



VNiVERSiDAD D SALAMANCA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, NUTRICIÓN Y
BROMATOLOGÍA

**Aportaciones científicas para el uso de suplementos dietéticos. Un estudio de
caso en plantas hepatoprotectoras**

DOCTORAL THESIS

Carla Susana Correia Pereira

Directores

Dra. Isabel Cristina Fernandes Rodrigues Ferreira
Dr. Celestino Santos-Buelga
Dra. Lillian Bouçada de Barros

Salamanca, 2015

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. SUPLEMENTOS DIETÉTICOS	4
1.2. PLANTAS HEPATOPROTECTORAS USADAS EN SUPLEMENTOS DIETÉTICOS	5
1.2.1. <i>Estrés oxidativo y daño hepático</i>	5
1.2.2. <i>Plantas hepatoprotectoras</i>	7
1.3. EL CASO PARTICULAR DE ALCAHOFA, CARDO MARIANO Y BORUTUTU.....	8
1.3.1. <i>Composición química</i>	8
1.3.2. <i>Propiedades bioactivas</i>	9
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	10
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
3.1. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS PLANTAS DESECADAS	12
3.1.1. <i>Caracterización nutricional de alcachofa, borututu y cardo mariano</i>	12
3.1.2. <i>Caracterización nutricional, actividad antioxidante y hepatotoxicidad de borututu sometido a radiación gamma</i>	12
3.2. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y HEPATOTOXICIDAD DE SUPLEMENTOS DIETÉTICOS PREPARADOS A PARTIR DE ALCACHOFA, BORUTUTU Y CARDO MARIANO	13
3.2.1. <i>Actividad antioxidante y hepatotoxicidad de infusiones y comprimidos</i>	13
3.2.2. <i>Actividad antioxidante y hepatotoxicidad de jarabes y efectos sinérgicos</i>	13
3.2.3. <i>Influencia del tipo de formulación y la mezcla de plantas</i>	14
3.2.4. <i>Influencia de la adición de miel sobre la actividad antioxidante y hepatotoxicidad de infusiones</i>	14
3.3. COMPOSICIÓN FENÓLICA Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS SUPLEMENTOS DIETÉTICOS PREPARADOS	15
3.3.1. <i>Compuestos fenólicos en extractos e infusiones de alcachofa y cardo mariano</i>	15
3.3.2. <i>Compuestos fenólicos en comprimidos y jarabes de alcachofa y de cardo mariano y actividad antimicrobiana de infusiones, comprimidos y jarabes</i>	16
3.3.3. <i>Compuestos fenólicos y actividad antimicrobiana en infusiones, comprimidos y jarabes de borututu</i>	17
4. CONCLUSIONES	18
REFERENCIAS	21

1. Introducción

1.1. Suplementos dietéticos

Una alimentación suficiente y equilibrada es fundamental para mantener las funciones vitales, prevenir enfermedades y envejecer de manera saludable. Sin embargo, hay casos en los que no es posible alimentarse adecuadamente, ya sea por motivos de tipo médico (anorexia, náuseas y vómitos, disfunción gastrointestinal, incapacidad física o para alimentarse uno mismo, entre otros) o ambiental (calidad de alimentos inadecuada, insuficiente disponibilidad, patrones de comidas irregulares, etc.), o por existir alteraciones en las necesidades de nutrientes (p.ej., situaciones clínicas particulares o aumento del gasto energético) (Saunders et al., 2011). Por esas u otras razones, como pueden ser mantener el estado general de salud, mejorar el aspecto, aumentar el rendimiento físico o retrasar la aparición de enfermedades relacionadas con la edad, el uso de suplementos dietéticos ha aumentado notablemente en las últimas décadas (Reay et al., 2005; Nichter y Thompson, 2006; Bailey et al., 2013).

Este tipo de productos son cada vez más utilizados como complementos en su alimentación por personas sanas, al ser percibidos como “naturales” y seguros, aunque su uso más prevalente es por parte de pacientes hospitalizados o con riesgo de hospitalización, sometidos a medicación o con patología crónicas, así como por personas de edad (Gardiner et al., 2006). Entre sus diversas aplicaciones, se encuentran la pérdida de peso (Chang y Chiou, 2014; Gambero y Ribeiro, 2015), tratamiento de diabetes (González-Ortiz et al., 2015), demencias (Allen et al., 2013), deterioro cognitivo (Clement et al., 2011), hiperplasia prostática (Kim et al., 2012), epilepsia (Lee y Chung, 2010) o problemas gastrointestinales (Lino et al., 2014), o mejora en la función sexual (Balayssac et al., 2012), ósea y de articulaciones (Challoumas et al., 2015; LeBoff et al., 2015).

El creciente interés en los suplementos dietéticos ha dado lugar a la producción y comercialización de una amplia gama de formulaciones que contienen vitaminas, minerales, preparados de hierbas o ingredientes similares, y facilitado su distribución con libre disponibilidad por cauces diversos, como farmacias, tiendas naturistas, grandes superficies, Internet e incluso en el mercado negro (Radimer et al., 2004). Mientras que el fácil acceso a estos productos ofrece evidentes ventajas al simplificar el

proceso de compra, el hecho de que cualquier persona puede acceder fácilmente a una variedad de suplementos sin prescripción o asesoramiento médico puede tener varios riesgos asociados. De hecho, se han observado interacciones negativas con medicamentos, efectos secundarios e incluso toxicidad, haciendo cada vez más necesaria una legislación específica para los suplementos dietéticos utilizados con fines medicinales (Eisenberg et al., 1993; Izzo y Ernst, 2009; Wallace y Paauw, 2015).

1.2. Plantas hepatoprotectoras usadas en suplementos dietéticos

1.2.1. Estrés oxidativo y daño hepático

El hígado es el órgano más grande del cuerpo humano y tiene un papel fundamental en la regulación de procesos fisiológicos. Participa en varias funciones vitales relacionadas con la digestión, metabolismo, inmunidad y almacenamiento de nutrientes, y contribuye al mantenimiento y regulación de la homeostasis en el organismo cuerpo (Ahsan et al., 2009). Además, el hígado es normalmente responsable de la desintoxicación y excreción de metabolitos de desecho de medicamentos, xenobióticos y toxinas, lo que lo hace un objetivo especialmente vulnerable al daño causado por sustancias químicas tóxicas y radicales libres generados como intermediarios en los procesos metabólicos (Bodakhe y Ram , 2007; Hsu et al., 2010). Idealmente, estos radicales son neutralizados por las defensas antioxidantes celulares, equilibrio cuyo mantenimiento es crucial para el normal funcionamiento del organismo y que puede verse comprometido si se produce un aumento excesivo de metabolitos oxidativos.

En el hígado, la consecuencia más frecuente del estrés oxidativo es la iniciación de la peroxidación lipídica, inducida por el ataque de las cadenas acil-lipídicas por parte de un radical con capacidad suficiente para abstraer un átomo de hidrógeno de un carbono metilénico de la cadena. Este proceso se facilita por la presencia de dobles enlaces, lo que explica la susceptibilidad particular de los ácidos grasos poliinsaturados. Como consecuencia de la abstracción de un átomo de hidrógeno, las moléculas lipídicas pueden entonces reaccionar con el oxígeno molecular, originando radicales peroxilo, que, según las circunstancias, pueden combinarse entre sí, atacar a proteínas de membrana (provocando cambios estructurales en la membrana y en los mecanismos de señalización de proteínas asociadas) o abstraer átomos de hidrógeno de ácidos grasos

adyacentes, propagando la cadena de peroxidación lipídica. Esta propagación está influida por diversos factores; así, por ejemplo, se ve favorecida por una alta relación proteínas/lípidos en la membrana y dificultada por la presencia de antioxidantes capaces de donar átomos de hidrógeno a los radicales peroxilo, interrumpiendo de este modo la reacción en cadena y evitando la propagación de las reacciones de peroxidación lipídica (Halliwell y Chirino, 1993; Ferreira et al., 2009).

Los principales productos primarios en los procesos de peroxidación lipídica son los hidroperóxidos (LOOH), no obstante, son productos secundarios de la peroxidación, como malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (4-HNE), generados en la descomposición de ácido araquidónico y de otros ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), los que se consideran más tóxicos y mutagénicos. El MDA puede actuar como señalizador en la regulación de la expresión génica y en particular en lipocitos hepáticos, e inducir la expresión de genes de la ruta del colágeno. Además, tiene una alta capacidad para reaccionar con proteínas y ADN, entre otras biomoléculas, conduciendo a la formación de aductos (Ayala et al., 2014).

Los compuestos fenólicos son conocidos por capacidad para donar átomos de hidrógeno y electrones a radicales libres, por lo que son normalmente clasificados como antioxidantes interruptores de cadena, aunque su capacidad antioxidante varía dependiendo del grado de hidroxilación, posición de grupos hidroxilo, polaridad, solubilidad y potencial reductor (Elliott et al., 1992; Ferrali et al., 1997; Cos et al., 1998; Hirano et al., 2001). Adicionalmente, algunos flavonoides también demuestran capacidad para actuar como quelantes de catalizadores metálicos, activar enzimas antioxidantes, reducir radicales alfa-tocoferol e inhibir oxidasas. Por lo tanto, estos compuestos no sólo interfieren en las reacciones de propagación de radicales libres, sino también con la formación de los radicales, ya sea quelando metales de la transición o mediante la inhibición de las enzimas implicadas en la reacción de iniciación (Ferrali et al., 1997; Rice-Evans et al., 1996).

Las lesiones hepáticas pueden ser causadas por sustancias tóxicas, infecciones y trastornos autoinmunes, y se encuentran entre las dolencias más graves y una de las principales amenazas para la salud pública (Asha y Pushpangadan, 1998). Sin embargo, los tratamientos para enfermedades como cirrosis, hígado graso o hepatitis crónica son problemáticas debido a efectos secundarios causados por los medicamentos utilizados

en su tratamiento. Por lo tanto, el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos eficaces con menores efectos secundarios es una necesidad emergente, lo que ha conducido a numerosas investigaciones en el campo de las plantas medicinales hepatoprotectoras.

1.2.2. Plantas hepatoprotectoras

A pesar de la popularidad de las plantas medicinales, utilizadas por cerca del 80% de la población mundial con fines muy diversos (sedantes, analgésicos, antipiréticos, cardioprotectores, antibacterianos o antiprotozoarios, entre otros), hay todavía una falta de modalidades eficaces para el tratamiento de enfermedades del hígado (Olaleye et al., 2006). Sin embargo, debido a la insuficiencia de medicamentos hepáticos fiables, la búsqueda de productos naturales activos se ha intensificado en las últimas décadas y está experimentando un resurgimiento, siendo utilizados por hasta un 65% de los pacientes hepáticos en Europa y los Estados Unidos. Este tipo de remedios son generalmente percibidos como alternativas más seguras a medicamentos de síntesis, ofreciendo la imagen de un tipo de tratamiento más ligero y, por tanto, inofensivo, que conlleva menor toxicidad, adecuado efecto terapéutico, mayor adhesión del paciente y mejor relación coste/eficacia (Al-Asmari et al., 2014).

Diversas plantas se han descrito como hepatoprotectoras, como *Abrus mollis* Hance, *Aloe barbadensis* Mill, *Artemisia capillaris* Thunb., *Bauhinia variegata* L., *Butea monosperma* (Lam), *Cardiospermum halicacabum* Linn., *Cineraria abyssinica* Sch. Bip. ex A. Rich., *Cochlospermum vitifolium* (Willd.), *Cochlospermum angolensis* Welw., *Cynara scolymus* L., *Equisetum arvense* L., *Erycibe hainanensis* Merr., *Ficus ingens* (Miq.) Miq., *Gentiana olivieri* Griseb., *Hippophae rhamnoides* L., *Lactuca indica* L., *Laggera pterodonta* (DC) Benth, *Nelumbo nucifera* Gaertn., *Ocimum gratissimum* Linn., *Peltiphyllum peltatum* Engl., *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn., *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill., o *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Estas plantas son usadas, entre otros, para el tratamiento de distintas dolencias hepáticas, como hepatomegalia (*A. barbadensis*; The Wealth of India, 2000), hepatitis vírica [*A. capillaris* (Wu et al., 2001), *C. vitifolium* (Sánchez-Salgado et al., 2007), *P. amarus* (Sane et al., 1997), *E. arvense* (Editorial Committee of Chinese Medicinal Herbs) *A. mollis* (Zhou and Li, 2005)], inhibición del crecimiento de células de carcinoma hepático en sistema modelo [*A. capillaris* (Zhao et al., 2014), *L. indica* (Kim et al., 2007), *E. arvense* (Oh et al., 2004), *P. amarus* (Krithika et al., 2009), *E. hainanensis* (Feng et al., 2014)] y animales

de experimentación [*C. angolensis* (Bousserouel et al., 2012), *L. pterodonta* (Wu et al., 2007)], y protección contra fibrosis crónica de hígado y cirrosis (*B. monosperma*, *B. variegata*, *O. gratissimum*; Gupta et al., 2013). Muchas de estas plantas contienen compuestos fenólicos cuyo potencial antioxidante se ha relacionado con su capacidad hepatoprotectora, al asociarse a menudo las lesiones de hígado a reacciones oxidativas que conducen a la peroxidación de lípidos en el tejido hepático.

1.3. El caso particular de alcahofa, cardo mariano y borututu

1.3.1. Composición química

La alcahofa se cultiva extensamente en todo mundo sobre todo para consumo como alimento de sus inflorescencias inmaduras, ya sea crudas, hervidas, al vapor o fritas. Es una planta cuyo uso se conoce desde la antigüedad y que es percibida como una verdura nutritiva y saludable (Lattanzio et al., 2009), debido a sus propiedades antioxidantes y efectos hepatoprotectores (Gebhardt y Fausel, 1997; Zapolska-Downar et al., 2002; Jiménez-Escrig et al., 2003; Wang et al., 2003; Falleh et al., 2008; Kubić et al., 2008; Gouveia y Castilho, 2012). Es una planta con muy poca grasa y altos niveles de minerales, vitamina C, fibra o inulina, aunque su actividad se ha relacionado sobre todo con la fracción polifenólica, compuesta fundamentalmente por hidroxicinamatos y flavonas, en particular ácidos mono- y di-cafeoilquinicos y glicósidos de luteolina y apigenina (Schütz et al., 2004; Falleh et al., 2008; Lutz et al., 2011; Pandino et al., 2011a y b; Gouveia y Castilho, 2012).

En nuestro conocimiento, no existe estudios sobre metabolitos primarios y valor nutritivo en cardo mariano y borututu, aunque existen algunos trabajos sobre su composición fitoquímica incluyendo compuestos fenólicos. Por ejemplo, se sabe que el cardo mariano contiene una mezcla de flavonolignanos, denominados en su conjunto silimarina, constituida por isómeros diastereoméricos y/o constitucionales de silibinas e isosilibinas A y B, silicristina, isosilicristina y silidianina (Wang et al., 2010; Calani et al., 2012; Althagafy et al., 2013), que se consideran los principales responsables de sus efectos terapéuticos (Giese, 2001; Zuber et al., 2002; Doehmer et al., 2011). Por otra parte, recientemente se ha caracterizado la composición fenólica en extractos acuosos e

hidrometanólicos de borututu, revelando niveles elevados de derivados de los ácidos elágico y metil elágico (Ferrerres et al., 2013).

1.3.2. Propiedades bioactivas

La alcahofa, el cardo mariano y el borututu poseen diversos efectos farmacológicos, especialmente como antioxidantes y hepatoprotectores, descritos en diferentes estudios. La silimarina, presente en las semillas del cardo mariano, parece ser el principal ingrediente farmacológicamente activo de esta planta, con indicaciones frente a hepatotoxicidad y enfermedad aguda y crónica de hígado (Giese, 2001; Zuber et al., 2002; Doehmer et al., 2011), sí como en la prevención de trastornos de bazo y vejiga (Rainone, 2005). Este complejo flavonoide ha demostrado actividad para inhibir el crecimiento de células de carcinoma hepático (Brandon-Warner et al., 2010) y de tumores de hígado en modelos animales (Bousserouel et al., 2012).

La infusión de corteza de borututu es usada en medicina tradicional angolana para el tratamiento de enfermedades hepáticas y la profilaxis de la malaria (Poppendieck, 1981; Silva et al., 2011), mientras que infusión de su raíz seca muestra elevada actividad antirradicalaria *in vitro* (Costa et al., 2012), inhibe *Plasmodium falciparum* y deprime la síntesis de ADN en eritrocitos de ratón infectados por *Plasmodium berghei* (Presber et al., 1991).

Por su parte, las hojas de alcahofa son utilizadas por sus acciones colagoga, colerética y coliocinética, y también para el tratamiento de la dispepsia y como anti-diabéticas (Koubaa et al., 1999).

A pesar de sus descritos efectos hepatoprotectores, no existen apenas estudios sobre la actividad frente a carcinoma hepatocelular para las tres plantas mencionadas (Miccadei et al., 2008; Brandon-Warner et al., 2010), y son también escasos los estudios sobre las formas más consumidas (infusiones y suplementos dietéticos). El carcinoma hepatocelular es grave problema sanitario, con más de 660.000 nuevos casos por año en el mundo, siendo una enfermedad con un desenlace rápido y fatal, con una esperanza de vida de unos 6 meses tras el diagnóstico; presenta la tercera tasa de mortalidad más alta entre todos los tipos de cáncer (Jemal et al., 2011).

2. Justificación y objetivos de la investigación

Muchos suplementos dietéticos, nutraceuticos y algunos productos farmacéuticos están basados en compuestos bioactivos obtenidos de fuentes naturales, por lo que se está realizando un intenso esfuerzo científico en la exploración de plantas medicinales así como en la evaluación de la eficacia de formulaciones basadas en las mismas (Dai y Mumper, 2010). Para el presente estudio se seleccionaron tres especies de plantas, alcachofa, borututu y cardo mariano, debido a su disponibilidad al ser comúnmente utilizadas en suplementos dietéticos y formulaciones nutraceuticas.

Dado que estas plantas son consumidas con fines medicinales y funcionales e incorporadas en diferentes suplementos dietéticos (cardo mariano y borututu se usan, por ejemplo, directamente en forma de cápsulas o comprimidos), y que la alcachofa y el cardo mariano puede ser también consumidos como alimento (Lattanzio et al. 2009; Vaknin et al. 2008), es importante conocer su perfil nutricional. Así, en la presente tesis se han caracterizado las características nutricionales de estas tres especies, y se han analizado sus componentes hidrofílicos (azúcares y ácidos orgánicos) y lipofílicos (tocoferoles y ácidos grasos). Además, se estudió el perfil fenólico de distintas formulaciones y extractos de las partes más utilizadas de estas plantas, toda vez que los compuestos fenólicos son señalados como sus componentes más activos (Razali et al., 2012).

La actividad antioxidante es a menudo evaluada como un escrutinio preliminar de la bioactividad de productos vegetales. En el presente estudio se han utilizado cuatro ensayos diferentes para evaluar la actividad antioxidante: captación del radical DPPH, poder reductor, inhibición de la decoloración de β -caroteno e inhibición de la formación de sustancias reactivas a ácido tiobarbitúrico (TBARS). Además, se estudió la actividad de inhibición del crecimiento de células de carcinoma hepático utilizando la línea celular HepG2 de carcinoma hepático humano, y se evaluó la hepatotoxicidad en cultivos primarios de células de hígado de cerdo. De hecho, la evaluación de la seguridad de plantas o extractos para ser empleados como alimento o medicina es una necesidad, por cuanto los potenciales efectos de los compuestos naturalmente presentes en plantas son difíciles de anticipar (Jacociunas et al., 2013). Igualmente, se estudió la actividad anti-microbiana frente a aislados clínicos de bacteria multirresistentes, concretamente *Escherichia coli*, *Escherichia coli* productora de β -lactamasas de amplio

espectro (Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-producing *E. coli*), *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) y *Pseudomonas aeruginosa*.

Además de estudiar la influencia del tipo de formulación en los perfiles químico y de bioactividad de las plantas elegidas, este estudio se planteó como objetivo el evaluar las posibles diferencias que pudieran derivar de utilizar mezclas de las tres plantas en diferentes proporciones en las formulaciones, así como el efecto de la adición de miel a sus infusiones. Asimismo, se intentó también correlacionar la bioactividad de las preparaciones con su composición fenólica. Por último, se exploró el efecto sobre material desecado de borututu de la irradiación con rayos gamma, una de las técnicas de descontaminación más prometedoras para distintos productos alimentarios, a diferentes dosis (1 y 10 kGy), evaluando su influencia sobre la composición química y la actividad antioxidante y frente a células de carcinoma hepático.

3. Resultados y discusión

3.1. Caracterización funcional de las plantas desecadas

3.1.1. Caracterización nutricional de alcachofa, borututu y cardo mariano

La composición proximal de alcachofa, borututu y cardo mariano se analizó utilizando métodos convencionales y técnicas instrumentales (cromatografía líquida y de gases con diferentes tipos de detección) para los perfiles de sustancias hidrofílicas (azúcares y ácidos orgánicos) y lipofílicas (ácidos grasos y tocoferoles).

El borututu mostró los contenidos más elevados de carbohidratos, sacarosa y azúcares totales, grasas, ácidos cítrico y siquímico, y tocoferoles α -, β -, δ - y totales. La alcachofa poseía los mayores contenidos de minerales, proteínas, ácido oxálico, γ -tocoferol y ácidos grasos saturados (SFA), principalmente ácido palmítico, así como la mejor relación entre ácidos grasos $n6$ y $n3$. Por su parte, el cardo mariano tenía los niveles más altos de fructosa y glucosa, ácido quínico, ácidos orgánicos totales y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), mayoritariamente ácido linoleico, junto con el mejor ratio PUFA/SFA.

3.1.2. Caracterización nutricional, actividad antioxidante y hepatotoxicidad de borututu sometido a radiación gamma

Se evaluó la composición proximal de muestras de borututu control (no irradiadas) e irradiadas. En general, el tratamiento con radiación gamma no afectó apreciablemente a la composición química del borututu, encontrándose incluso las mayores concentraciones totales de azúcares, ácidos orgánicos, tocoferoles y PUFA en la muestra irradiada a la concentración más elevada (10 kGy) entre las ensayadas, lo que sugería un efecto conservador de la irradiación sobre esas moléculas. Esa muestra presentaba también los niveles más elevados de compuestos fenólicos y flavonoides totales y de actividad antioxidante. Además, las muestras irradiadas mantenían la actividad inhibitoria sobre el crecimiento en células HepG2 de carcinoma hepático.

De manera general, la irradiación gamma se mostró como una técnica de conservación adecuada para este tipo de material desecado sin afectar a sus componentes bioactivos.

3.2. Actividad antioxidante y hepatotoxicidad de suplementos dietéticos preparados a partir de alcachofa, borututu y cardo mariano

La capacidad antioxidante se evaluó mediante evaluación de la captación del radical DPPH, poder reductor, inhibición de la decoloración de β -caroteno e inhibición de la formación de sustancias reactivas a ácido tiobarbitúrico (TBARS), mientras que la inhibición del crecimiento de células de carcinoma hepático se estudió en la línea celular HepG2, y la hepatotoxicidad en cultivos primarios de células de hígado de cerdo.

3.2.1. Actividad antioxidante y hepatotoxicidad de infusiones y comprimidos

Las propiedades antioxidantes, actividad anti-carcinoma hepatocelular y toxicidad hepática de las infusiones y suplementos dietéticos de las muestras de plantas fueron evaluadas y comparadas. Todas las muestras revelaron buenas propiedades antioxidantes, aunque las infusiones mostraban mayor actividad biológica que los suplementos dietéticos.

La infusión de borututu poseía las actividades antioxidante y anti-carcinoma hepático más elevadas sin presentar toxicidad sobre células no tumorales de hígado. La infusión de alcachofa también presentaba actividad antitumoral, aunque mostró cierta toxicidad para células normales a las concentraciones más altas ensayadas. Las propiedades antioxidantes y antitumorales se correlacionaron positivamente con el contenido de polifenoles totales y de flavonoides. En general, entre las tres especies estudiadas, la infusión de borututu resultó para ser la más completa en relación sus efectos antioxidante y anti-hepatoma celular.

3.2.2. Actividad antioxidante y hepatotoxicidad de jarabes y efectos sinérgicos

Se evaluaron las actividades antioxidantes y anti-hepatoma celular en jarabes que contenían cada una de las plantas por separado y de mezclas de las mismas en distintas combinaciones, con el objeto de comprobar si existía algún tipo de interacción entre ellas. El jarabe de cardo mariano demostró la mayor actividad antioxidante por todos los métodos analizados, proporcionando los mejores resultados tanto en las muestras que sólo incluían esta planta como en las combinaciones que la contenían. En prácticamente todas las mezclas predominaron los efectos sinérgicos, resultando más eficaz para la

mejora de la actividad antioxidante la mezcla de distintos jarabes basados en cada planta que la mezcla de plantas en el mismo jarabe. Sin embargo, esta última fue ventajosa para mejorar la actividad anti-carcinoma hepático.

3.2.3. Influencia del tipo de formulación y la mezcla de plantas

Los efectos del tipo de formulación (F) y de la relación entre proporciones de distintas plantas en las mezclas (ratio A:B:M; R) fueron evaluados fijando uno de los factores, esto es, los resultados se presentan como las medias de cada formulación (comprendiendo los valores para todos los ratios entre plantas en esas condiciones) y también como las medias de cada ratio (comprendiendo los resultados para todas las formulaciones correspondientes).

Los jarabes tendieron a ser el tipo de formulación con los contenidos de compuestos fenólicos y de flavonoides y la actividad antioxidante más elevados. Por el contrario, los comprimidos se mostraron como la peor formulación. En lo concerniente a los ratios A:B:M, los resultados no revelaron diferencias tan pronunciadas. Ninguna de las mezclas ensayadas mostró toxicidad hasta las dosis máximas ensayadas sobre cultivos primarios de células hepáticas normales (PLP2), aunque algunas muestras, especialmente las infusiones, mostraron toxicidad sobre las líneas celulares HepG2 de carcinoma hepático. Todas las muestras sin excepción dieron efectos para la actividad antioxidante comparadas con la de las plantas individuales.

3.2.4. Influencia de la adición de miel sobre la actividad antioxidante y hepatotoxicidad de infusiones

Se evaluó la influencia de la incorporación de miel de castaño a infusiones de las plantas medicinales estudiadas, tanto individuales como en combinaciones de dos y tres plantas, con respecto a su actividad antioxidante y hepatotoxicidad. Los resultados se compararon mediante análisis de varianza y análisis discriminante lineal.

La adición de miel a las infusiones tuvo un resultado beneficioso en todos los casos, produciendo un efecto sinérgico sobre actividad antioxidante, con excepción de en el ensayo de inhibición de la decoloración de β -caroteno en las preparaciones de cardo mariano+alcachofa, y también daba lugar a menor hepatotoxicidad, excepto en el caso de la infusión de alcachofa. Por otra parte, los resultados del análisis discriminante

lineal pusieron de manifiesto que la adición de miel superaba incluso el efecto favorable de la mezcla de plantas mezcladas.

3.3. Composición fenólica y actividad antimicrobiana de los suplementos dietéticos preparados

Los perfiles fenólicos fueron analizados mediante HPLC-DAD-ESI/MS, llevando a cabo la identificación a partir de sus características de retención y espectros UV-vis y de masas, así como por comparación con datos disponibles en la literatura y/o estándares cuando estaban disponibles.

La actividad antimicrobiana se evaluó utilizando microorganismos obtenidos de aislados clínicos de pacientes hospitalizados. Se emplearon cuatro bacterias Gram-negativas: *Escherichia coli* aisladas de orina, *Escherichia coli* productora de β -lactamasas de amplio espectro (ESBL-producing *E. coli*) aisladas de hemocultivos, *Proteus mirabilis* de exudados de la herida y *Pseudomonas aeruginosa* de orina, y una bacteria Gram-positiva: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA).

3.3.1. Compuestos fenólicos en extractos e infusiones de alcachofa y cardo mariano

Se caracterizaron los compuestos fenólicos en extractos hidrometanólicos e infusiones (el modo más común de preparación) obtenidos de plantas de cardo mariano y alcachofa. Las infusiones de ambas especies presentaron mayor contenido fenólico que los extractos hidrometanólicos. El cardo mariano mostró una composición fenólica similar en las dos preparaciones, revelando sólo diferencias cuantitativas entre ellas. Sin embargo, en el caso de la alcachofa se encontró un perfil ligeramente diferente entre infusiones y extractos hidrometanólicos. Apigenina-7-*O*-glucurónido fue el principal flavonoide encontrado en cardo, mientras que luteolina-7-*O*-glucurónido era la más abundante en alcachofa. Tanto las infusiones de cardo mariano como de alcachofa se pueden considerar buenas fuentes de compuestos bioactivos, especialmente ácidos fenólicos y flavonoides.

3.3.2. Compuestos fenólicos en comprimidos y jarabes de alcachofa y de cardo mariano y actividad antimicrobiana de infusiones, comprimidos y jarabes

Se evaluó la composición fenólica en comprimidos y jarabes de alcachofa y de cardo mariano, y también la actividad antimicrobiana de infusiones, pastillas y jarabes.

Los compuestos fenólicos identificados en las formulaciones de alcachofa presentaron similitudes con los encontrados en las infusiones y extractos hidroalcohólicos mencionados en el apartado anterior, aunque se detectaron algunos picos no identificados previamente. Ácido vanílico y luteolina-7-*O*-glucósido fueron los compuestos más abundantes en jarabe de alcachofa, mientras los ácidos 5-*O*-cafeoilquínico, 4-*O*-cafeoilquínico y 1,3-dicafeoilquínico fueron los principales derivados fenólicos en las pastillas de esta planta. En el jarabe de cardo mariano, isoramnetina-*O*-desoxihexósido-*O*-hexósido e isoramnetina-3-*O*-rutinósido fueron los compuestos encontrados en mayor cantidad, mientras que en las pastillas el compuesto más abundante era un derivado hidroxilado de silibinina.

Entre las muestras basadas en la alcachofa, los mejores resultados en cuanto a actividad antimicrobiana se obtuvieron para las infusiones, que mostraron capacidad para inhibir *E. coli*, *E. coli* ESBL, *S. aureus* MRSA y *P. aeruginosa*, mientras que los comprimidos sólo revelaron actividad frente a *S. aureus* MRSA, aunque en concentraciones más bajas que la infusión.

Con relación al cardo mariano, el jarabe presentó la mayor actividad antimicrobiana, con menores valores MIC y demostró para ser capaz de inhibir el crecimiento de *E. coli*, *E. coli* ESBL, *S. aureus* MRSA y *P. aeruginosa*. Las infusiones también mostraron capacidad para inhibir estas bacterias pero en concentraciones significativamente más altas que el jarabe. Los comprimidos revelaron actividad antimicrobiana frente *E. coli* ESBL, aunque en menor concentración que la infusión, mientras que no inhibían el crecimiento de las restantes bacterias. Ninguna de las formulaciones estudiadas de estas plantas fue capaz de inhibir el crecimiento de *P. mirabilis* a las concentraciones estudiadas.

3.3.3. Compuestos fenólicos y actividad antimicrobiana en infusiones, comprimidos y jarabes de borututu

Tres formulaciones diferentes (infusión, comprimidos y jarabe) de borututu fueron caracterizadas en cuanto a su composición fenólica y actividad antimicrobiana *in vitro* frente a aislamientos clínicos de bacterias multirresistentes. Se detectó un total de once compuestos fenólicos, siendo la infusión y los comprimidos las que presentaban la mayor variedad. El ácido protocatequico sólo estaba presente en infusiones, en la cual era el compuesto más abundante, mientras que (epi)galocatequina-*O*-galato era la molécula principal en pastillas, y eucaglobulina/globulusina B en los jarabes. La infusión reveló actividad antimicrobiana frente a todas las bacterias estudiadas con la excepción de *Proteus mirabilis*, mientras que los comprimidos mostraban actividad contra *E. coli* ESBL y *S. aureus* MRSA. En los jarabes no se detectó ninguna actividad antimicrobiana, lo que estaba de acuerdo con sus bajas concentraciones de compuestos fenólicos. Nuevamente, ninguna de las formulaciones fue capaz de inhibir el crecimiento de *P. mirabilis*. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, la infusión de esta planta (*Cochlospermum angolensis*) pueden considerarse buena fuente de compuestos fenólicos y buen agente antimicrobiano.

4. Conclusiones

El presente estudio tenía por objeto el ampliar el conocimiento sobre tres plantas medicinales ampliamente utilizadas por sus propiedades hepatoprotectoras: borututu, alcachofa y cardo mariano. Para ello, se caracterizaron químicamente y se evaluó la actividad biológica de distintas formulaciones de las mismas disponibles en el mercado (infusiones, pastillas y jarabes).

1) Con respecto a la caracterización química, el borututu presentó los contenidos más alto de carbohidratos, azúcares totales y sacarosa, grasa, ácidos siquímico y cítrico, y tocoferoles α -, β -, δ - y totales. La alcachofa tenía el contenido más alto de cenizas, proteínas, ácido oxálico, ácidos grasos saturados (SFA), principalmente ácido palmítico y γ -tocoferol, como también la mejor relación entre ácidos grasos $n6/n3$. El cardo mariano mostró los niveles más altos de fructosa y glucosa, ácido quínico y ácidos orgánicos totales, ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), principalmente ácido linoleico, y la mejor relación PUFA/SFA. La bioactividad de compuestos lipofílicos, particularmente ácidos grasos insaturados y tocoferoles, se perdía en las infusiones, pero continuaba siendo significativa en comprimidos y jarabes que contienen las plantas comercializadas como suplementos dietéticos. En nuestro conocimiento, éste es el primer informe detallado sobre composición de sustancias de interés nutricional en estas plantas.

2) Se exploró la aplicación de la irradiación con rayos gamma como método alternativo para la conservación borututu seco. Se pudo concluir que, en general, este tratamiento no afectaba significativamente a la composición proximal de este material, observando incluso los contenidos más altos de azúcares totales, ácidos orgánicos, tocoferoles y ácidos grasos poliinsaturados en la muestra irradiada a la dosis más alta (10 kGy). Esta muestra presentaba también los niveles más altos de flavonoides y polifenoles totales y, en general, la mayor actividad antioxidante, tanto en infusiones como en extractos hidroalcohólicos obtenidos a partir del material irradiado. Las muestras irradiadas conservaban la actividad para inhibir el crecimiento de células de carcinoma hepático (HepG2), con menores disminuciones en el extracto hidroalcohólico obtenido a partir de la muestra irradiada a 10 kGy. Con todo, la irradiación gamma a las dosis ensayadas demostró para ser una técnica adecuada para la conservación de hierbas secas sin afectar sus perfiles de compuestos bioactivos.

3) Se evaluó la actividad biológica de diferentes formulaciones (infusiones, comprimidos y jarabes) de cada una de las tres plantas. Todas las muestras revelaron buena actividad antioxidante, aunque mayor en las infusiones y jarabes que en los comprimidos. La alcachofa presentó los mejores resultados en la actividad antitumoral, aunque para su infusión se encontró cierta toxicidad sobre las células normales. La infusión de borututu y el jarabe de cardo mariano mostraron la actividad antioxidante más elevadas entre todas las preparaciones estudiadas, pero la infusión demostró mejores resultados que el jarabe en su capacidad para inhibir la proliferación de células HepG2. Así pues, para lograr los beneficios atribuidos a estas plantas no parece necesario recurrir al uso de jarabes, bastante más costosos que las infusiones, a menos que existan otros beneficios asociados a los jarabes además de los aquí estudiados.

4) Se estudiaron diferentes formulaciones preparadas con mezclas en diferentes proporciones de las tres plantas consideradas. Sin excepción para todas las formulaciones, las mezclas produjeron efectos sinérgicos para la actividad antioxidante, y en algunos casos también con respecto a la actividad de anti-carcinoma hepatocelular, comparadas con las formulaciones basadas en plantas individuales. Por otra parte, ninguna de las muestras mostró toxicidad sobre células primario de hígado. Los resultados obtenidos deben contribuir a la toma de decisiones con vistas a establecer la mejor formulación y mezcla de plantas para la preparación de productos eficaces y seguros derivados del cardo alcachofa, borututu y leche.

5) Se valoró el efecto de la adición de miel de castaño a las infusiones, toda vez que es una práctica habitualmente utilizada para mejorar el sabor de las mismas. Los resultados obtenidos demostraron que la incorporación de miel potenciaba las propiedades antioxidante y citoprotectora de las infusiones. El aumento de la actividad antioxidante fue verificado en todos los casos, tanto en las preparaciones que contenían una única planta como mezclas de las mismas, con la única excepción de la preparación de alcachofa, cardo mariano y miel, donde se observó un efecto menos favorable en el caso particular del ensayo de inhibición de la decoloración de β -caroteno. Las observaciones realizadas también sugerían que la mejora inducida por la adición de miel en las propiedades bioactivas ensayadas podría incluso superar el efecto sinérgico obtenido por mezcla de plantas.

6) En lo relativo a composición fenólica, alcachofa, cardo mariano y borututu se mostraron buenas fuentes de tanto de ácidos fenólicos como de flavonoides. En general, las infusiones contenían mayores niveles de estos compuestos que los extractos hidrometanólicos. Comparando las diferentes formulaciones de las tres plantas, se observaron las siguientes tendencias con respecto a las concentraciones de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante: infusión > comprimidos > jarabe para alcachofa y borututu, e infusión > jarabe > comprimidos para cardo mariano. Luteolina-7-*O*-glucurónido y luteolina-7-*O*-glucósido fueron los principales flavonoides encontrados en la infusión de alcachofa, mientras que apigenina-7-*O*-glucurónido, luteolina-7-*O*-glucurónido y apigenina-*O*-desoxihexosil-glucurónido lo eran en la de cardo mariano y el ácido protocatéquico en la de borututu.

7) Por último, se evaluó la actividad antimicrobiana de estas formulaciones, encontrado que, de manera general, las muestras con concentraciones más altas de compuestos fenólicos también poseían la actividad antimicrobiana más potente, lo que podría explicarse por las bien conocidas propiedades antimicrobianas de estos compuestos.

Del presente estudio puede concluirse que cardo mariano, alcachofa y borututu son importantes fuentes naturales de fitoquímicos con propiedades antioxidantes, hepatoprotectoras y antimicrobianas, que se podrían incluir en la dieta en forma de suplementos, contribuyendo así a prevenir enfermedades crónicas. Este trabajo también contribuye a apoyar las razones para el uso tradicional de estas plantas en diversas formulaciones (material seco, pastillas o jarabes), ampliando el conocimiento sobre los compuestos bioactivos que podrían ser responsables. Son necesarios, sin embargo, más estudios para concluir sobre los mecanismos de acción de estos compuestos, así como para confirmar que los efectos aquí reportados se pueden producir en el organismo humano.

Referencias

- Ahsan, M.R., Islam, K.M., Bulbul, I.J. 2009. Hepatoprotective activity of methanol extract of some medicinal plants against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Eur. J. Sci. Res.* 37(2), 302-310.
- Al-Asmari, A.K., Al-Elaiwi, A.M., Athar, M.T., Tariq, M., Eid, A.A., Al-Asmary, S.M. 2014. A review of hepatoprotective plants used in Saudi traditional medicine. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* Vol. 2014, Article ID 890842, 22 pages.
- Allen, V.J., Methven, L., Gosney, M.A. 2013. Use of nutritional complete supplements in older adults with dementia: Systematic review and meta-analysis of clinical outcomes. *Clin. Nutr.* 32, 950-957.
- Althagafy, H.S., Graf, T.N., Sy-Cordero, A.A., Gufford, B.T., Paine, M.F., Wagoner, J., Polyak, S.J., Croatt, M.P., Oberlies 2013. Semisynthesis, cytotoxicity, antiviral activity, and drug interaction liability of 7-O-methylated analogues of flavonolignans from milk thistle. *Bioorg. Med. Chem.* 21, 3919-3926.
- Asha, V.V., Pushpangadan, P. 1998. Preliminary evaluation of the anti-hepatotoxic activity of *Phyllanthus kozhikodanus*, *Phyllanthus maderspatensis* and *Solanum indicum*, *Fitoterapia* 59, 255-259.
- Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S. 2014. Lipid Peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2014, Article ID 360438, 31 pages.
- Bailey, R.L., Gahche, J.J., Miller, P.E., Thomas, P.R., Dwyer, J.T. 2013. Why US adults use dietary supplements, *JAMA Intern. Med.* 173, 355-361.
- Balayssac, S., Gilard, V., Zedde, C., Martino, R., Malet-Martino, M. 2012. Analysis of herbal dietary supplements for sexual performance enhancement: First characterization of propoxyphenyl-thiohydroxyhomosildenafil and identification of sildenafil, thiosildenafil, phentolamine and tetrahydropalmatine as adulterants. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 63, 135-150.
- Bodakhe, S.H., Ram, A. 2007. Hepatoprotective properties of *Bauhinia variegata* bark extract. *Yakugaku Zasshi* 127, 1503-1507.

- Bousserouel, S., Bour, G., Kauntz, H., Gosse, F., Marescaux, J., Raul, F. 2012. Silibinin inhibits tumor growth in a murine orthotopic hepatocarcinoma model and activates the TRAIL apoptotic signaling pathway. *Anticancer Res.* 32, 2455-2462.
- Bousserouel, S., Bour, G., Kauntz, H., Gosse, F., Marescaux, J., Raul, F. 2012. Silibinin inhibits tumor growth in a murine orthotopic hepatocarcinoma model and activates the TRAIL apoptotic signaling pathway. *Anticancer Res.* 32, 2455-2462.
- Brandon-Warner, E., Sugg, J.A., Schrum, L.W., McKillop, I.H. 2010. Silibinin inhibits ethanol metabolism and ethanol-dependent cell proliferation in an *in vitro* model of hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 291, 120-129.
- Calani, L., Brighenti, F., Bruni, R., Del Rio, D. 2012. Absorption and metabolism of milk thistle flavanolignans in humans. *Phytomedicine* 20, 40-46.
- Challoumas, D., Stavrou, A., Pericleous, A., Dimitrakakis, G. 2015. Effects of combined vitamin D - calcium supplements on the cardiovascular system: Should we be cautious? *Artherosclerosis* 238, 388-398.
- Chang, Y.Y., Chiou, W.-B. 2014. The liberating effect of weight loss supplements on dietary control: A field experiment. *Nutrition* 30, 1007-1010.
- Clement, Y.N., Onakpoya, I., Hung, S.K., Ernst, E. 2011. Effects of herbal and dietary supplements on cognition in menopause: A systematic review. *Maturitas* 68, 256-263.
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietnck, A.J., Vanden Berghe, D. 1998. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.* 61, 71-76.
- Costa, A.S.G., Nunes, M.A., Almeida, I.M.C., Carvalho, M.R., Barroso, M.F., Alves, R.C., Oliveira, M.B.P.P. 2012. Teas, dietary supplements and fruit juices: A comparative study regarding antioxidant activity and bioactive compounds. *LWT-Food Sci. Technol.* 49, 324-328.
- Dai, J., Mumper, R.J. 2010. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* 15, 7313-7352.

- Doehmer, J., Weiss, G., McGregor, G.P., Appel, K. 2011. Assessment of a dry extract from milk thistle (*Silybum marianum*) for interference with human liver cytochrome-P450 activities. *Toxicol. In Vitro* 25, 21-27.
- Eisenberg, D.M., Kessler, R.C., Foster, C., Nerlock, F.E., Calkins, D. R., Delbanco, T. L. 1993. Unconventional medicine in the United States, prevalence, costs, and patterns of use. *N. Engl. J. Med.* 328, 246-252.
- Elliott, A.J., Scheiber, S.A., Thomas, C., Pardini, R.S. 1992. Inhibition of glutathione reductase by flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* 44, 1603-1608.
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoni, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. 2008. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C.R. Biologies* 331, 372-379.
- Feng, Z., Song, S., An, Y., Yang, Y., Jiang, J., Zhang, P. 2014. Hepatoprotective acyl glycosides obtained from *Erycibe hainanensis*. *Phytochem. Lett.* 9, 163-167.
- Ferrali, M., Signorini, C., Caciotti, B., Sugherini, L., Ciccoli, L., Giachetti, D., Comporti, M. 1997. Protection against oxidative damage of erythrocyte membranes by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett.* 416, 123-129.
- Ferrali, M., Signorini, C., Caciotti, B., Sugherini, L., Ciccoli, L., Giachetti, D., Comporti, M. 1997. Protection against oxidative damage of erythrocyte membranes by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett.* 416, 123-129.
- Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Abreu, R.M.V. 2009. Antioxidants in wild mushrooms. *Curr. Med. Chem.* 16, 1543-1560.
- Ferreres, F., Grosso, C., Gil-Izquierdo, A., Valentão, P., Andrade, P.B. 2013. Ellagic acid and derivatives from *Cochlospermum angolensis* Welw. extracts: HPLC-DAD-ESI/MSⁿ profiling, quantification and In vitro anti-depressant, anti-cholinesterase and anti-oxidant activities. *Phytochem. Anal.* 24, 534-540.
- Gambero, A., Ribeiro, M.L. 2015. The positive effects of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) in obesity. *Nutrients* 7, 730-750.

- Gardiner, P., Graham, R.E., Legedza, A.T., Eisenberg, D.M., Phillips, R.S. 2006. Factors associated with dietary supplement use among prescription medication users. *Arch. Intern. Med.* 166, 1968-74.
- Gebhardt, R., Fausel, M. 1997. Antioxidant and hepatoprotective effects of artichoke extracts and constituents in cultured rat hepatocytes. *Toxicol. In Vitro.* 11, 669-672.
- Giese, L.A. 2001. Milk thistle and the treatment of hepatitis. *Gastroenterol. Nurs.* 24, 95-97.
- Giese, L.A. 2001. Milk thistle and the treatment of hepatitis. *Gastroenterol. Nurs.* 24, 95-97.
- González-Ortiz, M., Martínez-Abundis, E., Robles-Cervantes, J.A., Pérez-Rubio, K.G. 2015. Comparison of two liquid nutritional supplements designed for patients with diabetes: Effect on glucose and insulin metabolism in healthy subjects. *Pharma Nutrition* 3, 7-10.
- Gouveia, S.C., Castilho, P.C. 2012. Phenolic composition and antioxidant capacity of cultivated artichoke, Madeira cardoon and artichoke-based dietary supplements. *Food Res. Int.* 48, 712-724.
- Gupta, A., Sheth, N.R., Pandey, S., Shah, D.R., Yadav, J.S. 2013. Design and evaluation of herbal hepatoprotective formulation against paracetamol induced liver toxicity. *J. Yong Pharmac.* 5, 180-187.
- Halliwell, B., Chirino, S. 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 57(suppl), 15S-25S.
- Hirano, R., Sasamoto, W., Matsumoto, A., Itakura, H., Igarashi, O., Kondo, K. 2001. Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation, *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 47, 357-362.
- Hsu, Y.W., Tsai, C.F., Chuang, W.C., Chen, W.K., Ho, Y.C., Lu, F.J. 2010. Protective effects of silica hydride against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Food Chem. Toxicol.* 48, 1644-1653.
- Izzo, A.A., Ernst, E. 2001. Interactions between herbal medicines and prescribed drugs, a systematic review. *Drugs* 61, 2163-2175.

- Jacociunas, L.V., Andrade, H.H.R., Lehmann, M., Abreu, B.R.R., Ferraz, A.B.F., Silva, J., Grivicich, I., Dihl, R.R. 2013. Artichoke induces genetic toxicity in the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) cytome assay. *Food Chem. Toxicol.* 55, 56-59.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. 2011. Global Cancer Statistics. *Cancer J. Clin.* 61, 69-90.
- Jiménez-Escrig, A., Dragsted, L.O., Daneshvar, B., Pulido, R., Saura-Calixto, F. 2003. *In vitro* antioxidant activities of edible artichoke (*Cynara scolymus* L.) and effect on biomarkers of antioxidants in rats. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5540-5545.
- Kim, K.H., Kim, Y.H., Lee, K.R. 2007. Isolation of quinic acid derivatives and flavonoids from the aerial parts of *Lactuca indica* L. and their hepatoprotective activity *in vitro*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 6739-6743.
- Kim, T.-H., Lim, H.-J., Kim, M.-S., Lee, M.S. 2012. Dietary supplements for benign prostatic hyperplasia: An overview of systematic reviews. *Maturitas* 73, 180-185.
- Koubaa, I., Damak, M., McKillop, A., Simmonds, M. 1999. Constituents of *Cynara cardunculus*. *Fitoterapia* 70, 212-213.
- Krithika, R., Mohankumar, R., Verma, R.J., Shrivastav, P.S., Mohamad, I.L., Gunasekaran, P., Narasimhan, S. 2009. Isolation, characterization and antioxidative effect of phyllanthin against CCl₄-induced toxicity in HepG2 cell line. *Chem-Biol. Interact.* 181, 351-358.
- Kubić, J., Popović, V., Petrović, S., Mucaji, P., Ćirić, A., Stojković, D., Soković, M. 2008. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. *Food Chem.* 107, 861-868.
- Lattanzio, V., Kroon, P.A., Linsalata, V., Cardinali, A. 2009. Global artichoke: a functional food and source of nutraceutical ingredients. *J. Funct. Foods* 1, 131-144.
- Lattanzio, V., Kroon, P.A., Linsalata, V., Cardinali, A. 2009. Global artichoke: a functional food and source of nutraceutical ingredients. *J. Funct. Foods* 1, 131-144.
- LeBoff, M.S., Yue, A.Y., Copeland, T., Cook, N.R., Buring, J.E., Manson, J.E. 2015. Vital-bone health: Rationale and design of two ancillary studies evaluating the

- effects of vitamin D and/or omega-3 fatty acid supplements on incident fractures and bone health outcomes in the vitamin D and Omega-3 trial (vital). *Contemp. Clin. Trials* 41, 259-68.
- Lee, S.W., Chung, S.S. 2010. A review of the effects of vitamins and other dietary supplements on seizure activity. *Epilepsy Behav.* 18, 139-150.
- Lutz, M., Henríquez, C., Escobar, M. 2011. Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (*Cynara cardunculus* L.), raw and cooked. *J. Food Compos. Anal.* 24, 49-54.
- Miccadei, S., Di Venere, D., Cardinali, A., Romano, F., Durazzo, A., Foddai, M.S., Fraioli, R., Mobarhan, S., Maiani, G. 2008. Antioxidative and apoptotic properties of polyphenolic extracts from edible part of artichoke (*Cynara scolymus* L.) on cultured rat hepatocytes and on human hepatoma cells. *Nutr. Cancer* 60, 276-283.
- Nichter, M., Thompson, J.J. 2006. For my wellness, not just my illness: North Americans' use of dietary supplements. *Cult. Med. Psychiatry* 30, 175-222.
- Oh, H., Kim, D.-H., Cho, J.-H., Kim, Y.-C. 2004. Hepatoprotective and free radical scavenging activities of phenolic petrosins and flavonoids isolated from *Equisetum arvense*. *J. Ethnopharmacol.* 95, 421-424.
- Olaleye, M.T., Adegboye, O.O., Akindahunsi, A.A. 2006. Alchornea cordifolia extract protects wistar albino rats against acetaminophen induced liver damage. *Afr. J. Biotechnol.* 5, 2439-2445.
- Pandino, G., Lombardo, S., Mauromicale, G., Williamson, G. 2011a. Phenolic acids and flavonoids in leaf and floral stem of cultivated and wild *Cynara cardunculus* L. genotypes. *Food Chem.* 126, 417-422.
- Pandino, G., Lombardo, S., Mauromicale, G., Williamson, G., 2011b. Profile of polyphenols and phenolic acids in bracts and receptacles of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) germplasm. *J. Food Compos. Anal.* 24, 148-153.
- Poppendieck, H.-H. 1981 *Cochlospermaceae*, New York Botanical Gardens, Bronx, NY.

- Presber, W., Herrman, D.K., Hegenscheid, B. 1991. The effect of an extract from *Cochlospermum angolense* ('Burututu') on *Plasmodium berghei* in the mouse malaria suppression test. *Angewandte Parasitologie*, 32, 7-9.
- Radimer, K., Bindewald, B., Hughes, J., Ervin, B., Swanson, C., Picciano, M.F. 2004. Dietary supplements use by US adults: data from the national health and nutrition examination survey 1999-2000. *Am. J. Epidemiol.* 160, 339-349.
- Razali, N., Mat-Junit, S., Abdul-Muthalib, A.F., Subramaniam, S., Abdul-Aziz, A. 2012. Effects of various solvents on the extraction of antioxidant phenolics from the leaves, seeds, veins and skins of *Tamarindus indica* L. *Food Chem.* 131, 441-448.
- Reay, J.L., Kennedy, D.O., Scholey, A.B. 2005. Single doses of *Panax ginseng* (G115) reduce blood glucose levels and improve cognitive performance during sustained mental activity. *J. Psychopharmacol.* 19, 357-365.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.* 20, 933-956.
- Sánchez-Salgado, J.C., Ortiz-Andrade, R.R., Aguirre-Crespo, F., Vergara-Galicia, J., León-Rivera, I., Montes, S., Villalobos-Molina, R., Estrada-Soto, S. 2007. Hypoglycemic, vasorelaxant and hepatoprotective effects of *Cochlospermum vitifolium* (Willd.) Sprengel: A potential agent for the treatment of metabolic syndrome. *J. Ethnopharmacol.* 109, 400-405.
- Sane, R.T., Chawla, J.L., Kuber, V.V. 1997. Studies on *Phyllanthus amarus*. *Indian Drugs-Part II* 34:654-655.
- Saunders, J., Smith, T., Stroud, M. 2011. Malnutrition and undernutrition. *Medicine* 39, 45-50.
- Schütz, K., Kammerer, D., Carle, R., Schieber, A. 2004. Identification and quantification of caffeoylquinic acids and flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, juice, and pomace by HPLC-DAD-ESI/MSⁿ. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4090-4096.
- Silva, J.R.A., Ramos, A.S., Machado, M., Moura, D.F., Neto, Z., Canto-Cavalheiro, M.M., Figueiredo, P., Rosario, V.E., Amaral, A.C.F., Lopes, D. 2011. A review of antimalarial plants used in traditional medicine in communities in Portuguese

speaking countries: Brazil, Mozambique, Cape Verde, Guinea-Bissau, Sao Tome and Principe and Angola. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 106, 142-158.

The Wealth of India 2000. A dictionary of Indian raw materials and industrial products national institutes of science communication, council of scientific and industrial research, New Delhi, 1:A-Ci (Revised), 47-49.

Vaknin, Y., Hadas, R., Schafferman, D., Murkhovsky, L., Bashan, N. 2008. The potential of milk thistle (*Silybum marianum* L.), an Israeli native, as a source of edible sprouts rich in antioxidants. Int. J. Food Sci. Nutr. 59, 339-346.

Wallace, J., Paauw, D.S. 2015. Appropriate prescribing and important drug interactions in older adults. Med. Clin. North Am. 99, 295-310.

Wang, K., Zhang, H., Shen, L., Du, Q., Li, J. 2010. Rapid separation and characterization of active flavonolignans of *Silybum marianum* by ultra-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry. J. Pharmac. Biomed. Anal. 53, 1053-1057.

Wang, M., Simon, J.E., Aviles, I.F., He, K., Zheng, Q.Y., Tadmor, Y. 2003. Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke. J. Agric. Food Chem. 51, 601-608.

Wu, T.S., Tsang, Z.J., Wu, P.L., Lin, F.W., Lin, F.W., Li, C.Y., Teng, C.M., Lee, K.H. 2001. New constituents and antiplatelet aggregation and anti-HIV principles of *Artemisia capillaris*. Bioorgan. Med. Chem. 9, 77-83.

Wu, Y., Yang, L., Wang, F., Wu, X., Zhou, C., Shi, S., Mo, J., Zhao, Y. 2007. Hepatoprotective and antioxidative effects of total phenolics from *Laggetera pterodonta* on chemical-induced injury in primary cultured neonatal rat hepatocytes. Food Chem. Toxicol. 45, 1349-1355.

Zapolska-Downar, D., Zapolska-Downar, A., Naruszewicz, M., Siennicka, A., Krasnodebska, B., Kolodziej, B. 2002. Protective properties of artichoke (*Cynara scolymus*) against oxidative stress induced in cultured endothelial cells and monocytes. Life Sci. 71, 2897-2908.

Zhao, Y., Geng, C.-A., Ma, Y.-B., Huang, X.-Y., Chen, H., Cao, T.-W., He, K., Wang, H., Zhang, X.-M., Chen, J.-J. 2014. UFLC/MS-IT-TOF guided isolation of anti-

HBV active chlorogenic acid analogues from *Artemisia capillaris* as a traditional Chinese herb for the treatment of hepatitis. *J. Ethnopharmacol.* 156, 147-154.

Zhou, F., Li, A.Y. 2005. Anti-inflammatory and immune experiment of *Abrus cantoniensis* and *Abrus mollis*. *Yunnan J. Trad. Chin. Med. Mater. Med.* 26, 33-34.

Zuber, R., Modriansky, M., Dvorak, Z., Rohovsky, P., Urichova, J., Simanek, V. 2002. Effect of silybin and its congeners on human liver microsomal cytochrome P450 activities. *Phytother. Res.* 16, 632-638.

Zuber, R., Modriansky, M., Dvorak, Z., Rohovsky, P., Urichova, J., Simanek, V. 2002. Effect of silybin and its congeners on human liver microsomal cytochrome P450 activities. *Phytother. Res.* 16, 632-638.