

**ARTÍCULO ORIGINAL****Actividad neuroprotectora del aceite esencial de Salvia lavandulifolia Vahl.****Neuroprotective activity of Salvia lavandulifolia Vahl. Essential oil.****Porres Martínez M\*, Gómez-Serranillos MP, Carretero Accame ME**

Department of Pharmacology. Faculty of Pharmacy. Universidad Complutense of Madrid.

Avda. Complutense s/n 28040 MADRID

\*mariaporresmartinez@gmail.com

---

**RESUMEN**

---

**INTRODUCCIÓN:** El advenimiento de la biología molecular ha agregado una nueva dimensión al proceso de descubrimiento de nuevos fármacos dirigidos hacia el concepto de las terapias avanzadas donde medicamentos clásicos coexistirán con células madre, genes y tejidos transformados ex vivo. Existen muchos tipos de células madre y todos ellos comparten las características de ser capaces de renovarse y dar lugar a progenie diferenciada.

El presente trabajo, compara y reflexiona sobre el desarrollo farmacéutico de un medicamento convencional con un medicamento celular. Ambos presentan la misma forma de dosificación, suspensión de un principio activo: de síntesis para el medicamento convencional y células para el medicamento celular; en un medio acuoso, contenido en una jeringa como acondicionamiento primario.

**METODOLOGÍA:** La fabricación de inyectables requiere de más cuidados que cualquier otra forma farmacéutica clásica debido a su vía de administración. Un inyectable debe cumplir, entre otras, con las siguientes características: isotonía, ausencia de pirógenos, y de esterilidad. Sin embargo en la preparación de una suspensión celular, el producto final no puede ser esterilizado, ya que las células deben ser viables para poder mantener sus características terapéuticas. La esterilidad del medicamento celular, deberá ser aportada en el proceso de producción, clase A sobre un entorno clase B.

**CONCLUSIÓN / DISCUSIÓN:** Los métodos de preparación y control de inyectables convencionales son procedimientos que no pueden utilizarse en el medicamento celular ya que dichas técnicas son incompatibles con la viabilidad de células mesenquimales, por lo que el método de elaboración del activo celular para la misma forma de dosificación debe realizarse en condiciones controladas. Así pues el desarrollo galénico de ambos medicamentos difiere y deberá ser considerado en cuanto a la tecnología farmacéutica se refiere.

---

**PALABRAS CLAVE:** Salvia lavandulifolia, aceite esencial, neuroprotección, astrocitos.

---

**ABSTRACT**

---

**INTRODUCTION**

Neurodegenerative diseases are becoming more and more common and they represent one of the major public health problems. These diseases are related to oxidative stress, which is caused, among other factors, by an overproduction of free radicals. There are few studies regarding the beneficial effect of essential oil of Salvia lavandulifolia Vahl. (Spanish Sage) on cognitive function, memory and attention in people with dementia and even in the healthy population. In these studies, the effect is mainly ascribed to the capacity to inhibit the acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes, as well as, to their anti-inflammatory, antioxidant and estrogen properties. However, so far it has been not determined a neuroprotective activity based on its antioxidant capacity.

**OBJETIVE**

We have evaluated the neuroprotective activity of essential oil from different samples of Salvia lavandulifolia, studying their antioxidant capacity and using for this purpose astrocytes as glial cells,

---

Fecha de recepción (Date received): 15-04-2010

Fecha de aceptación (Date accepted): 10-06-2010

Ars Pharm 2010; 51.Suplemento 3: 657-675.

---

which carry out an important function in the central nervous system.

#### METHODOLOGY

The essential oil extracted was studied by gas chromatography to determine its composition. Its effect on survival, proliferation and cytotoxicity in cells was quantitatively evaluated using the technique of bromide 3 - (4, 5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-difeniltetrazol (MTT), just as its protective effect against toxic (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). The intracellular generation of free radicals was also measured using dichlorofluorescein (DCFH-DA) technical as well as the ability of essential oil to reduce free radicals production induced by hydrogen peroxide.

#### CONCLUSION /DISCUSSION

The main components of the samples studied are: 1.8-cineole, camphor and  $\alpha$ -pinene. The essential oil of *S. lavandulifolia* exerts a protective effect on astrocytes against hydrogen peroxide, increasing significantly viability of cells under oxidative stress conditions. None of the samples generated free radicals on the cell line of the study as dichlorofluorescein technique showed. The essential oil also demonstrated a slight free radical scavenger capacity.

---

**KEYWORDS:** *Salvia lavandulifolia*, essential oil, neuroprotection, astrocytes.

---

## 1. INTRODUCCIÓN

A medida que la población envejece, las enfermedades neurodegenerativas son cada vez más frecuentes y representan un serio problema de salud pública, dado que afectan a la función cerebral de forma progresiva. Estas enfermedades están relacionadas con el estrés oxidativo, que es causado, entre otros factores, por una sobreproducción de radicales libres.

En la actualidad sólo existen fármacos que mejoran de forma paliativa y temporal el déficit cognitivo de los pacientes. Por eso es importante desarrollar nuevas alternativas modificadoras del proceso neurodegenerativo, que eviten o al menos retrasen la muerte neuronal. Las plantas medicinales que poseen aceites esenciales pueden constituir una fuente de principios activos con actividad antioxidante. Existen estudios sobre el efecto beneficioso del aceite esencial de *Salvia lavandulifolia* (*Salvia* española) sobre las funciones cognitivas, la memoria y la atención de personas con demencia<sup>1,2</sup> e incluso en la población sana. Esta acción se debe principalmente a la inhibición de las enzimas acetilcolinesterasa<sup>3</sup> y butirilcolinesterasa<sup>4</sup>, así como a sus efectos antiinflamatorios, antioxidantes y estrogénicos.

El **objetivo** principal de este trabajo es evaluar la actividad neuroprotectora de diferentes muestras de aceite esencial de *Salvia lavandulifolia*, estudiando su capacidad antioxidante, utilizando para ello cultivos celulares, concretamente astrocitos, células gliales que realizan una importante función en el sistema nerviosos central.

### 1.1. SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)

El SNC de un humano adulto posee unas 100.000 millones de células: neuronas y células de la glía. La glía supone la mayor parte de las células del sistema nervioso y es necesaria para el correcto funcionamiento del cerebro. Las células de la glía se pueden clasificar en macroglía (astrocitos y oligodendrocitos) y microglía, y poseen un papel importante en la memoria y el aprendizaje.

Los **astrocitos**, a los que se puede considerar las células gliales más importantes en el cerebro; son de origen neuroectodérmico y presentan forma estrellada. En la actualidad se sabe que aparte de su función estructural, realizan un papel importante en el sistema nervioso: mantienen el medio extracelular, estabilizan la comunicación célula-célula, regulan el flujo sanguíneo cerebral, participan en el mantenimiento de la sinapsis, también mantienen el metabolismo neuronal y la síntesis de neurotransmisores, interviniendo en el desarrollo y mantenimiento de la barrera hematoencefálica<sup>5</sup>. Los astrocitos poseen un papel neuroprotector, determinados estudios indican que la apoptosis de los mismos puede contribuir al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Además, estas células realizan un papel protector de las neuronas frente a distintas agresiones como el estrés oxidativo<sup>6</sup>.

El sistema nervioso central es especialmente sensible al **estrés oxidativo**, que se caracteriza por un estado de oxidación de moléculas vitales originando una modificación secundaria de su estructura y función biológica y produciendo, con el paso del tiempo, el deterioro de las moléculas orgánicas y la pérdida de su función biológica en los seres vivos<sup>7</sup>. Con la edad el estrés oxidativo aumenta, lo que incrementa la susceptibilidad de desarrollo de enfermedades neurodegenerativas al producirse un exceso de radicales libres.

## 1.2. Salvia lavandulifolia Vahl.

El término Salvia significa “la que salva”, y la reputación como tal de este género llega hasta nuestros días.

### 1.2.1. Clasificación taxonómica

- Familia: Lamiaceae
- Género: *Salvia*
- Especie: *Salvia lavandulifolia* Vahl.
- Otros nombres: Salvia española, mariselva, sielva, Spanish sage (inglés).

### 1.2.2. Características de la especie

- Descripción botánica

*Salvia lavandulifolia* Vahl. es un pequeño arbusto muy ramificado y aromático que alcanza hasta 50cm de altura. Los tallos son leñosos en la base, con numerosas ramificaciones herbáceas y pubescentes de forma ascendente o erecta. Las hojas (50 mm) son opuestas, simples, pecioladas (5 mm) y con las nerviaciones muy marcadas. La floración se produce hacia finales de primavera y las flores se agrupan en el extremo de las ramas, con apariencia de espigas. La corola (20-25 mm), pubescente es de color azul claro a lila, de hasta 25 mm de longitud, abierta en dos labios en su parte distal: el superior tiene forma de casco y está formado por dos pétalos mientras que el inferior lo forman tres pétalos. Se encuentra en zonas templadas y cálidas del Mediterráneo occidental, en terrenos montañosos con suelo calizo<sup>8,9</sup>.

---

- Composición química:

Las sumidades floridas contienen principalmente aceite esencial (1,0-2,8%), terpenos, flavonoides y ácidos fenólicos (ácido rosmarínico)<sup>10</sup>.

- Usos

Tradicionalmente se emplea en trastornos nerviosos y crisis asmáticas. Por vía tópica se utiliza por su acción antirreumática y antitranspirante. También se usa para disminuir la viscosidad sanguínea, como hipotensor y en trastornos menstruales. Algunos estudios demuestran su actividad hipoglucemiante<sup>11</sup>. Además, se utiliza popularmente como aromatizante de alimentos y para sanear los armarios.

### 1.2.3. Aceite esencial

Los aceites esenciales son mezclas complejas volátiles, obtenidas a partir de especies vegetales aromáticas mediante procesos físico-químicos, principalmente por arrastre en corriente de vapor de agua. Posteriormente se separa de la fase acuosa por métodos físicos. Son líquidos oleosos a temperatura ambiente, volátiles y poco coloreados, proporcionando un olor característico a las especies vegetales que los contienen<sup>12</sup>. En las *Lamiaceae* se almacena en pelos secretores.

- Composición Química:

El aceite esencial de *Salvia lavandulifolia* es una mezcla compleja y presenta una alta variabilidad intraespecífica en las diferentes muestras. El clima, el origen geográfico, así como el estadio vegetativo en el momento de la recolección influyen en las cualidades del aceite esencial de esta planta aromática<sup>13</sup>.

Está constituido principalmente por monoterpenos, entre los que destacan: hidrocarburos bicíclicos como  $\alpha$ -pineno (4-11%), sabineno (0,1-3%), limoneno (2-5%); alcoholes acíclicos (linalol 0,5-9%), bicíclicos (borneol 1-8%), monocíclicos (terpen-1-en-4-ol <2%); cetonas bicíclicas como tuyonas (< 0,5%) y alcanfor (11-36%); ésteres acíclicos como acetato de linalilo (<5%); éteres como 1,8-cineol o eucaliptol (11-25%) y acetato de sabinilo<sup>14</sup>.

- Actividad farmacológica

Se ha determinado que 1,8-cineol,  $\alpha$  y  $\beta$  pineno, borneol y alcanfor presentan una actividad **inhibitoria del enzima acetilcolinesterasa**<sup>1,2,15</sup> lo que ejerce un efecto beneficioso en las capacidades **cognitivas**. También podrían estar implicadas otras vías de actuación en los efectos positivos que ejerce sobre la memoria esta especie de *Salvia*, como es su capacidad **antioxidante**, atribuida al 1,8-cineol, linalol y  $\alpha$  y  $\beta$  pineno<sup>4,16</sup>; mientras que  $\alpha$ -pineno es **antiinflamatorio** y geraniol **estrogénico**<sup>17</sup>. El conjunto de estas actividades tiene un efecto positivo en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas<sup>10</sup>, producido por complejas

interacciones entre los terpenos que forman el aceite esencial. Por ejemplo, existe una actividad sinérgica entre el 1,8-cineol y  $\alpha$ -pineno u óxido de cariofileno<sup>18</sup> y una actividad antagonista con el alcanfor, efectos prooxidantes<sup>19</sup>. Además de su indudable interés en las funciones cognitivas, también posee otras actividades como antiespasmódica o antibacteriana<sup>20</sup>.

- Toxicidad

*Salvia lavandulifolia* no se considera tóxica, salvo que se use a muy elevadas concentraciones. Entre sus componentes, algunos han mostrado toxicidad:

- **Acetato de sabinilo** (0,1-24%) atraviesa la barrera placentaria y produce toxicidad fetal y efectos abortivos<sup>21</sup>, así como hepatotoxicidad<sup>22</sup>.
- **Alcanfor**: produce náuseas, vómitos, efectos convulsivos (a dosis elevadas), estado epiléptico, así como hepatotoxicidad y neurotoxicidad<sup>23</sup>.
- **Tuyonas**: son responsables de crisis convulsivas y epilépticas, aunque su presencia en *S. lavandulifolia* es mucho menos significativa (<1,5%) y por tanto menos tóxica que en otras especies del mismo género, como en *Salvia officinalis*<sup>24</sup>.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. MATERIAL

#### 2.1.1. Material Vegetal

Las partes aéreas de los dos primeros ejemplares de salvia española fueron cultivadas en Solsona (Lérida) en el año 2008, procedentes de un ensayo de influencia del riego y densidad de plantación. Ambas muestras tuvieron un porcentaje de riego del 80% y una distancia entre plantas de 0,6 m, pero se diferenciaban en la distancia entre líneas. La muestra nº 1 presentaba una distancia entre líneas de 1,2 m y la muestra nº 2 de 0,8 m. Mientras la muestra nº 3 recolectada en marzo de 2010 procede del Centro de ensayo de evaluación de variedades de Aranjuez (Madrid) INIA. Una vez recolectadas, se desecaron convenientemente extendidas a temperatura ambiente y se guardaron en lugar fresco y seco hasta el momento de la destilación. Los ejemplares fueron proporcionados y autenticados en el Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Ministerio de Ciencia e Innovación (INIA). En los ensayos se han utilizado los aceites esenciales procedentes de las tres muestras citadas anteriormente y su composición se determinó mediante cromatografía de gases.

#### 2.1.2. Cultivos celulares

El estudio de la posible actividad neuroprotectora de *Salvia lavandulifolia* se ha llevado a cabo utilizando la línea celular U-373 MG, procedente de astrocitoma humano, manteniéndola en incubador a 37°C y en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% para su supervivencia

óptima. El *medio de cultivo* utilizado para esta línea celular está compuesto por Medio basal Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) con glucosa, L-glutamina, HEPES y sin piruvato; con un contenido adicional de gentamicina al 0,5% para prevenir el crecimiento de bacterias, suero fetal bovino (FBS) al 10% para el medio de crecimiento o al 1 % para el medio de mantenimiento. Se conserva en nevera a una temperatura entre 2-8°C.

## Tóxico

El tóxico seleccionado para favorecer la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), ha sido el peróxido de hidrógeno, siendo el radical hidroxilo que se forma el responsable de los efectos citotóxicos. Origina radicales libres por la reacción de Haber-Weiss ( $O_2^- + H_2O_2 \rightleftharpoons O_2 + \cdot OH + OH$ ). El aumento de la formación de peróxido de hidrógeno produce un incremento del estrés oxidativo, que a su vez produce un incremento en la formación de radicales libres que juegan un papel importante en la muerte neuronal en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas<sup>25</sup>. Se ha utilizado una concentración de 1 mM<sup>26</sup>. Además, como control negativo se ha utilizado Tritón X-100 por la elevada mortalidad celular que produce.

## 2.2. MÉTODOS

### 2.2.1. Extracción del aceite esencial

Las sumidades floridas de *Salvia lavandulifolia*, una vez desecadas se sometieron a extracción por destilación por arrastre en corriente de vapor de agua (Real Farmacopea Española), obteniéndose los aceites esenciales correspondientes.

### 2.2.2. Cromatografía de gases (CG)

Los aceites esenciales extraídos previamente, se estudiaron por CG para separar y analizar las mezclas de sustancias volátiles, aplicando las siguientes condiciones instrumentales y analíticas:

- Cromatógrafo: Hewlett Packard 6890
- Detector de ionización de llama (FID)
- Temperatura del detector: 250°C
- Columna: capilar de 30 m de longitud, 5% fenil metil-silicona
- Gradiente de temperatura: 70 a 240°C con una variación de 3° por minuto
- Temperatura final 240 °C durante 2 minutos
- Inyector automático: volumen de la inyección 1 µl.

### 2.2.3. Determinación de la viabilidad celular: ensayo de MTT

Para evaluar cuantitativamente la supervivencia, proliferación y citotoxicidad de las

---

células se ha usado la técnica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT).

Esta sal de tetrazolio se reduce a formazán, un derivado insoluble en agua que forma cristales violetas en el interior celular y que se solubilizan con dimetilsulfóxido (DMSO). Esta reducción es indicativa del metabolismo celular, ya que la reacción redox se produce por deshidrogenasas mitocondriales de células vivas únicamente. La cantidad de formazán generada es directamente proporcional al número de células vivas. Cuanto mayor sea esta relación, mayor será la intensidad del color, y por tanto, mayor la absorbancia<sup>27</sup>.

El número de células sembrado ha sido de 50.000 células/pocillo. El tratamiento con los aceites esenciales se ha mantenido durante 24 horas, y la exposición al tóxico durante 30 minutos. La medición se realiza espectrofotométricamente a una longitud de onda de 550 nm en el Lector de placas Digiscan 340.

#### **2.2.4. Medida de la generación intracelular de radicales libres: técnica de la diclorofluoresceína (DCFH-DA)**

La 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) es un compuesto no fluorescente que atraviesa las membranas celulares. Se hidroliza enzimáticamente por las esterasas intracelulares a 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH). En presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el peróxido de hidrógeno, se oxida a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) que es un compuesto altamente fluorescente<sup>28</sup>. La fluorescencia intracelular de la diclorofluoresceína permite cuantificar la formación de especies reactivas de oxígeno y el estrés oxidativo producido en las células, ya que la intensidad de la fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de radicales libres producidos.

Para establecer la curva de tiempo de generación de radicales libres, se han tomado medidas cada 10 minutos en la primera hora y 2 medidas cada 30 minutos durante la segunda hora. La medición se ha llevado a cabo utilizando un Fluorímetro Lector de microplacas FLx800, Bio-Tek, Instruments, Inc. a una longitud de onda de excitación de 480 nm y de emisión de 510 nm. El número de células sembradas ha sido de 50.000 células/pocillo.

### **2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

A través del programa estadístico STATGRAPHICS plus 5.1 se han analizado los resultados. Los experimentos se han realizado por triplicado, siendo  $n = 4$  ( $n$  total = 12). Los resultados se expresan como valores promedios  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias estadísticas fueron determinadas por medio del análisis de la varianza (ANOVA), siendo el nivel de significación de  $p \leq 0,05$ .

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL

El rendimiento de la muestra n° 1 fue del 2,57 %, la muestra n° 2 rindió un 1,84 % y el de la muestra n° 3 fue de un 1,54 % de aceite esencial.

#### 3.2. CROMATOGRAFÍA DE GASES

La determinación de la composición química de las tres muestras de aceite esencial de *Salvia lavandulifolia* se ha realizado mediante CG, en las condiciones descritas en el apartado de material y métodos, expresándose a continuación en la 1 los componentes mayoritarios y en las figuras 2, 3 y 4, los respectivos cromatogramas:

**Tabla 1.-** Composición química del aceite esencial de *Salvia lavandulifolia* (%).

	Muestra n°1	Muestra n°2	Muestra n°3
$\alpha$ -pineno	8,99	11,67	10,9
canfeno	5,23	7,11	6,87
$\beta$ -felandreno	9,31	8,5	
$\beta$ -pineno			9,77
myrceno			7,62
1,8-cineol	31,88	13,51	25,2
alcanfor	14,42	23,85	10,99
d-terpineol	7,18	11,95	
ledol	10,8	8,14	

Figura 2. Cromatograma de la muestra n° 1.

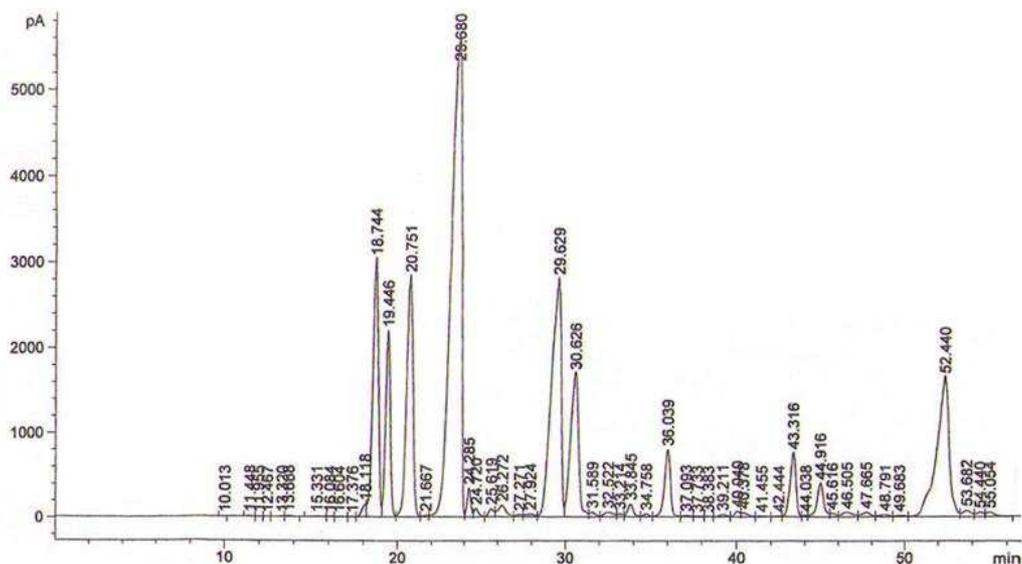


Figura 3. Cromatograma de la muestra n° 2.

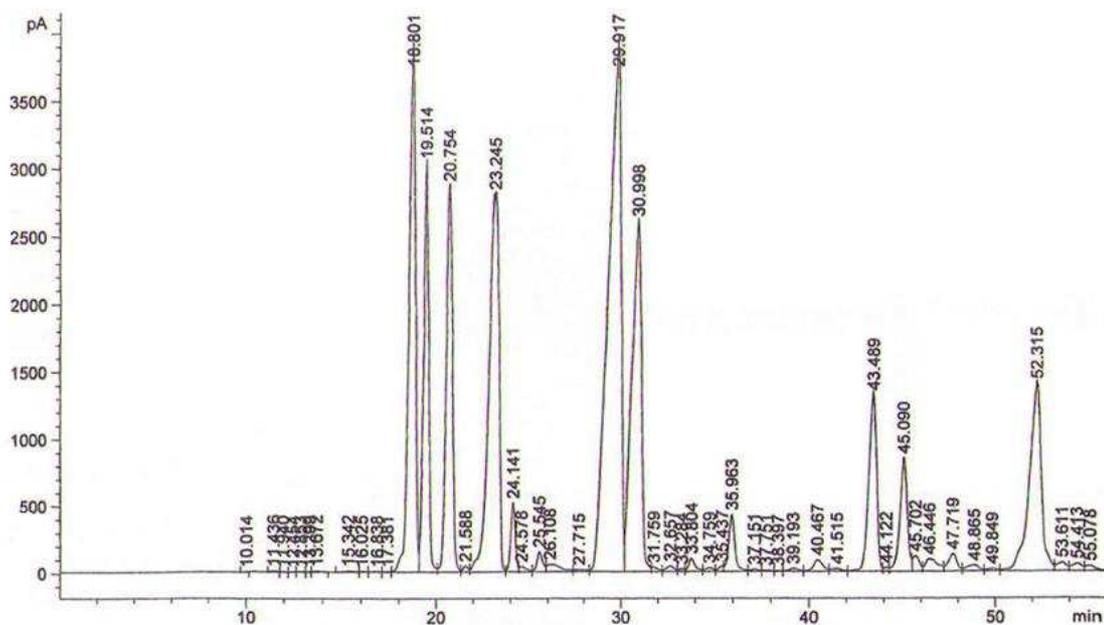
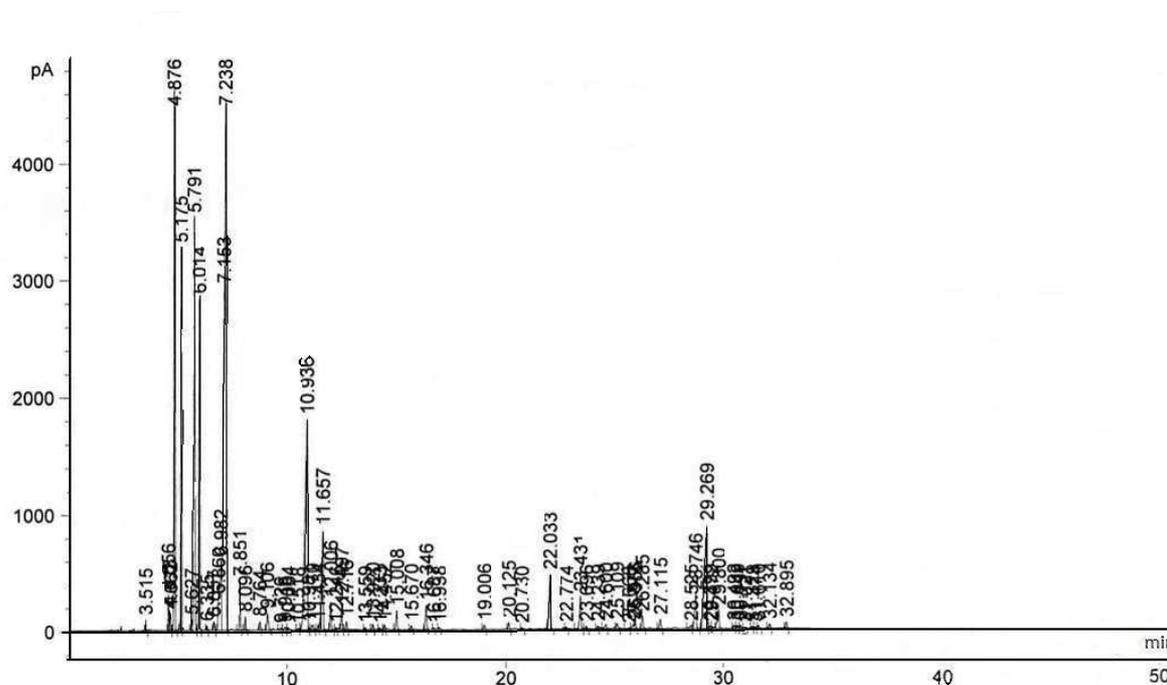


Figura 4. Cromatograma de la muestra n° 4.



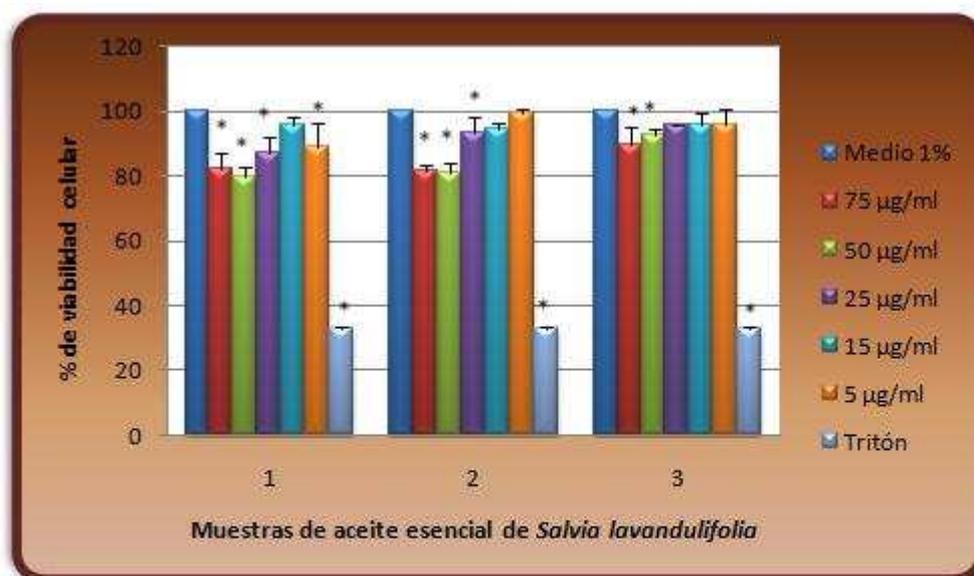
### 3.3. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR: ENSAYO DE MTT

- **Ensayo de viabilidad celular**

En primer lugar, para determinar la viabilidad celular de las muestras se realizó el ensayo de MTT, ensayo de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol a formazán, en astrocitos (U373). Para ello, se inició el estudio realizando un amplio barrido de concentraciones seriadas de las muestras a estudiar; tras revisar los resultados iniciales obtenidos, las concentraciones seleccionadas fueron: 75 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 15 µg/ml y 5 µg/ml

Los resultados del ensayo reflejan que las muestras de aceite esencial de salvia a las diferentes concentraciones ensayadas no presentan toxicidad para la línea celular U373, al observar, un porcentaje de viabilidad celular superior al 80% para todas las concentraciones, en contraste con el tritón, control negativo, que presenta una supervivencia celular del 33,1% (gráfica 1 y tabla 2).

**Gráfica 1.-** Representación gráfica de los datos de viabilidad celular mostrados en la tabla (\*= $p \leq 0,05$ ).



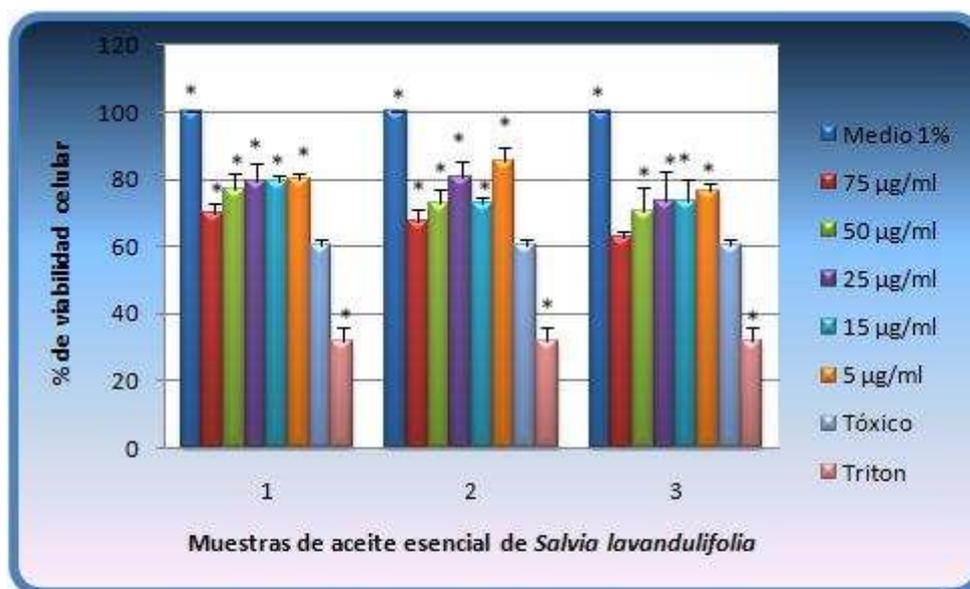
Concentraciones	Muestra nº 1	Muestra nº 2	Muestra nº 3
75µg/ml	82,54±4,6*	81,40±2,1*	89,45±5,7*
50µg/ml	80,07±3,0*	80,96±3,0*	92,48±2,0*
25µg/ml	87,30±4,7*	93,65±4,8*	95,70±0,3
15µg/ml	96,08±2,5	94,42±2,1	95,84±3,6
5µg/ml	89,13±7,4*	99,57±1,2	95,73±5,0

• **Efecto protector frente al tóxico**

A continuación, en una segunda etapa del trabajo y una vez establecidas las concentraciones no tóxicas de los aceites, se estudió el efecto de dicho aceite en células sometidas a estrés oxidativo por **peróxido de hidrógeno**, intentándose apreciar el efecto protector de los aceites esenciales de *S.lavandulifolia*.

Si se analiza la efectividad del pretratamiento de 24 horas en células sometidas a estrés oxidativo, se aprecia una disminución de la toxicidad producida por el peróxido de hidrógeno, lo que indica una actividad protectora frente al daño producido por el mismo. Las muestras nº 1 y nº 2 destacan por presentar los mejores resultados como protector frente al tóxico, apreciándose un incremento de la viabilidad celular de hasta casi un 85,5%, frente al 60% ocasionado por el tóxico (Gráfica 2 y tabla 3).

**Gráfica 2.-** Representación gráfica del efecto de diversas concentraciones del aceite esencial en células U373 sometidas a estrés oxidativo.



Concentraciones	Muestra nº 1	Muestra nº 2	Muestra nº 3
75µg/ml	69,99±2,7*	67,78±3,1*	62,53±1,8
50µg/ml	77,01±4,7*	72,80±4,2*	70,22±7,4*
25µg/ml	79,56±5,0*	80,33±4,9*	73,70±8,8*
15µg/ml	79,50±1,8*	72,94±2,0*	73,68±6,4*
5µg/ml	79,93±2,1*	85,41±4,4*	76,31±2,7*

### 3.4. MEDIDA DE LA GENERACIÓN INTRACELULAR DE RADICALES LIBRES: TÉCNICA DE LA DICLOROFLUORESCÉINA (DCFH-DA)

- **Capacidad generadora de radicales libres del aceite esencial**

En primer lugar, se observó la capacidad de las muestras de aceite esencial de *Salvia lavandulifolia* para producir radicales libres de forma independiente en comparación con el peróxido de hidrógeno. A continuación se muestran los resultados de este ensayo, a las concentraciones previamente seleccionadas 50 µg/ml, 25 µg/ml y 10 µg/ml. Como se puede observar en las gráficas nº 3, nº 4 y nº 5, las tres muestras de aceite esencial poseen menor capacidad generadora de radicales libres que el tóxico, siendo las muestras 2 y 3 las que mejores resultados presentan.

Gráficas 3, 4 y 5. Capacidad generadora de radicales libres de las tres muestras de aceite esencial de *S.lavandulifolia* en astrocitos a diferentes concentraciones en comparación con el peróxido de hidrógeno.

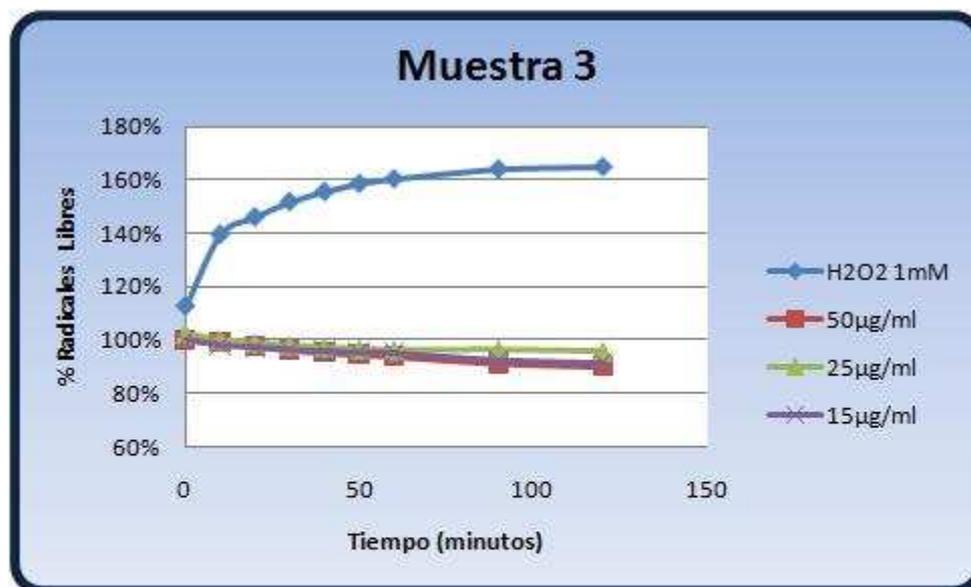
Gráfica 3



Gráfica 4



Gráfica 5



- **Capacidad captadora de radicales libres producidos por el peróxido de hidrógeno**

Posteriormente se evaluó la actividad antioxidante, como base de una posible actividad neuroprotectora de las muestras en estudio al proteger frente a los radicales libres. En las tablas 7, 8 y 9 y en las gráficas 6, 7 y 8, se muestran los resultados del ensayo de capacidad de captación de radicales libres en células sometidas a estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno y tratadas con el aceite esencial en estudio (concentraciones de 50 µg/ml, 25 µg/ml y 10 µg/ml).

**Tabla 7, 8 y 9.** Resultados de la capacidad del aceite esencial de *S.lavandulifolia* de la muestra nº 1, 2 y 3, respectivamente, para disminuir la presencia de radicales libres generados por el peróxido de hidrógeno.

**Tabla 7**

Tiempo (min)	H2O2 1mM	50 µg/ml	25 µg/ml	15 µg/ml
0	141,17±6,0	130,61±4,8*	124,01±4,5*	124,83±1,2*
10	163,64±5,6	146,63±8,9*	141,64±6,4*	140,76±6,2*
20	175,11±4,7	149,32±9,1*	145,93±4,2*	148,33±6,3*
30	185,88±7,5	150,11±5,8*	149,73±2,8*	151,46±7,1*
40	186,19±6,3	150,94±3,9*	152,03±2,3*	153,80±7,3*
50	184,64±2,9	151,40±3,4*	152,89±1,5*	154,49±6,9*
60	186,29±4,5	150,63±2,9*	153,35±1,0*	154,99±7,2*
90	184,55±5,8	147,78±2,7*	152,89±1,4*	154,58±7,6*
120	180,41±6,8	143,40±2,9*	150,84±2,0*	151,28±7,8*

**Tabla 8**

Tiempo (min)	H2O2 1mM	50 µg/ml	25 µg/ml	15 µg/ml
0	141,17±6,0	120,73±1,3*	124,91±1,5*	119,80±2,8*
10	163,64±5,6	127,17±8,5*	137,41±2,2*	142,19±7,4*
20	175,11±4,7	136,38±4,2*	145,59±4,8*	151,37±5,6*
30	185,88±7,5	138,41±4,7*	149,49±5,2*	154,69±2,0*
40	186,19±6,3	141,79±3,1*	150,95±2,7*	157,45±3,5*
50	184,64±2,9	142,90±2,3*	151,72±2,7*	158,90±5,7*
60	186,29±4,5	142,16±1,8*	142,44±3,2*	160,00±6,5*
90	184,55±5,8	141,68±1,7*	150,82±4,1*	159,56±7,2*
120	180,41±6,8	139,60±4,7*	147,13±6,1*	156,43±8,0*

Tabla 9

Tiempo (min)	H2O2 1mM	50 µg/ml	25 µg/ml	15 µg/ml
0	141,17±6,0	122,59±0,7*	124,86±4,8*	122,70±4,1*
10	163,64±5,6	136,88±0,5*	142,90±5,6*	145,76±5,4*
20	175,11±4,7	140,26±2,0*	149,43±3,7*	153,14±2,1*
30	185,88±7,5	144,98±2,8*	155,68±2,6*	161,00±1,8*
40	186,19±6,3	148,03±4,0*	158,94±2,5*	165,26±0,7*
50	184,64±2,9	149,62±4,1*	162,49±2,5*	168,31±0,8*
60	186,29±4,5	150,81±5,1*	164,64±3,0*	170,45±1,6*
90	184,55±5,8	152,51±6,3*	167,64±4,5*	173,14±3,6*
120	180,41±6,8	152,94±7,3*	168,34±5,8*	172,75±5,2

Los mejores resultados del ensayo de la diclorofluoresceína se producen a la concentración de 50 µg/ml, reflejando que las muestras de los 3 aceites esenciales reducen de forma significativa la presencia de radicales libres ocasionada por el peróxido de hidrógeno. Las muestras nº 1 y nº 2 son las que mejores resultados producen.

#### 4. DISCUSIÓN

El estrés oxidativo está implicado en el envejecimiento, así como en diversas patologías como el cáncer o las enfermedades neurodegenerativas; se caracteriza por una producción excesiva de radicales libres, implicados en el daño celular. Para prevenirlo, así como la muerte celular que puede causar, es importante la búsqueda de antioxidantes con capacidad de eliminar el exceso de radicales libres o disminuir la generación de los mismos. En este estudio se ha comprobado la capacidad antioxidante como base para el estudio de la actividad neuroprotectora de *Salvia lavandulifolia*.

En primer lugar, se ha estudiado la composición química de las tres muestras de aceite esencial de *Salvia lavandulifolia* recolectadas en Solsona (Lérida), y del Centro de ensayo de evaluación de variedades de Aranjuez (Madrid), comprobando la heterogeneidad que presenta el aceite. En todas las muestras destaca el alto porcentaje de 1,8-cineol (principalmente en la muestra nº 1 y 3) y de alcanfor (sobre todo en la muestra nº 2), siendo los componentes mayoritarios de la muestra nº 1 el alcanfor y el  $\alpha$ -pineno, mientras que el 1,8-cineol,  $\alpha$ -pineno y canfeno destacan en la muestra nº 2 y en el caso de la muestra nº 3 el alcanfor y el  $\alpha$ -pineno. En todos los casos el rendimiento del aceite esencial ha sido superior al 1,50 %.

A continuación, se han estudiado los efectos de diferentes concentraciones de las tres muestras de aceite esencial de *Salvia lavandulifolia* sobre la línea celular U373 con el fin de comprobar si estos aceites son tóxicos para las células. Mediante el ensayo de viabilidad de MTT se ha observado que las concentraciones de 75 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 15 µg/ml y 5

$\mu\text{g/ml}$  no presentan toxicidad en astrocitos, ya que se observa un porcentaje de supervivencia superior al 80% similar al del control positivo (medio 1%), a diferencia del 33% del control negativo (tritón) que redujo de forma significativa la supervivencia celular.

Una vez determinadas las concentraciones no tóxicas sobre las células, se ha estudiado el efecto de estas concentraciones sobre la misma línea celular sometida a estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno, a una concentración 1mM durante 30 minutos, que reduce significativamente la viabilidad celular respecto al control. Esto es debido a que el peróxido de hidrógeno es una especie reactiva de oxígeno, implicado en el daño oxidativo. Los astrocitos modulan el efecto neurotóxico del peróxido de hidrógeno y protegen a las neuronas frente a la toxicidad producida por éste<sup>29</sup>. Tras el pretratamiento durante 24 horas se comprobó que las tres muestras de aceite esencial de *Salvia lavandulifolia* producen una mejora en la supervivencia celular frente al tóxico, que en algunas ocasiones llegó a ser del 25 %, siendo las muestras nº 1 (79%) y nº 2 (85%) las que mejores resultados han producido en la protección de las células frente al estrés oxidativo.

El paso siguiente consistió en evaluar la capacidad del aceite esencial de *Salvia lavandulifolia*, de producir radicales libres (técnica de la diclorofluoresceína) de forma independiente, se observó que las tres muestras de aceite esencial (<107%) generan menos radicales libres que el tóxico (peróxido de hidrógeno) (165%), siendo las muestras nº 2 y nº 3 las que mejores resultados generan al producir menos radicales libres.

Posteriormente evaluamos la capacidad antioxidante de las muestras en estudio, comprobando su capacidad para disminuir la presencia de radicales libres producidos por el peróxido de hidrógeno en las células. Se observó que las muestras de aceite esencial producían una protección frente al peróxido de hidrógeno, siendo las muestras nº 1 y 2 las más activas.

Los aceites esenciales presentan diferente actividad antioxidante según el estadio de desarrollo de la planta, el tiempo de recolección, las condiciones geográficas y ecológicas, el método de extracción, secado y análisis. La actividad antioxidante del aceite esencial de salvia está relacionada con la concentración de terpenos, así como de la acción sinérgica de sus componentes minoritarios. Son las más activas las que cuentan con la presencia de  $\beta$ -felandreno y  $\alpha$ -pineno. No existe influencia del año o la época de recolección en el contenido de los principales componentes del aceite esencial excepto en el caso del alcanfor que varía significativamente en función de la estación, siendo su concentración mayor en febrero, antes de la floración<sup>30</sup>.

A la vista de los resultados obtenidos en el estudio de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Salvia lavandulifolia* sobre la línea celular U373, se pueden establecer que las tres muestras de *S. lavandulifolia* recolectadas presentan un rendimiento en aceite esencial del 2,57 % (muestra nº 1), 1,84 % (nº 2) y 1,54 % (nº 3), siendo sus componentes mayoritarios 1,8-cineol (muestra nº 1 y 3), alcanfor (muestra nº 2),  $\alpha$ -pineno y canfeno (3 muestras). En los estudios de actividad se ensayaron un elevado número de concentraciones

de las cuales: 75, 50, 25, 15 y 5 µg/ml resultaron no tóxicas para la línea celular U373, siendo seleccionadas para los ensayos. El aceite esencial de *Salvia lavandulifolia* ejerce un efecto protector en astrocitos frente a peróxido de hidrógeno, al incrementar de forma significativa la viabilidad celular en células sometidas a estrés oxidativo. Así mismo, ninguna de las muestras de aceite esencial ensayadas mediante la técnica de la diclorofluoresceína (DCFH-DA) presentó capacidad generadora de radicales libres sobre la línea celular utilizada. Las 3 muestras de aceite esencial presentaron capacidad de captación de los radicales libres producidos por el peróxido de hidrógeno.

## BIBLIOGRAFIA

1. Tildesley N, Kennedy D, Perry EK, Ballard C, Savelev S, Wesnes KA, Scholey AB. *Salvia lavandulaefolia* (Spanish Sage) enhances memory in healthy young volunteers. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2003; 75:669-674.
2. Perry NL, Houghton PJ, Theobald A, Jenner P, Perry EK. *In-vitro* inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2000; 52:895-902.
3. Scholey AB, Tildesley NTJ, Ballard CG, Wesnes KA, Tasker A, Perry EK, Kennedy DO. An extract of *Salvia* (sage) with anticholinesterase properties improves memory and attention in healthy older volunteers. *Psychopharmacology* 2008; 198:127-139.
4. Savelev S, Okello E, Perry EK. Butyryl- and acetyl-cholinesterase inhibitory activities in the essential oils of *Salvia* species and their constituents. *Phytotherapy Research* 2004; 18:315-324.
5. Maragaskis NJ, Rothstein JD. Mechanisms of disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nature* 2006; 2:679-689.
6. Escartin C, Bonvento G. Targeted activation of astrocytes: a potential neuroprotective strategy. *Molecular Neurobiology* 2008; 38:231-241.
7. Emerit J, Edeas M, Bricaire F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomedicine and pharmacotherapy* 2004; 58:39-46.
8. Flora Europaea. Cambridge at the University. 1972; 3:189.
9. Flora Iberica. Familia Labiatae. 15. *Salvia*. 2010; 3(XII):298-326
10. Perry N, Bollen C, Perry E, Ballard C. *Salvia* for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2003; 75: 651-659
11. Zarzuelo A, Risco S, Gámez MJ, Jimenez J, Cámara M, Martínez MA. Hypoglycemic action of *Salvia lavandulifolia* Vahl. ssp. *oxydon*: a contribution to studies on the mechanism of action. *Life Sciences* 1990; 47:909-915.
12. Villar del Fresno, A. M<sup>a</sup>. *Farmacognosia General*. Editorial Síntesis. 1999. 153-164.
13. Crespo ME, Jimenez C, Zarzuelo A. The essential oil of *Salvia lavandulifolia* subspecies *oxydon*. A study of its vegetative cycle. *Planta Medica* 1986; 52:367-369.
14. Bruneton, J. *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales* 2001: 477-570. 2ª Edición. Editorial ACRIBIA.
15. Perry NSL, Houghton PJ, Jenner P, Keith A, Perry EK. *Salvia lavandulaefolia* essential oil inhibits cholinesterase *in vivo*. *Phytotherapy Research* 2002; 9:48-51.
16. Howes M, Perry N, Houghton P. Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders. *Phytotherapy Research* 2003; 17:1-18.
17. Perry N, Houghton PJ, Sampson J, Theobald A, Hart S, Lis-Balchin M, Hoult R, Evans P, Jenner P, Milligan S, Perry EK. *In-vitro* activity of *S.lavandulaefolia* (Spanish sage) relevant to treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Pharmacy and pharmacology* 2001; 53:1347-1356

18. Kennedy DO, Scholey AB. The psychopharmacology of European herbs with cognition-enhancing properties. *Current Pharmaceutical Design* 2006; 12:4613-4623.
  19. Savelev S, Okello E, Perry NSL, Wilkins RM, Perry EK. Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoid in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2003; 75:661-668.
  20. Baricevic D, Bartol T. The biological/pharmacological activity of the *Salvia* genus. Sage: the genus *Salvia*. *Medicinal and Aromatic Plants* 2000; 14:143-184.
  21. Pages N, Fournier G, Velut V, Imbert C. Potential teratogenicity in mice of the essential oil of *Salvia lavandulaefolia* Vahl. Study of a fraction rich in sabinyl acetate. *Phytotherapy Research* 1992; 6:80-83.
  22. Fournier G, Pages N, Cosperec I. Contribution to the study of *Salvia lavandulaefolia* essential oil: potential toxicity attributable to the sabinyl acetate. *Planta Medica* 1993; 59:96-97.
  23. Grbic G, Culic M, Martac L, Sokovic M, Spasic S, Dokovic D. Effect of camphor essential oil on rat cerebral cortex activity as manifested by fractal dimension changes. *Archives of Biological Sciences* 2008; 60:547-553.
  24. Tildesley N, Kennedy D, Perry EK, Ballard C, Wesnes KA, Scholey AB. Positive modulation of mood and cognitive performance following administration of acute doses of *Salvia lavandulaefolia* essential oil to healthy young volunteers. *Physiology and Behavior* 2005; 83:699-709.
  25. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry* 1992; 59:1609-1623.
  26. Martín S, Gómez-Serranillos P, Ortega T, Villar AM., Carretero ME., Prodanov M, Vacas V, Cabellos M, Arroyo T, Estrella I, Hernández T. Neuroprotective effect of red wines from different grape varieties. XXIII International Conference on Polyphenols. Manitoba (Canadá) 2006
  27. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 1983; 65:55-63.
  28. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology* 1992; 5:227-231.
  29. Desagher S, Glowinski J, Premont J. Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *The Journal of Neuroscience* 1996; 16:2553-2562.
  30. Papageorgiou V, Gardeli C, Mallouchos A, Papaioannou M, Komaitis M. 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* 2008; 56:7254-7264.
-