



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**  
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**Hongos y plantas de interés medicinal en la Selva de Irati  
(Navarra). Ensayos de citotoxicidad del hongo obtenido de la  
Selva de Irati y comparación con tres plantas comerciales  
utilizadas en el tratamiento del cáncer.**

**Trabalho de Projeto**

**Maitane Maisterra Udi**

*Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança  
e à Universidade de Salamanca para obtenção do  
Grau de Mestre em Farmácia e Química de Produtos Naturais*

Orientado por

**Luz Maria Muñoz Centeno**

**Isabel Cristina F.R. Ferreira**

**Pablo Anselmo García García**

**Bragança**

**Noviembre, 2016**

## Agradecimientos

Me gustaría demostrar mi más sincero agradecimiento de todo corazón a todas las personas que han hecho posible este proyecto, que no son pocas.

En primer lugar se lo quiero agradecer a mis tutores, el Doctor Pablo A. García, del Área de Química Farmacéutica de la Universidad de Salamanca (USAL) de España, por ser una bellísima persona que no paramos de “molestar” y bombardearle a preguntas, y que siempre está ahí para cualquier duda, apoyo, animo, y todo con total disponibilidad. Por toda su sabiduría compartida, y todos esos ratos que hemos estado charlando y que me han ayudado a aclarar un poco mis ideas, a crecer como persona y seguir con muchas ganas de formarme en el ámbito de la investigación. A mi tutora Luz María Muñoz Centeno del Área de Botánica de la Universidad de Salamanca (USAL) de España, por toda su ayuda, todo lo aprendido y todos los buenos momentos vividos. Y por supuesto a la Doctora Isabel Ferreira del Laboratorio de Química y Bioquímica Aplicada del Instituto Politécnico de Bragança (IPB) de Portugal, por hacer posible este máster y darnos la oportunidad de crecer en el ámbito de productos naturales con el mejor equipo y el mejor ambiente posible, ha sido un verdadero placer!

También tengo que agradecer a el Doctor Ricardo C. Calhella del Laboratorio de Química y Bioquímica Aplicada del Instituto Politécnico de Bragança (IPB) de Portugal, por todo lo que me ha enseñado en el ámbito celular, por sus explicaciones y aclaraciones, el buen ambiente que crea entre todos y la comodidad de trabajar en un ambiente inmejorable, por ser simpatiquísimo y estar siempre dispuesto a ayudar. Y a la Doctora Lillian Barros (del mismo departamento), por su ayuda en la caracterización química y su amabilidad y simpatía, siempre dispuesta a ayudar en cualquier momento.

También al resto de compañeros del laboratorio, en especial a Angela Fernandes de Portugal, por enseñarme como desenvolverse en el laboratorio y toda su ayuda para cualquier duda y a Angy y Virginia de España por estar siempre ahí.

A todos los entrevistados, en especial a Koldo Villalba, por haberme hablado del hongo, haberme hipnotizado con esa energía y gusto por la naturaleza, por compartir conocimientos y sabidurías, y por ser el tipo de persona que es, espectacular. También a Fernando Esparza, por abrirme los ojos, y animarme a seguir adelante.

A todos mis compis del máster, por hacer que estos dos años hayan sido geniales, por el apoyo entre nosotros, aclaración de dudas, risas y las cervecitas de después de una larga jornada de trabajo. Por la ayuda recibida y colaboración a la hora de todas las mudanzas y transportes. A Beñat por aguantar mi mal genio en el laboratorio, a Liane por hacerme las mañanas más amenas, a Mireia por esos descansitos tan apreciados, a Joana por esos bailes tan graciosos y a Ane por seguir conmigo en esta aventureta.

También quería agradecer a algunos amigos en concreto, a Bego, por acogerme siempre que ha hecho falta y ayudarme a mantener la calma en momentos de mucho estrés, también por haberme presentado a todas sus compañeras en especial mi Logroñesa favorita, Vega. A todos mis colegas de Zizur, por darme animos en todo, ser uno de mis principales apoyos, por animarme a rascar el hongo, y todas las risas que nos hemos hecho con el tema. Al Nomo, por estar en esos momentos más difíciles y en los más buenos y emocionantes. A Sarabe por haberme hablado de Josep y por mostrarme el camino. A Angela por esos cafecitos y animos recibidos, a Jokin por estar siempre ahí, a Elisa por acompañarme en el aprendizaje y a todos los demás que no puedo nombrar por que no terminaría nunca. A los Gaztetxeros y Gaztetxe Esparru porque sin ellos no sería la persona que soy, por enseñarme a luchar, organizarme y seguir luchando por mis sueños.

A los colombianos que me enseñaron el precioso mundo de los productos naturales, Jefer, Camilo y Don Javier Matulevich.

Y por último, y más importante a mi familia. A mi ama y aita, por ayudarme toda la vida en todo, cuidarme, educarme como dios manda y apoyarme en todo y más. A mi hermana Ainhoa, que aunque es la pequeña es la que más me hace aterrizar a la Tierra, y la que me recuerda que es hora de trabajar. A mi madrina, porque es un gran placer tener siempre a una persona cuando hace falta y dispuesta a darlo todo por la gente que quiere. A mi tío Pedro Luis, por ser el mejor setero de todo Salazar y el mundo entero. A mi tío Bene por todo lo que sabe y toda su ayuda. A mi abuela, que aunque ya no este con nosotros se que está ahí. A mi abuelo, de donde me viene esa afición del monte, costillicas con guerrén y espectaculares lugares que sin ti, mi aita no los habría aprendido para poder enseñármelos, y a mi otra abuela, por su interés y ánimo. A todos mis primos, por ser tan locos y haberme hecho crecer entre tantas risas y a todos mis tios restantes por ser como son. Muchísimas gracias de todo corazón.

**Os adoro!**

# ÍNDICE

Lista de símbolos, siglas y abreviaturas .....	V
Índice de figuras .....	VII
Índice de tablas .....	IX
RESUMEN .....	XI
1. INTRODUCCIÓN .....	15
1.1. ETNOBOTÁNICA Y ETNOFARMACOLOGÍA .....	15
1.2. ESTUDIOS ETNOBOTÁNICOS EN NAVARRA .....	17
1.3. ZONA DE ESTUDIO .....	18
1.3.1. LOCALIZACIÓN .....	18
1.3.2. MEDIO FÍSICO .....	18
1.3.3. MEDIO SOCIOECONÓMICO .....	19
1.3.4. ELECCIÓN Y ESTUDIOS POSTERIORES .....	19
1.4. <i>Terana caerulea</i> (Lam.) Kuntze .....	20
1.5. FAMILIA <i>CRASSULACEAE</i> .....	23
1.5.1. GÉNERO <i>KALANCHOE</i> Adanson Fam. 2: 248. 1763 .....	24
1.6. CARACTERIZACIÓN NUTRICIONAL .....	34
1.6.1. PROTEÍNAS .....	35
1.6.2. CARBOHIDRATOS .....	35
1.6.3. LÍPIDOS .....	36
1.6.4. CENIZAS .....	36
1.6.5. ACIDOS ORGÁNICOS .....	37
1.6.6. TOCOFEROLES .....	37
1.6.7. <i>KALANCHOES</i> .....	38
1.7. ACTIVIDAD ANTITUMORAL .....	40
1.7.1. CÁNCER .....	40
1.7.2. ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE <i>Kalanchoe pinnata</i> .....	41
1.7.3. ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE <i>Kalanchoe daigremontiana</i> .....	42
1.7.4. ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE <i>Kalanchoe gastonis-bonnieri</i> .....	43
2. OBJETIVOS .....	44
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	46
3.1. ENTREVISTAS .....	46
3.2. MATERIAL DE ESTUDIO .....	46

3.3. EXTRACTOS Y FRACCIONAMIENTO BIOGIADO DE LOS COMPUESTOS RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD .....	47
3.3.1. INFUSIONES Y DECOCCIONES.....	47
3.3.2. EXTRACTOS DE DISOLVENTES DE DIFERENTES POLARIDADES .	48
3.3.3. FRACCIONAMIENTO Y AISLAMIENTO .....	49
3.3.4. IDENTIFICACIÓN QUÍMICA .....	50
3.4. CARACTERIZACIÓN NUTRICIONAL .....	51
3.4.1. PATRONES Y REACTIVOS .....	51
3.4.2. VALOR NUTRICIONAL.....	52
3.4.3. ANÁLISIS DE COMPUESTOS NUTRITIVOS INDIVIDUALES .....	52
3.5. ENSAYOS DE ACTIVIDAD CITOTÓXICA .....	55
3.5.1. PATRONES Y REACTIVOS .....	55
3.5.2. CITOTOXICIDAD EN LÍNEAS CELULARES TUMORALES HUMANAS Y EN CULTURAS PRIMARIAS DE HÍGADO NO TUMORALES .....	55
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	58
4.1. ESTUDIO ETNOBOTÁNICO .....	58
4.2. EXTRACTOS Y FRACCIONAMIENTO BIOGIADO DE LOS COMPUESTOS RESPONSABLES DE LA BIOACTIVIDAD .....	63
4.2.1. INFUSIONES Y DECOCCIONES.....	63
4.2.2. EXTRACTOS DE DISOLVENTES DE DIFERENTES POLARIDADES .	64
4.2.3 IDENTIFICACIÓN QUÍMICA .....	65
4.3. CARACTERIZACIÓN NUTRICIONAL .....	69
4.3.1. VALOR NUTRICIONAL.....	69
4.3.2. ANALISIS DE FITOQUÍMICOS.....	70
4.4 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD .....	73
4.4.1 ENSAYOS DE ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LAS FRACCIONES DEL E. AcOEt DE <i>TERANA CAERULEA</i> .....	78
4.4.2 ENSAYOS DE ACTIVIDAD CITOTÓXICA EN LA FRACCIÓN DE BUTANOL DE <i>K. DAIGREMONTIANA</i> .....	79
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS .....	80
REFERENCIAS .....	83

## Lista de símbolos, siglas y abreviaturas

<b>ABTS</b>	Ácido 2,2'-azinobis(3- etilbenzotiazolín)-6-sulfónico
<b>AcOEt</b>	Acetato de Etilo
<b>AOAC</b>	Asociación de Químicos Analíticos Oficiales ( <i>Association of Official Analytical Chemists</i> )
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>BHA</b>	Butil-hidroxianisol (Butylated hydroxyanisole)
<b>BHT</b>	Butil-hidroxitolueno
<b>BuOH</b>	Butanol
<b>D.</b>	<i>daigremontiana</i>
<b>DAD</b>	Detector de red de diodos ( <i>Diode Array Detector</i> )
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfoxido
<b>DSMZ</b>	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH</i>
<b>dw</b>	Peso seco ( <i>dry weight</i> )
<b>EAC</b>	Tumor ascítico de Ehrlich
<b>EBV</b>	Virus de Epstein-Barr
<b>EC<sub>50</sub></b>	Concentración de extracto correspondiente al 50% de actividad proliferativa
<b>FID</b>	Detector de ionización de llama ( <i>Flame Ionization Detection</i> )
<b>Fr.</b>	Fracción
<b>GB</b>	<i>gastonis-bonniери</i>
<b>GC</b>	Cromatografía de gases
<b>GI<sub>50</sub></b>	Concentración de muestra responsable del 50% de la inhibición del crecimiento celular
<b>HBSS</b>	Solución salina de Hank (Hank's balanced salt solution)
<b>HeLa</b>	Línea celular humana de cáncer cervical
<b>HepG2</b>	Línea celular humana de cáncer de hígado
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución ( <i>High performance liquid chromatography</i> )
<b><sup>1</sup>H-RMN</b>	Resonancia magnética nuclear de Hidrogeno
<b>HRMS</b>	Espectros de masa de alta resolución
<b>HT-1080</b>	Células humanas de fibrosarcoma
<b>IPB</b>	Instituto Politécnico de Bragança
<b>K.</b>	<i>Kalanchoe</i>
<b>LD<sub>50</sub></b>	Concentración de muestra responsable del 50% de la toxicidad
<b>MCF-7</b>	Línea celular humana de cáncer de mama
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MS</b>	Espectroscopía de masas
<b>MUFA</b>	Ácidos grasos monoinsaturados ( <i>Monounsaturated fatty acids</i> )
<b>NCI-H460</b>	Línea celular humana de cáncer de pulmón
<b>NIST</b>	<i>National Institute of Standards and Technology</i>

<b>OMS/WHO</b>	Organización mundial de la salud/ <i>World Health Organization</i>
<b>P.</b>	<i>pinnata</i>
<b>PI</b>	Patrón interno
<b>PLP2</b>	Línea celular de hígado de cerdo
<b>PUFAs</b>	Ácidos grasos poli-insaturados ( <i>Polyunsaturated fatty acids</i> )
<b>RCOOH</b>	Ácido carboxílico
<b>RI</b>	Índice de refracción
<b>RMN/NMR</b>	Resonancia magnética nuclear/ <i>Nuclear magnetic resonance</i>
<b>RPMI</b>	Medio de cultivo celular Roswell Park Memorial Institute
<b>SD</b>	Desviación estándar
<b>SFAs</b>	Ácidos grasos saturados ( <i>Saturated fatty acids</i> )
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>SRB</b>	Sulforodamina B
<b>STZ</b>	Estreptozotocina
<b>T.</b>	<i>Terana caerulea</i>
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>TLC</b>	Cromatografía en capa fina ( <i>Thin Layer Chromatography</i> )
<b>UFLC</b>	Cromatografía líquida ultrarápida ( <i>Ultra Fast Liquid Chromatography</i> )
<b>UV</b>	Espectroscopía ultravioleta
<b>XTT</b>	Sal de tetrazolio amarilla
<b>ω-3</b>	Omega-3
<b>ω-6</b>	Omega-6

# Índice de figuras

<b>Figura 1:</b> Ubicación de la Selva de Irati en Navarra (Gobierno de Navarra).....	18
<b>Figura 2:</b> <i>Terana caerulea</i> (Maitane Maisterra).....	20
<b>Figura 3:</b> Distribución de <i>Terana caerulea</i> en España (Menéndez Valderrey, 2007) ..	21
<b>Figura 4:</b> Estructura del ácido telefórico (Honda <i>et al.</i> , 1998).....	22
<b>Figura 5:</b> Estructura del leuco-hexametiléter (Weisgraber <i>et al.</i> , 1972).....	22
<b>Figura 6:</b> Estructura de la Corticina A (Newsome <i>et al.</i> , 2014).....	22
<b>Figura 7:</b> Estructura de ácido 6- <i>n</i> -pentadecil-2,4-dihidroxibenzoico (Neveu <i>et al.</i> , 1974) .....	22
<b>Figura 8:</b> Cortalcerona (Baute <i>et al.</i> , 1976).....	22
<b>Figura 9:</b> 2-furilglioxal (Baute <i>et al.</i> , 1976) .....	22
<b>Figura 10:</b> Plantas, hoja y planta de <i>K. pinnata</i> (Maitane Maisterra).....	26
<b>Figura 11:</b> Estructura de los diferentes terpenos de <i>K. pinnata</i> (Supratman <i>et al.</i> , 2001, Ram <i>et al.</i> , 2004) .....	27
<b>Figura 12:</b> Plantas, hoja y gémulas foliares de <i>K. daigremontiana</i> (Maitane Maisterra) .....	30
<b>Figura 13:</b> Compuestos de <i>K. daigremontiana</i> (Rashid <i>et al.</i> , 2013).....	31
<b>Figura 14:</b> Planta y gémulas foliares de <i>K. gastonis-bonnieri</i> (Maitane Maisterra) .....	33
<b>Figura 15:</b> Esquema de composición de un alimento (Maitane Maisterra).....	34
<b>Figura 16:</b> Estructura de los diferentes tocoferoles y tocotrienoles (DellaPenna, 2005) .....	37
<b>Figura 17:</b> Estructura de las diferentes bufadienolidas (Supratman <i>et al.</i> , 2001).....	41
<b>Figura 18:</b> <i>Terana caerulea</i> en la Selva de Irati (Maitane Maisterra).....	47
<b>Figura 19:</b> Muestras de <i>K. pinnata</i> , <i>K. daigremontiana</i> y <i>K. gastonis-bonnieri</i> (Maitane Maisterra).....	47
<b>Figura 20:</b> Muestras de <i>K. gastonis-bonnieri</i> liofilizadas (Maitane Maisterra) .....	48
<b>Figura 21:</b> Cromatografía en columna de <i>Terana caerulea</i> (Maitane Maisterra) .....	50
<b>Figura 22:</b> TLC para la selección de la fase móvil (Maitane Maisterra).....	50
<b>Figura 23:</b> GS/MS (Maitane Maisterra) .....	50
<b>Figura 24:</b> RMN (Maitane Maisterra) .....	51
<b>Figura 25:</b> Determinación de las proteínas y de las cenizas totales (Maitane Maisterra) .....	52
<b>Figura 26:</b> Proceso de tinción de las células (Maitane Maisterra).....	57

<b>Figura 27:</b> Espectro HRMS (ESI) del compuesto <b>1</b> .....	66
<b>Figura 28:</b> Estructura del compuesto <b>1</b> presente en el extracto AcOEt de <i>T. caerulea</i> . ..	66
<b>Figura 29:</b> Correlaciones significativas observadas en los experimentos RMN 2D HMBC (flechas en negro continuas) y ROESY (flecha en rojo discontinuas) .....	67
<b>Figura 30:</b> Espectro HRMS (ESI) del compuesto <b>2</b> .....	68
<b>Figura 31:</b> Estructura del compuesto 2 del extracto de BuOH de <i>K. daigremontiana</i> ..	68

## Índice de tablas

<b>Tabla 1:</b> Taxonomía de <i>Terana caerulea</i> (Menéndez Valderrey, 2007) .....	20
<b>Tabla 2:</b> Taxonomía de <i>Kalanchoe pinnata</i> (Maire, 1976) .....	25
<b>Tabla 3:</b> Taxonomía de <i>Kalanchoe daigremontiana</i> (Maire, 1976).....	29
<b>Tabla 4:</b> Taxonomía de <i>Kalanchoe gastonis-bonnieri</i> (CJB, 2012).....	32
<b>Tabla 5:</b> Análisis químico de <i>K. pinnata</i> (mg/100 g) (Alabi <i>et al.</i> , 2005).....	39
<b>Tabla 6:</b> Contenido de azúcares en <i>K. pinnata</i> (mg/100 g) (Alabi <i>et al.</i> , 2005).....	39
<b>Tabla 7:</b> Compuestos identificados en <i>K. daigremontiana</i> (Anisimov <i>et al.</i> , 2009) .....	39
<b>Tabla 8:</b> Contenido en tocoferoles de las hojas de <i>K. daigremontiana</i> (Szymanska <i>et al.</i> , 2009).....	39
<b>Tabla 9:</b> Contenido de tocoferoles en las hojas de <i>K. daigremontiana</i> de diferentes edades (Kruk <i>et al.</i> , 2011) .....	39
<b>Tabla 10:</b> Contenido de cenizas totales de las hojas de <i>K. gastonis-bonnieri</i> (Legramandi, 2011).....	40
<b>Tabla 11:</b> Actividad inhibitoria de las bufadienolidas hacia la activación de EBV (Supratman <i>et al.</i> , 2001) .....	41
<b>Tabla 12:</b> Actividad proliferativa con la células humanas HT-1080 de fibrosarcoma (Ueda <i>et al.</i> , 2002) .....	42
<b>Tabla 13:</b> Diferentes tipos de vino y sus respectivos usos tradicionales .....	58
<b>Tabla 14:</b> Información obtenida acerca de las plantas y sus usos medicinales tradicionales mediante las entrevistas en la zona de la Selva de Irati.....	60
<b>Tabla 15:</b> Información obtenida acerca de los usos medicinales tradicionales de los hongos y líquenes mediante las entrevistas en la zona de la Selva de Irati.....	62
<b>Tabla 16:</b> Pesos y rendimientos obtenidos de las extracciones por infusión y decocción para 35 g en fresco de <i>K. daigremontiana</i> , <i>K. pinnata</i> y <i>K. gastonis-bonnieri</i> .....	63
<b>Tabla 17:</b> Pesos y rendimientos obtenidos en los diferentes extractos para 2 g de cada muestra: <i>K. daigremontiana</i> , <i>K. pinnata</i> , <i>K. gastonis-bonnieri</i> y <i>T. caerulea</i> .....	64
<b>Tabla 18:</b> Fracciones obtenidas del extracto de AcOEt de <i>T. caerulea</i> .....	65
<b>Tabla 19:</b> Fracción obtenida del extracto BuOH de <i>K. daigremontiana</i> .....	67
<b>Tabla 20:</b> Composición nutricional y valor energético de las tres plantas del género <i>Kalanchoe</i> .....	69
<b>Tabla 21:</b> Composición de ácidos orgánicos de las tres plantas del género <i>Kalanchoe</i> (media±SD) .....	70

<b>Tabla 22:</b> Caracterización de los ácidos grasos, en porcentaje relativo, presentes en las muestras de planta seca de <i>K. daigremontiana</i> , <i>K. pinnata</i> y <i>K. gastonis-bonnierii</i> (media $\pm$ SD).....	71
<b>Tabla 23:</b> Composición de carbohidratos para las tres plantas del género <i>Kalanchoe</i> (media $\pm$ SD), expresado en g por cada 100 gramos de planta seca.....	72
<b>Tabla 24:</b> Composición de tocoferoles para las tres plantas del género <i>Kalanchoe</i> expresado en microgramos por 100 gramos de planta seca.....	73
<b>Tabla 25:</b> Resultados de la citotóxicidad de los extractos de <i>K. daigremontiana</i> .....	74
<b>Tabla 26:</b> Resultados de la citotóxicidad de los extractos de <i>K. pinnata</i> .....	74
<b>Tabla 27:</b> Resultados de la citotóxicidad de los extractos de <i>K. gastonis-bonnierii</i> .....	75
<b>Tabla 28:</b> Resultados de la citotóxicidad de los extractos de <i>Terana caerulea</i> .....	75
<b>Tabla 29:</b> Resultados de la citotóxicidad de las infusiones y decocciones de las tres <i>Kalanchoes</i> .....	75
<b>Tabla 30:</b> Citotoxicidad de ellipticina GI <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL) .....	77
<b>Tabla 31:</b> Resultados de la actividad citotóxica de las tres fracciones obtenidas del extracto de AcOEt de <i>T. caerulea</i> .....	78
<b>Tabla 32:</b> Resultados de la actividad citotóxica de la fracción obtenidas del extracto de BuOH de <i>K. daigremontiana</i> .....	79

## RESUMEN

Desde la antigüedad se han utilizado las plantas y las setas como fuentes de nutrientes y también por sus propiedades medicinales. En la actualidad, continúa el interés en la búsqueda de productos naturales que den lugar a nuevos fármacos, complementos dietéticos o nutracéuticos, de ahí la importancia del estudio de sus constituyentes químicos y de sus actividades biológicas.

Con el fin de ampliar el conocimiento de estas fuentes naturales y por tanto de sus usos, en este trabajo se han estudiado tres especies de plantas medicinales, *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Oken., *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H.Perrier y *Kalanchoe gastonis-bonnieri* Raym.-Hamet & H.Perrier y una especie de hongo saprófito, *Terana caerulea* (Lam.) Kuntze.

El hongo *Terana caerulea* fue elegido mediante un estudio etnobotánico de la Selva de Irati, a través de entrevistas a 14 personas de 9 localidades diferentes, de un rango de edad de 27-94 años de los valles de Salazar y Aezkoa. Se recopilaron un total de 47 usos farmacológicos tradicionales pertenecientes a 25 plantas de 20 familias diferentes. También se recopilaron los usos de un líquen y dos hongos. Mediante este estudio etnobotánico se escogió el hongo *Terana caerulea* para su posterior estudio.

La caracterización química de este hongo consistió en la preparación de extractos y fracciones utilizando disolventes de diferentes polaridades: hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol y agua. Estos extractos fueron fraccionados mediante el uso de cromatografía en columna y cromatografías en capa fina.

Los diferentes extractos y fracciones se analizaron mediante espectrometría de masas (GC/MS y HRMS) y resonancia magnética nuclear ( $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN, COSY, HSQC, HMBC y ROESY), y los resultados se compararon con bases de datos de espectros y con la bibliografía, con el fin de identificar los compuestos presentes.

Se evaluó la actividad citotóxica de extractos, fracciones y compuestos aislados en cuatro líneas celulares tumorales humanas: MCF-7 (carcinoma de mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmón), HeLa (carcinoma cervical) y HepG2 (carcinoma hepatocelular); y la evaluación de la citotoxicidad en cultivos primarios de células de hígado de cerdo (PLP2) por el método de la sulforodamina B (SRB).

El extracto de AcOEt fue el que presentó los valores más bajos de GI<sub>50</sub> en los ensayos de actividad citotóxica frente a las cuatro líneas celulares tumorales evaluadas, siendo más activo frente al carcinoma de mama (MCF-7). A partir de él, se aisló e identificó un compuesto no descrito anteriormente, un derivado del ácido telefórico con tres de los seis grupos hidroxilos metilados: 5',8,8'-trimetoxi-2,9':2',9'-diepoxi-9,7'-ciclo-7,9'-neoligna-7(9'),8,7'-trieno-4,4',5-triol. Este presentó actividad citotóxica, pero en menor medida que los resultados del extracto total de AcOEt, con lo que se podría decir que no es el compuesto más citotóxico de toda la composición química de *Terana caerulea* o que en ese extracto existen sinergias entre diferentes compuestos para lograr una potencia que se pierde en el aislamiento.

La caracterización química de las tres *Kalanchoes* incluyó la determinación de su valor nutricional y energético mediante el análisis de proteínas, grasas, cenizas y carbohidratos, particularmente azúcares por HPLC-RI y ácidos grasos por GC-FID, y la determinación de otros fitoquímicos como tocoferoles por HPLC-Fluorescencia y ácidos orgánicos por UFLC-DAD. También se evaluó su actividad citotóxica frente a las mismas líneas celulares de los extractos de diferentes polaridades (hexano, DCM, AcOEt, MeOH y agua), infusiones y decocciones.

El valor nutricional de las tres plantas reveló una composición elevada en carbohidratos, baja en lípidos y valores energéticos bastante similares. Sin embargo, la composición de ácidos orgánicos varió mucho según la planta. Los tres *Kalanchoes* mostraron una relación de ácidos grasos SFA>PUFA>MUFA, siendo en todos los casos mayoritarios los ácidos grasos saturados. Respecto al contenido en azúcares, *K. pinnata* presentó una mayor cantidad. También contiene la mayor concentración en tocoferoles, siendo  $\gamma$ -tocoferol la isoforma mayoritaria. Todas las plantas presentaron actividad citotóxica, siendo el extracto de BuOH de *K. daigremontiana* el que mejores resultados mostró, y con lo cual, el extracto que se fraccionó para aislar e identificar los compuestos responsables de la actividad. En este caso se aisló e identificó el compuesto 3-O- $\beta$ -D-xilopiranosil(1 $\rightarrow$ 2) $\alpha$ -L-ramnopiranosido de kaempferol mediante las mismas técnicas espectroscópicas, flavonoide no responsable de toda la bioactividad detectada en el extracto butanólico de *K. daigremontiana*.

## ABSTRACT

Since Antiquity different plants and fungus have been used as a nutrient source and also for its medical properties. Nowadays, the interest of looking for diet complements or neurasthenic is due to the study of chemical constituents and biological activities.

In order to know more about these natural sources and therefor their uses in this research, three plant species have been issued: *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Oken., *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H.Perrier and *Kalanchoe gastonis-bonnieri* Raym.-Hamet & H.Perrier, and a species of saprophytic fungus, *Terana caerulea* (Lam.) Kuntze.

The fungus *Terana caerulea* was elected throughout an ethnobotanic study in Irati's Forest, through interviewing 14 people of 9 different places, from an age-range between 27 to 94 in Salazar and Aezkoa valleys. A total of 47 pharmacological uses have been collected from 25 plants of 20 different families. In addition, the usage of a lichen and two fungi was recorded and through the ethnobotanical study the fungus *Terana caerulea* was chosen for investigation.

Its chemical characteristics consisted on making extracts and fractions using solvents from different polarities: hexane, dichloromethane, ethyl acetate, methanol and water. These extracts were fractioned through column chromatography and using thin layer chromatography for checking the fractions.

Different extracts and fractions were analyzed using mass spectrometry (GC/MS y HRMS) and nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN, COSY, HSQC, HMBC y ROESY), and results were compared with spectrum data bases as well as bibliography to identify the compounds.

Antitumoral activity of extracts, fractions and isolated compounds was assessed in four human tumor cell lines: MCF-7 (mama carcinoma), NCI-H460 (lung carcinoma), HeLa (cervical carcinoma) y HepG2 (hepatocellular carcinoma); and cytotoxicity in primary liver pig cells culture (PLP2) by sulphorodamine B method (SRB).

EtOAc extract was presenting lowest  $\text{GI}_{50}$  in cytotoxic activity assay against the four tumor cell lines evaluated, being more active against mama carcinoma. (MCF-7).

Based on that, it was isolated and identified a compound not previously described, a derivate of telephoric acid: 5',8,8'-trimethoxy-2,9':2',9'-diepoxy-9,7'-ciclo-7,9'-neoligna-7(9'),8,7'-trieno-4,4',5-triol. This showed cytotoxic activity, but to a lesser extent the results of the total extract of EtOAc, so that compound is not the most cytotoxic of all the chemical composition of *Terana caerulea* or that in this extract synergies between different compounds to reach a power which is lost in isolation.

The chemical characterization of the three *Kalanchoes* included its nutritional and energetic value by an analysis of proteins, ashes and carbohydrates, particularly sugars by HPLC-RI, fatty acids by GC-FID and determination of other phytochemist like tocopherols by HPLC-Fluorescence and organic acids by UFLC-DAD. Their cytotoxic activities were evaluated against the same cell lines of the different polarity extracts (hexane, DCM, EtOAc, MeOH y water), infusions and decoction.

Three plants' nutritional values revealed a high composition in carbohydrates, low in lipids and energetic values quite similar. However, the composition of organic acids varied a lot depending on the plant. The three *Kalanchoes* showed a relation among fatty acids SFA>PUFA>MUFA, being mainly saturated fatty acids. Regarding to sugar content, *K. pinnata*, showed a higher quantity. It also presented the major concentration in tocopherols, being  $\gamma$ -tocopherol the major isoform. Every plant presented cytotoxic activity, being BuOH extract from *K. daigremontiana* which showed the best results and throughout the fractioned extract which isolated and identified the compounds responsible of activity. In this case the kaempferol 3-*O*- $\beta$ -D-xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2) $\alpha$ -L-rhamnopyranoside was isolated and identified with the same spectroscopic techniques. As before, this flavonoid is not the responsible of the whole bioactivity detected in *K. daigremontiana* butanolic extract.

# 1. INTRODUCCIÓN

Este proyecto se basa en un estudio etnobotánico de la Selva de Irati, con el fin de elegir un hongo o líquen para su posterior estudio citotóxico mediante entrevistas a la gente de la zona, y su comparación con tres plantas del género *Kalanchoe* comercializadas para el uso contra el cáncer como medicina alternativa o complementaria.

## 1.1. ETNOBOTÁNICA Y ETNOFARMACOLOGÍA

La evolución del conocimiento científico sobre las plantas en su utilización por el hombre, se ha producido a través del tiempo. Civilizaciones primitivas percibían la existencia de plantas comestibles y tóxicas que, al ser utilizadas para combatir dolencias, revelaban empíricamente su potencial curativo (Barros, 2008). En este contexto, la etnobotánica surge para comprender el estudio de las sociedades humanas y sus interacciones con las plantas, ya sean ecológicas, genéticas, evolutivas, simbólicas o culturales (Fonseca-Kruel & Peixoto, 2004).

No existe una definición general de etnobotánica, ya que se ha ido modificando según épocas y autores. Los primeros trabajos que se llevaron a cabo bajo el término consistían en realizar listas o catálogos de plantas con especificación de sus respectivos usos (Harshberger, 1896). Cuando los investigadores provenientes de la etnografía comenzaron a interesarse por la disciplina, el objeto de estudio se fue ampliando a la totalidad de las relaciones ser humano-planta, incluyéndose los aspectos etnográficos y simbólicos. Aunque las plantas se inmiscuyen en todos los aspectos de cualquier cultura, el trabajo etnobotánico suele centrarse en los grupos humanos cuya relación con la naturaleza es más directa. Los más importantes son los pueblos indígenas y las culturas rurales (Pardo de Santayana & Gómez Pellón, 2003).

Una de las definiciones más completas es la siguiente, “campo interdisciplinario que comprende el estudio e interpretación del conocimiento, significación cultural, manejo y usos tradicionales, de los elementos de la flora. Al decir tradicionales, se indica que dichos conocimientos, valor cultural, manejo y usos, han sido hechos suyos y transmitidos a través del tiempo por un grupo humano caracterizado por su propia cultura”. La raíz etnos debe traducirse aquí como pueblo, pero no solo en un sentido

racial, sino social y cultural. En pocas palabras, el principal objeto de la Etnobotánica es el estudio de las sabidurías botánicas tradicionales (Barrera, 2001).

En resumen, la etnobotánica es una herramienta útil para recuperar y estudiar el conocimiento tradicional que los pueblos tienen sobre las propiedades de las plantas, su utilización en todos los ámbitos de la vida y su manejo.

La Ley 42/2007 de 13 de diciembre del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad, define conocimiento tradicional como “el conocimiento, las innovaciones y prácticas de las poblaciones locales ligados al patrimonio natural y a la biodiversidad, desarrolladas desde la experiencia y adaptadas a la cultura y el medio ambiente local”. Ampliando esta definición, el conocimiento tradicional se puede considerar “El conjunto de saberes, valores, creencias y prácticas concebidas a partir de la experiencia de adaptación al entorno local a lo largo del tiempo, compartidas y valoradas por una comunidad y transmitidas de generación en generación”. Por entorno local se entiende tanto el entorno cultural como el biológico (Pardo de Santayana *et al.*, 2014).

Estos conocimientos son dinámicos, ya que se transforman incorporando nuevos elementos y desechando otros en una adaptación constante al entorno ambiental, social, cultural, tecnológico y económico de la comunidad o grupo de individuos. Para que esto pueda ocurrir, la sociedad tiene que seguir teniendo la capacidad de generar y transmitir conocimiento (Gómez-Baggethun *et al.*, 2013).

El éxito de las poblaciones humanas ha dependido del conocimiento y de la manipulación de su entorno, en el que las plantas tienen un papel básico. El ser humano se ha valido de los vegetales para solucionar la mayoría de sus necesidades vitales. Este patrimonio es especialmente frágil debido a la acción homogeneizadora y universalizadora de la sociedad industrial (Pardo de Santayana & Gómez Pellón, 2003).

Por otro lado, la etnofarmacología se define como "una exploración científica interdisciplinaria de los agentes biológicamente activos tradicionalmente empleados u observados por el hombre". Este término fue utilizado por primera vez en 1967. La observación, identificación, descripción, la investigación experimental de los ingredientes y sus efectos, y los efectos de los fármacos indígenas es un campo interdisciplinario de la investigación muy importante en el estudio de la medicina tradicional (Ghorbani *et al.*, 2006).

En España, la riqueza de conocimientos en el ámbito de las plantas medicinales, es grande (Pardo de Santayana *et al.*, 2014). Según Fernández y Amezcúa (2007) el número de plantas utilizadas como medicinales en España se aproxima a las 1200.

Todo este conocimiento tradicional es de un incalculable valor y ha sido el punto de partida de este proyecto.

## **1.2. ESTUDIOS ETNOBOTÁNICOS EN NAVARRA**

El número de estudios etnobiológicos en España es grande y de muy diversa índole, concretamente en la provincia de Navarra podemos encontrar varios estudios repartidos en varias zonas, Navarra Norte (Cavero *et al.*, 2011a), Navarra Media (Cavero *et al.*, 2011b) y Ribera Navarra (Calvo *et al.*, 2011), estos se centran en el ámbito de la medicina, junto a otro estudio del Valle de Metauten que se centra en el ámbito alimenticio. También encontramos varios estudios de toda la provincia centrándose en varios ámbitos: alimentación, medicina, artesanía, fitonimia y veterinaria, y otro de la zona del Pirineo, donde se registraron 92 especies vegetales (Akerreta *et al.*, 2007). Las investigaciones hechas en Navarra desde 2003 hasta el presente, han recolectado un número elevado de plantas, que ha permitido publicar varios manuscritos para diversas afecciones: digestivas, (Calvo *et al.*, 2013), dermatológicas (Cavero *et al.*, 2013), cardiovasculares (Calvo & Cavero, 2014), respiratorias (Cavero & Calvo, 2014), enfermedades del aparato locomotor (Cavero & Calvo, 2015) y trastornos neurológicos y mentales (Calvo & Cavero, 2015).

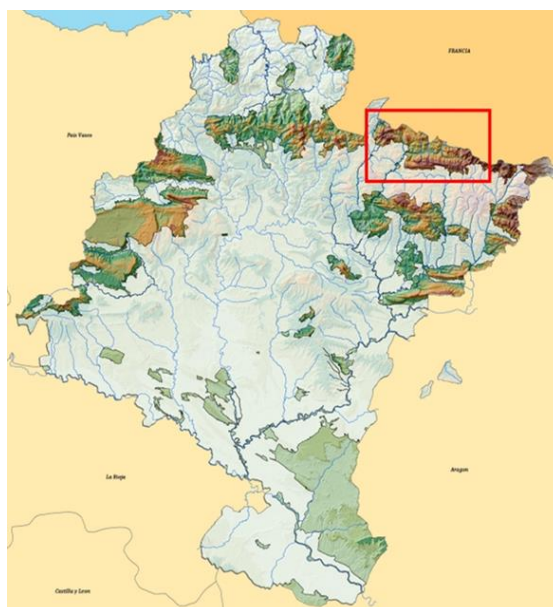
Este estudio se centra en la Selva de Irati, un extenso hayedo-abetal situado en el Pirineo oriental y el segundo mejor conservado de Europa. Está compuesto de cuatro valles, dos de ellos pertenecen a Francia, Valle de Cize y Valle de Zuberoa, y otros dos a España, Valle de Salazar y Valle de Aezkoa, en estos dos últimos valles hemos realizado nuestro estudio.

Para ver los vegetales más interesantes desde el punto de vista medicinal en esta zona, se ha realizado una revisión de los estudios etnobotánicos hechos en la provincia y se ha hecho un pequeño estudio etnobotánico, centrándonos sobre todo en hongos y líquenes medicinales, ya que en los estudio previos, estos grupos de vegetales no estaban suficientemente estudiados.

## 1.3. ZONA DE ESTUDIO

### 1.3.1. LOCALIZACIÓN

La selva de Irati es un extenso hayedo-abetal situado en el Pirineo oriental, en la cabecera del río Irati, entre los valles de Aezkoa y Salazar, noreste de Navarra (España) y los valles de Zuberoa y de Cize en la Baja Navarra (Francia) (**figura 1**). Con sus 17195 hectáreas, constituye la mayor masa arbolada continua de Navarra y de la Península Ibérica, y es el segundo hayedo-abetal más extenso y mejor conservado de Europa, después de la Selva Negra de Alemania (Gobierno de Navarra, 2008).



**Figura 1:** Ubicación de la Selva de Irati en Navarra (Gobierno de Navarra)

### 1.3.2. MEDIO FÍSICO

La Selva de Irati está presidida por una de las cimas más altas de Navarra, el Orhi, que supera los 2000 m de altitud y se sitúa en el extremo oriental. En el otro extremo, al oeste, se encuentran los Altos de Ortzanzurieta, Urkulu y Txangoa de cerca de 1500 m de altitud. Por otro lado, la cadena montañosa de Abodi situada al sur, supone un límite físico imponente que separa este espacio de los valles poblados de la Aezkoa y Salazar. Así mismo, existen numerosas cimas de menor altitud por todo el territorio. Presenta un paisaje aparentemente poco humanizado, donde domina la masa forestal al fondo y las áreas abiertas en la cima de las montañas. Destaca la abundancia de cursos de agua por todo el territorio y la presencia en el interior de los embalses de Irabia y Koixta (Gobierno de Navarra, 2008).

### 1.3.3. MEDIO SOCIOECONÓMICO

El valle de Salazar, constituye una comunidad formada por 15 pueblos (Junta General del Valle de Salazar), mientras que el Valle de Aezkoa está formado por 9 pueblos (Web oficial del Valle de Aezkoa). A principios de este siglo fue la época de mayor población en el Pirineo, con una densidad próxima a los 10 hab/km<sup>2</sup>. En el presente, con una densidad media inferior a 5 hab/km<sup>2</sup>, queda patente la depresión demográfica a la que se ha visto sometido el Pirineo (MAGRAMA, 2006). Todos estos datos muestran una situación recesiva y con clara tendencia a la despoblación. Esta situación supone un riesgo para la conservación de algunos hábitats vinculados muy estrechamente a la gestión humana y una disminución de la capacidad de respuesta y adaptación a las nuevas circunstancias del mercado y la economía (Gobierno de Navarra, 2008).

Debido a la tendencia de despoblación, se ha considerado importante el registro de los usos tradicionales de las plantas de la zona. Para ello se han realizado varias entrevistas con el fin de elegir una planta, hongo o líquen para su posterior estudio.

### 1.3.4. ELECCIÓN Y ESTUDIOS POSTERIORES

Finalmente se escogió el hongo *Terana caerulea* para el estudio de su actividad citotóxica y su comparación con tres plantas del género *Kalanchoe*.

En la medicina tradicional, las plantas del género *Kalanchoe* se han utilizado en el tratamiento de enfermedades periodontales, formación de grietas en los labios, contusiones, heridas, artritis, úlceras gástricas, disentería, tos, fiebre, cólera, enfermedades urinarias y para aliviar dolores de cabeza (Singab *et al.*, 2011). También se ha observado que poseen efectos antiulcerosos, antimicrobianos, analgésicos, hipoglucemiantes, cardiotónicos y antiinflamatorios (Singab *et al.*, 2011; Kuo *et al.*, 2008; Garcés *et al.*, 2007). En las farmacopeas tradicionales malgache, africana y brasileña su uso está registrado para el tratamiento de enfermedades infecciosas, inflamatorias y cancerosas (García, 2009). Hoy en día varias de las especies del género *Kalanchoe* se utilizan como tratamiento alternativo o complementario para el cáncer (Pharmawords, 2006), por esa razón, se hará una comparación con estas tres plantas.

## 1.4. *Terana caerulea* (Lam.) Kuntze

### a) Sinónimos

*Corticium caeruleum* (Lam.) Schrad. ex Fr., *Pulcherricium caeruleum* (Lam.) Parmasto, *Thelephora caerulea* (Lam.) Schrad. ex DC., *Thelephora indigo* Schwein y *Athelia caerulea* (Lam.) Schrad. ex Chevall (Moreno *et al.*, 2010; Fungal Biodiversity Center).

### b) Nombres vernáculos

En castellano es conocido como Corticiáceo azulado, en euskera *Azal urdin*; inglés: *Cobalt Crust*; y en francés: *Croûte bleue*. (Moreno *et al.*, 2010).

### c) Taxonomía

*Terana caerulea* es una especie perteneciente al reino Fungi, cuya taxonomía se presenta en la **tabla 1**.

**Tabla 1:** Taxonomía de *Terana caerulea* (Menéndez Valderrey, 2007)

<i>Terana caerulea</i>	
<b>Reino</b>	Fungi
<b>División</b>	Basidiomycota
<b>Clase</b>	Agaricomycetes
<b>Orden</b>	Poliporales
<b>Familia</b>	Phanerochaetaceae
<b>Genero</b>	<i>Terana</i>
<b>Especie</b>	<i>Terana caerulea</i>



**Figura 2:** *Terana caerulea* (Maitane Maisterra)

### d) Descripción

Es un hongo cuyas fructificaciones son resupinadas adnatas, es decir, el cuerpo fructífero está en la superficie, con el himenio (zona fértil) expuesta al exterior, en forma de parches circulares (orbiculares) que van confluyendo unos con otro y en la madurez pueden alcanzar grandes dimensiones. Está firmemente unido a la superficie vegetal sobre la que crece excepto en los bordes. La superficie himenial es lisa a tuberculada, de consistencia blando-cerácea, de color azul añil, azul marino o azul oscuro cuando el hongo se encuentra en actividad. Con la desecación la superficie himenial se resquebraja y adquiere un color azul pardo. El margen himenial es concoloro o blanquecino en la juventud. Contexto grueso de 0,2-0,5 mm.

Las esporas son elipsoides de 7-13 x 4-7  $\mu\text{m}$ , hialinas, de paredes finas. Basidios claviformes de 30-60 x 5-8  $\mu\text{m}$ , hialinos o algo azulados, tetraspóricos, fibulados en la base y a veces con proliferaciones laterales o apicales (**figura 2**) (Moreno *et al.*, 2010).

#### e) Distribución y ecología

Es un hongo saprófito de ramas muertas y troncos con corteza de todo tipo de sustratos arbóreos, caducifolios y en ocasiones de coníferas, y matorrales (*Berberis*, *Buxus*, *Clematis*, *Crataegus*, *Myrtus*, *Nerium*, *Rubus*, *Ulex*, *Vitex*, *Vitis*). Es escaso en la Europa central y occidental, pero abundante en el sur de Europa, las regiones tropicales y subtropicales. En la Península Ibérica se encuentra distribuida por toda la geografía fructificando en especies caducifolias y de hoja esclerófila de los géneros *Quercus*, *Fraxinus* y *Castanea* principalmente (**figura 3**) (Moreno *et al.*, 2010).



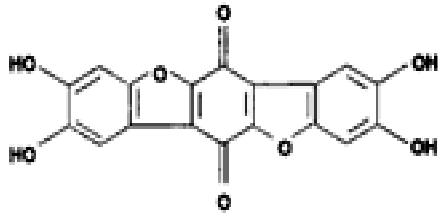
**Figura 3:** Distribución de *Terana caerulea* en España (Menéndez Valderrey, 2007)

#### f) Usos tradicionales

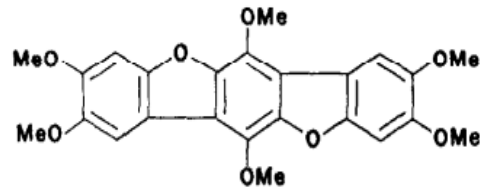
No se han encontrado estudios que hagan referencia al uso tradicional del hongo *T. caerulea*.

#### g) Composición química

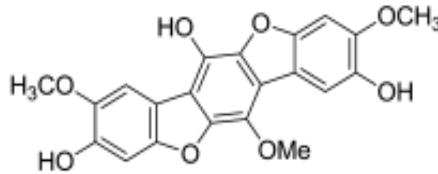
Varias estructuras descritas de este hongo derivan del ácido telefórico (**figura 4**), siendo la diferencia entre ellas el número de metilos presentes en la estructura. Entre ellas, las diferentes corticinas, corticina A (**figura 6**), B y C que son responsables de su color azul. También se ha identificado un leuco-hexametiléter (**figura 5**), que pierde su color al reducirse la quinona a hidroquinona y sustituirse todos los alcoholes por grupos metoxilos (al metilarse por completo) (Newsome *et al.*, 2014; Jaklitsch *et al.*, 2012; Velisek *et al.*, 2011; Baute *et al.*, 1976; Weisgraber *et al.*, 1972).



**Figura 4:** Estructura del ácido telefórico (Honda *et al.*, 1998)

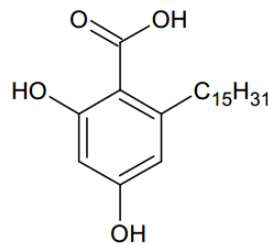


**Figura 5:** Estructura del leuco-hexametiléter (Weisgraber *et al.*, 1972)



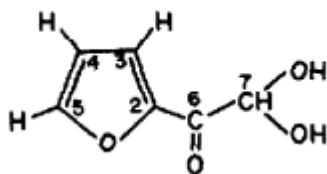
**Figura 6:** Estructura de la Corticina A (Newsome *et al.*, 2014)

Otra estructura identificada en *T. caerulea* es un compuesto fenólico, derivado del ácido benzoico, ácido 6-*n*-pentadecil-2,4-dihidroxibenzoico (**figura 7**) (Neveu *et al.*, 1974)

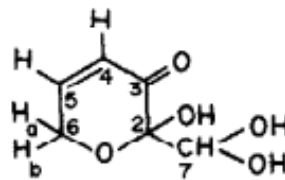


**Figura 7:** Estructura de ácido 6-*n*-pentadecil-2,4-dihidroxibenzoico (Neveu *et al.*, 1974)

El extracto acuoso del micelio de *T. caerulea*, en presencia de agentes activadores, han mostrado la presencia de hidrato de 2-furilgloxal (**figura 9**) e hidrato de 2-hidroxi-6*H*-3-pirona-2-carboxaldehído, este último conocido como cortalcerona (**figura 8**) (Baute *et al.*, 1977; Baute *et al.*, 1976).



**Figura 9:** 2-furilgloxal (Baute *et al.*, 1976)



**Figura 8:** Cortalcerona (Baute *et al.*, 1976)

#### **h) Acciones farmacológicas**

El extracto metanólico en crudo de *T. caerulea*, presenta actividad **antioxidante**, probada mediante los métodos de captadores de radicales libres DPPH y ABTS, utilizando como estándar Trolox y BHA (Lee *et al.*, 2013).

También presenta actividad **antibacteriana** gracias a su composición química, que contiene cortalcerona (Baute *et al.*, 1976).

Ambas actividades podrían justificarse a través de los compuestos fenólicos que se han descrito en sus estudios de composición.

### **1.5. FAMILIA CRASSULACEAE**

Las plantas objeto de este estudio pertenecen a la familia *Crassulaceae*.

Las plantas incluidas en esta familia son generalmente perennes, de herbáceas a subarborescentes. Hojas generalmente crasas y enteras, alternas, opuestas o verticiladas, frecuentemente agrupadas en roseta basal, aunque a veces ubicada en el ápice de los tallos estériles. Inflorescencias cimosas, terminales o axilares. Flores hermafroditas, raramente dioicas, actinomorfas, típicamente pentámeras, raramente 3-4 o 6-32 meras, a veces solitarias o agrupadas en parejas axilares. Cáliz de sépalos libres o soldados en la base, generalmente carnosos y poco llamativos. Pétalos libres o soldados en diferente grado. Androceo con 1-2 verticilos de estambres. Ovario súpero, carpelos en igual número que sépalos o pétalos, libres o, con menor frecuencia, más o menos soldados; estilo de longitud variable. Fruto en polifolículo; semillas numerosas en cada folículo (Maire, 1976).

Familia cosmopolita integrada por cerca de 35 géneros (número que puede variar dependiendo de los criterios de clasificación) y aproximadamente 1500 especies.

Muchas de las especies de esta familia se han adaptado a vivir en hábitats extremadamente secos, para lo que las plantas han desarrollado estructuras que permiten evitar la deshidratación, como pruina, pelos, espinas; además sus tallos y hojas se hicieron carnosas para acumular agua. Para sobrevivir en esas condiciones, han desarrollado diferentes métodos de reproducción vegetativa, éste es el caso de ciertos *Kalanchoe* Adans., que gracias a sus gémulas foliares, se difunden con mucha facilidad (Castroviejo, 1997).

### **1.5.1. GÉNERO *KALANCHOE* Adanson Fam. 2: 248. 1763.**

*Kalanchoe* es un género controvertido. En 1907 el botánico estadounidense especialista en Crasuláceas Rayment-Halmet publicó una monografía del género *Kalanchoe* incluyendo al género *Bryophyllum* dentro del mismo (Sánchez de Lorenzo, 2015), pero algunos de los estudios moleculares que se están llevando a cabo, los consideran géneros distintos y varias especies del género *Kalanchoe* han pasado ahora al género *Bryophyllum*.

Las plantas pertenecientes a este género son herbáceas perennes, subarbustos o arbustos carnosos. Las hojas son opuestas, raramente verticiladas o alternas. Inflorescencias terminales en cimas o panículas de cimas. Flores tetrámeras. Cáliz formado por 4 sépalos, más o menos concrecentes en la base. Corola gamopétala, generalmente con divisiones muy cortas. Androceo formado por dos verticilos de estambres 4 + 4, glabros, insertos en el tubo de la corola. Nectarios en forma de escamas. Ovario formado por 4 carpelos, ligeramente concrecentes en la base, glabros, atenuados en 4 estilos más o menos largos. Fruto formado por 4 folículos polispermos (Maire, 1976).

Las sustancias más notables biosintetizadas por las diferentes especies de este género pertenecen a los glucósidos de flavonoides, un conjunto de pigmentos vegetales y a las bufadienolidas, grupo de esteroides cardioactivos. (García, 2009).

En este proyecto vamos a hacer la caracterización nutricional, y el estudio de la actividad citotóxica de tres plantas del género *Kalanchoe*: *K. pinnata*, *K. daigremontiana* y *K. gastonis-bonnieri*.

#### ***Kalanchoe pinnata* (Lamk.) Pers., Syn. Pl. 1: 446. 1805.**

##### **a) Sinónimos**

*Bryophyllum calycinum* Salisb.; *Cotyledon pinnata* Lam. (1786); *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken (1841); *Verea pinnata* (Lam.) Spreng. (1825) (CJB, 2012).

##### **b) Nombres vernáculos**

Es conocida vulgarmente en castellano como: Planta de Aire, Campanas de la Catedral, Planta de la Vida, Planta de Goethe. Los dos primeros son también nombres comunes de otras plantas de otras especies y géneros (Mukul, 2009).

En África se conoce como *goodluck* y/o *resurrection plant* (Ojewole, 2005). También se conoce como *Wonder of the World* (maravilla del mundo) en el habla inglesa (Mukul, 2009).

En Hawai se conoce como *Oliwa Ka Kahakai*, en Estados Unidos como *Mother Of Thousands*, *Air Plant*, en la República Dominicana como *Herbe Mal Tete*, en Filipinas como *Katakataka* (asombrosa, notable) y en Bolivia como Siempre Viva, Parvu u Hoja Del Aire (Mukul, 2009).

### c) Taxonomía

La taxonomía de *K. pinnata* se muestra en la **tabla 2**.

**Tabla 2:** Taxonomía de *Kalanchoe pinnata* (Maire, 1976)

<i>Kalanchoe pinnata</i>	
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Subreino</b>	Tracheobionta
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Subclase</b>	Rosidae
<b>Orden</b>	Saxifragales
<b>Familia</b>	Crassulaceae
<b>Género</b>	<i>Kalanchoe</i>
<b>Subgénero</b>	<i>Bryophyllum</i>
<b>Especie</b>	<i>Kalanchoe pinnata</i>

### d) Descripción botánica

Es una planta perenne, verde y glabra. Tallo erecto, robusto, simple y cilíndrico, de 0,6-1,2 m de altura. Hojas carnosas, opuestas, decusadas, imparipinnadas, a veces alguna de ellas reducidas al foliolo terminal, foliolos oblongos, raramente suborbiculares, margen crenado de color púrpura; peciolo púrpura de 2-10 cm; las hojas inferiores son simples. Flores colgantes en cimas agrupadas en panículas terminales; pedicelos floríferos de 18-25 cm de largo. Cáliz hinchado, en forma de campana, verde-purpura, a veces con rayas de color rojo o rojo-violeta; tubo de 21-31 mm de largo; lóbulos tan anchos como largos (7-10,5 x 7-10,5 mm) de deltados a semiorbiculares, agudos. Corola tubular más larga que el cáliz, tubo blanco-verdoso de 25-30 mm, lóbulos rojizos de 10-12 mm, ovado-trianguulares, agudos. Estambres ligeramente exertos, filamentos insertos por debajo de la mitad del tubo de la corola. Nectarios lineales. Carpelos conniventes, ovoide-lanceolados, atenuados en estilos delgados, más largos que el ovario. Floración

primaveral. Se multiplica fácilmente por las yemas adventicias que surgen en las hojas (**figura 10**) (Maire, 1976).



**Figura 10:** Plantas, hoja y planta de *K. pinnata* (Maitane Maisterra)

#### e) **Distribución y ecología**

Es una planta nativa de Madagascar. Se distingue por la abundancia de plántulas en miniatura que se forman en los márgenes de sus hojas, característica que tiene en común con otros miembros del género (Mukul, 2009).

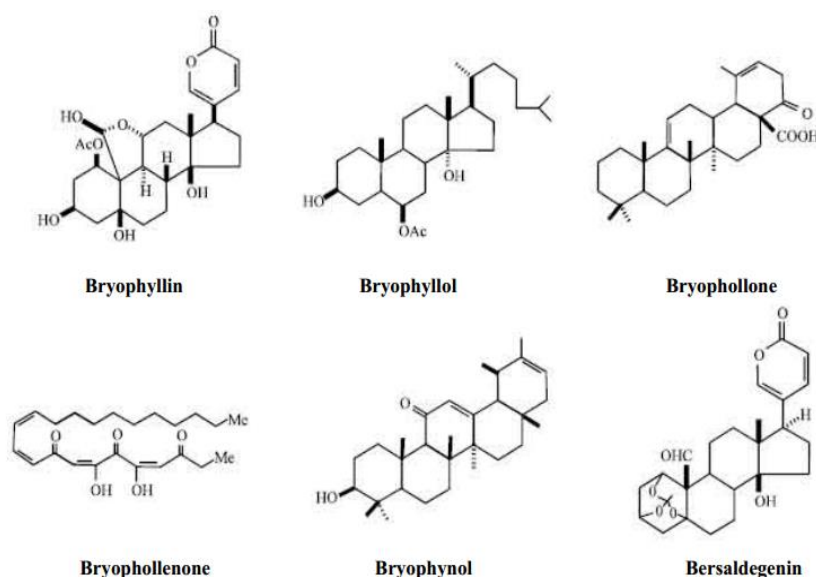
Se ha naturalizado en las regiones de Asia, Australia, Nueva Zelanda, India occidental, Macaronesia, Mascareñas, Galápagos, Melanesia, Polinesia y Hawái. En muchas de ellas, se considera como una especie invasora (Mukul, 2009).

Habita en climas cálido, semicálido y templado desde el nivel del mar hasta los 2600 m, ocupa sitios sobre roca, asociada a bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio, subperennifolio, perennifolio, además de bosque mesófilo de montaña (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

#### f) **Composición química**

Estudios anteriores de los extractos de diferentes partes de *K. pinnata* mostraron la presencia de alcaloides, triterpenos (**figura 11**) como  $\alpha$  y  $\beta$ -amirina, sus acetatos, briofolona, briofinol, y briofolenona, 18- $\alpha$ -oleanona y taraxasterol; flavonoides como 5'-metil-4',5, 7-trihidroxi-flavona, 3, 4', 5, 7-tetrahidroxi-5-metil-5'propanoamina antociananidina y un diglicosido de kaempferol nombrado como kapinnatosida (conocido por tener actividad contra la leishmaniasis), saponinas, taninos, carotenoides, cardenolidas, y esteroides como birofilol, 24-etil-25-hidroxicolesterol y  $\beta$ -sitosterol (Matthew, 2013; Nguielefack *et al.*, 2006; Okwu & Josiah, 2006; Gaind & Gupta, 1974; Gaind & Gupta, 1972; Marriage, *et al.*, 1971).

Las hojas contienen un grupo de compuestos químicos muy activos llamados bufadienolidas que se mencionan en el apartado 1.7.2 (**figura 17**) (Rastogi 1990-1994; Yamagishi *et al.*, 1989; McKenzie, *et al.*, 1987).



**Figura 11:** Estructura de los diferentes terpenos de *K. pinnata* (Supratman *et al.*, 2001, Ram *et al.*, 2004)

### g) Acciones farmacológicas

Varios estudios de diferentes extractos de *K. pinnata* confirman acciones farmacológicas tales como: **actividad antimicrobiana** frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger* (Okwu & Nnamdi, 2011), también es eficaz frente a infecciones causadas por *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogens*, *Klebsiella pneumonia* y *Salmonella typhi* debido a la presencia de compuestos fenólicos (Afzal *et al.*, 2012; Ofokansi *et al.*, 2005), **actividad anti-úlceras** testada en úlceras agudas inducidas en el estómago y el duodeno de ratas y conejillos de indias (Siddhartha & Chaudhuri, 1991), **actividad hipotensora**, disminuye las presiones arteriales y del corazón en las ratas normotensas anestesiadas e hipertensas (Prasad *et al.*, 2012; Ojewole, 2002), **actividad antihelmíntica** y **antiprotozoaria** evaluada *in vivo* en el modelo murino de la leishmaniasis cutánea (Majaz *et al.*, 2011; Muzitano *et al.*, 2009; Muzitano *et al.*, 2006), **actividad cicatrizante** (Nayak *et al.*, 2010), **actividad antidiabética**, investigada en ratas utilizando estreptozotocina (STZ) inducida por la diabetes mellitus (Bergmann *et al.*, 2006; Ojewole, 2005), **actividad antiinflamatoria**, inhibe la inflamación aguda inducida por la albumina de huevo fresco, también tiene un efecto antinociceptivo en estímulos de dolor inducidos en ratones (Afzal *et al.*, 2012; Ojewole, 2005), **actividad hepatoprotectora**, reduce significativamente las enzimas que aumentan durante la lesión

hepática (Yadav & Dixit, 2003; Shahidi *et al.*, 1999), **actividad nefroprotectora**, **actividad diurética** y **antiurólítica** (Majaz *et al.*, 2011; Patil *et al.*, 2008; Harlalka & Patil, 2007), **actividad anticonvulsiva**, aumenta el período de latencias de las convulsiones y reduce la duración de los ataques (Hossan & Yemitan, 2009; Nguelefack *et al.*, 2006), **actividad sedante** y **relajante muscular**, posee una potente acción depresora del sistema nervioso central (Afzal *et al.*, 2012; Hossan & Yemitan, 2009; Pal *et al.*, 1999), y también mostró un efecto relajante *in vitro* sobre la contractilidad del miometrio humano (David *et al.*, 2000).

Otras actividades importantes son la **actividad antioxidante**, esta fue evaluada mediante varios métodos, la actividad captadora de radicales DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) utilizando el ácido ascórbico como estándar, método de eliminación de radicales libres de óxido nítrico, que se utiliza para detectar la actividad oxidativa, poder reductor de los extractos, que se determinó como medida de la actividad antioxidante y el método de inhibición de la peroxidación lipídica (Harlalka *et al.*, 2007). **Actividad inmunomoduladora**, esta se evaluó en el extracto acuoso de las hojas de *K. pinnata* y se observó que las células del bazo de los animales tratados previamente con la planta mostraron una disminución de la capacidad de los mitógenos y el antígeno *in vitro*, así como la respuesta específica de anticuerpos a la ovoalbúmina también fue reducida significativamente por el tratamiento (Cruz *et al.*, 2008; Rossi-Bergmann *et al.*, 1994), y la **actividad antitumoral** determinada por varios métodos; determinación de los efectos inhibidores sobre el virus de Epstein-Barr (EBV), actividad antiproliferativa contra las células humanas HT-1080 de fibrosarcoma, evaluación de la actividad antiproliferativa mediante la escisión de la sal de tetrazolio amarilla XTT y ensayos *in vivo* con ratones con células del tumor ascítico de Ehrlich (EAC) (Devbhuti *et al.*, 2012; El Abdellaou *et al.*, 2010; Ueda *et al.*, 2002; Supratman *et al.*, 2001).

#### **h) Precauciones**

El estudio de toxicidad aguda determina que los valores de LD<sub>50</sub> del extracto metanólico en ratones y ratas son 1159,03 y 1459,69 mg/kg, respectivamente, y la LD<sub>50</sub> del extracto acuoso 957,02 y 1064,21 mg/kg respectivamente. Se encontró que los extractos no son tóxicos por vía oral en dosis de hasta 3 g/kg en ratones y ratas. En la dosis 2 g/kg de peso corporal por vía oral durante 35 días en ratas no causó cambios histológicos en los riñones, el corazón y el bazo. No hubo ninguna muerte en una dosis

máxima de 5 g/kg por la vía oral. La LD<sub>50</sub> intraperitoneal fue de 1,8 g/kg de peso en ratas (Devbhuti *et al.*, 2012; Ozolua *et al.*, 2010; Devbhuti *et al.*, 2008).

***Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H.Perrier Ann. Mus. Colon. Marseille, sér. 3, 2: 128–132. 1914.**

**a) Sinónimos**

*Bryophyllum daigremontianum* (Raym.-Hamet & H.Perrier) A. Berger (1930) (CJB, 2012).

**b) Nombres vernáculos**

Es conocida vulgarmente en castellano como: Espinazo del Diablo, Aranto, Siempreviva, Dulcamara; portugués: *Mãe de milhares*; inglés: *Mother of Thousands*, *Palm tree Bryophyllum*, *Mexican Hat Plant*, *Alligator Plant*, *Devil's backbone*, *Chandelier Plant*, *Mother of Millions* (LLIFLE, 2005).

**c) Taxonomía**

La taxonomía de *K. daigremontiana* se presenta en la **tabla 3**.

**Tabla 3:** Taxonomía de *Kalanchoe daigremontiana* (Maire, 1976)

<i>Kalanchoe daigremontiana</i>	
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Subreino</b>	Tracheobionta
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Subclase</b>	Rosidae
<b>Orden</b>	Saxifragales
<b>Familia</b>	Crassulaceae
<b>Género</b>	<i>Kalanchoe</i>
<b>Subgénero</b>	<i>Bryophyllum</i>
<b>Especie</b>	<i>Kalanchoe daigremontiana</i>

**d) Descripción botánica**

Planta perenne, verde y glabra. Tallo simple o poco ramificado, erecto, cilíndrico, de 60-80 cm de largo. Hojas simples, opuestas, lanceoladas, verdes en el haz, glaucas o gris-rosadas con vetas marrón-púrpuras en el envés, margen serrado con dientes agudos de los que surgen gémulas foliares que forman raíces; pecíolos subcilíndricos más cortos que la lámina; las hojas inferiores pueden alcanzar 13 x 4 cm, las superiores son menores. Flores colgantes en cimas agrupadas en panículas terminales. Cáliz con forma de campana, verde o púrpura, tubo de 3-4 mm; lóbulos de 3-7 mm, ovado-trianguares,

erectos. Corola rosa-violácea, con tubo subcilíndrico de 13-17 mm; lóbulos de 6-12 mm, obovados de ápice redondeado. Estambres más cortos que la corola con los filamentos insertos por debajo de la mitad del tubo de ésta. Carpelos conniventes, atenuados en estilos largos y delgados. Florece en invierno o primavera, aunque su periodicidad no es anual (**figura 12**) (Maire, 1976).



**Figura 12:** Plantas, hoja y gémulas foliares de *K. daigremontiana* (Maitane Maisterra)

#### e) Distribución y ecología

*K. daigremontiana* es nativa del valle del río Fiherenana y las montañas Androhibolava en el suroeste de Madagascar. Ha sido introducido en numerosas regiones tropicales y subtropicales, como Florida y en la costa sur de Texas, Puerto Rico, las islas del Pacífico (Galápagos, Hawai, Fiji, Marshal, Nueva Caledonia, Niue) África subtropical y África del Sur, Australia (Queensland), India, Pakistán, china, Nueva Zelanda, y partes de las Islas Canarias.

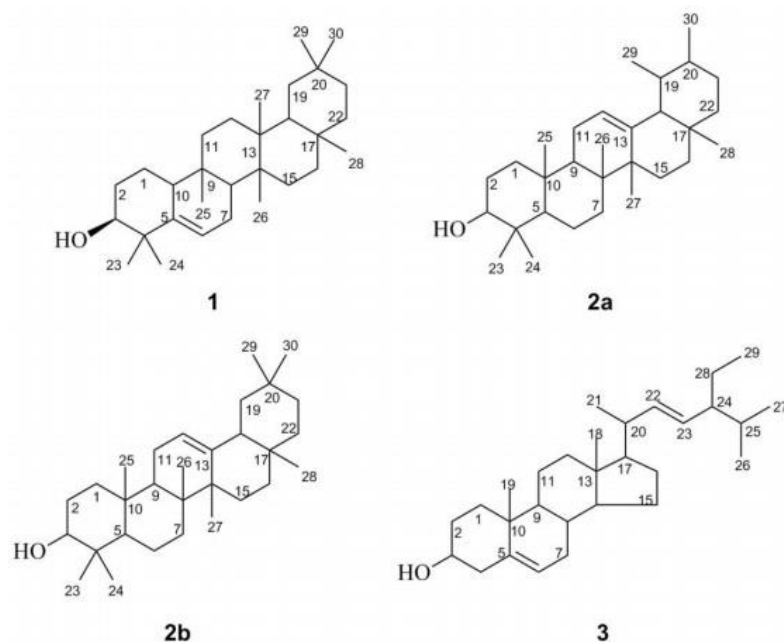
Se cultiva ampliamente en los jardines en los países tropicales. Está bien establecida y se considera una maleza agresiva que naturalizada casi en todas partes y por lo general se encuentra en la difusión de los bordes de caminos. Los exudados de las raíces pueden inhibir el crecimiento de las plantas cercanas (LLIFLE, 2005).

Puede sobrevivir largos periodos de sequía con poco o nada de agua. Sin embargo no es resistente a las heladas y típicamente muere si se somete a temperaturas bajo cero (The Encyclopedia of Life, 2009).

#### f) Composición química

Estudios anteriores han confirmado varios tipos de compuestos como 11-oxo-epi- $\beta$ -amirina, 21-deshidrodesmosterol, ácido 3,4-dihidroxi-*cis*-cinámico y *p*-hidroxibenzaldehído (Kulka, 2006), glut-5(6)-en-3 $\beta$ -ol [1], mezcla de  $\alpha$ -amirina [2a] y  $\beta$ -amirina [2b] y estigmasterol [3] (**figura 13**) (Rashid *et al.*, 2013).

Al igual que *K. pinnata*, también contiene un grupo de bufadienolidas muy activas (figura 17) (Supratman *et al.*, 2001).



**Figura 13:** Compuestos de *K. daigremontiana* (Rashid *et al.*, 2013)

### g) Acciones farmacológicas

Varios estudios de diferentes extractos de *K. daigremontiana* confirman actividades tales como **actividad antimicrobiana**, determinada por el método de difusión de disco (Bauer *et al.*, 1966), esto se probó frente a varias bacterias Gram positivas y Gram negativas y en diferentes hongos (Kamrun *et al.*, 2008). **Actividad trombolítica**, evaluada mediante el método de Prasad (Sikder *et al.*, 2011; Prasad *et al.*, 2006) y **actividad hemolítica**, evaluada mediante una prueba de eritrocitosis (Anisimov *et al.*, 2009).

Otras actividades farmacológicas importantes son la **actividad antioxidante**, esta fue evaluada mediante la actividad captadora de radicales DPPH utilizando *terc*-butil-4-hidroxitolueno (BHT) como estándar de referencia (Rashid *et al.*, 2013) y **actividad antitumoral**, evaluada mediante el método de determinación de los efectos inhibidores sobre el virus de Epstein-Barr (EBV) (Supratman *et al.*, 2001).

### h) Precauciones

Se ha determinado que las hojas de *K. daigremontiana* son tóxicas en pollitos a una dosis de 8-12 mg/g de peso corporal. Los signos tóxicos incluyen depresión, falta de coordinación muscular, espasmos, temblores, convulsiones, parálisis y la muerte (Williams & Smith, 1984).

***Kalanchoe gastonis-bonnierei* Raym.-Hamet & Perrier Ann. Sci. Nat., Bot., sér. 9 16: 364–366 (1912)**

**a) Sinónimos**

*Bryophyllum gastonis-bonnierei* (Raym.-Hamet & H.Perrier) Lauz.-March. y *Kalanchoe adolphi-engleri* Raym.-Hamet (1955) (CJB, 2012).

**b) Nombres vernáculos**

Es conocida vulgarmente en castellano como: Oreja de burro, Hojerilla, Ojaransín, en inglés como: *Donkey ears*, *Sprouting Leaf*, *Sprout Leaf Plant*, *Palm Beachbells*, *Miracle Leaf*, *Leaf of Life*, *Good Luck Leaf*, *Giant Kalanchoe*, *Tree of Life*, *Donkey ear plant*, *Donkey's ear*, *Life Plant* y en portugués como: *Perrier planta-da-vida* (LLIFLE, 2005).

**c) Taxonomía**

La taxonomía de *K. gastonis-bonnierei* se muestra en la **tabla 4**.

**Tabla 4:** Taxonomía de *Kalanchoe gastonis-bonnierei* (CJB, 2012)

<i>Kalanchoe gastonis-bonnierei</i>	
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Subreino</b>	Tracheobionta
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Subclase</b>	Rosidae
<b>Orden</b>	Saxifragales
<b>Familia</b>	Crassulaceae
<b>Género</b>	<i>Kalanchoe</i>
<b>Especie</b>	<i>Kalanchoe gastonis-bonnierei</i>

**c) Descripción botánica**

Planta verde-pruinosa. Tallos, en su mayoría, simples, cilíndricos, de 70 x 1,5 cm. Hojas simples, opuestas, de lanceoladas a espatuladas, pruinosas, gris-verdosas con manchas púrpuras, de 15-50 x 5-10 cm, márgenes crenados de los que surgen gémulas foliares que forman raíces, ápices agudos; pecíolos anchos, poco diferenciados de los limbos. Flores colgantes en cimas agrupadas en panículas terminales. Cáliz glabro, campanulado-urceolado, verde rojizo, tubo de 13-15 mm, lóbulos triangulares de 5-10 mm. Corola amarilla o verde rojiza, con tubo cilíndrico de 30-40 mm, lóbulos triangular-ovados de 6-10 mm, ápice acuminado. Estambres más cortos que la corola con los filamentos insertos por debajo de la mitad del tubo de ésta. Carpelos conniventes,

atenuados en estilos largos y delgados. Florece a lo largo del verano pero puede hacerlo en otras épocas también (**figura 14**) (FNA, 2009).



**Figura 14:** Planta y gémulas foliares de *K. gastonis-bonnierei* (Maitane Maisterra)

#### **d) Distribución y ecología**

*K. gastonis-bonnierei* es originaria del noroeste de Madagascar. Introducida como planta de jardín, ahora se ha naturalizado en las zonas tropicales de la Amazonia, África, Asia, Australia y otros lugares en los trópicos.

Se encuentra en las rocas calcáreas en bosques bajos abiertos (LLIFLE, 2005).

#### **e) Composición química**

Estudios realizados a *K. gastonis-bonnierei* han confirmado la presencia de compuestos terpénicos y fenólicos, entre ellos flavonoides como, 3-*O*- $\alpha$ -ramnopiranosil-7-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil(1->3)- $\alpha$  -L-ramnopiranosido de quercetina y 6-*C*- $\beta$ -D-glucopiranosil-8-*C*- $\beta$ -D-glucopiranosido de apigenina (vicenin-2) (Costa *et al.*, 2015; Legramandi, 2011).

#### **f) Acciones farmacológicas**

El extracto acuoso en crudo de *K. gastonis-bonnierei* presenta **actividad anticonceptiva**, esto se ha probado *in vivo* en el epidídimo de ratas (Miranda-Beltrán *et al.*, 2003). La **actividad antifúngica** también ha sido evaluada mediante la técnica de dilución de microplaca, esto ha sido probado en diferentes extractos (Legramandi, 2011).

#### **g) Precauciones**

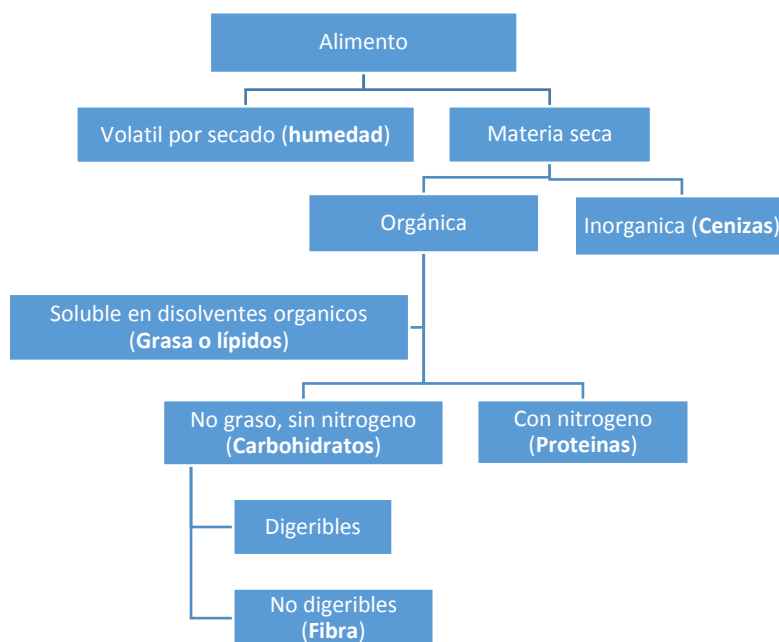
Los estudios de toxicidad revelaron que 13 g/kg peso corporal induce un 80% de letalidad y la dosis letal está estimada en 11,0 g/kg de peso. En todos los casos los animales desarrollaron mal estar general, con los siguientes síntomas: espasmos abdominales, erizado de pieles, letargo, postración, la inactividad y la pérdida de peso. Tres de las seis ratas murieron a las 24 horas, y las otras tres sobrevivieron recuperándose por completo en 8 días después del tratamiento (Miranda-Beltrán *et al.*, 2003).

## 1.6. CARACTERIZACIÓN NUTRICIONAL

Una dieta saludable ayuda a protegernos de la malnutrición en todas sus formas, así como de las enfermedades no transmisibles, como la diabetes, cardiopatías, accidentes cardiovasculares y el cáncer. Para tener una alimentación sana es preciso comer frutas, verduras, legumbres, frutos secos y cereales integrales (WHO, 2015).

Tanto las plantas como las setas son fuentes de productos naturales, cuya diversidad y complejidad es muy grande, por lo que es necesario clasificarlos en grupos basándose en diferentes criterios. En la clasificación por su origen biosintético, se pueden diferenciar dos grupos, productos del metabolismo primario (carbohidratos, lípidos, aminoácidos, péptidos y proteínas) (**figura 15**) y productos del metabolismo secundario (compuestos terpénicos, fenólicos y compuestos secundarios nitrogenados).

Estos productos naturales son compuestos químicos que pueden ser responsables de acciones farmacológicas, denominándose principios activos, y son utilizados en terapéuticas, como en fitoterapia y medicina (Castillo García & Martínez Solís, 2007). Pero también pueden ser utilizados como complementos dietéticos o como nutracéuticos en alimentos funcionales (término acuñado desde nutrición y farmacéutico). Algunos ejemplos de nutracéuticos o "ingredientes alimentarios funcionales" son: fibra dietética, ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), proteínas, péptidos, aminoácidos, cetoácidos, minerales, vitaminas antioxidantes y otros antioxidantes (Andlauer & Fürst, 2002).



**Figura 15:** Esquema de composición de un alimento (Maitane Maisterra)

### **1.6.1. PROTEÍNAS**

Los aminoácidos son las unidades estructurales de las proteínas. Todos ellos tienen tres grupos funcionales unidos a un átomo central de carbono; un grupo amino, un grupo carboxilo y una cadena lateral.

Las proteínas tienen varias funciones que son específicas de cada tipo de proteína.

El cuerpo de un adulto normal, no obeso, contiene de 12-18 % de proteínas, con diferentes funciones; estructurales, reguladoras, contráctiles, inmunitarias, de transporte y catalíticas (actúan como enzimas que regulan reacciones bioquímicas) (Tortora *et al.*, 2003).

### **1.6.2. CARBOHIDRATOS**

Los carbohidratos están formados por carbono, hidrógeno y oxígeno. Estos incluyen azúcares, almidones, glucógeno y celulosa (Tortora *et al.*, 2003).

La principal función de los carbohidratos en los animales consiste en proporcionar una fuente rápida de energía química para generar ATP, que activa las reacciones metabólicas.

Estos se clasifican en tres grandes grupos, de acuerdo con su tamaño: monosacáridos (no se pueden convertir por hidrólisis en azúcares más pequeños), disacáridos y polisacáridos (la hidrólisis los rompe en sus monosacáridos constituyentes). (Tortora *et al.*, 2003; McMurry, 2001).

Los carbohidratos se pueden unir a una gran variedad de compuestos (llamados agliconas) formando glucósidos, lo que aumenta la solubilidad en agua de las gliconas. Los glucósidos varían en su estructura química y su actividad farmacológica debido a su componente de aglicona (Tortora *et al.*, 2003).

En Farmacología, además de su utilidad como agentes de carga (sustancias que aumentan el volumen de un alimento sin contribuir significativamente a su valor energético), se ha descubierto que varios polisacáridos poseen actividad inmunomoduladora, antitumoral, anticoagulante, hipoglucémica o antiviral. Los distintos productos de hidratos de carbono comercializados incluyen fibra, celulosa y sus derivados, almidón (polímeros de glucosa) y sus derivados, dextrinas, fructanos, los ácidos algínicos, agar y gommas (Gurib-Fakim, 2006).

### 1.6.3. LÍPIDOS

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos (RCOOH) con una cadena hidrocarbonada de 4 a 36 carbonos. En los ácidos grasos saturados (SFAs), la cadena hidrocarbonada está saturada, es decir, no contiene dobles enlaces. En los ácidos grasos insaturados, la cadena hidrocarbonada está insaturada, es decir, posee uno (monoinsaturados, MUFAs) o más dobles enlaces (poliinsaturados, PUFAs). La mayor parte de los ácidos grasos sintetizados o ingeridos por un organismo se incorporan a los triglicéridos, compuestos por tres ácidos grasos unidos por enlace éster al glicerol, para el almacenamiento de energía metabólica o se incorporan a los fosfolípidos constituyentes de las membranas (Nelson & Cox, 2000).

Los ácidos grasos esenciales son PUFAs, necesarios para la salud, que deben incorporarse en la alimentación, ya que no pueden sintetizarse en el cuerpo humano. Se dividen en dos familias: Omega-3 ( $\omega$ -3) y Omega-6 ( $\omega$ -6). Los ácidos grasos  $\omega$ -3, además de sus efectos antiinflamatorios, pueden tener efectos beneficiosos sobre el corazón y otras patologías como el cáncer, diabetes y enfermedades neurológicas. Los ácidos grasos  $\omega$ -6, como el ácido  $\gamma$ -linoleico, también poseen propiedades antiinflamatorias, siendo su fuente principal los aceites de semillas (Kaur *et al.*, 2012; Castro Gonzales, 2002; Gurib-Fakim, 2006).

Los aceites vegetales son significativos en la industria alimentaria y farmacéutica. Algunos se usan como disolventes para fármacos liposolubles como algunas vitaminas y antibióticos. Otros, por ejemplo, los aceites de almendra y oliva se utilizan en cosmética (Gurib-Fakim, 2006).

### 1.6.4. CENIZAS

El contenido en cenizas es una medida del total de los minerales presentes en un alimento. (Bianchini & Eyherabide, 1998). Los metales traza esenciales (Zn, Mn, Co, Cu, I, F, Sn, Cr, Mo, Se, Br, Ni), a pesar de su pequeña cantidad son necesarios para mantener la vida, pero en altas concentraciones son tóxicos. Algunos elementos pueden acumularse en los sistemas biológicos y convertirse en un peligro significativo para la salud como son los carcinógenos, mutágenos o teratógenos (Cd, Hg, Pb, Bi, Sb, As) (Štroffeková *et al.*, 2008).

### 1.6.5. ACIDOS ORGÁNICOS

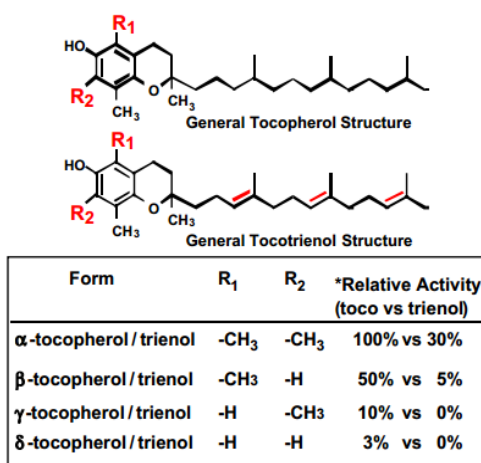
Los ácidos orgánicos son compuestos de bajo peso molecular que se encuentran en todos los organismos, y se caracterizan por la posesión de uno o más grupos carboxilo (Jones, 2008).

Los ácidos orgánicos son intermediarios fotosintéticos que se producen principalmente en la mitocondria a través del ácido tricarbóxico o ciclo de Krebs y en menor medida en el glioxisoma como parte del ciclo del glioxilato (López-Bucio *et al.*, 2000).

Algunos ácidos orgánicos pueden tener actividad biológica, y por lo tanto un impacto significativo en la salud humana. Los ácidos tartárico, málico, cítrico y succínico han demostrado beneficios positivos para la salud como antioxidantes debido a su capacidad de quelar metales y deslocalizar la carga electrónica de los radicales libres. (López-Bucio *et al.*, 2000; Seabra *et al.*, 2006).

### 1.6.6. TOCOFEROLES

Los tocoferoles y los tocotrienoles, frecuentemente conocidos como vitamina E, son moléculas anfipáticas con la cola hidrófoba asociada a la membrana lipídica y la cabeza polar que permanece en la superficie de la membrana. Su estructura común consta de un anillo cromano y una cadena lateral de isoprenos (**figura 16**) (DellaPenna, 2005).



**Figura 16:** Estructura de los diferentes tocoferoles y tocotrienoles (DellaPenna, 2005)

La vitamina E se compone de ocho isoformas, cuatro tocoferoles de cadena saturada (α-tocoferol, β-tocoferol, γ-tocoferol y δ-tocoferol) y cuatro tocotrienoles de cadena insaturada (α-tocotrienol, β-tocotrienol, γ-tocotrienol y δ-tocotrienol), siendo el

$\alpha$ -tocoferol la isoforma más potente y abundante en los sistemas biológicos (Burton & Traber, 1990).

Estos compuestos juegan un papel importante en la salud mediante la inactivación de los radicales libres producidos a través de la actividad celular normal y de diversos factores de estrés. Actúan como antioxidantes mediante la donación de un átomo de hidrógeno a los radicales peroxilo de moléculas de lípidos insaturados, formando un hidroperóxido y un radical tocoferoxilo, que reacciona con otros radicales peroxilo o tocoferoxilo formando aductos más estables. La capacidad antioxidante relativa *in vivo* de los tocoferoles sigue el orden  $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ . La vitamina E es el principal antioxidante presente en el plasma, glóbulos rojos y tejidos, que permite la protección de la integridad de las estructuras lipídicas, principalmente de las membranas (Traber, 2007; Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996).

#### **1.6.7. KALANCHOES**

La composición química del género *Kalanchoe* está condicionada por varios factores; edad de la planta, tipo de suelo, factores ambientales, tipo de cultivo, clima, recolecta...

Muchos autores han aislado e identificado algunos constituyentes químicos del género, pudiéndose clasificar principalmente como: glucósidos de flavonoides, antocianinas, cumarinas, bufadienólidas, triterpenos, esteroides, fenantrenos y ácidos grasos (Singab *et al*, 2011; Milad *et al*, 2014).

##### **a) *Kalanchoe pinnata***

El contenido en nutrientes muestra carbohidratos, proteínas, lípidos, ácidos y yodo (**tabla 5**). En las hojas también se han detectado componentes fenólicos: ácido para-hidroxibenzoico, cafeico, cumárico, ferúlico y siríngico; los ácidos orgánicos acético, málico, cítrico, isocítrico, láctico, fumárico, oxálico, oxalacetato y succínico; los ácidos grasos palmítico, esteárico, araquídico y behénico; los azúcares rafinosa, lactosa, sacarosa, glucosa, galactosa y fructosa (**tabla 6**); las vitaminas y aminoácidos, riboflavina, ácido ascórbico, tiamina, niacina, piridoxina, glicina, cisteína, hidrolizado de caseína, ácido glutámico, hidrolizado de proteína, metionina, tirosina y fenilalanina. También es buena fuente de elementos minerales como Na, Ca, K, P, Mg, Mn, Fe, Cu, Zn (Patterwar, 2012; Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009; Alabi *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 2000; Gaind *et al.*, 1972; Siddiqui *et al.*, 1989).

**Tabla 5:** Análisis químico de *K. pinnata* (mg/100 g) (Alabi *et al.*, 2005)

Composición química					
Carbohidratos	Proteínas	Lípidos	Ácidos	Yodo	Oxalatos totales
4,29	14,5	24,3	36,60	10,20	1,96

**Tabla 6:** Contenido de azúcares en *K. pinnata* (mg/100 g) (Alabi *et al.*, 2005)

Azúcares (mg/100 g)							
Rafinosa	Sacarosa	Lactosa	Glucosa	Galactosa	Fructosa	Maltosa	Arabinosa
2,8	0,20	4,92	2,62	5,82	2,30	5,64	8,66

### b) *Kalanchoe daigremontiana*

Estudios anteriores han confirmado varios tipos de nutrientes en *K. daigremontiana*: ácidos orgánicos (Jolchine, 1962), ácidos grasos, carbohidratos, carotenoides, triacilgliceroles, fosfolípidos, esteroides y clorofila (**tabla 7**) (Anisimov *et al.*, 2009).

**Tabla 7:** Compuestos identificados en *K. daigremontiana* (Anisimov *et al.*, 2009)

Metabolito	mg/100 g de peso fresco
Ácidos grasos libres	45,4
β-caroteno	2,6
Clorofilas	60,6
Carotenoides	19,6
Esteroides libres	16,4
Carbohidratos	26,0
Ésteres de esteroides	9,8
Ésteres de ácidos grasos	21,0
Triacilgliceroles	38,0
Fosfolípidos (forfatidil glicerol y fosfatidil inositol)	13,4

Respecto a su contenido en tocoferoles, cabe destacar que el isómero más abundante es el γ-tocoferol (**tablas 8 y 9**) (Szymanska *et al.*, 2009).

**Tabla 8:** Contenido en tocoferoles de las hojas de *K. daigremontiana* (Szymanska *et al.*, 2009)

	μg α-Toc/g planta seca	γ-Toc/α-Toc (%)	δ-Toc/α-Toc (%)	Tocoferoles total (μg/g planta seca)
<i>Kalanchoe daigremontiana</i>	16,7 ± 1,5	85,2 ± 8,6	12,0 ± 2,0	32,9

**Tabla 9:** Contenido de tocoferoles en las hojas de *K. daigremontiana* de diferentes edades (Kruk *et al.*, 2011)

	Tocoferoles (μg/g de planta seca)		
	α-Tocoferol	γ-Tocoferol	δ-Tocoferol
Hojas jóvenes	24,9 ± 2,0	30,0 ± 1,8	5,4 ± 0,4
Hojas de edad media	16,9 ± 2,8	7,9 ± 0,5	1,1 ± 0,1
Hojas viejas	20,3 ± 1,3	37,3 ± 3,7	2,6 ± 0,7

c) *Kalanchoe gastonis-bonniieri*

Respecto a su composición nutricional el único dato que se ha encontrado ha sido su contenido en cenizas totales (**tabla 10**) (Legramandi, 2011).

**Tabla 10:** Contenido de cenizas totales de las hojas de *K. gastonis-bonniieri* (Legramandi, 2011)

<i>K. gastonis-bonniieri</i>	
Cenizas totales	22,25 ± 0,99

Debido a que los datos sobre los nutrientes no abundan, y con el objetivo de mejorar el conocimiento de su valor nutricional, el presente estudio proporciona nuevos datos sobre el contenido de algunos compuestos tales como proteínas, lípidos, tocoferoles, cenizas, ácidos orgánicos, ácidos grasos y carbohidratos en las tres plantas del género *Kalanchoe*.

## 1.7. ACTIVIDAD ANTITUMORAL

### 1.7.1. CÁNCER

Cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos (metástasis). Las metástasis son la principal causa de muerte por cáncer.

El cáncer es una de las primeras causas de muerte a nivel mundial; en 2012 se le atribuyeron 8,2 millones de muertes. En este año, los cánceres diagnosticados con más frecuencia en el hombre fueron los de pulmón, próstata, colon y recto, estómago e hígado, mientras que en la mujer fueron los de mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago. Aproximadamente un 30% de las muertes por cáncer se deben a cinco factores de riesgo comportamentales y alimentarios, índice de masa corporal elevado, consumo insuficiente de frutas y verduras, falta de actividad física y consumo de tabaco y alcohol y por lo tanto, pueden prevenirse (WHO, 2015).

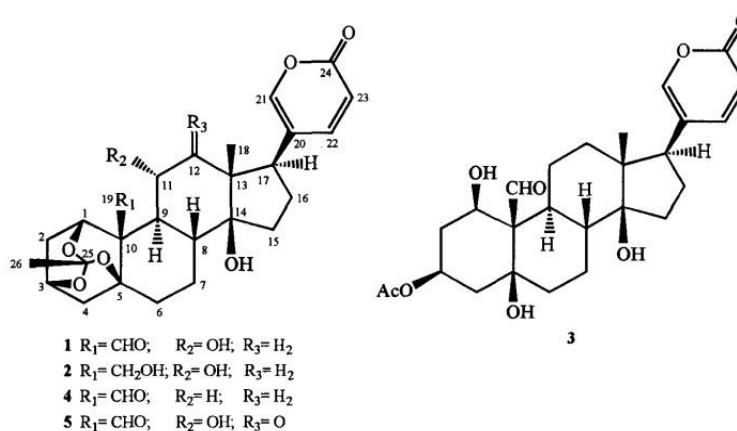
La transformación de una célula normal en tumoral es un proceso multifásico y suele consistir en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Estas alteraciones son el resultado de la interacción entre los factores genéticos del paciente y

de agentes externos; radiaciones ultravioletas e ionizantes, componentes del humo del tabaco, la aflatoxina (contaminante de los alimentos), arsénico (contaminante del agua) e infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos (WHO, 2015).

Desde la antigüedad, las plantas se han utilizado como remedios para tratar diferentes tipos de enfermedades y lesiones con resultados satisfactorios. Hoy en día, más del 60 % de los medicamentos contra el cáncer provienen de compuestos naturales o se derivan de ellos, haciendo que estas moléculas bioactivas se vuelvan cada vez más interesante para las empresas farmacéuticas, incluso como prototipos de formulaciones finales para drogas contra el cáncer (Carocho & Ferreira, 2013).

### 1.7.2. ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE *Kalanchoe pinnata*

Se aislaron 5 bufadienolidas de las hojas de *K. pinnata* y *K. daigremontiana* (figura 17). Estos se examinaron para determinar sus efectos inhibidores sobre el virus de Epstein-Barr (EBV) mediante la activación del antígeno temprano en las células Ranji, inducido por el promotor de tumores 13-acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol. Todos los compuestos exhibieron actividad inhibitoria (tabla 11) (Supratman *et al.*, 2001).



**Figura 17:** Estructura de las diferentes bufadienolidas (Supratman *et al.*, 2001)

**Tabla 11:** Actividad inhibitoria de las bufadienolidas hacia la activación de EBV (Supratman *et al.*, 2001)

Compuesto	Inhibición (%) concentración (μM)					IC <sub>50</sub> (μM)
	0,16	0,8	4	20	100	
1	23,4 (91,1)	92,3 (96,1)	100 (79,3)	100 (82,1)	100 (74,2)	0,4
2	29,5 (90,1)	34,1 (91,8)	92,4(79,3)	100 (89,4)	100 (69,4)	1,6
3	4,8 (95,2)	45,0 (94,9)	52,4 (92,8)	84,9 (94,1)	100 (90,7)	3,0
4	0 (97,0)	100 (96,3)	ND (33,3)	ND (18,6)	ND (0)	-
5	0 (96,0)	46,0 (94,0)	ND (0)	ND (0)	ND (0)	-

Otro estudio evaluó la actividad antiproliferativa de *K. pinnata* contra las células humanas HT-1080 de fibrosarcoma con metástasis avanzada. Esto fue probado en los extractos de metanol, metanol-agua y agua. Todos los extractos mostraron actividad (**tabla 12**) (Ueda *et al.*, 2002).

**Tabla 12:** Actividad proliferativa con la células humanas HT-1080 de fibrosarcoma (Ueda *et al.*, 2002)

Nombre de la planta	Rendimiento (%)			EC <sub>50</sub> (µg/mL)		
	MeOH ext.	MeOH-H <sub>2</sub> O ext.	H <sub>2</sub> O ext.	MeOH ext.	MeOH-H <sub>2</sub> O ext.	H <sub>2</sub> O ext.
<i>Kalanchoe pinnata</i>	6,0	1,8	0,9	>100	>100	>100

Un estudio posterior completó la evaluación de la actividad antiproliferativa. El ensayo se basó en la escisión de la sal de tetrazolio amarilla XTT, para formar un tinte de color naranja por células metabólicamente activas (proliferación de células kit II). Se analizaron dos extractos, el extracto de etanol y el de acetato de etilo (El Abdellaou *et al.*, 2010).

También se han hecho ensayos *in vivo*, para evaluar la actividad antitumoral de *K. pinnata*. Para ello se utilizaron ratones con células del tumor ascítico de Ehrlich (EAC). Estos se trataron con el extracto acuoso y metanólico. El crecimiento tumoral fue estudiado por dos parámetros; porcentaje de inhibición de peso del tumor, e inhibición del crecimiento de las células ascéticas. Los resultados indican que el extracto metanólico y el extracto acuoso tienen capacidad para inhibir el crecimiento del tumor inducido por la línea de células EAC en una dosis de forma dependiente en los animales experimentales (Devbhuti *et al.*, 2012).

### 1.7.3. ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE *Kalanchoe daigremontiana*

Como antes se ha mencionado en el apartado de la actividad antitumoral de *K. pinnata*, se hizo un ensayo conjunto de estas dos especies para determinar sus efectos inhibidores sobre el virus de Epstein-Barr (EBV) mediante la activación del antígeno temprano en las células Ranji, inducido por el promotor de tumores descrito anteriormente. Para ello se aislaron 5 bufadienolidas de las hojas de estas dos especies (los resultados se muestran en el apartado de actividad antitumoral de *K. pinnata*, 1.7.2.) (Supratman *et al.*, 2001).

#### **1.7.4. ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE *Kalanchoe gastonis-bonni***

No se han encontrado estudios que evalúen la actividad antitumoral de los extractos de *K. gastonis-bonni*.

## 2. OBJETIVOS

Los objetivos generales de este proyecto han sido:

i) Registro de los conocimientos tradicionales de la zona de la Selva de Irati con el fin de no perder conocimientos y aumentar el estudio etnobotánico en el ámbito de hongos y líquenes.

ii) Elección de una planta, hongo o líquen, de la Selva de Irati para su posterior evaluación de propiedades citotóxicas y comparación con plantas comerciales utilizadas para el tratamiento del cáncer.

iii) Evaluación de las propiedades citotóxicas de tres plantas comerciales utilizadas para el tratamiento del cáncer, *Kalanchoe daigremontiana* (Raym.-Hamet & Perr.) A. Berger, *Kalanchoe gastonis-bonnierii* (Raym.-Hamet & H.Perrier ) Lauz.-March y *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Oken.

iv) Evaluación del valor nutricional de las tres plantas del género *Kalanchoe*.

Para poder lograr estos objetivos se fijaron los siguientes objetivos particulares:

1) Entrevistar a personas con conocimientos tradicionales de la zona de la Selva de Irati para obtener información de la flora de la zona, con el fin de elegir una planta, líquen o hongo para su posterior estudio.

2) Identificación botánica y conservación en el herbario de la planta, líquen o hongo elegido de la Selva de Irati.

3) Preparación de extractos de *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol:agua soluble en *n*-butanol, metanol:agua insoluble en *n*-butanol y agua caliente de las tres plantas del género *Kalanchoe* (*Kalanchoe pinnata*, *Kalanchoe daigremontiana* y *Kalanchoe gastonis-bonnierii*) y del hongo elegido de la Selva de Irati, *Terana caerulea*.

4) Evaluación de la actividad citotóxica de los diferentes extractos obtenidos. La capacidad de inhibición del crecimiento celular se evaluó en líneas celulares tumorales humanas: MCF-7 (carcinoma de mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmón), HeLa (carcinoma cervical) y HepG2 (carcinoma hepatocelular), utilizando el método de la sulforrodamina B. La citotoxicidad para células normales se evaluó utilizando un cultivo primario establecido a partir de células de hígado de cerdo.

5) Evaluación del contenido en macronutrientes, azúcares, ácidos grasos, tocoferoles y ácidos orgánicos de las tres plantas del género *Kalanchoe*, con sus respectivos métodos.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. ENTREVISTAS

La metodología de este pequeño estudio etnobotánico incluye trabajo de campo basado en entrevistas etnobotánicas, mediante las cuales se recopila la información directamente de la persona sobre el uso tradicional de las plantas. El trabajo de campo se ha realizado desde noviembre del 2015 hasta junio del 2016. Para ello se han entrevistado 14 personas de 9 localidades que han nacido o han vivido la mayor parte de su vida en la zona de la Selva de Irati. Se ha utilizado una entrevista semi-estructurada, dejando espacio a la espontaneidad. Estas se efectuaron en castellano o euskera, dependiendo del idioma utilizado por la persona entrevistada. Todas las personas entrevistadas fueron informadas del propósito de la entrevista y dieron su consentimiento para ser entrevistadas. La información fue recogida en una tabla Excel.

La búsqueda de los informantes se efectuó en residencias de ancianos, revista Mendixut (Revista del Pirineo Navarro), la familia, amigos y contactos y de reuniones espontáneas en pueblos.

De los entrevistados un 28,6 % fueron mujeres y un 71,4 % hombres. La media de edad de los informantes fue 67 años siendo la edad más baja 27 y 94 la más alta.

Para cada especie se intentó recopilar la siguiente información: nombre local, parte de la planta utilizada, tiempo de recolección, secado, modo de administración y preparación, dosis, uso y vigencia.

### 3.2. MATERIAL DE ESTUDIO

El hongo elegido de las entrevistas del estudio etnobotánico, *Terana caerulea*, se recolectó en la Selva de Irati el 22 de febrero del 2016, a una altitud aproximada de 750 m, latitud 42° 58' 35,78" y a longitud 1° 13' 45,91". Se recolectó en un entorno húmedo, abundaban los manzanos y bojés. Se recolectó de la superficie de ramas muertas en una zona sombría y húmeda (**figura 18**).



**Figura 18:** *Terana caerulea* en la Selva de Irati (Maitane Maisterra)

Las tres especies del género *Kalanchoe* se adquirieron de forma comercial (**figura 19**). Estas se obtuvieron de la empresa Pámiesvitae, empresa Catalana, ubicada en Balaguer, dedicada a la horticultura tanto de plantas comestibles como medicinales. Estas están cultivadas de forma ecológica, sin el uso de ningún herbicida químico.



**Figura 19:** Muestras de *K. pinnata*, *K. daigremontiana* y *K. gastonis-bonnierii* (Maitane Maisterra)

### **3.3. EXTRACTOS Y FRACCIONAMIENTO BIOGIADO DE LOS COMPUESTOS RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD**

#### **3.3.1. INFUSIONES Y DECOCCIONES**

Para la preparación de las infusiones se utilizaron 35 g de *Kalanchoe* en fresco troceadas en pequeños trozos (1 cm<sup>3</sup> aprox.) y 350 mL de agua ultra pura por cada infusión. El agua desionizada en ebullición se añadió a los 35 g de muestra, se dejó reposar 10 minutos y se filtró. Esto se hizo con cada una de las *Kalanchoes*.

Para las decocciones se utilizaron 35 g de muestra fresca troceada y 350 mL de agua desionizada. El agua desionizada se calentó junto a los 35 g de muestra y se llevó al punto de ebullición. Se quitó de la placa calefactora, se dejó reposar durante 15 minutos y posteriormente se filtró. Esto se hizo con cada una de las *Kalanchoes*.

Las infusiones y decocciones de las tres *Kalanchoes* se congelaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se liofilizaron (**figura 20**) (liofilizador Telstar Cryodos y liofilizador Telstar LyoQuest). En total se obtuvieron 2 extractos en fresco de cada *Kalanchoe*.



**Figura 20:** Muestras de *K. gastonis-bonnierii* liofilizadas (Maitane Maisterra)

### **3.3.2. EXTRACTOS DE DISOLVENTES DE DIFERENTES POLARIDADES**

#### **a) Reactivos**

Los diferentes reactivos utilizados para la obtención de los extractos de diferentes polaridades fueron; hexano a granel destilado en columnas de rectificación, diclorometano (DCM) ACS y acetato de etilo (AcOEt) para análisis de la marca Carlo Erba, etanol absoluto puro de la marca Panreac, *n*-butanol ISO para análisis de la marca Carlo Erba y agua ultrapura obtenida mediante un sistema de purificación de agua Millipore Direct-Q.

#### **b) Metodología**

Los diferentes *Kalanchoes* se trozaron y se secaron en la estufa MMM Medcenter Einrichtungen GmbH a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se trituraron mediante una trituradora-batidora doméstica (Braun JB5050).

El hongo *T. caerulea* fue secado a temperatura ambiente. Una vez seco se raspó de las diferentes ramas mediante una navaja. Posteriormente se trituró con un mortero.

Para obtener los extractos en disolventes se utilizaron 2 g de cada muestra de forma independiente (*K. pinnata*, *K. daigremontiana*, *K. gastonis-bonnierii* y *T. caerulea*) que se maceraron durante 20 h por agitación en 100 mL de diferentes disolventes de polaridad creciente: hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol y agua caliente. Todas las extracciones se hicieron por duplicado (menos la de agua caliente), filtrándose tras cada maceración y uniendo los extractos del mismo disolvente. El extracto

metanólico se repartió en un embudo de decantación por solubilidad en *n*-butanol o en agua desionizada. Los diferentes disolventes se evaporaron mediante rotavapor (Buchi R-210) a 40 °C para obtener 6 extractos de polaridad creciente por cada una de las cuatro muestras estudiadas: en hexano, en diclorometano, en acetato de etilo, metanólico soluble en butanol, metanólico soluble en agua y en agua caliente.

### 3.3.3. FRACCIONAMIENTO Y AISLAMIENTO

#### a) *Reactivos, material y equipamientos*

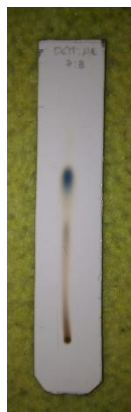
Los disolventes utilizados en este proceso fueron diclorometano ACS, acetato de etilo y acetona para análisis de la marca Carlo Erba, y metanol de HPLC de la marca Panreac.

Para las cromatografías preparativas en columna se empleó, como fase estacionaria o empaquetamiento de las columnas, gel de sílice P60 granulado de 40-63 µm (230-400 mesh) (*Merck*). Para las cromatografías en capa fina (TLC), se emplearon placas de DC-Fotigfolien ALUGRAM®Sil G/UV254, de 0,20 mm de anchura (*Macherey-Nagel*). Para el revelado de las placas se empleó una lámpara ultravioleta Duo-UV-Source for thin-layer and column chromatography (*Desaga*), a 254 y 366 nm, y también una disolución de ácido fosfomolibdico (10 %) en etanol de 96 °, las placas se rociaban con la disolución y se calentaban posteriormente en estufa a 105 °C por unos segundos.

#### b) *Metodología*

El extracto de AcOEt de *T. caerulea*, obtenido en el apartado 3.3.2, se fraccionó por cromatografía en columna (**figura 21**). La muestra (45 mg aproximadamente) se depositó en forma de papilla sobre sílice en la parte superior de la columna.

La selección del eluyente se hizo mediante el estudio por TLC del extracto de AcOEt (**figura 22**) y consistió en DCM, DCM:acetona (93:7), DCM:acetona (8:2), DCM:acetona (1:1), acetona y metanol. Se recogieron 57 tubos de aproximadamente 20 mL y un matraz de 250 mL con la última fracción. Las fracciones se reunieron según la semejanza de los perfiles cromatográficos y espectroscópicos observados por TLC y <sup>1</sup>H-RMN.



**Figura 22:** TLC para la selección de la fase móvil (Maitane Maisterra)



**Figura 21:** Cromatografía en columna de *Terana caerulea* (Maitane Maisterra)

Para el extracto de ButOH de *K. daigremontiana*, obtenido en el apartado 3.3.2., se hizo el mismo procedimiento, partiendo de 48 mg de muestra aproximadamente. En este caso los eluyentes seleccionados fueron DCM, DCM:MeOH (95:5), DCM:MeOH (9:1), DCM:MeOH (8:2), DCM:MeOH (7:3), DCM:MeOH (1:1) y MeOH. Se recogieron 51 tubos de aproximadamente 18 mL y una matraz de 250 mL con la última fracción. Las fracciones se reunieron según la semejanza de los perfiles cromatográficos y espectroscópicos observados por TLC y  $^1\text{H-RMN}$ .

### 3.3.4. IDENTIFICACIÓN QUÍMICA

#### a) Reactivos y equipamiento

Para la caracterización química de los diferentes extractos, apartado 3.3.2, los equipamientos utilizados han sido los siguientes:

- Cromatógrafo de gases (*Hewlett Packard 5890 Series II*) acoplado a detector de masas (*MSD Hewlett Packard 5972*) **GC/MS (figura 23)**: Columna cromatográfica de composición (5 %-fenil)-metilpolisiloxano *HP-5ms* de *Agilent* (30 m  $\times$  0,25 mm  $\times$  0,25  $\mu\text{m}$ ) con helio como gas portador (1 mL/min). Identificación por comparación de los espectros de masas de los compuestos utilizando la biblioteca Wiley W9N08 de espectros de masas del National Institute of Standards and Technology (NIST).



**Figura 23:** GS/MS (Maitane Maisterra)

- Espectrómetro de resonancia magnética nuclear (*Varian modelo Mercury Vx 400 MHz*)  
**RMN (figura 24):** Utilizado para la obtención de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz),  $^{13}\text{C}$  (100 MHz), COSY, ROESY, HSQC Y HMBC. Las muestras se solubilizaron en cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) y en metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (*Cambridge Isotope Laboratories*), según su polaridad. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) en hercios (Hz).



**Figura 24:** RMN (Maitane Maisterra)

#### ***b) Metodología***

Para su análisis por GC/MS las muestras se disolvieron en DCM. Una vez disueltas se inyectaron mediante una jeringa de la marca Hamilton, específica para el aparato.

Para la realización de los espectros de RMN, los diferentes extractos fueron disueltos en  $\text{CDCl}_3$  o  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Posteriormente se introdujeron en un tubo específico para el análisis.

### **3.4. CARACTERIZACIÓN NUTRICIONAL**

#### **3.4.1. PATRONES Y REACTIVOS**

Para la determinación de micronutrientes y macronutrientes se utilizaron diferentes mezclas de patrones: análisis de ácidos grasos, la mezcla contenía 37 ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) desde C4 hasta C24, (referencia 47885-U); análisis de tocoferoles, mezcla de las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  y para el análisis de azúcares, una mezcla de D(-)-fructosa, D(+)-glucosa anhidra, D(+)-melecitosa monohidratada, D(+)-rafinosa pentahidratada, D(+)-sacarosa, D(+)-trehalosa y D(+)-xilosa. Todos ellos adquiridos en Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA), así como, la mezcla

de patrones para el análisis de ácidos orgánicos, ácido oxálico, quinico, málico, xiquímico, ascórbico, cítrico, succínico y fumárico.

### 3.4.2. VALOR NUTRICIONAL

El estudio del valor nutricional de las tres *Kalanchoe* se hizo mediante la determinación de los lípidos, proteínas, cenizas y carbohidratos. Para ello, se utilizaron los métodos oficiales de la AOAC (AOAC International, 1995). El contenido en lípidos se determinó por extracción con éter de petróleo de una cantidad conocida de muestra (1,5 g) mediante un Soxhlet. El contenido de proteínas de las diferentes muestras se determinó mediante el método macro-Kjeldahl (**figura 25**). Las cenizas se determinaron por incineración a 550°C (**figura 25**). Para la determinación de los hidratos de carbono disponibles se utilizó el método de Antrona.

Para el cálculo de la energía total se utilizó la siguiente ecuación (valores en g/100 g)

$$\text{Energía (kcal)} = 4 \times (\text{proteínas} + \text{glúcidos}) + 9 \times (\text{lípidos})$$



**Figura 25:** Determinación de las proteínas y de las cenizas totales (Maitane Maisterra)

### 3.4.3. ANÁLISIS DE COMPUESTOS NUTRITIVOS INDIVIDUALES

#### a) Azúcares

La determinación de los azúcares libres de las diferentes muestras se hizo por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de índice de refracción (HPLC-RI), conforme a la metodología descrita por el grupo de investigación del IPB (Guimarães *et al.*, 2010).

Se utilizó un gramo de cada muestra seca, obtenida de la muestra desgrasada. Se enriquecieron con melecitosa como patrón interno (25 mg/mL) y se extrajeron con

etanol:agua (8:2) (40 mL) durante 1 h 30 min a 80 °C. Posteriormente el etanol se evaporó mediante el rotavapor a 60 °C. La fracción de agua fue lavada con éter mediante un embudo de decantación, esta acción se repitió tres veces, y se metió en la estufa para evaporar el éter restante. El residuo final se disolvió en agua enrasando a 5 mL. Las muestras se midieron directamente utilizando el método del patrón externo. Todas las muestras fueron filtradas con discos de nylon 0,22 µm (Millipore) antes de su inyección.

Los azúcares se determinaron por HPLC en un sistema integrado por bomba (Knauer, sistema Smartline 1000), desgasificador (Smartline 5000), inyector automático (AS-2057 Jasco), detector de RI (Knauer Smartline 2300) y software Clarity 2.4 (DataApex). Se empleó una columna cromatográfica 100-5 NH<sub>2</sub> Eurospher (4,6 × 250 mm, 5 µm, Knauer) operando a 30 °C (horno Grace 7971 R) y como fase móvil una mezcla de acetonitrilo:agua desionizada 7:3 (v/v) con flujo de 1 mL/min. La identificación de los azúcares se realizó comparando los tiempos de retención de los picos de las muestras con patrones y la cuantificación mediante línea de calibrado. Los resultados fueron expresados en g por 100 g de masa seca.

#### ***b) Ácidos orgánicos***

Los ácidos orgánicos de las diferentes muestras se determinaron mediante cromatografía líquida ultra rápida con detector de fotodiodos (UFLC-DAD), según el procedimiento optimizado por el grupo de investigación del IPB (Pereira *et al.*, 2013).

Se utilizó 1,5 g de cada muestra que se extrajeron con ácido metafosfórico 4,5 % (25 mL), en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se filtraron con papel de filtro. Todas las muestras fueron filtradas con discos de nylon de 0,20 µm (Millipore) antes de su inyección.

El análisis se realizó mediante un cromatógrafo Shimadzu 20A series UFLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) acoplado a un detector de fotodiodos empleando preferentemente una longitud de onda de 215 nm. La separación se llevó a cabo con una columna SphereClone (Phenomenex, Torrance, CA, USA) C18 de fase reversa (4,6 × 250 mm, 5 µm) operando a 35 °C y como fase móvil se utilizó ácido sulfúrico (3,6 mM) con un flujo de 0,8 mL/min. Los ácidos orgánicos se cuantificaron en función del área de sus picos a 215 nm mediante rectas de calibrado de patrones comerciales. Los resultados fueron expresados en g por 100 g de masa seca.

### **c) Ácidos grasos**

Los ácidos grasos, después de su transesterificación, se determinaron por cromatografía gaseosa con detección de ionización de llama (GC-FID), según la metodología descrita por el grupo de investigación del IPB (Barros *et al.*, 2010).

La masa obtenida después de la extracción Soxhlet (muestra desgrasada), se le adicionó 5 mL de metanol:ácido sulfúrico:tolueno 2:1:1 (v/v/v) y se mantuvo en un baño a 50 °C con agitación de 160 rpm durante por lo menos 12 h. Seguidamente se añadieron 3 mL de agua desionizada, con el objetivo de separar las dos fases. Se recuperaron los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES) mediante 3 mL de éter, agitando en el vortex. El agua residual se eliminó mediante sulfato sódico anhidro y se filtró con disco de nylon de 0,20 µm para un vial.

El análisis de los ácidos grasos se realizó con un sistema GC modelo DANI 1000, equipado con detector FID y una columna de separación Macherey Nagel (30 m × 0,32 mm × 0,25 µm). El programa de temperatura del horno fue el siguiente: T inicial 50 °C durante 2 min; seguidamente se aumentó la temperatura 30 °C/min hasta 125 °C, 5 °C/min hasta 160 °C, 20 °C/min hasta 180 °C, 3 °C/min hasta 200 °C y 20 °C/min hasta 220 °C, que se mantuvo durante 15 min. Como gas portador se empleó hidrógeno con un caudal de 4,0 mL/min. El perfil de ácidos grasos se obtuvo en base a los tiempos de retención de los picos de patrones de FAMES y de las muestras. Los resultados se expresan en porcentaje relativo de cada ácido graso.

### **d) Tocoferoles**

Los tocoferoles se determinaron por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de fluorescencia (HPLC-Fluorescencia), siguiendo el procedimiento optimizado por el grupo de investigación del IPB (Barros *et al.*, 2010).

Se utilizaron 500 mg de cada muestra, a los que se adicionaron 100 µL de una disolución de butil-hidroxitolueno en hexano, BHT (10 mg/mL), como antioxidante y 250 µL de una disolución de tocol en hexano (50 µg/mL) como patrón interno. Posteriormente se adicionaron 4 mL de metanol, se homogeneizó en el vortex durante 1 min, y 4 mL de hexano, se homogeneizó en el vortex durante 1 min. Después se adicionaron 2 mL de una disolución acuosa de cloruro de sodio saturada, se homogeneizó en el vortex durante 1 min y se centrifugó (5 min, 4000 g, 10 °C). El sobrenadante se transfirió a un vial, previamente envuelto en papel de aluminio. Las muestras fueron reextraídas dos veces

más con hexano. Al extracto final se le añadió sulfato sódico anhidro y se evaporó sobre corriente de nitrógeno, se redisolvió en 2 mL de hexano y se filtró con disco de nylon de 0,20 µm para su posterior análisis.

Para el análisis de tocoferoles se empleó el mismo equipamiento que para el análisis de azúcares, pero empleando un detector de fluorescencia (Jasco FP-2020, Easton, MD, USA) programado para excitar a 290 nm y emitir a 330 nm. La separación se llevó a cabo con una columna cromatográfica YMC Waters Polyamide II (250 mm × 4,6 mm) en fase normal, operando a 30 °C, y como fase móvil se empleó una mezcla de *n*-hexano:acetato de etilo 7:3 (v/v), con un flujo de 1 mL/min. Los compuestos se identificaron por comparación con patrones comerciales y se cuantificaron en base a las rectas de calibración de esos patrones empleando la técnica del patrón interno (PI, tocol). La cantidad de tocoferoles fue expresada en µg por 100 g de masa seca.

### **3.5. ENSAYOS DE ACTIVIDAD CITOTÓXICA**

#### **3.5.1. PATRONES Y REACTIVOS**

Para la evaluación de la actividad citotóxica se utilizaron las siguientes disoluciones; medio de cultivo RPMI-1640 (Hyclone; Logan, Utah, EUA), L-glutamina (Gibco), aminoácidos no esenciales (2mM) (Hyclone), suero fetal bovino (SFB) (Hyclone), penicilina/estreptomicina (100 U/mL y 100 µg/mL, respectivamente) (Hyclone), ácido tricloroacético (TCA) (Sigma), solución salina de Hank's (HBSS) (Gibco), tryple Express (Gibco), ácido acético (Sigma), ellipticina (Sigma), sulforodamina B (SRB) (Fluka), azul tripano (Gibco), y tris [2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol] (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA).

#### **3.5.2. CITOTOXICIDAD EN LÍNEAS CELULARES TUMORALES HUMANAS Y EN CULTURAS PRIMARIAS DE HÍGADO NO TUMORALES**

Para evaluar la actividad antiproliferativa *in vitro* de las diferentes muestras, se utilizaron 4 líneas celulares tumorales humanas; HeLa (carcinoma cervical), NCI-H460 (carcinoma pulmonar), HepG2 (carcinoma hepatocelular) y MCF-7 (carcinoma de mama) obtenidas de DSMZ (Leibniz-Institut DSMZ - *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*). Para la evaluación de la hepatotoxicidad se

utilizó una cultura primaria establecida a partir de células de hígado de cerdo, PLP (*Porcine Liver Primary cell culture*).

La determinación de la citotoxicidad se hizo mediante el método colorimétrico de Sulforodamina B (SRB). Este método es utilizado para la determinación de la densidad celular, basándose en el contenido proteico de las células. Los resultados se expresan en base a la concentración de muestra responsable del 50% de la inhibición del crecimiento celular ( $GI_{50}$ ), que se calculó a partir del gráfico del porcentaje de inhibición celular frente a la concentración de la muestra.

#### **a) *Mantenimiento de las células***

El mantenimiento de las células se hizo rutinariamente mediante un medio de cultivo para células adherentes RPMI-1640, al que se le añadió 1 % L-glutamina, 1 % penicilina/ estreptomycin (100 U/mL y 100  $\mu$ g/mL respectivamente), 1 % aminoácidos no esenciales y 10 % suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor. Estas se mantuvieron a 37 °C en una incubadora de aire humificado con un 5 % de CO<sub>2</sub> (HF 151, *Heal Force*) (Guimarães *et al.*, 2013). El medio de cultivo es cambiado cada 2 días.

#### **b) *Preparación de las muestras***

La preparación de las muestras se hizo a partir de los extractos de diferentes polaridades (apartado 3.3.2), utilizando 8 mg de cada extracto disueltos en 1 mL de DMSO y H<sub>2</sub>O (1:1), obteniendo una concentración final de 8 mg/mL. A partir de estas disoluciones, se realizaron disoluciones sucesivas en las microplacas de 96 pocillos obteniendo las siguientes concentraciones; 8; 2; 0,5; 0,125; 0,03125 y 0,0078 mg/mL.

Se utilizaron 10  $\mu$ L de cada uno de los extractos para cada ensayo. Todos los ensayos se hicieron por duplicado.

#### **c) *Preparación de las células***

La preparación de las células se hizo una vez las muestras estaban preparadas para que estuvieran óptimas.

Se retiró el medio de cultivo y se adicionó el medio de lavado HBSS (3 mL), este quita los residuos proteicos que puedan quedar en la caja. Se retiró y se sumó la enzima proteolítica trypLE Express (3 mL). La caja de cultivo se colocó en la incubadora durante 3 minutos para la desagregación de las células y posteriormente se adicionó medio de cultivo (6 mL) para saturar el trypLE (los volúmenes indicados son para cajas de 75 cm<sup>2</sup>).

La suspensión celular se transfirió a un Falcon estéril y se centrifugó (1200 rpm, 5 min.). Se retiró el sobrante, se resuspendieron las células, y se le sumó medio de cultivo (5 mL), obteniendo una suspensión. Se retiraron 75  $\mu$ L de suspensión y se adicionaron 75  $\mu$ L de azul tripano para la cuantificación de las células mediante una cámara Neubauer. Todas las experiencias se realizaron en una cámara de flujo laminar vertical (TelStar, AV-30/70), en ambiente aséptico.

**d) Exposición de las células al compuesto de ensayo, fijación y tinción**

Las líneas celulares se depositaron con una concentración de 50000 células/mL. Se adicionaron 10  $\mu$ L de cada concentración de las muestras en cada pocillo de la microplaca y 190  $\mu$ L de la suspensión celular anteriormente preparada. Las microplacas se incubaron durante 48 h a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se sometieron al test de SRB.

En este test, se adicionó 100  $\mu$ L de ácido tricloroacético frío (TCA, 10 %) a cada pocillo, y se incubó durante 1 h a 4° C. Posteriormente las microplacas se lavaron con agua, se secaron, se les adicionó 100  $\mu$ L de la solución de SRB (0,1 % en 1 % de ácido acético) y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, las microplacas se lavaron con ácido acético 1 % para eliminar el exceso de SRB, se secaron, y se adicionó 200  $\mu$ L de Tris (10 mM, pH 7,4) a cada pocillo (**figura 26**). Las microplacas se agitaron mediante un agitador (Stat Fax-2100) para solubilizar la SRB. Se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas (Biotec ELX800).



**Figura 26:** Proceso de tinción de las células (Maitane Maisterra)

**e) Hepatotoxicidad**

Para la determinación de la hepatotoxicidad se preparó un cultivo de células primarias a partir de hígado fresco de cerdo obtenido en un matadero, siguiendo el procedimiento descrito por el grupo de investigación BioChemCore IPB, donde se incluye este trabajo (Abreu *et al.*, 2011). Las células se trataron con las diferentes concentraciones de muestra y se realizó el test de SRB descrito anteriormente.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. ESTUDIO ETNOBOTÁNICO

Se han recopilado un total de 47 usos farmacológicos, pertenecientes a 25 plantas, referentes a usos medicinales tradicionales en la zona de la Selva de Irati (**tabla 14**).

Estas 25 especies pertenecen a un total de 20 familias, siendo la *Asteraceae* y la *Rosaceae* las familias que mayor número de especies mencionadas acogen, con un total de tres. Sin embargo también hay familias muy utilizadas con un único taxón mencionado, como por ejemplo *Amaryllidaceae*, *Urticaceae*, *Verbenaceae* y *Papaveraceae*.

La especie más destacada ha sido *Allium cepa* L., conocida como cebolla, con su uso como emoliente, mencionada por 8 de las personas entrevistadas. La segunda especie más mencionada ha sido *Urtica dioica* L., conocida como ortiga u *osina* en euskera, utilizada popularmente por su uso como purgante de la sangre y mejoramiento del flujo sanguíneo. *Verbena officinalis* L. (verbena), *Crataegus oxiacanta* L. auct. (espino blanco) también han sido de las más destacadas por usos como tratamiento de la sinusitis y cardiotónico respectivamente, junto con *Calendula officinalis* L. (caléndula) por su uso regenerante cutáneo y antiinflamatorio.

La forma de preparación que más se ha mencionado ha sido la infusión, seguida del emplasto. Cabe destacar que también se han mencionado varios tipos de vino como remedios tradicionales, así como el vino mismo, para diferentes dolencias (**tabla 13**). La parte más utilizada para la preparación de los usos tradicionales ha sido la parte aérea, con las hojas como parte más mencionada.

**Tabla 13:** Diferentes tipos de vino y sus respectivos usos tradicionales

TIPO DE VINO	USOS POPULARES	FORMA DE PREPARACIÓN	VECES CITADO
Vino	Para desinfectar heridas	Limpiar la herida con el vino	3
Vino de nueces	Para el dolor de tripa de los niños	Macerar durante 40 días 40 nueces, 4 L de vino, 1 L de coñac y 500 g de azúcar. Quitar las nueces y dejar 3 meses más. Tomar un chupito	1
Vino de higos	Para el catarro, cocer vino con 2-3 higos y tomar en caliente antes de acostarse	Cocer vino con 2-3 higos. Tomar en caliente antes de acostarse	2

Las afecciones más citadas han sido las afecciones dermatológicas leves como heridas y quemaduras. Pero se han mencionado otras muchas como afecciones respiratorias, cardíacas y circulatorias.

Respecto a los hongos y líquenes, la información obtenida sobre los usos medicinales ha sido muy escasa (**tabla 15**). Esto puede deberse a que el interés se ha centrado en los usos culinarios de los hongos y no en los medicinales. Además, existe cierto miedo de la población de la zona hacia los hongos, ya que a lo largo de la historia ha habido mucha gente que ha fallecido a causa de una intoxicación por la ingesta de estas, creando una situación de respeto hacia el reino fungi, llevando a su olvido sus usos terapéuticos tradicionales. Cabe destacar que hay gente que tiene mucha afición, pero solo la persona que conoce bien las setas va a ser la recolectora. También hay que resaltar, que gracias a esta prospección etnobotánica se ha conocido el hongo *Terana caerulea*, un hongo poco estudiado que nos ha dado la oportunidad de conocer acciones farmacológicas y compuestos hasta ahora desconocidos.

**Tabla 14:** Información obtenida acerca de las plantas y sus usos medicinales tradicionales mediante las entrevistas en la zona de la Selva de Irati

FAMILIA	NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE VULGAR	PARTE UTILIZADA	USOS POPULARES	FORMA DE PREPARACIÓN	VECES CITADO
<i>Adoxaceae</i>	<i>Sambucus nigra</i> L.	Sauco, Intsusa	Flor	1. Para catarrros	1. Infusión con leche de las flores	2
			Hojas Parte aérea	2. Para heridas abiertas 3. Como diurético, para la gota, fiebre y tos	2. Bálsamo 3. Infusión	4 3
<i>Amaryllidaceae</i>	<i>Allium cepa</i> L.	Cebolla, Tipula	Bulbo	1. Como vulneraria	1. Emplasto, directamente en contacto con la piel	8
<i>Aspleniaceae</i>	<i>Asplenium scolopendrium</i> L.	Lengua de Ciervo	Hojas	1. Para los bronquios	1. Infusión	1
<i>Asteraceae</i>	<i>Calendula officinalis</i> L.	Maravilla, Caléndula, Mariloka	Parte aérea	1. Para la circulación y las varices. 2. Para golpes, torceduras, inflamaciones, heridas y quemaduras. 3. Para golpes, torceduras e inflamaciones	1. Aceite 2. Crema de aceite de Caléndula 3. Emplasto o en baños	3 5 2
	<i>Taraxacum officinale</i> Weber	Diente de León, Kardabera	Parte aérea  Hojas	1. Para limpiar los riñones 2. Para reuma y gota 3. Para las verrugas 4. Para bajar la tensión	1. Infusión 2. Infusión 3. Latex del tallo 4. Comer la hojas	3 1 1 1
	<i>Achillea millefolium</i> L.	Milenrama, Milorria	Hojas y flores	1. Para dolores menstruales y para su regulación 2. Para alergias y asma	1. Infusión 2. Infusión	3 1
<i>Boraginaceae</i>	<i>Anchusa azurea</i> Mill.	Lengua de Perro, Lapate, Idimingain	Hojas	1. Para limpiar y desinfecta heridas	1.1 Machacar, tostar y aplicar en caliente 1.2 Aplicar la planta en verde sobre la herida	3 3
	<i>Symphytum tuberosum</i> L.	Consuelda menor	Parte aérea	1. Como vulneraria, y para huesos rotos 2. Para gota y huesos rotos	1. Emplasto 2. Infusión	2 1
<i>Equisetaceae</i>	<i>Equisetum arvense</i>	Cola de Caballo, Azeri Buztana	Parte aérea	1. Para la aportación de mirelas, tales como el Silice 2. Como diurético, bueno para los riñones	1. Tomar tres infusiones al día durante un mes 2. Infusión	4 4

				3. Para acné, micosis, soriasis y pérdida de cabello	3. Infusión	2
<i>Geraniaceae</i>	<i>Geranium robertianum</i> L.	Hierba de San Roberto, Mokobelar	Parte aérea	1. Emoliente 2. Para cerrar heridas. 3. Para mejorar la circulación.	1. Machacar junto a excrementos de paloma y aplicar 2. Emplasto 3. Infusión	1 2 1
<i>Hypericaceae</i>	<i>Hypericum perforatum</i> L.	Hipérico, Hierba de San Juan, Sanjuan Belarra	Parte aérea	1. Para quemaduras, golpes y heridas (hay que tener cuidado con su uso y el sol ya que es fotosensible) 2. Para los síntomas de la menopausia (relaja el sistema nervioso) 3. Para los nervios, depresión e insomnio	1. Crema de aceite de Hipérico 2. Decocción 3. Infusión	3 2 2
<i>Lamiaceae</i>	<i>Prunella vulgaris</i> L.	Consuelda menor	Raíz	1. Para tendinitis	1. Crema	1
<i>Malvaceae</i>	<i>Malva sylvestris</i> L.	Malva, Malma	Parte aérea Flores	1. Para la garganta 2. Para la tos	1. Gárgaras con la decocción 2. Infusión	1 2
<i>Papaveraceae</i>	<i>Chelidonium majus</i> L.	Celidonia mayor, Hierba verruguera, Karets Belarra.	Tallo	1. Para eliminar verrugas, callos y desinfectar heridas 2. Para tratar las cataratas	1. Látex del tallo 2. Aplicar el látex del tallo por la parte externa del parpado	5 2
<i>Plantaginaceae</i>	<i>Plantago major</i> L.	Llanten, Plantaina	Parte aérea	2. Para la tos.	1. Decocción	3
<i>Primulaceae</i>	<i>Anagallis arvensis</i> L.	Murajes, Pasmobelarra	Parte aérea	1. Como hemostático 2. Para depurar los riñones	1. Aplicar directamente en la herida 2. Vino o decocción	3 1
<i>Ranunculaceae</i>	<i>Clematis vitalba</i> L.	Clemátide, Legartza	Tallos	1. Para fumadores asmáticos	1. Fumar la rama	1
<i>Rhamnaceae</i>	<i>Rhamnus alaternus</i>	Carrasquilla, Atxariba	Brotos nuevos y frutos	1. Para catarros, anginas e irritaciones de garganta	1. Infusión	1
<i>Rosaceae</i>	<i>Rubus fruticosus</i> L.	Zarza, Sasia	Hojas jóvenes Hojas, tallos y flores	1. Para la tos 2. Para quemaduras, heridas, granos y hemorroides	1. Infusión 2. Baños	1 2

<i>Rosaceae</i>	<i>Crataegus monogyna</i> Jacq.	Espino Blanco, Elorri Zuria	Flor y fruto Hojas	1. Para bajar la tensión 2. Cardiotónico	1. Infusión 2. Infusión	4 5
	<i>Rubus idaeus</i> L.	Frambuesa, Masusta	Hojas	1. Para tener un buen parto	1. Tomar la infusión en el último mes de embarazo	1
<i>Sapindaceae</i>	<i>Aesculus hippocastanus</i> L.	Castaña pilonga	Fruto, castaña	1. Reuma	1. Llevar una castaña pilonga en el bolsillo	2
<i>Saxifragaceae</i>	<i>Saxifraga paniculata</i> Mill.	Bálsamo	Hojas	1. Para desinfecta heridas	1. Calentar las hojas, quitarle la piel y aplicar en la herida	1
<i>Urticaceae</i>	<i>Urtica dioica</i> L.	Ortiga, Atsun, Osina	Parte aérea	1. Purgante y mejora del flujo sanguíneo	1. Infusión en fresco	6
				2. Para los bronquios, gota y anemia	2. Infusión	1
<i>Verbenaceae</i>	<i>Verbena officinalis</i> L.	Verbena, Izusta	Parte aérea	1. Para sinusitis y bronquitis. También para hinchazones por infección	1. Aplicar una tortilla hecha con la clara del huevo en la zona afectada	5
				2. Reuma	2. Emplasto o aplicar alcohol de Verbena	2

**Tabla 15:** Información obtenida acerca de los usos medicinales tradicionales de los hongos y líquenes mediante las entrevistas en la zona de la Selva de Irati

<i>Lobariaceae</i>	<i>Lobaria pulmonaria</i>	Pulmonaria de árbol (liquen)	Parte aérea	1. Para la tos crónica	1. Macerar durante 48h. en agua fría y tomar	1
<i>Amanitaceae</i>	<i>Amanita muscaria</i>	Amanita muscaria	Restos de velo blanco del sombrero	1. Provocar alucinaciones de tipo erótico	1. Secar previamente, si no provoca vómitos. Comer poco a poco.	1
<i>Phanerochaetaceae</i>	<i>Terana caerulea</i>	Hongo azul, azal urdin	Parte aérea	1. Actividad antibacteriana	1. Desconocida	1

En este caso solo han sido mencionados dos hongos y un líquen (**tabla 15**). El líquen tiene uso como antitumor, mientras que uno de los hongos, *Amanita muscaria*, sirve como alucinógeno y del otro, *Terana caerulea*, se nos indicó que tenía propiedades antibióticas, pero poco se conoce de su uso terapéutico tradicional. Dada esta situación, hemos decidido elegir un hongo para su posterior estudio químico y anticanceroso, ya que no hay mucha información acerca de estos. En nuestro caso hemos elegido el hongo saprófito *Terana caerulea*, con el fin de conseguir más información acerca de este peculiar hongo azul.

## 4.2. EXTRACTOS Y FRACCIONAMIENTO BIOLOGICO DE LOS COMPUESTOS RESPONSABLES DE LA BIOACTIVIDAD

### 4.2.1. INFUSIONES Y DECOCCIONES

Los resultados que se obtuvieron de la extracción en fresco por infusión y decocción de las tres *Kalanchoes* se muestran en la **tabla 16**.

**Tabla 16:** Pesos y rendimientos obtenidos de las extracciones por infusión y decocción para 35 g en fresco de *K. daigremontiana*, *K. pinnata* y *K. gastonis-bonnierii*

Extractos	<i>K. daigremontiana</i>		<i>K. pinnata</i>		<i>K. gastonis-bonnierii</i>	
	Masa (g)	(%)	Masa (g)	(%)	Masa (g)	(%)
Infusión	0,81	2,3	1,15	3,4	1,43	4,1
Decocción	0,87	2,5	1,46	4,2	1,34	3,8

Para *K. daigremontiana*, el mayor rendimiento se obtuvo mediante la decocción, al igual que con *K. pinnata*. En el caso de *K. gastonis-bonnierii*, el mayor rendimiento se obtuvo con la infusión. Normalmente el rendimiento obtenido será siempre más alto mediante la decocción, ya que el tiempo de contacto de la muestra con el disolvente es mayor, facilitando su extracción. La presencia de compuestos lipídicos y/o poliméricos dificultó la filtración pudiendo ser la causa de un menor rendimiento en la decocción.

Todos los rendimientos obtenidos fueron muy bajos. Esto se debe a que este tipo de plantas tienen una gran cantidad de agua en su composición, originando un porcentaje de rendimiento muy bajo. Probablemente también se debe a que hay una cantidad alta de compuestos insolubles en agua como las ceras. Estos compuestos son apolares, y no interactúan prácticamente con el agua, haciendo muy difícil su extracción mediante este disolvente, consiguiendo rendimientos más bajos todavía.

#### 4.2.2. EXTRACTOS DE DISOLVENTES DE DIFERENTES POLARIDADES

En el proceso de extracción por maceración con disolventes de diferentes polaridades para cada una de las muestras secas y trituradas de *K. daigremontiana*, *K. pinnata*, *K. gastonis-bonnierei* y *T. caerulea*, se obtuvieron los extractos y rendimientos que se muestran en la **tabla 17**.

**Tabla 17:** Pesos y rendimientos obtenidos en los diferentes extractos para 2 g de cada muestra: *K. daigremontiana*, *K. pinnata*, *K. gastonis-bonnierei* y *T. caerulea*

Extractos	<i>K. daigremontiana</i>		<i>K. pinnata</i>		<i>K. gastonis-bonnierei</i>		<i>T. caerulea</i>	
	Masa (mg)	Rendimiento (%)	Masa (mg)	Rendimiento (%)	Masa (mg)	Rendimiento (%)	Masa (mg)	Rendimiento (%)
Hexano	79	4,0	113	5,7	97	4,9	24	1,2
DCM	40	2,0	16	0,8	16	0,8	93	4,7
AcOEt	25	1,3	14	0,7	5	0,3	53	2,7
BuOH	62	3,1	85	4,3	69	3,5	107	5,4
H <sub>2</sub> O	190	9,6	849	42,3	365	18,3	18	0,9
Decocción final	577	28,9	170	8,7	288	14,4	75	3,8
<b>Total</b>	<b>973</b>	<b>48,9</b>	<b>1247</b>	<b>62,5</b>	<b>840</b>	<b>42,2</b>	<b>370</b>	<b>18,7</b>

En el caso de *K. daigremontiana*, el mayor rendimiento se obtuvo en la decocción final, lo que nos indica que la mayoría de compuestos son bastante polares y solubles en agua. En el caso de *K. pinnata*, como también pasó con *K. gastonis-bonnierei*, el mayor rendimiento se obtuvo en el extracto acuoso, esto nos indica que la mayoría de compuesto son bastante polares, más solubles en agua que en butanol.

Para *T. caerulea*, los rendimientos no fueron muy altos, suponiendo la totalidad de los extractos un 18,7 % de la masa natural seca, presentando una proporción equilibrada entre compuestos apolares (5,9 % de solubles en hexano y DCM), compuestos de polaridad media (8,1 % de solubles en AcOEt y BuOH) y compuestos polares (4,7 % de solubles en agua).

En general, el mayor rendimiento se obtuvo con *K. pinnata*, seguido de *K. daigremontiana*, seguido de *K. gastonis-bonnierei*, y por último *T. caerulea*.

### 4.2.3. IDENTIFICACIÓN QUÍMICA

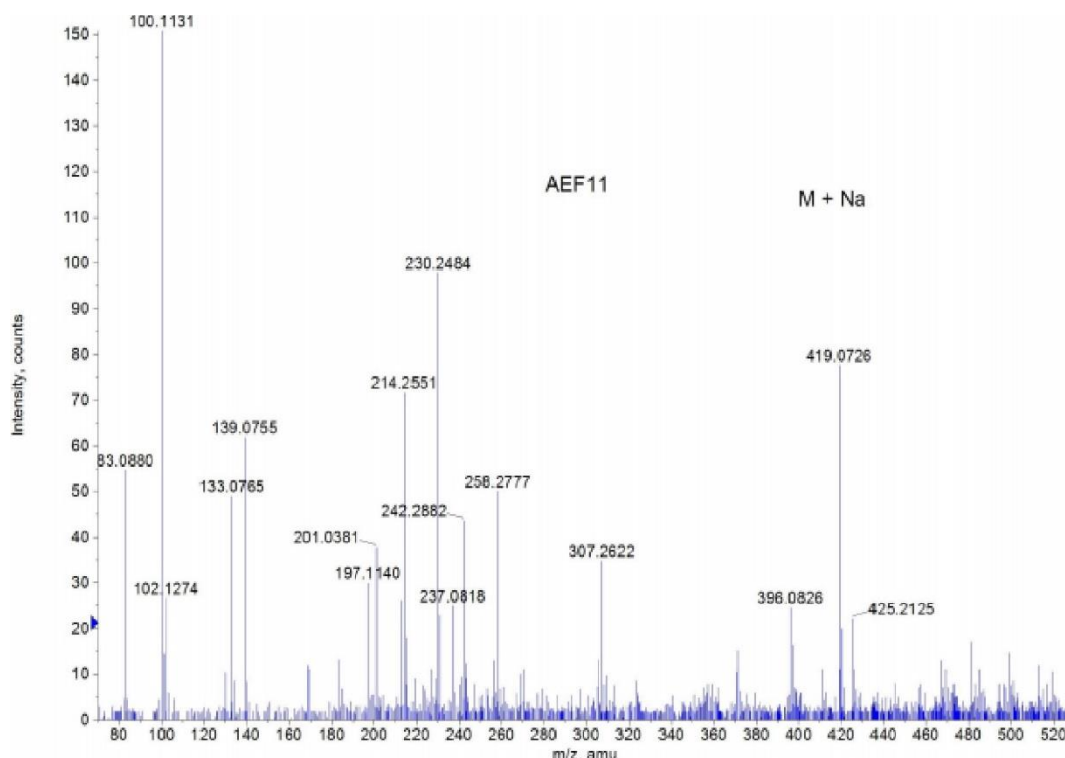
#### a) Fracciones de la cromatografía del Extracto AcOEt de *Terana caerulea*

En el fraccionamiento del E. AcOEt de *T. caerulea* mediante cromatografía en columna de gel de sílice, se obtuvieron 9 fracciones que se analizaron mediante  $^1\text{H}$ -RMN. De estas fracciones solo tres se tuvieron en cuenta para los ensayos de actividad, **tabla 18**. Estas corresponden al 22 % en masa del total del extracto (9,8 mg). Sobre el resto de fracciones eluidas de la cromatografía no se hicieron ensayos de actividad por seguir teniendo mezclas complejas de compuestos en muy baja cantidad individual.

**Tabla 18:** Fracciones obtenidas del extracto de AcOEt de *T. caerulea*

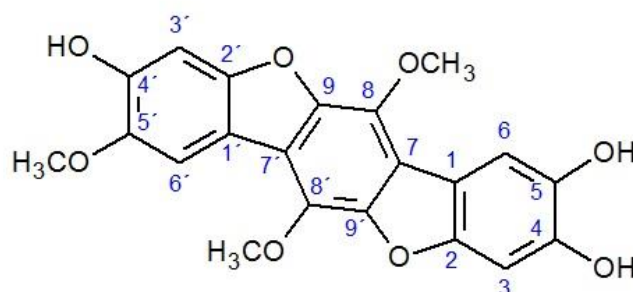
Fracción de E.AcOEt	Eluyente	Masa (mg)	Compuestos identificados	Análisis efectuados
Fr. 9-10	93 DCM:7 Acetona	2,2	Compuesto <b>1</b>	$^1\text{H}$ -RMN; $^{13}\text{C}$ -RMN; COSY
Fr. 11-14	93 DCM:7 Acetona	3,8	Compuesto <b>1</b> acompañado de dos derivados minoritarios	$^1\text{H}$ -RMN; $^{13}\text{C}$ -RMN; HSQC; HMBC; ROESY; HRMS
Fr. 37-45	Acetona	3,8	Mezcla de compuestos relacionados con <b>1</b>	$^1\text{H}$ -RMN; $^{13}\text{C}$ -RMN; HRMS

En las fracciones analizadas se identificó un nuevo compuesto inestable no descrito anteriormente, que se degrada en presencia de luz y el oxígeno del aire. Se trata de un derivado del ácido telefórico, con tres de los seis grupos hidroxilos metilados: 5',8,8'-trimetoxi-2,9':2',9-diepoxi-9,7'-ciclo-7,9'-neoligna-7(9'),8,7'-trieno-4,4',5-triol (**figura 28**). Su fórmula molecular ( $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{O}_8$ ) se dedujo a través del ion  $[\text{M}+\text{Na}]^\pm$  observado en su espectro de HRMS (ESI) a 419,0726  $m/z$  (calculada para  $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{O}_8\text{Na}$  419,0737), **figura 27**.



**Figura 27:** Espectro HRMS (ESI) del compuesto **1**

Este compuesto se identificó por sus señales de  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN, COSY, ROESY, HSQC y HMBC:



**Figura 28:** Estructura del compuesto **1** presente en el extracto AcOEt de *T. caerulea*

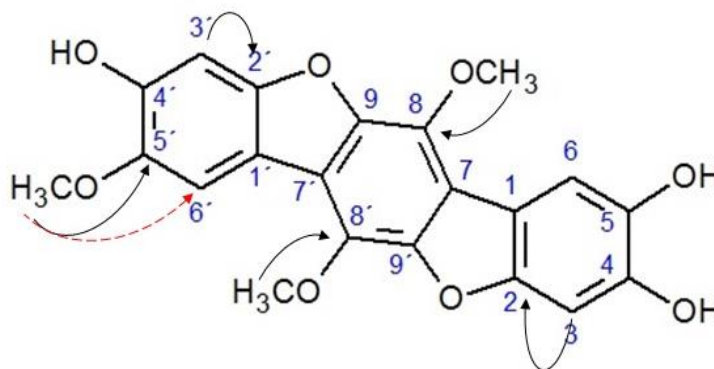
$^1\text{H}$ -RMN/ $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm): 7,59 (1 H, s, H-6'), 7,51 (1 H, s, H-6), 7,04 (1 H, s, H-3'), 7,00 (1 H, s, H-3), 4,33 (3 H, s,  $\text{CH}_3\text{O}$ -8), 4,30 (3 H, s,  $\text{CH}_3\text{O}$ -8'), 3,98 (3 H, s,  $\text{CH}_3\text{O}$ -5')

$^{13}\text{C}$ -RMN/ $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm): 152,7 (C-2'), 152,2 (C-2), 148,4 (C-4'), 147,2 (C-5), 146,2 (C-5'), 143,8 (C-9), 143,7 (C-9'), 143,3 (C-4), 134,5 (C-8), 134,5 (C-8'), 117,9 (C-1), 117,4 (C-1'), 116,1 (C-7), 116,1 (C-7'), 108,4 (C-6), 105,6 (C-6'), 99,3 (C-3'), 99,0 (C-3), 61,2 ( $\text{CH}_3\text{O}$ -8), 61,2 ( $\text{CH}_3\text{O}$ -8'), 57,1 ( $\text{CH}_3\text{O}$ -5').

**HMBC:** 3,98 ppm ( $\text{CH}_3\text{O}$ -5') correlaciona con 146,2 ppm (C-5')

Los hidrógenos de los dos metoxilos a 4,33 ppm ( $\text{CH}_3\text{O}$ -8) y 4,37 ppm ( $\text{CH}_3\text{O}$ -8') correlacionan con las dos señales a 134,5 ppm (C-8) y (C-8') (**figura 29**).

**ROESY:** 3,98 ppm (CH<sub>3</sub>O-5') correlaciona con 7,59 ppm (H-6') y no con 7,04 ppm (H-3') (**figura 29**).



**Figura 29:** Correlaciones significativas observadas en los experimentos RMN 2D HMBC (flechas en negro continuas) y ROESY (flecha en rojo discontinuas)

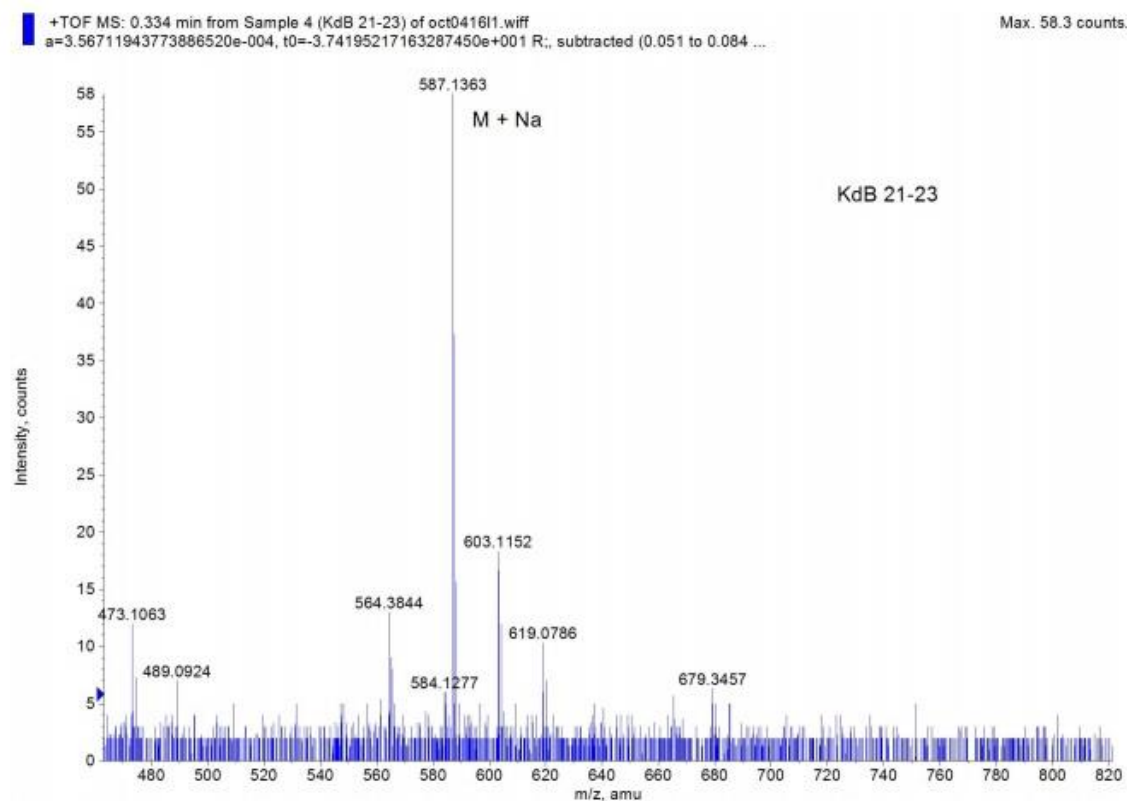
### b) Fracciones de la cromatografía del Extracto BuOH de *K. daigremontiana*

En el fraccionamiento del E. BuOH de *K. daigremontiana* mediante cromatografía en columna de gel de sílice, se obtuvieron 9 fracciones. De estas fracciones solo se tuvo una en cuenta para los ensayos de actividad, **tabla 19**, que se corresponde el 7,9 % (4,9 mg) de extracto total. Sobre el resto de fracciones eluidas de la cromatografía no se hicieron ensayos de actividad por seguir teniendo mezclas complejas de compuestos en muy baja cantidad individual.

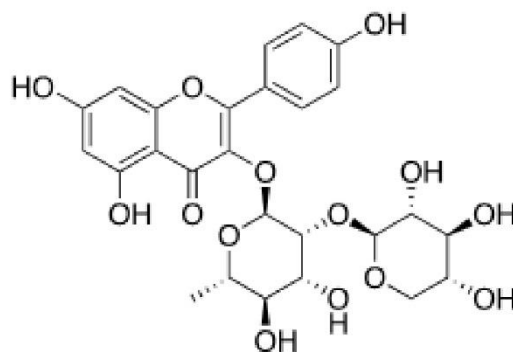
**Tabla 19:** Fracción obtenida del extracto BuOH de *K. daigremontiana*

Fracción de E.BuOH	Eluyente	Masa (mg)	Compuestos identificados	Análisis efectuados
Fr. 21-22	8 DCM:2 MeOH	4,9	Compuesto 2	<sup>1</sup> H-RMN; <sup>13</sup> C-RMN; COSY; HSQC; HMBC; ROESY; HRMS; MS/MS

En esta fracción se identificó un flavonoide, 3-*O*-β-D-xilopiranosil (1→2) α-L-ranopiranosido de kaempferol (**figura 31**). Esta estructura se caracterizó mediante las técnicas espectroscópicas recogidas en la tabla anterior y se confirmó mediante la comparación con lo descrito en bibliografía (Nielsen *et al.*, 2005; Muzinato *et al.*, 2006). Próximamente aparecerá una publicación de un grupo de investigadores de la Universidade Federal do Rio de Janeiro (ya disponible en versión de publicación aceptada) en la que se describe la presencia de este flavonoide en *K. daigremontiana* (Ürményi *et al.*, 2016). Su fórmula molecular (C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>O<sub>14</sub>) se dedujo a través del ion [M+Na]<sup>±</sup> observado en su espectro de HRMS (ESI) a 587,1363 *m/z* (calculada para C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>O<sub>14</sub>Na 587,1371) (**figura 30**).



**Figura 30:** Espectro HRMS (ESI) del compuesto 2



**Figura 31:** Estructura del compuesto 2 del extracto de BuOH de *K. daigremontiana*

Las señales en el experimento HMBC y ROESY indican la misma constitución de los fragmentos y los desplazamientos químicos de los átomos de carbono en el  $^{13}\text{C}$ -RMN y de los átomos de hidrógeno junto con las constantes de acoplamiento en el  $^1\text{H}$ -RMN confirman tanto la estructura de piranosas en los monosacáridos, como la glicosilación en la posición 3 del kaempferol, como las configuraciones de cada uno de los átomos de carbono de los monosacáridos.

### 4.3. CARACTERIZACIÓN NUTRICIONAL

#### 4.3.1. VALOR NUTRICIONAL

Los resultados del estudio del valor nutricional (proteínas, lípidos, carbohidratos y cenizas) y del valor energético obtenido en las plantas secas *K. daigremontiana*, *K. pinnata* y *K. gastonis-bonnierii*, se presentan en la **tabla 20**.

**Tabla 20:** Composición nutricional y valor energético de las tres plantas del género *Kalanchoe*

	<i>K. daigremontiana</i>	<i>K. pinnata</i>	<i>K. gastonis-bonnierii</i>
<b>Proteínas</b> (g/100 g dw)	8,25 ± 0,17	8,80 ± 0,44	5,37 ± 0,18
<b>Lípidos</b> (g/100 g dw)	3,01 ± 0,42	4,52 ± 0,25	2,66 ± 0,09
<b>Carbohidratos</b> (g/100 g dw)	57,83 ± 0,19	77,32 ± 0,78	72,52 ± 0,14
<b>Cenizas</b> (g/100 g dw)	30,90 ± 0,02	9,36 ± 0,41	19,45 ± 0,11
<b>Energía</b> (kcal/100 g dw)	291 ± 1	385 ± 0	335 ± 1

Los carbohidratos fueron los macronutrientes más abundantes en las tres *Kalanchoes*, siendo el valor superior para *K. pinnata*, seguido de *K. gastonis-bonnierii* y por último *K. daigremontiana*. El segundo valor más alto lo obtuvieron las cenizas, *K. daigremontiana* con el valor más alto, seguido de *K. gastonis-bonnierii* seguido de *K. pinnata*. Los niveles más altos para proteínas fueron para *K. pinnata*, muy seguidos de *K. daigremontiana* (8,8 g/100 g y 8,3 g/100 g respectivamente). En el caso de los lípidos, *K. pinnata* obtuvo los valores más altos (4,5 g/100 g).

En comparación con los datos de bibliografía, apartado 1.6.7., no hay similitudes con los resultados, ya que para el caso de *K. pinnata* los lípidos serían mayoritarios y en el caso de *K. daigremontiana* las clorofilas. Respecto al contenido de cenizas para *K. gastonis-bonnierii* si hay similitudes siendo un 22,25 g/100 g de muestra seca el contenido total de cenizas según la bibliografía.

El valor energético más alto obtenido fue para *K. pinnata* seguido de *K. gastonis-bonnierii* y *K. daigremontiana* (385 kcal/100 g; 335 kcal/100 g y 291 kcal/100 g respectivamente).

### 4.3.2. ANALISIS DE FITOQUÍMICOS

#### a) Ácidos orgánicos

**Tabla 21:** Composición de ácidos orgánicos de las tres plantas del género *Kalanchoe* (media±SD)

Ácidos orgánicos	<i>K. daigremontiana</i> (g/100 g dw)	<i>K. pinnata</i> (g/100 g dw)	<i>K. gastonis-bonnierei</i> (g/100 g dw)
Ácido oxálico	3,99 ± 0,88	1,43 ± 0,01	0,51 ± 0,04
Ácido málico	3,19 ± 1,11	-	3,65 ± 0,44
Ácido shikímico	0,10 ± 0,02	-	0,12 ± 0,00
Ácido cítrico	-	-	1,74 ± 0,08
Ácido succínico	-	-	1,67 ± 0,10
Ácido fumárico	-	-	0
<b>Suma</b>	<b>7,28 ± 2,01</b>	<b>1,43 ± 0,01</b>	<b>7,69 ± 0,38</b>

Los ácidos orgánicos identificados variaron mucho según la planta (**tabla 21**). En el caso de *K. daigremontiana*, se identificaron 3 ácidos orgánicos (ácido oxálico, ácido málico y ácido shikímico), en *K. pinnata* se identificó un único ácido orgánico (ácido oxálico) y en el caso de *K. gastonis-bonnierei* se identificaron 6 (ácido oxálico, ácido málico, ácido shikímico, ácido cítrico, ácido succínico y ácido fumárico), aunque la cantidad de ácido fumárico fue tan baja que no se pudo cuantificar.

La mayor cantidad de ácidos orgánicos se encontró para *K. gastonis-bonnierei*, siendo el ácido málico el mayoritario. Para *K. daigremontiana*, se encontraron un total de 7,28 g/100 g de planta seca de ácidos orgánicos, siendo el mayoritario el ácido oxálico. En el caso de *K. pinnata* solo se encontró un único ácido orgánico, ácido oxálico (1,43 g /100 g de planta seca).

#### b) Ácidos grasos

La composición de ácidos grasos; ácidos grasos saturados (SFA), ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), de los tres *Kalanchoes* se presentan en la **tabla 22**.

**Tabla 22:** Caracterización de los ácidos grasos, en porcentaje relativo, presentes en las muestras de planta seca de *K. daigremontiana*, *K. pinnata* y *K. gastonis-bonnierei* (media  $\pm$  SD)

	<i>K. daigremontiana</i>	<i>K. pinnata</i>	<i>K. gastonis-bonnierei</i>
C6:0	0,26 $\pm$ 0,02	0,97 $\pm$ 0,02	0,36 $\pm$ 0,01
C8:0	0,26 $\pm$ 0,01	0,55 $\pm$ 0,02	0,15 $\pm$ 0,00
C10:0	0,54 $\pm$ 0,02	0,85 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,00
C12:0	0,49 $\pm$ 0,03	0,79 $\pm$ 0,01	0,32 $\pm$ 0,01
C14:0	4,91 $\pm$ 0,21	5,90 $\pm$ 0,08	4,59 $\pm$ 0,03
C15:0	0,92 $\pm$ 0,07	0,93 $\pm$ 0,02	0,92 $\pm$ 0,06
C16:0	16,73 $\pm$ 0,16	17,17 $\pm$ 0,15	17,53 $\pm$ 0,21
C16:1	0,42 $\pm$ 0,01	0,47 $\pm$ 0,01	0,50 $\pm$ 0,00
C17:0	0,75 $\pm$ 0,03	0,96 $\pm$ 0,02	0,93 $\pm$ 0,01
C17:1	0,07 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,00
C18:0	8,41 $\pm$ 0,08	12,40 $\pm$ 0,01	6,73 $\pm$ 0,00
C18:1n9c+t	6,67 $\pm$ 0,29	3,98 $\pm$ 0,02	4,62 $\pm$ 0,11
C18:2n6c	12,94 $\pm$ 0,28	17,75 $\pm$ 0,04	14,52 $\pm$ 0,00
C18:3n3	15,15 $\pm$ 0,12	17,82 $\pm$ 0,08	12,70 $\pm$ 0,01
C20:0	3,80 $\pm$ 0,21	3,99 $\pm$ 0,05	4,60 $\pm$ 0,00
C20:3n3+C21:0	0,74 $\pm$ 0,01	0,48 $\pm$ 0,00	1,60 $\pm$ 0,06
C20:5n3	0,14 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,00
C22:0	22,45 $\pm$ 0,25	12,29 $\pm$ 0,20	23,32 $\pm$ 0,08
C23:0	0,70 $\pm$ 0,04	0,54 $\pm$ 0,00	1,09 $\pm$ 0,11
C24:0	3,64 $\pm$ 0,09	1,94 $\pm$ 0,05	4,94 $\pm$ 0,23
<b>SFA (%)</b>	<b>63,86 <math>\pm</math> 0,13</b>	<b>59,28 <math>\pm</math> 0,07</b>	<b>65,68 <math>\pm</math> 0,17</b>
<b>MUFA (%)</b>	<b>7,17 <math>\pm</math> 0,29</b>	<b>4,57 <math>\pm</math> 0,02</b>	<b>5,32 <math>\pm</math> 0,11</b>
<b>PUFA (%)</b>	<b>28,98 <math>\pm</math> 0,43</b>	<b>36,15 <math>\pm</math> 0,06</b>	<b>29,01 <math>\pm</math> 0,06</b>

SFA: ácidos grasos saturados, MUFA: ácidos grasos monoinsaturados, PUFA: ácidos grasos poliinsaturados

Los tres *Kalanchoes* mostraron una relación de ácidos grasos SFA>PUFA>MUFA, donde en todos los casos son mayoritarios los ácidos grasos saturados; *K. daigremontiana* 63,86 %, *K. pinnata* 59,28 % y *K. gastonis-bonnierei* 65,68 %.

En el caso de *K. daigremontiana*, los ácidos grasos mayoritarios fueron ácido behénico (C22:0, 22,45 %), ácido palmítico (C16:0, 16,73 %), ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3n3, 15,15 %) y ácido linoleico (C18:2n6c, 12,94 %).

Para *K. pinnata*, los ácidos grasos más abundantes fueron ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3n3, 17,82 %), ácido linoleico (C18:2n6c, 17,75 %) y ácido palmítico (C16:0, 17,17 %).

*K. gastonis-bonnierei* mostró los resultados más altos para ácido behénico (C22:0, 23,32 %), ácido palmítico (C16:0, 17,53 %), ácido linoleico (C18:2n6c, 14,52%) y ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3n3, 12,70 %).

*K. daigremontiana* y *K. gastonis-bonneri* muestran un perfil de ácido grasos parecido, mientras que *K. pinnata* se diferencia por no tener el ácido behénico como mayoritario. Si consideramos el porcentaje de ácido behénico, se puede observar que *K. pinnata* tiene aproximadamente la mitad que las otras dos plantas. Esto puede ser útil a la hora de hacer una identificación quimiotaxonómica, es decir, de indentificar estas plantas (o partes de ellas o sus extractos) a través de su contenido en ácidos grasos.

### c) Carbohidratos

**Tabla 23:** Composición de carbohidratos para las tres plantas del género *Kalanchoe* (media $\pm$ SD), expresado en g por cada 100 gramos de planta seca

<b>Azúcares</b>	<i>K. daigremontiana</i> (g/100 g)	<i>K. pinnata</i> (g/100 g)	<i>K. gastonis-bonnierei</i> (g/100 g)
Fructosa	0,69 $\pm$ 0	14,97 $\pm$ 0,81	3,39 $\pm$ 0,26
Glucosa	0,23 $\pm$ 0	2,29 $\pm$ 0,19	0 $\pm$ 0
Sacarosa	0,31 $\pm$ 0,01	14,43 $\pm$ 0,52	3,01 $\pm$ 0,16
<b>Suma</b>	1,23 $\pm$ 0,02	30,69 $\pm$ 1,52	6,41 $\pm$ 0,42

En el análisis de los carbohidratos, azúcares, se han identificado tres tipos (fructosa, glucosa y sacarosa) para cada planta (**tabla 23**). En el caso de *K. daigremontiana* y *gastonis-bonnierei*, el azúcar mayoritario ha sido la fructosa, mientras que para *K. pinnata* ha sido la sacarosa. La cantidad total de azucares varía mucho según el tipo de especie.

*K. pinnata* ha sido la que mayor cantidad de azucares ha presentado, con un total de 30,69 g/100 g seguido de *K. gastonis-bonnierei* (6,41 g/100 g) seguido de *K. daigremontiana* (1,23 g/100 g). En el caso de *K. gastonis-bonnierei* la cantidad de glucosa fue tan pequeña que no se pudo cuantificar.

Para *K. pinnata*, en comparación con los datos de bibliografía, se puede observar que estos no coinciden, ya que han sido identificados 8 tipos de azúcares, siendo la arabinosa la mayoritaria, monosacárido que en nuestro caso no se ha detectado.

#### d) Tocoferoles

**Tabla 24:** Composición de tocoferoles para las tres plantas del género *Kalanchoe* expresado en microgramos por 1 gramo de planta seca

<b>Tocoferoles</b>	<i>K. daigremontiana</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	<i>K. pinnata</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	<i>K. gastonis-bonnierei</i> ( $\mu\text{g/g}$ )
$\alpha$ -Tocoferol	139 $\pm$ 1	446 $\pm$ 0	112 $\pm$ 1
$\beta$ -Tocoferol	7,55 $\pm$ 0,51	122 $\pm$ 0	11,2 $\pm$ 0,4
$\gamma$ -Tocoferol	614 $\pm$ 1	758 $\pm$ 1	71,5 $\pm$ 0,6
$\delta$ -Tocoferol	99,0 $\pm$ 0,9	155 $\pm$ 1	12,2 $\pm$ 0,5
<b>Suma</b>	860 $\pm$ 3	1482 $\pm$ 3	207 $\pm$ 2

En el análisis de los tocoferolos las tres plantas presentaron las cuatro isoformas de los tocoferoles ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ) (**tabla 24**).

Para *K. daigremontiana* la isoforma mayoritaria fue  $\gamma$ -tocoferol (614  $\mu\text{g/g}$ ), seguido de  $\alpha$ -tocoferol (139  $\mu\text{g/g}$ ). Estos datos coinciden con la información obtenida para la introducción, ya que estudios anteriores confirman que la isoforma mayoritaria de *K. daigremontiana* es  $\gamma$ -tocoferol. En el caso de *K. pinnata* la isoforma mayoritaria también fue  $\gamma$ -tocoferol seguido de  $\alpha$ -tocoferol (758  $\mu\text{g/g}$  y 446  $\mu\text{g/g}$  respectivamente). La isoforma mayoritaria de *K. gastonis-bonnierei* fue  $\alpha$ -tocoferol (112  $\mu\text{g/g}$ ) seguido de la  $\gamma$ -tocoferol (71,5  $\mu\text{g/g}$ ).

La mayor concentración de tocoferoles se encontró para *K. pinnata* (1482  $\mu\text{g/g}$ ), continuado por *K. daigremontiana* (860  $\mu\text{g/g}$ ), y *K. gastonis-bonnierei* (207  $\mu\text{g/g}$ ).

## 4.4 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

La evaluación de la citotoxicidad de los extractos de diferentes polaridades de las tres plantas y el hongo, y las decocciones y las infusiones de las tres plantas se desarrolló sobre cuatro líneas celulares tumorales humanas: HeLa (carcinoma cervical), NCI-H460 (carcinoma de pulmón), HepG2 (carcinoma hepatocelular) y MCF-7 (carcinoma de mama). La hepatotoxicidad se evaluó sobre un cultivo primario de células de hígado de cerdo: PLP2.

Todos los resultados aparecen en las **tablas 25-29**.

**Tabla 25:** Resultados de la citotoxicidad de los extractos de *K. daigremontiana*

<b>Extractos de <i>Kalanchoe daigremontiana</i> (GI<sub>50</sub> µg/mL)</b>						
	<b>D. Hex</b>	<b>D. DCM</b>	<b>D. AcOEt</b>	<b>D. Butanol</b>	<b>D. H<sub>2</sub>O</b>	<b>D. Decocc. Final</b>
<b>HeLa (carcinoma cervical)</b>	167 ± 14	14,8 ± 0,7	311 ± 13	3,10 ± 0,20	200 ± 2	257 ± 12
<b>NCI-H460 (carcinoma pulmonar)</b>	83,7 ± 7,4	5,01 ± 0,47	>400	5,48 ± 0,66	98,17 ± 7,12	>400
<b>HepG2 (carcinoma hepatocelular)</b>	207 ± 19	63,2 ± 6,9	>400	20,7 ± 1,2	>400	>400
<b>MCF-7 (carcinoma de mama)</b>	79,5 ± 5,6	4,86 ± 0,48	237 ± 16	1,41 ± 0,18	257 ± 24	347 ± 6
<b>PLP (células hepáticas de cerdo)</b>	233 ± 7	6,65 ± 0,46	>400	39,6 ± 2,4	>400	>400

**Tabla 26:** Resultados de la citotoxicidad de los extractos de *K. pinnata*

<b>Extractos de <i>Kalanchoe pinnata</i> (GI<sub>50</sub> µg/mL)</b>						
	<b>P. Hex</b>	<b>P. DCM</b>	<b>P. AcOEt</b>	<b>P. BuOH</b>	<b>P. H<sub>2</sub>O</b>	<b>P. Decocc. Final</b>
<b>HeLa (carcinoma cervical)</b>	197 ± 12	216 ± 12	345 ± 5	49,5 ± 1,0	287 ± 28	179 ± 16
<b>NCI- H460 (carcinoma pulmonar)</b>	79,4 ± 2,71	201 ± 3	>400	39,5 ± 24,6	>400	>400
<b>HepG2 (carcinoma hepatocelular)</b>	304 ± 23	328 ± 17	>400	285 ± 5	>400	>400
<b>MCF-7 (carcinoma de mama)</b>	92,6 ± 8,8	212 ± 3	276 ± 1	61,3 ± 5,3	330 ± 2	333 ± 10
<b>PLP (células hepáticas de cerdo)</b>	>400	>400	>400	>400	>400	>400

**Tabla 27:** Resultados de la citotoxicidad de los extractos de *K. gastonis-bonnierei*

	Extractos de <i>Kalanchoe gastonis-bonnierei</i> (GI <sub>50</sub> µg/mL)					
	GB. Hex	GB. DCM	GB. AcOEt	GB. BuOH	GB. H <sub>2</sub> O	GB. Decocc. Final
HeLa (carcinoma cervical)	159 ± 8	79,4 ± 2,0	72,5 ± 4,2	12,0 ± 0,5	276 ± 2	225 ± 15
NCI-H460 (carcinoma pulmonar)	75,2 ± 7,4	299 ± 19	303 ± 12	9,88 ± 0,87	>400	>400
HepG2 (carcinoma hepatocelular)	246 ± 11	127 ± 12	>400	61,0 ± 3,7	>400	>400
MCF-7 (carcinoma de mama)	105 ± 9	64,1 ± 3,6	60,6 ± 0,8	4,80 ± 0,26	310 ± 11	306 ± 5
PLP (células hepáticas de cerdo)	70,0 ± 1,9	62,0 ± 3,8	>400	16,62 ± 1,39	>400	>400

**Tabla 28:** Resultados de la citotoxicidad de los extractos de *Terana caerulea*

	Extractos de <i>Terana caerulea</i> (GI <sub>50</sub> µg/mL)					
	T. Hex	T. DCM	T. EtOAc	T. Butanol	T. H <sub>2</sub> O	T. Decocc. Final
HeLa (carcinoma cervical)	73,4 ± 3,0	12,7 ± 2,4	5,69 ± 0,45	55,3 ± 6,0	61,5 ± 2,1	224 ± 14
NCI- H460 (carcinoma pulmonar)	71,0 ± 3,1	19,9 ± 1,3	11,9 ± 1,4	100 ± 8	215 ± 16	>400
HepG2 (carcinoma hepatocelular)	77,1 ± 6,0	50,2 ± 4,0	175 ± 8	341 ± 13	339 ± 25	>400
MCF-7 (carcinoma de mama)	74,7 ± 2,9	15,1 ± 1,3	3,22 ± 0,18	76,7 ± 4,7	93,1 ± 3,9	279 ± 17
PLP (células hepáticas de cerdo)	157 ± 5	8,7 ± 3,8	30,6 ± 3,0	>400	>400	>400

**Tabla 29:** Resultados de la citotoxicidad de las infusiones y decocciones de las tres *Kalanchoes*

	<i>K. daigremontiana</i>		<i>K. pinnata</i>		<i>K. gastonis-bonnierei</i>	
	Infusión	Decocción	Infusión	Decocción	Infusión	Decocción
HeLa (carcinoma cervical)	>400	48,94 ± 3,04	178 ± 16	201 ± 6	171 ± 11	289 ± 19
NCI-H460 (carcinoma pulmonar)	>400	49,4 ± 2,9	>400	298 ± 20	162 ± 14	186 ± 5
HepG2 (carcinoma hepatocelular)	>400	293 ± 15	>400	>400	>400	>400
MCF-7 (carcinoma de mama)	>400	35,13 ± 10,30	321 ± 26	312 ± 9	88,9 ± 5,4	202 ± 8
PLP (células hepáticas de cerdo)	>400	335 ± 12	>400	320 ± 6	287 ± 12	271 ± 14

En el caso de *K. daigremontiana*, los mejores resultados se obtuvieron para el extracto butanólico, que resultó tener actividad citotóxica frente a las cuatro líneas celulares tumorales, siendo más activo frente al carcinoma de mama ( $GI_{50} = 1,41 \pm 0,18$ ). El extracto de diclorometano también presentó actividad en las cuatro líneas, con su mayor actividad frente al carcinoma de mama ( $GI_{50} = 4,86 \pm 0,48$ ) muy seguida del carcinoma pulmonar ( $GI_{50} = 5,01 \pm 0,47$ ). Respecto a la citotoxicidad, el extracto más tóxico fue el de diclorometano ( $GI_{50} = 6,65 \pm 0,46$ ) seguido del extracto butanólico ( $GI_{50} = 39,6 \pm 2,4$ ). Los extractos de acetato de etilo, agua y la decocción final no presentaron citotoxicidad, mientras que a su vez obtuvieron actividad citotóxica más baja.

*K. pinnata* obtuvo los mejores resultados para el extracto de butanol, que resultó tener actividad citotóxica frente a las cuatro líneas celulares, teniendo la mayor actividad frente al carcinoma pulmonar ( $GI_{50} = 39,5 \pm 24,6$ ), seguido del carcinoma cervical ( $GI_{50} = 49,5 \pm 1,0$ ). Ningún extracto presentó toxicidad frente a las células de hígado de cerdo.

Los mejores resultados de actividad citotóxica se obtuvieron para el extracto butanólico en el caso de *K. gastonis-bonnierii*, obteniendo resultados contra las cuatro líneas celulares, siendo la mejor el carcinoma de mama ( $GI_{50} = 4,80 \pm 0,26$ ), seguido del pulmonar ( $GI_{50} = 9,88 \pm 0,87$ ), seguido del cervical ( $GI_{50} = 12,0 \pm 0,5$ ). Respecto a la citotoxicidad, el extracto butanólico fue también el que mayor toxicidad presentó frente a las células de hígado de cerdo ( $GI_{50} = 16,6 \pm 1,4$ ), seguido del extracto de DCM ( $GI_{50} = 62,0 \pm 3,8$ ) y hexano ( $GI_{50} = 70,0 \pm 1,9$ ).

El hongo *T. caerulea* presentó muy buenos resultados en las cuatro líneas celulares, siendo el extracto de acetato de etilo el que mejor actividad obtuvo en todas las líneas celulares (MCF-7 =  $3,22 \pm 0,18$ ; HeLa =  $5,69 \pm 0,45$  y NCI =  $11,9 \pm 1,4$ ), excepto en la de carcinoma hepatocelular, siendo el extracto de diclorometano el mejor ( $GI_{50} = 50,2 \pm 4,0$ ). Los extractos de hexano, DCM y AcOEt fueron los mejores, aportando buenos resultados para las cuatro líneas celulares. También fueron los únicos que presentaron toxicidad frente a las células de hígado de cerdo; hex  $GI_{50} = 157 \pm 5$ ; DCM  $GI_{50} = 8,73 \pm 3,75$  y AcOEt  $GI_{50} = 30,6 \pm 3,0$ .

Generalmente los resultados obtenidos fueron muy buenos, teniendo en cuenta que son matrices naturales y que no son compuestos aislados. Esto nos aporta datos para nuevas interesantes investigaciones, ya que los datos obtenidos son muy buenos, comparando con datos de agentes antitumorales sintéticos como la ellipticina (**tabla 30**).

**Tabla 30:** Citotoxicidad de ellipticina GI<sub>50</sub> (µg/mL)

Ellipticina	
MCF-7 (carcinoma de mama)	0,91 ± 0,04
NCI-H460 (carcinoma pulmonar)	1,03 ± 0,09
HeLa (carcinoma cervical)	1,91 ± 0,06
HepG2 (carcinoma hepatocelular)	1,14 ± 0,21
PLP2	3,22 ± 0,67

Las matrices naturales, se consideran muy buenos antitumorales cuando la concentración para alcanzar el GI<sub>50</sub> es menor de 20 µg, resultados que se ha conseguido en varios casos: fracciones de DCM y BuOH de *K. daigremontiana*; fracción de BuOH de *K. gastonis-bonnierii* y fracciones de DCM y AcOEt de *T. caerulea*.

Cabe destacar que estos resultados son de extractos de diferentes disolventes que contienen muchos compuestos. Esto indica que habría que tener en cuenta que la cantidad del compuesto que tiene la actividad está en menor concentración de lo que se expresa en la tabla, ya que las concentraciones de la tabla se refieren a la mezcla en su totalidad. Con lo cual, la cantidad de los compuesto antitumorales sería más baja que la que se indica en la tabla, obteniendo mejores resultados todavía. Dada esta situación, se decidió hacer el fraccionamiento del extracto butanólico de *K. daigremontiana* y el fraccionamiento del extracto de acetato de etilo de *T. caerulea* con el fin de aislar e identificar las moléculas responsables de la actividad (apartado 4.2.3).

Los resultados de las infusiones y decocciones de las tres *Kalanchoes* se pueden observar en la **tabla 29**.

La infusión de *K. daigremontiana* no mostró actividad citotóxica. La decocción mostró actividad frente a las cuatro líneas celulares, obteniendo el mejor resultado para el carcinoma de mama (MCF-7). Ninguna presentó hepatotoxicidad frente a los cultivos primarios de células de hígado de cerdo (PLP2).

Los mejores resultados de la infusión y decocción de *K. pinnata* se observaron para el carcinoma cervical (HeLa). La infusión no mostro actividad frente a las líneas NCI-H460 y HepG2 y la decocción frente a la línea celular HepG2. Ninguna presentó hepatotoxicidad frente a los cultivos primarios de células de hígado de cerdo (PLP2).

Los mejores resultados de *K. gastonis-bonnierii* se observaron para la infusión frente a la línea celular del carcinoma de mama (MFC-7). Respecto a la decocción, los mejores resultados de obtuvieron frente al carcinoma pulmonar (NCI-H460). Tanto la infusión como la decocción no presentaron actividad frente al carcinoma hepatocelular.

Ninguna presentó hepatotoxicidad frente a los cultivos primarios de células de hígado de cerdo (PLP2).

Generalmente los mejores resultados se observaron para la decocción de *K. daigremontiana*.

#### 4.4.1 ENSAYOS DE ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LAS FRACCIONES DEL E. AcOEt DE *TERANA CAERULEA*

La evaluación de la actividad citotóxica de las tres fracciones obtenidas del extracto de AcOEt de *T.* se pueden observar en la **tabla 31**.

Todas las fracciones han demostrado tener actividad citotóxica.

**Tabla 31:** Resultados de la actividad citotóxica de las tres fracciones obtenidas del extracto de AcOEt de *T. caerulea*

	Fracciones de <i>Terana caerulea</i> del extracto de AcOEt (GI <sub>50</sub> µg/mL)		
	Fr. 9-10	Fr. 11-14	Fr. 37-45
<b>HeLa (carcinoma cervical)</b>	19,6 ± 1,3	14,4 ± 1,2	18,6 ± 1,3
<b>NCI-H460 (carcinoma pulmonar)</b>	68,74 ± 0,6	15,2 ± 1,1	23,8 ± 0,1
<b>HepG2 (carcinoma hepatocelular)</b>	43,4 ± 0,9	20,2 ± 1,7	35,5 ± 2,2
<b>MCF-7 (carcinoma de mama)</b>	57,3 ± 3,9	12,5 ± 0,9	18,3 ± 0,6
<b>PLP (células hepáticas de cerdo)</b>	128 ± 9	58,8 ± 5,0	83,8 ± 8,2

La fracción 11-14 es la que mayor actividad presentó en todas las líneas cancerosas, y a su vez la que mayor citotoxicidad tuvo frente a las células de hígado de cerdo. Para las fracciones 11-14 y 37-45, los mejores resultados fueron para MCF-7, mientras que para la fracción 9-10 los mejores resultados fueron para HeLa.

Como se ha mencionado en el apartado 4.2.3, la fr. 9-10 y fr. 11-14 tienen una composición muy parecida. En la primera tenemos un compuesto, mientras que en la otra tenemos ese mismo compuesto mayoritario junto a dos minoritarios. Si observamos los resultados, podemos reparar que estos son diferentes. Además de la diferencia en composición, también ha podido influir el momento de preparar los compuestos para realizar los ensayos de citotoxicidad, ya que la fr.9-10 estuvo varios días sin disolvente, mientras que la fr. 11-14 estuvo solo unas horas sin este. Al ser un compuesto inestable, ya que se puede observar que a la medida que se va quedando sin disolvente se forma un solido negro, podemos deducir que esto ha podido tener algún tipo de influencia. También

puede deberse a una sinergia, ya que la fracción 11-14 tiene más actividad que las otras dos fracciones.

Si comparamos estos resultados con el resultado general del extracto de AcOEt, observamos que la concentración requerida para GI<sub>50</sub> ha aumentado, con lo cual, el compuesto aislado no es el que mayor actividad citotóxica presenta de toda la mezcla. Los resultados generales pueden deberse a interacciones entre las moléculas de la composición de *T. caerulea*, ya que la fr. 9-10 (compuesto **1** aislado), tiene menor actividad que la fr. 11-14 (compuesto **1** + dos compuestos minoritarios).

#### 4.4.2 ENSAYOS DE ACTIVIDAD CITOTÓXICA EN LA FRACCIÓN DE BUTANOL DE *K. DAIGREMONTIANA*

Los resultados obtenidos para la fracción del E. BuOH de *K. daigremontiana* se pueden observar en la **tabla 32**.

**Tabla 32:** Resultados de la actividad citotóxica de la fracción obtenidas del extracto de BuOH de *K. daigremontiana*

Fracción de <i>K. daigremontiana</i> del extracto butanólico (GI <sub>50</sub> µg/mL)	
	Fr. 21-22
<b>HeLa (carcinoma cervical)</b>	22,1 ± 3,1
<b>NCI-H460 (carcinoma pulmonar)</b>	25,6 ± 0,9
<b>HepG2 (carcinoma hepatocelular)</b>	62,9 ± 5,1
<b>MCF-7 (carcinoma de mama)</b>	92,8 ± 1,6
<b>PLP (células hepáticas de cerdo)</b>	160 ± 3

En este caso la mayor actividad se observó para el carcinoma HeLa, muy seguido de NCI-H460, mientras que el peor resultado se observó para MCF-7. Su citotoxicidad fue baja en relación con los demás resultados.

En comparación con los resultados del extracto butanólico, la GI<sub>50</sub> es mayor en el compuesto aislado, con lo cual, esta molécula no es la única responsable de la actividad citotóxica que presenta *K. daigremontiana*, aunque sí participa en ella.

En el artículo que está a la espera de publicación (Ürményi *et al.*, 2016), se puede observar que la actividad anti-HSV del compuesto aislado de *K. daigremontiana* tiene menor actividad que el extracto en su totalidad donde este está presente. En nuestro caso ocurre lo mismo.

## 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En este trabajo se ha llevado a cabo, por un lado, un estudio etnobotánico para la elección de un hongo, *Terana caerulea*, y su caracterización química (preparación de extractos y fracciones de diferentes polaridades) para su posterior evaluación de la actividad citotóxica frente a líneas celulares neoplásicas, y por otro lado, se realizó la caracterización química (valor nutricional/valor energético y composición en azúcares libres, tocoferoles, ácidos orgánicos y ácidos grasos) de tres plantas del género *Kalanchoe* (*K. pinnata*, *K. daigremontiana* y *K. gastonis-bonnierii*) y la determinación de la actividad citotóxica de sus extractos de diferentes polaridades, infusiones y decocciones.

El estudio etnobotánico recopiló un total de 47 usos farmacológicos tradicionales pertenecientes a 25 plantas de 20 familias diferentes y los usos tradicionales de un líquen y dos hongos. Mediante este estudio se escogió el hongo *Terana caerulea*.

El material seco de *T. caerulea* fue extraído por maceración con diferentes disolventes, obteniéndose los diferentes extractos de hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol y acuoso, siendo el de mayor rendimiento el extracto butanólico (5,4 %).

En la evaluación de la citotoxicidad, el extracto de AcOEt fue el que presentó los valores más bajos de GI<sub>50</sub> frente a las cuatro líneas celulares tumorales evaluadas, siendo más activo frente al carcinoma de mama (MCF-7).

A partir de este extracto, se aisló e identificó un compuesto nuevo, no descrito anteriormente, derivado del ácido telefórico con tres de los seis grupos hidroxilos metilados, 5',8,8'-trimetoxi-2,9':2',9'-diepoxi-9,7'-ciclo-7,9'-neoligna-7(9'),8,7'-trieno-4,4',5-triol. Este presentó actividad citotóxica, pero en menor medida que los resultados del extracto total de AcOEt, con lo que se podría decir que no es el compuesto más citotóxico de *T. caerulea* o que en ese extracto existen sinergias entre diferentes compuestos para lograr una potencia que se pierde en el aislamiento.

El material seco de las tres *Kalanchoes* fue tratado de la misma manera que *T. caerulea*, para obtener extractos de diferentes polaridades, siendo la decocción final el de mayor rendimiento para *K. daigremontiana* (28,9 %), y el extracto butanólico para *K. pinnata* y *K. gastonis-bonnierii* (42,3 y 18,3 % respectivamente).

El valor nutricional (proteínas, lípidos, glúcidos y cenizas), de las plantas secas reveló una composición elevada en carbohidratos, baja en lípidos y valores energéticos bastante similares.

En cuanto a la composición total de azúcares y tocoferoles, *K. pinnata* demostró una composición total de todos ellos mayor que las otras dos plantas, siendo sus compuestos mayoritarios de dichos grupos fructosa y  $\gamma$ -tocoferol respectivamente. La composición de ácidos orgánicos varió mucho según la planta, siendo *K. gastonis-bonnierii* la planta que mayor número de ácidos orgánicos presentó.

Las tres plantas mostraron un perfil de ácidos grasos SFA>PUFA>MUFA, siendo en todos los casos mayoritarios los ácidos grasos saturados, *K. daigremontiana* 63,86 %, *K. pinnata* 59,28 % y *K. gastonis-bonnierii* 65,68 %.

En la evaluación de la actividad citotóxica de los extractos de las Kalanchoes, destaca que las tres plantas presentaron actividad citotóxica, habiéndose obtenido los mejores resultados para el extracto de BuOH de *K. daigremontiana* que presentó actividad citotóxica frente a las cuatro líneas celulares tumorales y siendo más activo frente al carcinoma de mama (MCF-7).

Respecto a los resultados de la citotoxicidad de las infusiones y decocciones de las tres plantas, los mejores resultados se obtuvieron para la decocción de *K. daigremontiana*, que mostró actividad frente a las cuatro líneas celulares, obteniendo el mejor resultado para el carcinoma de mama (MCF-7).

Debido a los resultados obtenidos en la evaluación de la citotoxicidad, el extracto BuOH de *K. daigremontiana* se fraccionó para aislar e identificar los compuestos responsables de la actividad. En este caso se aisló e identificó el compuesto 3-O- $\beta$ -D-xilopiranosil(1 $\rightarrow$ 2) $\alpha$ -L-ramnopiranosido de kaempferol, flavonoide no responsable de toda la bioactividad detectada en el extracto butanólico de *K. daigremontiana* y descrito recientemente en esta planta.

En comparación del hongo *T. caerulea* y las plantas del género *Kalanchoe*, se puede observar que los resultados obtenidos en la actividad citotóxica generalmente son mejores para el hongo que para las plantas. Respecto a su composición química, también se puede observar una gran diferencia, ya que el hongo *T. caerulea* se alimenta de madera muerta, presentando en su composición varios compuestos derivados del lignano,

mientras que en las plantas del género *Kalanchoe* predominan los compuestos flavonoides.

Como futuro trabajo sería interesante intentar aislar los compuestos responsables de la actividad citotóxica de *T. caerulea* y *K. daigremontiana*, (si mantienen su actividad aislados) ya que los resultados obtenidos son prometedores. También sería muy interesante evaluar la actividad citotóxica de este hongo y planta en animales, por sus buenos resultados en células y para intentar desvelar sus mecanismos de acción para su futuro uso en medicina.

De manera general, se puede concluir que las cuatro matrices naturales estudiadas, *Kalanchoe pinnata*, *K. daigremontiana*, *K. gastonis-bonneri* y *Terana caerulea* poseen en su composición compuestos químicos de gran interés. Este trabajo contribuye al conocimiento de estas especies en cuanto a composición química y también en cuanto a su bioactividad, pudiendo ampliar a su vez su uso a nivel medicinal (tradicional y farmacéutico) y en la alimentación como ingredientes funcionales con beneficios para la salud en la prevención de enfermedades.

## REFERENCIAS

- Abreu, R. M. V, Ferreira, I. C. F. R., Calhelha, R. C., & Lima, R. T. (2011). Anti-hepatocellular carcinoma activity using human HepG2 cells and carboxylate derivatives : in vitro evaluation , cell cycle analysis and QSAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46: 5800–5806.
- Afzal M., Gupta G., Kazmi I., Rahman M., Afzal O., Alam J., Hakeem K. R., Pravez M., Gupta R. & Anwar F. (2012). Antiinflammatory and analgesic potential of a novel steroidal derivative from *Bryophyllum pinnatum*. *Fitoterapia* 83: 853 – 858.
- Akerreta S., Cavero R. Y. & Calvo M. I. (2007). First comprehensive contribution to medical ethnobotany of Western Pyrenees. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3: 26.
- Alabi D. A., Onibudol M. Z. & Amusa N. A. (2005). Chemicals and Nutritional Composition of Four Botanicals with Fungitoxic Properties. *World Journal of Agricultural Sciences*, 1: 84-88.
- Almeida A. P., Da Silva S. A. G., Souza M. L. M., Lima L. M. T. R., Rossi-Bergmann B., Goncalves de Moraes V. L. & Costa S. S. (2000). Isolation and Chemical Analysis of a Fatty Acid Fraction of *Kalanchoe pinnata* with a Potent Lymphocyte Suppressive Activity. *Planta Medica*, 66: 134-137.
- Andlauer, W. & Fürst, P. (2002). Nutraceuticals: A piece of history, present status and outlook. *Food Research International*, 35: 171–176.
- Anisimov M. M, Gerasimenko N. I, Chaikina E. L & Serebryakov Y. M. (2009). Biological activity of metabolites of the herb *Kalanchoe diargremontania* (Hamet de la Bathie) Jacobs et Perrie. *Biology Bulletin*, 36: 568-574.
- AOAC International. (1995). *AOAC: Official Methods of Analysis*.
- Barrera A. (2001). *Cuadernos de Divulgación* N° 5. La etnobotánica: 3 puntos de vista y una perspectiva. (6ª reimpressão). Montecillo, Estado de México, México. 3-15.
- Barros, I.M.C. (2008). *Contribuição ao Estudo Químico e Biológico de Hancornia spiciosa Gomes*. (Apocynaceae). 194p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde- Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília.
- Barros, L., Carvalho, A. M., Morais, J. S., & Ferreira, I. C. F. R. (2010). Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry*, 120: 247–254.
- Barros, L., Heleno, S. a., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2010). Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: Vitamins and phenolics. *LWT - Food Science and Technology*, 43: 544–550.
- Bauer A.W., Kirby W. M. M., Sherris J. C. & Turck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45: 493-496.

- Baute R., Baute M. A., Deffleux G. & Filleau M. J. (1976). Cortalcerone, a new antibiotic induced by external agents in *Corticium caeruleum*. *Phytochemistry*, 15: 1753-1755.
- Baute M. A., Baute R., Deffleux G. & Filleau M. J. (1977). Conversion of glucose to cortalcerone via glucosone by *Corticium caeruleum*. *Phytochemistry*, 16: 1895-1897.
- Bergmann B. R., Costa S. S., Borges M. B. S., Silva S. A., Noletto G. R., Souza M. L. M. & Moraes V. L. G. (2006). Immunosuppressive effect of the aqueous extract of *Kalanchoe pinnata* in mice. *Phytotherapy Research*, 8: 399-402.
- Bianchini M. R. & Eyherabide G. A. (1998). Técnicas de mineralización para la determinación de macronutrientes en muestras de raíz de zanahoria (*Daucus carota* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata* 103: 191-195.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009). Consultado en febrero en <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Siemprevi+o+tronador&id=7493>.
- Burton, G. W. & Traber, M. G. (1990). Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annual Review of Nutrition*, 10: 357-382.
- Calvo M. I., Akerreta S. & Cavero R. Y. (2011). Pharmaceutical ethnobotany in the Riverside of Navarra (Iberian Peninsula). *Journal of Ethnopharmacology*, 135: 22-33.
- Calvo M. I., Akerreta S. & Cavero R. Y. (2013). The pharmacological validation of medicinal plants used for digestive problems in Navarra, Spain. *European Journal of Integrative Medicine*, 5: 537-546.
- Calvo M. I. & Cavero R. Y. (2014). Medicinal plants used for cardiovascular diseases in Navarra and their validation from Official sources. *Journal of Ethnopharmacology*, 157: 268-273.
- Calvo M. I. & Cavero R. Y. (2015). Medicinal plants used for neurological and mental disorders in Navarra and their validation from official sources. *Journal of Ethnopharmacology*, 169: 263-268.
- Carocho, M. & Ferreira, I. C. F. R. (2013). The role of phenolic compounds in the fight against cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 13: 1236-1258.
- Castillo García, E., & Martínez Solís, I. (2007). *Manual de Fitoterapia*. Elsevier Masson.
- Castro Gonzales M. I. (2002). Acidos grasos omega-3: beneficios y fuentes. *Interciencia*, 27:128-136.
- Castroviejo, S. 1997. *Crassulaceae* L. in Castroviejo, S., Aedo, C., Laínz, M., Morales, R., Muñoz Garmendia, F., Nieto Feliner, G. & Paiva, J. (eds.). *Flora iberica* 5: 97-98. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.

- Cavero R. Y., Akerreta S. & Calvo M. I. (2011a). Pharmaceutical ethnobotany in Northern Navarra (Iberian Peninsula). *Journal of Ethnopharmacology*, 133: 138-146.
- Cavero R. Y., Akerreta S. & Calvo M. I. (2011b). Pharmaceutical ethnobotany in the Middle Navarra (Iberian Peninsula). *Journal of Ethnopharmacology*, 137: 844-855.
- Cavero R. Y., Akerreta S. & Calvo M. I. (2013). Medicinal plants used for dermatological affections in Navarra and their pharmacological validation. *Journal of Ethnopharmacology*, 149: 533–542.
- Cavero R. Y. & Calvo M. I. (2014). Medicinal plants used for respiratory affections in Navarra and their pharmacological validation. *Journal of Ethnopharmacology*, 158: 216–220.
- Cavero R. Y. & Calvo M. I. (2015). Medicinal plants used for musculoskeletal disorders in Navarra and their pharmacological validation. *Journal of Ethnopharmacology*, 168: 255–259.
- Conservatoire et Jardin botaniques & South African National Biodiversity Institute (CJB). (2012). Consultado en marzo de 2016 en <http://www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/details.php?langue=an&id=205300>  
<http://www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/details.php?langue=an&id=55086>  
<http://www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/details.php?langue=an&id=140257>
- Costa S. S., Correa M. F. & Casanova L. M. (2015). A new triglycosyl flavonoid isolated from leaf juice of *Kalanchoe gastonis-bonnieri* (Crassulaceae). *Natural Product Communications*, 10: 433-436.
- Cruz E. A., Da-Silva S. A. G., Muzitano M. F., Silva P. M. R., Costa S. S. & Rossi-Bergmann B. (2008). Immunomodulatory pretreatment with *Kalanchoe pinnata* extract and its quercitrin flavonoid effectively protects mice against fatal anaphylactic shock. *International Immuno pharmacology*, 8: 1616 –1621.
- David M., Hamann C., Chen F., Bruch L. & Lichtenegger L. (2000). Comparison of the relaxation effect *in vitro* of nitroglycerin vs. fenoterol on human myometrial strips. *Journal of Perinatal Medicine*, 28: 232-42.
- DellaPenna D. (2005). A decade of progress in understanding vitamin E synthesis in plants. *Journal of Plant Physiology*, 162: 729–37.
- Devbhuti D., Gupta J. K., Devbhuti P. & Bose A. (2008). Phytochemical and Acute Toxicity Study on *Bryophyllum calycinum* SALISB. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 65: 501-504.
- Devbhuti D., Gupta J. K. & Devbhuti P. (2012). Studies on Antitumor Activity of *Bryophyllum calycinum* Salisb. against Ehrlich Ascites. *Journal of PharmaSciTech*, 2: 31-33.
- El Abdellaou S., Destandau E., Toribio A., Elfakir C., Lafosse M., Renimel I., André P., Cancellieri P. & Landemarre L. (2010). Bioactive molecules in *Kalanchoe pinnata* leaves: extraction, purification, and identification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398: 1329–1338.

- Fernández C. & Amezcúa C. (2007). *Plantas medicinales y útiles en la Península Ibérica. 2.400 especies y 37.500 aplicaciones*. Herbario JAEN (España).
- Flora of North America (FNA), Global Plants STOR, ITHAKA (2009). Consultado en octubre de 2016 en <http://plants.jstor.org/stable/10.5555/al.ap.flora.fna008000320?searchUri=qtype%3Dall%26amp%3Bquery%3DKalanchoe%2Bgastonis-bonnier>
- Fonseca-Kruel V. S. & Peixoto A. L. (2004). Etnobotânica na Reserva Extrativista Marinha de Arraial do Cabo, RJ, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 18: 177-190.
- Fungal Biodiversity Center. CBS-KNAW COLLECTIONS. Consultado en abril de 2016 en <http://www.cbs.knaw.nl/Collections/BioloMICS.aspx?TableKey=14682616000000067&Rec=417835&Fields=All>
- Harlalka G. V. & Patil C. R. (2007). Protective effect of *Kalanchoe pinnata* pers. (*Crassulaceae*) on Gentamicine induced nephrotoxicity in rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 39: 201-205.
- Harshberger J. W. (1896). The purpose of ethnobotany. *Botanical Gazette Journal*, 21: 146-154.
- Honda N. H. & Vilegas W. (1998). A química dos líquens. *Química Nova*, 21: 110-125.
- Hossan M. S. & Yemitan O. K. (2009). Neuropharmacological effects of aqueous leaf extract of *Bryophyllum pinnatum* in mice. *African Journal of Biomedical Research*, 9: 101-107.
- Gaind K. & Gupta R. (1972). Alkanes, Alkanols, Triterpenes, and Sterols of *Kalanchoe pinnata*. *Phytochemistry*, 11: 1500-1502.
- Gaind K. & Gupta R. (1974). Identification of waxes from leaves of *Kalachoe pinnata*. *Planta Medica*, 23: 193-197.
- Garcés H. M. P., Champagne C. E. M., Townsley B. T., Park S., Malho R., Pedroso M. C & Sinha N. R. (2007). Evolution of asexual reproduction in leaves of the genus *Kalanchoe*. *Plant Biology*, 104: 1-6.
- García C. C. (2009). *Kalanchoe spp.*: una fuente natural de nuevas sustancias bioactivas puestas de manifiesto por la Etnomedicina. *Encuentros en la Biología*, 124: 31-32.
- Guimarães, R., Barros, L., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2010). Studies on chemical constituents and bioactivity of rosa micrantha: An Alternative antioxidants source for food, pharmaceutical, or cosmetic applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 6277–6284.
- Gobierno de Navarra. Mapa de la Selva de Irati-Orreaga/Roncesvalles. Consultado el 2 de Febrero en [http://www.navarra.es/NR/rdonlyres/CAC9EC5F-5F0F-4271-BCF3-05AE0C42DFA0/326291/MapacompletoRoncesvallesSelvadeIrati\\_web.JPG](http://www.navarra.es/NR/rdonlyres/CAC9EC5F-5F0F-4271-BCF3-05AE0C42DFA0/326291/MapacompletoRoncesvallesSelvadeIrati_web.JPG)
- Gobierno de Navarra. (2008). *Bases técnicas para el plan de gestión del L.I.C. orreaga/roncesvalles-selva de irati (ES0000126)*. Documento I: ANÁLISIS

ECOLÓGICO Y SOCIOECONÓMICO. 4-38. Gestión ambiental viveros y repoblaciones de Navarra, Navarra.

- Gómez-Baggethun, E., Corbera E., & Reyes-García V. (2013). Traditional ecological knowledge and global environmental change: research findings and policy implications. *Ecology and Society* 18: 72.
- Ghorbani A., Naghibi F. & Mosaddegh M. (2006). Ethnobotany, Ethnopharmacology and Drug Discovery. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2: 109-118.
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27:kaur 1–93.
- Jolchine G. (1962). The metabolism of acetic acid in the leaves of *Bryophyllum daigremontianum* Berger. The formation of organic acids by different condensation reactions involving the acety radical in the chloroplasts and in the non-chloroplast cellular fraction. *Bulletin de la Société de chimie biologique*, (Paris), 44: 337-64.
- Jones D. L. (2008). Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant and Soil*, 205: 25–44.
- Junta General del Valle de Salazar, Zaraitzuko batzordea. Consultado en febrero de 2016 en, <http://www.valledesalazar.com/>
- Kamal-Eldin, A., & Appelqvist, L. A. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31: 671–701.
- Kamrun N., Mohammad G. U. K., Mohammad S. R., Bilkis B. & Mohammad A. R. (2008). Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Bryophyllum daigremontianum*. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences* 7: 99-101.
- Kaur, N., Chugh, V., & Gupta, A. K. (2012). Essential fatty acids as functional components of foods- a review. *Journal of Food Science and Technology*, 51(October), 1–15.
- Kruk J., Pisarski A. & Szymanska R. (2011). Novel vitamin E forms in leaves of *Kalanchoe daigremontiana* and *Phaseolus coccineus*. *Journal of Plant Physiology*, 168: 2021-2027.
- Kulka R. G. (2006). Cytokinin inhibit epiphyllous plantlet development on leaves of *Bryophyllum marnierianum*. *Experimental Botany Journal*, 17: 122–125.
- Kuo P. C., Kuo T. H., Su C. R., Liou M. J. & Wu T. S. (2008). Cytotoxic principled and  $\alpha$ -pyrone ringopening derivatives of bufadienolides from *Kalanchoe hybrida*. *Tetrahedron*, 64: 3392-3396.
- Lee J., Hong J. H., Kim J. D., Ahn B. J., Kim B. S., Kim G. H. & Kim J. J. (2013). The antioxidant properties of solid-culture extracts of basidiomycetous fungi. *Journal of General and Applied Microbiology*, 59: 279-285.
- Legramandi V. H. P. (2011). *Kalanchoe gastonis-bonnieri* Raym.-Hamet & H. Perrier e *Kalanchoe pinnata* pers. (Crassulaceae): atividade antifúngica e estudo farmacognóstico comparativo. Tesis para obtener el máster en ciencias farmacéuticas. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Brasil.

- LLIFLE, Encyclopodeias of living forms. (2005). Consultado en marzo de 2016 en [http://www.llifle.com/Encyclopedia/SUCCULENTS/Family/Crassulaceae/14430/Kalanchoe\\_daigremontiana](http://www.llifle.com/Encyclopedia/SUCCULENTS/Family/Crassulaceae/14430/Kalanchoe_daigremontiana)
- López-Bucio, J., Nieto-Jacobo, M. F., Ramírez-Rodríguez, V., & Herrera-Estrella, L. (2000). Organic acid metabolism in plants: From adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Science*, 160: 1–13.
- MAGRAMA, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. (2006). Gobierno de España. *Los Valles Pirenaicos. Geografía humana*. Consultado en [http://www.magrama.gob.es/es/biodiversidad/publicaciones/20\\_pirineo\\_navarro\\_02\\_02\\_tcm7-45720.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/biodiversidad/publicaciones/20_pirineo_navarro_02_02_tcm7-45720.pdf)
- Maire R. 1976. *Flore de L'Afrique du nord*. Volumen XIV, 251-268. Editions Lechevalier S. A. R. L., Paris.
- Majaz Q. A., Tatiya A. U., Khurshid M. & Nazim S. (2011). The miracle plant (*Kalanchoe pinnata*): A photochemical and pharmacological review. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 2: 1478-1482.
- Marriage P. B. & Wilson D. G. (1971). Analysis of Organic acids of *Bryophyllum pinnatum*. *Can. Journal Biochemistry*, 49: 282-295.
- Matthew S., Khosla K. K., Matthew C. & Bhowmik D. (2013). Preliminary Phytochemical Studies Of *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 1: 19-23.
- McKenzie R. A., Franke F. P. & Dunster P. J. (1987). The toxicity to Cattle and Bufadienolide content of six *Bryophyllum* species. *Australian Veterinary Journal*, 64: 298-301.
- McMurry, J. (2001). *Química Orgánica* (5ª ed.). International Thomson Editores.
- Menéndez Valderrey J. L. (2007). *Terana caerulea* (Lam.) Kuntze. *Asturnatura.com*, número 112, consultado en junio del 2016 en <http://www.asturnatura.com/especie/terana-caerulea.html>
- Milad R., El-Ahmady S. & Singab A. N. (2014). Genus *Kalanchoe* (*Crassulaceae*): A review of Its ethnomedicinal, botanical, chemical and pharmacological properties. *European Journal of Medicinal Plants*, 4: 86-104.
- Miranda-Beltrán M. L., Puebla-Pérez A. M., Guzmán-Sánchez A. & Huacuja Ruiz L. (2003). Male Rat Infertility Induction/Spermatozoa and Epididymal Plasma Abnormalities After Oral Administration of *Kalanchoe gastonis-bonnieri* Natural Juice. *Phytotherapy Research*, 17: 315-319.
- Moreno G. & Manjón J. M. (2010). *Guía de hongos de la Península Ibérica*. Ediciones Omega. Barcelona, España.
- Mukul. (2009). Find me a cure, alternative medicine. Consultado en febrero de 2016 en <http://findmeacure.com/2009/03/25/kalanchoe-pinnata/>
- Muzitano M. F., Cruz E. A., Almeida A. P., Silva S. A. G., Kaiser C. R., Guette C., Rossi-Bergmann B & Costa S. S. (2006). Quercitrin: an antileishmanial flavonoid glycoside from *Kalanchoe pinnata*. *Planta Médica*, 72: 81-83.

- Muzinato M. F., Tinoco L. W., Guette C., Kaiser C. R., Rossi-Bergmann B. & Costa S. S. (2006). The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. *Phytochemistry*, 67: 2071-2077.
- Muzitano M. F., Falco C. A. B., Cruz E. A., Bergonzi M. C., Bilia A. R., Vincieri F. F. & Costa S. S. (2009). Oral metabolism and efficacy of *Kalanchoe pinnata* flavonoids in a murine model cutaneous leishmaniasis. *Planta Médica*, 75: 307-311.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2000). *Lehninger Principios de Bioquímica*. Ediciones Omega.
- Neveu A., Baute R., Bourgeois G. & Deffieux G. (1974). Recherches sur le pigment bleu du champignon *Corticium caeruleum* (Schrad. ex Fr.) Fr. (Aphyllophorales). *Bulletin de la Societe de pharmacie de Bordeaux*, 113: 77-85.
- Nguelefack T. B., Nana P., Atsamo A. D., Dimo T., Watcho P., Dongmo A. B., Tapondjou L. A., Njamen D., Wansi S. L. & Kamanyi A. (2006). Analgesic and anticonvulsant effects of extracts from the leaves of *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haworth (*Crassulaceae*). *Journal of Ethnopharmacology*, 106: 70-75.
- Nielsen A. H., Olsen C. E. & Moller B. L. (2005). Flavonoids in flowers of 16 *Kalanchoe blossfeldiana* varieties. *Phytochemistry*, 66: 2829-2835.
- Ofokansi K. C., Esimone C. O. & Anele C. K. (2005). Evaluation of the *in vitro* combined antibacterial effect of the leaf extracts of *Bryophyllum pinnatum* (Fam: *Crassulaceae*) and *Ocimum gratissimum* (Fam: *Labiatae*). *Plant Product Research Journal*, 9: 23-27.
- Ojewole J. A. O. (2002). Antihypertensive properties of *Bryophyllum pinnatum* (Lam) Oken leaf extracts. *American Journal of Hypertension*, 15: 34A-34A.
- Ojewole J. A. O. (2005). Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic effects of *Bryophyllum pinnatum* (*Crassulaceae*) leaf aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 99: 13-19.
- Okwu D. E. & Josiah C. (2006). Evaluation of the chemical composition of two Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 5: 357-361.
- Okwu D. E. & Nnamdi F. U. (2011). Two novel flavonoids from *Bryophyllum pinnatum* and their antimicrobial Activity. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 3: 1-10.
- Ozolua R. I., Idogun S. E. & Tafamel G. E. (2010). Acute and Sub-Acute Toxicological Assessment of Aqueous Leaf Extract of *Bryophyllum Pinnatum* (Lam.) in Sprague-Dawley Rats. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, 5: 145-151.
- Nayak B. S., Marshall J. R. & Isitor G. (2010). Wound healing potential of ethanolic extract of *Kalanchoe pinnata* Lam. leaf-A preliminary study. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48: 572-576.
- Newsome A. G., Culver C. A. & Breemen R. B. (2014). Nature's Palette: the search for natural blue colorants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62: 6498-6511.

- Pal S., Sen T. & Nag Chaudhari A. K. (1999). Neuropsychopharmacological profile of the methanolic fraction of *Bryophyllum Pinnatum* leaf extract. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51: 313-318.
- Pardo de Santayana, M. & Gómez Pellón E. (2003). Etnobotánica: aprovechamiento tradicional de plantas y patrimonio cultural. *Anales Jardin Botánico*, Madrid 60:171-182.
- Pardo de Santayana M., Morales R., Aceituno-Mata L. & Molina M. (editores). (2014). *Inventario español de los conocimientos tradicionales relativos a la biodiversidad*. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Madrid. 411: 15-28.
- Pereira, C., Barros, L., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Use of UFLC-PDA for the analysis of organic acids in thirty-five species of food and medicinal plants. *Food Analytical Methods*, 6: 1337–1344.
- Pharmawords, información científica sobre prevención de enfermedades, medicina alternativa y complementaria (MAC) y nuevas terapéuticas. *Algunas especies de Kalanchoe podrían ayudar en la lucha contra el cáncer*. (2010). Consultado en marzo de 2016 en <http://pharmawords.blogspot.com.es/2010/10/algunas-especies-de-kalanchoes-podrian.html>
- Pattewar S. (2012). *Kalanchoe Pinnata*: Phytochemical and Pharmacological Profile. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3: 993-1000.
- Patil R., Bhargava K., Ptel P., Singh K. & Surana J. (2008). Diuretic and anti urolthiatic activity of hydroalcoholic extracts of leaves of *Kalanchoe pinnata* pers. *Journal of Pharmaceutical Research*, 7: 87-91.
- Prasad A. K., Kumar S., Iyer S. V., Sudani R. J. & Vaidya S. K. (2012). Pharmacognostical, phytochemical and pharmacological review on *Bryophyllum pinnata*. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 3: 423-433.
- Prasad S., Kashyap R. S., Deopujari J. Y., Purohit H. J., Taori G. M. & Daginawala H. F. (2006). Development of an *in vitro* model to study clot lysis activity of thrombolytic drugs. *Thrombosis Journal*, 4: 14.
- Ram P. R. & Mehrotra B. N. (2004). *Compendium of Indian Medicinal Plants*. Vol. 5. New Dehli.
- Rashid M. A. , Sharker S. M., Hossain Md. K., Haque M. R., Hamidul Kabir A. N. M. & Hasan M. C. (2013). Phytochemical and Pharmacological Studies of *Bryophyllum daigremontianum* (Raym.). *American Journal of PharmTech Research*, 3: 484-492.
- Rastogi R. P. & Mehrotra B. N. (1990-1994). *Compendium of Indian Medicinal Plants*, 5: 141-143.
- Rossi-Bergmann R. B., Costa S. S., Borges M. B. S., Da Silva S. A., Noletto G. R., Souza M. L. & Moraes V. L. G. (1994). Immunosuppressive effect of the aqueous extract of *Kalanchoe Pinnata* in mice. *Phytotherapia* 8: 399-402.

- Sánchez de Lorenzo J. M. (2015). Epónimos del género *Kalanchoe Adanson* (*Crassulaceae*). *Bouteloua*, 23: 43-50.
- Seabra, R. M., Andrade, P. B., Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F. & Bastos, M. L. (2006). Anti-oxidant compounds extracted from several plant materials. *Biomaterials from aquatic and terrestrial organisms*, 115-174.
- Shahidi F., Chavan U. D., Bal A.K. & McKenzie D. B. (1999). Chemical composition of beach pea (*Lathyrus maritimus*L). plant parts. *Food Chemistry*, 64: 39-44.
- Siddhartha P. & Nag Chaudhuri A. K. (1991). Studies on the antiulcer activity of a *Bryophyllum pinnatum* leaf extract in experimental animals. *Journal of Ethanopharmacology*, 33: 97-102.
- Siddiqui S., Faizi S., Siddiqui B. S. & Sultana N. (1989). Triterpenoids and phenanthrenes from leaves of *Briophyllum pinnatum*. *Phytochemistry* 28: 2433-2438.
- Sikder M. A., Siddique A. B., Hossian A. K. M. N., Miah M. K., Kaisar M. A. & Rashid M. A. (2011). Evaluation of thrombolytic activity of four Bangladeshi medicinal plants, as a possible renewable source for thrombolytic compounds. *Journal of Pharmacy and Nutrition Science*, 1: 4-8.
- Singab A. B., El-Ahamdy S. H., Labib R. M. & Freky S. S. (2011). Phenolics from *Kalanchoe marmorata* Baker, family *Crassulaceae*. *Bulletin of Faculty of Pharmacy*, Cairo University, 49: 1-5.
- Štroffeková O., Planková A., Jánošová V., Sýkorová M. & Havránek E. (2008). Determination of Fe, Zn, Pb, Cd and Se content in medical plants by x-ray fluorescence analysis and galvanostatic stripping chronopotentiometric analysis. *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae* 55: 219-229.
- Supratman U., Fujita T., Akiyama K., Hayashi H., Murakami A., Sakai H., Koshimizu K., & Ohigashi H. (2001). Anti-tumor Promoting Activity of Bufadienolides from *Kalanchoe pinnata* and *K. daigremontiana x tubiflora*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 65: 947-949.
- Szymanska R. & Kruk J. (2008). Tocopherol content and isomers composition in selected plant species. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46: 29-33.
- The Encyclopedia of Life. (2009). Información taxonómica sobre *Kalanchoe daigremontiana*. Consultado en marzo del 2016 en <http://eol.org/pages/487234/overview>
- Tortora G. J. & Grabowski S. R. (2003). *Principios de anatomía y fisiología*. Oxford.
- Traber, M. G. (2007). Vitamin E regulatory mechanisms. *Annual Review of Nutrition*, 27: 347-362.
- Ueda J-Y., Tezuka Y., Banskota A. H., Tran Q. L., Tran Q. K., Harimaya Y., Saiki I. & Kadota S. (2002). Antiproliferative Activity of Vietnamese Medicinal Plants. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25: 753-760.
- Ürményi F. G. G., Saraiva G. N., Casanova L. M., Matos A. S., Camargo L. M. M., Romanos M. T. V. & Costa S. S. (2016). Anti-HSV-1 and HSV-2 flavonoids and

a new kaempferol triglycoside from the medicinal plant *Kalanchoe daigremontiana*. (Ha espera de publicación).

Velisek J. & Cejpek K. (2011). Pigments of Higher Fungi: a review. *Czech Journal of Food Sciences*, 2: 87-102.

Web oficial del Valle de Aezkoa. Consultado en febrero del 2016 en <http://www.aezkoa.net/>

Weisgraber K. & Weiss U. (1972). Hexamethyl ether of lueco-thelephoric acid from *Corticium caeruleum*. *Phytochemistry*, 11: 2585-2587.

WHO. (2015). N° 394. Alimentación sana. Consultado en mayo de 2016 en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs394/es/>

WHO. (2015). N° 297. Cáncer. Consultado 20 de Febrero, 2016 en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

Williams M. C. & Smith M. C. (1984). Toxicity of *Kalanchoe spp* to chicks. *American Journal of Veterinary Research*, 45: 543-546.

Yadav N. P. & Dixit V. K. (2003). Hepatoprotective activity of leaves of *Kalanchoe pinnata* Pers. *Journal of Ethnopharmacology*, 86: 197-202.

Yamagishi T., Haruna M., Yan X. Z., Chang J. J. & Lee K. H. (1989). Antitumor agents, Bryophyllin B, A Novel Potent cytotoxic Bufadienolide from *Bryophyllum Pinnatum*. *Journal of Natural Products* 52: 1071-1079.