROs secundarios como los radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), siendo éstos los radicales con mayor toxicidad (Halliwell, 1992) y también puede reaccionar con el radical óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) formando el anión no radical peroxinitrito (ONOO^-) (Brzeszczynska *et Gwozdziński*, 2008; Valko *et al.*, 2006; Valko *et al.*, 2007).

Se produce en toda las células eucariotas animales por reducción univalente del oxígeno molecular; aproximadamente el 1-3% del O_2 reducido en las mitocondrias puede formar el radical superóxido (Willcox *et al.*, 2004). La eliminación del $\bullet\text{O}_2^-$ que se genera en las células se realiza por las Superóxido dismutasas (SOD), al convertirse en peróxido de hidrogeno (H_2O_2):

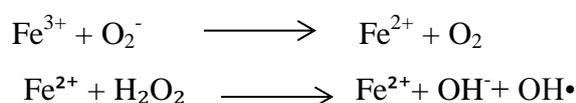


Radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$)

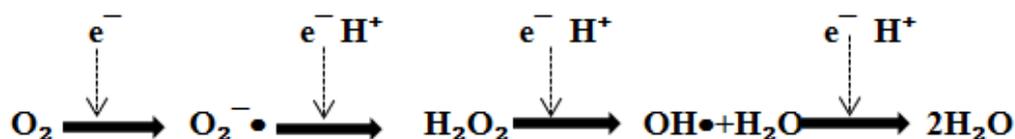
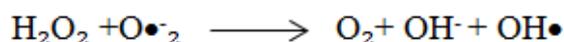
El radical hidroxilo es la forma neutra del ión hidróxido, es el radical libre más reactivo y, por ello, el más dañino. Su vida media es muy corta, alrededor de 10^{-9} s (Valko *et al.*, 2007). Debido a su alta reactividad reacciona con la mayoría de las biomoléculas muy cerca de su lugar de formación, produciendo daños muy extensos a nivel celular: a nivel de la cadena de ADN produce alteraciones químicas en los componentes de sus cadenas y a nivel de la membrana lipídica favorece su peroxidación (Scandalios, 2005).

Este radical se produce a partir del ión superóxido por diferentes vías, siendo la más importante la denominada reacción de Fenton en presencia de compuestos metálicos (Fenton, 1894):

a) Reacción de Fenton



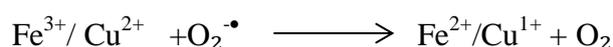
- b) Reacción de Haber-Weiss, a partir del peróxido de hidrógeno y del radical superóxido (Haber *et Weiss*, 1934):



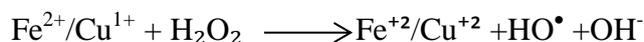
Generación de Radical hidroxilo desde el oxígeno \longrightarrow radical superóxido
 \longrightarrow el radical hidroxilo (Willcox *et al.*, 2004)

Esta reacción es muy lenta, pero los metales de transición (hierro y cobre) pueden acelerar la velocidad de la reacción al actuar como catalizadores de la misma.

- c) Reducción de iones metálicos: el anión superóxido es capaz de reducir los iones de Fe^{3+} , Cu^{2+} u otros iones de metales



El ion metálico en estado reducido reacciona con el peróxido de hidrogeno:



El hierro es el metal de transición más abundante en el hombre, donde no se encuentra en forma libre, sino estrechamente unido a proteínas específicas tanto circulantes como tisulares (transferrina, hemoglobina, ceruloplasmina, ferritina). Las proteínas plasmáticas apo-transferrina y ceruloplasmina tienen una elevada capacidad antioxidante.

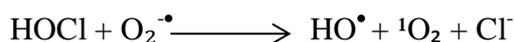
La capacidad antioxidante de la apo-transferrina depende de su habilidad para unirse a 2 iones férricos (Fe^{3+}). El hierro libre no está presente en plasma debido a que los iones ferrosos (Fe^{2+}) son oxidados a Fe^{3+} por la actividad ferroxidasa de la ceruloplasmina, y son incorporados a la transferrina (Saugstad, 2003). Por eso, no se ha podido explicar claramente la reducción del H_2O_2 catalizada por metales en células de mamífero ya que hay un gran número de proteínas de unión a metales (ferritina, transferrina, ceruloplasmina...) que actúan como reserva de iones metálicos e impiden que éstos participen en reacciones redox (Valko *et al.*, 2007).

El radical hidroxilo también puede generarse a través de una variedad de mecanismos: ionizantes la radiación provoca la descomposición del agua, resultando en la formación de OH e hidrógeno átomos y descomposición fotolítica de la alquil hidroperóxido (Buonocore *et al* 2010)

El radical hidroxilo es muy rápido en reacción con el radical óxido de nitrógeno ($\text{NO}\bullet$) para general el radical peroxinitrito



el radical hidroxilo también se puede formar a partir del ácido hipocloroso por reacción con el radical HOCl



Peróxido de hidrogeno (H_2O_2)

El peróxido de hidrogeno se considera una ERO por su toxicidad sobre el ADN, lípidos y membrana celular, así como por su capacidad de desencadenar la formación de otros RL (Pham-Huy *et al.*, 2008).

Su importancia reside en la capacidad que tiene de atravesar las membranas biológicas, alcanzar así los diferentes compartimentos y extender el daño oxidativo a otras regiones más alejadas. Es decir, actúa como un mensajero secundario en la cascada de señalización intracelular.

El H_2O_2 se forma durante el metabolismo aeróbico celular por reducción bivalente del oxígeno, por medio de la acción de algunas peroxidasas y de la SOD:

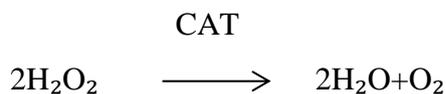


También se forma en reacciones catalizadas por oxidasas como la L-aminoácido oxidasa, la glicolato-oxidasa y la monoaminooxidasa, así como en el proceso de oxidación de ácidos grasos que se produce en los peroxisomas (Halliwell *et al.*, 2000).

Reacciona con el radical superóxido para originar el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) mediante la reacción de Fenton-Haber-Weiss (la cual depende de las disponibilidades de Fe o Cu) (Dringen *et al.*, 2005; Halliwell, 1992; Scandalios, 2005).



Debido al consumo normal de oxígeno a nivel celular, la generación de peróxidos es constante; el más abundante de ellos es el peróxido de hidrógeno. Las células disponen de sistemas enzimáticos susceptibles de eliminar esos RL derivados del oxígeno como son: catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y SOD (Lishchak, 2014). Sin embargo, las células nerviosas no son ricas en estas enzimas (Dringen *et al.*, 2005; Lau *et al.*, 2005).



El peróxido de hidrógeno puede actuar como mensajero del factor de necrosis tumoral (TNF), activar factores de transcripción como NF-κB, AP-1, inhibir la actividad de la fosfatasa fosfotirosina, estimular la proteína quinasa, aumentar la síntesis de derivados de ciclooxigenasa, lipoxigenasa y metabolitos del ácido araquidónico.

Debido a todos estos efectos, el peróxido de hidrógeno se utiliza en estudio de cultivos celulares *in vitro* como agente inductor de estrés oxidativo. En el caso de cultivos de astrocitos, la principal vía de eliminación es la regeneración del NADPH mediante la activación de la vía de la pentosa fosfatasa y un aumento de la expresión de los enzimas CAT y GPx (Dringen *et al.*, 2005; Mazlan *et al.*, 2006). El peróxido de hidrógeno desaparece muy rápidamente, siguiendo una cinética de primer orden.

Radical perhidroxilo (HO_2^{\cdot})

El radical perhidroxilo se genera a partir de $^{\cdot}O_2$, es un radical libre muy liposoluble que se considera un indicador muy potente de la peroxidación lipídica en las membranas biológicas (Kanner *et al.*, 1987; Borbón Jara B. *et al.*, 2015).

Radical alcoxilo y peróxido (RO^{\cdot} y ROO^{\cdot})

Los radicales alcoxilo (RO^{\cdot}) y peróxido (ROO^{\cdot}) son EROs generados durante la peroxidación lipídica por el ataque de algunos radicales libres sobre las cadenas carbonadas de los ácidos grasos de los fosfolípidos que forman las membranas celulares (Kanner *et al.*, 1987). Se generan continuamente durante el metabolismo aeróbico y por ello deben neutralizarse constantemente (Dringen *et al.*, 2005).

Este proceso de peroxidación se ve acelerado en presencia de metales de transición como Fe o Cu (Halliwell, 1995).



El mecanismo principal de eliminación de los radicales peróxido es el glutatión.

2.2.3. ESPECIES REACTIVAS DE NITRÓGENO

Las especies reactivas de nitrógeno (ERN) representan otra clase de radicales libres los cuales, en los últimos años, han adquirido mucha importancia. Los principales ERN con importancia a nivel biológico son los siguientes:

Radical óxido nítrico (NO[•])

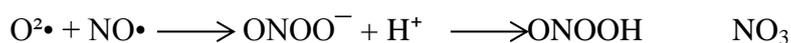
El óxido nítrico (NO[•]) es un radical libre, sintetizado en gran variedad de las células por la enzima óxido nítrico sintasa, aunque es poco reactivo (Prolo *et al.*, 2015). Su vida media es relativamente larga (3-5 segundos). Se forma en numerosos tipos celulares por una reacción enzimática catalizada por la enzima (óxido nítrico sintasa) para la conversión de L-arginina a L-citrulina.

Su importancia radica en ser una molécula de señalización biológica oxidativa en una gran variedad de procesos fisiológicos como neurotransmisión, regulación de la presión arterial, mecanismos de defensa, relajación de la musculatura lisa y regulación inmunitaria (Nisoli *et al.*, 2003; Valko *et al.*, 2006). Un exceso de óxido nítrico es citotóxico. Parte de su citotoxicidad es debida a la generación de una molécula mucho más agresiva, el anión peroxinitrito (ONOO⁻), que aparece durante los procesos inflamatorios (Valko *et al.*, 2006).

Radical Peroxinitrito (ONOO⁻)

Se forma como resultado de un reacción muy rápida entre NO[•] y el anión superóxido (Kirsch *et De Groot*, 2002; Beal, 1996).

El radical peroxinitrito, en un ambiente con pH neutro, puede formar ácido peroxinitroso, el cual a su vez es potente agente oxidante capaz de causar daño al ADN y lípidos (Margaret *et al.*, 1999).



El radical resultante no sólo provoca la oxidación de ADN, proteínas y lípidos, sino que también interfiere con importantes vías de señalización vascular. Así, los

EROs continúan aumentando y reducen la biodisponibilidad de NO y causan disfunción endotelial.

2.2.4. FUENTES DE PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES

Los radicales libres se producen fisiológicamente en pequeñas cantidades; cuando se generan en niveles elevados, el origen puede ser tanto *exógeno* (exposición a oxidantes medioambientales, farmacológicos y nutricionales, etc.) como *endógeno* (elevación de compuestos intermedios o productos tanto de reacciones oxidativas de las células como de procesos fisicoquímicos o de biotransformación).

Origen endógeno. La formación de las ERO y ERN a nivel celular ocurre por dos vías, enzimática y no enzimática. En las reacciones enzimáticas se incluyen la cadena respiratoria y el sistema del citocromo P450; entre las reacciones no enzimáticas se encuentran reacciones de oxígeno con los compuestos orgánicos y el proceso de respiración aeróbico a nivel mitocondrial (Pham-Huy *et al.*, 2008; Packer *et al.*, 1996).

Las reacciones de oxidación-reducción (redox) implican la transferencia de electrones entre dos compuestos y son reacciones comunes y vitales para algunas de las funciones biológicas básicas como respuesta al estrés, desarrollo y respiración (Zhang *et al.*, 2016).

Las mitocondrias son los orgánulos más importantes y esenciales para la producción y conservación de energía a nivel celular: a partir de glucosa y O₂, generan ATP mediante la fosforilación oxidativa (Rego *et Oliveira*, 2003).

En la cadena respiratoria mitocondrial hay 4 complejos; complejo I a IV incluyendo NADH deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa, coenzima Q-citocromo C reductasa y citocromo C oxidasa, respectivamente. Los complejos mitocondriales I y III son los principales productores de radicales libres mitocondriales conocidos (Du *et Yan*, 2010), durante la respiración mitocondrial la cadena respiratoria se considera como la primera fuente de los radicales libres en las células (Halliwell *et Gutteridge*, 1989).

El O_2 se reduce en 4 etapas, en cada una de las cuales se transfiere un electrón. Sin embargo, el transporte electrónico mitocondrial es imperfecto y la reducción monoelectrónica del oxígeno genera $O_2^{\cdot-}$. La dismutación espontánea y enzimática del $O_2^{\cdot-}$ da lugar a la formación de H_2O_2 , y tanto el $O_2^{\cdot-}$ como el H_2O_2 , pueden generar radicales $\cdot OH$ a través de reacciones de Fenton catalizadas por metales de transición. De este modo, se estima que en condiciones fisiológicas normales, entre el 1 y el 3% del oxígeno consumido por el organismo no llega a formar agua y acaba generando radicales libres y EROs (Figura (4)).

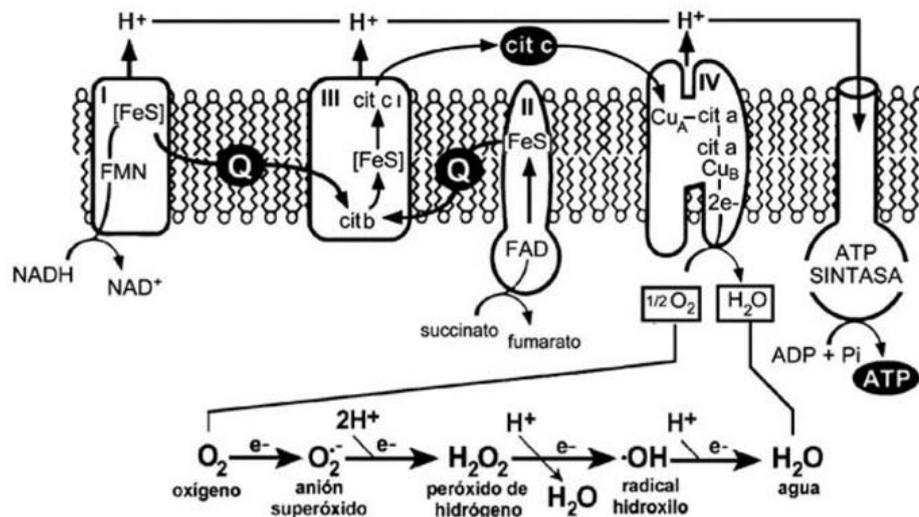


Figura 4. Generación de especies reactivas de oxígeno por la cadena de transporte electrónico mitocondrial (tomado de UNED.es)

Origen exógeno. Diferentes compuestos químicos como pesticidas, humo de tabaco, determinados contaminantes y disolventes orgánicos y fármacos (entre ellos anestésicos) son capaces de inducir daño oxidativo, en particular por incrementar la producción de óxidos de nitrógeno y radical hidroxilo que llevan al agotamiento del antioxidante intracelular glutatión (GSH) (Dreher *et Junod*, 1996; Machlin *et Bendich*, 1987; Vallyathan *et al.*, 1997).

Además, la radiación ionizante, UV o luz visible en presencia de fotosensibilizadores pueden provocar la formación de radicales libres intracelulares que atacan directamente la cadena de ADN (Demple *et Linn*, 1982; Machlin *et Bendich*, 1987).

2.2.5. SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Las células vivas disponen de varios mecanismos para contrarrestar el estrés oxidativo mediante la producción de antioxidantes, sustancias que cuando se encuentran en pequeñas cantidades con respecto al sustrato oxidado, previenen de forma significativa la oxidación de éste. Las funciones de los antioxidantes son neutralizar el exceso de radicales libres, proteger las células contra sus efectos tóxicos y contribuir a la prevención de enfermedades (Pham-Huy *et al.*, 2008; Wilcox, 2004). En condiciones normales, la mayor parte de los radicales libres son neutralizados mediante los sistemas antioxidantes celulares.

Como primera línea de defensa, los antioxidantes preventivos como las peroxidasas y las proteínas quelantes metálicas suprimen la generación de radicales libres. A continuación, como segunda línea de defensa, los antioxidantes que eliminan los radicales como la vitamina C y la vitamina E ejercen esta función inhibiendo la cadena de oxidación y evitando su propagación; las enzimas *de novo* actúan como tercera línea de defensa, reparando el daño y reconstituyendo membranas, proteínas o ADN (Willcox *et al.*, 2004).

En general, en la estructura de los distintos elementos redox que componen los sistemas de defensa antioxidante, destaca la presencia de dos aminoácidos con un papel fundamental, cisteína (Cys) y metionina (Met). Su importancia radica en la presencia de un grupo tiol o tioéter, respectivamente, grupos que son capaces de oxidarse y reducirse de forma reversible. El grupo más importante, que se oxida con mayor frecuencia, es el grupo tiólico (-SH) de la Cys (Jones, 2008); ésta, por si sola, se auto-oxida rápidamente y por ello debe protegerse formando parte de otras moléculas como proteínas estructurales o enzimáticas: caspasas, kinasas,

fosfatasas, proteasas, actina. Además, los residuos de Cys son frecuentes en los centros activos de proteínas involucradas en procesos de detoxificación, como las metalotioneínas, tiorredoxinas, glutatión transferasas, citocromos P-450 y peroxirredoxinas (Fahey, 2001). Estas proteínas son sensibles a la oxidación y tienen capacidad para interactuar con moléculas electrofílicas y/o cationes metálicos. La oxidación reversible de los grupos tiólicos aminoacídicos, hasta disulfuros y residuos de ácido sulfanílico, va a regular funciones biológicas mediante tres vías generales:

- 1) Alterando los residuos de cisteína del centro activo de la enzima
- 2) Alterando las posibles interacciones macromoleculares, y
- 3) Regulando la actividad enzimática, a través de una modificación alostérica de la cisteína (Jones, 2008).

Por otra parte, hay que señalar que el aminoácido selenocisteína también puede oxidarse, aunque este proceso es menos frecuente que los anteriores. Sin embargo, hay otras enzimas dependientes de selenio, que ocupan un lugar clave en las rutas antioxidantes del glutatión y la tiorredoxina. 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno.

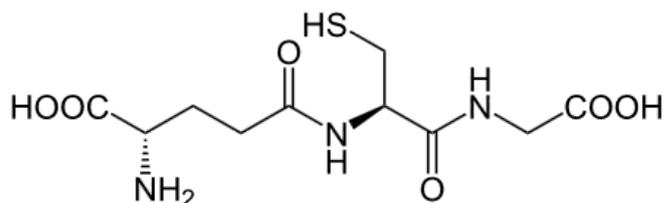
Los sistemas antioxidantes biológicos se dividen en dos grandes grupos: sistemas enzimáticos antioxidantes y sistemas antioxidantes no enzimáticos.

2.2.5.1. Sistema antioxidante no enzimático

La defensa antioxidante no enzimática está constituida por un grupo de moléculas de naturaleza muy diversa procedentes del metabolismo celular entre las que se incluyen la tiorredoxina, transferrina, ácido úrico, melatonina, ácido lipóico, bilirrubina, L-arginina, y el más importante entre todos ellos, el tripéptido glutatión (Pamplona *et Cosatantini D.*, 2011; Valko *et al.*, 2006). En este grupo también se incluyen las metalotioneínas, proteínas de bajo peso molecular y ricas en dominios de Cys, cuya función principal es la quelación de ciertos cationes metálicos como el Zinc (Bell *et Vallee*, 2009).

Glutación

El glutación es un tripéptido compuesto por cisteína, glutamato y glicina. Contiene un enlace peptídico inusual entre el grupo amino de la cisteína y el grupo carboxilo de la cadena lateral del glutamato.



Molécula de glutación

A nivel celular, el glutación se localiza en el núcleo, mitocondrias y citoplasma y se sintetiza por medio de dos enzimas: glutación sintasa y γ -glutamylcisteína sintasa. Como cosustrato, ambas enzimas utilizan ATP (Bains *et Shaw*, 1997; Dringen *et al.*, 2000).

El glutación se encuentra en concentraciones elevadas en los tejidos vegetales y animales (entre 0,5 mM y 12 mM) y desempeña una función fundamental en la defensa antioxidante celular, ya que actúa directamente como agente antioxidante y, además, activa determinados sistemas enzimáticos (Lu, 2009; Masella *et al.*, 2005).

Su capacidad antioxidante frente al daño oxidativo es debida a la capacidad reductora del grupo tiol de Cys, capaz de intercambiar electrones.

El glutación libre está presente principalmente en dos formas: reducida (GSH) y oxidada (GSSG). Por acción de los enzimas glutación peroxidasa (GPx) y glutación reductasa (GR), ambas formas son interconvertibles (Pastore *et al.*, 2003). El GSH presenta gran capacidad de regulación del estado redox celular y juega un papel importante en la supervivencia celular. Así, la relación GSSG/GSH se toma como índice de estrés oxidativo.

El efecto protector del glutatión a nivel celular se produce a varios niveles: actúa como cofactor de diversos enzimas antioxidantes como la GPx, que elimina el peróxido de hidrógeno generado en el citosol y la mitocondria, y la glutatión transferasa que elimina los productos de la peroxidación lipídica como el 4-hidroxinonal, entre otros; participa en el transporte de aminoácidos a través de la membrana celular, en la síntesis de prostaglandinas, en el metabolismo de toxinas, en la potenciación del sistema inmune y en la prevención del daño oxidativo; captura y neutraliza de forma directa los radicales H_2O_2 y $\text{O}_2^{\cdot-}$ y detoxifica el peróxido de hidrógeno y el peróxido lipídico; interviene sobre el potencial redox de los tioles, manteniendo los grupos sulfhidrilos en su forma reducida, y participa en la comunicación intracelular en el SNC. También participa en la regulación de la apoptosis celular (Dringen *et al.*, 2000; Lu, 2009; 2013; Valko *et al.*, 2006).

Los niveles de glutatión aumentan en presencia de sus precursores, como Cys, y disminuyen en presencia de otros como dimetilmaleato. En astrocitos, el glutatión ejerce un efecto neuroprotector marcado y los niveles del mismo se mantienen constantes durante su desarrollo (Dringen *et al.*, 2000; Jha *et al.*, 2000).

Coenzima Q (Ubiquinol)

El coenzima Q10 o ubiquinona es un antioxidante potente. Se considera equivalente a una vitamina liposoluble y se localiza a nivel de la membrana celular, formando parte de las lipoproteínas (Ahmadi *et al.*, 2016).

Bilirrubina

La bilirrubina es el producto final de la degradación del grupo hemo. Es un antioxidante liposoluble y por tanto capaz de inhibir la lipoperoxidación. Es considerado como un antioxidante de gran importancia fisiológica; en los liposomas, la bilirrubina suprime la oxidación en mayor medida que el α -tocoferol, considerado como el antioxidante de referencia, y es el antioxidante más potente frente a la peroxidación lipídica (Stocker *et al.*, 1987).

Dentro de los sistemas antioxidantes no enzimáticos de origen exógeno, cabe destacar el efecto protector de diversas vitaminas, como la vitamina E (α -

tocoferol), que protege las membranas de la peroxidación lipídica (Ahmadi *et al.*, 2016; Ambrogini *et al.*, 2016; Cederberg *et al.*, 2001; Omur *et al.*, 2016; Shimpuku *et al.*, 2000), la vitamina A y ácido retinóico (Hamishehkar *et al.*, 2016; Zeng *et al.*, 2017), y la vitamina C o ácido ascórbico, antioxidante primario que neutraliza directamente las especies radicales (Aguirre *et May*, 2008); el ascorbato es importante para la maduración neuronal y la protección del cerebro contra el estrés oxidativo (Harrison *et May*, 2009).

2.2.5.2. Sistema antioxidante enzimático

El sistema antioxidante enzimático está formado por un complejo enzimático de defensa que actúa de forma coordinada y que incluye la (SOD), (CAT), (GPx), tiorredoxina reductasa y (GR). Estas enzimas están implicadas fundamentalmente en la inactivación del radical superóxido y el peróxido de hidrógeno.

Superóxido dismutasa (SOD)

La SOD es la primera y más importante línea de sistema enzimático frente a los radicales libres y, particularmente frente a radicales anión superóxido que transforma en peróxido de hidrógeno mediante una cinética de primer orden. Se localiza principalmente en las neuronas (Packer, 1996).



La existencia de la SOD fue descubierta en 1969 por McCord y Fridovich, como un enzima dimérico generado normalmente de forma constante en pequeñas cantidades mediante la respiración aeróbica. En el hombre, existen tres tipos de SOD: Cu, Zn- SOD citosólica, Mn-SOD mitocondrial, y SOD extracelular (Zelko *et al.*, 2002):

- Cu, Zn- SOD cataliza la dismutación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. Su inducción es fundamental en la prevención del envejecimiento debido al estrés oxidativo y a factores ambientales.

Algunas patologías, como la esclerosis lateral amiotrófica, aparecen asociadas a una mutación en el gen de este enzima (Banci *et al.*, 1998; Birben *et al.*, 2012).

- Mn-SOD es necesaria para la supervivencia de la vida aeróbica y el desarrollo de la resistencia celular frente al daño inducido por ERO. En procesos de degeneración cerebral, es más abundante en astrocitos reactivos que en neuronas, lo que sugiere que este enzima es activado como mecanismo de defensa frente a los efectos negativos de las ERO (Mates, 2000; Röhrdanz *et al.*, 2001), se expresan ampliamente en el pulmón humano Mn-SOD se localiza en la mitocondria matriz. EC-SOD se localiza principalmente en el extracelular especialmente en áreas que contienen altas cantidades de las fibras de colágeno y alrededor de los vasos pulmonares y sistémicos. Eso también se ha detectado en el epitelio bronquial, alveolar epitelio y macrófagos alveolares. En general, CuZn- SOD y Mn-SOD actúan como captadores de los radicales superóxido.
- SOD extracelular es un enzima secretor. Es el más importante de la pared intersticial de los vasos sanguíneos, y el único enzima extracelular conocido con capacidad para eliminar el anión superóxido (Enghild *et al.*, 1999; Flynn *et Melov*, 2013).

Catalasa (CAT)

La CAT o hidroxidasa es un enzima presente en la mayoría de las células de mamíferos y de no mamíferos aeróbicos. Es un enzima del grupo hemo, tetramérico, que contiene cuatro ferriprotoporfirinas por molécula. En la célula, se almacena en pequeños orgánulos llamados peroxisomas (80%) y en el citosol (20%). Muchos microorganismos presentan más de una catalasa (Chelikani *et al.*, 2004; Nicholls *et al.*, 2001).

Es uno de los enzimas más eficaces que existen: no se produce saturación a ninguna concentración de peróxido de hidrógeno, su principal sustrato.



Es un enzima fundamental frente al estrés oxidativo. Además de detoxificar frente al peróxido de hidrógeno, actúa sobre los peróxidos lipídicos para transformarlos en alcoholes inertes y como peroxidasa frente a moléculas más pequeñas como metanol, etanol y nitritos (Mattes, 2000).

Glutación peroxidasa (GPx)

Este enzima fue descrito por Mills en 1957. Se localiza principalmente en las astrocitos (Packer *et al.*, 1996), donde actúa reduciendo hidroperóxidos a cambio de oxidar el glutatión:



El GSH actúa como donante de electrones. El producto de la reacción, el glutatión oxidado, es regenerado a GSH por medio de la GR.

Está formada por cuatro subunidades idénticas, cada una con un residuo de seleniocisteína esencial para su actividad enzimática. Existen dos isoformas de GPx, la dependiente de selenio y la GPx independiente de selenio (Valko *et al.*, 2006).

- La GPx dependiente de selenio (GPx-Se) es un tetrámero (80 kDa) con un residuo de seleniocisteína en cada centro activo, se localiza principalmente en el citosol. Presenta una gran actividad frente al H₂O₂ y los hidroperóxidos orgánicos (ROOH).
- La GPx independiente de selenio (GPx-no-Se) es un dímero (19-25 kDa) que se encuentra en el citoplasma de las células, y presenta actividad frente a los peróxidos orgánicos (ROOH), reduciéndolos a formas más estables como los hidróxidos (ROH), utilizando como sustrato reductor al GSH que da lugar al glutatión oxidado (GSSG)

La GPx reduce el peróxido de hidrógeno cuando su concentración es baja. Cuando su concentración se eleva, actúa la CAT, con mayor afinidad por el peróxido de hidrógeno.

Glutación reductasa (GR)

La glutación reductasa es una flavoproteína y un enzima crucial en el metabolismo celular, catalizando la reducción de GSSG a GSH, dependiente de NADPH. Es por lo tanto fundamental para recuperar los niveles adecuados de glutación reducido y cualquier alteración de su actividad provoca un aumento en la producción de EROs.



La GR se localiza principalmente en el citosol y las mitocondrias (Carlberg *et Mannervik*, 1985; Kertulis-Tartar *et al.*, 2009; Ulusu *et Tandoğan*, 2007).

2.2.6. DAÑO OXIDATIVO A LAS BIOMOLÉCULAS***Reacciones en cadena de peroxidación lipídica***

Los radicales libres y otras especies reactivas son capaces de extraer un átomo de hidrógeno de un ácido graso saturado generando un radical lipídico (R·), el cual puede reaccionar con O₂ dando lugar a un radical peroxilo (ROO·). Estos radicales peroxilo contribuyen a la propagación de las reacciones en cadena de peroxidación lipídica, sustrayendo átomos de hidrógeno de otros ácidos grasos insaturados cercanos, generando así nuevos radicales lipídicos (R·) e hidroperóxidos lipídicos (ROOH). Estos últimos se descomponen en radicales alcoxilo (RO·) y peroxilo (ROO·) contribuyendo a la propagación del daño oxidativo.

Esta descomposición se ve facilitada por la exposición a luz UV o por la presencia de iones metálicos, a través de la reacción de Fenton. Así, metales de transición tales como el hierro y el cobre son capaces de acelerar la iniciación y propagación

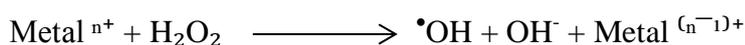
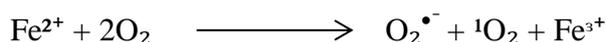
del proceso de peroxidación lipídica por el siguiente mecanismo (Lee *et al.*, 2004):



A su vez, los metales pueden descomponer los hidroperóxidos lipídicos generando radicales peroxilo y alcoxilo, acelerando las reacciones en cadena.



Los metales están implicados en la generación del oxígeno singlete, pudiendo además reaccionar con peróxido de hidrógeno para generar radicales hidroxilo.



La mayor parte de los componentes celulares pueden ser dañados por los radicales libres, pero las proteínas, los ácidos grasos insaturados, los ácidos nucleicos y los hidratos de carbono son los objetivos fundamentales estos ERO, dando lugar a nuevas especies reactivas que continúan el daño oxidativo.

Daño oxidativo a Proteínas

El daño oxidativo de los radicales libres a las proteínas *in vivo* puede afectar la función de receptores, enzimas y proteínas de transporte (Aruoma, 1998).

Los radicales libres de oxígeno están implicados de forma muy importante en la oxidación de las proteínas que conduce a modificaciones estructurales. El daño se dirige a aminoácidos aromáticos, Cys y enlaces disulfuro, residuos de prolina. En términos funcionales, este daño tiene serias implicaciones para la integridad

conformacional de varios componentes extracelulares de naturaleza protéica, incluyendo IgG, albúmina y colágeno (Lunec, 1990).

Daño oxidativo a lípidos

Los lípidos de la membrana presentes en orgánulos subcelulares son altamente susceptibles al daño de los radicales libres. Cuando los radicales libres reaccionan con los lípidos generan una peroxidación lipídica directa que a su vez da lugar a unos efectos directos e indirectos (Devasagayam *et al.*, 2004).

Daño oxidativo a carbohidratos

La oxidación de carbohidratos inducida por los radicales libres ha sido estudiada en menor medida que la reacción sobre proteínas. Moléculas como la glucosa, manosa y desoxiazúcares se auto-oxidan para producir H₂O₂ y oxoaldehídos, metabolitos implicados en la patogénesis de la diabetes, cáncer y enfermedades crónicas asociadas con el consumo de tabaco (Lunec, 1990).

Daño oxidativo a ADN

El daño oxidativo de los radicales libres al ADN se produce por la acción de EROs o ERNs sobre la cadena de ADN, provocando mutaciones en pares de bases, reordenamientos, delaciones, inserciones como el radical OH[•], etc. Estos cambios afectan a la transducción de la información citoplasmática y celular y a la actividad de las proteínas y genes que regulan la respuesta al estrés, proliferación celular, diferenciación y apoptosis (Devasagayam *et al.*, 2004; Wiseman *et Halliwell*, 1996).

La formación de radicales libres también está implicada en la toxicidad de una amplia variedad de xenobióticos (antimicrobianos, fármacos antitumorales y otros). Realmente, muchos de estos compuestos químicos ejercen su acción tóxica mediante la activación metabólica a productos intermedios reactivos que son los radicales libres (Martínez-Cayuela, 1998).

2.2.7. DAÑO OXIDATIVO Y ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

El SNC es particularmente sensible y susceptible a daños inducidos por EROs debido a su morfología, a su metabolismo normal que implica un elevado consumo de oxígeno y a la composición de su membrana celular, con muchos ácidos grasos poliinsaturados. Además, es relativamente deficiente en defensas antioxidantes y tiene un alto contenido en hierro y ascorbato que favorece la generación de más EROs a través de la reacción de Fenton/Haber Weiss (Rego *et Oliveria*, 2003).

Las principales consecuencias del estrés oxidativo a nivel cerebral son la disminución intracelular de los antioxidantes, rotura de ADN, peroxidación y degradación lipídica, inflamación celular, aumento del consumo de glucosa, oxidación y sulfoconjugación de proteínas, aumento de la concentración citoplasmática de ión calcio libre, disminución del potencial de membrana mitocondrial con la consiguiente inhibición del transporte activo de iones y la recuperación de neurotransmisores.

El envejecimiento natural provoca una disminución de la respuesta celular al estrés debido a cambios morfológicos y bioquímicos paulatinos. La supervivencia celular está ligada a la capacidad de resistencia a las agresiones, capacidad que disminuye con la edad. Al envejecer, aumenta la producción de EROs, lo cual va ligado a alteraciones funcionales, aumento de la oxidación protéica y peroxidación lipídica, entre otros. La degradación de los lipoperóxidos da lugar a múltiples productos terminales entre los que destaca el malondialdehído (MDA); la cuantificación del mismo se ha utilizado como un índice del daño oxidativo a lípidos (Andersen, 2004).

Los trastornos neurodegenerativos son un grupo heterogéneo de las enfermedades del sistema nervioso, incluyendo el cerebro, la médula espinal y los nervios periféricos, que tienen diferentes etiologías. Muchos son hereditarios, otros son secundarios a procesos tóxicos o metabólicos, y otros resultado de una infección (Singh *et al.*, 2004).

Las enfermedades neurodegenerativas causan la muerte de las células neuronales hasta el punto de ocasionar progresión de la enfermedad neurológica, Hay muchos tipos diferentes de enfermedades neurodegenerativas incluyendo, pero sin limitarse, la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Alzheimer (EA), Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) y la enfermedad de Huntington. Estas enfermedades afectan a millones de personas en todo el mundo y en todas ellas se ha detectado un daño oxidativo importante en la zona afectada (Halliwell, 2011).

Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer fue descrita por primera vez por el médico alemán Alois Alzheimer en 1907. Se trata de la enfermedad neurodegenerativa más común, afectando aproximadamente al 5% de la población a la edad de 65 años y hasta el 30% de los mayores de 85 años (Galimberti *et Scarpini*, 2013). La EA es un proceso neurodegenerativo progresivo e irreversible caracterizado por la pérdida de la memoria a corto y largo plazo; en los estadios avanzados de la enfermedad, los pacientes exhiben alteraciones del comportamiento incluyendo agitación, irritabilidad, ansiedad, delirios y depresión. La patología comienza en la corteza transentorrinal, continúa hasta la corteza entorrinal, el hipocampo, la amígdala y otras áreas corticales (Braak *et Braak*, 1991; Rodríguez *et al.*, 2012).

El signo neuropatológico de la EA es la acumulación progresiva de material fibroso insoluble que normalmente no se encuentra en el SNC humano (Braak *et Braak*, 1991), con pérdida de neuronas y sinapsis y alteraciones relacionadas con procesos reactivos (Duyckaerts *et al.*, 2009). Está asociada con marcadores histopatológicos específicos como depósitos extracelulares focales de β -amiloide fibrilar (también llamadas placas neuríticas o seniles) en el parénquima del cerebro y las paredes de los vasos sanguíneos; acumulación intraneuronal de ovillos neurofibrilares compuestos de filamentos tau-hiperfosforilados anormales (Rodríguez *et al.*, 2012); peroxidación lipídica elevada con aumento de los niveles de 4-hidroxi-2-nonenal glutatión; aumento en el daño del ADN de linfocitos; modificación de proteínas en la corteza frontal (Rahman, 2007).

Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson fue descrita por primera vez en 1817 por James Parkinson, Esta patología tiene una prevalencia de alrededor del 1% a la edad de 65 años, aumentando al 5% a la edad de 85 años. La incidencia en hombres es ligeramente superior a las mujeres (Hirtz *et al.*, 2007).

La enfermedad comienza lentamente como disfunción neuronal originada por la muerte de las células dopaminérgicas (DA) de la sustancia *nigra pars compacta* (SNC) (Fearnley *et Lees*, 1991). Cuando los síntomas motores de la enfermedad aparecen, más de la mitad de la DA de las neuronas ya ha desaparecido (Fearnley *et Lees*, 1991). La demencia puede ser una complicación temprana de la EP pero su incidencia aumenta hasta el 78% en estadios posteriores (Aarsland *et al.*, 2003). Hoy en día está profundizando en la búsqueda de biomarcadores para detectar la enfermedad antes de la aparición de la sintomatología motora.

Esclerosis lateral amiotrófica

La esclerosis lateral amiotrófica es una enfermedad neurológica progresiva y devastadora caracterizado por debilidad muscular progresiva hasta parálisis total con manifestaciones clínicas heterogéneas y signos de neurona motora superior e inferior (Polkey *et al.*, 2016). Patológicamente, la ELA se caracteriza por la degeneración de las neuronas motoras y la muerte con gliosis que reemplaza a las neuronas perdidas (Yang *et al.*, 2016).

2.3. *Rosmarinus officinalis* L.

2.3.1. Estudio botánico

La especie *Rosmarinus officinalis* se incluye en la siguiente situación taxonómica:

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Subfamilia: Nepetoideae

Tribu: Mentheae

Género: *Rosmarinus*

Especie: *Rosmarinus officinalis*

Nombre científico: *Rosmarinus officinalis* L.

Son sinónimos: *Rosmarinus officinalis* subsp. *palaui* (O. Bolòs & Molin.); *R. flexuosus* Jord. & Four.; *R. laxiflorus* var. *reptans* Debeaux; *R. laxiflorus* De Noé; *R. officinalis* var. *nutans* Cout.; *R. officinalis* var. *palaui* O. Bolòs & Molin.; *R. palaui* (O. Bolòs & Molin.); *R. rigidus* Jord. & Fourr.; *R. serotinus* Loscos; *R. tenuifolius* Jord. & Fourr.

Nombres comunes:

Castellano: Romero, Romani, Romeu

Árabe: Iklil, klil

Francés: Romarin

Griego: Dendrolivano

Inglés: Rosemary

Turco: Biberiye, Mezarotu, Hasalban

La familia Lamiaceae abarca aproximadamente 224 géneros y 5.600 especies distribuidas en todo el mundo (Dominguez-Vázquez *et al.*, 2002).

El nombre del género, *Rosmarinus*, deriva del latín *ros(roris)*, que significa rocío, y *marinus*, que significa mar, siendo conocido como el “rocío del mar”.

El género *Rosmarinus* se extiende de forma natural en la zona mediterránea, aunque se cultiva ampliamente en todo el mundo. En la Península Ibérica aparece representado por tres especies: *R. officinalis* L., *R. eriocalix* Jord. & Fourr. y *R. tomentosus* Hub.-Mor. & Maire.

R. officinalis es un arbusto aromático de hoja perenne, perteneciente a la familia de las labiadas, que presenta un tallo leñoso y muy ramificado de entre 1 y 2 m de altura. Sus hojas, muy abundantes, largas y estrechas, crecen directamente sobre el tallo sin pedúnculo, con unas dimensiones de entre 1,5 y 3 cm de longitud por 2 ó 3 mm de anchura. Presentan un color verde oscuro por (el haz) la cara y una tonalidad blanquecina por el envés. En las plantas más jóvenes se recubren de abundantes pelos que desaparecen al crecer. En la zona de unión de la hoja con el tallo nacen los ramilletes floríferos. Las flores son de color azulado, violáceo o rosa y nacen en forma de ramilletes en la unión del tallo con la hoja, con un tamaño aproximado de 5 mm. El fruto mide 1 mm y aparece dentro del cáliz en forma de cuatro pequeñas nueces de color pardo (Figura 5.).

Tienen la corola bilabiada de una sola pieza. El color es azul violeta pálido, rosa o blanco, con cáliz verde o algo rojizo, también bilabiado y acampanado. Son flores axilares, muy aromáticas y melíferas (contienen miel), se localizan en la cima de las ramas, tienen dos estambres encorvados soldados a la corola y con un pequeño diente. La floración se produce en primavera y otoño.

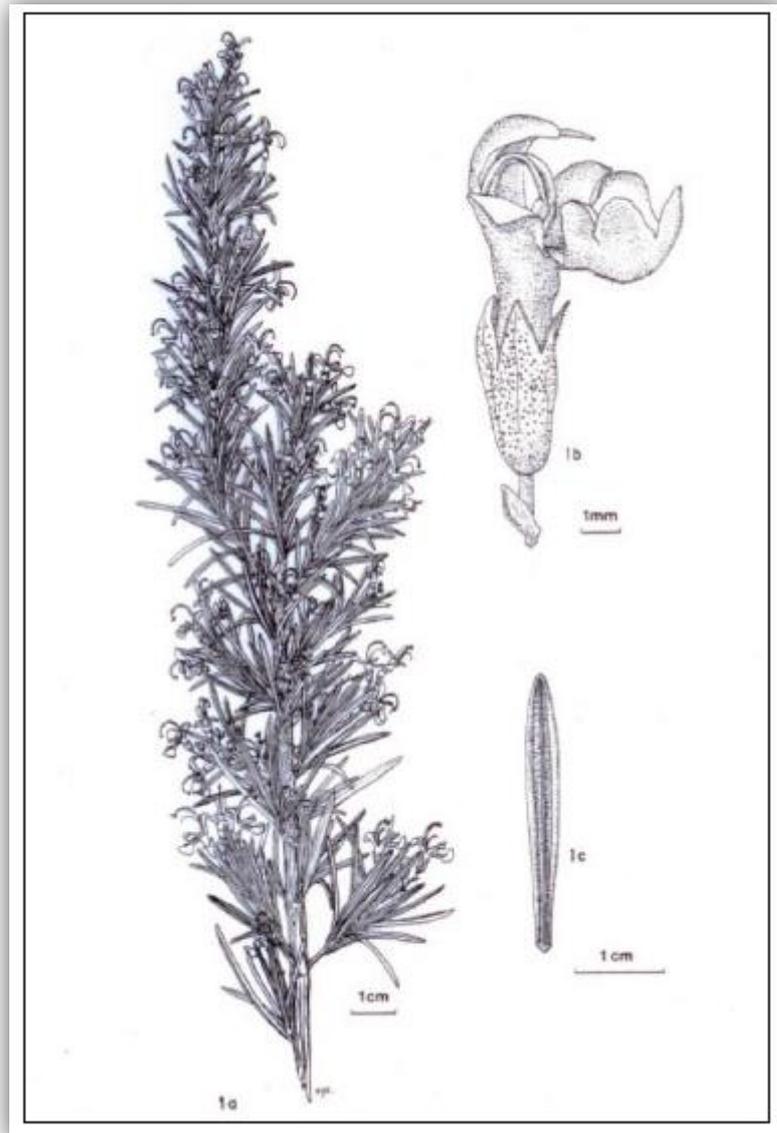


Figura 5. *Rosmarinus officinalis* L.

El origen de la planta es el área mediterránea; se distribuye de forma natural por toda la región mediterránea occidental, hasta las islas del Adriático por el Norte y hasta Libia por el Sur. Crece espontáneamente o en cultivo, en los suelos calcáreos, localizándose algunas especies también en Asia. *R. officinalis* se encuentra asilvestrado en regiones como el Cáucaso, Chipre y Macaronesia, Chile y otras zonas del centro y sur del continente americano (Figura 6A) Se cultiva como planta ornamental en todo el mundo.

En cuanto a su distribución en la Península Ibérica, se encuentra sobre todo en las zonas centro y este de la península; únicamente escasea en puntos del Norte y Noroeste. También es abundante en las Islas Baleares y Canarias (Figura 6B).

A)



B)

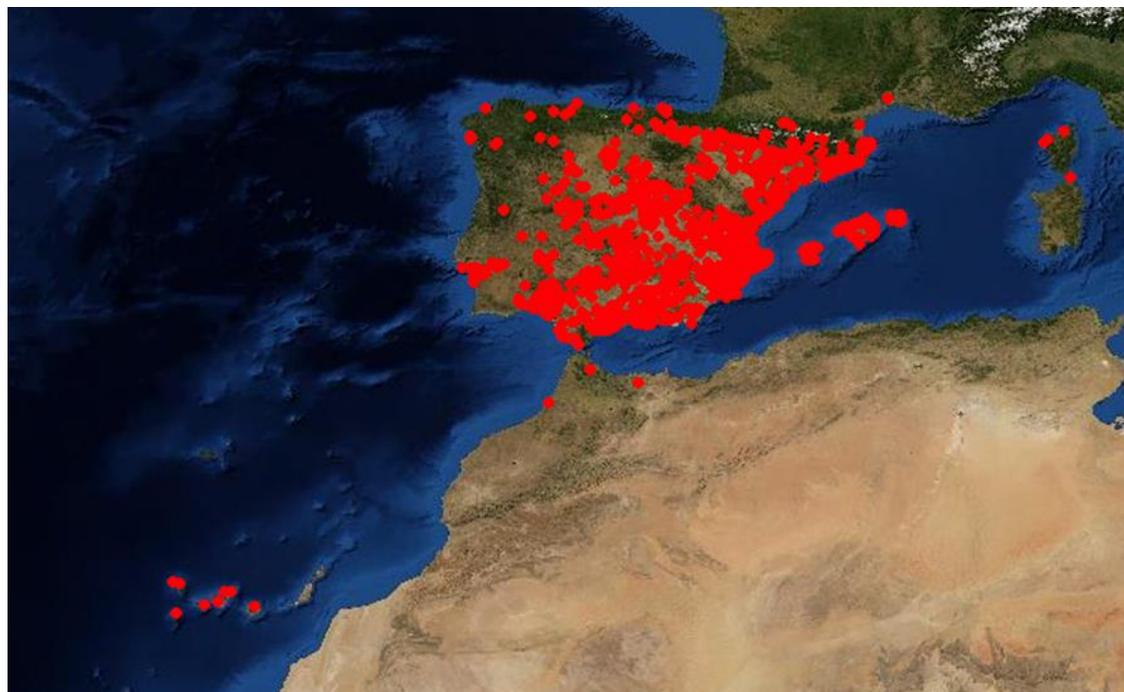


Figura 6. Mapa de distribución de *R. officinalis* L. A) en el área mediterránea y B) en España (Anthos, 2016)

Su hábitat se encuentra en espacios cubiertos de matorral mediterráneo, ubicándose en laderas soleadas y montañosas cerca del mar y protegido del viento. Se extiende por terrenos con sustratos calcáreos, asentándose entre pedregales o arenosos con gran permeabilidad, ya que necesita muy poca humedad para crecer. Sobrevive hasta los 1.500 m de altitud y soporta temperaturas mínimas de 10° C bajo cero. Crece de forma natural acompañado de otras plantas aromáticas como tomillos.

2.3.2. ESTUDIO FITOQUÍMICO

2.3.2.1. Compuestos polifenólicos

Los compuestos fenólicos o polifenoles son compuestos naturales ampliamente distribuidos en el Reino vegetal e incluyen un grupo de estructuras químicas que se caracterizan por presentar el núcleo aromático de benceno, clasificadas según el número de anillos de fenol que contengan y los elementos estructurales que actúen como sustituyentes, habiéndose identificado más de 8000 estructuras químicas diferentes (Pandey *et* Rizvi, 2009).

En cuanto a su origen biosintético, los polifenoles son productos secundarios del metabolismo de las plantas derivados de fenilalanina o su precursor, el ácido sikímico (Formica *et* Regelson, 1995) (Figura 7.). Su función en el vegetal es fundamentalmente de defensa, bien frente a la radiación ultravioleta o a la agresión de agentes patógenos.

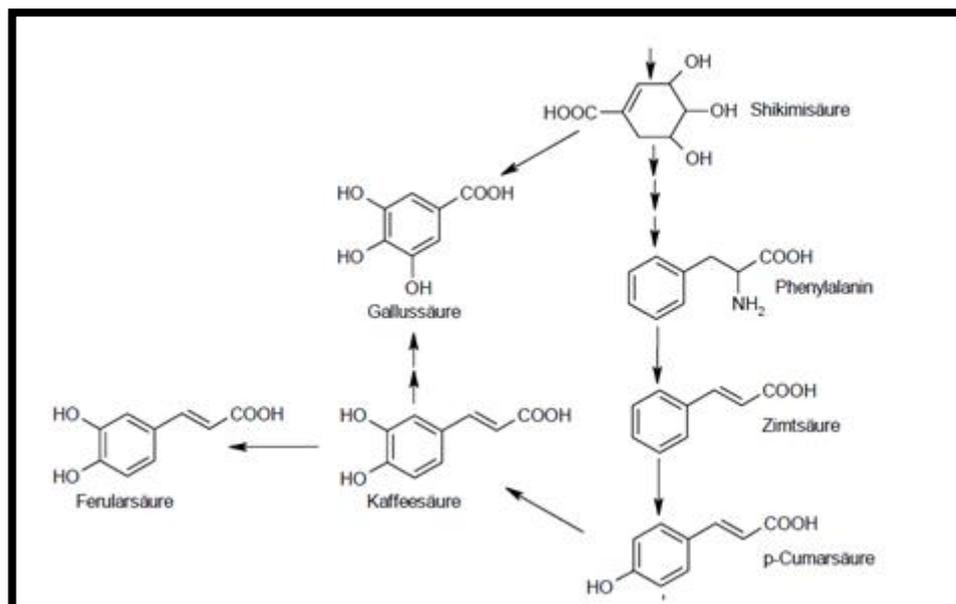


Figura 7. Ruta biosintética de polifenoles

Así, en la formación de polifenoles participan dos rutas metabólicas: la Vía de los policétidos, minoritaria en plantas superiores y la Vía del ácido sikímico, dependiente de luz. Ambas rutas metabólicas se inician con el metabolismo de la glucosa.

Los enzimas que participan se hallan asociados, formando un complejo multienzimático que cataliza todos los pasos de la biosíntesis, dando lugar a los ácidos policétidos íntegramente formados. Pero estas estructuras, donde se da una alternancia de átomos con y sin oxígeno, son muy inestables y en las plantas se estabilizan originando compuestos aromáticos de tipo fenólico.

En función del número de anillos fenólicos y de sus sustituyentes, los polifenoles se agrupan en más de 10 clases diferentes (Wollgast, 2000); los principales grupos corresponden a ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos (Pandey *et* Rizvi, 2009) (Figura 8).

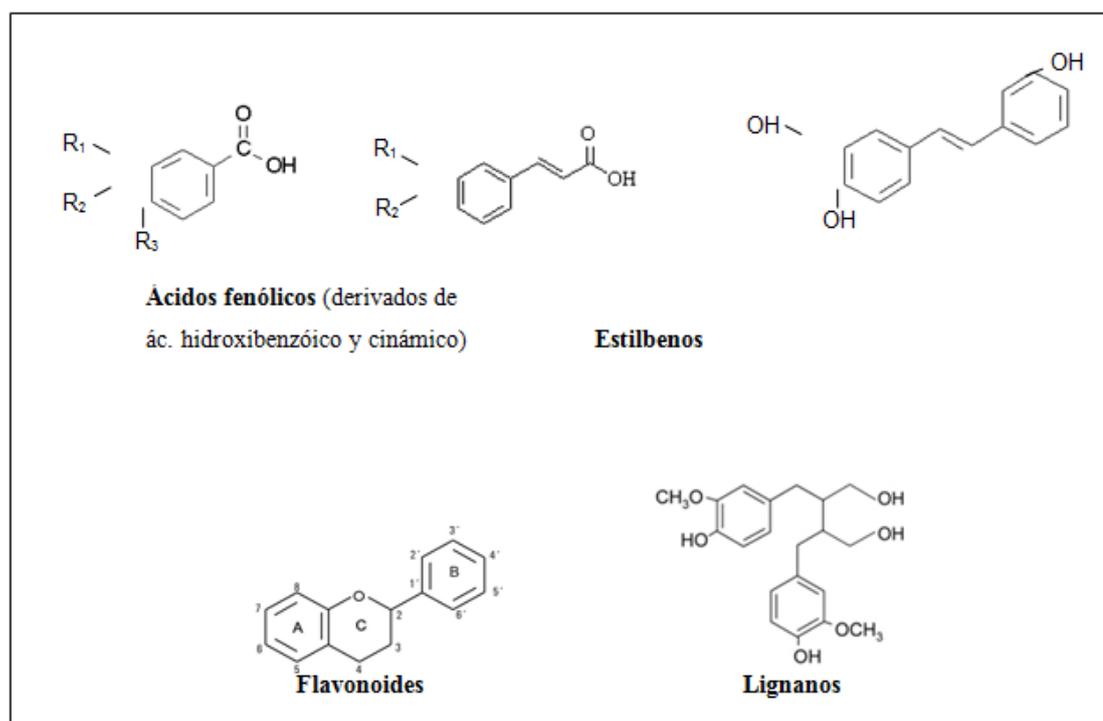


Figura 8. Estructura química de los principales grupos de polifenoles

Los fenoles se clasifican en función del número de átomos de carbono de la cadena alifática que se encuentra sustituyendo el núcleo bencénico; así, podemos encontrar compuestos de tipo C₆-C₁ derivados del ácido benzoico, como los polímeros del ácido gálico, compuestos que en general se encuentran unidos a azúcares y constituyen el grupo de los taninos hidrolizables.

De menor significación son los compuestos de tipo C₆-C₂, derivados del ácido fenilacético, como el ácido homogentísico. El grupo de fenoles simples más extenso es el C₆-C₃ que constituye los derivados de cinamoilo. Estos compuestos, junto con los de tipo C₆-C₁ y C₆-C₂, suelen acumularse en estructuras periféricas del vegetal como las glándulas de esencias, pues son componentes de los aceites esenciales. Dentro del grupo C₆-C₃ se encuentran también las cumarinas compuestos bicíclicos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, de las que se han aislado más de 1000 estructuras diferentes.

La distribución de los polifenoles en el vegetal a nivel tisular, celular y subcelular no es uniforme. Los compuestos insolubles se localizan en las paredes celulares,

mientras que los polifenoles solubles se acumulan en las vacuolas. Algunos de ellos, como la quercetina, se encuentran en todos los productos de la planta: fruto, cereales, zumos, té, vino, infusiones, etc., mientras que las flavanonas y las isoflavonas se encuentran más restringidas. En la mayoría de los casos, los vegetales contienen mezclas complejas de polifenoles que se acumulan preferentemente en las capas más superficiales de las plantas.

Extracción de polifenoles

Los polifenoles son compuestos relativamente estables que se pueden extraer a partir de planta seca y pulverizada con diferentes disolventes, tanto en frío como en caliente. Al tratarse de compuestos con gran número de sustituyentes polares, su extracción se realiza generalmente utilizando una mezcla de 70-80 % de Agua: Metanol o 70% de Agua: Acetona. También se pueden utilizar mezclas de agua y etanol, aunque así sólo se extraen parcialmente, debido a la presencia de polímeros de alto peso molecular como las procianidinas (Lee *et* Widmer, 1996).

Para la identificación y cuantificación de estos compuestos se pueden utilizar diferentes técnicas cromatográficas, siendo de especial interés la cromatografía líquida de alta eficacia o alta resolución (HPLC).

Como Fase estacionaria se emplean columnas de fase reversa C18 (octadecilsilano), con un tamaño de partícula entre 3 y 10 μm (Graayer, 1989; Lee *et* Widmer, 1996; Markham *et* Bloor, 1998; Mc Murrough *et* Byrne, 1992). Las fases móviles más utilizadas para el análisis de polifenoles están compuestas por Agua, Acetonitrilo y Metanol, con la adición de algún corrector ácido como el acético, fórmico o fosfórico (Lee *et* Widmer, 1996; Markham *et* Bloor, 1998).

Los principales compuestos fenólicos presentes en la hoja de romero, con capacidad antioxidante, son los ácidos fenólicos rosmarínico ($\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_8$), caféico ($\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$) y clorogénico ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$) y los diterpenos fenólicos carnosol ($\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_4$) y ácido carnósico ($\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_4$) (Figura 9).

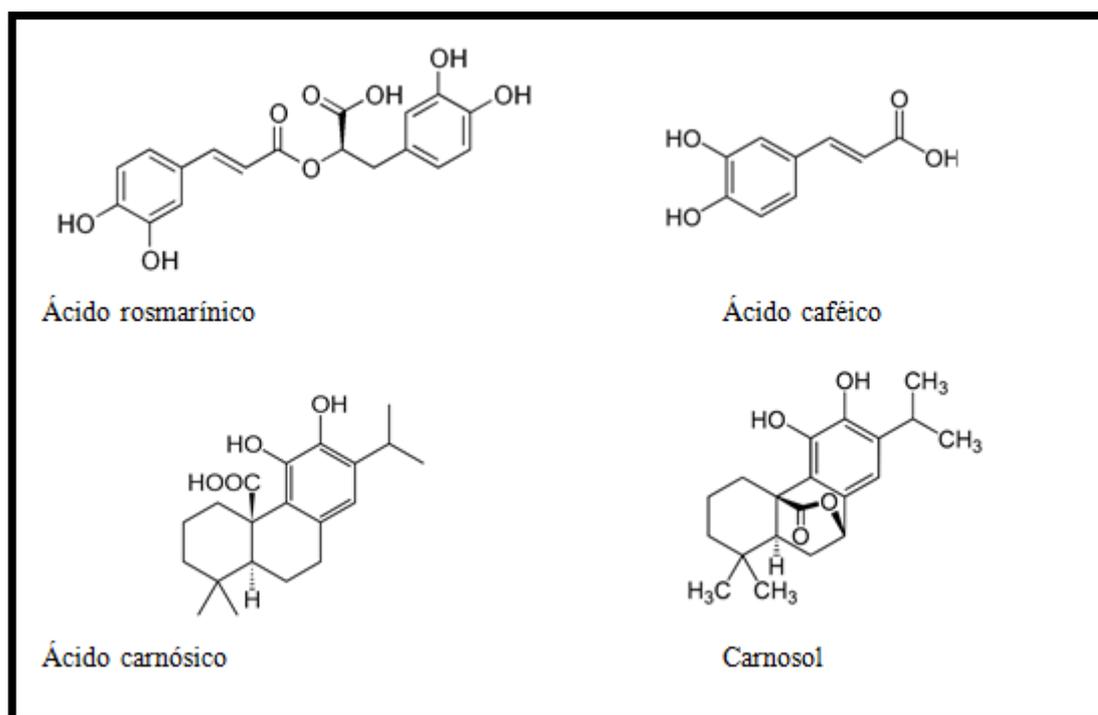


Figura 9. Estructura química de los principales compuestos fenólicos identificados en *R. officinalis* L.

A partir de cultivos de brotes de romero mantenidos durante 17 meses, se detectaron cantidades variables de ácido carnósico y carnosol, los cuales fueron también identificados en cultivos de callos, aunque en cantidades entre 20 y 80 veces inferiores a los primeros. Al realizar cultivos en suspensión, sólo se detecta el ácido carnósico, también en cantidades muy bajas.

La cantidad de ácido rosmarínico es comparable al realizar cultivos de brotes y de callos, siendo superior su concentración en cultivos en suspensión.

Por tanto, la cantidad de ácidos carnósico y rosmarínico y carnosol en los extractos de romero depende del grado de diferenciación del tipo de cultivo celular (Kuhlmann *et al.*, 2006).

Se ha comprobado que el rendimiento en compuestos fenólicos en la especie varía en función de la localización geográfica, estado fenológico y momento de la recolección, siendo superior en los meses de verano (junio a septiembre). Esta

variación afecta a la potencial capacidad antioxidante del extracto obtenido (Abuashwashi *et al.*, 2016; Abuashwashi *et al.*, 2014; Almela *et al.*, 2006; del Baño *et al.*, 2006; Collins et Charles, 1987; Moreno *et al.*, 2006; Papageorgiou *et al.*, 2008; Yesil-Celiktas *et al.*, 2007).

2.3.2.2. Aceite esencial

El aceite esencial de romero es un líquido incoloro o amarillo pálido, con aroma característico balsámico, de tipo cineol, más o menos alcanforado, y con una composición compleja que incluye monoterpenos, fenoles, sesquiterpenos, éteres, cetonas y alcoholes de monoterpenos, ésteres de los anteriores, alcanfor, eucaliptol, α -pineno y borneol (Fahim *et al.*, 1999; Steinmetz *et al.*, 1987), de forma que los monoterpenos son los compuestos más representativos. Estos componentes proceden del metabolismo secundario del vegetal y se biosintetizan en diversos órganos de especies denominadas aromáticas (Figura 10).

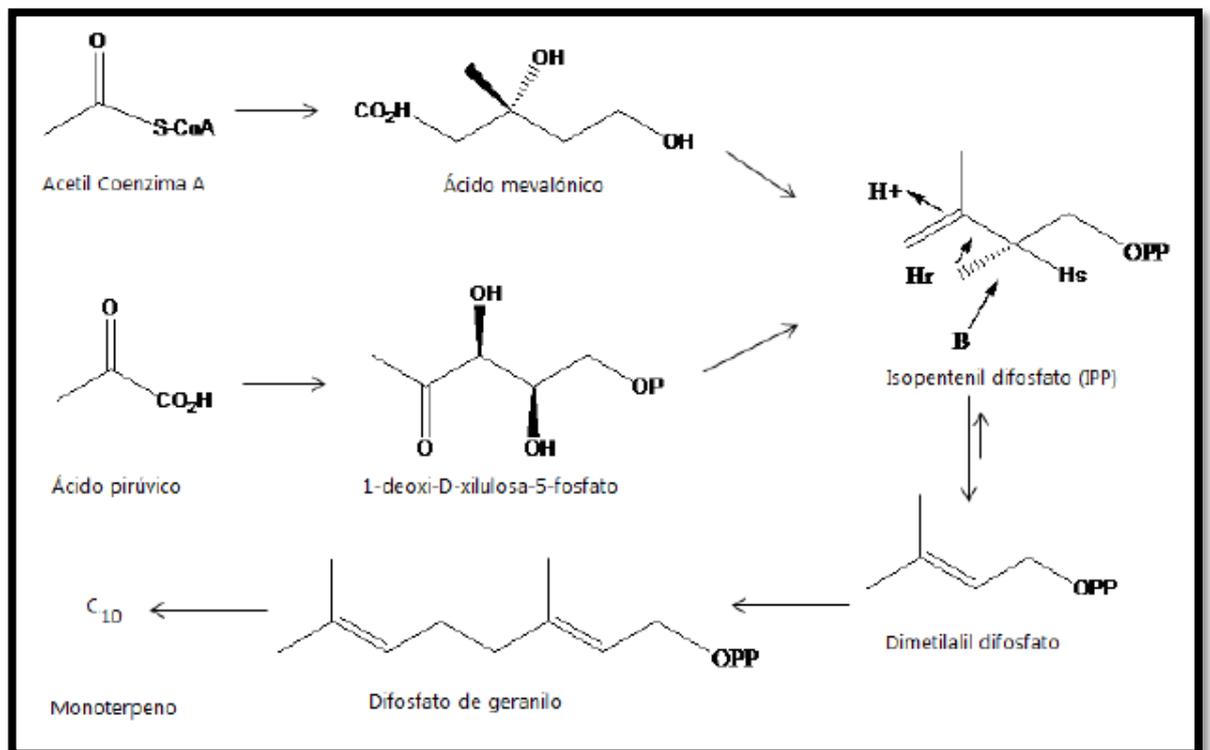


Figura 10. Esquema biosintético de monoterpenos

De acuerdo con la estructura del esqueleto carbonado de los principales componentes del aceite esencial, se pueden encontrar tres tipos biogénicos: tipo eucaliptol (Italia, Marruecos y Túnez), tipo alcanfor-borneol (España) y tipo α -pineno-verbenona (Francia, Córcega).

Los principales componentes son el 1,8-cineol (20-50%), α -pineno (15-26%), alcanfor (10-25%), acetato de bornilo (1-5%), borneol (1-6%), canfeno (5-10%) y α -terpineol (12-24%) (Figura 5), encontrándose cantidades inferiores y variables de limoneno, β -pineno, β -cariofileno y mirceno (ESCOPE, 1997). Existen además unos límites establecidos a nivel internacional sobre la composición exacta del aceite esencial de romero con el fin de garantizar su calidad (ISO, 2000) (Tabla 1).

Compuesto	Tipo eucaliptol (Italia, Marruecos y Túnez)		Tipo alcanfor- borneol (España)	
	% mínimo	% máximo	% mínimo	% máximo
α -pineno	9	14	18	26
canfeno	2,5	6	8	13
β -pineno	4	9	2	5
mirceno	1	2	2,5	4,5
limoneno	1,5	4	2,5	5,5
1,8-cineol	38	55	17	25
<i>p</i> -cimeno	0,5	2,5	1	2
alcanfor	5	15	12,5	22
acetato de bornilo	0,1	1,6	0,4	2,5
α -terpineol	1	2,5	1	3,5
borneol	1	5	2	4,5
verbenona	n.d. ^a	0,4	0,7	2,5

^an.d.: no
detectable

Tabla 1. Composición del aceite esencial de *R. officinalis* L. de acuerdo con la norma (ISO 1342:2000)

En la Figura 11 se representa la estructura química de los principales componentes del aceite esencial de *R. officinalis* L.

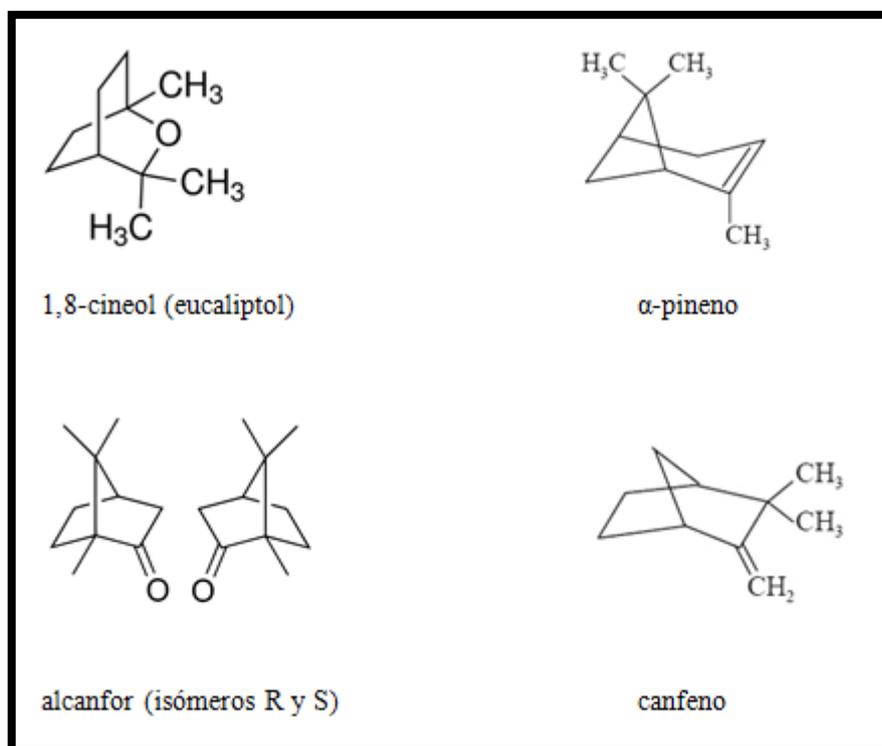


Figura 11. Principales componentes del aceite esencial de *R. officinalis* L.

La cantidad y composición del aceite esencial varía entre subespecies, parte de la planta utilizada, origen geográfico y método de preparación. También varía en función del desarrollo de hojas, flores, tallos y raíces de *R. officinalis* (Angioni *et al.*, 2004; del Baño *et al.*, 2006; Palomino *et al.*, 2010). Aunque el rendimiento en aceite esencial es variable, para que pueda ser considerado oficial no debe ser inferior a 12ml/kg (Ph. Eur., 8ª, 1560).

En general, los aceites esenciales presentan cierta toxicidad cuando se utilizan *in vivo*. En el caso del aceite esencial de romero, es considerado como Seguro (Generally Recognized as Safe - GRAS) por la Asociación Americana de Fabricantes de Fragancias y Esencias (Fragrance and Essence Manufacturers Association - FEMA) desde 1965 y se encuentra en el listado de la Agencia Norteamericana de Alimentación y Medicamentos (Food and Drug Administration - FDA) para su uso en alimentación.

En el año 1970, el Consejo de Europa incluyó el aceite esencial de romero en la lista de sustancias, especias y condimentos admisibles para su uso, con una posible limitación de la cantidad de principio activo en el producto final (EFSA, 2008). Por lo tanto, las preparaciones conteniendo aceite esencial de romero pueden considerarse como seguras y carentes de efectos tóxicos a las dosis recomendadas.

Sin embargo, su uso no se recomienda durante el embarazo debido a la toxicidad de algunos de sus componentes (McGuffin *et al.*, 1997) y está contraindicado en casos de obstrucción del conducto biliar, colangitis, enfermedad hepática, piedras en la vesícula biliar y otros trastornos biliares que requieran supervisión médica.

2.3.3. ESTUDIO ETNOFARMACOLOGICO

El romero es una planta aromática que crece de forma espontánea en toda la zona mediterránea y que ha llevado al empleo de las partes aéreas y el aceite esencial en medicina tradicional desde la antigüedad, para el alivio de la astenia, debilidad crónica, como carminativo y para mejorar la circulación sanguínea, entre otras aplicaciones (Laguna, 1968; Puerto, 2005).

El aceite esencial ya se empleaba en la antigua Grecia para mejorar la memoria. En la Edad Media, la obra de Dioscorides “Materia Medica” (1555) describe el uso del aceite esencial con fines medicinales como tónico, estimulante, carminativo en casos de dispepsia, para el dolor de cabeza y tensión nerviosa (Laguna, 1968; Puerto, 2005); como aditivo en baños de agua caliente se ha aplicado en casos de cansancio y para estimular la circulación (Morton, 1977). En la “Materia Medica” hindú (Nadkarni, 1999) se describe por sus acciones carminativa y estimulante. Por otro lado, la British Herbal Pharmacopoeia (BHP, 1983) incluye las indicaciones siguientes para el aceite esencial de romero: “estados depresivos con debilidad general y debilidad cardiovascular” (Tabla 2).

Preparación	Uso tradicional	Forma de uso/ Vía de aplicación	Referencia
Partes aéreas y Aceite esencial	Espasmolítico	Infusión o decocción de las partes aéreas; aceite esencial/ Vía oral	Ph Fr., 1980 (romero)
Aceite esencial	Antiséptico, cicatrizante de heridas	Solución alcohólica/ Vía tópica	
Aceite esencial, hojas secas y ramitas	Carminativo, espasmolítico, sedante, diurético, antimicrobiano	Vía oral	BHP, 1983
	Rubefaciente, analgésico suave, parasiticida	Vía tópica	
Partes aéreas	Mejora de las funciones hepática y biliar y en trastornos dispépticos	Infusión, extracto fluido o tintura/ Vía oral	ESCOPE, 1997
Partes aéreas y Aceite esencial	Adyuvante en condiciones reumáticas y trastornos circulatorios periféricos	Extracto etanólico o decocción de las partes aéreas; aceite esencial/ Vía tópica	
	Cicatrizante de heridas y antiséptico		
Partes aéreas y Aceite esencial	Dispepsia	Vía oral	Blumenthal (Commission E monographs, 1998)
Aceite esencial	Trastornos reumáticos y problemas circulatorios	Vía tópica	

Tabla 2. Usos tradicionales de *R. officinalis* L. según fuentes bibliográficas

En la actualidad, el aceite esencial de romero se utiliza también como tónico y para tratar la fatiga mental (Laybourne *et al.*, 2003).

2.3.4. ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA

Además de sus usos tradicionales, diversas publicaciones científicas han demostrado el interés del romero como diurético, antidepresivo, antiespasmódico y en el tratamiento del resfriado, gripe y dolor reumático (Chandler, 1985; Erenmemisoglu, 1997). Recientemente se ha comprobado su eficacia en la mejoría de factores globales y secundarios relacionados con la memoria (Moss *et al.*, 2003), así como su efecto hipotensor y mejoría de la calidad de vida de pacientes hipertensos (Fernandez *et al.*, 2013).

Basándose en los usos tradicionales de la especie se han publicado numerosos estudios farmacológicos con objetivo de validarlos, así como identificar los principios activos responsables de la actividad observada.

2.3.4.1. Preparaciones de *Rosmarinus officinalis* L.

La actividad farmacológica de las diferentes preparaciones de romero se atribuye principalmente a su contenido en compuestos fenólicos, con probada actividad antioxidante: inhiben la producción de especies reactivas de oxígeno, cuya acumulación ejerce un efecto negativo en diferentes órganos y sistemas. Presentan una actividad quelante de metales y de oxígeno y favorecen la supervivencia celular (Bravo, 1998; Pandey *et al.*, 2009; Rizvi, 2009; Rice-Evans, 1995; Scalbert *et al.*, 2005a)

Esta capacidad antioxidante permite proteger a los componente celulares frente al daño oxidativo y limitar así las consecuencias derivadas del estrés oxidativo. Los polifenoles han demostrado actividad antitumoral, antimicrobiana (Konneh *et al.*, 1998), antiinflamatoria (Agarwal *et al.*, 1996; Mukhtar, 1996; Kuo, 1997; Newmark, 1996), antialérgica (Benavente-García, *et al.*, 1997; Middlenton, 1998) y pueden actuar modulando reacciones inmunes (Rohdewald, *et al.*, 1997), así como las acciones de los enzimas topoisomerasa II DNA (Romanczyk *et al.*, 1997), tirosina kinasa (Groundwater *et al.*, 1996), citocromo P-450 (Huang *et al.*, 1992), óxido nítrico sintasa (Romanczyk *et al.*, 1997), ciclooxigenasa y lipoxigenasa

(Cook *et al.*, 1996; Romanczyk *et al.*, 1997), directamente implicados en procesos inflamatorios y apoptóticos a nivel celular.

Estudios *in vitro*

El extracto alcohólico de romero presenta una buena actividad antiespasmódica en íleo de cobaya aislado utilizando acetilcolina e histamina como agentes espasmógenos (Forster *et al.*, 1980).

Numerosos estudios demuestran la actividad antioxidante de extractos de romero y sus principales componentes aislados. La actividad antioxidante de extractos de *R. officinalis* depende directamente de la concentración de diterpenos fenólicos (Schwarz *et al.*, 1992), observándose una gran variabilidad en la concentración de los mismos en las muestras comerciales analizadas (2,8 a 22,5%).

Los cuatro diterpenos ácido carnósico, rosmanol, carnosol y epirosmanol, aislados a partir de las hojas de romero, inhiben la producción del anión superóxido en el sistema xantina/xantina oxidasa, mostrando un efecto protector frente al estrés oxidativo (Haraguchi *et al.*, 1995).

El mecanismo de acción *in vitro* de la infusión y extracto acetato de etilo de *R. officinalis* frente a radicales hidroxilo, directa o indirectamente implicados en el daño celular, se estudió mediante dos modelos que expresan sus resultados como IC₅₀. Ambas muestras (infusión y extracto acetato de etilo) mostraron una baja actividad como captadores de OH⁺ (Guerreiro *et al.*, 1994). Al estudiar su actividad antioxidante mediante diferentes modelos, se observó una respuesta diferente en función del método utilizado; el extracto de romero fue capaz de prolongar el tiempo de respuesta en el ensayo de oxidación de lipoproteínas de baja densidad humanas (LDL) *ex vivo*. Además, la capacidad antioxidante observada no se relaciona totalmente con el contenido total en fenoles, pero sí con el contenido en ácido rosmarínico, principal componente del extracto (Dorman *et al.*, 2003).

En el estudio realizado por Kuhlmann *et al.* (2006) se demostró que la actividad captadora de radicales del extracto de romero (método de DPPH) depende de la presencia y cantidad de tres componentes: ácido carnósico, carnosol y ácido rosmarínico, y fundamentalmente de este último, relacionado también directamente con la actividad antiinflamatoria del extracto.

Para estudiar los mecanismos moleculares relacionados con la acción quimiopreventiva del extracto de romero y algunos de sus componentes aislados, se utilizaron modelos de cultivo celular hepático y bronquial humanos. Tanto el extracto como carnosol y ácido carnósico aislados muestran una actividad inhibidora potente de la formación de aductos de ADN inducidos por benzo (α) pireno o aflatoxina B₁. Se postula que los dos mecanismos principales relacionados con esta acción anticarcinogénica son; a) la inhibición de la activación metabólica de los pro-carcinógenos catalizada por enzimas de fase I citocromo P450; y b) la inducción de la vía de desintoxicación catalizada por enzimas de fase II como la glutatión-S-transferasa (Offord *et al.*, 1997).

El ácido rosmarínico inhibe de forma potente la formación de ácido 5-hidroxi-6,8,11,14-eicosatetranoico (5-HETE) y los leucotrienos B₄ (LTB₄) a concentraciones de 10⁻⁵–10⁻³M (Kimura *et Okida*, 1987). Además, aumenta la producción de prostaglandina E₂ e inhibe el sistema de complemento (Al-Sereti *et al.*, 1999).

Los efectos del ácido rosmarínico y fragmentos de gamma globulinas humanas, inhibidor de la activación del complemento, se ensayaron en relación a los cambios hematológicos y hemodinámicos inducidos por endotoxinas en conejo (Bult *et al.*, 1985). Sus efectos se compararon con la depleción causada por el factor de veneno de cobra (CVF). El ácido rosmarínico (20mg/kg) inhibe en un 70% la activación del complemento tras inyección de endotoxina, lo que se traduce en una reducción de la síntesis de prostaciclina y tromboxano; así mismo, afecta a los efectos independientes del complemento como la leucopenia o la formación de edema pulmonar (Bult *et al.*, 1985).

Los resultados del estudio de Makino et al. (2000) sugieren que el ácido rosmarínico puede prevenir la proliferación celular mesangial a dosis bajas. La proliferación de células glomerulares mesangiales es uno de los principales hallazgos histológicos en diferentes patologías renales y se encuentra mediado por varios factores humorales. El ácido rosmarínico reduce de forma significativa la síntesis basal de ADN ($p < 0,001$); inhibe de forma significativa y dosis dependiente la síntesis del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y del factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$) ($p < 0,01$ a $0,05$). El estudio dinámico mostró que el ácido rosmarínico es efectivo incluso adicionado ocho horas después del estímulo de crecimiento y sugiere que suprime la entrada de las células mesangiales en fase S (Makino *et al.*, 2000).

El ácido carnósico ha demostrado efecto inhibitor de proteasas frente al virus de inmunodeficiencia humana ($\text{IC}_{90} = 0,08\mu\text{g/ml}$), mientras que el extracto de romero mostró un 50% de inhibición en la formación de placa viral (Paris *et al.*, 1993; Romero *et al.*, 1989). El efecto citotóxico TC_{90} en linfocitos H9 del ácido carnósico es de $0,36\mu\text{g/ml}$, muy cercano a la dosis antiviral eficaz (Paris *et al.*, 1993).

Un extracto metanólico con un 30% de ácido carnósico, 16% de carnosol y 5% de ácido rosmarínico ha mostrado un efecto potente como agente antimicrobiano frente a bacterias Gram positivas (concentración mínima inhibitoria- MIC entre 2 y 15mg/ml), Gram negativas (MIC entre 2 y 60mg/ml) y levaduras (MIC de 4mg/ml). En contraste, un extracto acuoso conteniendo un 15 % de ácido rosmarínico, mostró una actividad antimicrobiana menor (Moreno *et al.*, 2006).

El extracto etanólico de romero ($0,5\text{g}/100\text{g}$ peso corporal) ejerce un efecto hepatoprotector cuando se administra a ratas durante 3 semanas, usando tetracloruro de carbono y ciclofosfamida como compuestos mutagénico y hepatotóxicos. Este efecto es comparable al obtenido con silimarina como compuesto de referencia, observándose una mejoría en los parámetros séricos y hepáticos (Fahim *et al.*, 1999).

Este efecto hepatoprotector también se observa en el modelo de daño inducido por hidróperóxido de terc-butilo en rata (Joyeux *et al.*, 1990).

Estudios *in vivo*

Una de las principales indicaciones tradicionales del romero está relacionada con alteraciones en el eje hepato-renal, fundamentalmente trastornos hepatobiliares. Los brotes jóvenes de la planta han demostrado efecto hepatoprotector y sobre la secreción biliar en animal de experimentación, observándose además un efecto diurético suave; estas propiedades no se obtienen al ensayar la planta entera (Asai *et al.*, 1999; Fleurentin *et al.*, 1986; Haloui *et al.*, 2000; Hoefler *et al.*, 1987).

El extracto hidroalcohólico (70%) de *R. officinalis*. disminuye el índice de lesión ulcerosa en diferentes modelos experimentales en rata.

Además, estudios preliminares realizados con el ácido rosmarínico aislado muestran el efecto anti-inflamatorio a nivel gingival (van Dyke *et al.*, 1986).

Así mismo, se han publicado ensayos que muestran cierto efecto hipoglucémico en ratón, tras la ingesta de una infusión de hojas de romero (Erenmemisoglu *et al.*, 1997).

El efecto a nivel inmunológico observado en los estudios *in vitro*, únicamente se observa en los ensayos *in vivo* en condiciones de estrés, como una deficiencia en proteínas o antioxidantes (Babu *et al.*, 1998).

Otros estudios detectan cierta actividad de los principales componentes de *R. officinalis* como antitumorígenicos, citotóxicos o antimutagénicos (Fahim *et al.*, 1999; Singletary *et Nelshoppen* 1991).

2.3.4.2. Aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L.

El aceite esencial de romero se investigó junto con los aceites esenciales de *Mentha piperita* L., y *Salvia officinalis* L. con el fin de comprobar su actividad espasmolítica en la musculatura longitudinal de íleo de cobaya, comprobándose que la concentración de los componentes de los aceites esenciales influye en su acción. Los tres aceites esenciales ensayados muestran actividad espasmolítica. La acción estimulante del pineno se traduce en la inducción de espasmos, mientras que el sumatorio de los demás componentes lleva a un efecto espasmógeno/espasmolítico (Taddei *et al.*, 1988).

Las mismas muestras se ensayaron a dosis entre 0,1 y 1 mg/Kg, vía *i.v.*, en cobayas macho, mediante el método experimental de Boissier y Chivot. El esfínter de Oddi, en estado de contracción con hidrocloreuro de morfina (1 mg/kg, *i.v.*), se relajó tras la inyección de las tres muestras. El tiempo necesario para recuperar la contracción normal del esfínter de Oddi se acelera de forma proporcional a la dosis de aceite esencial (Giachetti *et al.*, 1988).

Al estudiar la actividad espasmolítica de los compuestos aislados frente a los agentes espasmógenos BaCl₂ y acetilcolina, el alcanfor no mostró actividad agonista frente a ninguno de ellos (Cabo *et al.*, 1986).

El aceite esencial de *R. officinalis* ejerce un efecto relajante sobre el músculo liso de tráquea en un modelo de órgano aislado (Aqel, 1991). Las contracciones inducidas por acetilcolina en músculo liso de conejo y las inducidas por histamina en cobaya son inhibidas por el aceite esencial, de forma dosis dependiente y reversible. Los resultados obtenidos indican un posible mecanismo de acción como antagonista de calcio (Aqel, 1991).

El aceite esencial de romero muestra mayor actividad antioxidante que sus principales componentes aislados (1,8-cineol, α -pineno, β -pineno) en los ensayos de DPPH y blanqueador de β -pineno, siendo aquella directamente dependiente de la concentración ensayada (Wang *et al.*, 2008).

A nivel de la contractilidad del músculo cardíaco (Hof *et Ammon*, 1989), el aceite esencial, con un contenido de 40,9% de 1,8-cineol, 5,2% de acetato de bornilo, 13,9% de α -pineno y 7,1% de β -pineno, se ensayó sobre aurícula aislada de cobaya y se comparó su efecto con el obtenido en íleon aislado. El comportamiento observado es diferente en ambos músculos: en íleon aislado, la inhibición media máxima de las contracciones inducidas por acetilcolina se obtiene con concentraciones más altas de 1,8-cineol (465nl/ml frente a 100nl/ml), mientras que ocurre lo contrario con el acetato de bornilo (112nl/ml frente a 400nl/ml). Los autores concluyeron que tanto el aceite esencial de romero como el 1,8-cineol y el acetato de bornilo deprimen la contractilidad del músculo cardíaco e inhiben las contracciones inducidas por acetilcolina en íleon de cobaya (Hof *et Ammon*, 1989). Los resultados del estudio realizado posteriormente con el aceite esencial en músculo liso vascular de conejo sugieren un efecto relajante directo, dosis dependiente y reversible (Aquel, 1991).

La actividad antimicrobiana y fungicida del aceite esencial de romero es débil, inferior a la de otros aceites esenciales estudiados como el de *Satureja montana* L. o *Thymus vulgaris* L., aunque con un espectro de acción amplio (Benjilali *et al.*, 1986; Panizzi *et al.*, 1993).

Así mismo, tiene actividad insecticida frente a *Drosophilla auraria* (Konstantopoulou *et al.*, 1992), no posee capacidad de inhibir el crecimiento de *Candida albicans* (Larrondo *et Calvo*, 1991).

En resumen, los estudios publicados demuestran el efecto beneficioso de *R. officinalis* a nivel digestivo, como carminativo y en trastornos como flatulencia o distensión abdominal. El aceite esencial posee efecto antibacteriano y anti-

inflamatorio, mientras que el extracto de la planta presenta actividad diurética y, a dosis muy elevadas, hepatoprotectora.

La actividad antioxidante de *R. officinalis* depende fundamentalmente de los diterpenos fenólicos, como ácido carnósico, carnosol y rosmanol, cuyo contenido en la planta puede variar en función de su estado fenológico, origen geográfico o incluso técnica de secado o destilación. Estudios *in vitro* indican que el compuesto con mayor potencia antioxidante es el ácido carnósico. Los experimentos realizados en animal de experimentación demuestran la actividad inhibidora de los diterpenos sobre peroxidasas lipídicas y su influencia en los niveles de glucosa.

Todo lo anteriormente expuesto demuestra el interés del estudio en profundidad de la composición química y de la actividad antioxidante del extracto metanólico y el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* mediante ensayos que abarquen diferentes mecanismos de acción, ya que únicamente se han realizado ensayos preliminares con resultados positivos y prometedores a este nivel.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. MATERIAL VEGETAL

3.1.1.1. *Rosmarinus officinalis* L.

El material vegetal utilizado en este trabajo corresponde a la parte aérea de *Rosmarinus officinalis* L. procedente de flora espontánea de diferentes localizaciones geográficas de la península Ibérica (Tabla 3). La parte aérea de la planta se recolectó de forma manual en plena floración, entre los años 2009 y 2010.

Los ejemplares fueron autenticados por la Dra. M^a Ángeles Cases Capdevila y el Dr. Federico Varela Nieto (Departamento de Plantas Aromáticas y Medicinales. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria –INIA–, Madrid, Ministerio de Ciencia e Innovación). Un espécimen de cada muestra se conserva en el Herbario interno del INIA para control.



Figura 12. Especimen de *Rosmarinus officinalis* L. (Tomado por el autor)

Muestra	Provincia	Municipio	Localidad	Latitud	Longitud	Altitud
1	Toledo	Ontígola	Ontígola/Aranjuez TO2542	400051N	0033514W	589
2	Toledo	Almorox	Pinar de Almorox CM507 cruce N403	401729N	0042154W	715
3	Toledo	Alcaudete de la Jara	N502 km134	394957N	0045209W	477
4	Murcia	Lorca	La Paca, finca La Misquiruela	375222N	0015320W	833
5	Murcia	Moratalla	La Rogativa	380841N	0021343W	1161
6	Albacete	Robledo	CM3133 km33	384704N	0022705W	1002
7	Valencia	Lliria	Casinos/Alcubias CV245 km6-7	394521N	0004104W	502
8	Guadalajara	Alcocer	N320 km202.5 camino rural	402809N	0023252W	710
9	Cuenca	Huete	Huete/Vellisca dcha. La Peñuela	400829N	0024158W	847
10	Guadalajara	Cifuentes	Masegoso de Tajuña/Cifuentes N204 km52-53	404837N	0024022W	936
11	Zaragoza	Pina de Ebro	La Almolda/Monegrillo A1104 km34-35 izda.	413514N	0002029W	407
12	Tarragona	Pontils	Sant Magi de Brufaganya Las Fuentes	412859N	0012705E	704
13	Tarragona	Flix	La Palma d'Ebre/Flix T703 km1-2	411615N	0003514E	149
14	Madrid	Morata de Tajuña	Puente de Arganda	401347N	0032613W	537

Tabla 3. Descripción geográfica de las muestras de *R. officinalis* L. recolectadas

Las muestras recolectadas se extendieron de forma adecuada para su secado, en una habitación aireada, a temperatura ambiente y protegida de la luz. Se tomaron muestras para controlar la pérdida de humedad a los 14, 15 y 16 días, de acuerdo con las monografías correspondientes de la Ph. Eur. 2.2.32 *Pérdida por desecación (20232)* y *Hoja de romero (1560)*. Una vez desecadas, las muestras se almacenaron en bolsas de papel, en lugar fresco, seco y protegido de la luz hasta su utilización.

3.1.1.1.1. Aceite esencial

El aceite esencial de las diferentes muestras de romero se obtiene por destilación por arrastre en corriente de vapor de agua de los tallos, con sus hojas y flores, empleando un aparato Clevenger, tal y como se detalla en el apartado de Métodos (3.2.2.2.)

3.1.1.1.2. Extracto metanólico

El extracto metanólico de las muestras de romero se obtiene por maceración de las partes aéreas secas de la planta con metanol R, tal y como se detalla en el apartado de Métodos (3.2.2.4.).

3.1.2. MATERIAL CELULAR

3.1.2.1. Cultivo celular

Los estudios de actividad se llevan a cabo en la línea celular U373-MG ECACC (European Collection of Animal cell Cultures, Salisbury, Wiltshire, Gran Bretaña). Son células que provienen de astrocitoma-glioblastoma cerebral humano con aspecto estrellado, con una buena adherencia a los frascos de cultivo utilizados y cuyo crecimiento se produce en monocapa.

3.1.2.2. Material de cultivo celular

- Medio DMEM con 4,5 g/l de glucosa, L glutamina, Na piruvato y 25 mM de HEPES, y Gentamicina al 0,5% como antibiótico.
- Suero fetal bovino (FBS) al 10% para el crecimiento y al 1% para el mantenimiento del cultivo.
- Frascos de cultivo de 75 cm²
- Autoclave, Trace Raypa Steam Sterilizer, Modelo STERICLAV-S (Raypa, España)
- Baño termostatzado, Modelo Unitronic 320 OR (Selecta Precisterm, España)
- Cabina de flujo laminar vertical, Thermo Scientific. (MSC Advantage, España)
- Centrífuga Sorvall RT 6000 Du Pont Instruments (Giralt, EEUU)
- Congelador de -80°C, Modelo 902, Thermo electron corporation. (ULT Freezer, España)
- Eppendorf de 0,5; 1,5 y 2 ml (Sarsdtedt, Alemania)
- Frigorífico y congelador -20°C (Balay, España)
- Incubador termostatzado con gas CO₂, Modelo Heracell 150 (Thermo Electron Corporation, España)
- Microscopio óptico invertido (NIKON TMS, Japón)
- Nitrógeno Líquido, 35 VHC (Taylor-Wharton, Alemania)
- Pipetas estériles (Sarsdtedt, Alemania)
- Frascos de cultivo estériles (Sarsdtedt, Alemania)
- Placas petri y placas de 96 pocillos estériles (Sarsdtedt, Alemania)
- Tubos estériles de 15 y 50 ml (Sarsdtedt, Alemania)

3.1.2.3. Tóxico

Se ha seleccionado como tóxico el peróxido de hidrógeno (H₂ O₂ - Sigma, St. Louis, MO, USA) en base a su capacidad de generar especies reactivas de oxígeno, produciendo un daño celular que puede desembocar en muerte celular. El H₂ O₂ es una especie reactiva que produce daño oxidativo a nivel del ADN

(siendo este daño mucho mayor que el producido por el hierro), en los lípidos y en la membrana celulares.

En las diferentes técnicas utilizadas en este estudio, se ha usado tritón X-100 como control negativo

3.2. MÉTODOS

3.2.1. HUMEDAD

Una cantidad exactamente pesada de cada una de las partes aéreas en flor de las diferentes muestras recolectadas, se preservan para secarse, en ausencia de luz y Tª ambiente, registrándose su peso durante 14 días. Finalmente, cuando esta pérdida no varíe anotamos el porcentaje de humedad.

3.2.2. ESTUDIO FITOQUÍMICO

3.2.2.1. Obtención del aceite esencial

Las partes aéreas en flor de las diferentes muestras recolectadas, una vez desecadas, se extraen por destilación por arrastre en corriente de vapor de agua, siguiendo la monografía “Hoja de romero” de la Farmacopea Europea 2005, (01/1560) (*Rosmarini folium*).

La extracción se realiza con una bureta tipo Clevenger (2.8.12 *Determinación de aceites esenciales en drogas vegetales*). Partiendo de 25.0g de la droga troceada, ésta se introduce en un matraz de fondo redondo de 1000ml y se extrae con 300ml de agua destilada con un flujo de 2-3ml/min durante 3h. Al cabo de 10min de reposo, el volumen de aceite esencial recogido en la bureta se anota se separa y conserva en viales de color ámbar, adecuadamente etiquetados y llenos, protegidos de la luz, a una temperatura de 4°C.

El rendimiento de la muestra se expresa en ml de aceite esencial por kilogramo de planta seca. El aceite esencial de romero presenta un aspecto claro, móvil, de color amarillo pálido o incoloro, con un aroma característico.

3.2.2.2. Caracterización del aceite esencial por Cromatografía de gases (CG)

Las muestras de aceite esencial obtenidas a partir de las diferentes muestras de romero se analizan por Cromatografía de Gas-Líquido (CG), mediante un Cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama y columna capilar de 30m, de 5% fenil-metil silicona (equipo informático Hewlett Packard 6890 Series). Se aplica un gradiente de temperatura de 70 a 240°C, con un incremento de 3°C por minuto, manteniendo la temperatura final durante 2 minutos. Para la identificación de los componentes de los aceites esenciales, se utilizan los tiempos de retención relativos de sustancias puras y los correspondientes índices de Kovats. La cuantificación de los componentes se realiza de acuerdo con las áreas de sus picos cromatográfico.

3.2.2.3. Extracto metanólico

A partir de los residuos de la destilación de cada una de las muestras, éstos se llevan a sequedad en estufa a 35°C hasta peso constante. El residuo seco y pulverizado en molino de aspas tipo Culati con malla de 5µm se conserva libre de humedad hasta proceder a su extracción.

Una cantidad de muestra, previamente desecada y desengrasada (20g, aproximadamente, exactamente pesados), se somete a extracción con Metanol R por maceración/percolación en frío, durante 24h. Al cabo de este tiempo, se filtra a través de un filtro de pliegues. El extracto metabólico obtenido se recoge en viales adecuadamente etiquetados y se almacena en frío hasta su utilización.

3.2.2.4. Caracterización de los extractos metanólicos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Los extractos metanólicos obtenidos se analizan por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en un Cromatógrafo líquido-líquido con detector de Diodo-Array y equipo informático, Agilent 1100 Series equipado con una columna C18 de fase reversa y aplicando una elución en gradiente lineal, comenzando con 10% de metanol y 90% de agua y finalizando con 95% de metanol y 5% de agua en 50 minutos.

La identificación se lleva a cabo por comparación de los espectros de absorción de los componentes detectados en los extractos con los de sustancias puras, mediante un detector de diodos. La cuantificación se realiza por el método de patrón externo.

3.2.2.5. Determinación del contenido total en compuestos fenólicos en los extractos metanólicos

Los polifenoles totales se determinan mediante el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Folin *et* Ciocalteu, 1927), utilizando ácido gálico como compuesto de referencia (Singleton *et al.*, 1999). Este método se basa en la capacidad de los compuestos fenólicos para reaccionar con agentes oxidantes (Folin-Ciocalteu) a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser cuantificada espectrofotométricamente a 760 nm.

El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, compuestos que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional la intensidad de color al número de grupos hidroxilo de la molécula.

En tubos de 50 ml, previamente forrados de papel aluminio para evitar reacciones de fotosensibilidad, se añaden 500 µl del extracto de *R. officinalis* L disuelto en metanol (1mg/ml) y 500 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu. Pasados 3 minutos se añaden 10 ml de una disolución de Na₂CO₃ (75 g/l) y 14 ml de agua destilada, agitando varias veces, seguido de reposo durante 1 h. A continuación, se toma 1ml de muestra en una cubeta de cuarzo y se mide su absorbancia a una λ de 760 nm en un espectrofotómetro (UVIKON 930, Kontron Instruments) (Saura-Calixto et al., 2007). Como referencia se prepara una curva de calibración con diferentes concentraciones de ácido gálico (6,75-400 ppm), cuya absorbancia se mide con el procedimiento anteriormente descrito, a partir de 500 µl de cada concentración de ácido gálico.

Con el fin de determinar la concentración en fenoles se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones de ácido gálico (6,75-400 ppm). Al igual que con las muestras en estudio, se añadieron 500 µl de cada concentración de ácido gálico y se procedió de la misma forma.

El contenido total en compuestos fenólicos (T) se obtiene por extrapolación a partir de la recta de regresión absorbancia/concentración del ácido gálico y se expresa como *ppm equivalentes de ácido gálico por mg de muestra (Gallic Acid Equivalents: GAE)*.

$$T = (C \times V \times DF) / m$$

Siendo **C**, la concentración de cada extracto obtenida de la recta de regresión; **V**, el volumen inicial en que se disuelve el extracto; **DF**, el factor de dilución y **m**, el peso del extracto.

3.2.3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA

3.2.3.1. Determinación de la actividad antioxidante: capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno (ORAC)

La actividad captadora de radicales libres de los extractos y del aceite esencial se determina por el método ORAC siguiendo el protocolo de Dávalos *et al.* (2004) con pequeñas modificaciones. Este método determina la capacidad antioxidante de una sustancia o muestra problema frente al daño oxidativo producido por un agente pro-oxidante (radical peroxilo). La fluoresceína es un compuesto fluorescente adicionado a la muestra a analizar; en presencia de los radicales peroxilo generados por descomposición térmica del 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (APPH), la fluoresceína pierde su capacidad de fluorescencia (Ou *et al.*, 2001). Los compuestos con actividad antioxidante son capaces de neutralizar los radicales peroxilo mediante la donación de un átomo de hidrógeno, evitando su reacción con la fluoresceína y por tanto, la disminución de fluorescencia.

Material utilizado:

- Espectrofluorímetro Optima Fluostar (BMG Labtechnologies Gmb, Offenburg, Alemania)
- Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) (Sigma-Aldrich, España)
- Fluoresceína (Sigma-Aldrich, España)
- Metanol (Panreac Química, España)
- Tampón PBS (tampón fosfato salino) ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{K}_2\text{HPO}_4$) 75 mM, pH 7,4 (Panreac Química, España).

Las muestras de aceite esencial de romero se diluyen en proporción 1mg/ml en Metanol/PBS (500 μ l/500 μ l).

Las muestras correspondientes a los extractos metanólicos de romero se diluyen en tampón PBS (1mg/ml). A partir de esta solución, se preparan diferentes concentraciones a ensayar con tampón PBS.

El antioxidante de referencia utilizado es un análogo sintético hidrosoluble de la vitamina E, Trolox, diluido en la misma solución tampón, con un rango de concentración 1-8 μM .

En placa de 96 pocillos de poliestireno negro, se disponen 20 μl de las distintas concentraciones de muestra a analizar, 20 μl de tampón fosfato (Blanco) o distintas concentraciones de Trolox (estándar positivo). Se añaden a continuación 120 μl de fluoresceína a todos los pocillos (concentración final 70nM), manteniendo las placas en incubadora a 37°C durante 10 minutos. Después de adicionar el radical iniciador APPH (60 μl , concentración final 12mM), se mide la fluorescencia en un el espectrofluorímetro durante 2h, medida cada 90 segundos. La λ de excitación es de 485nm y la de emisión de 520 nm, en un total de 104 ciclos. El lector de microplacas de fluorescencia se controla por Software FLUOstar (V2.20 R7). Todas las muestras de reacción se preparan por duplicado y se ensayan independientemente al menos tres veces.

Las medidas de fluorescencia se normalizan por diferencia entre el área bajo la curva de la muestra y el área bajo la curva del blanco. De las curvas normalizadas, el área bajo la curva de caída de fluorescencia (AUC) se calcula como:

$$\text{AUC} = 1 + \sum \frac{f_i - f_0}{f_0}$$

donde,

f_0 : lectura de fluorescencia inicial medida a tiempo 0

F_i : lectura de fluorescencia medida a un tiempo determinado (i)

El área bajo la curva neta (AUC) que corresponde a cada muestra se determina de la siguiente manera:

$$\text{AUC neta} = \text{AUC antioxidante (Trolox o muestra problema)} - \text{AUC blanco}$$

Se calculan así las ecuaciones de la recta de regresión que relaciona área y concentración del compuesto antioxidante en estudio. El valor ORAC de una muestra problema es el cociente de la pendiente de su recta de regresión entre la

pendiente de la recta de regresión correspondiente al Trolox, obtenidos en el mismo ensayo, y los resultados se expresan en μmoles equivalentes de Trolox / mg de muestra. Siendo la concentración de antioxidante de las muestras proporcional a la intensidad de la fluorescencia en el ensayo (Ou *et al.*, 2002; Tomer *et al.*, 2007).

3.2.3.2. Determinación del radical DPPH

El radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) se caracteriza por su gran estabilidad debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, lo que hace que, a diferencia de la mayoría de los radicales libres, la molécula no se dimerice. Esta deslocalización produce un color violeta intenso con una banda de absorción alrededor de los 520 nm.

El método diseñado por Blois (1958) y desarrollado por Brand-Williams *et al.*, (1995), y Molyneux (2004), consiste en la cuantificación del cambio de color que experimenta la molécula en presencia de sustancias antioxidantes: en estado de reposo, el DPPH posee un electrón desapareado y es de color azul-violeta; en presencia de una sustancia antioxidante, el color violeta se desvanece a amarillo pálido. El cambio de color se cuantifica por espectrofotometría a $\lambda = 517\text{nm}$.



donde AH es un agente antioxidante que actúa como anti-radical y dona átomos de H a la molécula de DPPH \cdot , dando como resultado un radical con estructura estable.

La deslocalización del electrón y la pérdida de absorbancia de DPPH \cdot proporciona un índice que permite estimar la capacidad captadora de radicales libres de los compuestos ensayados.

Los resultados se expresan como Concentración Inhibitoria Cincuenta (IC_{50}), definida como la concentración de sustrato que causa un 50% de pérdida de absorbancia del DPPH.

El material empleado es el siguiente:

- Espectrofluorímetro Optima Fluostar (BMG Labtechnologies Gmb, Offenburg, Alemania)
- 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) (Sigma Aldrich, España)
- Metanol (Panreac Quimica S.A. Barcelona, España)
- Análogo biosintético hidrosoluble de la vitamina E: Ácido 6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) (Sigma-Aldrich, España)

Se preparan las soluciones madre de las muestras de aceite esencial y extractos metanólicos de romero, en metanol (1mg/ml). A partir de esta solución, se preparan las diferentes concentraciones a ensayar. Se prepara un solución stock de DPPH 1mM en metanol protegida con papel de aluminio a 4C°.

En una placa de 96 pocillos se añaden las diferentes concentraciones de las muestras, hasta un volumen total de 220 μ l. Como un blanco se utiliza el metanol y como control positivo, Trolox. Las concentraciones finales de DPPH en cada pocillo se establecen mediante la realización de las curvas de calibrado y su extrapolación correspondientes. La placa se incuba en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Al cabo de este tiempo, la pérdida de absorbancia del DPPH se mide en un espectrofluorímetro a $\lambda = 517\text{nm}$, a temperatura ambiente. Todas las muestras se analizan por triplicado y los resultados se expresan como la media de tres experimentos independientes.

3.2.4. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

3.2.4.1. Cultivos celulares

El cultivo celular se mantiene en medio DMEM con 4,5 g/l de glucosa, L glutamina, y HEPES 25mM, sin piruvato, con Gentamicina al 0,5% como antibiótico, suero fetal bovino (FBS) al 10% para crecimiento o al 1% para mantenimiento del cultivo.

Cuando las células alcanzan el 80% de confluencia en los frascos de cultivo, es necesario realizar un subcultivo celular para mantener un crecimiento óptimo. Para ello, se añade PBS sin calcio y sin magnesio para eliminar los restos de medio de cultivo (los iones calcio y magnesio inhiben la acción de la enzima tripsina) y se adiciona Tripsina, para romper la unión de las células adheridas al sustrato. Se incuban durante 2-3 minutos a 37°C y CO₂ al 5%. A continuación, se añaden 10 ml de medio de cultivo para neutralizar la tripsina con los cationes Ca²⁺ y Mg²⁺ y se centrifuga en tubo Falcón a 1500 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se elimina y el pellet se resuspende en 10 ml de DMEM-c. De esta forma, la suspensión celular queda preparada para la realización de los diferentes ensayos.

Antes de llevar a cabo cualquier protocolo de experimentación, es necesario realizar un recuento de células para asegurar que el número de células viables es similar en todos los ensayos. Para ello se emplea el método de exclusión con azul tripán (Trypan Blue) en la cámara de Neubauer (Keith *et Elliot*, 1979). figura 13.

El azul tripán es un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana, de forma que tiñe de manera selectiva las células muertas. Las células vivas, al no captar este coloide, se observan refringentes al microscopio óptico de contraste, facilitando su visualización.

A 90 µl de la suspensión celular se añade azul tripán en relación 1:10. En la cámara de Neubauer se realiza el recuento de células presentes en los cinco cuadrantes de la cámara y se obtiene el valor medio. El número de células por mililitro de suspensión permite calcular el número de células total.

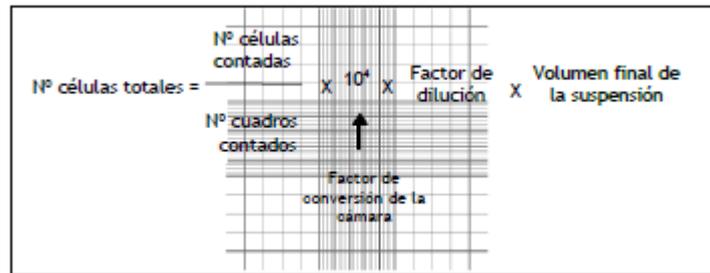


Figura 13. Cámara de Neubauer. Distribución de los cuadrantes que la componen

El cálculo del número de células totales (NCT) en un volumen de suspensión dado, se realiza aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de células totales} = \frac{[\text{n}^\circ \text{ células viables} \times 10^4 \times F \times \text{Volumen suspensión}]}{5 \text{ cuadrantes}}$$

5 cuadrantes

donde,

- número de células contadas en los cinco cuadrantes sombreados de la cámara de Neubauer dispuestos en L
- 10⁴ : factor de conversión de la cámara
- F : Factor de dilución: 10
- Volumen total de suspensión en ml

A continuación se siembran en frascos de cultivo o en las placas necesarias para el experimento y se incuban a 37°C y 5% de CO₂.

La conservación a medio-largo plazo de las células se realiza por congelación, utilizando medio de congelación: suspensión de suero fetal bovino (FBS) suplementado con glicerol al 10% como agente crioprotector. El glicerol es capaz de penetrar en el interior celular, se solidifica el agua sin que se formen cristales, lo cual evita la formación de cristales de hielo que puedan destruir la integridad de las membranas y orgánulos celulares (Ameigeiras *et* Gil-Loyzaga, 2011).

Para congelar las células, se lavan con PBS sin Ca/Mg y se añade tripsina. A continuación se neutraliza con medio de crecimiento al 10%. Posteriormente se realiza su centrifugación a 1500 rpm durante 10min y tras eliminar el

sobrenadante, se resuspende el pellet en medio de congelación y se traspasa a un vial de crioconservación (1-2ml) adecuadamente etiquetado.

El proceso de congelación debe ser gradual para minimizar el daño celular. Las células se mantienen 24 h en un congelador a -20°C . A continuación, se cambian a un congelador de -80°C en donde se mantienen un tiempo mínimo de una semana y un máximo de dos meses.

Para períodos más largas de tiempo, las células se almacenan sumergidas en nitrógeno líquido (-196°C). Cuando es necesario descongelarlas, se introducen los viales en un baño a 37°C , con agitación rápida. Una vez descongeladas, las células se siembran en frascos de cultivo y se mantienen en un incubador a 37°C , CO_2 al 5%. El medio de cultivo se cambia a las 24 h de la descongelación para retirar las células muertas y los restos de glicerol que puedan afectar al crecimiento. Al cabo de diez días desde la descongelación, las células ya están preparadas para ser utilizadas en los diferentes ensayos.

Cada 2 ó 3 días se cambia el medio del cultivo para el crecimiento de las células. Se trabaja con células que se encuentren entre los pases 1 y 30. Para mantener la supervivencia celular durante los tratamientos con las diferentes muestras se utiliza medio DMEM de mantenimiento (DMEM-m) de igual composición al de crecimiento, excepto por contener 1% de FBS.

3.2.4.1.1. Preparación de las muestras

Para realizar la evaluación de la actividad biológica de las muestras, se preparan distintas concentraciones de los aceites esenciales y extractos metanólicos a partir de soluciones madre de concentración 1mg/ml en PBS exento de calcio y magnesio (Invitrogen S.A., España), previa disolución en dimetilsulfóxido (DMSO), mantenidas a -20°C y protegidas de la luz. Las diluciones se preparan con el fin de obtener unas concentraciones finales equivalentes a las consideradas activas para algunos de sus componentes

3.2.4.1.2. Tratamiento celular

A partir de la línea celular U373-MG en fase de mantenimiento en la placa correspondiente, se realiza el tratamiento (pre-incubación) con las distintas muestras a estudiar, es decir, aceite esencial o extracto metanólico, durante 24 h, a las concentraciones seleccionadas. Posteriormente, se estudia el efecto neuroprotector de las células en un modelo de estrés oxidativo inducido por H₂O₂ 1 mM, durante 30 minutos.

Estos cultivos celulares se utilizan para los siguientes estudios: determinación de la viabilidad celular, generación y captación de EROs, determinación de proteínas, determinación de la actividad del enzima antioxidante catalasa, determinación de la actividad de caspasa-3, determinación de la peroxidación lipídica (MDA).

3.2.4.2. Estudios sobre cultivos celulares

3.2.4.2.1. Estudio de viabilidad celular: ensayo de reducción de MTT

La supervivencia celular se evalúa mediante el método de la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).

El MTT es un indicador de la actividad mitocondrial de las células vivas; es una sal soluble en agua y de color amarillo que actúa como aceptor de electrones, de manera que se reduce a nivel mitocondrial dando lugar a un compuesto de coloración azul-violácea (formazán) (Liu *et al.*, 1997; Mosmann, 1983; Takahashi *et al.*, 2002).

La intensidad de la coloración está en relación directa con la viabilidad celular, ya que únicamente las células vivas poseen deshidrogenasas mitocondriales capaces de transformar la sal. Los cristales de formazán formados son insolubles en agua pero solubles en DMSO, el cual se puede cuantificar por espectrofotometría a una λ de 550nm.

Los reactivos utilizados son:

- Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (MTT) (Sigma-Aldrich, España)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Panreac Química, España)
- Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, España)

Se siembran las células en placas de 96 pocillos, con una densidad de 50.000 células/pocillo y se incuban a 37°C y 5% de CO₂ durante 24h con los diferentes tratamientos (0,5-250 µg/ml de aceite esencial y 3,13-800µg/ml de extracto metanólico). Como control negativo se emplea Tritón al 5%. A continuación, se aspira el medio y se adicionan 100µl de una disolución de MTT (2 mg/ml en PBS) con medio DMEM al 10%. Se deja incubar 1h a 37°C. Al cabo de este tiempo, se adiciona DMSO para disolver los cristales de formazán formados e inmediatamente después se mide la producción de formazán por espectrofotometría a $\lambda = 550\text{nm}$ en un lector de placas (Digiscan 340).

Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad, considerando el 100% de viabilidad la media de las absorbancias de los pocillos con células no tratadas con los productos en estudio.

3.2.4.2.2. Evaluación del daño celular

Para el establecimiento de un modelo de daño celular por oxidación en los cultivos de astrocitos y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en estudios previos realizados por el grupo investigador, las células se tratan con H₂O₂ 1mM como agente oxidante.

Las células (5×10^5 células/pocillo) se incuban durante 24 h en placas de 96 pocillos con 100µl medio DMEM-c/pocillo. A continuación, se tratan con las diferentes concentraciones de muestras de aceite esencial y extracto metanólico y se incuban durante otras 24 h. Posteriormente se someten a estrés oxidativo mediante la adición de H₂O₂ 1mM, incubando las placas durante 45 min a 37°C y 5% de CO₂. Pasado ese tiempo, el medio de cultivo se sustituye por medio

DMEM-m y se deja en incubación durante otras 24h. Al cuarto día del inicio del experimento, se retira el medio y se añade 100µl MTT/pocillo (2 mg/ml). Las placas se incuban entonces en ausencia de luz durante 1 h a 37°C y, tras añadir 100µl DMSO/pocillo, se mide la absorbancia en un lector de placas a $\lambda = 550$ nm. Los resultados se comparan con un grupo control, no tratado y se expresan como porcentaje de viabilidad, considerando como 100% de viabilidad la media de las absorbancias de los pocillos con células no tratadas con los productos en estudio.

3.2.4.2.3. Estudio de la morfología celular

La observación de la morfología de las células vivas en cultivo, tratadas y sin tratar con el aceite esencial, el extracto metanólico o Trolox, se realiza mediante un microscopio de contraste de fases que permite su visualización sin tener que realizar tinciones que podrían originar cambios fisiológicos en las propias células.

La adquisición de imágenes se llevó a cabo con una cámara digital (Moticam 2500, 5.0 MP Live Resolution) acoplada al microscopio y el tratamiento de las mismas con el programa Motic Images Plus 2.0.

3.2.4.2.4. Actividad antirradicalaria

El método empleado para determinar la generación de radicales libres de oxígeno se basa en la 2',7'-diclorohidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA), molécula fotosensible que se degrada en presencia de la luz. La DCFH-DA atraviesa la membrana celular y, por acción enzimática de esterasas intracelulares es desacetilada y se transforma en diclorohidrofluoresceína (DCFH), producto no fluorescente capaz de reaccionar con especies reactivas de oxígeno para oxidarse a diclorofluoresceína (DCF), compuesto fluorescente que se puede determinar. La intensidad de la fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de especies reactivas de oxígeno generadas (LeBel *et al.*, 1992; Afri *et al.*, 2004; Fernández-Gómez *et al.*, 2005; Wang et Joseph, 1999).

Los reactivos empleados son:

- 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (0,01 M en DMSO) (Sigma-Aldrich, España)
- Glucosa (Panreac Química S.A.)
- Solución de fosfato salino (PBS) (Invitrogen)

En una placa de 96 pocillos se siembran 5×10^5 células/pocillo y se adicionan 200 μ l/pocillo de una solución DCFH-DA con PBS glucosado (50 μ l de DCFH-DA en 25ml de PBS glucosado), protegido de la luz; se incuba durante 30min a 37°C y 5% de CO₂. A continuación se aspira el medio y se lavan las células con 200 μ l/pocillo de PBS glucosado. Seguidamente se añaden los compuestos en estudio (1, 2,5 ,5 y 12,5 μ g/ml de aceite esencial y 12,5, 25, 50 y 100 μ g/ml de extracto metanólico) y el control negativo, H₂O₂ 1mM, dejando actuar durante 30 minutos. Después de este tiempo, se procede a la lectura utilizando un Fluorímetro Lector de microplacas FLx800, BioTek, Instruments, Inc., en las siguientes condiciones de lectura: λ de excitación = 480 nm y λ de emisión = 510nm. Las medidas se toman cada 10 minutos en la primera hora de medida (7 medidas) y cada 30 minutos en la siguiente hora (2 medidas).

3.2.4.2.5. Preparación de los extractos celulares

Se preparan extractos citosólicos para la realización de los siguientes ensayos: determinación de la concentración de MDA por HPLC, determinaciones enzimáticas y determinación de los niveles de glutatión.

Las células se siembran en placas de Petri de 75cm² y se dejan crecer hasta confluencia. A continuación, se tratan con las diferentes concentraciones de aceite esencial y extracto metanólico disueltas en medio DMEM-m (1%) y se dejan incubar durante 24h a 37°C y 5% de CO₂. Seguidamente se recogen las células mediante raspado en tubos Falcon de 15ml y se centrifuga (800 rpm) durante 5

min a temperatura ambiente. El sobrenadante se aspira y se lavan las células con 1ml de PBS, introduciendo a continuación los contenidos en tubos Eppendorf de 1,5 ml, siendo nuevamente centrifugados a 800 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Los sedimentos se emplean inmediatamente o se conservan a -20°C para su posterior determinación.

A la hora de ser utilizados, se realiza un lisado celular empleando tampón de lisis (TRIS 25mM, NaCl 150mM, EDTA 1mM, Triton X-100 1%) (Sigma-Aldrich, España) en agua destilada, ajustando el pH a 7,4. A 5 ml del tampón se le adicionan distintas antiproteasas (100µl de leupeptina a una concentración de 1mg/ml en agua destilada; 175µl de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) a una concentración 0,5mM en isopropanol (Panreac, España); 50µl de pepstatina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1mg/ml en metanol) para evitar el deterioro de proteínas y enzimas. A cada eppendorf con la muestra de células se añaden 300µl de esta mezcla de tampón de lisis y antiproteasas, manteniéndolos en frío (hielo triturado) durante todo el proceso de lisado (20 min). A continuación, las muestras se sonicán (dos ciclos a 80 Hz) también en frío para evitar la desnaturalización de las proteínas y se centrifugan en ultracentrífuga refrigerada (Solvall RL-5B, Dupont Instruments, USA) a 15.000 rpm durante 10 min a 4°C, obteniéndose un sobrenadante que corresponde con el extracto citosólico.

En el modelo de toxicidad celular, los astrocitos cultivados, después de ser tratados durante 24h con las muestras, se incuban con H₂O₂ 1mM en DMEM-m (hasta un volumen en placa de 4 ml) durante 45 min. Pasado el tiempo de incubación, se retira el tóxico y se añade DMEM-m, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

3.2.4.2.6. Determinación de la concentración de las proteínas

La determinación protéica se realiza por medio del método del ácido bicinónico (Smith *et al.*, 1985), basado en la determinación de proteínas de

Lowry (Lowry *et al*, 1951). En un primer paso es preciso extraer el extracto citosólico de la suspensión celular.

Esta técnica se basa en la propiedad de las proteínas, en medio alcalino, de reducir el cobre en estado de oxidación II a estado de oxidación I de forma concentración-dependiente, lo que le permite reaccionar con el ácido bicincóninico y formar un complejo de color violeta que podemos registrar a $\lambda=550$ nm.

Los reactivos utilizados son:

- Álbúmina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU)
- Solución de ácido bicincóninico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU)
- Solución de sulfato de cobre (II) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU)

La determinación se lleva a cabo sobre los extractos celulares totales. En una placa de 96 pocillos con 3 μ l de los extractos citosólicos de cada una de las muestras, se añade agua miliQ hasta 25 μ l y a continuación, 200 μ l/pocillo de una mezcla de ácido bicincóninico al 98% (v/v) y sulfato de cobre al 2% (v/v). Se deja incubar a 37°C durante 1 h, protegido de la luz. Al cabo de este tiempo los pocillos se ven de color morado; la absorbancia se mide entonces en un lector de placas a una $\lambda = 550$ nm. Cada muestra se analiza por triplicado. En la misma placa se prepara una recta patrón con albúmina sérica bovina (BSA) (0-20 μ g/ μ l).

La concentración de proteínas se determina mediante extrapolación de los datos de absorbancia obtenidos la curva patrón de albúmina y se expresa como mg de proteína/ml de muestra.

3.2.4.2.7. Determinación de los niveles de glutatión

El sistema de Glutatión reducido (GSH) es el principal sistema antioxidante no enzimático, siendo capaz de reaccionar con los radicales libres y reparar el daño inducido por éstos mediante reacciones de transferencia de electrones, originando glutatión oxidado o disulfuro (GSSG).

La determinación de GSH y GSSG se realiza mediante el método de Hissin et Hilf (1976), con ligeras modificaciones. Este método se basa en la capacidad del fluoróforo o-ftaldehído (OPT) de reaccionar con aminas primarias en presencia de grupos tiol, sulfitos y ciano que generan un compuesto fluorescente (isoindol), detectado a una λ de excitación de 420 nm y 350 nm de emisión.

Esta reacción del OPT (Sigma-Aldrich) con el GSH se produce a pH 8 y con GSSG, a pH 12. Un pH superior a 8 provoca la oxidación del GSH, por lo cual se adiciona N-etilmaleimida (NEM) (Sigma-Aldrich).

Los extractos citosólicos previamente obtenidos y con una concentración en proteínas evaluada (ver apartados 4.3.4.5. y 4.3.4.6.), se tratan con ácido perclórico (Panreac Química, S.A.) al 1% v/v, durante 5 min. A continuación se centrifugan a 14.000 rpm durante 10min, a 4°C para retirar las proteínas. El sobrenadante se recoge para la determinación de GSH y GSSG. Por último, se determina el índice redox como cociente entre la concentración de GSSG y GSH.

3.2.4.2.8. Determinación del glutati6n reducido

En una placa de 96 pocillos se a~aden 50 μ l de muestra, 150 μ l de tamp6n fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) 0,1 M/EDTA 0,005 M en agua destilada a pH 8 y 20 μ l de una soluci6n extempor~nea de OPT en metanol (1 mg/ml). La palca se mantiene durante 15min en la oscuridad, a temperatura ambiente. A continuaci6n se mide la absorbancia en un fluor6metro (FLx-800) a una λ de excitaci6n de 420 nm y λ de emisi6n de 350 nm.

La curva patr6n de GSH se realiza con una disoluci6n 9,7mM en tamp6n fosfato/EDTA. Todas las muestras se preparan por triplicado.

3.2.4.2.9. Determinación del glutatión oxidado

En una placa de 96 pocillos se añaden 50µl de muestra y 3µl de NEM (7,5 mM diluido en tampón fosfato/EDTA, pH 8, preparado diariamente), dejando las placas en oscuridad durante 5 min. A continuación, se añaden 150µl de NaOH 0,1 N (Panreac España S.A.) en agua destilada, pH 12 y 20 µl de la solución de OPT a cada pocillo, dejando las placas de nuevo en oscuridad durante 15min. A continuación se mide la absorbancia en un fluorímetro (FLx-800) a una λ de excitación de 420 nm y λ de emisión de 350 nm.

La curva patrón de GSSG (Sigma-Aldrich) se realiza con una disolución 9,1mM en solución de NaOH en agua destilada.

Las concentraciones de GSH o GSSG para cada una de las muestras se obtienen mediante la siguiente ecuación:

$$\text{mg GSH o GSSG} = (\Delta A_m - b) / a \times C \times v$$

donde,

- ΔA_m : valor de absorbancia de la muestra
- b: ordenada en el origen de la recta patrón correspondiente
- a: pendiente de la recta
- C: concentración de proteínas en mg/ml
- v: volumen de la muestra (50µl)

El índice redox (IR) se expresa como el cociente GSH/GSSG

- Ácido perclórico (HClO₄) (Panreac Química S.A.)
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Panreac Química S.A.)
- Glutatión oxidado (GSSG) (Sigma-Aldrich)
- Glutatión reducido (GSH) (Sigma-Aldrich)
- Hidróxido sódico (NaOH) (Panreac Química S.A.)
- N-etilmaleimida (NEM) (Sigma-Aldrich)

- fluoróforo oftaldehído (OPT) (Sigma-Aldrich)
- Tampón fosfato (NaH₂PO₄ + Na₂HPO₄) (Panreac Química S.A.)

3.2.4.2.10 Determinación de la actividad de caspasa-3

La actividad caspasa en los astrocitos se determina mediante un método fluorimétrico basado en la detección de los productos de la hidrólisis de N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-metil cumarina (Ac-DEVD-amc), sustrato sintético específico de caspasa-3 (Höpfner *et al.*, 2004).

Reactivos:

- tampón de lisis (10 mM Tris, 130 mM de NaCl, 1% Triton X-100, 10 mM pirofosfato sódico, 10 mM difosfato sódico; ajustando el pH a 7,5)
- ditioneitol (DTT) 2 mM (1,5 mg de DTT por 5 ml de tampón)
- Ac-DEVD-AMC (caspasa-3) C30H₃₇N₅O₁₃ (λ_{exc} =380 nm; λ_{em} =460) (Alexis Biochemicals, USA). Se solubiliza en DMSO (Panreac Química, España) y se conserva, protegido de la luz, a -20°C.

En una placa de 24 pocillos se siembran 300.000 células/pocillo, en 400µl de DMEM-m durante 24h. Posteriormente, se tratan con las diferentes concentraciones de las muestras y se incuban durante otras 24h. A continuación se aspira el medio de cultivo y se adicionan 300µl de tampón de lisis (10mM Tris, 130mM de NaCl, 1% Triton X-100, 10mM pirofosfato sódico, 10mM difosfato sódico; ajustando el pH a 7,5) al cual se adicionó en el momento de su utilización ditioneitol (DTT) 2mM (1,5 mg de DTT por 5 ml de tampón), para evitar la oxidación de los enzimas. Las células se recogen mediante rascado en tubos eppendorf, manteniéndose a -20°C hasta su valoración.

Para determinar la actividad caspasa-3, se centrifugan las suspensiones celulares a 13.000 rpm durante 10min y se recogen los sobrenadantes, en los cuales se valora

la concentración de proteínas (apartado 3.2.4.2.6.) y, a continuación, la valoración de la actividad enzimática.

En placas de 96 pocillos, se añaden 100µl de sobrenadante; 50µl de tampón de reacción (20mM HEPES, 10% glicerol; pH 7,5; en el momento de su utilización se añadió DTT 2mM como en el caso anterior); y 3,5 µl del sustrato (péptido) disuelto en PBS y liofilizado, reconstituido con DMSO (1mg/1ml).

A continuación, se mide la fluorescencia a tiempo cero y cada hora, durante 24h a λ de excitación 360/40 nm λ de emisión 480/20 nm emisión, a una sensibilidad de 60. Las células se mantienen en incubador a 37°C entre lecturas. Todos los ensayos se realizan por triplicado.

Los efectos de las muestras de romero sobre la actividad caspasa-3 se cuantifican mediante el cálculo de la pendiente de la recta (unidad arbitraria de fluorescencia [UAF]/h) a diferentes tiempos (0,1; 2; 3; 4; 5; 22; 23; y 24 horas), refiriendo el valor a los mg de proteína que contienen:

$$\text{UAF/h/mg prot} = (\text{UAF/h} \times 1000)/\text{mg prot}$$

Gráficamente se representa el porcentaje de actividad caspasa-3 con respecto al grupo control, que es considerado el 100%.

3.2.4.2.11. Determinación de la peroxidación lipídica

Como consecuencia de los efectos oxidantes de los radicales libres de oxígeno sobre la membrana celular, se producen procesos de peroxidación lipídica que ocasionan la descomposición de los ácidos grasos poliinsaturados y la aparición de productos de peroxidación como el malondialdehído (MDA). Estos compuestos pueden a su vez reaccionar con distintos grupos químicos como los tioles e interferir con proteínas y ácidos nucleicos.

La peroxidación lipídica a nivel de membrana provoca un aumento de la rigidez de la capa lipídica que altera las propiedades físico-químicas de la membrana celular (Bermejo *et al.*, 1997).

Para la determinación de la peroxidación lipídica se mide la formación de MDA en los cultivos celulares de cada muestra, mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) según Grotto *et al.* (2007), con ligeras modificaciones. Los resultados se expresan en nmoles de MDA por mg de proteína.

Condiciones del método analítico (HPLC)

- Cromatógrafo Agilent 1260
- Detección: Detector de diodos DA 1260, a λ 268 y 532 nm, simultáneamente
- Columna: Agilent eclipse plus C18 (100 x 4,6 mm; 3,5 μ m)
- T horno: 40°C
- Fase móvil: H₂O/MeOH (50:50 V/V) en elución isocrática
- Flujo: 0,5 ml/min
- t de análisis: 20 minutos

Se prepara una disolución madre de MDA 3 mM en agua destilada para realizar la curva de calibrado (5 - 40 μ M).

Los extractos citosólicos de las células tratadas se obtienen en las condiciones descritas anteriormente previa determinación del contenido en proteínas.

Las muestras se filtran a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,22 μ de tamaño de poro y se mantienen a 4°C hasta el momento de su inyección en el cromatógrafo.

3.2.4.2.12. Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes

En todos los casos se emplean extractos citosólicos (apartado 3.2.4.2.5.) tras la determinación del contenido en proteínas según (apartado 3.2.4.2.6.).

Determinación de la actividad del enzima catalasa

El enzima CAT cataliza dos tipos de reacciones, la descomposición de H_2O_2 en agua y oxígeno y la oxidación de donadores de hidrógeno con el consumo de una molécula de peróxido.



La actividad CAT se evalúa mediante el método de Barja de Quiroga *et al.* (1989), con ligeras modificaciones, que determina la descomposición del peróxido de hidrógeno por espectrofotometría a $\lambda = 240\text{nm}$.

A una cubeta de cuarzo de 1cm y un volumen de ensayo de 700 μl , se añaden 30 μl de los extractos citosólicos de las células tratadas o no, en presencia o ausencia del tóxico oxidante, y una solución de H_2O_2 en tampón fosfato 50mM (K_2HPO_4 y KH_2PO_4 a pH 7,4) para obtener una concentración en cubeta de 1mM. El blanco corresponde a una cubeta con tampón fosfato. La absorbancia se mide de un espectrofotómetro UVIKON 930 a $\lambda = 240\text{nm}$.

La determinación de la actividad enzimática total (U), se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$U = (\Delta A_m - \Delta A_p) \times V / \epsilon \times D \times v \times C$$

donde,

- ΔA_m : cambio en la absorbancia/min en cada muestra
- ΔA_p : cambio en la absorbancia/min de H_2O_2
- V: volumen total en la cubeta
- ϵ : coeficiente de extinción molar de H_2O_2 ($43,6 \cdot 10^{-3} / \text{nmol} \times \text{cm}$)
- D: paso de luz (1cm)
- v: volumen de muestra
- C: mg de proteína/ml

3.2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables estudiadas se almacenan en una base de datos del programa *Microsoft Office Excell 2007* y se tratan con el programa estadístico STATGRAPHICS plus 5.1. Los valores de todos los experimentos presentados se expresan como valores promedios \pm desviación estándar de los resultados obtenidos en ensayos independientes, valorados por triplicado. Las diferencias estadísticas son determinadas por medio del análisis de la varianza (ANOVA) simple. Se considera que la diferencia entre los grupos tratados y el control es estadísticamente significativa (* respecto al control o # respecto al H₂O₂) cuando el valor de “*t*” obtenido es mayor que el tabulado para un margen de confianza del 95,0 % ($p < 0,05$). En el caso de que la diferencia respecto al grupo control no sea significativa no se emplea ningún símbolo indicativo.

El método utilizado para discernir entre las medias es el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD). Con este método, hay un 5,0% de riesgo de considerar cada par de medias como significativamente diferentes cuando la diferencia real es igual a 0.

4. RESULTADOS

4.1. HUMEDAD

La determinación de la pérdida de humedad se realiza aplicando la fórmula

$$P = [(W - D) / D] * 100$$

Donde,

P: contenido de humedad [%]

W: peso inicial de la muestra [g]

D: peso de la muestra seca [g]

El peso inicial de la muestra varía entre (100-107) g. dependiendo de la localidad de recogida. Después de 14 días de secado en ausencia de luz y T^a ambiente se registra una pérdida de humedad, tal como se puede observar en la Tabla 4.

Muestra	Localidad	Perdida de humedad
1	Toledo	65,35%
2	Toledo	49,78%
3	Toledo	38,89%
4	Murcia	55,01%
5	Murcia	58,39%
6	Albacete	59,02%
7	Valencia	60,45%
8	Guadalajara	70,02%
9	Cuenca	66,98%
10	Guadalajara	43,85%
11	Zaragoza	58,98%
12	Tarragona	39,98%
13	Tarragona	50,38%
14	Madrid	56,35%
Media		55,25%

Tabla 4. Pérdida de humedad de las muestras de *R. officinalis* L. en las condiciones descritas

4.2. ACEITE ESENCIAL DE *rosmarinus officinalis* L.

4.2.1. Estudio fitoquímico

4.2.1.1. Rendimiento

Tras la destilación de las muestras en las condiciones descritas en material y métodos, se obtiene un aceite de color amarillo claro con un olor característico

En la Tabla 5 se recoge el rendimiento obtenido del aceite esencial para las 14 muestras ensayadas; y el rendimiento final se calcula como la media de los valores (\pm DS)

Muestra	Localidad	Rendimiento \pm DS
1	Toledo	2,3 \pm 0,6
2	Toledo	3,8 \pm 0,3
3	Toledo	1,63 \pm 0,1
4	Murcia	1,16 \pm 0,8
5	Murcia	3,38 \pm 0,5
6	Albacete	2,02 \pm 0,2
7	Valencia	2,01 \pm 0,6
8	Guadalajara	2,52 \pm 0,2
9	Cuenca	1,5 \pm 0,3
10	Guadalajara	2,13 \pm 0,3
11	Zaragoza	3,04 \pm 0,5
12	Tarragona	1,65 \pm 0,6
13	Tarragona	1,43 \pm 0,6
14	Madrid	2,3 \pm 0,5
Media		2,21 \pm 0,76

Tabla 5. Rendimiento (en porcentaje) del aceite esencial de *R.officinalis* L., obtenido en las condiciones descritas en el apartado correspondiente.

Como se puede observar en la Tabla 5. el rendimiento obtenido es variable. El aceite esencial procedente de la muestra número 2, Toledo presenta el mayor rendimiento (3,8 %); mientras que el aceite esencial procedente de la muestra número 4, Murcia presenta el menor rendimiento (1,16 %).

4.2.1.2. Composición del aceite esencial

El análisis cromatográfico por GC permite la identificación y cuantificación de trece compuestos en un único análisis. Los cromatogramas obtenidos se recogen en la figura 14.; Se presentan la proporción de los diferentes componentes de las muestras de aceite esencial. Los componentes más abundantes son 1,8-cineol, alcanfor y mirceno.

En la Tabla 6 se pueden observar los componentes identificados en las 14 muestras de estudio junto con su concentración. En la muestra número (12), Tarragona se han identificado 13 componentes que representan el 99,8% del total del aceite esencial, se caracteriza por presencia de altos niveles de monoterpenos oxigenados 69,92%, principalmente alcanfor 39,11% y 1,8-cineol 20,17%, mientras los hidrocarburos monoterpénicos como α -pineno 8,66% y mirceno 6,66% se encuentran en menor proporción 29,88%.

En la muestra número (13), Tarragona, se han identificado, asimismo, 13 componentes que representan el 92% del total de los componentes del aceite esencial, presenta mayoritariamente monoterpenos oxigenados 59,69%, como alcanfor 23,47% y 1,8-cineol 20,17%, mientras los hidrocarburos monoterpénicos representan el 32,31%, como α -pineno 11,61% y β -pineno 10,63%.

En la muestra (10), Guadalajara, los 13 componentes identificados representan el (90,57%) del total de los componentes del aceite esencial; esta muestra está caracterizada por un alto nivel de los monoterpenos oxigenados 63,42% como alcanfor 29,7% y 1,8-cineol 24,93%, mientras los hidrocarburos monoterpénicos se encuentran en menor proporción 27,15%

En la muestra número (5) , Murcia, se han identificado 12 componentes que representan el 87,47% del total del aceite esencial,; se caracteriza por la presencia

de altos niveles de hidrocarburos monoterpénicos 48,01%; principalmente α -pineno 20,93% y γ -terpineno 12,11%, mientras que los monoterpenos oxigenados representan el 39,46%, entre ellos 1,8-cineol 17,53%;

En la muestra número (4), Murcia, los componentes monoterpenos oxigenados representan el 87,11% del total del aceite esencial, se caracteriza por presencia de hidrocarburos monoterpénicos 45,69%; principalmente α -pineno 21,29%; mientras que los monoterpenos oxigenados constituyen el 41,42%

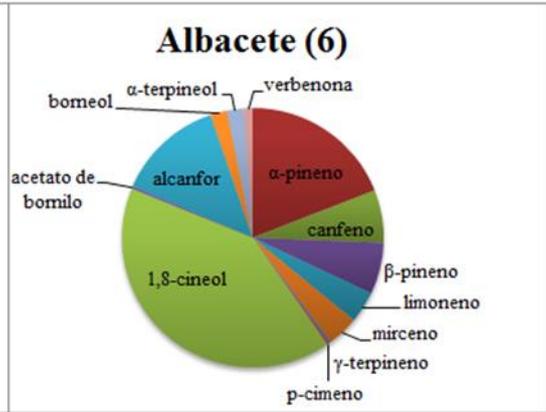
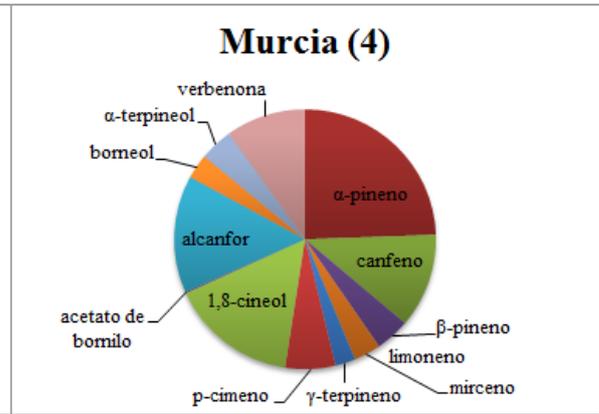
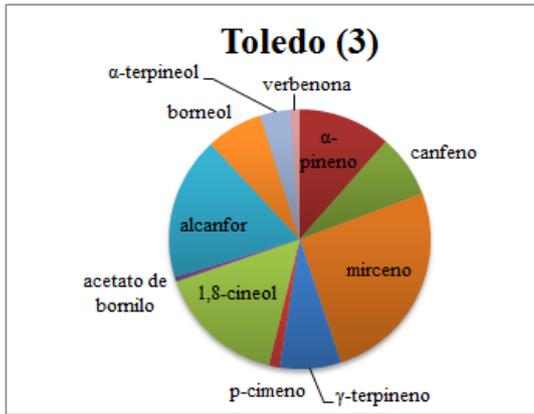
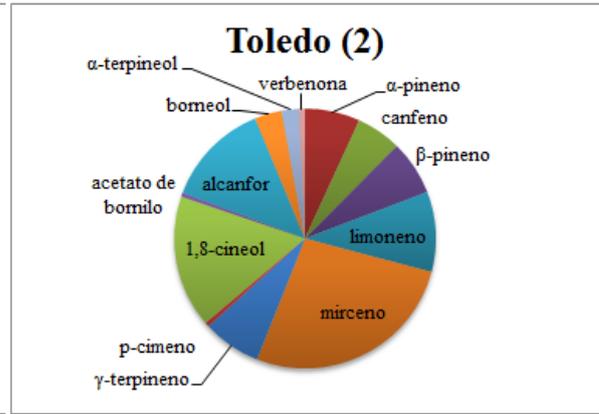
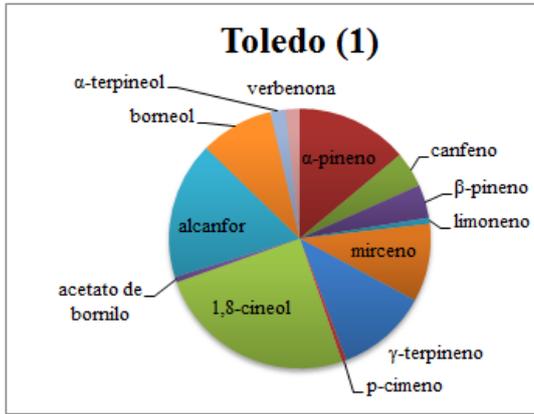
En cuanto a monoterpenos oxigenados, la muestra que presenta mayor cantidad es la número 7, Valencia, con un 77,04%; en ella destaca un elevado contenido de alcanfor 40,67%. En esta muestra se ha identificado la menor proporción de hidrocarburos monoterpénicos (7%).

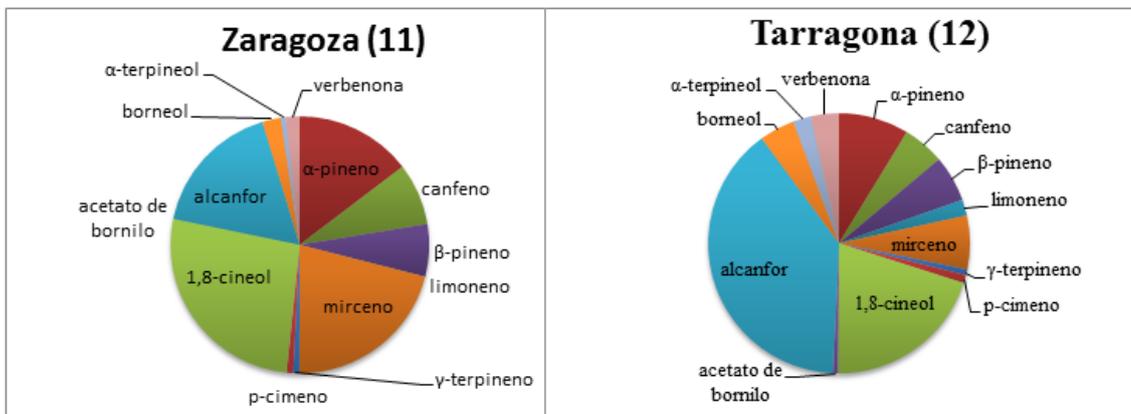
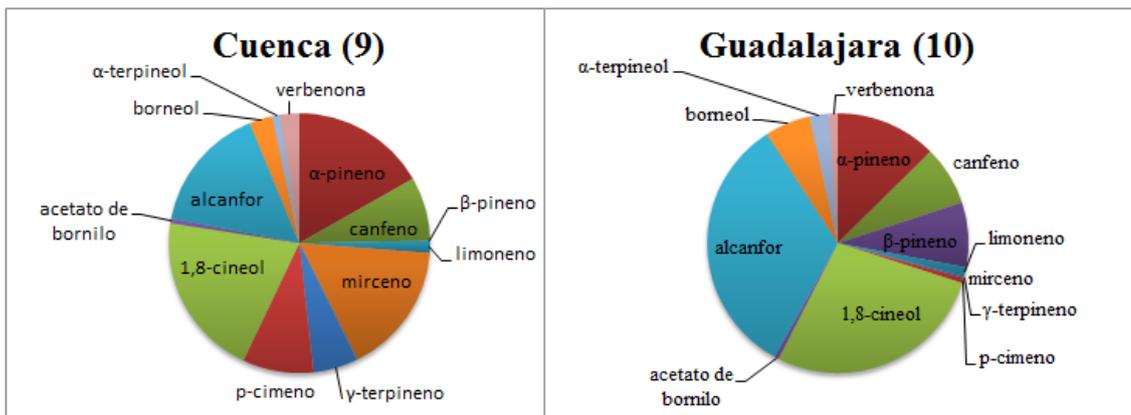
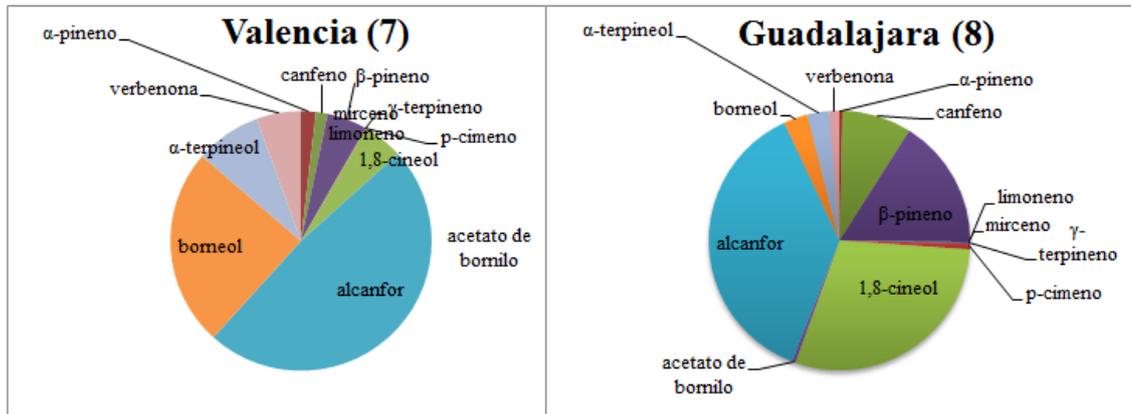
En la muestra número (1) se han identificado 13 componentes que representan el 71,03% del total del aceite esencial. Este aceite esencial, obtenido de muestra recolectada en la provincia de Toledo, se caracteriza por presentar altos niveles de monoterpenos oxigenados (45,91%) principalmente 1,8-cineol (17,02 %), seguido por alcanfor (11,73%); mientras que los hidrocarburos monoterpénicos (38,89%) como α -pineno (9,52%) y β -pineno (2,84%) se encuentran en menor proporción. En la muestra número 2 de la provincia de Toledo se han identificado asimismo 13 componentes que representan el 83,95 % del total del aceite esencial. Donde los monoterpenos oxigenados (59,37%) 1,8-cineol (31,3%) y alcanfor (15,59%) son mayoritarios; seguido por los hidrocarburos monoterpénicos (31,03%) β -pineno (11,83%) y α -pineno (7,52%).

Componentes químicos (%)	Muestra													
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)
Hidrocarburos Monoterpénicos														
α-pineno	9,52	5,45	8,38	21,29	20,93	14,55	1,54	0,32	10,89	11,36	10,93	8,66	11,61	6,44
canfeno	3,05	4,48	5,74	10,21	sd	5,04	1,21	7,34	5,18	6,71	5,85	5,15	6,61	5,06
β-pineno	2,84	5,42	sd	3,72	8,64	4,91	4,18	13,77	sd	7,28	4,94	5,71	10,63	7,07
limoneno	0,52	8	0	0	0	3	0	sd	1	1	0	2	2	0,78
mirceno	6,68	21,52	18,8	2,9	5,93	2,96	sd	sd	10,72	sd	15,77	6,66	0,35	10,15
γ-terpineno	7,78	5,79	5,55	2,17	12,11	0,21	sd	0,17	3,64	0,21	0,6	0,71	0,44	0,94
p-cimeno	0,38	0,44	0,99	5,4	0,4	0,21	0,07	0,64	5,72	0,59	0,6	0,99	0,67	0,52
Total	30,77	51,1	39,46	45,69	48,01	30,88	7	22,24	37,15	27,15	38,69	29,88	32,31	30,96
Monoterpenos oxigenados														
1,8-cineol	17,02	13,22	11,65	13,72	17,53	31,18	4,18	25,02	13,28	24,93	19,93	20,17	20,17	16,39
acetato de bornilo	0,47	0,39	0,45	0,15	0,3	0,26	sd	0,41	0,39	0,51	sd	0,6	1,94	0,26
alcanfor	11,73	10,44	13	12,71	9,52	10,11	40,67	31,6	10,23	29,7	12,78	39,11	23,47	18,15
borneol	6,24	2,69	5,14	2,67	6,83	1,58	20,69	2,53	1,86	5,11	1,74	4,35	7,47	1,7
α-terpineol	1,29	1,7	2,74	3,56	3,81	1,57	6,87	2,29	0,66	2,17	0,46	2,23	2,27	0,23
verbenona	1,21	0,61	0,86	8,61	1,47	0,85	4,63	1,1	1,53	1	1,31	3,46	4,37	0,49
Total	37,96	29,05	33,84	41,42	39,46	45,55	77,04	62,95	27,95	63,42	36,22	69,92	59,69	37,22
a.e porcentaje	2,3	3,8	1,63	1,16	3,38	2,02	2,01	2,52	1,5	2,13	3,04	1,65	1,43	2,3
identificados%	68,73	80,15	73,3	87,11	87,47	76,43	84,04	85,19	65,1	90,57	74,91	99,8	92	68,18

Tabla 6. Componentes identificados (%) de diferentes muestras de aceites esenciales determinada por Cromatografía de Gases (sd= sin detectar)

El análisis se realiza en cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama, columna capilar de fenil-metil silicona y gradiente de temperatura de 70 a 240°C, 3°C/min





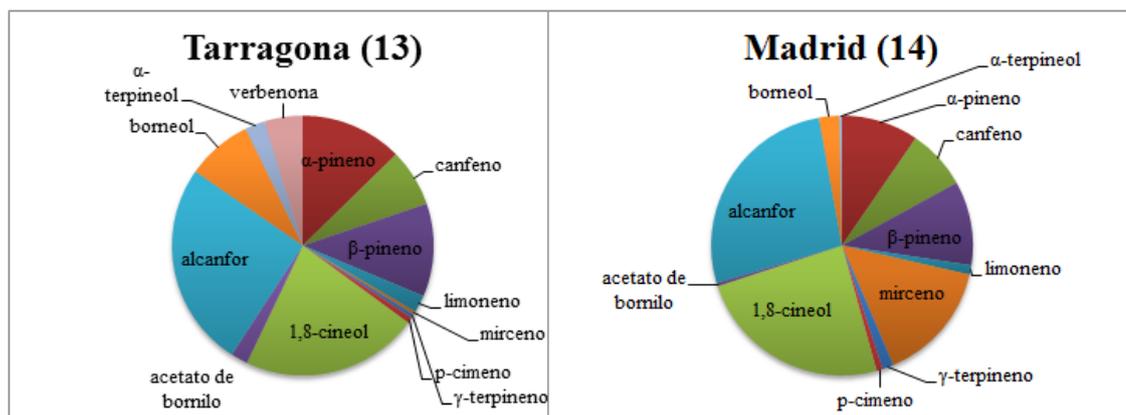


Figura 14. Proporción de los componentes identificados en las muestras del aceite esencial según localidad de recolección

En la Figura 15, se presenta como ejemplo el cromatograma obtenido para una de las muestras de a.e analizado. El análisis se realiza en cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama, columna capilar de fenil-metil silicona y gradiente de temperatura de 70 a 240°C, 3°C/min

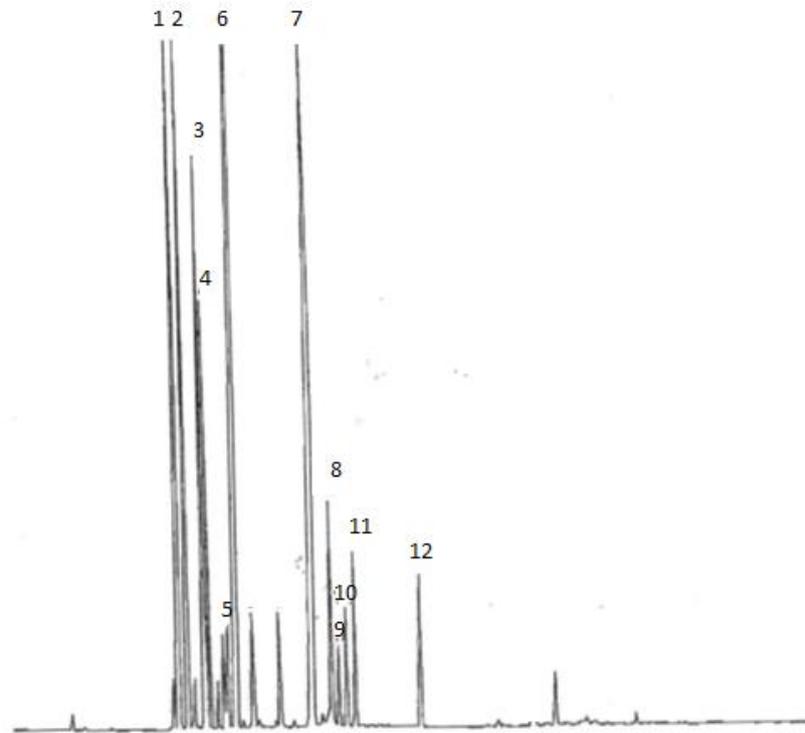


Figura 15.- Cromatograma representativo de una muestra de aceite esencial de *R. officinalis* en las condiciones de análisis descritas en el texto. Se pueden identificar los picos correspondientes a: 1) alfa-pineno, 2) canfeno, 3) beta-pineno, 4) mirceno, 5) p-cimeno, 6) 1,8 cineol + limoneno, 7) alcanfor, 8) borneol, 9) terpinen-4-ol, 10) verbenona, 11) alfa-terpineol, 12) acetato de bornilo

4.2.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA

4.2.2.1. Actividad antioxidante in vitro (ORAC)

En la Figura 16 se representa la curva estándar de Trolox, con concentraciones conocidas de este antioxidante, análogo hidrosoluble de la vitamina E.

En la Tabla 7 y la Figura 17 se muestran los resultados de la capacidad antioxidante de los aceites esenciales de las muestras en estudio, cuantificado mediante el ensayo ORAC. Todas las muestras presentan capacidad antioxidante siendo las muestras 3, 6, 9 y 12 las que presentan mayor actividad (1,39 μmol de equivalentes Trolox / mg de muestra), seguido de la muestra 13 con un valor de 1,30 (μmol de equivalentes Trolox / mg de muestra), la muestra número 2 presenta un valor de 1,01 (μmol de equivalentes Trolox / mg de muestra).

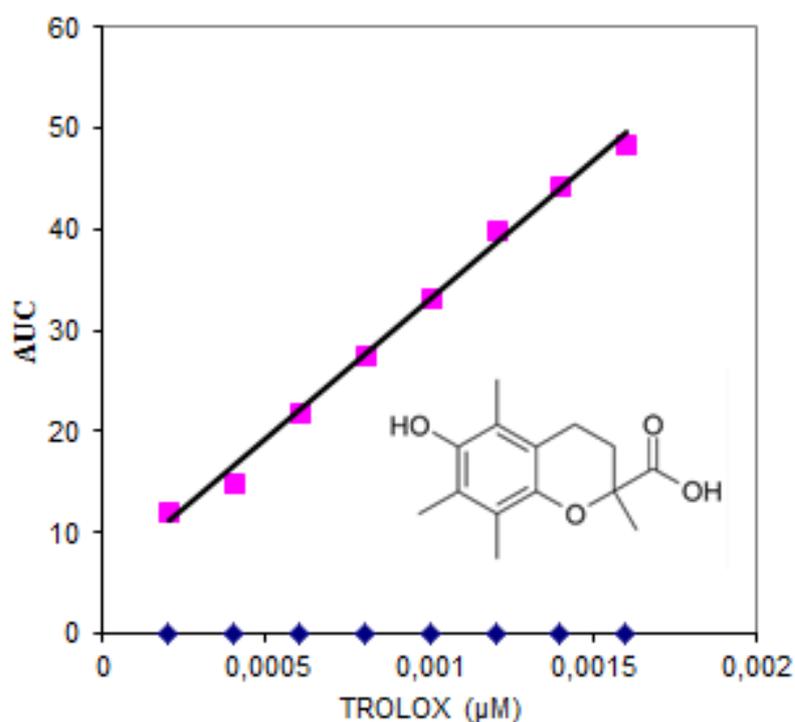


Figura 16. Curva de calibración de Trolox. Regresión lineal del área bajo la curva (AUC) neta a diferentes concentraciones de Trolox. ($\text{AUC}_{\text{neta}} = \text{AUC}_{\text{muestra}} - \text{AUC}_{\text{blanco}}$).

Muestra	Localidad	Valor ORAC($\mu\text{mol Trolox/mg}$)\pmDS
1	Toledo	1,18 \pm 0,026
2	Toledo	1,01 \pm 0,018
3	Toledo	1,39 \pm 0,035
4	Murcia	1,19 \pm 0,001
5	Murcia	1,02 \pm 0,048
6	Albacete	1,39 \pm 0,090
7	Valencia	1,19 \pm 0,009
8	Guadalajara	1,02 \pm 0,034
9	Cuenca	1,39 \pm 0,091
10	Guadalajara	1,19 \pm 0,000
11	Zaragoza	1,02 \pm 0,008
12	Tarragona	1,39 \pm 0,016
13	Tarragona	1,30 \pm 0,019
14	Madrid	1,11 \pm 0,098
Media		1,19 \pm 0,150

Tabla 7. Capacidad antioxidante (valor ORAC) de las 14 muestras de aceite esencial del *Rosmarinus officinalis* L.; Los resultados se expresan como media \pm DS de tres experimentos independientes (n= 3)

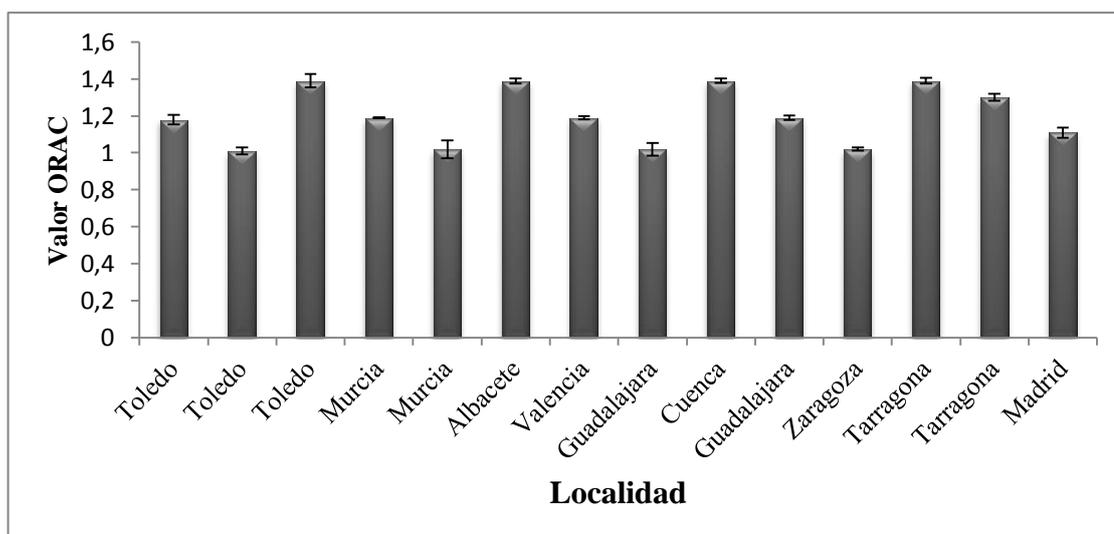


Figura 17. Capacidad antioxidante (valor ORAC) de las 14 muestras de aceite esencial del *Rosmarinus officinalis* L.; Los resultados se expresan como media \pm DS de tres experimentos independientes (n= 3).

4.2.2.2. Determinación del radical DPPH

En esta prueba se determina el IC50, es decir, el índice de concentración necesario para decolorar en un 50% la concentración inicial de DPPH, con el fin de tener un parámetro de referencia entre los extractos. En esta prueba hay una concentración constante de DPPH por lo cual aunque se incremente la concentración del aceite esencial habrá un límite de decoloración., Como se puede observar en la Tabla 8. el aceite esencial del *R. Officinalis* L se presenta una mayor actividad captadora del radical DDPH que el control positivo de referencia Trolox

Porcentaje de inhibición de DPPH

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{Ab - Am}{Ab} \right) \times 100$$

donde

Ab= Absorbancia de DPPH

Am= Absorbancia de muestra

Como se puede observar en la Tabla 8, la Concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) (mg aceite esencial/ml) de DPPH frente a distintas muestras del aceite esencial varia notablemente entre las distintas muestras, el valor más bajo corresponde a la muestra (3), Toledo, es $344,90 \pm 15,10$, mientras que la muestra con valor más alto es la (11), Zaragoza, con un valor de $854,65 \pm 05,54$.

Muestra	Localidad	IC₅₀ (mg aceite esencial /ml)±D.S
1	Toledo	$549,25 \pm 08,98$
2	Toledo	$433,13 \pm 16,84$
3	Toledo	$344,90 \pm 15,10$
4	Murcia	$585,61 \pm 16,54$
5	Murcia	$684,54 \pm 16,54$
6	Albacete	$599,24 \pm 13,91$
7	Valencia	$745,54 \pm 12,50$
8	Guadalajara	$681,54 \pm 06,84$
9	Cuenca	$715,65 \pm 10,58$
10	Guadalajara	$658,01 \pm 06,31$
11	Zaragoza	$854,65 \pm 05,54$
12	Tarragona	$599,54 \pm 02,01$
13	Tarragona	$691,87 \pm 02,54$
14	Madrid	$574,44 \pm 03,08$
Media		$625,08 \pm 124,02$

Tabla 8 Concentración inhibitoria 50 de DPPH. Los resultados se expresan como media \pm DS de tres experimentos independientes (n= 3)

Los resultados previos obtenidos en los ensayos *in vitro* de las diferentes muestras de aceite esencial indican la falta de diferencias estadísticamente significativas entre las mismas, por lo que los estudios de la actividad biológica en cultivos

celulares se llevan a cabo únicamente con la muestra de Comunidad de Madrid como representante de todas las muestras de *R. officinalis* recolectadas para este estudio.

4.2.3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

4.2.3.1. Viabilidad celular

En primer lugar se evalúa la ausencia de toxicidad celular de las muestras del aceite esencial sobre la línea celular U373-MG. Para ello las células se tratan con un rango de concentraciones del aceite esencial y se determina el porcentaje de viabilidad celular.

Las células U373-MG se tratan con las muestras de aceite esencial objeto de estudio en un amplio rango de concentraciones (0, 5; 1; 2,5; 5; 12,5; 25; 50; 100 y 250 µg/ml) durante 24 horas a 37°C y 5% CO₂. A continuación, se incuban con MTT durante 1 hora en oscuridad a 37°C y 5% CO₂ para medir así la actividad mitocondrial. Como control positivo se utilizan células sin tratar y como control negativo se usa Tritón X-100, que produce una elevada mortalidad celular.

Como se puede observar en la Figura 18.; el tratamiento en el rango de concentraciones de aceite esencial de (0,5; 1; 2,5; 5 y 12,5 µg/ml) no presenta efectos citotóxicos (viabilidad superior al 85%) en las muestras en estudio tras 24 horas de tratamiento, mientras que a las concentraciones más elevadas, disminuye significativamente el porcentaje de viabilidad celular en comparación con las células control (100% de viabilidad). El Tritón X-100 presenta una reducida viabilidad celular (25,45%).

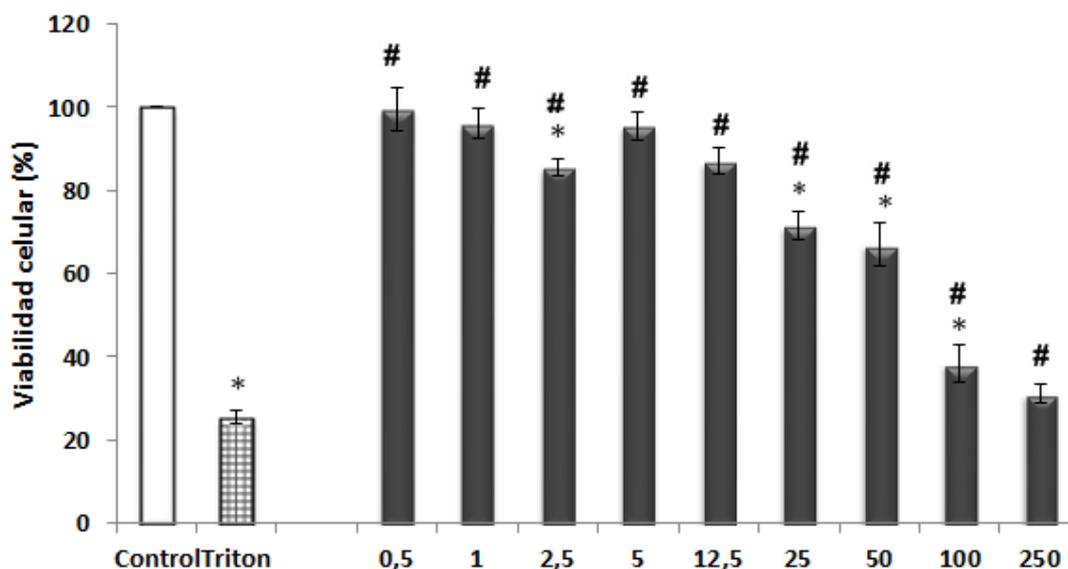


Figura 18. Evaluación *in vitro* de los efectos del aceite esencial de *R. officinalis* L. sobre la viabilidad celular. Las células se incuban con distintas concentraciones (0, 5; 1; 2,5; 5; 12,5; 25; 50; 100 y 250 µg/ml) durante 24 horas. El porcentaje de células viables se determina mediante la técnica de MTT. Como control positivo se utilizan células sin tratar y como control negativo células tratadas con Tritón X-100. Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad celular, considerándose el 100% los valores obtenidos para las células no tratadas. Los datos se expresan como porcentaje de viabilidad de la media \pm DS (n=3). *p<0,05 vs control, #p<0,05 vs Tritón

4.2.3.2. Evaluación del daño celular

Con el fin de estudiar la actividad neuroprotectora del aceite esencial, se evalúa la viabilidad celular empleando un modelo de toxicidad inducida por peróxido de hidrogeno (H_2O_2 1mM); se observan, además, los cambios en la morfología de las células tras los tratamientos mediante un microscopio de contraste de fase (NIKON TMS).

Cuando los astrocitos se someten a daño oxidativo con el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), se observa una disminución significativa de la viabilidad celular respecto a las células sin tratar (59,89%) Figura 19. El tratamiento previo durante 24 h con el aceite esencial, revierte parcialmente ese daño., a todas las concentraciones ensayadas, no observándose diferencias significativas respecto al control. Las concentración de 0,5 a 12,5µg/ml ejercen mayor efecto protector

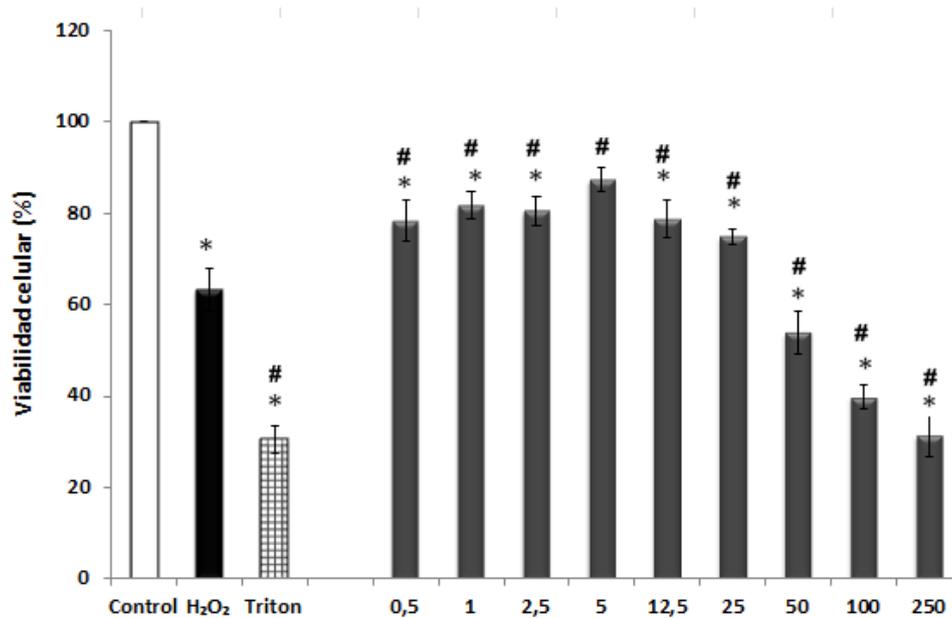


Figura 19. Efecto neuroprotector del aceite esencial del *R. officinalis* L. frente a la toxicidad inducida por H₂O₂. Las células se someten a pretratamiento durante 24 horas con diferentes concentraciones del aceite esencial en estudio (0, 5; 1; 2,5; 5; 12,5; 25; 50; 100 y 250 µg/ml) y se incuban con H₂O₂ (1mM) durante 30 minutos. El porcentaje de células viables se determina mediante el método de reducción celular del MTT. Los datos se expresan como porcentaje de viabilidad, media ± DS (n=3). *p<0,05 vs control, #p<0,05 vs H₂O₂

4.2.3.3. Estudio de la morfología celular

Como se puede observar en la imagen (Figura 20), las células control presentan una morfología redondeada y se encuentran agrupadas. Cuando se tratan con H₂O₂ (1mM) durante 30 minutos, las células presentan cambios en su morfología, adquiriendo formas menos circulares, de menor tamaño, así como una disminución en su agrupación y en número. La preincubación de las células U373-MG con los aceites esencial elegidas para los estudios, previo a la exposición con H₂O₂ evita la aparición de estos cambios.

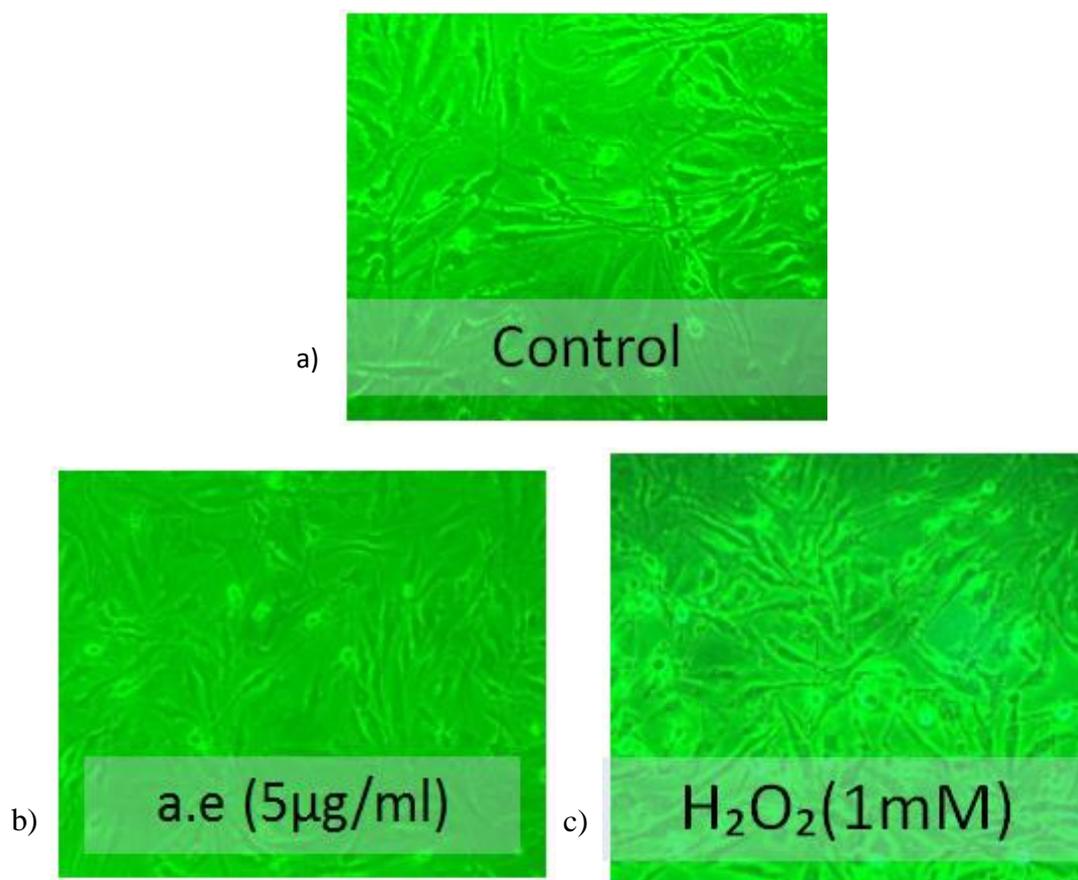


Figura 20. Efecto sobre la morfología celular de los diferentes tratamientos: a) grupo control; b) aceite esencial de romero, 5µg/ml) y c) H₂O₂ 1mM. Las imágenes corresponden a fotografías representativas de cada uno de los tratamientos, utilizando una cámara Moticom acoplada a microscopio de contraste de fase.

4.2.3.4. Actividad antiradicalaria

Además de evaluar el efecto de las distintas concentraciones del aceite esencial sobre la viabilidad celular de astrocitos en cultivo, se estudia el efecto del H₂O₂ como agente productor de radicales libres en las células y los niveles de EROs generados mediante el ensayo de la diclorofluoresceína (DCFH-DA). Inicialmente, se evalúa si alguna de las concentraciones del aceite esencial produce radicales libres en la línea celular U373- MG. Los resultados muestran

que ninguno de los extractos es capaz de generar radicales libres, a diferencia de peróxido de hidrógeno.

Tal como se observa en la Figura 21, los niveles intracelulares de EROs se ven aumentados de manera significativa en comparación con las células control, lo que confirma que el H_2O_2 en las condiciones experimentales establecidas, es un inductor de estrés oxidativo. A las 2 h del ensayo, la concentración de EROs intracelulares es un 34% mayor en las células tratadas sólo con H_2O_2 en relación con las células control.

El tratamiento sólo con las concentraciones del aceite esencial en estudio (1; 2,5; 5 y 12,5 $\mu\text{g/ml}$) seleccionadas en función de los resultados obtenidos previamente en el estudio de viabilidad y, protección frente al tóxico no causa cambios en los niveles intracelulares de EROs en comparación con las células control.

Esto indica que las concentraciones del aceite esencial en estudio no inducen la producción de EROs ni tampoco reaccionan con compuestos del medio de cultivo favoreciendo la formación de EROs.

Sin embargo, el tratamiento de las células con concentraciones del aceite esencial en estudio, previo a la exposición con H_2O_2 reduce de manera significativa la generación intracelular de EROs, lo que puede suponer que el efecto protector de estos compuestos observado en los ensayos anteriores, se debe al menos en parte, a un efecto positivo sobre de la vía de estrés oxidativo (Figura 22).

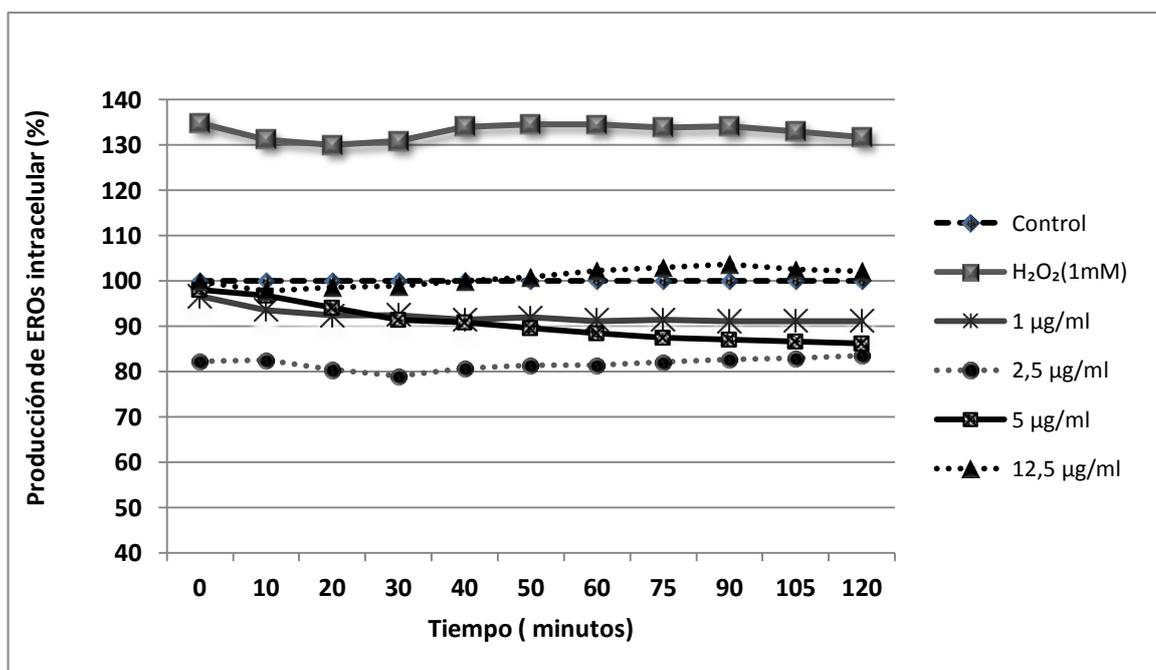


Figura 21. Producción de radicales libres por el aceite esencial de *R. officinalis* L.

Las células U373- MG se tratan con diferentes concentraciones del aceite esencial en estudio (1; 2,5; 5 y 12,5 µg/ml) para valorar si son capaces de producir radicales libres. Las células se incuban con DCFH-DA durante 30 minutos, en oscuridad a 37°C y 5% de CO₂. A continuación, se tratan con diferentes concentraciones del aceite esencial, La generación de radicales libres se determina mediante la técnica de la diclorofluoresceína Se representa el porcentaje de producción de radicales libres vs tiempo (min) respecto al grupo de células control (células sin tratar). Los resultados se expresan como % de producción de EROs intracelulares respecto al control. Los datos se expresan como media ± DS (n=3).

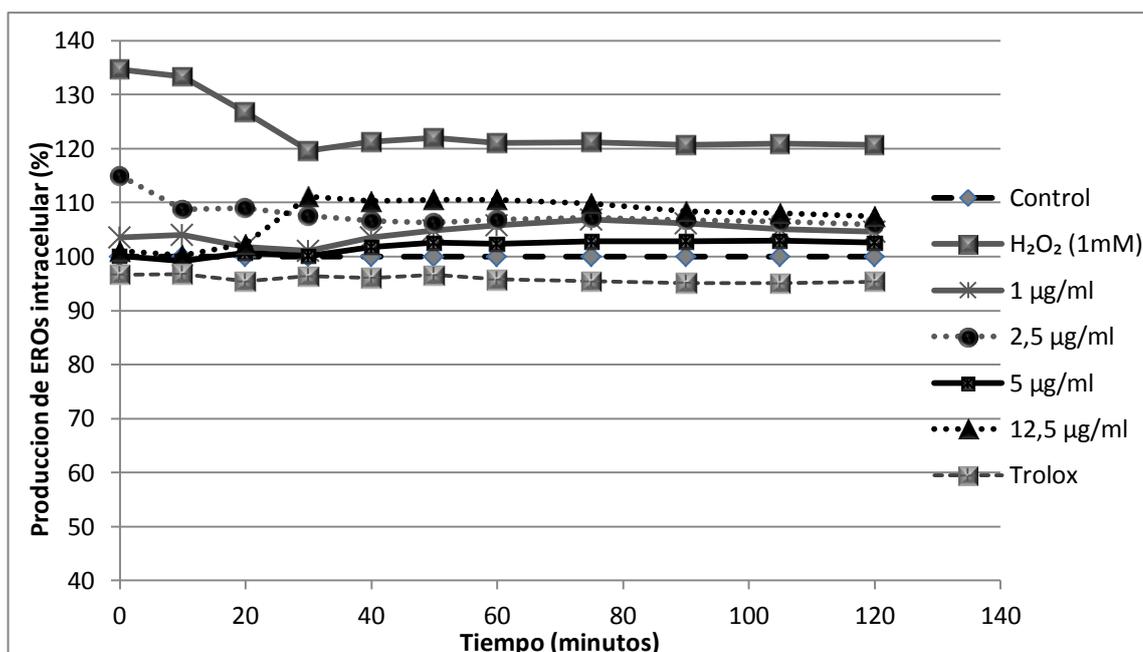


Figura 22. Efecto protector del aceite esencial de *R. officinalis* L. sobre la producción de EROs por el peróxido de hidrógeno. Las células se incuban con DCFH-DA durante 30 minutos, en oscuridad a 37°C y 5% de CO₂. A continuación, se tratan con las muestras de aceite esencial (1; 2,5; 5 y 12,5 µg/ml) 1mM) y con peróxido de hidrógeno. Los resultados se expresan como % de producción de EROs intracelulares respecto al control. Los datos se expresan como media ± DS (n=3).

4.2.3.5. Determinación de los niveles de glutatión

Para medir los niveles de GSH, GSSG y el efecto del aceite esencial de *R. officinalis* L. sobre los niveles de glutatión. Las células de U373-MG son pretratadas durante 24 horas con las muestras de aceite esencial (1; 2,5, 5 y 12,5 µg/ml) e incubadas durante 30 minutos con H₂O₂ (1 mM). El efecto del aceite esencial sobre la cantidad de glutatión se determina mediante fluorescencia utilizando OPT como marcador de fluorescencia. Los datos se expresan como media ± DS (n=3). como se en la figura 23. Al incubar las células con H₂O₂ (1mM, 30 min), los niveles de GSH disminuyen, en respecto al control,(nmole/mg de proteína mientras que los niveles de la especie oxidada (GSSG) aumentan. Cuando las células se incuban con los aceites esenciales de estudio los niveles del GSSG se aumenta en una manera significativa en comparación con el grupo control.

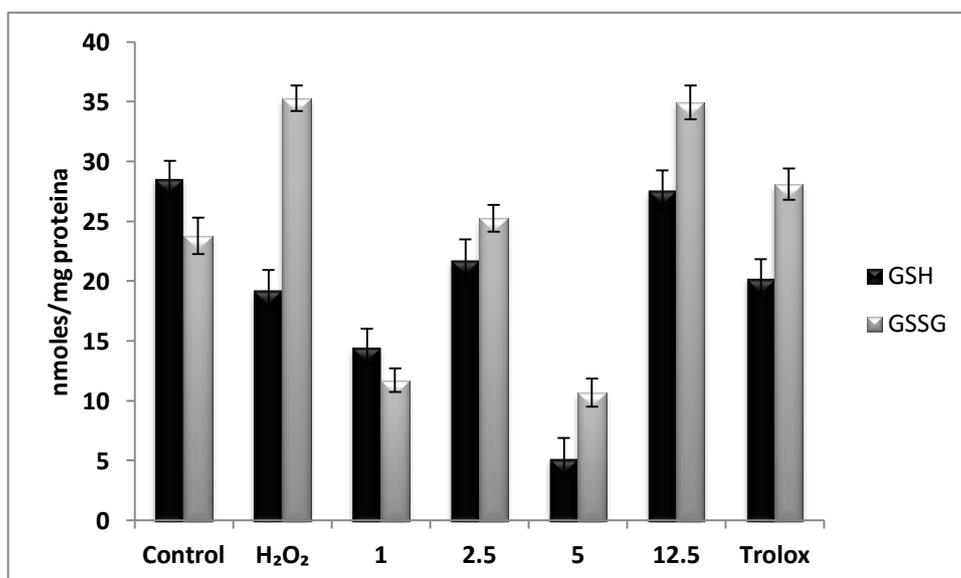


Figura 23. Relación entre los niveles de GSH, GSSG. Las células U373-MG se someten a pretratamiento con el aceite esencial de *R. officinalis* L. (1; 2,5; 5 y 12,5 $\mu\text{g/ml}$) durante 24 horas y, a continuación, se incuban durante 30 minutos con H_2O_2 (1mM). Los datos se expresan como media \pm DS (n= 3).

Con el fin de determinar el efecto del aceite esencial de *R. officinalis* L. sobre los niveles de glutatión, se analizan los niveles de GSSG y GSH mediante fluorescencia. El índice redox, expresando como IR, es el cociente entre la cantidad de GSSG respecto al total (GSSG+GSH) (Tabla 9). El tratamiento con H_2O_2 produce un aumento del IR de forma estadísticamente significativa con respecto al grupo control (0,64 frente a 0,45, respectivamente). Sin embargo, el tratamiento previo con el aceite esencial de romero consigue normalizar los valores de IR, especialmente a las concentraciones de 1,5 y 12,5 $\mu\text{g/ml}$.

Compuesto	IR=GSSG/(GSSG+GSH)
Control	0,45 ± 0,2
H₂O₂ (1mM)	0,64 ± 0,5
1 µg/ml+1mM H ₂ O ₂	0,44 ± 0.04
2,5 µg/ml+1mM H ₂ O ₂	0,53 ± 0.03
5 µg/ml+1mM H ₂ O ₂	0,67 ± 0.04
12,5 µg/ml+1mM H ₂ O ₂	0,55± 0.02
0,5 mM Trolox	0,58 ±0.02

Tabla 9. Efecto del aceite esencial de *R. officinalis* L. sobre los niveles de glutatión. Las células U373-MG son pretratadas durante 24 horas con las muestras de aceite esencial (1; 2,5; 5 y 12,5 µg/ml) e incubadas durante 30 minutos con H₂O₂ (1 mM). El efecto del aceite esencial sobre la cantidad de glutatión se determina mediante fluorescencia utilizando OPT como marcador de fluorescencia. Los datos se expresan como media ± DS (n=3). No se encuentran diferencias estadísticamente significativas al realizar el análisis de ANOVA, con relación a la variable de las células tratadas con H₂O₂

4.2.3.6. Determinación de la actividad caspasa-3

Se determina la muerte celular producida por estrés oxidativo, analizando la actividad de la principal enzima efectora de apoptosis, caspasa-3, cuyo sustrato es Ac-DEVD-AMC. Como se puede mostrar en la Figura 24. cuando las células se someten a daño oxidativo inducido por H₂O₂ (500 µM) durante 30 minutos ocasiona a una elevación no significativa de la actividad de caspasa-3, el tratamiento previo con el aceite esencial del *R. officinalis* L. durante 24 h, reduce ligeramente la actividad caspasa-3 con respecto al tóxico de forma estadísticamente no significativa, Por otro lado, el tratamiento de las células con el aceite esencial no activa las caspasa-3, lo que indica estas concentraciones del aceite esencial no inducen la actividad de esta enzima activadora del proceso de la apoptosis.

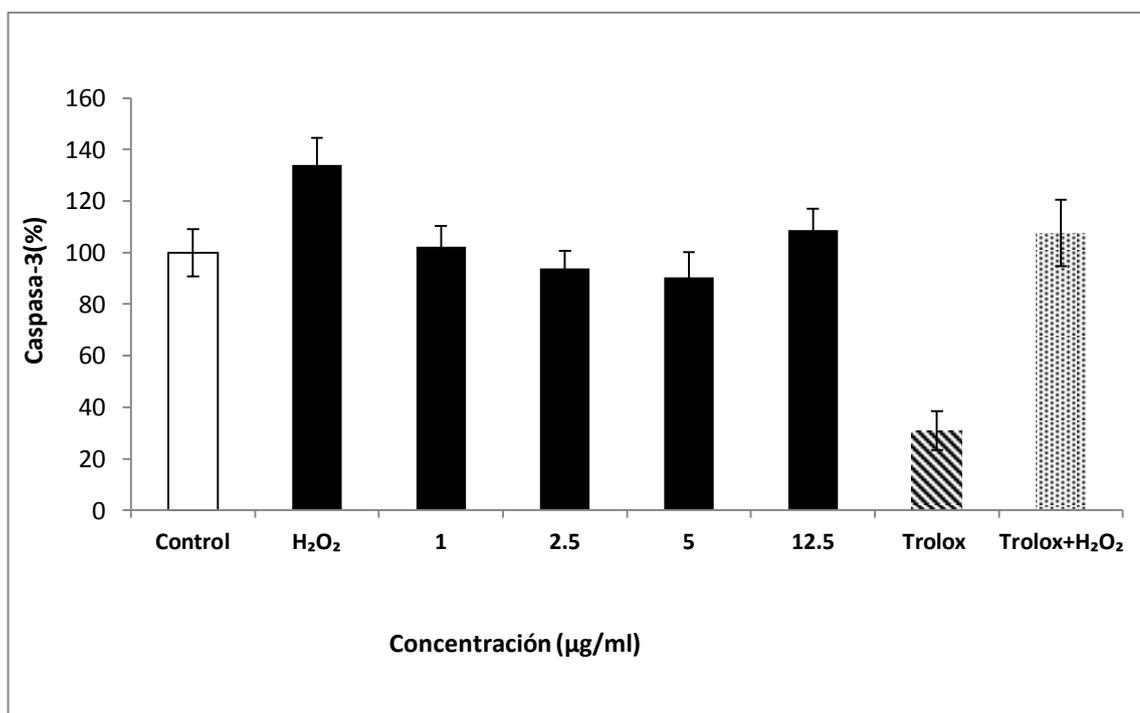


Figura 24. Efecto del aceite esencial del *R. officinalis* L. sobre la actividad caspasa-3. Las células de U373-MG se tratan con las muestras de aceite esencial a las (1; 2,5; 5 y 12,5 µg/ml) durante 24 horas y se incuban con H₂O₂ (500 µM) durante 30 minutos. La actividad caspasa-3 se determina en extractos celulares totales mediante medida en un fluorímetro, utilizando el sustrato específico Ac-DEVD-AMC. Los resultados se representan como % respecto al control (100%, células sin tratar). Los resultados se expresan como media ± DS (n= 3)

4.2.3.7. Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica es uno de los principales mecanismos de daño celular producido por ROS. Para valorar el grado de degradación oxidativa de los lípidos, se han cuantificado los niveles del producto secundario malondialdehído (MDA) por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

En la Figura 25 se muestra A) la recta de calibrado de MDA y B) el cromatograma correspondiente a la concentración 40 µM.

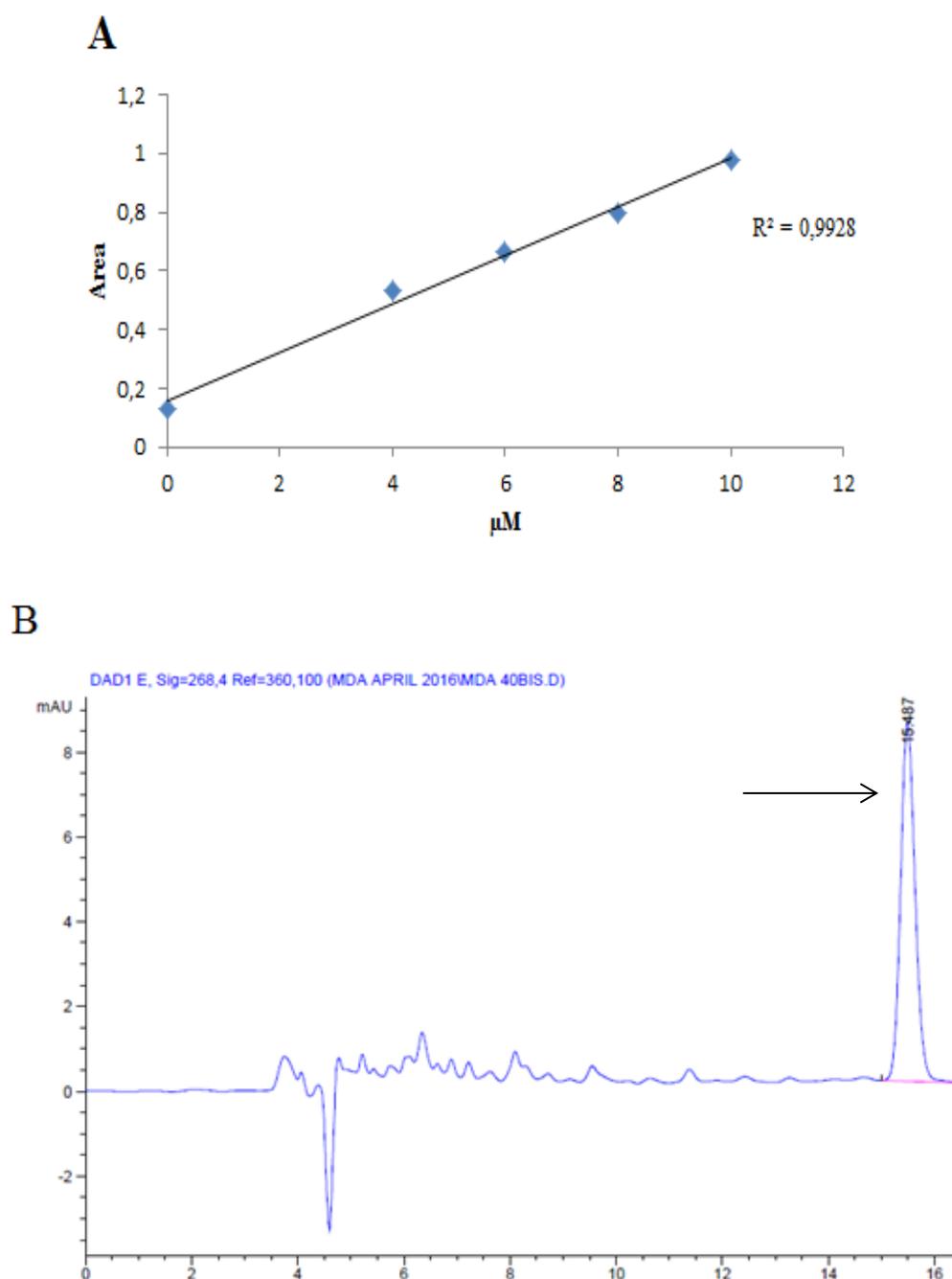


Figura 25. A) Recta de calibración del malondialdehido (MDA). La ecuación de la recta de regresión se utilizó para determinar las concentraciones de MDA en los cultivos de astrocitos tratados con las diferentes concentraciones y con el H_2O_2 . B) Cromatograma correspondiente a la concentración de 40 μM de MDA. El análisis se realiza en cromatógrafo con detector de diodos DA 1260, a λ 268 y 532 nm y temperatura de 40°C.

En la Figura 26 se presentan las concentraciones de MDA liberadas al medio de cultivo por las células U373-MG sin tratar; como se puede observar, la concentración de MDA en las células U373-MG expuestas a H₂O₂ (1 mM, 30 min) resulta ser significativamente superior a la de las células control (16,07 frente a 34,86 nmoles/mg proteína, respectivamente).

Ninguna de las concentraciones ensayadas provoca degradación de las membranas biológicas por peroxidación lipídica, ya que no se observan aumentos en los valores de MDA en comparación con las células control. Por otro lado, el tratamiento de las células con el aceite esencial, previo a la exposición al tóxico, es capaz de inhibir la formación de MDA inducida por éste. Esta inhibición es significativa para las concentraciones de 1 µg/ml y 5 µg/ml.

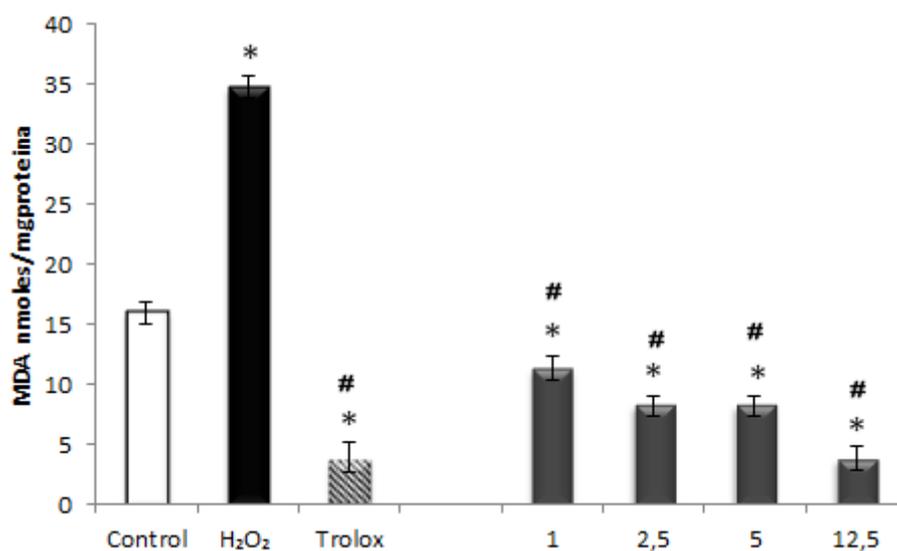


Figura 26. Efecto del aceite esencial de *R.officinalis* L.sobre la peroxidación lipídica. Las células U373-MG se tratan con las muestras de aceite esencial (1; 2,5; 5 y 12,5 µg/ml) durante 24 horas. Los resultados se expresan como nmol/mg proteína, media ± DS (n=3). * $p < 0,05$ vs control y # $p < 0,05$ vs H₂O₂.

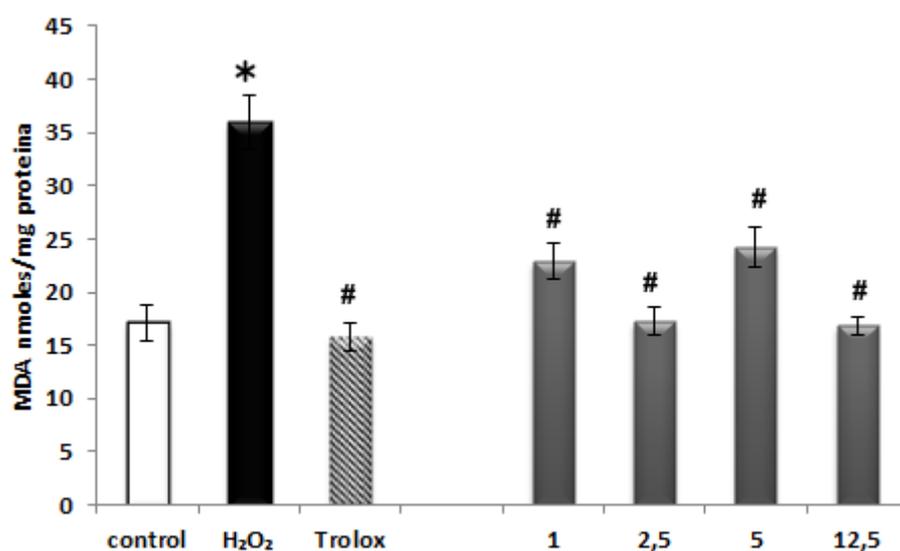
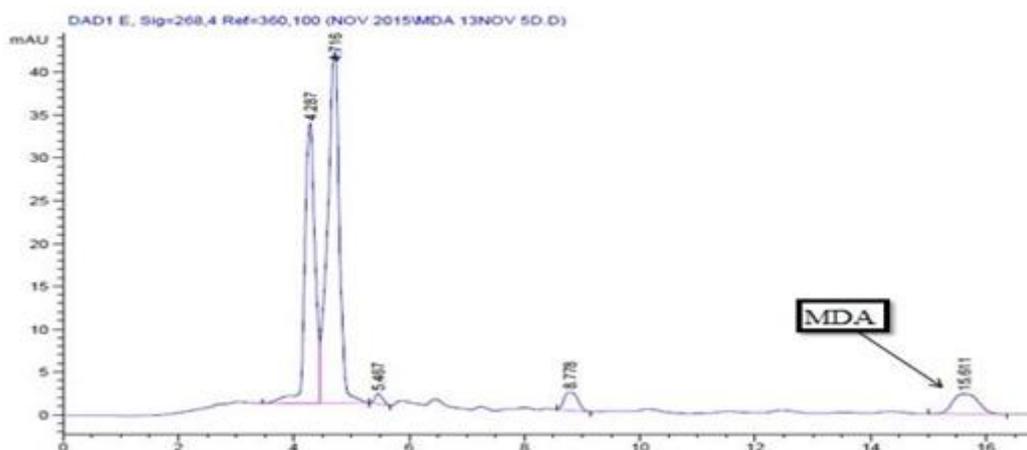


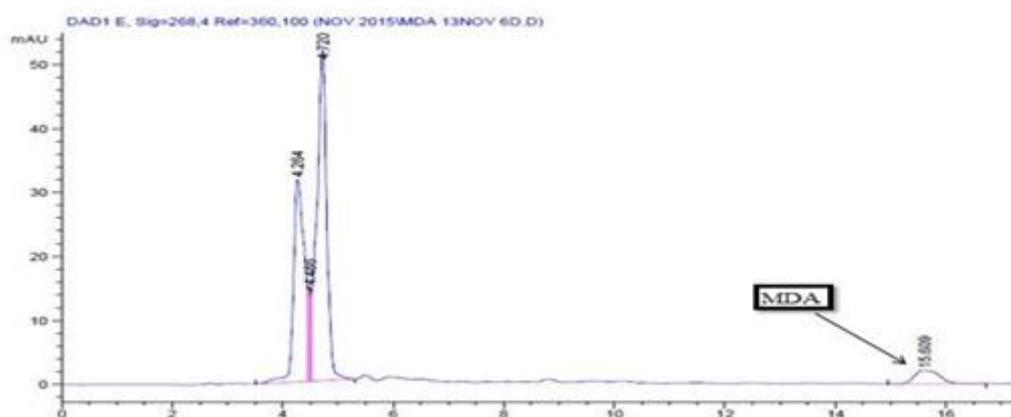
Figura 27. Efecto del aceite esencial de *R. officinalis* L. sobre la peroxidación lipídica. Las células U373-MG se tratan con las muestras de aceite esencial (1; 2,5; 5 y 12,5 µg/ml) durante 24 horas y se incuban con H₂O₂. (1 mM) durante 30 minutos. Los resultados se expresan como nmol/mg proteína, media ± DS (n=3). * $p < 0,05$ vs control y # $p < 0,05$ vs H₂O₂.

En la Figura 28 se muestran como ejemplo los cromatogramas obtenidos tras el tratamiento con diferentes concentraciones de aceite esencial y su influencia en los niveles de MDA en el cultivo celular. Como se puede comprobar, el tratamiento con la concentración de 12,5 µg/ml consigue revertir casi completamente la formación de MDA.

A)



B)



C)

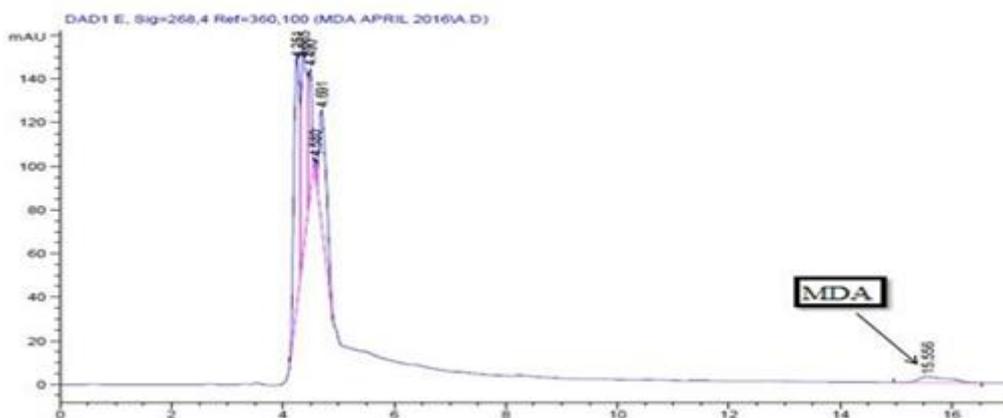


Figura 28. Cromatogramas correspondientes al análisis de los niveles de MDA tras el tratamiento con aceite esencial de romero A) 1µg/ml; B) 5µg/ml; C) 12,5µg/ml en presencia de H₂O₂

4.2.3.8. Determinación de la actividad del enzima CAT

Una vez evaluado el efecto protector del aceite esencial frente al daño oxidativo inducido por H_2O_2 se ha determinado si esta capacidad citoprotectora puede ser debida a la activación del sistema antioxidante enzimático celular durante el proceso de estrés oxidativo en la línea celular U373-MG. Para ello, se evalúa el efecto de las muestras de aceite esencial sobre la actividad de la enzima antioxidante Catalasa induciendo un daño oxidativo mediado por H_2O_2

Como se puede observar en la Figura 29 la actividad enzimática aumenta cuando las células U373-MG son sometidas a daño oxidativo. El tratamiento con todos los concentraciones del aceite esencial (1; 2,5; 5 y 12,5 $\mu\text{g/ml}$) induce un aumento no significativo en la actividad enzimática, con respecto al grupo control.

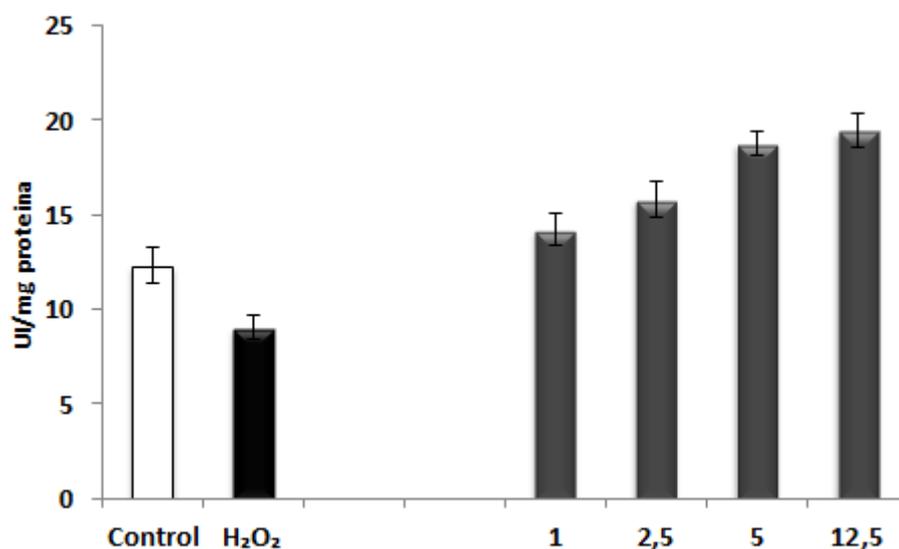


Figura 29. Efecto del aceite esencial de *R. officinalis* L. en la actividad y expresión enzimática de CAT. Las células U373-MG se pre incuban con las muestras de aceite esencial (1; 2,5; 5 y 12,5 $\mu\text{g/ml}$) durante 24 horas y posteriormente se induce un estado de estrés oxidativo con H_2O_2 (1mM) durante 30 minutos. La actividad enzimática de CAT se mide mediante espectrofotometría en extractos celulares totales. Los resultados de la actividad enzimática se expresan como media \pm DS (n=3).

4.3. EXTRACTO METANÓLICO DE *R. officinalis* L.

4.3.1. Estudio fitoquímico

4.3.1.1. Rendimiento

En la Tabla 10 se recoge el rendimiento obtenido de los extractos metanólicos de las 14 muestras estudiadas; el rendimiento final se calcula como la media de dichos valores (\pm DS) Como se puede observar, el rendimiento es variable. El extracto procedente de la muestra número 13, Tarragona, presenta el valor más elevado (22,80%), mientras que el extracto procedente a la muestra número 6, Guadalajara, presenta el más bajo (11,50 %). Los resultados se expresan como media \pm DS de tres experimentos independientes (n= 3).

Muestra	Localidad	Rendimiento \pm DS
1	Toledo	17,67 \pm 0,85
2	Toledo	21,33 \pm 0,12
3	Toledo	12,33 \pm 0,83
4	Murcia	11,67 \pm 0,56
5	Murcia	12,00 \pm 0,64
6	Albacete	19,67 \pm 0,76
7	Valencia	18,33 \pm 0,21
8	Guadalajara	11,50 \pm 0,64
9	Cuenca	13,47 \pm 0,35
10	Guadalajara	14,67 \pm 0,31
11	Zaragoza	19,33 \pm 0,95
12	Tarragona	21,40 \pm 0,35
13	Tarragona	22,80 \pm 0,36
14	Madrid	16,00 \pm 0,86
Media		15,72 \pm 5,94

Tabla 10. Rendimiento (%) de los extractos metanólicos del *R. officinalis* L.; Los resultados se expresan como media \pm DS de tres experimentos independientes (n= 3)

4.3.1.2. Composición

El análisis por HPLC de los compuestos fenólicos permite identificar 27 compuestos polifenólicos en los extractos metanólicos de las 14 muestras (Tabla 11): derivados de flavonoles (quercetina, miricetina, rutina y kanferol); derivados de Flavanonas (Hesperetina, hesperidina y Arbutina); derivados de flavona como (4OH3metcin, isovitexina y apigenina-7glucoside); derivados de ácidos cinámicos (ácido clorogenico, ácido cinámico y ácido rosmarínico) ácido benzóico como (ácido gentisico y ácido abscísico)

En la Tabla 12 se muestra la composición en compuestos fenólicos (flavonoides y ácidos fenólicos) identificados en las muestras de extractos metanólicos de *R. officinalis* por HPLC, de acuerdo con su tiempo de retención y espectro de absorción a 254, 280 y 350 nm.

Los flavonoides, quercitrina, miricetina, hespertina, vitexin y apigenina se detectaron en todas las muestras; también los ácidos fenólicos (clorogénico, rosmarínico y 4OH-cinámico) y xantona.

La muestra número (6), Albacete, es la muestra con el mayor porcentaje de compuestos polifenólicos, un total de 98,9%; los resultados cuantitativos mostraron que los compuestos más abundantes en esta muestra de romero son flavonoides 93,28% específicamente rutina 52,08% y miricetina 27,71% en cuanto los ácidos polifenólicos el porcentaje detectado es muy bajo 5,62%; en segundo lugar destaca la muestra número (3) ,Toledo, con un contenido fenólico de 74,08% que contiene como principales compuestos fenólicos flavonoides como rutina 27,54% y miricetina 11,94% en cuanto los ácidos fenólicos representan 18,98% en el que destaca el ácido cinámico con 10,53% ; en el tercer lugar se encuentra la muestra número (11), procedente de Zaragoza, 65,69%, en la que destacan rutina 34,90%, miricetina 12,709% , hespertina 6,70% y el ácido clorogénico 4,11% (Tabla 13)

t_R (min)	Compuesto		
	254nm	280nm	350nm
4,604	Ác. ursólico		
7,011	Ác. clorogénico		
7,054			Ác. gentísico
8,053		Ác. caféico	
8,480	Ác. vainílico		
9,376	Ác. isovainílico		
12,313		Ac. 4-OH cinámico	
12,847	Ác. cumárico		
12,875			Ác. sinápico
14,033		Ác. 4OH 3MeOH cinámico	
14,148		Ác. siríngico	
14,543	Vitramina		
15,222	Vitexina		
17,500	Ác. abscísico		
18,407			Isovitexina
19,096		Hesperidina	
19,100	Ác. rosmarínico		
20,196	Rutósido		
22,114	Quercitrina		
23,708	Miricetina		
24,551		Ac. cinámico	
26,093	Hesperetina		
27,880	Arbutina		
28,856			Apigenina-7-glucósido
29,061			Luteolina
30,691			Apigenina
30,693	Kaempferol		
33,455			Rutina
35,096	Xantona		
36,483	Ác. carnósico		
37,040	Carnosol		

Tabla 11. Compuestos fenólicos (flavonoides y ácidos fenólicos) identificados en las muestras de extractos metanólicos de *R. officinalis* por HPLC, de acuerdo con su tiempo de retención y espectro de absorción a 254, 280 y 350 nm. El análisis se realizó con una columna Spherisorb C18 (250x4,6mm; 5mm). Fase móvil A: Metanol y B: H₂O/ácido acético (0,05%) con elución en gradiente y flujo de 1ml/min. Todas las muestras se analizan por triplicado

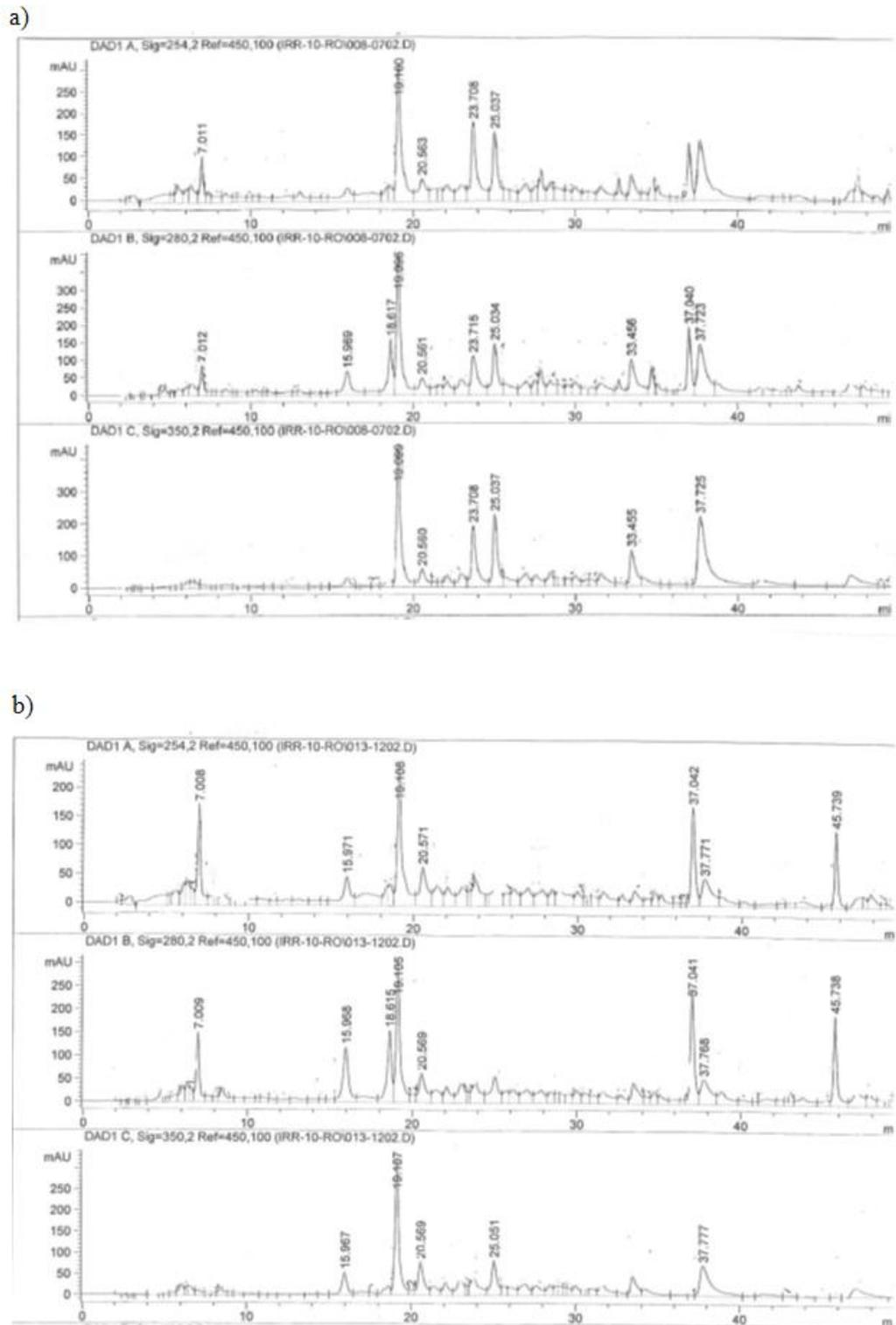


Figura 30.- Cromatograma representativo de dos muestras de *R. officinalis* (extracto metanólico), con detección a 254, 280 y 350nm. La identificación de los picos se incluye en la Tabla 11.; a) muestra n° 2 (Toledo); b) muestra n° 9 (Cuenca)

Compuesto	Muestra													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Flavonoides														
Flavonoles														
quercitrina	0,32	0,35	0,44	0,32	0,402	0,46	0,315	0,39	0,398	0,4175	0,4895	0,37	0,466	12,1675
miricetina	7,66	10,74	11,94	12,17	11,682	27,71	16,82	9,76	12,483	11,5375	12,709	11,765	23,2975	6,6145
rutina			27,54	18,42	27,0635	52,08	17,612	21,205	18,7985	24,4205	34,906	20,538	15,1095	
kanferol	0	0	0,01	0,01	0,0075	0	0,003	0,002	0,005	0,003	0,009	0,0035	0,009	4,2225
Flavanonas														
Hesperetina	4,08	3,58	9,56	6,61	6,2825	5,67	6,6225	7,313	7,5565	6,962	6,7015	5,3875	8,33	0,1455
hesperidin	0,61	0,8	0,9	0,65	0,5795	0,74	0,744	0,5395	0,937	0,715	0,8405	0,3815	1,017	
Arbutina	0,17	0,14	0,17	0,15	0,1885	0,15	0,056	0,116	0,0955	0,0775	0,0745		0,173	0,0055
Xanthona														
xantona	5,59	3,04	3,68	4,22	6,044	5,91	2,575	3,61555	3,0125	2,826	3,3375	2,5295	3,879	0,001
Flavonas														
vitexin	0,02	0,02	0,03	0,03	0,028	0,02	0,021	0,001	0,0255	0,025	0,001	0,0115	0,024	0,227
luteolina			0,2		0,072	0,1	0,07	0,054	0,114	0,15			0,0825	0,034
apigenina	0,03	0,05	0,11	0,03	0,076	0,09	0,034	0,029	0,0375	0,0415	0,068	0,0405	0,058	18,416
4OH3metcin	0,1	0,13		0,13	0,103	0,15	0,138	0,139		0,167	0,165		0,231	
isovitexina	0,27	0,34	0,23							0,2015	0,165			0,1803
apig-7gluc	0,48	0,93	0,29	0,18	0,146	0,2	0,1505	0,177	0,147		0,4235	0,3925	0,241	
Total	19,33	20,12	55,1	42,92	52,6745	93,28	45,161	43,34105	43,61	47,544	59,89	41,4195	52,9175	42,0138

Tabla 12. Contenido en compuestos fenólicos (Flavonoides) de extracto metanólico de *R.officinalis* L. determinado por HPLC

Compuesto	Muestra													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Ácidos Fenólicos														
Ácidos cinámicos														
sinápico								0,146			0,164			
clorogénico	4,71	7,52	6,75	1,73	4,1395	3,52	1,866	6,0345	3,8885	8,148	4,117	1,5935	3,32	0,074
cinámico		13,18	10,53											
rosmarínico	0,69	0,91	1,02	0,73	0,6725	0,83	0,816	0,6405	1,0125	0,858	0,935	0,495	1,1945	0,323
cafeico				0,06	0,0725	0,08	0,071		0,086	0,093	0,084	0,05	0,064	0,481
ursólico	0,06	0,06	0,13										0,1085	1,729
Ácidos benzoicos														
vainílico			0,08	0,07	0,073	0,05	0,0745	0,069	0,0765	0,067	0,0825	0,068	0,0935	0,0615
isovainílico			0,07	0,06	0,066	0,06	0,0585	0,057		0,0705	0,0665	0,058	0,07	0,0285
gentísico	0,18	0,24										0,138		
abscísico				0,23	0,1965	0,41	0,181		0,414	0,184		0,4025		0,725
carbónico	0,03	0,02	0	0	0,001	0	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	1,3215
4OHcinámico	0,33	0,24	0,4	0,48	0,3345	0,67	0,4985	0,3475	0,489	0,578	0,5235	0,7405	1,3325	0,1325
siringico	0,04	0,09												0,654
Total	6,04	22,26	18,98	3,36	5,5555	5,62	3,5665	7,1495	5,9675	9,9995	5,8095	3,5465	6,184	5,53
Compuestos fenólicos	25,37	42,38	74,08	46,28	58,23	98,9	48,7275	50,49055	49,5775	57,5435	65,6995	44,966	59,1015	47,5438

Tabla 12. (cont) Contenido en compuestos fenólicos (Ácidos Fenólicos) de extracto metanólico de *R. officinalis* L. determinado por HPLC

4.3.1.3. Contenido total en compuestos fenólicos

La determinación de la cantidad total de los compuestos polifenólicos (método de Folin-Ciocalteu) se realizó a través de una curva de calibración con un estándar de ácido gálico (6,75-400 ppm), obteniendo un coeficiente de regresión de 0.997. Los valores obtenidos se expresaron en ppm de ácido gálico/mg de extracto de romero Figura 31.

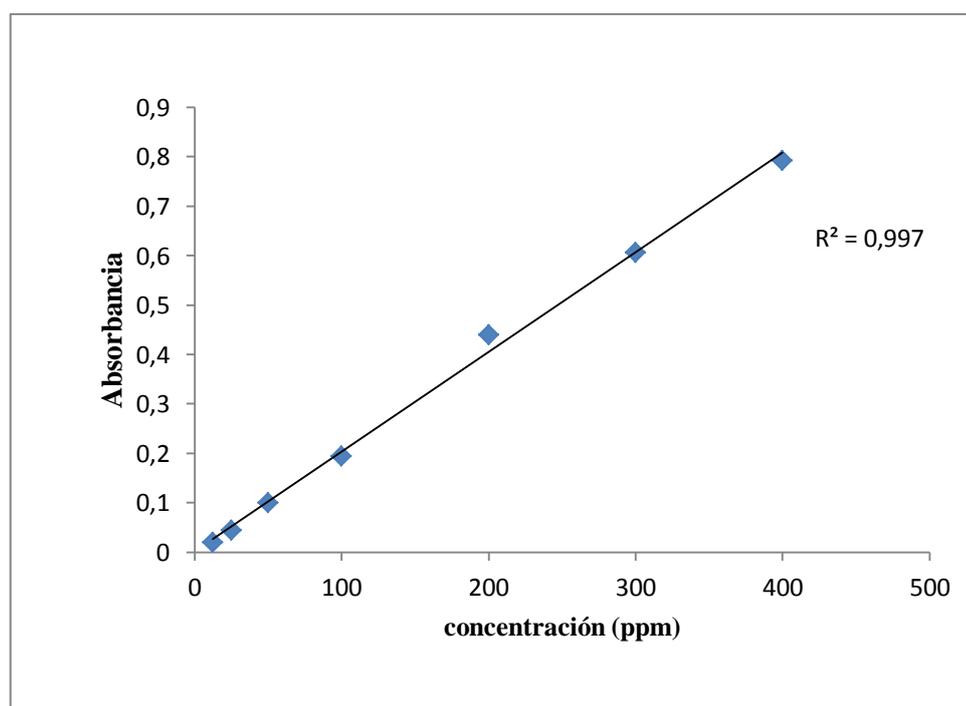


Figura 31. Curva de calibración de ácido gálico

Los resultados correspondientes al contenido fenólico total de las muestras (**T**) se expresaron como ppm equivalentes de ácido gálico por mg de muestra [Gallic Acid Equivalent (GAE)], extrapolando las concentraciones de los diferentes extractos a partir de la recta de regresión absorbancia/concentración del ácido gálico (Tabla 13).

$$T = (C \times V \times DF) / m$$

dónde:

C = Concentración de cada extracto obtenida de la recta de regresión

V = Volumen inicial en que se disuelve el extracto

DF = Factor de dilución

m = Peso del extracto.

Muestra	$\mu\text{g}(\text{ácido gálico/gm extracto metanólico})$
1	183,56 \pm 0,57
2	281,15 \pm 0,90
3	335,02 \pm 0,13
4	193,02 \pm 0,33
5	201,34 \pm 0,91
6	165,54 \pm 1,01
7	210,38 \pm 0,68
8	301,85 \pm 1,36
9	127,32 \pm 0,39
10	200,65 \pm 0,68
11	308,65 \pm 1,36
12	179,35 \pm 1,05
13	188,01 \pm 0,68
14	165,75 \pm 0,52
media	217,25 \pm 62,92

Tabla 13. Concentración de fenoles totales (μg de ácido gálico/mg extracto de romero) de los extractos metanólicos de *R. officinalis* L.. Los resultados se expresan como media \pm DS de tres experimentos independientes (n= 3)

4.3.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA

4.3.2.1. Actividad antioxidante in vitro (ORAC)

En la Tabla 14 se muestran los resultados de la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de las muestras en estudio, cuantificado mediante el ensayo ORAC. Todas las muestras presentan una elevada capacidad antioxidante siendo la muestra 14 la que presenta mayor actividad (3,51 μmol de equivalentes Trolox / mg de muestra), seguida de la muestra 9 con un valor de 3,25 (μmol de equivalentes Trolox / mg de muestra).

Muestra	Localidad	Valor ORAC(μmol Trolox/mg) \pm DS
1	Toledo	3,06 \pm 0,15
2	Toledo	2,81 \pm 0,12
3	Toledo	3,11 \pm 0,11
4	Murcia	3,21 \pm 0,09
5	Murcia	2,85 \pm 0,08
6	Albacete	2,93 \pm 0,09
7	Valencia	2,95 \pm 0,15
8	Guadalajara	3,12 \pm 0,13
9	Cuenca	3,25 \pm 0,09
10	Guadalajara	2,94 \pm 0,14
11	Zaragoza	2,86 \pm 0,08
12	Tarragona	2,45 \pm 0,05
13	Tarragona	3,01 \pm 0,02
14	Madrid	3,51 \pm 0,12
Media		3,00 \pm 0,23

Tabla 14. Capacidad antioxidante (valor ORAC) de las 14 muestras de extracto metanólico del *R. officinalis* L.; Los resultados se expresan como media \pm DS de tres experimentos independientes (n= 3).

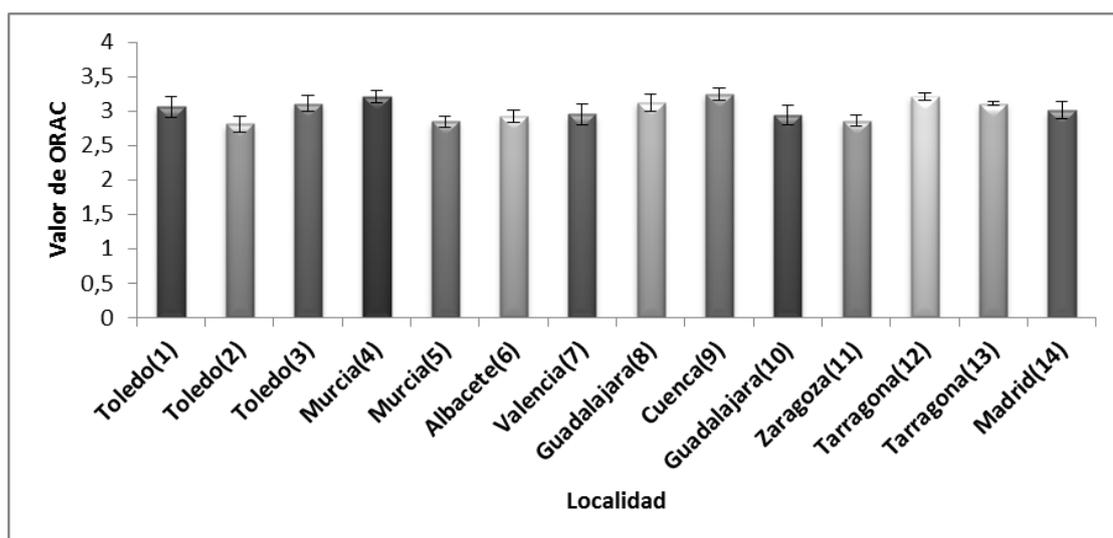


Figura 32. Capacidad antioxidante (valor ORAC) de las 14 muestras del extracto metanólico del *Rosmarinus officinalis* L.; Los resultados se expresan como media \pm DS de tres experimentos independientes (n= 3).

4.3.2.1. Determinación del Radical DPPH

En esta prueba se determina el IC₅₀, es decir, la concentración necesario para decolorar en un 50% la concentración inicial de DPPH, con el fin de tener un parámetro de referencia entre los extractos. En esta prueba hay una concentración constante de DPPH por lo cual aunque se incremente la concentración del extracto habrá un límite de decoloración.

El extracto metanólico de *R. officinalis* L. presenta una actividad captadora del radical DDPH que varía entre las distintas muestras, oscilando entre valores máximos de 13,25 para la muestra de Guadalajara y mínimos de 4,02 para la muestra número 1 de Toledo. En cualquier caso, los valores obtenidos indican una elevada capacidad captadora de RL.

Muestra	Localidad	CI50(mg extracto metanólico/ml)±DS
1	Toledo	4,02 ± 0,91
2	Toledo	7,22 ± 0,56
3	Toledo	7,29 ± 0,85
4	Murcia	12,54 ± 0,94
5	Murcia	4,56 ± 0,54
6	Albacete	10,67 ± 0,84
7	Valencia	6,69 ± 0,35
8	Guadalajara	13,25 ± 0,98
9	Cuenca	6,08 ± 0,35
10	Guadalajara	10,68 ± 0,99
11	Zaragoza	6,54 ± 0,35
12	Tarragona	5,86 ± 0,37
13	Tarragona	8,54 ± 0,48
14	Madrid	5,90 ± 0,25
Media		7,84 ± 2,87

Tabla 15. Concentración inhibitoria 50 (mg extracto metanólico/ml) de DPPH. Los resultados se expresan como media ± DS de tres experimentos independientes (n= 3)

Los resultados previos obtenidos en los ensayos *in vitro* de las diferentes muestras del extracto metanólico indican la falta de diferencias estadísticamente significativas entre las mismas, por lo que los estudios de la actividad biológica en cultivos celulares se llevan a cabo únicamente con la muestra de Comunidad de Madrid como representante de todas las muestras de *R. officinalis* recolectadas para este estudio.

4.3.3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

4.3.3.1. Viabilidad celular

En el primer lugar se estudia si el extracto metanólico del *R. officinalis* L. ejerce un efecto citotóxico en la línea celular U373-MG, in vitro mediante el ensayo de MTT.

Las células U373 se tratan e incuban con el extracto objeto de estudio en un amplio rango de concentraciones (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400; 500; 600; 700 y 800 µg/ml) durante 24 horas a 37°C. A continuación, se incuban con MTT durante 1 hora en oscuridad a 37°C para medir así la actividad mitocondrial. Como control positivo se utilizan células sin tratar y como control negativo se usa Tritón X-100, que produce una elevada mortalidad celular.

Como se puede observar en la Figura 33, las concentraciones ensayadas entre 6,25 y 600 µg/ml no son citotóxicas (viabilidad superior al 80%), mientras que a la concentración más elevada (700 y 800 µg/ml), disminuyen el porcentaje de viabilidad celular en comparación con las células control (100% de viabilidad). El Tritón X-100 induce una disminución significativa de la viabilidad celular (31,1%).

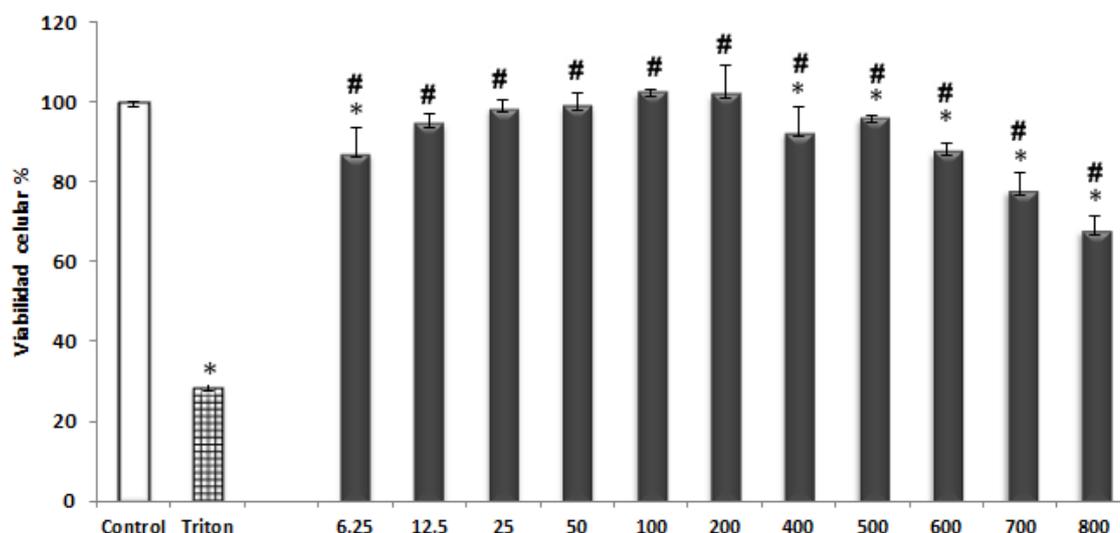


Figura 33. Evaluación *in vitro* de los efectos de los extractos metanólicos de *R. officinalis* L. sobre la viabilidad celular. Las células se incuban con distintas concentraciones (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400; 500; 600; 700 y 800 µg/ml) durante 24 horas. El porcentaje de células viables se determina mediante la técnica de MTT. Como control positivo se utilizan células sin tratar y como control negativo células tratadas con Tritón X-100. Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad celular, considerándose el 100% los valores obtenidos para las células no tratadas. Los datos se expresan como porcentaje de viabilidad de la media \pm DS (n=3). *p<0,05 vs control, #p<0,05 vs Tritón

4.3.3.2. Evaluación del daño celular

Con el fin de comprobar el posible efecto protector de *R. officinalis* L. en un modelo de estrés oxidativo, las células U373- MG se incuban durante 24 horas con las concentraciones seleccionadas a partir del ensayo de viabilidad (12,5-600 µg/ml). Posteriormente, las células se tratan durante 30 minutos con H₂O₂, 1mM.

El peróxido de hidrógeno causa una disminución significativa de la viabilidad celular (61,95%). El pretratamiento con varias concentraciones del extracto metanólico del *R. officinalis* L. protege a las células del daño oxidativo provocado por peróxido de hidrógeno, tal y como se refleja en el porcentaje de viabilidad celular. Las concentraciones de 12,5; 25, 50 y 100 µg/ml ejercen un efecto estadísticamente significativo comparado con el tóxico (Figura 34).

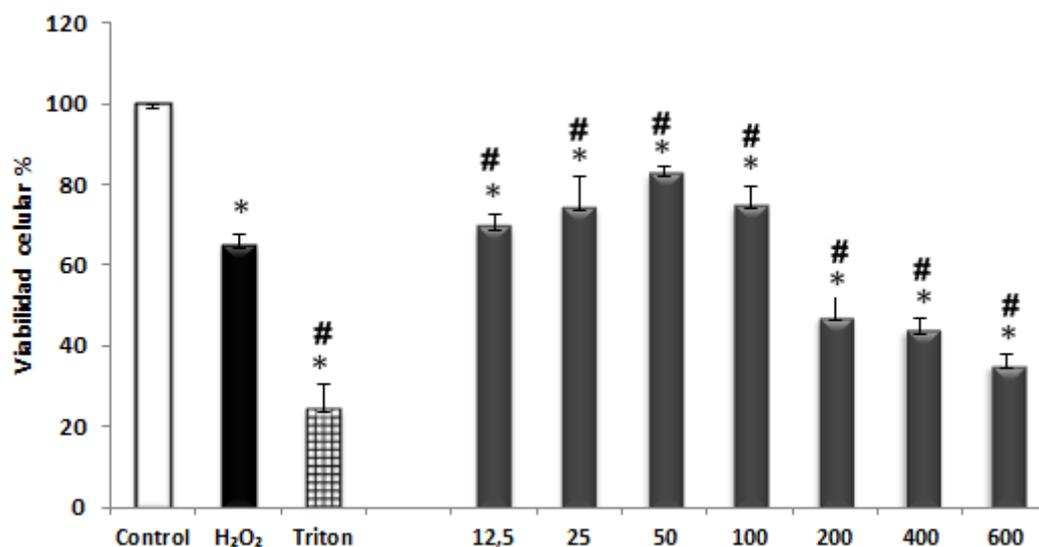


Figura 34. Efecto protector frente a la toxicidad inducida por H₂O₂. Las células U373-MG se incuban con los extractos metanólicos de *R.officinalis* durante 24 horas y se incuban con H₂O₂ (1 mM) durante 30 minutos. 100% corresponde a la viabilidad de las células sin tratar (control). Los resultados se expresan como media \pm DS de tres experimentos independientes (n=3). Control negativo: Tritón. * $p < 0,05$ vs control. # $p < 0,05$ vs H₂O₂

4.3.3.3. Estudio de la morfología celular

Como se puede observar, las células control presentan una morfología redondeada y se encuentran agrupadas (Figura 35 a). Cuando se tratan con H₂O₂ (1 mM) durante 30 minutos, las células presentan cambios en su morfología, adquiriendo formas menos circulares, de menor tamaño, así como una disminución en su agrupación y en número (Fig. 35 b). La preincubación de las células U373-MG con los extractos metanólicos en las concentraciones elegidas para los estudios, previo a la exposición con H₂O₂ evita la aparición de estos cambios (Fig. 35 c, d)).

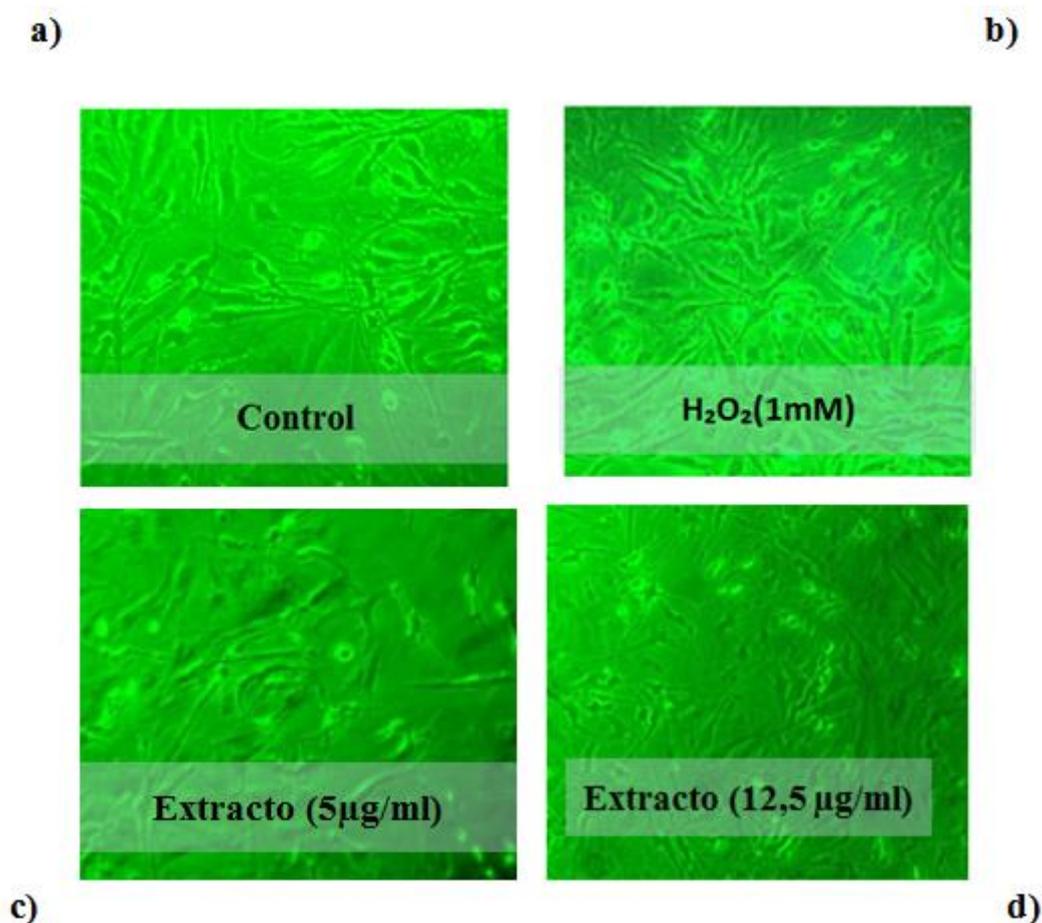


Figura 35. Efecto sobre la morfología celular de los diferentes tratamientos: a) grupo control; b) H₂O₂ 1mM, c) extracto metanólico 5µg/ml, d) extracto metanólico 12,5µg/ml. Las imágenes corresponden a fotografías representativas de cada uno de los tratamientos, utilizando una cámara Moticam acoplada a un microscopio de contraste de fase.

4.3.3.4 Determinación de la actividad antiradicalaria

En la Figura 36 se recogen los resultados del tratamiento de las células con H₂O₂ (1 mM). Tal como se observa, los niveles intracelulares de ROS se ven aumentados de manera significativa en comparación con las células control, lo que confirma que el H₂O₂ en las condiciones experimentales establecidas es un inductor de estrés oxidativo. Trascorridas 2 h del comienzo del ensayo, la concentración de ROS intracelulares es un 34% mayor en las células tratadas sólo con H₂O₂ en relación con las células control. Los niveles del ROS en las células tratadas con extracto metanólico son inferiores al grupo control, lo cual indica que nos son capaces de generar RL per se.

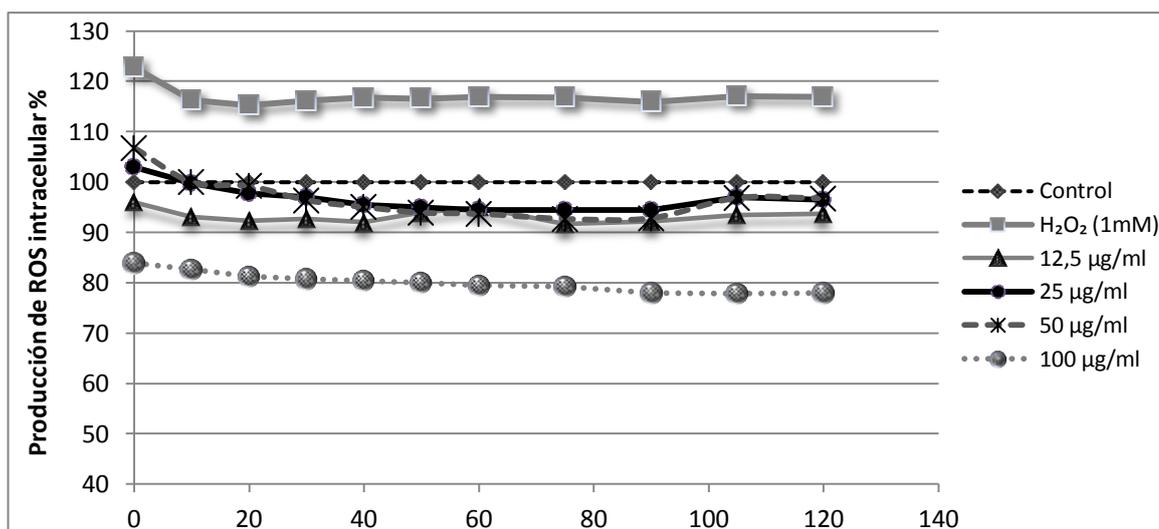


Figura 36.-Efecto directo de los extractos metanólicos del *R. officinalis* L. sobre la liberación de EROs intracelular. Las células U373-MG se incuban con DCFH-DA durante 30 minutos, en oscuridad a 37°C y 5% de CO₂. A continuación, se tratan con diferentes concentraciones del extracto metanólico (12,5-100 µg/ml) se comparan con las células únicamente tratadas con H₂O₂ (1 mM). Los resultados se expresan como % de producción de EROs intracelulares respecto al control. Los datos se expresan como media ± D S(n=3).

Con el fin de evaluar el posible efecto protector del extracto de romero, las células se tratan con las diferentes concentraciones (12,5- 100µg/ml) previo a la adición del tóxico. Las concentraciones ensayadas son capaces de disminuir la formación intracelular de ROS (Figura 37).

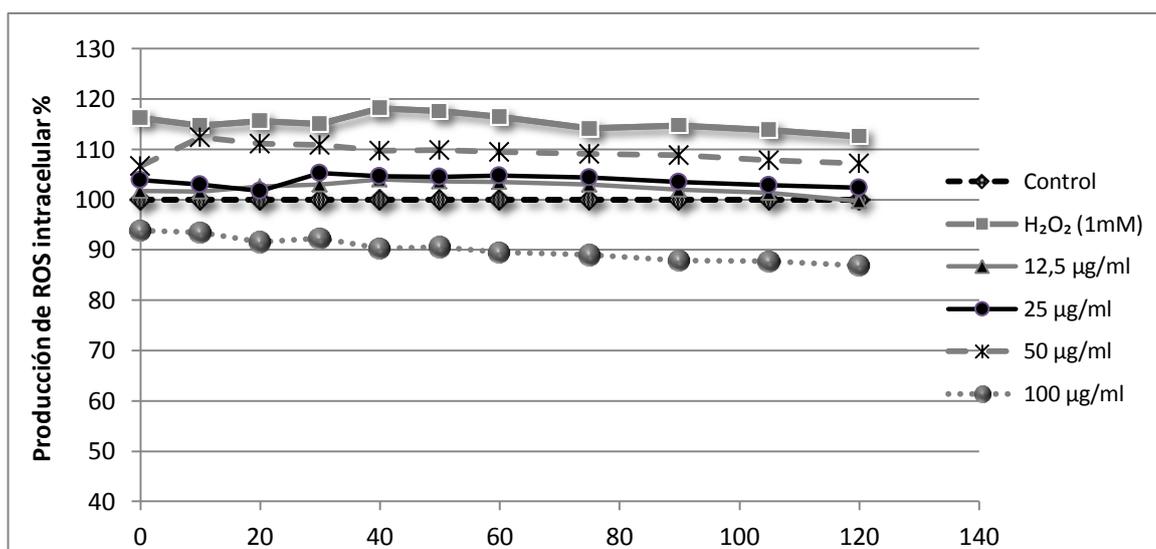


Figura 37. Efecto protector del extractos metanólico de *R. officinalis* L. sobre la producción de EROS por el peróxido de hidrógeno. Las células se incuban con DCFH-DA durante 30 minutos, en oscuridad a 37°C y 5% de CO₂. A continuación, se tratan con concentraciones del extracto metanólico (12,5-100 µg/ml) y con H₂O₂ (1Mm), Los resultados se expresan como % de producción de ROS intracelulares respecto al control. Los datos se expresan como media ± DS (n=3).

4.3.4.5. Determinación de los niveles de glutatión

Para medir los niveles de GSH, GSSG y el efecto de los extractos metanólicos de *R. officinalis* L. sobre los niveles de glutatión, las células de U373-MG son pretratadas durante 24 horas con las distintas concentraciones (12,5, 25, 50 y 100 µg/ml) e incubadas durante 30 minutos con H₂O₂, (1 mM). El efecto del extracto sobre la cantidad de glutatión se determina mediante fluorescencia utilizando OPT como marcador de fluorescencia. como se en la figura 37. Al incubar las células con H₂O₂, (1mM, 30 min), los niveles de GSH disminuyen, en respecto al control, mientras que los niveles de la especie oxidada (GSSG) aumentan. Cuando las células se incuban con los extractos de estudio los niveles del GSSG se aumenta en una manera no significativa en comparación con el grupo control.

En la Figura 38 se muestran los valores de GSH y GSSG por mg de proteína en las células sin tratar (Control), tratadas con tóxico (H_2O_2 , 1mM), tratadas con trolox (0,5 mM) y tratadas con el extracto metanólico (12,5; 25; 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

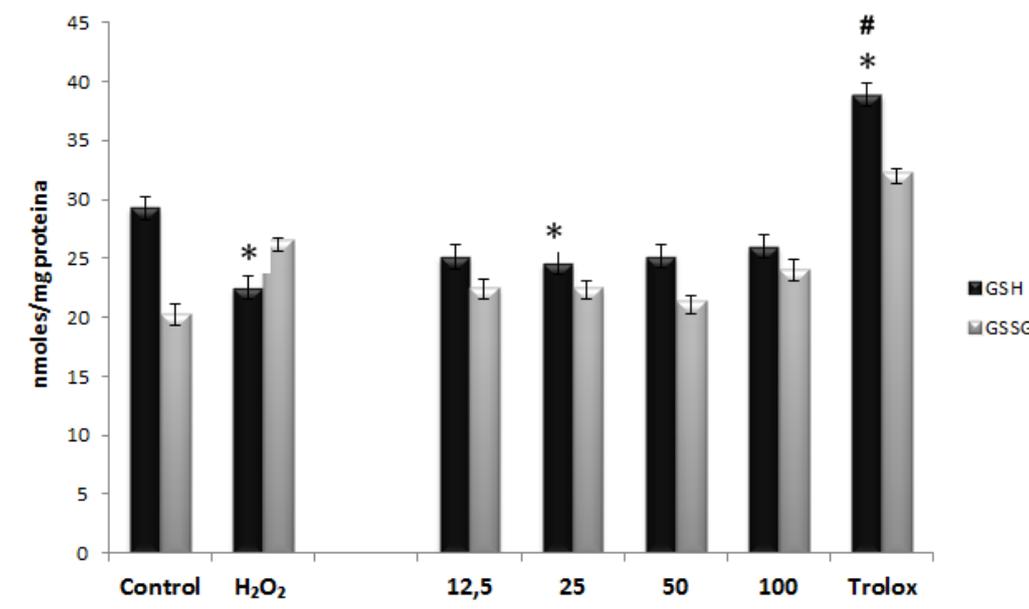


Figura 38. Efecto de extracto metanólico del *R. officinalis* L. sobre la actividad de GSH, GSSG (nmol/mg proteínas). Las células U373-MG se someten a pretratamiento tratan con el extracto metanólico del *R. officinalis* L. (12,5; 25; 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 24 horas y, a continuación, se incuban durante 30 minutos con H_2O_2 (1mM). Los resultados se representan como media \pm DS (n =3) *p< 0,05 vs Control; #p< 0,05 vs H_2O_2

Con el fin de determinar el efecto del extracto metanólico de *R. officinalis* L. sobre los niveles de glutatión, se analiza el índice redox(Tabla 16).

Como se puede observar, se produce un aumento en el IR en las células únicamente incubadas con el tóxico, con respecto a las células control (0,54 frente a 0,41). Sin embargo, cuando las células se incuban con el extracto metanólico en estudio, el IR se reduce para todas las concentraciones ensayadas.

Compuesto	IR=GSSG/(GSSG+GSH)
Control	0,41 ± 0,43
H₂O₂ (1mM)	0,54 ± 0,70
12,5 µg/ml+1mM H ₂ O ₂	0,47 ± 0.04
25 µg/ml+1mM H ₂ O ₂	0,48 ± 0.03
50 µg/ml+1mM H ₂ O ₂	0,46 ± 0.02
100 µg/ml+1mM H ₂ O ₂	0,48 ± 0.03
0,5 mM Trolox	0,45 ±0.08

Tabla 16. Efecto del extracto metanólico de *R. officinalis* L. sobre los niveles de glutatión y la relación entre GSSG y GSH.; Las células U373-MG son pretratadas durante 24 horas con las muestras de extracto metanólico (12,5; 25; 50 y 100 µg/ml) e incubadas durante 30 minutos con H₂O₂ (1 mM). El efecto del extracto sobre la cantidad de glutatión se determina mediante fluorescencia utilizando OPT como marcador de fluorescencia. Los datos se expresan como media ± DS (n=3).

4.3.4.6. Determinación de la actividad caspasa-3

Se determina la muerte celular producida por estrés oxidativo, analizando la actividad de la principal enzima efectora de apoptosis, caspasa-3, cuyo sustrato es Ac-DEVD-AMC.

Cuando las células se someten a daño oxidativo inducido por H₂O₂ 500 µM durante 30 minutos, se produce una elevación no significativa de la actividad de caspasa-3 respecto al grupo control. El tratamiento previo con el extracto metanólico de *R. officinalis* L. durante 24 h, reduce ligeramente la actividad caspasa-3 con respecto al tóxico de forma estadísticamente no significativa. El tratamiento de las células con el extracto metanólico en las concentraciones de estudio no activa las caspasa-3, lo que indica que no ejerce actividad apoptótica a nivel celular (Figura 39).

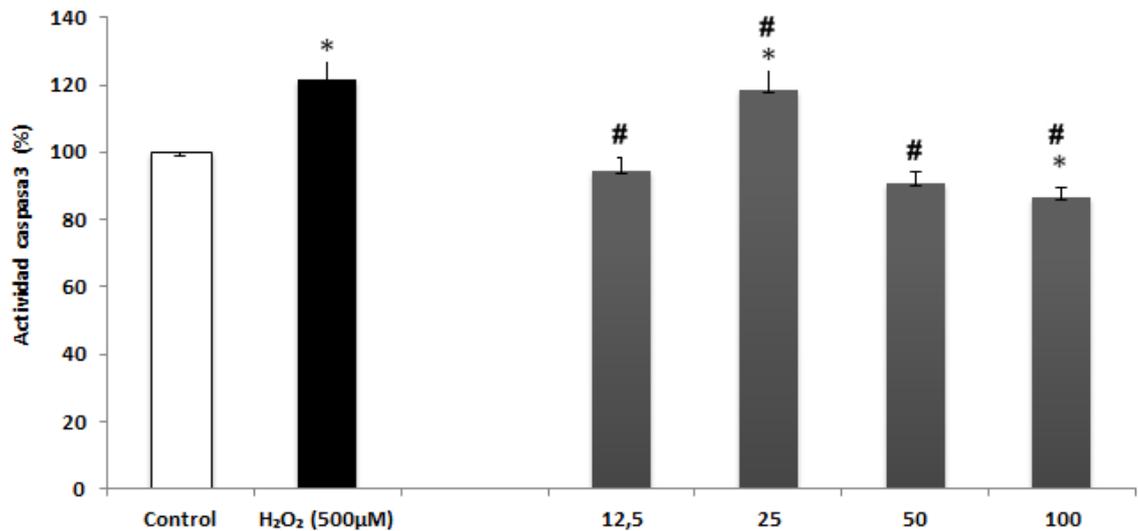


Figura 39. Efecto del extracto metanólico de *R. officinalis* L. sobre la actividad caspasa-3. Las células U373-MG se tratan con las concentraciones (12,5; 25, 50 y 100 µg/ml) durante 24 horas y se incuban con H₂O₂ (500 µM) durante 30 minutos. La actividad caspasa-3 se determina en extractos celulares totales mediante medida en un fluorímetro, utilizando el sustrato específico Ac-DEVD-AMC. Los resultados se representan como % respecto al control (100%, células sin tratar). Los resultados se expresan como media ± DS (n= 3). * $p < 0,05$ vs control y # $p < 0,05$ vs H₂O₂

4.3.4.7. Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica es uno de los principales mecanismos de daño celular producido por EROs. Para valorar el grado de degradación oxidativa de los lípidos, se han cuantificado los niveles del producto secundario MDA por HPLC.

En la Figura 39 se presentan las concentraciones de MDA liberadas al medio de cultivo por las células U373-MG sin tratar. Como se puede observar, la concentración de MDA en las células U373-MG expuestas a H₂O₂ (1 mM, 30 min) es significativamente superior a la de las células control (26,43 frente a 39,5nmoles/mg proteína, respectivamente). El tratamiento directo con el extracto de romero (12,5; 25; 50 y 100 µg/ml) produce un ligero aumento en los valores de MDA en comparación con las células control.

Sin embargo, el pretratamiento con estas concentraciones en las condiciones de estrés oxidativo inducido por H₂O₂ dan lugar a la inhibición de la formación de MDA como subproducto de la peroxidación lipídica, siendo significativa para 12,5µg/ml y 25 (µg/ml) (Figura 40).

En la Figura 41 se muestran los cromatogramas por HPLC correspondientes a la determinación de los niveles de MDA en las células tratadas con 12,5; 25 y 100µg/ml de extracto.

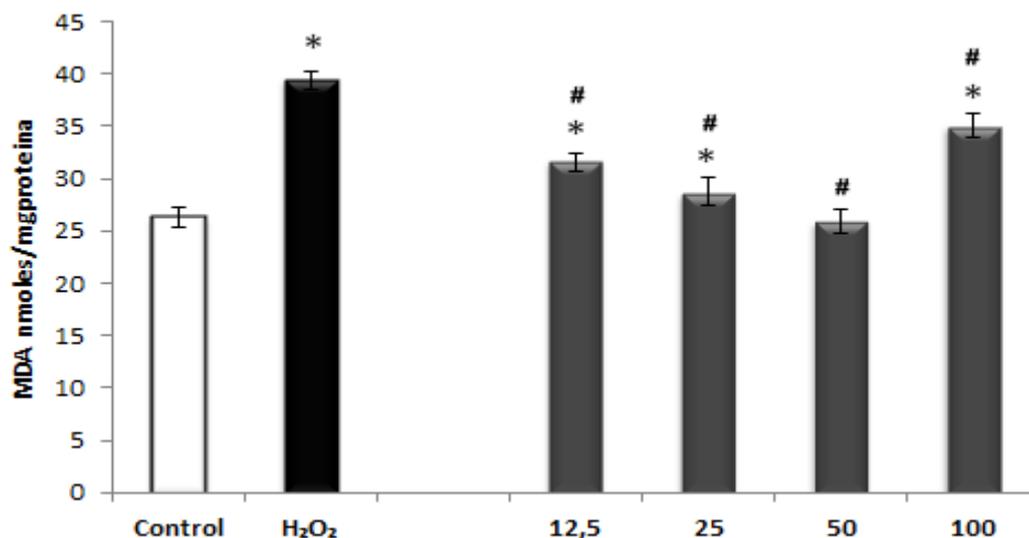


Figura 40. Efecto del extracto metanólico del *R. officinalis* L. sobre la peroxidación lipídica. Las células U373-MG se tratan con las concentraciones en estudio (12,5; 25; 50 y 100 µg/ml) durante 24 horas. Los resultados se expresan como nmol/mg proteína, media \pm DS (n=3). *p<0,05 vs control y #p<0,05 vs H₂O₂.

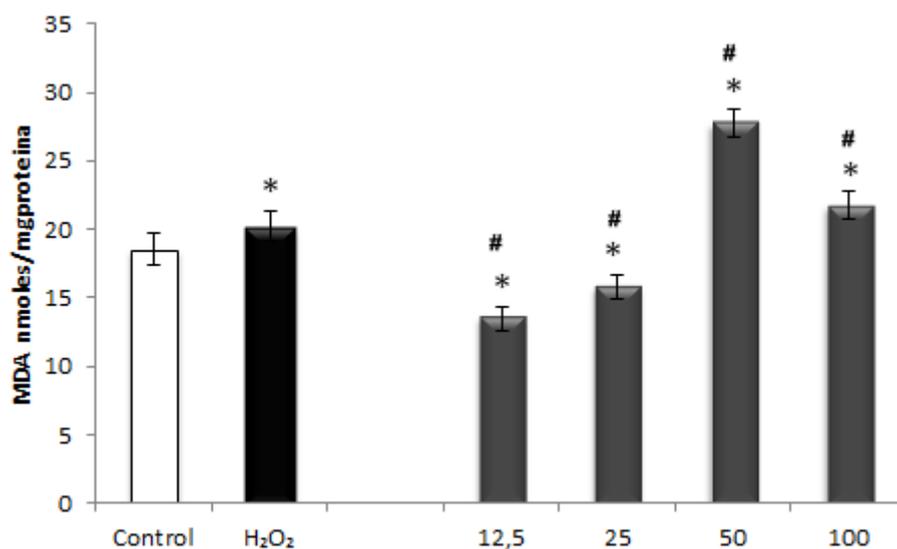
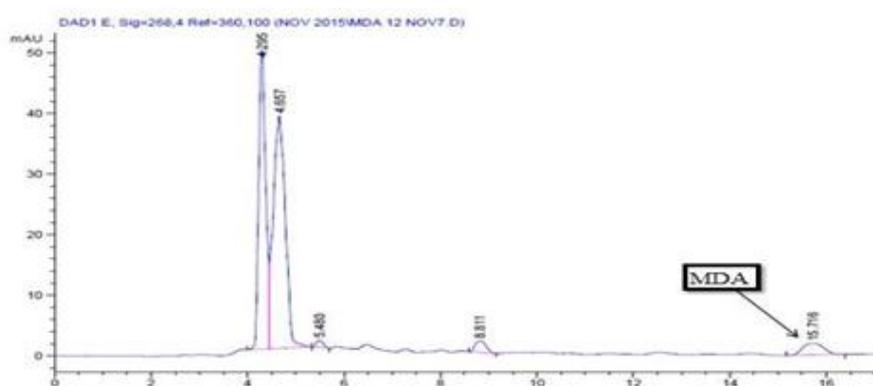
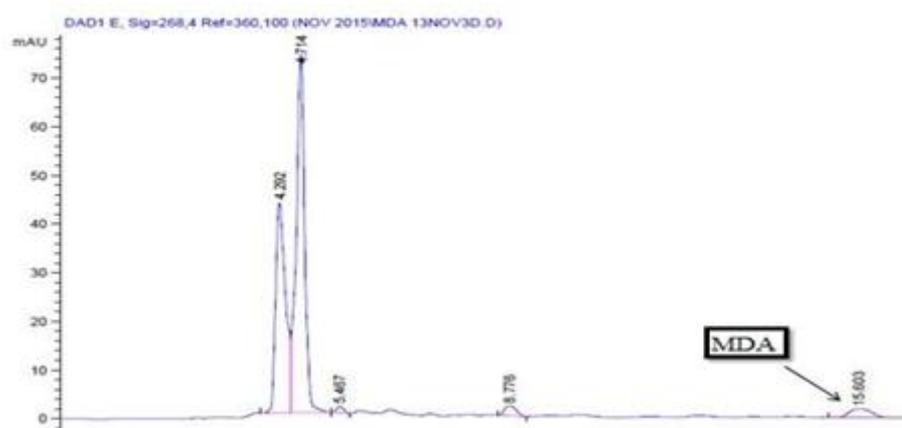


Figura 41. Efecto del extracto metanólico del *R. officinalis* L. sobre la peroxidación lipídica. Las células U373-MG se tratan con las concentraciones (12,5; 25; 50 y 100 µg/ml) durante 24 horas y se incuban con H₂O₂ (1 mM) durante 30 minutos. Los resultados se expresan como nmol/mg proteína, media \pm SD (n=3). *p<0,05 vs control y #p<0,05 vs H₂O₂

A)



B)



C)

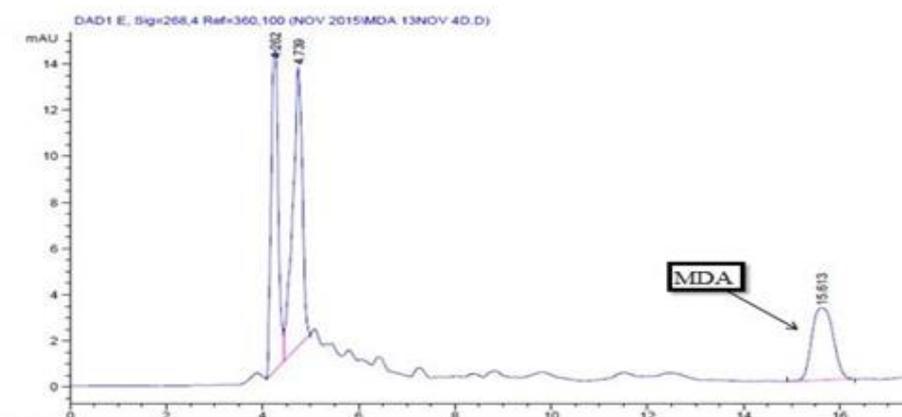


Figura 42. Cromatogramas correspondientes al análisis de las células tratadas con el extracto metanólico A) 12,5 μ g/ml); B) 25 μ g/ml); C) 100 μ g/ml, en presencia de H₂O₂

4.3.4.8. Determinación de la actividad del enzima catalasa (CAT)

Por el ultimo se determina si *R. officinalis* puede influir en el sistema antioxidante enzimático celular. Para ello, se evalúa el efecto de las muestras del extracto metanólico a las concentraciones seleccionadas (12,5; 25; 50 y 100 µg/ml) sobre uno de los principales enzimas antioxidantes, la CAT. Las células U373-MG se pretratan durante 24 horas con las concentraciones del extracto metanólico del *R. officinalis* L. y se induce un estado de estrés oxidativo por H₂O₂ (1 mM) durante 30 minutos. La determinación de los niveles de CAT se evalúa analizando los extractos celulares totales.

En la Figura 43 se observa la actividad enzimática en presencia del tóxico. Cuando los astrocitos fueron sometidos a daño oxidativo, ninguna de las concentraciones de los compuestos en estudio, así como el toxico consiguieron revertir la actividad enzimática, en comparación con las células sin tratar (control) No se observaron diferencias significativas respecto a las células tratadas únicamente con el toxico (H₂O₂).

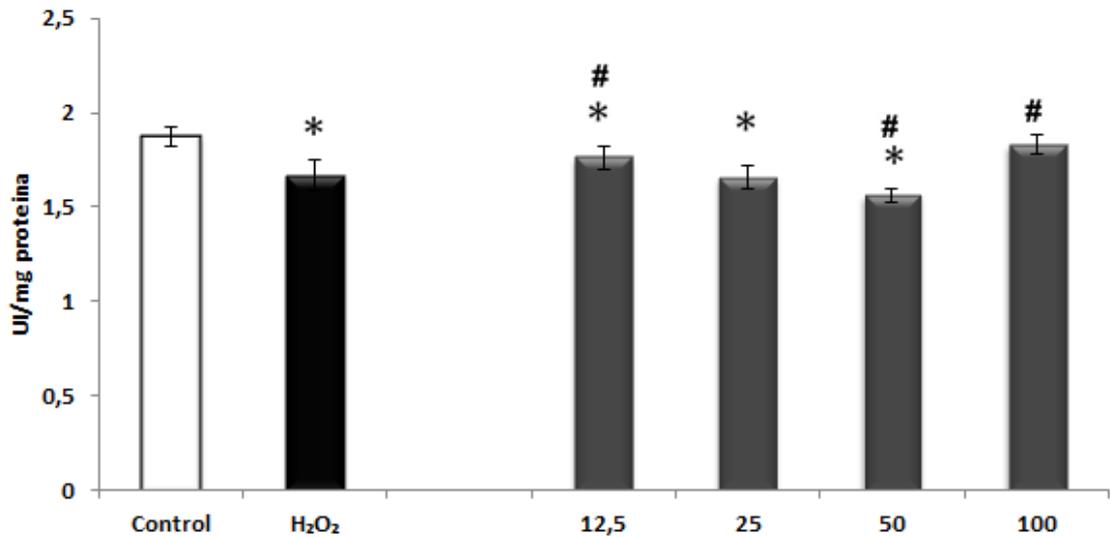


Figura 43. Efecto del extracto metanólico del *R. officinalis* L. en la actividad y expresión enzimática de CAT. Las células U373-MG se tratan con las concentraciones (12,5; 25; 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$) durante 24 horas y posteriormente se induce un estado de estrés oxidativo con H_2O_2 (1 mM) durante 30 minutos, se mide la actividad enzimática de CAT mediante espectrofotometría en extractos celulares totales. Los resultados se expresan como UI/mg proteína \pm DS (n=3). * $p < 0,05$ vs control y # $p < 0,05$ vs H_2O_2

5. DISCUSIÓN

Las plantas medicinales han jugado un papel importante a lo largo de la historia en el descubrimiento de nuevos fármacos y mecanismos de acción innovadores. Entre los diferentes mecanismos de acción estudiados, la actividad antioxidante es uno de los más seguidos en la actualidad debido a la importancia del estrés oxidativo y los efectos perjudiciales de las especies reactivas de oxígeno en diversas patologías. Por ello, una de las principales vías de investigación es la búsqueda de moléculas capaces de prevenir o reducir la magnitud de estos mediadores de oxidación mediante interacción con diferentes dianas bioquímicas o farmacológicas.

El romero (*Rosmarinus officinalis* L.) es una planta aromática que crece de forma espontánea en toda la zona mediterránea. Las partes aéreas y el aceite esencial de romero se han utilizado en medicina tradicional desde la antigüedad para el tratamiento de diferentes afecciones (astenia, debilidad crónica, como carminativo, etc). La hoja de romero es rica en compuestos polifenólicos con actividad antioxidante (Abuashwashi *et al.*, 2014; Collins *et al.*, 1987), mientras que su aceite esencial presenta una composición compleja y variable en función de su origen geográfico, estado fenológico y momento de la recolección (Angioni *et al.*, 2004; Porte *et al.*, 2000; Palomino *et al.*, 2010; Varela *et al.*, 2009). De acuerdo con la estructura del esqueleto carbonado de los principales componentes del aceite esencial, se pueden encontrar tres tipos biogénicos: tipo eucaliptol (Italia, Marruecos y Túnez), tipo alcanfor-borneol (España) y tipo α -pineno-verbenona (Francia, Córcega) (ESCOP, 1997).

En este contexto, se aborda el análisis fitoquímico de muestras de *R. officinalis* recolectadas en el mismo estado fenológico (floración) en distintas localizaciones del área central de la península Ibérica, con el fin de estudiar la composición química de su aceite esencial por CG y su composición en compuestos fenólicos (flavonoides y ácidos fenólicos) por HPLC, así como evaluar su actividad en una línea celular de astrocitoma humano con el objetivo de determinar su actividad neuroprotectora a través de su acción antioxidante directa y/o moduladora de la respuesta celular.

El efecto protector frente al estrés oxidativo producido por H₂O₂ en un modelo *in vitro* se ha evaluado en cultivos de células nerviosas (U373-MG). Dicha línea celular, procedente de glioblastoma de astrocito humano, constituye una diana farmacológica para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas debido a su papel funcional y protector en el sistema nervioso

Los ensayos de neuroprotección realizados incluyen el estudio del efecto sobre la viabilidad y morfología celular (efecto directo y protector), protección frente al estrés oxidativo, valoración de marcadores de estrés oxidativo (MDA y GSH/GSSG) y actividad del enzima antioxidante CAT y del principal enzima efector de apoptosis, caspasa 3.

Dicho estudio se ha realizado utilizando, por un lado, el aceite esencial obtenido por destilación y, por otro lado, el extracto metanólico de las mismas muestras.

ACEITE ESENCIAL DE *R. OFFICINALIS*

Estudio fitoquímico

A partir de las partes aéreas secas y groseramente troceadas, sometidas a hidrodestilación en un aparato Clevenger durante 2h a presión atmosférica (dos repeticiones), se obtiene el aceite esencial cuyo rendimiento se evalúa por gravimetría. El rendimiento obtenido para las 14 muestras recolectadas es variable, oscilando entre 1,2 y 3,4%. La muestra recolectada en la comunidad de Madrid presenta un valor intermedio, del 2,3%. Dichas variaciones pueden responder a los cambios en las condiciones climáticas y geográficas de los distintos municipios, y coinciden con los datos publicados previamente por otros autores (Angioni *et al.*, 2004; Palomino *et al.*, 2010).

La composición del aceite esencial se analiza por Cromatografía de Gases (CG), con el fin de identificar y cuantificar en un único análisis los principales componentes: α -pineno, canfeno, β -pineno, mirceno, limoneno, 1-8 cineol, γ -terpineno, p-cimeno, acetato de bornilo, alcanfor, borneol, α -terpineol y verbenona.

El estudio analítico permite detectar diferencias en la composición de las muestras analizadas, con mayor abundancia de monoterpenos oxigenados (28% a 77%) y menor proporción de hidrocarburos monoterpénicos (7% a 51%). En todas las muestras se han identificado α -pineno, p-cimeno, 1,8-cineol, alcanfor, borneol, verbenona y α -terpineol, siendo los componentes más abundantes: 1,8-cineol, alcanfor y α -pineno (Tabla 6), composición que coincide con el romero tipo alcanfor-borneol, predominante en la Península Ibérica y que concuerda con el perfil recogido en la Norma Internacional ISO 1342 (2000).

Actividad farmacológica

Capacidad antioxidante

Una vez realizado el estudio y determinados los distintos componentes del aceite esencial para las catorce muestras recolectadas, se aborda al estudio preliminar de su capacidad antioxidante *in vitro*, valorando su capacidad de absorción del radical oxígeno (método ORAC). Los resultados indican una actividad significativa para todas las muestras ensayadas, con un valor medio de $1,19 \pm 0,15$ μ mol Trolox/mg aceite esencial, tomando como referencia el Trolox, análogo hidrosoluble de la vitamina E.

El estudio de su actividad captadora de radicales libres derivados de DPPH confirma los resultados obtenidos anteriormente, con un valor medio de IC₅₀ superior a 650 mg/ml.

Aunque en este estudio no se han ensayado los componentes del aceite esencial aislados, algunos autores han identificado algunos monoterpenos como potentes captadores de radicales libres, entre ellos 1,8-cineol y α -pineno (Ciftci *et al.*, 2011; Porres *et al.*, 2010). Como en muchos otros ejemplos procedentes del reino vegetal, la capacidad antioxidante de los monoterpenos aislados es inferior a la obtenida con el aceite esencial y por ello, en el caso del aceite esencial de romero estudiado, la capacidad antioxidante y antirradicalaria observada se puede atribuir a un efecto sinérgico de sus diferentes componentes, siendo de destacar la

aportación de 1,8-cineol y α -pineno, presentes y mayoritarios en todas las muestras estudiadas.

Actividad protectora sobre línea celular U373-MG

Los estudios de neuroprotección se llevan a cabo sobre cultivo celulares con el fin de elucidar los posibles mecanismos que permitan explicar el efecto antioxidante previamente observado. El peróxido de hidrógeno se utiliza como agente inductor de daño oxidativo.

Los resultados de los estudios de actividad antioxidante y captadora de radicales libres (ORAC y DPPH) para de las diferentes muestras de aceite esencial indican la falta de diferencias estadísticamente significativas entre las mismas, por lo que los estudios de actividad biológica en cultivos celulares se llevan a cabo únicamente con la muestra procedente de la Comunidad de Madrid como representante de todas las muestras de *R. officinalis* recolectadas para este estudio.

Previo al estudio de la capacidad protectora se determina el efecto directo del tratamiento con el aceite esencial sobre la viabilidad celular mediante el método de reducción del MTT. Este estudio permite establecer las concentraciones no tóxicas que se aplicarán en los siguientes ensayos.

Para ello se realizan varios experimentos hasta determinar las condiciones óptimas de crecimiento celular, tratándose las células con concentraciones crecientes de aceite esencial, entre 0,5 y 250 $\mu\text{g/ml}$ durante 24h. el control positivo lo constituyen las células no tratadas y como control negativo, Tritón X-100.

El tratamiento con el aceite esencial de romero no es citotóxico para las concentraciones comprendidas entre 0,5 y 12,5 $\mu\text{g/ml}$; las concentraciones más elevadas disminuyen significativamente la viabilidad celular.

A continuación se estudia el efecto protector de las mismas concentraciones de aceite esencial frente a un modelo de estrés oxidativo inducido por H_2O_2 1mM. La incubación previa de las células con las diferentes concentraciones de aceite

esencial de romero (0,5 a 250 $\mu\text{g/ml}$) consigue revertir parcialmente el daño provocado con el agente oxidante, hasta valores próximos a los obtenidos para las células control. Las concentraciones más eficaces se encuentran entre 0,5 y 12,5 $\mu\text{g/ml}$. Así mismo, se observa que el tratamiento con el aceite esencial es capaz de preservar la morfología celular normal frente al tratamiento con el tóxico.

A partir de estos resultados se seleccionan las concentraciones más adecuadas para continuar el estudio: 1 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ y 12,5 $\mu\text{g/ml}$.

En primer lugar se evalúa si alguna de las concentraciones es capaz de inducir la formación de radicales libres en la línea celular U373-MG, mediante el ensayo de la diclorofluoresceína (DCFH-DA). El efecto del aceite esencial se compara con las células no tratadas (grupo control) y con el efecto producido por el peróxido de hidrógeno. Este último es capaz de generar una cantidad superior de radicales libres, de forma estadísticamente significativa, con respecto a cualquiera de las concentraciones de aceite esencial ensayadas. A las dos horas del ensayo, la concentración de EROs en las células tratadas con peróxido de hidrógeno es un 34% superior al grupo control. El tratamiento con el aceite esencial solo no provoca incremento en la producción de EROs.

Sin embargo, el tratamiento de las células con el aceite esencial previo a la exposición con peróxido de hidrógeno ejerce un efecto protector que se puede cuantificar como una reducción significativa en la formación de EROs.

La determinación de los niveles de glutatión reducido permite detectar uno de los principales marcadores de estrés oxidativo a nivel celular, particularmente en los astrocitos, donde su eficacia es marcada. El efecto del aceite esencial de romero sobre el sistema de GSH y GSH/GSSG se determina por fluorescencia con OPT como marcador de fluorescencia. El tratamiento de las células con peróxido de hidrógeno provoca una elevación de los niveles de glutatión oxidado, con aumento del índice redox. Esto implica una disminución de la capacidad de respuesta antioxidante celular.

El pretratamiento de las células con el aceite esencial de romero a 1 µg/ml, 24h antes de la adición del peróxido de hidrógeno, previene las alteraciones provocadas por el mismo, observándose una normalización del índice redox debido fundamentalmente al incremento de los valores de GSH.

A continuación se estudia el posible efecto del aceite esencial sobre el sistema antioxidante enzimático de la CAT, mediante espectrofotometría en extractos celulares totales. El tratamiento de los astrocitos con peróxido de hidrógeno provoca una disminución significativa en la actividad enzimática, sometiendo a la célula a un mayor riesgo de daño celular. El pretratamiento con el aceite esencial de romero induce un aumento en la actividad del enzima antioxidante, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas para las concentraciones más altas ensayadas.

Estos resultados indican que la disminución observada en los niveles de EROs en las células tratadas con el aceite esencial de romero puede ser debida, al menos en parte, a un incremento en la actividad de los sistemas antioxidantes tanto no enzimáticos (GSH) como enzimáticos (CAT).

Por otro lado, y puesto que existe una relación entre el estrés oxidativo y la apoptosis celular, se determinan la actividad del enzima caspasa-3 como principal enzima efector de apoptosis. El tratamiento con peróxido de hidrógeno induce un incremento en la actividad caspasa-3 que explica la disminución en la viabilidad celular observada previamente. El tratamiento previo con distintas concentraciones de aceite esencial es capaz de proteger a las células, de forma que la actividad del enzima pro-apoptótico se mantiene dentro de los valores normales obtenidos en el grupo control (células no tratadas). Por lo tanto, se puede afirmar que el aceite esencial de romero ejerce un efecto anti-apoptótico.

Finalmente, como medida del daño celular provocado por el estrés oxidativo, se determinan los niveles de MDA, producto secundario derivado de la degradación oxidativa de los lípidos de membrana. El tratamiento de las células con peróxido de hidrógeno induce un incremento significativo en la liberación de MDA. El

tratamiento previo de las células con distintas concentraciones de aceite esencial permite mantener los niveles de MDA próximos al grupo control, siendo particularmente activa la concentración de 2,5µg/ml.

Estos resultados coinciden con los publicados por otros autores para los aceites esenciales obtenidos de otras especies vegetales y parecen estar relacionados con su elevado contenido en 1,8-cineol (Porres *et al.*, 2010).

EXTRACTO METANÓLICO DE *R. OFFICINALIS*

Estudio fitoquímico

A partir de las partes aéreas secas y groseramente troceadas, se obtiene el extracto metanólico cuyo rendimiento se evalúa por gravimetría de acuerdo con la monografía correspondiente de la RFE. El rendimiento obtenido para las 14 muestras recolectadas es variable, oscilando entre 11 y 21%. La muestra recolectada en la comunidad de Madrid presenta un valor intermedio, del 16 %, aproximadamente.

el contenido en compuesto fenólicos del extracto metanólico se analiza por HPLC, pudiéndose identificar y cuantificar 27 compuestos fenólicos en un único análisis. Aunque se observa cierta variabilidad en su composición, atribuible a su diferente origen geográfico, los flavonoides quercitrina, miricetina, hesperetina, xantona, vitexina y apigenina, así como los ácidos fenólicos clorogénico, rosmarínico y 4-OH cinámico, se han detectado en todas las muestras.

Los compuestos fenólicos más abundantes en el romero son los flavonoides (hasta 93%), destacando su contenido en rutina y miricetina.

Actividad farmacológica

Capacidad antioxidante

En primer lugar se realiza el estudio preliminar de su capacidad antioxidante *in vitro*, valorando su capacidad de absorción del radical oxígeno (método ORAC). Los resultados indican una actividad significativamente alta para todas las muestras

ensayadas, con un valor medio de $3,00 \pm 0,23 \mu\text{mol Trolox/mg extracto}$, tomando como referencia el Trolox, análogo hidrosoluble de la vitamina E.

El estudio de su actividad captadora de radicales libres derivados de DPPH muestra resultados similares, con un valor medio de IC_{50} de 7,84 mg/ml.

Estos valores indican un elevado potencial antioxidante para el extracto metanólico de *R. officinalis* que concuerda con los resultados publicados previamente por otros autores (Moreno et al., 2006).

Actividad protectora sobre línea celular U373-MG

Al igual que en el caso del aceite esencial, los estudios de neuroprotección se llevan a cabo sobre cultivo de astrocitos con el fin de elucidar los posibles mecanismos que permitan explicar el efecto antioxidante previamente observado. El peróxido de hidrógeno se utiliza como agente inductor de daño oxidativo.

Como ocurría con el aceite esencial de romero, los resultados de los ensayos *in vitro* con los extractos metanólicos son similares sin diferencias estadísticamente significativas entre los mismos, por lo que los estudios de actividad biológica en cultivos celulares se llevan a cabo únicamente con la muestra procedente de la Comunidad de Madrid como representante de todas las muestras de *R. officinalis* recolectadas para este estudio.

El efecto directo del tratamiento con el extracto metanólico sobre la viabilidad celular de astrocitos se determinan mediante el método de reducción del MTT, estableciéndose así las concentraciones no tóxicas que se aplicarán en los siguientes ensayos. Las células se tratan con concentraciones crecientes de extracto, entre 6,25 y 800 $\mu\text{g/ml}$ durante 24h. Como control positivo se utilizan células no tratadas y como control negativo, Tritón X-100. Ninguna de las concentraciones ensayadas es tóxica para la línea celular U-373MG.

Al estudiar el efecto protector de las mismas concentraciones frente a un modelo de estrés oxidativo inducido por H_2O_2 1mM, se observa que las concentraciones

de 12,5µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml y 100µg/ml son capaces de mantener e incluso incrementar la supervivencia celular, por lo que dichas concentraciones se seleccionan para continuar el estudio.

En el ensayo de actividad antiradicalaria mediante el ensayo de la diclorofluoresceína (DCFH-DA), se compara el efecto del tratamiento con el extracto metanólico de romero con las células no tratadas (grupo control) y con el efecto producido por el peróxido de hidrógeno. El incremento en EROs producido por el peróxido de hidrógeno es revertido por el extracto metanólico de romero.

En cuanto a la actividad sobre los niveles de glutatión reducido, se observa que el tratamiento de las células con peróxido de hidrógeno provoca una elevación de los niveles de glutatión oxidado y disminución de GSH, con aumento del índice redox, lo cual implica una disminución de la capacidad de respuesta antioxidante celular. El pretratamiento de las células con el extracto metanólico de romero consigue mantener los niveles de GSH en valores normales, con ligera elevación de GSSG pero con un índice redox similar al del grupo control (diferencia no estadísticamente significativa).

En cuanto al efecto del tratamiento con el extracto metanólico sobre los niveles de CAT, no se observan variaciones estadísticamente significativas. Los valores permanecen similares a los obtenidos con el grupo control. Esta falta de respuesta a nivel enzimático puede explicarse en base al hecho de que la célula ha visto aumentada su defensa antioxidante (menor producción de EROs, mayor actividad de GSH) y no es necesario que se produzca una mayor liberación del enzima.

En el caso de la actividad caspasa-3, el tratamiento previo con distintas concentraciones de extracto metanólico de romero es capaz de proteger a las células, de forma que la actividad del enzima pro-apoptótico se mantiene dentro de los valores normales obtenidos en el grupo control para tres de las concentraciones ensayadas (12,5µg/ml, 50µg/ml y 100µg/ml), por lo que se puede afirmar que el extracto de romero ejerce un efecto anti-apoptótico.

Finalmente, como medida del daño celular provocado por el estrés oxidativo, se determinan los niveles de MDA, producto secundario derivado de la degradación oxidativa de los lípidos de membrana. El tratamiento de las células con peróxido de hidrógeno induce un incremento significativo en la liberación de MDA. Al igual que ocurre con el aceite esencial, el tratamiento previo con el extracto metanólico de romero permite disminuir los niveles de MDA próximos al grupo control, siendo particularmente activa la concentración de 50µg/ml.

En base a todos los resultados obtenidos, se puede concluir que tanto el aceite esencial como el extracto metanólico de *R. officinalis* recolectados en la Península Ibérica ejercen una actividad antioxidante y protectora sobre la línea celular de astrocitos humana U373-MG sometida al daño oxidativo provocado por el agente inductor H₂O₂. Dicho efecto protector se refleja en su capacidad captadora de radicales libres, su capacidad protectora en cuanto a viabilidad y morfología celulares, aumento de la actividad de los sistemas antioxidantes endógenos, disminución de la muerte celular por apoptosis e inhibición de la peroxidación lipídica. Todo ello se traduce un efecto neuroprotector significativo frente al estrés oxidativo.

6. CONCLUSIONES

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se ha realizado el estudio fitoquímico de muestras espontáneas de *Rosmarinus officinalis* L. recolectadas en el momento de su floración en diferentes zonas geográficas de la península Ibérica, con el fin de estudiar su composición química y evaluar su actividad antioxidante. El estudio se ha realizado por un lado con el aceite esencial obtenido por destilación de la planta, y por otro lado, con el extracto metanólico de la misma. La actividad antioxidante se ha evaluado mediante un modelo de estrés oxidativo inducido por H₂O₂ sobre la línea celular de astrocitoma humano U-373MG.

En base a los resultados obtenidos en el desarrollo experimental, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

1. El aceite esencial obtenido a partir de *R. officinalis* L. presenta un rendimiento medio de 2,21%, con ligeras variaciones dependiendo de su origen geográfico. Dicha variación se refleja también en el porcentaje de sus principales componentes, aunque en todos los casos se corresponde con el tipo alcanfor-borneol, predominante en la península Ibérica.
2. La capacidad antioxidante y captadora de radicales libres *in vitro* del aceite esencial de *R. officinalis* L. es moderada, con valores de $1,19 \pm 0,15$ μmol Trolox/mg aceite esencial e IC₅₀ superior a 650 mg/ml.
3. El aceite esencial de *R. officinalis* L. ejerce efecto neuroprotector sobre la línea celular de astrocitoma humano U373-MG que se manifiesta como disminución en la producción endógena de especies reactivas de oxígeno, aumento de los niveles de GSH y de la actividad enzimática CAT e inhibición de la actividad apoptótica mediada por caspasa-3. Así mismo, inhibe la peroxidación lipídica, tal y como demuestra la disminución en los niveles de MDA.

4. El extracto metanólico de *R. officinalis* L. presenta un rendimiento medio de 15,72%, con un elevado contenido en flavonoides (hasta 93%). Destaca su contenido en rutina y miricetina.
5. El potencial antioxidante y captador de radicales libres *in vitro* del extracto metanólico de *R. officinalis* L. es elevado, con valores de $3,00 \pm 0,23 \mu\text{mol}$ Trolox/mg extracto e IC_{50} de 7,84 mg/ml, respectivamente.
6. Sobre la línea celular de astrocitoma humano U-373MG, el extracto metanólico de *R. officinalis* L. inhibe la formación de radicales libres de oxígeno y eleva los niveles de GSH hasta valores normales, sin influir en la actividad del enzima antioxidante CAT. Así mismo, ejerce un efecto antiapoptótico por disminuir los niveles de caspasa-3. Se produce también inhibición de la peroxidación lipídica, tal y como demuestra la disminución en los niveles de MDA.
7. *Rosmarinus officinalis* L. presenta actividad neuroprotectora en la línea celular de astrocitoma humano U373-MG frente al daño oxidativo provocado por peróxido de hidrógeno a través de los siguientes mecanismos: capacidad captadora de radicales libres, capacidad protectora en cuanto a viabilidad y morfología celulares, aumento de la actividad de los sistemas antioxidantes endógenos, disminución de la muerte celular por apoptosis e inhibición de la peroxidación lipídica.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aarsland, D., Litvan, I., Salmon, D., Galasko, D., Wentzel-Larsen, T., Larsen, J.P., 2003. Performance on the dementia rating scale in Parkinson's disease with dementia and dementia with Lewy bodies: comparison with progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 74(9):1215-1220.

AbouZid, S.F., Mohamed, A.A., 2011. Survey on medicinal plants and spices used in Beni-Sueif, Upper Egypt. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 7:18.

Abuashwashi, A.M., Palomino, O., Gómez-Serranillos, M.P., 2014. Variability in the polyphenolic composition and antioxidant ability of wild *Rosmarinus officinalis* L. collected in Spain. *Planta Medica*. 80(16):1551. DOI: 10.1055/s-0034-1395100.

Abuashwashi, M.A., Palomino, O.M., Gómez-Serranillos, M.P., 2016. Geographic origin influences the phenolic composition and antioxidant potential of wild *Crataegus monogyna* from Spain. *Pharmaceutical Biology*. 1-6.

Afri, M., Frimer, A.A., Cohen, Y., 2004. Active oxygen chemistry within the liposomal bilayer. Part IV: Locating 2', 7'-dichlorofluorescein (DCF), 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) and 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) in the lipid bilayer. *Chemistry and Physics of Lipids*. 131:123-133.

Agarwal, R., Mukhtar, H., 1996. Cancer chemoprevention by polyphenols in green tea and artichoke. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 401:35-50.

Aguirre, R., May, J. M., 2008. Inflammation in the vascular bed: importance of vitamin C. *Pharmacology and Therapeutics*. 119(1):96-103.

Ahmadi, S., Bashiri, R., Ghadiri-Anari, A., Nadjarzadeh, A., 2016. Antioxidant supplements and semen parameters: An evidence based review. *International Journal of Reproductive BioMedicine*. 14(12): 729-736.

Akrouf, A., Hajlaoui, H., Mighri, H., Najjaa, H., El Jani, H., Zaidi, S., Neffati, M., 2010. Chemical and biological characteristics of essential oil of *Rosmarinus*

officinalis cultivated in Djerba. Journal of Essential Oil Bearing Plants.13(4): 398-411.

Almela,L., Sanchez-Muñoz,B., Fernández-López, J.A.,Roca, M.A., Rabe, V., 2006. Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. Journal of Chromatography A, 1120: 221–229.

Al-Sereiti, M.R., Abu-Amerb, K.M., Sena, P., 1999. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. Indian Journal of Experimental Biology.37:24-131.

Altıok, N., Ersoz, M., Krsoz, M., Karpuz, V., Koyuturk, M., 2006. *Ginkgo biloba* extract regulates differentially the cell death induced by hydrogen peroxide and simvastatin. NeuroToxicology.27(2):158-163.

Amador-Marín, B., Guerra-Martín, M.D., 2016. Eficacia de las intervenciones no farmacológicas en la calidad de vida de las personas cuidadoras de pacientes con enfermedad de Alzheimer. Gaceta Sanitaria.31 (2):154-160.

Ambrogini, P., Betti, M., Galati, C., Di Palma, M., Lattanzi, D., Savelli, D., Galli, F., Cuppini, R., Minelli, A., 2016. A- Tocopherol and hippocampal neural plasticity in physiological and pathological conditions. International Journal of Molecular Sciences.17(12):1-32.

Ambrosini, E. and Aloisi, F., 2004. Chemokines and glial cells: a complex network in the central nervous system. Neurochemical Research. 29:1017-1038.

Ameigeiras, E., Gil-Loyzaga, P.E., 2011. Criopreservación de células y tejidos. En: Gil-Loyzaga PE. Cultivo de células animales y humanas. Aplicaciones en medicina regenerativa. Ed. Visión Libros, Madrid pp. 103-110.

Andersen, J.K., 2004. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?. Nature Reviews Neuroscience.5:18-25.

Angioni, A., Barra, A., Cereti, E., Barile, D., Coisson, J.D., Arlorio, M., Dessi, S., Coroneo, V., Cabras, P., 2004. Chemical composition, plant genetic

- differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.52 (11):3530-3535.
- Anthos. Sistema de información sobre las plantas en España. Real Jardín Botánico, 2006-2012. www.anthos.es.
- Aqel, M.B., 1991. Relaxant effect of the volatile oil of *Rosmarinus officinalis* on tracheal smooth muscle. *Journal of Ethnopharmacology*. 33(1-2):57-62.
- Araque, A., Navarrete, M., 2009. Glial cells in neuronal network function. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 365:2375-2381.
- Araque,A., Parpura, V., Sanzgiri,R.P., Haydon, P.G., 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neuroscience*.22:208-215.
- Aruoma, O.I., 1998. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists´ society*.75 (2):199-212.
- Aruoma, O.I., Halliwell, B., Aeshbach, R., Löligers, J., 1992. Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. *Xenobiotica* .22(2):257-268.
- Asad, S.F., Singh, S., Ahmad, A., Khan, N.U., Hadi, S.M., 2001. Prooxidant and antioxidant activities of bilirubin and its metabolic precursor biliverdin: a structure- activity study. *Chemico-Biological Interactions*.137(1):59-74.
- Asai, A., Nakagawa, K., Miyazawa, T., 1999.Antioxidative effects of turmeric, rosemary and capsicum extracts on membrane phospholipid peroxidation and liver lipid metabolism in mice. *Journal of Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*.63(12): 2118-2122.
- Babu, H., Claasen, J.H., Kannan, S., Rünker, A.E., Palmer, T., Kempermann, G.,2011. A protocol for isolation and enriched monolayer cultivation of neural precursor cells from mouse dentate gyrus. *Frontiers in Neuroscience*.5:89.

- Bains, J.S., Shaw, C.A., 1997. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Research Reviews*. 25(3):335-358.
- Banci, L., Benedetto, M., Bertini, I., Del Conte, R., Piccioli, M., Viezzoli, M.S., 1998. Solution structure of reduced monomeric Q133M2 copper, zinc superoxide dismutase (SOD). Why Is SOD a dimeric enzyme? *Biochemistry*. 37(34):11780-11791.
- Banerjee, S., Bhat, M.A., 2007. Neuron-Glial Interactions in Blood-Brain Barrier Formation. *The Journal of Neuroscience*. 30:235-258.
- Barbut, S., Josephson, D.B., Maurer, A.J., 1985. Antioxidant properties of rosemary oleoresin in Turkey sausage. *Journal of Food Science*. 50:1356-1359.
- Barja de Quiroga, G., Perez-Campo, R. López-Torres, M., 1990. Anti-oxidant defences and peroxidation in liver and brain of aged rats. *Biochemical Journal*. 272: 247-250.
- Barnham, K.J., Masters, C.L., Bush, A.I., 2004. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature Reviews Drug Discovery*. 3(3):205-214.
- Beal, M.F., 1996. Mitochondria, free radicals, and neurodegeneration. *Current Opinion in Neurobiology*. 6(5):661-666.
- Bell, S. G., Vallee, B. L., 2009. The metallothionein/thionein system: an oxidoreductive metabolic zinc link. *Chembiochem*. 10(1):55-62.
- Benavente-García, O., Castillo, J., Marin, F.R., Ortuño, A., Del Río, J.A., 1997. Uses and properties of *Citrus* flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45(12): 4505–4515.
- Benítez, G., González-Tejero, M.R., Molero-Mesa, J., 2010. Pharmaceutical ethnobotany in the western part of Granada province (southern Spain). ethnopharmacological synthesis. *Journal of Ethnopharmacology*. 129:87-105.

- Benjlali, B., Tantaoui Elaraki, A., Ismailil Alaoui, M., Ayadi, A., 1986. Method for studying antimicrobial effects of essential oils by direct contact in agar media [*Thymus capitatus*, *Rosmarinus officinalis*, *Eucalyptus globulus*, *Artemisia herba alba*]. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*. 20: 155-167.
- Bhagavan, H.N., Chopra, R.K., 2006. Coenzyme Q10: Absorption, tissue uptake, metabolism and pharmacokinetics. *Journal of Free Radical Research*.40(5):445-453.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O., 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization*.
- Blanco, E., Macía, M.J., Morales, R., 1999. Medicinal and veterinary plants of el Caurel (Galicia, northwest Spain).65:113-124.
- Bogdadi, H.A.A., Kokoska, L., Havlk, J., Kloucek, P., Rada, V., Vorisek, K., 2007. In vitro antimicrobial activity of some Libyan medicinal plants extracts. *Pharmaceutical Biology* .45(5):386-391.
- Bonet, M.Á., Parada, M., Selga, A., Vallés, J., 1999. Studies on pharmaceutical ethnobotany in the regions of L' Alt Empordá and Les Guilleries (Catalonia, Iberian Peninsula). *Journal of Ethnopharmacology* .68:145-168.
- Borbón Jara, B., Medel, A., Bedolla Valdez, Z., Alonso Núñez, G., Mercedes, T, Guzmán, O., 2015. Evaluación electroquímica de nanoestructuras Fe/MWCNT-Pt y Fe/MWCNT-Pt-Pd como materiales de cátodos multifuncionales con potencial aplicación en el mejoramiento de la calidad de agua tratada. *Revistas Unam*. 8(14):6-16.
- Botsoglou, N.A., Govaris, A., Giannenas, I., Botsoglou, E., Papageorgiou, G., 2007. The incorporation of dehydrated rosemary leaves in the rations of turkeys and their impact on the oxidative stability of the produced raw and cooked meat. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* .58(4):312-320.
- Braak, H. & Braak, E., 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathology*. 82:239-259.

- Bravo,L.,1998. Polyphenols:chemistry,dietary sources, metabolism, and nutritional significance.Nutrition Reviews.56 (11): 317-333.
- Brzeszczynska, J., Gwozdziński, K., 2008. Nitric oxide induced oxidative changes in erythrocyte membrane components, Cell Biology International.32(1):114-120.
- Bult,H., Herman,A.G., Rampart,M., 1985. Modification of endotoxin-induced haemodynamic and haematological changes in the rabbit by methylprednisolone, F(ab')₂ fragments and rosmarinic acid. British Journal of Pharmacology.84(2):317-327.
- Buonocore. G., Perrone. S., Tataranno. M.L., 2010. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species.Seminars in Fetal & Neonatal Medicine .15:186-190.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1985.[59].Glutathione reductase. Methods in Enzymology.113:484-490.
- Cavero, R.Y., Akerreta, S., Calvo, M.I., 2011. Pharmaceutical ethnobotany in the middle Navarra (Iberian Peninsula). Journal of Ethnopharmacology .137:844-855.
- Cederberg, J., Simán, C. M., Eriksson, U.J., 2001. Combined treatment with vitamin E and vitamin C d decreases oxidative stress and improves fetal outcome in experimental diabetic pregnancy. Pediatric Research .49(6):755-762.
- Chandler. 1985. Rosemary. Clinical Edge, 40–53.
- Chao, T-K., Hu, J., Pringsheim, T., 2017. Risk factors for the onset and progression of Huntington disease. Neurotoxicology.1-65.
- ChelikaniI, P., Fita, I., Loewen, P.C., 2004. Diversity of structures and properties among catalases. Cellular and Molecular Life Sciences.61(2):192-208.
- Ciftci, O., Ozdemir, I., Tanyildizi, S., Yildiz, S., Oguzturk, H.,2011. Antioxidative effects of curcumin, β -myrcene and 1,8-cineole against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced oxidative stress in rats liver. Toxicology and Industrial Health. 27(5):447-453

Clark, J. F., Sharp, F. R., 2006. Bilirubin oxidation products (BOXes) and their role in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*.26:1223-1233.

Collins, M.A., Charles, H.P., 1987. Antimicrobial activity of carnosol and urosalic acid: two anti-oxidant constituents of *Rosmarinus officinalis* L. *Food Microbiology*.4:311-315.

Cook, N.C., Samman, S., 1996. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*.7(2):66-76.

Crane, F.L. 2001. Biochemical functions of Coenzyme Q10 *Journal of the American College of Nutrition*. 20(6):591-598.

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., Milzani, A., 2006. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*. 52:601-623.

Darvesh, A.S., Carroll, R.T., Bishayee, A., Geldenhuys, W.J., Van der Schyf, C.J., 2010. Oxidative stress and Alzheimer's disease: dietary polyphenols as potential therapeutic agents. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 10(5):729-745.

Dasuri, K., Zhang, L., Keller, J.N., 2013. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radical Biology and Medicine*.62:170-185.

Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., 2004. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.52:48-54.

Deisseroth, A., Dounce, A.L. 1970. Catalase: physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiological Reviews*, 50(3):319-375.

Del Baño, M.J.,Lorente, J.,Castillo, C., Benavente-García, O.,Del Río,J.A.,Ortuño, A., Quirin, K-W., Gerard, D., 2003. Phenolic diterpenes,

flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of Leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant Activity Journal of Agricultural and Food Chemistry.51 (15):4247–4253.

Del Baño,M.J., Castillo,J., Benavente-García,O.,Lorente,J.,Martín-Gil,R., Acevedo, C., Alcaraz, M.,2006. Radioprotective-antimutagenic effects of rosemary phenolics against chromosomal damage induced in human lymphocytes by gamma-rays. Journal of Agricultural and Food Chemistry .54(6):2064-2068.

Delgado, J.M., Mora Teruel, F., Rubia vila, F.J., Ferrús Gamero, A., 1998. "Manual de neurociencia"Ed. Síntesis, Madrid.

Delgado, R., Carlin, A., Airaghi, L., Demitri, M.T., Meda, L., Galimberti, D., Baron, P., Lipton, J.M., Catania, A., 1998. Melanocortin peptides inhibit production of proinflammatory cytokines and nitric oxide by activated microglia. Journal of Leukocyte Biology. 63(6):740-745.

Demple, B., Linn, S., 1982. 5, 6-Saturated thymine lesions in DNA: production by ultraviolet light or hydrogen peroxide. Nucleic Acids Research.10(12):3781-3789.

Devasagayam, T., Tilak, J.C., Bloor, K.K., Sane, K.S., Ghaskadbi, S.S, Lele, R.D., 2004. Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. Journal of the Association of Physicians of India. .52:794-804.

Dias, P.C., Foglio, M.A., Possenti, A., Ernesto de Carvalho, J., 2000. Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extracts of *Rosmarinus officinalis* L. Journal of Ethnopharmacology .69:57-62.

Dilas, S., Knez, Z., Četojević-Simin,D.,Tumbas V.,Škerget, M., Čanadanović-Brunet, J.,Četković, G.,2012.In vitro antioxidant and antiproliferative activity of three rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract formulations, International Journal of Food Science and Technology..47(10):2052-2062.

Domínguez Vázquez,G., Berlín, B., Castro Ramírez, A.E., Estrada Lugo, E.J.I., 2002. Revisión de la diversidad y patrones de distribución de Labiatae en Chiapas. Revistas Unam.73(1):39-80.

- Dong, Y., Benveniste, E. N., 2001. Immune functions of astrocytes. *Glia* 36:180-190.
- Dorman, H.J.D., Peltoketo, A., Hiltunen, R., Tikkanen, M.J., 2003. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chemistry*. 83(2):255-262.
- Dreher, D., Junod, A.F., 1996. Role of oxygen free radicals in cancer development. *European Journal of Cancer*. 32A(1):30-38.
- Dringen, R., 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*. 62:649–671.
- Dringen, R., Pawlowski, P.G., Hirrlinger, J., 2005. Peroxide detoxification by brain cells. *Journal of Neuroscience Research*. 1-15;79(1-2):157-165.
- Du, H., Yan, S.S., 2010. Mitochondria medicine for neurodegenerative diseases. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 42:560-572.
- Duyckaerts, C., Delatour, B., M-C Potier. 2009. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathologica*. 118(1):5-36.
- Elamrani, A., Zrira, S., Benjilali, B., Berrada, M., 2000. A study of Moroccan rosemary oils. *Journal of Essential Oil Research*. 12 (4):487-495.
- Emerit, J., Edeas, M., Bricaire, F., 2004. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 58(1):39-46.
- Enghild, J.J., Thøgersen, I.B., Oury, T.D., Valnickova, Z., Højrup, P., Crapo, J.D., 1999. The heparin-binding domain of extracellular superoxide dismutase is proteolytically processed intracellularly during biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 274:14818-14822.
- Erenmemisoglu, A. Saraymen, R., Ustun, S., 1997. Effect of a *Rosmarinus officinalis* leave extract on plasma glucose levels in normoglycaemic and diabetic mice. *Pharmazie*. 52(8):645-6.

Estrela, J.M., Sáez, G.T., Such, L., Viña, J., 1983. The effect of cysteine and N-acetyl cysteine on rat liver glutathione (GSH), *Biochemical Pharmacology*.32 (22):3483-3485.

Fahim,F.A., Esmat,A.Y., Fadel, H.M., Hassan, K.,1999. Allied studies on the effect of *Rosmarinus officinalis* L. on experimental hepatotoxicity and mutagenesis. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*.50(6):413-27.

Fang, Y-Z., Yang, S., Wu, G., 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*.18 (10):872-879.

Fearnley, J.M., Lees, A.J., 1991. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain*.114(5):2283-2301.

Fenton, H.J.,1894. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society*.65:899-915.

Fernández,L.F.,Palomino,O.P., Frutos,G., 2014. Effectiveness of *Rosmarinus officinalis* essential oil as antihypotensive agent in primary hypotensive patients and its influence on health-related quality of life.*Journal of Ethnopharmacology*.151(1):509-516.

Fernandez-Gomez, F.J., Gomez-Lazaro, M., Pastor, D., Calvo, S., Aguirre, N., Galindo, M.F., Jourdan, J., 2005. Minocycline fails to protect cerebellar granular cell cultures against malonate-induced cell death. *Neurobiology of Disease*.20 (2):384-391.

Fields, R.D., Stevens-Graham, B., 2002. New insights in to neuron-glia communication. *Science*.298 (5593):556-562.

Fiskum, G., Murphy, A.N., Beal, M.F., 1998. Mitochondria in neurodegeneration: acute ischemia and chronic neurodegenerative diseases. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 19:351-369.

Fleurentin,J., Hoefler,C., Lexa,A., Mortier, F., Pelt,J.M., 1986.Hepatoprotective properties of *Crepis rueppellii* and *Anisotes trisulcus*: two traditional medicinal plants of Yemen.*Journal of Ethnopharmacology*.16(1):105-111.

- Flynn, J.M., Melov, S., 2013. SOD2 in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration, *Journal of Free Radical Biology and Medicine*.62:4-12.
- Folin, O., Ciocalteu, V., 1927. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 73:627-650.
- Formica, J.V., Regelson, W., 1995. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Journal of Food and Chemical Toxicology*.33(12):1061-1080.
- Forster, H.B., Niklas, H., Lutz, S., 1980. Antispasmodic effects of some medicinal plants. *Planta Medica*. 40(12):309-319.
- Fransen, M., Nordgren, M., Wang, B., Apanasets., 2012. Role of peroxisomes in ROS/RNS- metabolism: implications for human disease. *Biochimica et Biophysica acta*.1822:1363-1373.
- Frederickson, R., 1992. Astroglia en la enfermedad de Alzheimer. *Neurobiology of Aging*. 13(2):239 -253.
- Fuller, S., Münch, G., Steele, M., 2009. Activated astrocytes: a therapeutic target in Alzheimer's disease?, *Neurotherapeutic*. 9(11):1585-1594.
- Galimberti, D. Scarpini, E., 2013. Progress in Alzheimer's disease research in the last year. *Journal of Neurology*.260:1936-1941.
- Gandhi, S., Abramov, A.Y., 2012. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.428010.
- Gavillet, M., Allaman, I., Magistretti, P., 2008. Modulation of astrocytic metabolic phenotype by Proinflammatory Cytokines. *GLIA*. 56:975-989.
- Giachetti, D., Taddei, E., Taddei, I., 1988. Pharmacological Activity of Essential Oils on Oddi's Sphincter. *Planta Medica*.54(5):389-392.
- Gómez-Pinedo, U., Galán, L., Yañez, M., Matias-Guiu, J., Valencia, C., Guerrero-Sola, A., Lopez-Sosa, F., Brinc, J.R., Benito-Martin, M.S., 2016. La infusión intracerebroventricular prolongada de líquido cefalorraquídeo procedente de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica provoca cambios histológicos en el

cerebro y la médula espinal de la rata similares a los hallados en la enfermedad. *Neurología*.1-13.

González, J.A., García-Barriuso, M., Amich, F., 2010. Ethnobotanical study of medicinal plants traditionally used in the Arribes del Duero, Western Spain. *Journal of Ethnopharmacology* .131:343-355.

Grayer, R.J.G., Veitch, N.C., Kite, G.C., Price, A.M.; Kokubun, T., 2001 *Phytochemistry*.56:559-567.

Groundwater, P.W., Solomons, K.R., Drewe, J.A., Munawar, M.A., 1996. Protein tyrosine kinase inhibitors. *Progress in Medicinal Chemistry*. 33:233-329.

Gutierrez-Merino, C., Lopez-Sanchez, C., Lagoa, R., Samhan-Arias, A.K., Bueno, C., Garcia-Martinez, V., 2011. Neuroprotective actions of flavonoids. *Current Medicinal Chemistry*.18(8):1195-212.

Haber, F., Weiss, J., 1934. The catalytic compensation of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society of London*. 147:332-351.

Halliwell, B. 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*. 35(5):1147-1150.

Halliwell, B., 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry*. 59:1609-1623.

Halliwell, B., 1995. Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 54(6):505-510.

Halliwell, B., 2006. Proteasomal dysfunction: A Common feature of neurodegenerative diseases? Implications for the environmental Origins of neurodegeneration. *Antioxidants & Redox Signaling*. 8(11-12):2007-2019.

Halliwell, B., 2011. Free radicals and antioxidants- quo vadis?. *Trends in Pharmacological Sciences*. 32(3):125-130.

Halliwell, B., 2012. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Reviews*. 70(5):257-265.

Halliwell, B., Clement, M.V., Long, L.H., 2000. Hydrogen peroxide in the human body. Federation of European Biochemical Societies letters. 486:10–13.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1989. Free radicals in Biology and Medicine, 2 ed. Clarendon Press. Oxford.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.1990. Role of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease: An Overview. Methods in Enzymology. 186:1-85.

Halliwell, B., Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. 2006. Journal of Neurochemistry. 97:1634-1658.

Halliwell, B., Reactive Oxygen Species and the Central Nervous System1992. Journal of Neurochemistry. 59:1609-1623.

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

Haloui, M., Louedec, L., Michel, J-B, Lyoussi, B., 2000. Experimental diuretic effects of *Rosmarinus officinalis* and *Centaureum erythraea*, Journal of Ethnopharmacology .71:465-472.

Hamishehkar, H., Ranjdoost, F., Asgharian, P., Mahmoodopoor, A., sanaie, S., 2016. Vitamins, Are they safe? .Advanced Pharmaceutical Bulletin.6(4):467-477

Hanlidou, E., Karousou, R., Kleftoyanni, V., Kokkini, S., 2004.The herbal market of Thessaloniki (N Greece) and its relation to the ethnobotanical tradition. Journal of Ethnopharmacology .91:281-299.

Hanna, M.G., Nelson, I.P., 1999. Genetics and molecular pathogenesis of mitochondrial respiratory chain diseases. Cellular and Molecular Life Sciences.55:691-706.

Haraguchi, H.,Saito, T.,Okamura,N.,Yagi,A., 1995. Inhibition of lipid peroxidation and superoxide generation by diterpenoids from *Rosmarinus officinalis* .Planta Medica.61(4):333-336.

Harrison, F.E., May, J.M., 2009. Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radical Biology and Medicine*. 46(6):719-730.

Haydon, P.G., 2001. Glia: listening and talking to the synapse. *Nature Reviews Neuroscience*.2(3):185-193.

Hirtz, D., Thurman, D.J., Gwinn-Hardy, K., Mohamed, M., Chaudhuri, A.R. & Zalutsky, R., 2007. How common are the "common" neurologic disorders? *Neurology*, 68:326-337.

Hoeffler, C., Fleurentin, J., Mortire, F., Pelt, J.M., Guillemain, J., 1987. Comparative choleric and hepatoprotective properties of young sprouts and total plant extracts of *Rosmarinus officinalis* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*.19(2):133-143.

Hof, S., Ammon, H.P.T., 1989. Negative inotropic action of rosemary oil, 1,8-cineole, and bornyl acetate. *Planta Medica*.

Hof, S., Ammon, H.T.P., 1989. Negative inotropic action of Rosemary oil, 1,8-cineole

Höpfner, M., Sutter, A.P., Huether, A., Ahnert-Hilger, G., Scherubl, H., 2004. A novel approach in the treatment of neuroendocrine gastrointestinal tumors: additive antiproliferative effects of interferon-gamma and meta-iodobenzylguanidine. *BMC Cancer*. 4:23-37.

Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.53:1841-1856.

Huang, M-T., Ferraro, T., 1992. Phenolic compounds in food and cancer prevention. *American Chemical Society*.507(2):8-34.

Inoue, M., Sakaguchi, N., Isuzugawa, K., Tani, H., Ogihara, Y., 2000. Role of reactive oxygen species in gallic acid-induced apoptosis. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 23(10):1153-1157.

Jara Borbón, B., Medel, A., Bedolla Valdez Z., Alonso Nuñez G., Oropeza Guzmán M.T., 2015; Evaluación electroquímica de nanoestructuras Fe/MWCNT-Pt y Fe/MWCNT-Pt-Pd como materiales de cátodos multifuncionales con

potencial aplicación en el mejoramiento de la calidad de agua tratada. *Revistas Unam*.8(14):6-16.

Jarrar N., Abu-Hijleh A., Adwan K., 2010. Antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. alone and in combination with cefuroxime against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*.121-123.

Jha, N., Jurma, O., Lalli, G., Liu, Y., Pettus, E.H, Greenamyre, J.T., Liu, R-M., Forman, H.J., Andersen, J.K., 2000. Glutathione Depletion in PC12 Results in Selective Inhibition of Mitochondrial Complex I Activity Implications for parkinson's disease. *The Journal of Biological Chemistry*. 275(34):26096-26101.

Jones, D.P., 2008. Radical-free biology of oxidative stress. *The American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 295:C849-868.

Joyeux.M., Rolland, A., Fleurentin, J., Mortier, F., Dorfman, P., 1990. Tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Injury In Isolated Rat Hepatocytes: A Model for Studying Anti-Hepatotoxic Crude Drugs. *Planta Medica*.56(2):171-174.

Kanner, J., German, J.B., Kinsella, J.E., Hultin, H.O., 1987, Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 25(4):317-364.

Kanofsky, J.R., 1989. Singlet oxygen production by biological systems. *Chemical Biological Interactions*.70:1-28.

Karihtala, P., Soini, Y., 2007. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *Journal Compilation* .115:81-103.

Keith, R.F., Elliot, F., 1979. The preparation and use of isolated cells for metabolic studies. *Technical and Metabolic Researches B*.204:1-20.

Kertulis-Tartar, G.M., Rathinasabapathi, B., Ma, L.Q., 2009. Characterization of glutathione reductase and catalase in the fronds of two *Pteris* ferns upon arsenic exposure. *Plant Physiology and Biochemistry*.47:960-965.

- Kimura, Y., Okuda, H., Okuda, T., Hatano, T., Arichi, S., 1987. Studies on the activities of tannins and related compounds, X. Effects of caffeetannins and related compounds on arachidonate metabolism in human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Natural Products*. 50 (3): 392–399.
- Kirsch, M., De Groot, H., 2002. Formation of peroxynitrite from reaction of nitroxyl anion with molecular oxygen. *The Journal of Biological Chemistry*. 277 (16):13379-13388.
- Kolikova, J., Afzalov, R., Giniatullina, A., Surin, A., Giniatullin, R., Khiroug, L., 2006. Calcium-dependent trapping of mitochondria near plasma membrane in stimulated astrocytes. *Brain Cell Biology*. 35 (1):75-86.
- Konneh, M., Caen, J., 1998. Red wine derived compounds and their putative antiatherogenic properties. *Polyphenols*.
- Konstantopoulou, I., Vassilopoulou, L., Mavragani-Tsipidou, P., Scouras, Z.G., 1992. Insecticidal effects of essential oils. A study of the effects of essential oils extracted from eleven Greek aromatic plants on *Drosophila auraria*. *Experientia*. 48(6):616-619.
- Kuhlmann, A., Röhl A., 2006. Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro. cultures of rosemary (*Rosmarinus officinalis*.) and their anti-inflammatory effect on lipopolysaccharide-activated microglia. *Journal Pharmaceutical Biology*. 44(6):401-410.
- Kuo, S-M., 1997. Dietary flavonoid and cancer prevention: evidence and potential mechanism. *Critical Reviews in Oncogenesis*. 8(1):47-69.
- Laguna, A., 1968. In: Anazarbeo, Pedacio Dioscorides (Ed.), Instituto de España.
- Larrondo, J. V., Calvo, M.A., 1991. Effect of essential oils on *Candida albicans*: a scanning electron microscope study. *Biomedical Letters*. 46(184):269-272.
- Lau, F.C., Shukitt-Hale, B., Joseph, J.A., 2005. The beneficial effects of fruit polyphenols on brain ageing, *Neurobiol Ageing*. 26 suppl 1:128-32.

- Laybourne, G., Moss, M., Wesnes, K., Scott, S.D., 2003. Effects of acute oral administration of rosemary and peppermint on cognition and mood in healthy adults. *Journal of Psychopharmacology*. 17: A62.
- LeBel, C.P., Ischiropoulos H., Bondy S.C., 1992. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology*. 5:227-231.
- Lee, H. S., Widmer, B. W., 1996. Phenolic compounds. In L. M. L. Nollet (Ed.). *Handbook of food analysis*. New York: Marcel Dekker. 1:821-894.
- Lee, J., Koo, N., Min, D.B., 2004. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 3:21-33.
- Liu, Y., Peterson, D., Kimura, H., Schubert, D., 1997. Mechanism of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of Neurochemistry*. 69:581-593.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193:265-275.
- Lü, L., Li, J., Yew, D.T., Rudd, J.A., Mak, Y.T., 2008. Oxidative stress on the astrocytes in culture derived from a senescence accelerated mouse strain. *Neurochem Int*. 52:282-289.
- Lu, S.C., 2009. Regulation of glutathione synthesis. *Molecular Aspects of Medicine*. 30:42-59.
- Lu, S.C., 2013. Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1830:3143-3153.
- Lunec, J., 1990. Free radicals: their involvement in disease processes. *Annals of Clinical Biochemistry*. 27:173-182.
- Lushchak, O.V., Piroddi, M., Galli, F., Lushchak, V.I., 2014. Aconitase post-translational modification as a key in linkage between Krebs cycle, iron

homeostasis, redox signaling, and metabolism of reactive oxygen species. *Redox Report : Communications in Free Radical Research*. 19(1):8-15.

Lushchak, V.I., 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico- Biological Interactions*. 224(5):164-175.

MacCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*. 244(22):6049-6055.

Machado, D.G., Bettio, L.E.B., Cunha, M.P., Capra, J.C., Dalmarco, J.B., Pizzolatti, M.G., Rodrigues, A.L.S., 2009. Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: Involvement of the monoaminergic system. *Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 33:642-650.

Machlin, L.J., Bendich, A., 1987. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *The FASEB Journal*. 1 (6):441-445.

Magistretti, P., 2006. Neuron–glia metabolic coupling and plasticity. *Journal of Experimental Biology*. 209:2304-2311.

Makino, T., Ono, T., Muso, E., Yoshida, H., Honda, G., Sasayama, S., 2000. Inhibitory effects of rosmarinic acid on the proliferation of cultured murine mesangial cells. *Neurophology Dialysis Transplantation*. 15(8):1140-1145.

Marcoff, L., Thompson, P.D., 2007. The role of coenzyme Q10 in statin-associated myopathy: A systematic review. *Journal of the American College of Cardiology*. 49(23):2231-2237.

Markham, K. R., Bloor, S. J., 1998. Analysis and identification of flavonoids in practice. In *Flavonoids in Health and Disease*; Rice-Evans, C. A., Packer, L., Eds.; Dekker: New York. 1-33.

Marklund, S.L., Holme, E., Hellner, L., 1982. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clinica Chimica Acta*. 126:41–51.

Markovic, J., Garcia-Gimenez, J L., Gimeno, A., Viña, J., Pallardo, F. V., 2010. Role of glutathione in cell nucleus. *Free Radical Research*. 44(7):721-733.

- Martínez-Cayuela, M., 1998. Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. *Ars Pharmaceutica*. 39(1):5-18.
- Masella, R., Benedetto, R.D., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C., 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *Journal of Nutritional Biochemistry*.16:577-586.
- Matés, J.M., 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*.153(1-3):83-104.
- Mazlan, M., Sue Mian, T., Mat Top, G., Zurinah Wan Ngah W., 2006. Comparative effects of alpha-tocopherol and gamma-tocotrienol against hydrogen peroxide induced apoptosis on primary-cultured astrocytes. *Journal of the Neurological Sciences*.243 (1-2):5-12.
- Mc Guffin, M., Hobbs, C., Upton, R. and Goldberg, A. 1997. *Botanical Safety Handbook*, 79New York: CRC Press.
- McMurrough, I.,Byrne, J. R.,1992. HPLC analysis of bittering substances, phenolic compounds, and various compounds of alcoholic beverages. *Food Analysis by HPLC*.579-641.
- Middlenton E., 1998. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Flavonoids in the Living System*.439:175-182.
- Montgomery, D.L., 1994. Astrocytes: Form, Functions, and Roles in Disease. *Veterinary Pathology*.31:145-167.
- Moon, J-K., Shibamoto, T., 2009. Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.57:1655-1666.
- Moreno,S., Scheyer, T., Romano, C.S., Vojnov, A.A.,2006. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition.*Free Radical Research*.40(2):223-231.
- Morton, J.F., 1977. *Major Medicinal Plants: Botany, Culture and Uses* Thomas, Springfield, IL. 779–780.

- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for celular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immionological Methods*. 65:55-63.
- Moss, M., Cook., J., Wesnes, K., Duckett, P., 2003. Aromas of rosemary and lavender essential oils differentially affect cognition and mood in healthy adults. *The International Journal of Neuroscience*.113 (1):15-38.
- Nadkarni, K.M.m, 1999. *Indian materia medica*, Vol 1, popula Prakashan Pvt. Ltd, Bombay
- Napoli, E.M., Siracusa, L., Saija, A., Speciale, A., Trombetta, D., Tuttolomondo, T., La Bella, S., Licata, M., Virga, G., Leone, R., Leto, C., Rubino, L., Ruberto, G.,2015. Wild Sicilian rosemary: phytochemical and morphological screening and antioxidant activity evaluation of extracts and essential oils. *Chemistry & Biodiversity*.12(7):1075-1094.
- Navarrete,M.,Araque,A.,2010.Endocannabinoids Potentiate Synaptic Transmission through Stimulation of Astrocytes. *Neuron*.68(1):113–126.
- Negrotto, L., Correale, J., 2017. Amino acid catabolism in multiple sclerosis affects immune homeostasis. *The Journal of Immunology*.198 (3):1-10.
- Newmark,H.L., 1996. Plant phenolics as potential cancer prevention agents. *Dietary Phytochemicals in Cancer Prevention and Treatment*.401:25-34.
- Nicholls, P., Fita, I., Loewen, P.C., 2001. Enzymology and structure of catalases. *Advances in Inorganic Chemistry*.51:151-106.
- Nisoli, E., Clementi, E., Paolucci, C., Cozzi, V., Tonello, C., Sciorati, C., Bracale, R., Valerio, A., Francolini, M., Moncada, S., Carruba, M.O., 2003. Mitochondrial biogénesis in mammals: The role of endogenous nitric acid. *Science*. 299(5608):896-899.
- Nordgren, M., Fransen, M., 2014. Peroxisomal metabolism and oxidative stress. *Biochimie*.98:56-62.

- Ntzimani, A.G., Giatrakou, V.I., Savvaidis, I.N., 2010. Combined natural antimicrobial treatments (EDTA, lysozyme, rosemary and oregano oil) on semi cooked coated chicken meat stored in vacuum packages at 4°C: Microbiological and sensory evaluation, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* .11:187-196.
- Offord, E.A., Macé, K., Avanti, O., Pfeifer, A.M.A., 1997. Mechanisms involved in the chemoprotective effects of rosemary extract studied in human liver and bronchial cells. *Cancer Letters*. 114(1-2):275-281.
- Omur, A., Kirbas, A., Aksu, E., Kandemir, F., Dorman, E., Kaynar, O., Ucar, O., 2016. Effects of antioxidant vitamins (A, D, E) and trace elements (Cu, Mn, Se, Zn) on some metabolic and reproductive profiles in dairy cows during transition period. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 19(4):697-706.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R., 2001 Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49:4619-4626.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R., 2000. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49:4619-4626.
- Özcan, M.M., Chalchat, J.C., 2008. Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) oil from Turkey. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* .59(7-8):691-698.
- Packer, L., 1998. α -Lipoic acid: a metabolic antioxidant which regulates NF- κ B signal transduction and protects against oxidative injury. *Drug Metabolism Reviews* 30 (2):245-275.
- Packer, L., Tritschler, H.J., Wessel, K., 1996. Neuroprotection by the metabolic antioxidant α - lipoic acid. *Free Radical Biology and Medicine*. 22(1/2):359-379.
- Palomino, O.M., Gómez-Serranillos, M.P., Ortega, T., Carretero, M.E., Varela, F., Navarrete, P., Cases, M.A., 2010. Variation in the essential oil composition of

Rosmarinus officinalis collected from different Spanish locations in the Andalusia region. *Acta Horticulturae* .860: 249-253.

Pamplona, R., Costantini, D., 2011. Molecular and structural antioxidant defences against oxidative stress in animals. *American Journal of Physiology*.301:843–863.

Pandey, K.B., Rizvi, S.I., 2009. Pleiotropic biological effects of resveratrol: implications for human health. *National Academy Science Letters*.32 (11):321-326.

Pandey, K. Rizvi, S.I., 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity* .2(5):270-278.

Panizzi, L., Flamini, G., Cioni, P.L., Morelli, I., 1993. Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. *Journal of Ethnopharmacology*.39(3):167-170.

Papageorgiou, V., Gardeli, C., Mallouchos, A., Papaioannou, M., Komaitis, M., 2008. Variation of the chemical profile and antioxidant behavior of *Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia fruticosa* Miller grown in Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(16):7254-7264.

Paris, A., Strukelj, B., Renko, M., Turk, V., Pukl, M., Umek, A., Korant, B.D., 1993. Inhibitory effect of carnosolic acid on HIV-1 protease in cell-free assays. *Journal of Natural Product*. 56:1426-1430.

Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., Piemonte, F., 2003. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta*.333:19-39.

Perea, G., Navarrete, M., Araque, A., 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in Neurosciences*.32(8):421-431.

Pertusa, M., García-Matas, S., Rodríguez-Farré, E., Sanfeliu, C., Cristófol, R., 2007. Astrocytes aged in vitro show a decreased neuroprotective capacity. *Journal of Neurochemistry*.101(3):794-805.

Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C., 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science* .4(2):89-96.

- Phaniendra, A., Jestadi, D.B., 2015. Free radical: properties, sources, targets, and their implication in various diseases, *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 30(1):11-26.
- Pisoschi, A.M., Pop, A., 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*.97:55-74.
- Polat, R., Satil, F., 2012. An ethnobotanical survey of medicinal plants in Edremit gulf (Balıkesir- Turkey). *Journal of Ethnopharmacology* .139:626-641.
- Polkey, M., Lyall, R.A., Yang, K., Johnson, E., Leigh, P.N., Moxham, J., 2016. Respiratory muscle strength as predictive biomarker for survival in Amyotrophic lateral sclerosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*.195(1):1-48.
- Porres,M.,Gómez-Serranillos,M.P.,Carretero, M.E., 2010. Actividad neuroprotectora del aceite esencial de *Salvia lavandulifolia* Vahl. *Ars Pharmaceutica*.51 (3):657-675.
- Porte, A., De, O., Godoy, R.L., Lopes, D., Koketsu, M., Goncalves, S.L., Torquilbo, H.S., 2000. Essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) from Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Essential Oil Research*.12:577-580.
- Prolo, C, Álvarez, M.N., Ríos, N., Peluffo, G., Radi, R., Romero, N., 2015. Nitric oxide diffusion to red blood cells limits extracellular, but not intraphagosomal, peroxynitrite formation by macrophages. *Free Radical Biology and Medicine*.87:346-355.
- Puerto, J., 2005. La fuerza de Fierabrás. *Medicina, Ciencia y Terapéutica en tiempos del Quijote*. Ed Just in Time, S.L. Madrid, Spain.
- Quintanilla, R.A., Tapia, C., Pérez, M.J., 2016. Possible role of mitochondrial permeability transition pore in the pathogenesis of Huntington disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.1-6.
- R. Douglas Fields, R.D., Stevens-Graham, B., 2002. New Insights into Neuron-Glia Communication. *Neuroscience*. 298(5593):556-562.

- Rahman, K., 2007. Studies on free radicals, antioxidants, and co- factors. *Clinical Interventions in Aging*. 2(2):219–236.
- Rahman, T., Hosen, I., Islam, M.M.T., Shekhar ,H.U., 2012. Oxidative stress and human health. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 3:997-1019.
- Raivich, G., Bohatschek, M., Kloss, C.U., Werner, A., Jones, L.L., Kreutzberg, G.W., 1999. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Research Reviews*.30 (1):77-105.
- Rego, A.C., Oliverira, C.R., 2003. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochemical Research*.28 (10):1563-1574.
- Riancho, J., Gonzalo, I., Ruiz-Soto, M., Berciano, Y.J., 2015. ¿Por qué degeneran las motoneuronas? Actualización en la patogenia de la esclerosis lateral amiotrófica. *Neurologia*.1-11.
- Rice-evans,C.A.,Miller,N.J.,Bolwell, P.G.,Bramley, P.M.,Pridham, J.B.,1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Journal Free Radical Research*.22(4): 375-383.
- Rodríguez, J.J., Noristani, H.N. Verkhatsky, A., 2012. The serotonergic system in ageing and Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*. 99(1):15-41.
- Rohdewald, P., Rice-Evans, C., Packer, L., eds. 1998. *Pycnogenol. Flavonoids in Health and Disease*. New York: Marcel Dekker, 405–419.
- Röhrdanz, E., Schmuck, G., Ohler, S., Kahl R., 2001. The influence of oxidative stress on catalase and MnSOD gene transcription in astrocytes. *Brain Research*. 900(1):128-136.
- Romanczyk, L.J., Hammerstone, J.F., Buck, M.M., Post, L.S., Cipolla, G.G., Micceland, C.A., Mundt, J.A., Schmitz, H.H., 1997. Cocoa extract compounds and methods for making and using the same. Patent Cooperation Treaty (PCT) WO 97/36497, Mars incorporated, USA.

- Sanai,N.,Tramontin, A.D.,Quiñones-Hinojosa, A.,Barbaro, N. M., Gupta, n., Kunwar,s., Lawton, M.T., McDermott, M.W.,Parsa,A.T.,Verdugo,J.M-G.,Berger,M.S., Alvarez-Buylla, A.,2004. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration.Nature. 427:740-744.
- Sarri, M., Mouyet, F.Z., Benziane, M., Cheriet, A., 2014. Traditional use of medicinal plants in a city at steppic character (M'sila,Algeria).Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research .2(2):31-35.
- Saugstad, O. D., 1996. "Role of xanthine oxidase and its inhibitor in hypoxia: reoxygenation injury" .Pediatrics .98(1):103-7.
- Saugstad,O.D.,2003. Bronchopulmonary dysplasia—oxidative stress and antioxidants. Seminars in Neonatology.8(1):39-49.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., Goñi, I., 2007. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. Food Chemistry.101:492-501.
- Scandalios, J.G., 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. Brazilian Journal of Medical and Biological Research.38(7):995-1014.
- Schrader, M., Fahimi, H.D., 2006. Peroxisomes and oxidative stress. Biochemica et Biophysica Acta. 1763:1755-1766.
- Schwarz,K.,Ternes,W.,Schmauderer,E., 1992. Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. III. Stability of phenolic diterpenes of rosemary extracts under thermal stress as required for technological processes Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung, 195:104–107.
- Shaham, S.,2005. Glia–neuron interactions in nervous system function and development. Current Topics in Developmental Biology. 69:39–66.
- Shimpuku, H., Tachi, Y., Shinohara, M., Ohura, K., 2000. Effect of vitamin E on the degradation of hydrogen peroxide in cultured human umbilical vein endothelial cells. Life Sciences. 68(3):353-359.

Sienkiewicz, M., Lysakowska, M., Pastuszka, M., Bienias, W., Kowalczyk, E. 2013. The potential of use Basil and Rosemary essential oils as effective antibacterial agents. *Molecules*.18:9334-9351.

Sies, H., 1997. Physiological society symposium: impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress. *Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Experimental Physiology*.82:291-295.

Sies, H., 1991. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr*. 69(21-23):965-968.

Singh, R.P., Sharad, S., Kapur, S., 2004. Free radicals and oxidative stress in neurodegenerative diseases: Relevance of dietary antioxidants. *Journal of Indian Academy of Clinical Medicine* .5(3):218-225.

Singletary, K.W., Nelshoppen, J.M., 1991. Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene(DMBA)-induced mammary tumorigenesis and of in vivo formation of mammary DMBA-DNA adducts by rosemary extract. *Cancer Letters*.60(2):169-175.

Singleton, V.L., Orthofer, R, Lamuela-Raventós, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299:152-178.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150: 76-85.

Soliman, F.M., El-Kashoury, E.A., Fathy, M.M., Gonaïd, M.H. 1994. Analysis and Biological activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. from Egypt. *Flavour and Fragrance Journal*. 9:29-33.

Steinmetz, M.D., Vial, M., Millet, Y., 1987. Actions of essential oils of rosemary and certain of its constituents (eucalyptol and camphor) on the cerebral cortex of the rat in vitro. *Journal de Toxicologie Clinique et Expérimentale*.7(4):259-271.

Stocker, R., Glazer, A.N., Ames, B.N., 1987. Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.84(16):5918-5922.

Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonaght, A. F., Glazer, A. N., Ames, B. N. ,1987. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*. 235, 1043-1046.

Taddei,I., Giachetti, D., Taddei, E., Mantovani, P., Bianchi, E., 1988. Spasmolytic activity of peppermint, sage and rosemary essences and their major constituents *Fitoterapia* .59:463-468.

Tahraoui, A., El-Hilaly, J., Israili, Z.H., Lyoussi, B.,2007. Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province).*Journal of Ethnopharmacology* .110:105-117.

Takahashi, S., Abe, T., Gotoh, J., Fukuuchi, Y., 2002. Substrate-dependence of reduction of MTT: a tetrazolium dye differs in cultured astroglia and neurons. *Neurochemistry International*. 40:441-448.

Takuma, K., Babab,A., Matsuda, T., 2004. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Progress in Neurobiology*.72(2):111-127.

Tarpey,M.M., White, C.R., Suarez, E., Richardson, G., Radi, R., Freeman, B.A., 1999.Chemiluminescent detection of oxidants in vascular tissue: lucigenin but not coeleterazine enhances superoxide formation. *Circulation Reserche*.(84): 1203-11.

Taupin, P., 2010. Adult neurogenesis and neural stem cells as a model for the discovery and development of novel drugs. *Journal Expert Opinion on Drug Discovery*.5(10):921-925.

Tomer, D.P., McLeman, L.D., Ohmine, S., Scherer, P.M., Murray, B.K., O'Neill, K.L., 2007.Comparison of the total oxyradical scavenging capacity and oxygen radical absorbance capacity antioxidant assays. *Journal of Medicinal Food*.10:337-344.

- Trouillas, P., Calliste, C-A., Allais, D-P., Simon, A., Marfak, A., Delage, C., Duroux, J-L., 2003. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. *Food Chemistry*.80:399-407.
- Tuttolomondo1; T.,Dugob,G.,Rubertoc,G., Letoa, C, Napolic, E. M., Cicerob, N., Teresa Gervasib , Virgaa G.,Leonea,R.,Licataa,M.,La Bellaa, S., 2015. Study of quantitative and qualitative variations in essential oils of Sicilian *Rosmarinus officinalis* L., *Natural Product Research*. .20(29):1928–1934.
- Ullian, E.M., Sapperstein, S.K., Christopherson, S., Barres, B.A., 2001. Control of synapse number by glia.*Science*.291(5504):657-661.
- Ulusu, N.N., Tandoğan, B., 2007. Purification and kinetic properties of glutathione reductase from bovine liver. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 303(1):45-51.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.64:178-189.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007.Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*.39:44-84.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological Interactions*.160:1-40.
- Vallyathan, V., Shi, X., 1997. The Role of oxygen free radicals in occupational and environmental lung diseases. *Environmental Health Perspectives*. 105(1):165-177.
- Van Dyke, T.E., Braswell, S., Offenbacher, S., 1986. Inhibition of gingivitis by topical application of ebselen and rosmarinic acid.*19(5):376-377*.

- Varela,F.,Navarrete,P.,Cristobal,R.,Fanlo,M.,Melero,R.,Sotomayor,J.A.,Jordán,M.,Cabot,P.,Sánchez de Ron,D.,Calvo,R.,CasesM.A.,2009. Variability in the chemical composition of wild *Rosmarinus officinalis* L Acta Horticulturae., 826:167–174.
- Vargas, D.L., Tyor, W.R., 2017. Update on disease- modifying therapies for multiple sclerosis. Journal of Investigative Medicine.65(2):1-9.
- Ventura,R.E.,Goldman, J.E., 2007. Dorsal Radial Glia Generate Olfactory Bulb Interneurons in the Postnatal Murine Brain. The Journal of Neuroscience. 27(16):4297–4302.
- Verkhatsky, A., Parpura, V., Pekna, M., Pekny, M., Sofroniew, M., 2014. Glia in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. Biochemical Society Transactions. 42(5):1291-1301.
- Vicente, G., Martín, D., García-Risco, M.R., Fornari, T., reglero, G., 2012. Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves for use in edible vegetable oils. Journal of Oleo Science. 61(12):689-697.
- Volterra, A., Meldolesi, J., 2005. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. Nature Reviews Neuroscience.6:626-640.
- Wang, H., Joseph J.A., 1999. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. Free Radial Biology and Medicine. 27:612-616.
- Wang, S.Y., Chen,C-T., Sciarappa,W., Wang,C.Y., Camp,M.J., 2008. Fruit quality,antioxidant capacity, and flavonoid content of organically and conventionally grown blueberries. Journal of Agricultural and Food Chemistry.56:5788-5794.
- Wang, W., Li, N., Luo, M., Zu, Y., Efferth, T., 2012. Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components, Molecules, 17:2704–2713.

- Wei, T., Zhao, X., Hou, J., Ogata, K., Sakaue, T., Mori, A., Xin, W., 2003. The antioxidant ESeroS-GS inhibits NO production and prevents oxidative stress in astrocytes. *Biochemical Pharmacology*. 66:83-91.
- Willcox, J.K., Ash, S.L., Catignani, G.L., 2004. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 44(4): 275-295.
- Wilson, J.X., 1997. Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Canadian Journal physiology and Pharmacology*. 75(10-11):1149-1163.
- Wiseman, H., Halliwell, B., 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal* .313:17-29.
- Wojtunik-Kulesza, K.A., Oniszczyk, A., Oniszczyk, T., Waksmundzka-Hajnos, M., 2016. The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer's disease. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 78:39-49.
- Wollgast, J., Anklam, E., 2000. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*. 33(6):433-447.
- Wu, J.Q., Kosten, T.R., Zhang, X.Y., 2013. Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 46(1):200-206.
- Yang, J., Lee, J., Kim, E.Y., Shin, D.H., 2016. Myelin water fraction MRI in a case of clinically probable amyotrophic lateral sclerosis. *Korean Journal of Clinical Neurophysiology*. 18(1):18-20.
- Yesil-Celiktas, O., Nartop, P., Gurel, A., Bedir, E., Vardar-Sukan, F., 2007. Determination of phenolic content and antioxidant activity of extracts obtained from *Rosmarinus officinalis* calli. *Journal of Plant Physiology*. 164(11):1536-1542.

Yoshikawa, T., Naito, Y., 2002. What is oxidative stress? The journal of the Japan Medical Association .45(7):271-276.

Zelko, I.N., Mariani, T., Floz, R.J., 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. Free Radical Biology and Medicine.33 (3):337-349.

Zeng, J., Chen, L., Wang, Z., Chen, Q., Fan, Z., Jiang, H., Wu, Y., Ren, L., Chen, J., Li, T., Song, W., 2017. Marginal vitamin A deficiency facilitates Alzheimer's pathogenesis. Acta Neuropathological .27:1-16.

Zhang, Y., Leclercq, J., Moontoro, P., 2016.Reactive oxygen species in Hevea brasiliensis latex and relevance to tapping panel dryness. Tree Physiology Advance Access.1-9.

Zonta, M., Angulo, M.C., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K-A., Pozzan, T., Carmignoto, G., 2002. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. Nature Neuroscience.6:43-50.

RESUMEN

Las plantas medicinales son una gran fuente de compuestos dotados de actividad biológica y susceptibles de ser utilizados para el tratamiento de diferentes patologías. Entre ellas, la actividad antioxidante es una de las más estudiadas en la actualidad debido a la relación observada entre el estrés oxidativo, las especies reactivas de oxígeno y el desarrollo y progresión de algunas enfermedades. Así, una de las líneas prioritarias de investigación es la búsqueda de nuevos compuestos capaces de prevenir o al menos disminuir el impacto de los mediadores de oxidación a nivel fisiológico, a través de diferentes dianas bioquímicas.

Las reacciones de óxido-reducción son procesos fisiológicos encaminados a la liberación de diferentes sustancias necesarias en el metabolismo celular normal. Estas reacciones implican la transferencia de electrones y pueden generar compuestos denominados radicales libres (RL) entre los cuales destacan los radicales libres de oxígeno (EROs), con una elevada reactividad química. El estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre la producción de dichos RL y la capacidad de un sistema biológico de neutralizarlos rápidamente, con el fin de proteger el daño causado a proteínas, lípidos o incluso ADN. Los compuestos antioxidantes son aquellos que, a bajas concentraciones, son capaces de prevenir el daño oxidativo mediado por RL a través de diferentes mecanismos: captación directa de EROs, modulación de la actividad enzimática, quelación de iones metálicos (Fe⁺³, Cu⁺), etc.

El romero (*Rosmarinus officinalis* L.) es una planta aromática que crece de forma espontánea en toda la zona mediterránea. Las partes aéreas y el aceite esencial de romero se han utilizado en medicina tradicional desde la antigüedad para el tratamiento de diferentes afecciones. La hoja de romero es rica en compuestos polifenólicos con actividad antioxidante, mientras que su aceite esencial presenta una composición compleja y variable en función de su origen geográfico, estado fenológico y momento de la recolección. De acuerdo con la estructura del esqueleto carbonado de los principales componentes del aceite esencial, se pueden encontrar tres tipos biogénicos: tipo eucaliptol (Italia, Marruecos y Túnez), tipo alcanfor-borneol (España) y tipo α -pineno-verbenona (Francia, Córcega).

En este contexto, se aborda el análisis fitoquímico de muestras de *R. officinalis* recolectadas en el mismo estado fenológico (floración) en distintas localizaciones del área central de la península Ibérica, con el fin de estudiar la composición química de su aceite esencial por CG y su composición en compuestos fenólicos (flavonoides y ácidos fenólicos) por HPLC, así como evaluar su actividad en una línea celular de astrocitos humana con el objetivo de determinar su eficacia neuroprotectora a través de su actividad antioxidante directa y/o moduladora de la respuesta celular.

Aceite esencial

A partir de las partes aéreas secas y groseramente troceadas, sometidas a hidrodestilación en un aparato Clevenger durante 2h a presión atmosférica, se obtiene el aceite esencial cuyo rendimiento se evalúa por gravimetría. El rendimiento obtenido para las 14 muestras recolectadas es variable, oscilando entre 1,2 y 3,4%. La muestra recolectada en la comunidad de Madrid presenta un valor intermedio, del 2,3%. Dichas variaciones pueden responder a los cambios en las condiciones climáticas y geográficas de los distintos municipios, y coinciden con los datos publicados previamente por otros autores.

El estudio de la composición del aceite esencial por CG permite la identificación y cuantificación de un 70% de sus componentes en un único análisis: α -pineno, canfeno, β -pineno, mirceno, limoneno, 1-8 cineol, γ -terpineno, p-cimeno, acetato de bornilo, alcanfor, borneol, α -terpineol y verbenona. Se observa una mayor abundancia de monoterpenos oxigenados (28% a 77%) y menor proporción de hidrocarburos monoterpénicos (7% a 51%). En todas las muestras se han identificado α -pineno, p-cimeno, 1,8-cineol, alcanfor, borneol, verbenona y α -terpineol, siendo los componentes más abundantes: 1,8-cineol, alcanfor y α -pineno, composición que coincide con el romero tipo alcanfor-borneol, predominante en la Península Ibérica.

El estudio preliminar de su actividad antioxidante mediante los métodos ORAC y DPPH muestra una actividad significativa, con valores de $1,19 \pm 0,15 \mu\text{mol Trolox/mg}$ aceite esencial y un IC_{50} superior a 650 mg/ml , respectivamente.

Al comparar los resultados de actividad antioxidante no se observan diferencias estadísticamente significativas entre las muestras, por lo que los siguientes ensayos se realizan únicamente con la muestra procedente de Madrid.

Los estudios de neuroprotección se llevan a cabo sobre cultivo de astrocitos, línea celular U373MG, con el fin de elucidar los posibles mecanismos que permitan explicar el efecto antioxidante previamente observado, usando peróxido de hidrógeno 1mM como agente inductor de daño oxidativo. El efecto directo del aceite esencial sobre la viabilidad celular se evalúa mediante el método de reducción del MTT, con concentraciones crecientes entre $0,5$ y $250 \mu\text{g/ml}$ durante 24h . Como control positivo se utilizan células no tratadas y como control negativo, Tritón X-100. El tratamiento con el aceite esencial de romero no es citotóxico en entre $0,5$ y $12,5 \mu\text{g/ml}$. Al ensayar su efecto protector, se observa que el pretratamiento con las diferentes concentraciones de aceite esencial de romero ($0,5$ a $250 \mu\text{g/ml}$) consigue revertir parcialmente el daño provocado con el agente oxidante, sin observarse diferencias significativas frente al control. Las concentraciones más eficaces se encuentran entre $0,5$ y $12,5 \mu\text{g/ml}$. Además de su efecto protector en la supervivencia celular, se observa también una recuperación de las características morfológicas normales de las células. A partir de estos resultados se seleccionan las concentraciones más adecuadas para continuar el estudio: $1\mu\text{g/ml}$, $2,5\mu\text{g/ml}$, $5\mu\text{g/ml}$ y $12,5\mu\text{g/ml}$.

La capacidad de aumentar la formación de radicales libre se evaluó mediante el ensayo de DCFH-DA. El tratamiento con el aceite esencial no incrementa la producción de EROs, a diferencia del agente tóxico H_2O_2 , que la incrementó en un 34% . El tratamiento previo con el aceite esencial produjo una disminución significativa en la producción de EROs.

El efecto del aceite esencial de romero sobre el sistema de GSH y GSH/GSSG se determina por fluorescencia con OPT como marcador de fluorescencia. El tratamiento de las células con peróxido de hidrógeno provoca una elevación de los niveles de glutatión oxidado, con aumento del índice redox. Esto implica una disminución de la capacidad de respuesta antioxidante celular. El pretratamiento de las células con el aceite esencial de romero a 1 µg/ml, 24h antes de la adición del peróxido de hidrógeno, previene las alteraciones provocadas por el mismo, observándose una normalización del índice redox debido fundamentalmente al incremento de los valores de GSH.

Al estudiar el efecto del aceite esencial sobre la actividad del sistema antioxidante enzimático de la CAT, se observa un incremento de la actividad enzimática para las concentraciones más altas.

Estos resultados indican que la disminución observada en los niveles de EROs en las células tratadas con el aceite esencial de romero puede ser debida, al menos en parte, a un incremento en la actividad de los sistemas antioxidantes tanto no enzimáticos (GSH) como enzimáticos (CAT).

Por otro lado, al estudiar la actividad del enzima caspasa-3 como principal enzima efector de apoptosis, se observa que el incremento en su actividad inducido por el peróxido de hidrógeno es revertido con el aceite esencial, de forma que la actividad del enzima pro-apoptótico se mantiene dentro de los valores normales obtenidos en el grupo control (células no tratadas). Por lo tanto, se puede afirmar que el aceite esencial de romero ejerce un efecto anti-apoptótico.

Los niveles de MDA se estudian como medida del daño celular provocado por el estrés oxidativo. El tratamiento de las células con peróxido de hidrógeno induce un incremento significativo en la liberación de MDA que desaparece con el tratamiento previo de las células con distintas concentraciones de aceite esencial, siendo particularmente activa la concentración de 2,5 µg/ml.

Extracto metanólico

A partir de las partes aéreas secas y groseramente troceadas, se obtiene el extracto metanólico cuyo rendimiento se evalúa por gravimetría. El rendimiento obtenido para las 14 muestras recolectadas es variable, oscilando entre 11 y 21%. La muestra recolectada en la comunidad de Madrid presenta un valor intermedio, del 2,3%, aproximadamente.

La composición en compuesto fenólicos del extracto metanólico se analiza por HPLC, pudiéndose identificar y cuantificar 27 compuestos fenólicos en un único análisis. Aunque se observa cierta variabilidad en su composición, atribuible a su diferente origen geográfico, los flavonoides quercitrina, miricetina, hesperetina, xantona, vitexina y apigenina, así como los ácidos fenólicos clorogénico, rosmarínico y 4-OH cinámico, se han detectado en todas las muestras.

Los compuestos fenólicos más abundantes en el romero son los flavonoides (hasta 93%), destacando su contenido en rutina y miricetina.

En primer lugar se realiza el estudio preliminar de su capacidad antioxidante *in vitro*, valorando su capacidad de absorción del radical oxígeno (método ORAC). Los resultados indican una actividad significativamente alta para todas las muestras ensayadas, con un valor medio de $3,00 \pm 0,23$ $\mu\text{mol Trolox/mg extracto}$, tomando como referencia el Trolox, análogo hidrosoluble de la vitamina E. El estudio de su actividad captadora de radicales libres derivados de DPPH muestra resultados similares, con un valor medio de IC_{50} de 7,84 mg/ml.

Estos valores indican un elevado potencial antioxidante para el extracto metanólico de *R. officinalis*, diferencias estadísticamente significativas entre las muestras ensayadas, por lo que los estudios de actividad biológica en cultivos celulares se llevan a cabo únicamente con la muestra procedente de la Comunidad de Madrid como representante de todas las muestras de *R. officinalis* recolectadas para este estudio.

El efecto directo del tratamiento con el extracto metanólico sobre la viabilidad celular de astrocitos (6,25 a 800 $\mu\text{g/ml}$ durante 24h) muestra la falta de toxicidad para la línea celular U-373MG. En cuanto a su efecto protector frente a un modelo

de estrés oxidativo inducido por H_2O_2 1mM, las concentraciones de 12,5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ y 100 $\mu\text{g/ml}$ son capaces de mantener e incluso incrementar la supervivencia celular, por lo que dichas concentraciones se seleccionan para continuar el estudio.

En el ensayo de actividad antiradicalaria mediante el ensayo de la diclorofluoresceína (DCFH-DA), el incremento en EROs producido por el peróxido de hidrógeno es revertido por el extracto metanólico de romero.

En cuanto a la actividad sobre los niveles de GSH y GSSG, el incremento de GSSG provocado por peróxido de hidrógeno es revertido por el pretratamiento con el extracto metanólico de romero, que consigue mantener los niveles de GSH en valores normales, con ligera elevación de GSSG pero con un índice redox similar al del grupo control (diferencia no estadísticamente significativa).

En cuanto al efecto del tratamiento con el extracto metanólico sobre los niveles de CAT, no se observan variaciones estadísticamente significativas. Los valores permanecen similares a los obtenidos con el grupo control. Esta falta de respuesta a nivel enzimático puede explicarse en base al hecho de que la célula ha visto aumentada su defensa antioxidante (menor producción de EROs, mayor actividad de GSH) y no es necesario que se produzca una mayor liberación del enzima.

En el caso de la actividad de la caspasa-3, el tratamiento previo con distintas concentraciones de extracto metanólico de romero aceite esencial es capaz de proteger a las células, de forma que la actividad del enzima pro-apoptótico se mantiene dentro de los valores normales obtenidos en el grupo control para tres de las concentraciones ensayadas (12,5 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ y 100 $\mu\text{g/ml}$), por lo que se puede afirmar que el extracto de romero ejerce un efecto anti-apoptótico.

Finalmente, el incremento significativo en la liberación de MDA provocado por el peróxido de hidrógeno es reducido por el tratamiento previo con el extracto metanólico de romero, siendo particularmente activa la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$.

En base a todos los resultados obtenidos, se puede concluir que tanto el aceite esencial como el extracto metanólico de *R. officinalis* ejercen una actividad antioxidante y protectora sobre la línea celular de astrocitos humana U373-MG sometida al daño oxidativo provocado por el agente inductor H₂O₂. Dicho efecto protector se refleja en su capacidad captadora de radicales libres, su capacidad protectora en cuanto a viabilidad y morfología celulares, aumento de la actividad de los sistemas antioxidantes endógenos (enzimáticos y no enzimáticos), disminución de la muerte celular por apoptosis e inhibición de la peroxidación lipídica. Todo ello se traduce un importante efecto neuroprotector frente al estrés oxidativo.

SUMMARY

Medicinal plants are a great source of active substances endorsed with different mechanisms of action able to be applied for human diseases. Among them, the antioxidant activity is one of the main studied effects due to the relationship between oxidative stress and reactive oxygen species (ROS) and several pathologies development. Nowadays, one of the priorities in pharmacological research is the obtaining of new agents capable of prevent or at least decrease the impact of these oxidation mediators at physiological level by acting on different biochemical or pharmacological targets.

Oxidative reactions are physiological processes aimed to release different substances which are needed in cellular metabolism. These reactions involve the transfer of electrons and may generate compounds known as ROS, among which there are the free radicals (FR) and oxygen derived molecules with high reactivity. Oxidative stress is defined as the imbalance between the production of free radicals and the ability of a biological system to quickly detoxify the reactive intermediates and repair the damage caused at protein, lipid and DNA levels. Antioxidant compounds are defined as those which at low concentration are capable of preventing oxidative damage mediated by free radicals trough different pathways such as a direct uptake of ROS, modulation of enzyme activity or chelating metal ions (Fe⁺³, Cu⁺), among others.

Rosmarinus officinalis L. (Lamiaceae), commonly known as rosemary, is an aromatic shrub spontaneously growing in the Mediterranean regions. Both aerial parts and essential oil of Rosemary have been used in folk medicine since ancient times for the treatment of asthenia, hypotension, permanent weakness, as carminative and to improve peripheral circulation, among others. Rosemary leaf is rich in polyphenolic compounds with antioxidant activity. Phenolic compounds such as flavonoids and phenolic acids exert broad pharmacological effects such as antiproliferative, antitumour, antiinflammatory, apoptosis-inducing and antioxidant activities which provide important health benefits related to metabolic syndrome, cancer, brain health and immune system. Previous *in vitro* studies with rosemary showed that the antioxidant potential is mainly related to phenolic diterpenes,

such as carnosic acid, carnosol and rosmanol. On the other hand, the essential oil (e.o.) obtained from Rosemary aerial parts shows a complex composition which varies according the plant geographic origin or phenological stage.

This experimental work is focused in the phytochemical study of spontaneous samples of *R. officinalis* L. collected in the same phenological period (flowering) in different locations within the Iberian peninsula, with the aim of assessing the chemical composition of the essential oil by GC and phenolic composition (flavonoids and phenolic acids) by HPLC. Then, the evaluation of the biological activity of both essential oil and extract is performed using a cellular line of human astrocytoma (U-373MG) with the aim of assessing the neuroprotective potential through its direct or indirect antioxidant activity.

Essential oil

The essential oil was obtained by hydrodistillation of the dried ground material in a Clevenger-like apparatus with two replications for each sample. The evaluation of the essential oil yield led to a variation among 1.2 and 3.4%. Sample collected in Madrid area showed an intermediate value of 2.3%. The observed differences are in accordance with previous data and may be due to the different geographic and climatic areas.

The GC analysis allowed the identification and quantification of nearly 70% of the chemical components of the essential oil: α -pinene, camphene, β -pinene, mircene, limonene, 1,8-cineol, γ -terpinene, p-cimene, bornyl acetate, camphor, borneol, α -terpineol and verbenone were detected in one single analysis. A higher percentage of oxygenated monoterpenes was observed (28% to 77%) with a lower proportion in hydrocarbon monoterpenes (7% to 51%). α -pinene, p-cimene, 1,8-cineol, camphor, borneol, verbenone and α -terpineol have been detected in every sample. 1,8-cineol, camphor and α -pinene were the most abundant, this indicating that the analyzed rosemary oil corresponds to camphor-cineol type, which is predominant in the Iberian peninsula.

The preliminary study of the antioxidant ability of the essential oil by the ORAC and DPPH methods showed a significant antioxidant and scavenging activity, with values of 1.19 ± 0.15 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ essential oil and IC_{50} superior to 650 mg/ml, respectively.

No statistically significant differences were found among samples in relation to their antioxidant ability, so the following experiments were only performed with the sample from Madrid.

Neuroprotective studies were performed with the human astrocytome line U-373MG, with 1mM H_2O_2 as toxic. First of all, direct effect on cell viability was tested by MTT method with a wide range of concentrations (0.5 to 250 $\mu\text{g/ml}$) for 24h. Untreated cells were used as positive control, while Triton X-100 was chosen as the negative control. Rosemary essential oil was non-toxic for concentrations ranging from 0.5 to 12.5 $\mu\text{g/ml}$. The protective effect of the e.o. was then assayed. Pretreatment with 0.5 to 12.5 $\mu\text{g/ml}$ e.o. during 24h before the stress induction by 1mM H_2O_2 allows the recovering of the induced injury, not only related to the cell number but also to the cell morphology. The concentrations of 1 $\mu\text{g/ml}$, 2.5 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ and 12.5 $\mu\text{g/ml}$ were then chosen for the following experiments.

First, the ability to increase the formation of free radicals at cellular level was evaluated by the DCFH-DA assay. Treatment with the e.o. did not increase ROS production, while 1mM H_2O_2 induced a 34% increase when compared to control group. Pretreatment of cells with the e.o. before H_2O_2 exposure protected cells from oxidative injury with a significant decrease in ROS levels.

Then the effect of the e.o. on the GSH levels were evaluated with OPT as fluorescence marker. Treatment with H_2O_2 induced a decrease in GSH levels and an increase in redox index, this indicating a diminution in the cellular antioxidant response. Pretreatment with 1 $\mu\text{g/ml}$ e.o. for 24h before H_2O_2 exposure prevented the damage, with a recovery of the redox index mainly due to the increase in GSH levels.

When assessing the effect of the e.o. on the CAT activity, an increase in the enzymatic activity was observed for the highest tested concentrations.

In summary, the results showed that the observed decrease in ROS levels in cells treated with Rosemary essential oil may be due, at least in part, to an increase in the activity of antioxidant defenses, both non-enzymatic (GSH) and enzymatic (CAT).

On the other hand, the influence of the e.o. on cellular apoptosis mediated by caspase-3 was evaluated. Treatment with H₂O₂ induced an increase in caspase-3 activity which was reverted by pre-treatment with the e.o. Thus, an anti-apoptotic effect for Rosemary e.o. was detected.

MDA levels were measured as a marker of cell damage. The statistically significant increase in MDA levels induced by H₂O₂ was reverted until control values when treated with 2.5 µg/ml e.o.

Methanolic extract

Methanolic extract was obtained from dried samples and evaluated gravimetrically. The final yield was variable, between 11 and 21%. The HPLC analysis allowed the identification and quantification of 27 phenolic compounds. The flavonoids quercitrin, miricetin, hesperetin, xanthone, vitexin and apigenin, together with the phenolic acids chlorogenic, rosmarinic and 4-OH cinnamic were detected in every sample.

The preliminary study of the antioxidant ability of the methanolic extract by the ORAC and DPPH methods showed antioxidant and scavenging activity, with values of $3,00 \pm 0,23 \mu\text{mol Trolox/mg extract}$ (with reference to Trolox as the positive antioxidant standard) and IC₅₀ superior to 7,84 mg/ml, respectively. These results showed a high antioxidant potential for Rosemary extract, these data being in agreement with previously published results by other authors.

No statistically significant differences were found among samples in relation to their antioxidant ability, so the following experiments were only performed with the sample from Madrid.

Neuroprotective studies performed with the human astrocytome line U-373MG showed that concentrations of the methanolic extract ranging from 6.25 to 800µg/ml for 24h were non-toxic. Moreover, when assaying the protective effect against the oxidative injury induced by 1mM H₂O₂, concentrations of 12.5µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml and 100µg/ml are able to keep and even increase cell survival and thus they are chosen for the following studies.

First, the ability to increase the formation of free radicals at cellular level was evaluated by the DCFH-DA assay. Treatment with the methanolic extract reverted the ROS increase induced by H₂O₂.

In relation to the effect on GSH levels, the increase GSSG and decrease in GSH induced by H₂O₂ was reverted by pretreatment with the methanolic extract, with no statistically significant differences with respect to control group.

When assessing the effect of the methanolic extract on the CAT activity, no statistically significant differences were shown. This lack of response may be due to the fact that cells have improved their own antioxidant defense (lower ROS production, increased GSH activity) and there is no need to increase the CAT release.

The effect of the methanolic extract on cellular apoptosis mediated by caspase-3 was shown as a decrease in the enzymatic activity evaluated, especially for 12.5µg/ml, 50µg/ml and 100µg/ml concentrations.

In relation to MDA levels, the significant increase in MDA levels induced by H₂O₂ was reverted when treated with 50µg/ml methanolic extract.

Summary

In conclusion, and taking in account all the previous results, both essential oil and methanolic extract from *R. officinalis* L. were endorsed with antioxidant and neuroprotective activity in the human cellular line U373-MG when submitted to oxidative injury by H₂O₂.

This effect was revealed through a free-radicals scavenging activity, protective effect in relation to cell viability and morphology, an increase and the activity of endogenous antioxidant defenses (both enzymatic and non-enzymatic), a decrease in cellular death induced by apoptotic enzymes and a decrease in lipid peroxidation.

All these actions imply a strong neuroprotective effect against oxidative damage for *Rosmarinus officinalis* L.