



Fraccionamiento y aislamiento de bioactivos con potencial citotóxico
en células tumorales de flores y hojas de *Castanea sativa* Miller

Beñat Otsoa Eribeko Uriarte

*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:

Pablo Anselmo García García

Isabel C.F.R. Ferreira

Bragança – Salamanca

2016

Agradecimientos

Este Trabajo de fin de máster hubiese sido imposible sin la aportación y apoyo de muchas personas, a las que me complace mostrar mi más sincero agradecimiento por toda la ayuda que me han prestado.

A mis tutores, el Doctor Pablo A. García del Departamento de Química Farmacéutica de la Universidad de Salamanca (USAL) de España y la Doctora Isabel C.F.R. Ferreira del Laboratorio de Química y Bioquímica Aplicada del Instituto Politécnico de Bragança (IPB) de Portugal. Por su implicación tanto desde la misma hora de realizar la matrícula del master como para realizar el papeleo de las convalidaciones y facilitándome al extremo la realización del master. También por todo el trabajo realizado para llevar a cabo este proyecto; siempre han estado pendientes del progreso del proyecto. En especial el Dr. Pablo, por todo tiempo que he pasado detrás suyo con las preguntas sobre espectros y fraccionamientos.

Al Doctor Ricardo C. Calhella del Laboratorio de Química y Bioquímica Aplicada del Instituto Politécnico de Bragança (IPB) de Portugal, por su ayuda indispensable para la evaluación de la actividad citotóxica, por instruirme con tanta paciencia y disponibilidad en los métodos de ensayo, y por su disposición para responder todo tipo de dudas.

Al doctor Julio López del Cietus USAL y a Sergio Parejo por la realización de los ensayos para la evaluación de la actividad antihelmíntica de los extractos.

A mis compañeras de máster. Todas me han facilitado tanto la realización de este master como el proyecto. Facilitándome alojamiento en algunas de mis cortas estancias en Bragança o Salamanca y sobre todo por su apoyo y ayuda. Ha sido un placer integrarme en este grupo aunque empezase en el segundo año. Pero en especial a Maitane Maisterra, por la paciencia que ha tenido en el laboratorio para enseñarme a desenvolverme con cierta soltura. Y a Ángela Patricia Hernández García por enseñarme tantos trucos para facilitar la labor del laboratorio.

A todo el profesorado de este master, de la Escuela Superior Agraria de Bragança (IPB) y de la Facultad de Farmacia (USAL), por su implicación en la enseñanza y por todo lo que he aprendido. Aunque solo haya realizado un año de master, y por ello no haya tenido el placer de conocer a todas las personas que lo integran; pero sin ellas este master no sería posible.

A mi cuadrilla, que siempre está dispuesta a hacer algún viaje con la excusa de hacerme una visita y por interesarse por mi proyecto, aunque cuando les explicaba algo no entendiesen casi nada. Y por todo el apoyo que me han dado desde la distancia en mis viajes y desde la cercanía cuando estaba en casa. Y por todos los buenos momentos que me han regalado durante este tiempo.

Y para finalizar, a mi familia, que ha sido tan importante en esta etapa. Sobre todo, mi aita y ama, Agustín y Arantza, y a mi hermana, Garazi, porque siempre han estado pendientes de mis idas y venidas, y siempre, siempre, han estado ahí cuando los he necesitado. También a aita y amama, Luisa y Valentín, Cecilia y Emilio, que no entendían nada de lo que les explicaba, pero siempre se interesaban por mis progresos y se preocupaban cuando estaba fuera.

Por eso me encantaría dedicarles a todas estas personas este trabajo que, sin su apoyo, hubiese sido imposible de realizar.

Mila esker denoi!!!!

¡Muchas gracias a todas y a todos!

Tabla de contenido

1	Lista de símbolos, siglas y abreviaturas.....	iii
2	Índice de figuras	viii
3	Índice de tablas	ix
4	Resumen	xi
5	Abstract	xii
6	Motivación	1
6.1	Interés.....	1
6.2	Descripción botánica.....	1
6.3	Usos tradicionales y propiedades.....	2
6.4	Bioactividad de las flores y las hojas de la <i>Castanea sativa</i> Miller	4
6.4.1	<i>Infusiones y decocciones de flores de Castanea sativa Miller, como matrices con efecto antitumoral y antimicrobiano (Carocho et al., 2014)</i>	4
6.4.2	<i>Actividad antioxidante de los extractos de flores, hojas, corteza y frutos (Castanea sativa Miller Longal) (Barreira et al., 2007)</i>	6
7	Composición química de las flores y las hojas	7
8	Objetivos.....	10
9	Materiales y métodos	12
9.1	Muestras	12
9.2	Reactivos.....	12
9.2.1	<i>Extracciones</i>	12
9.2.2	<i>Evaluación del poder antitumoral y la citotoxicidad de los extractos</i>	12
9.2.3	<i>Fraccionamiento de los extractos, mediante VLC con mayor actividad antitumoral</i>	13
9.2.4	<i>Espectroscopia RMN (¹H y ¹³C)</i>	13
9.2.5	<i>Cromatografía de capa fina</i>	13
9.2.6	<i>Fraccionamiento en columna</i>	13
9.3	Material y equipamiento	14
9.4	Extracción	14
9.5	Evaluación de la actividad citotóxica	17
9.5.1	<i>Actividad antiproliferativa en líneas celulares tumorales humanas</i>	18
9.5.2	<i>Evaluación de la hepatotoxicidad de los extractos en células de hígado no tumorales de cerdo</i>	33
9.6	Fraccionamiento de los extractos.....	20
9.7	Evaluación citotóxica de las fracciones	23
9.8	Identificación de los compuestos presentes en las fracciones	23
9.9	Cromatografía en columna.....	23
9.10	Evaluación de la actividad citotóxica de los compuestos aislados	25
10	Resultados y discusión	26
10.1	Rendimientos de la extracción.....	26
10.2	Evaluación de la actividad citotóxica	27
10.3	Fraccionamiento de los extractos.....	29
10.4	Evaluación de la actividad citotóxica de las fracciones.....	30
10.5	Identificación de los compuestos presentes en las fracciones	33
10.6	Cromatografía en columna.....	35
10.7	Identificación de los compuestos presentes en las fracciones	36

10.8	Evaluación de la actividad citotóxica de las fracciones finales	37
11	Conclusiones y perspectivas futuras	38
12	Bibliografía	40

1 Lista de símbolos, siglas y abreviaturas

°C	Grado celsius
¹³ C	Carbono 13
AAPH	Inhibición de la hemólisis oxidativa en eritrocitos
AcOEt	Acetato de etilo
BuOH	Butanol
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CG	Cromatografía de gases
CIMO	Centro de Investigación de Montaña
CL	Cromatografía Líquida
CO ₂	Carbono dióxido
CV	Coefficiente de variación
DCM	Diclorometano
DF	Flores diclorometano
DH	Hojas diclorometano
DJ	Decocción de las flores de <i>C. sativa</i> variedad Judia
DL	Decocción de las flores de <i>C. sativa</i> variedad Longal
DMEM	Medio de cultivo celular Dulbecco's Modified Eagle

DMSO	Dimetil sulfoxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EC ₅₀	Concentración del extracto en la cual el efecto es la mitad del máximo
EDTA	Ácido etilendiaminotetracloroacético
EtOH	Etanol
Ext.	Extracto
g	Gramo
GI ₅₀	Concentración de la muestra en la cual se inhibe el crecimiento neto de las células al 50%
H	Hidrogeno
H ¹⁺	Protón hidrogeno
H ₂ O	Agua
HBSS	Solución salina Hank's
HCT15	Línea celular de cáncer de colon
HeLa	Línea celular de cáncer cervical
HepG2	Línea celular de carcinoma de hígado
Hex.	Hexano
HH	Hojas hexano
HPLC	High-performance liquid chromatography (<i>Cromatografía líquida de alta eficacia</i>)
HRMS	High-resolution mass spectrometry (<i>Espectros de masas de alta resolución</i>)

Hz	Hercio
IJ	Infusión de las flores de <i>C. sativa</i> variedad Judia
IL	Infusión de las flores de <i>C. sativa</i> variedad Longal
J	Constante de acoplamiento
m	Metro
m/z	Relación masa/ carga
MCF7	Línea celular de adenocarcinoma de mama
mg	Miligramo
MHz	Mega hercio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MS	Detector de masas
Na ₂ SO ₄	Sodio sulfato
NaCl	Sodio cloruro
NAPROC13	Natural Products C13 NMR Database
NCI-H460	Línea celular de cáncer de pulmón
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
nm	Nanómetro
OH	Hidroxilo

OMS	Organización Mundial de la Salud
pH	Potencial de hidrógeno
PLP2	Cultivo primario de células (no cancerígenas) de hígado de cerdo
Ppm	Parte por millón
RMN(1H)	Cromatografía magnética nuclear de protón
ROS	Radicales libres de Oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI-1640	Medio de cultivo celular Roswell Park Memorial Institute
sBuOH	Fracción soluble en butanol del extracto EtOH/H ₂ O
SD	standard deviation (<i>Desviación estándar</i>)
SFB	Suero fetal bovino
sH ₂ O	Fracción soluble en agua del extracto EtOH/H ₂ O
SRB	Sulforodamina B
T ^a	Temperatura
TBARS	Thiobarbituric reactive substances (<i>Sustancias reactivas a ácido 2-tiobarbitúrico</i>)
TCA	Ácido tricloroacético
TLC	Cromatografía de capa fina
U	Unidad de masa atómica
V	Voltio
VLC	Vacuum Liquid Chromatography (<i>Cromatografía rápida a vacío</i>)

δ Desplazamiento químico

μL Microlitro

μm Micrómetro

2 Índice de figuras

Figura 1: Imagen de las partes de <i>Castanea sativa</i> , enciclopedia Flora ibérica (Real jardín botánico, 1990)	2
Figura 2: estructuras identificadas en las hojas de <i>Castanea sativa</i>	8-9-10
Figura 3: Cromatógrafo de gases (izq.) y Espectrómetro de resonancia magnética nuclear (dcha.)	14
Figura 4: Extracción por maceración y agitación de las flores (izq.) y hojas (dcha.)	15
Figura 5: Esquema que se siguió para la obtención de los extractos.....	16
Figura 6: Agitador de microplacas (izq.) y lector (dcha.)	19
Figura 7: Fraccionamiento mediante cromatografía VLC.....	21
Figura 8: Cromatografía en columna.....	25

3 Índice de tablas

Tabla 1: Actividad antitumoral de los extractos de las hojas y flores de <i>Castanea sativa</i> Miller (obtenida de Carocho et al., 2014).....	5
Tabla 2: Actividad antioxidante de los extractos de las hojas y flores de <i>Castanea sativa</i> Miller y contenidos de fenoles y flavonoides encontrados en dichos extractos	7
Tabla 3: Rendimientos de cada extracción de las hojas, representada en masa (mg) y porcentaje.....	26
Tabla 4: Rendimientos de cada extracción de las flores, representada en masa (mg) y porcentaje.....	26
Tabla 5: Actividad citotóxica de los extractos de las hojas; valores expresados en GI ₅₀ (µg/mL) (media ± SD)	27
Tabla 6: Actividad citotóxica de los extractos de las flores; valores expresados en GI ₅₀ (µg/mL) (media ± SD)	27
Tabla 7: Peso obtenido en cada fracción (con indicación de los eluyentes utilizados) en el fraccionamiento del extracto en diclorometano (524 mg en total) de las hojas de <i>Castanea sativa</i> Miller	29
Tabla 8: Peso obtenido en cada fracción (con indicación de los eluyentes utilizados) en el fraccionamiento del extracto en diclorometano (286 mg en total) de las flores de <i>Castanea sativa</i> Miller	29
Tabla 9: Peso obtenido en cada fracción (con indicación de los eluyentes utilizados) en el fraccionamiento del extracto en hexano (441 mg en total) de las hojas de <i>Castanea sativa</i> Miller.....	30
Tabla 10: Actividad citotóxica de las fracciones obtenidas a partir del extracto de las hojas en diclorometano; valores expresados en GI ₅₀ (µg/mL) (media ± SD)	32

Tabla 11: Actividad citotóxica de las fracciones obtenidas a partir del extracto de las flores en diclorometano; valores expresados en GI ₅₀ (µg/ml) (media ± SD).....	32
Tabla 12: Actividad citotóxica de las fracciones obtenidas a partir del extracto de las hojas en hexano; valores expresados en GI ₅₀ (µg/ml) (media ± SD).....	32
Tabla 13: Compuestos identificados y fracciones en los que aparecieron	34-35
Tabla 14: Fracciones de HH8 y HH9 (HH8-9) reunidas tras TLC y RMN(H) y el peso de cada una	35
Tabla 15: Fracciones de HD6, HD7 y HD8 (HD6-8) reunidas tras TLC y RMN(H) y el peso de cada una.....	36
Tabla 16: Actividad citotóxica de las fracciones HH8-9 fr8 y HD6-8 fr16-23; valores expresados en GI ₅₀ (µg/mL) (media ± SD).....	37

4 Resumen

Las plantas han sido fuente de curación desde la antigüedad. En la actualidad continua ese interés en la búsqueda de productos naturales que den lugar a nuevos fármacos.

En este trabajo se ha estudiado la citotoxicidad y la composición química de las hojas y flores macho de *Castanea sativa* Miller con el fin de purificar y aislar compuestos citotóxicos y así poder ampliar más los conocimientos sobre estos residuos naturales como posible fuente de curación.

Se obtuvieron distintos extractos progresivos en polaridad: *n*-hexano, diclorometano, Acetato de etilo (AcOEt), en etanol:agua (70:30, v/v) que a su vez fue fraccionado en dos fases inmiscibles (*n*-butanol y agua), y finalmente en agua caliente (decocción). Se evaluó la actividad citotóxica de los extractos mediante el método de la sulforodamina B frente a líneas celulares humanas: MCF7 (adenocarcinoma de pecho), NCI-H460 (carcinoma de pulmón), HeLa (carcinoma cervical) y HepG2 (carcinoma hepatocelular). Para evaluar la toxicidad se utilizaron líneas celulares PLP2 (cultivos primarios de células no tumorales de hígado de cerdo).

Los extractos más activos fueron: diclorometano flores (DF), diclorometano hojas (DH) y hexano hojas (HH). Los extractos HH y DH se fraccionaron mediante la técnica VLC (cromatografía líquida a vacío). Las fracciones obtenidas se volvieron a ensayar frente a las líneas celulares antes mencionadas, y los resultados mostraron que las que mayor actividad tenían fueron: HD6, HD7, HD8, HD9, HH8 y HH9.

Se realizó la caracterización química de estas fracciones con el fin de identificar los compuestos presentes mediante Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y de ^{13}C y Espectrometría de Masas (GC-MS y HRMS), comparando los resultados con bases de datos de espectros y con la bibliografía.

Se identificaron 11 compuestos entre los que destacaban: lupeol (mayoritario en las fracciones HH8 y HH9) y loliolida (en HD6, HD7 y HD8). Se consiguió el aislamiento de ambos compuestos mediante una cromatografía de columna. Se consiguió purificar el Lupeol y la Loliolida. Se evaluó la actividad citotóxica de los dos compuestos concluyendo que estos compuestos no eran los responsables de toda la bioactividad observada, y en caso de serlo, su actividad se vería potenciada por la presencia de otros compuestos presentes en las fracciones.

5 Abstract

Since ancient times that plants have been considered a source of different therapeutic principles. Nowadays the search for natural products that could lead to new drugs, justifies the importance of their structure elucidation and bioactive properties evaluation.

In order to increase the knowledge on natural products and their different uses, in particular on *Castanea sativa* Miller (chestnut), we have studied the cytotoxicity and chemical composition of its leaves and male flowers. The main objective was to isolate and purify the cytotoxic compounds present in these matrices.

The extractions were performed by sequential maceration, using different polarity solvents: hexane, dichloromethane, ethyl acetate and ethanol: water (70:30, v/v); this extract was fractioned in two immiscible phases (*n*-butanol and water); and water (decoction). The evaluation of cytotoxicity was conducted by SRB (sulphorodamine B) assay in human tumor cell lines: MCF-7 (breast carcinoma), NCI-H460 (non-small lung carcinoma), HeLa (cervical carcinoma) and HepG2 (hepatocellular carcinoma) and in primary cultures of porcine liver cells (PLP2).

The most actives extracts were: dichloromethane flowers (DF), dichloromethane leaves (DH) and hexane leaves (HH). The extracts HH and DH were fractioned by VLC (vacuum liquid chromatography) and the fractions obtained were also screened for their cytotoxicity. The results showed that the most active fraction were: HD6, HD7, HD8, HD9, HH8 y HH9.

The chemical characterization was made with different spectral methods: ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance and mass spectrometry (GC-MS and HRMS); the spectral dates were compared with standards, spectral databases and literature, in order to identify the compounds, present in the obtained fractions.

Eleven compounds were identified and two of them were very interesting: Lupheol (mainly in fractions HH8 and HH9) and Loliolide (in HD6, HD7 and HD8). The isolation of both compounds was achieved by column chromatography and the purification was quite efficient. Both compounds were screened for their cytotoxicity and the results showed that they were not responsible for all the observed bioactivity, and if responsible, the bioactivity is enhanced by the presence of other compounds in the fractions.

6 Motivación

6.1 Interés

Portugal es junto con Italia uno de los mayores productores de castañas de Europa, siendo el nordeste de Portugal el responsable del 85% de la producción total. Esto reporta a esta zona montañosa de Portugal millones de euros cada temporada. Dicha producción también genera residuos orgánicos: hojas, flores machos, cortezas (interna y externa). A estos residuos tradicionalmente se les ha dado un uso terapéutico: las infusiones de hojas y flores se utilizaban como mucolítico, antiespasmódico y en tratamientos anti-disentéricos entre otros (Neves *et al.*, 2009). En un estudio reciente se ha demostrado que las decocciones e infusiones de hojas y de las flores macho tienen poder antitumoral (Carocho *et al.*, 2014).

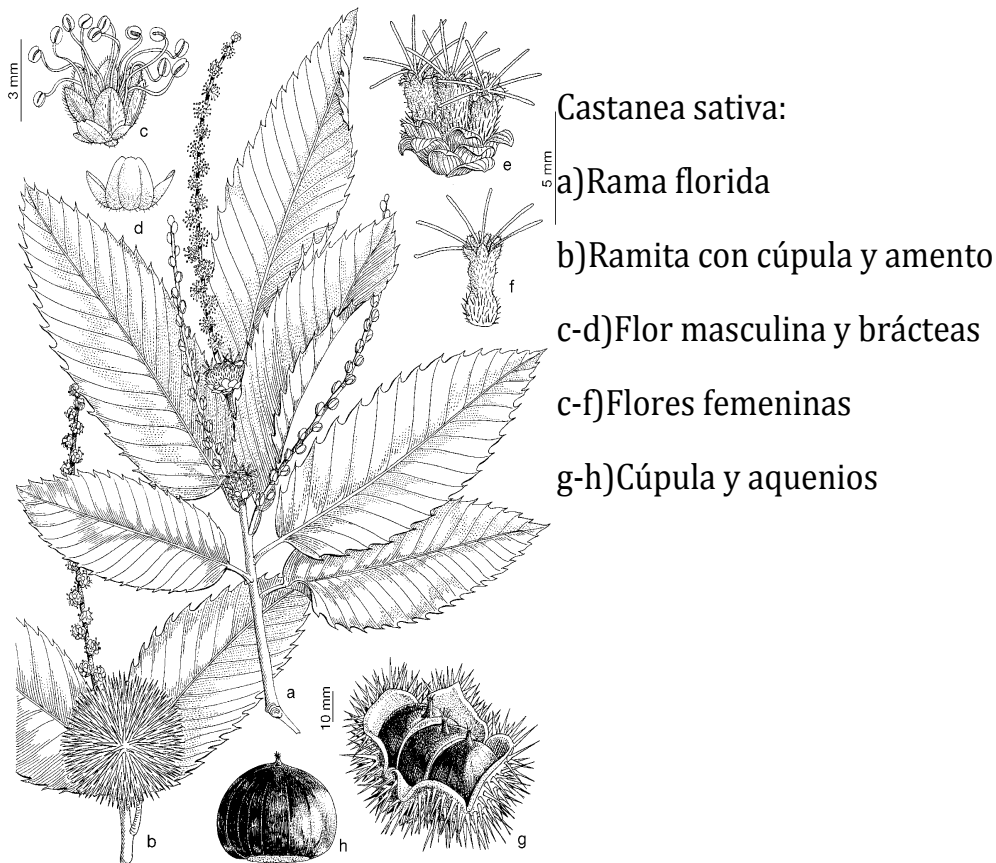
Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es una de las primeras causas de muerte en los países industrializados, cada año mueren 8,2 millones de personas en todo el mundo a causa del cáncer. La tasa de casos ha aumentado un 70% en las últimas dos décadas y existen más de 100 tipos de cáncer. (OMS, 2015)

Por estas razones es interesante fraccionar y aislar todos los principios activos antitumorales de las hojas y flores, para investigar si la citotoxicidad demostrada es gracias a las sinergias generadas entre los distintos bioactivos o por el contrario es uno de ellos el que presenta la citotoxicidad. Las dos variedades de castaño más cultivadas son *Judia* y *Longal*, por ello serán las dos que utilizaré en la investigación.

6.2 Descripción botánica

El nombre científico del castaño es *Castanea sativa* Miller, las variedades que vamos ha estudiar serán la *Longal* y la *Judia*. Según se describe en la enciclopedia Flora ibérica (Real jardín botánico, 1990) el castaño es un árbol caducifolio de hasta 30 m de la familia de las Fagaceae, de tronco muy grueso, hueco en la vejez. Corteza lisa, cenicienta o pardusca hasta los 15-20 años, después castaño-oscura y agrietada longitudinalmente. Ramitas glabras, castaño-rojizas. Como podemos observar en la **figura 1** las hojas son de 10-25 × 5-8 cm, son oblongo-lanceoladas, agudas o acuminadas, anchamente crenado-aserradas o aserradas, con dientes cuspidado-aristados, la base va de subcordadas a subtruncadas, las hojas jóvenes son verde-cenicientas, por el envés; después, verdes y tan sólo escuamulosas. Los amentos son largos y erectos, los inferiores son masculinos (13-30 cm de longitud y 5-7 de diámetro, de

joven son verdes y en la antesis se transforman en amarillos) y los superiores andróginos (10 cm de diámetro, al principio verdes y luego acastañadas, con espinas fasciculadas y largas). Los achenios son de 2,5-4 cm, levemente atenuados y agudos en el ápice, castaños, brillantes. La **figura 1** muestra una imagen donde podemos apreciar las partes más características de *Castanea sativa* Miller



Castanea sativa:

- a) Rama florida
- b) Ramita con cúpula y amento
- c-d) Flor masculina y brácteas
- c-f) Flores femeninas
- g-h) Cúpula y achenios

Figura 1: Imagen de las partes de *Castanea sativa* que se describen en la enciclopedia Flora ibérica (Real jardín botánico, 1990)

6.3 Usos tradicionales y propiedades

Principalmente el aprovechamiento del castaño ha sido alimenticio, ya que las castañas tienen un alto poder nutricional y se pueden consumir de distintas formas: crudas, asadas, en puré o incluso, en épocas de escasez se molían para hacer pan con la harina obtenida. La madera también es codiciada por su dureza y por su resistencia a la alternancia de sol y humedad (incluso endurece con la humedad) (Carvalho, 2005).

Según la página web *Botanical-online* tradicionalmente se han usado las distintas partes del castaño para el tratamiento de distintas patologías por su alto contenido de taninos. Estos le confieren propiedades astringentes, bacteriostáticas, expectorantes, calmantes y antitusivas. Se han usado por vía interna para el tratamiento de diarrea y tos. En cuanto al uso externo, también se ha utilizado para la curación de heridas. Partes utilizadas:

Hojas: Son astringentes, se han usado para el tratamiento de la diarrea y la disentería, pero en menor medida que la corteza, ya que el contenido de taninos es menor (Real jardín botánico, 1990). La aplicación interna de las decocciones e infusiones realizadas con hojas secas se utilizan para el tratamiento de afecciones de sistema respiratorio como la tos, bronquitis y asma, además también se utilizaba para reducir el colesterol y el tratamiento de la gripe (Carvalho, 2005); en cuanto a la aplicación externa se utilizan para el tratamiento de faringitis (mediante gargarismos), heridas y llagas (Botanical-online).

Corteza: Es astringente por el elevado contenido de taninos. Los preparados realizados con la corteza tienen un uso interno para el tratamiento de diarrea y la disentería (Real jardín botánico, 1990).

Fruto: La página Web *vivelanaturaleza* afirma que el consumo de estos frutos está especialmente indicado en personas con artritis y en dietas específicas para hipertensos y enfermos cardíacos. Tradicionalmente también se ha utilizado para tratar el dolor de muelas (Vallejo *et al.*, 2005).

Fruto con erizo (fruto con cúpula y aquenios): La decocción de un número impar de erizos (cúpula con aquenios) se empleaba para lavados que alivian las almorranas (Carvalho, 2005). En el mercado podemos encontrar innumerables productos realizados a partir de la castaña, la mayoría de ellos dirigidos a la alimentación. Hay una amplia gama de productos donde destacan todo tipo de preparaciones a partir de la castaña: Castañas frescas, secas, cocidas, bizcochos y magdalenas de castañas, cerveza, cremas de castañas o harinas de castañas.

6.4 Bioactividad de las flores y las hojas de la *Castanea sativa* Miller

Dada la importancia de la castaña en el nordeste de Portugal, el Centro de Investigación de Montaña (CIMO) situado en Bragança ha realizado varias investigaciones en torno al castaño; muchos de dichos trabajos tenían como fin investigar el valor nutricional de la castaña y la investigación de distintos métodos de conservación. También han realizado investigaciones para demostrar la bioactividad de todas las partes del castaño.

6.4.1 Infusiones y decocciones de flores de *Castanea sativa* Miller, como matrices con efecto antitumoral y antimicrobiano (Carocho *et al.*, 2014)

Para esta investigación se utilizaron flores macho de *Castanea sativa* Miller, exactamente de las variedades *Judia* y *Longal*, ya que son las más cultivadas. Se investigaron la actividad antitumoral y antifúngica de los preparados, pero también se obtuvo la actividad antioxidante y el perfil fenólico, siendo los mayoritarios el trigaloil-HHDP-glucósido y el glucósido de pentagaloilo. Estos compuestos tienen muchos efectos sobre las células tumorales, que muestran mediante los siguientes mecanismos de acción: la inhibición completa del crecimiento, inducción de la apoptosis, la supresión de la secreción de metaloproteinasas de la matriz y la reducción del comportamiento invasivo de tumores.

Las líneas celulares cancerosas utilizadas para el estudio de la actividad antitumoral fueron: MCF7 (adenocarcinoma de mama), NCI-H460 (cáncer pulmon), HeLa (cáncer cervical), HCT15 (cáncer de colon) y HepG2 (carcinoma de hígado). Estas líneas celulares son las más utilizadas para el screening primario de principios activos antitumorales. Para evaluar la hepatotoxicidad de cada principio activo se utilizan líneas celulares PLP2 (cultivos primarios de células no tumorales de hígado de cerdo).

Los resultados obtenidos se expresan GI_{50} (concentración de la muestra en la cual se inhibe el crecimiento neto de las células al 50%). Los resultados obtenidos aparecen en la siguiente tabla:

Tabla 1: Actividad antitumoral de los extractos de las hojas y flores de *Castanea sativa* Miller (obtenida de Carochi et al., 2014).

	IL	IJ	DL	DJ	Ellipticine
	(µg/mL)				
MCF7	292,64 ± 0,81	287,95 ± 6,80	287,95 ± 6,80	293,14 ± 4,15	0,91 ± 0,04
HCT15	292,00 ± 11,79	276,84 ± 17,10	196,54 ± 26,47	259,85 ± 13,79	1,91 ± 0,06
HeLa	>500	>500	>500	>500	1,14 ± 0,21
HepG2	266,01 ± 20,44	311,15 ± 2,99	278,09 ± 7,73	361,14 ± 7,84	3,22 ± 0,67
PLP2	>500	>500	>500	>500	2,06 ± 0,03

Notas: IL=infusión de Longal IJ=infusión Judia DL=decocción Longal DJ=decocción Judia

Los extractos utilizados mostraron una hepatotoxicidad nula en cultivos primarios de células no tumorales de hígado de cerdo (PLP2), demostrando la seguridad del consumo de las flores del castaño. A las concentraciones más elevadas los extractos no mostraron ningún tipo de efecto en los cultivos de cáncer cervical (HeLa). En los cultivos de cáncer de pecho (MCF7) todas las muestras tuvieron el mismo efecto sin ninguna diferencia estadística significativa. En cuanto al carcinoma de colon (HCT15) la decocción de *Longal* (DL) fue la más efectiva. En la línea celular de carcinoma de hígado (HepG2) la actividad de los extractos conseguidos de la variedad *Longal* tuvieron un efecto significativamente mayor a los de la variedad *Judia*. En cuanto a los métodos de extracción se pudieron observar diferencias en dos tipos de cultivo, las decocciones resultaron ser más efectivas contra el HCT15.

La actividad antitumoral que mostraron estos extractos puede estar relacionada con la presencia de trigaloil-HHDP-glucósido y glucósido de pentagaloilo, éste en menor cantidad; estos son los polifenoles mayoritarios encontrados en las flores, y pertenecen a la familia de los ellagitaninos, que han mostrado actividad antitumoral. El pentagalloyl ha mostrado actividad proapoptótica, antiproliferativa, antiangiogénica y antimetastática; y ha sido usado en cáncer de próstata, de pecho, de pulmón y en sarcoma.

Investigaciones adicionales de los compuestos aislados y purificados mostraran la relación de cada principio activo con esta actividad antitumoral mostrada por los extractos. En esto consiste una parte de esta investigación, en el fraccionamiento de los compuestos encontrados en estos extractos para estudiar su potencial antitumoral individualmente, para saber si la actividad antitumoral es gracias a la actividad de un solo compuesto o bien gracias a las sinergias que generan todos los compuestos.

6.4.2 Actividad antioxidante de los extractos de flores, hojas, corteza y frutos (*Castanea sativa* Miller Longal) (Barreira *et al.*, 2007)

En la actualidad sabemos que los radicales libres pueden causar daños irreversibles en los tejidos, mediante transformaciones moleculares o genéticas. El oxígeno es necesario para los organismos aerobios, pero sus metabolitos (ROS) pueden ser altamente tóxicos. En individuos sanos, la producción de radicales libres y las defensas antioxidantes naturales, las genera el propio organismo o las ingerimos con los alimentos, están en equilibrio. Pero este equilibrio se puede romper por distintas razones como el aumento de radicales o la disminución de las defensas, cuando esto ocurre aparece el *stress-oxidativo*. Este puede causar daños cardiovasculares, arterioesclerosis, cataratas, inflamaciones crónicas y enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer o Parkinson. Los radicales libres y ROS inducen la peroxidación lipídica, causando el deterioro de los alimentos.

Para obtener la actividad antioxidante de cada extracto se realizaron distintos ensayos:

- Neutralización de los radicales de DPPH
- Poder reductor
- Inhibición de la decoloración de β -Caroteno
- Inhibición de la hemólisis oxidativa en eritrocitos (AAPH)
- Inhibición de la peroxidación lipídica en los tejidos de cerebro de cerdo mediante la formación de ácido tiobarbitúrico (TBARS)
- Contenido total de Fenoles
- Contenido total de Flavonoides

Los resultados obtenidos que nos interesan son los expresados en la tabla 2 como EC₅₀ (concentración del extracto en la cual el efecto es la mitad del máximo) y CV (coeficiente de variación).

Tabla 2: Actividad antioxidante de los extractos de las hojas y flores de *Castanea sativa* Miller y contenidos de fenoles y flavonoides encontrados en dichos extractos.

		Flores	Hojas
Actividad de captación de radicales	EC50	74,9±0,60	170±2,49
	CV	0,80	1,47
Poder reductor	EC50	87,3±0,03	313±0,03
	CV	3,52	0,99
Inhibición de la decoloración	EC50	161±17,54	145±10,59
	CV	10,9	6,94
Inhibición de hemólisis	EC50	196±6,88	169±8,99
	CV	3,51	5,32
TBARS	EC50	9,93±2,05	31,4±1,97
	CV	2,83	3,86
Rendimiento de la extracción	%	16,3±0,95	20,9±1,22
Contenido total de Fenoles	mg/g	298±5,73	103±2,98
	CV (%)	1,92	2,90
Contenido total de Flavonoides	mg/g	160±5,32	54,5±3,74
	CV (%)	3,33	6,86

Podemos observar los efectos que tienen los distintos extractos del castaño, en este caso solo he utilizado los datos de las partes que yo utilizare en mi investigación. Hay que tener en cuenta que se usaron extractos en vez de compuestos fitoquímicos, estos aumentan su efecto bioactivo gracias a las adiciones y sinergias. Por lo que a una dieta rica en frutas y vegetales se le atribuye una compleja mezcla de fitoquímicos presentes en la comida. Esto explica que un solo antioxidante no puede reemplazar la combinación de fitoquímicos para lograr beneficios sanitarios.

Los resultados obtenidos tienen correlación con los contenidos de fenoles y flavonoides determinados en cada extracto. En cuanto a los fenoles es una correlación lineal negativa; es decir, Los extractos que contienen más fenoles muestran EC₅₀ menor. Con los flavonoides también pasa lo mismo pero el coeficiente de correlación es menor.

7 Composición química de las flores y las hojas

Las moléculas más importantes encontradas con actividad antitumoral son los compuestos fenólicos, más concretamente trigaloil-HHDP-glucósido y el glucósido de pentagaloilo. En cuanto a la actividad antioxidante encontraremos compuestos fenólicos y flavonoides.

En los extractos etanólicos de las hojas de *Castanea sativa* Miller encontraremos un alto contenido de ellagitaninos, en menor cantidad encontraremos gallotaninos y todavía en menor cantidad encontraremos los flavonoides. En cuanto a los extractos acuosos podremos encontrar polímeros fenólicos y taninos (Díaz-Reinoso *et al.*, 2011).

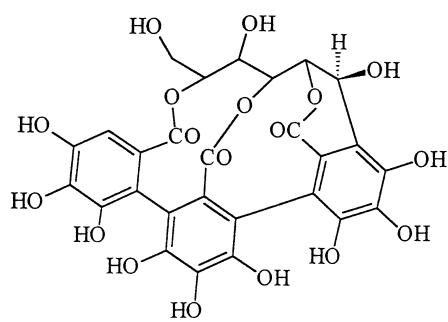
Investigadores de la Universidad de Pisa (A. Marsili *et al.*, 1972) consiguieron aislar distintos constituyentes de las hojas de *Castanea sativa* Miller: Ácido ursólico, ceras, lupeol, hidrocarburos alifáticos, ácidos grasos (láurico, tridecanoico, mirístico, pentadecanoico, palmítico, palmitoleico, eptadecanoico, esteárico, oleico, linoleico, monocosanoico, tricosanoico)

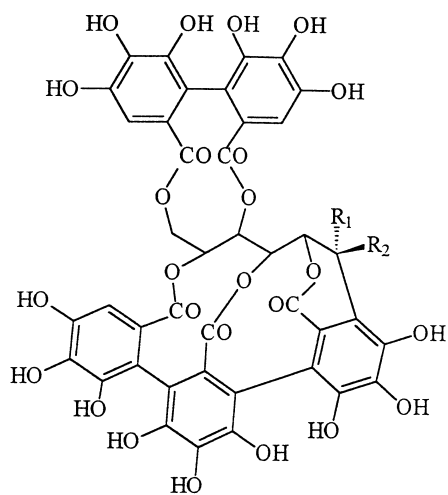
En las variedades *Judia* y *Longal* se han identificado distintos ácidos orgánicos: Ácido oxálico, cis-aconítico, cítrico, ascórbico, málico, quínico y fumárico (Ribeiro *et al.*, 2007). En los frutos también podemos encontrar un contenido significativo de polifenoles, entre los que predominan el ácido gálico y el elágico (De Vasconcelos *et al.*, 2010).

En cuanto a la corteza del castaño se han aislado distintos polifenoles que nos pueden ser útiles en nuestra investigación: Castalina (1), Vescalgina (2), Castalagina (3),

Acutisima A (4), Galloylhamamelosa (5), Curilagina (6), (3,5-Dimetoxi-4-hidroxifenol)-1-O- β -D-(6'-O-galloil)-glucosido (7), Castanin (8) (Lampire *et al.*, 1998).

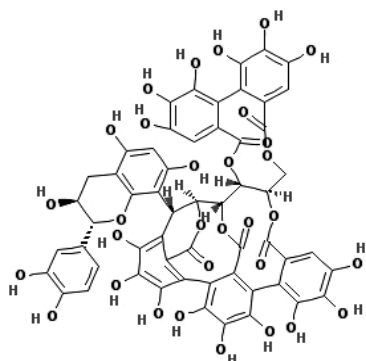
Figura 2: Estructuras de las moléculas aisladas de la corteza de *Castanea sativa*:



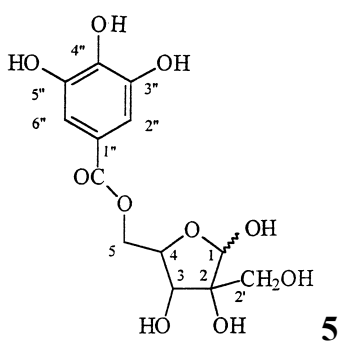


2 $R_1=H, R_2=OH$

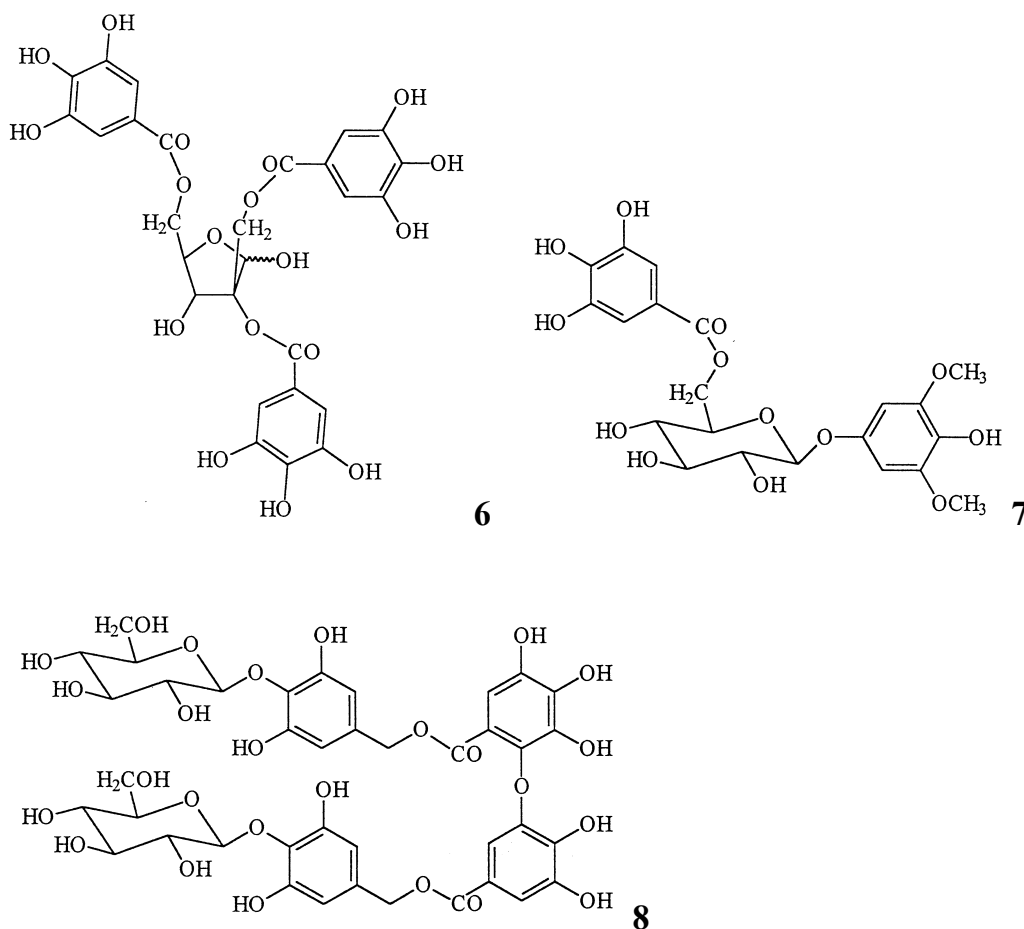
3 $R_1=OH, R_2=H$



4



5



Nota: Todas las estructuras excepto la 4(Pubchem 2016) están tomadas de Lampire et al., 1998.

8 Objetivos

- a) Obtener extractos progresivos en polaridad partiendo de las hojas y flores de *Castanea sativa* Miller.
- b) Utilizar los extractos previamente obtenidos en líneas celulares tumorales.
- c) Fraccionar los extractos con poder antitumoral, para obtener los compuestos aislados.
- d) Identificar los compuestos fraccionados anteriormente.
- e) Utilizar los compuestos aislados en líneas celulares tumorales.

El objetivo principal de esta investigación es la confirmación del poder antitumoral de los extractos de las hojas y las flores del castaño. Las investigaciones realizadas anteriormente se han realizado con los extractos acuosos, en cambio en esta investigación también se utilizarán

los extractos lipófilos. Con ello podremos obtener unos resultados más completos, en cuanto al poder antitumoral y a la composición química.

Las distintas extracciones progresivas en polaridad se realizaron de la siguiente manera: La primera fue en n-hexano, la segunda en diclorometano, la tercera en etanol:agua (70:30), en este extracto realizamos un fraccionamiento inicial en dos fases inmiscibles (n-butanol y agua), y la cuarta la realizamos en agua caliente (decocción). Por lo tanto, en la primera fase obtuvimos seis extractos diferentes:

1. Extracto en n-hexano
2. Extracto en diclorometano
3. Extracto en Acetato de etilo
4. Extracto en etanol:agua soluble en n-butanol
5. Extracto en etanol:agua insoluble en n-butanol
6. Extracto en agua caliente (decocción)

Para demostrar el poder antitumoral de las hojas y flores de *Castanea sativa* Miller, utilizamos los extractos distintos cultivos de células tumorales. Las líneas celulares cancerosas que utilizamos para el estudio de la actividad antitumoral fueron: MCF7 (adenocarcinoma de pecho), NCI-H460 (cáncer de pulmón), HeLa (carcinoma cervical) y HepG2 (carcinoma hepatocelular). Para evaluar la hepatotoxicidad de cada principio activo se utilizaron líneas celulares PLP2 (cultivos primarios de células no tumorales de hígado de cerdo).

9 Materiales y métodos

9.1 Muestras

Las flores y hojas de *Castanea sativa* Miller fueron recolectadas en junio de 2013 cerca de Oleiros (Bragança 41° 51' 02" N, 6° 49' 54" W). Se eligieron dos de los cultivos más representativos en el mercado portugués y europeo, es decir las variedades Judia y Longal. Las muestras fueron liofilizadas (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas, KS, USA) para después ser trituradas hasta obtener un polvo fino; finalmente se mezcló para conseguir una muestra homogénea.

9.2 Reactivos

9.2.1 Extracciones

- n-Hexano (Hex): Destilado en el laboratorio de química farmacéutica de la USAL
- Diclorometano (DCM) para análisis de la marca Carlo Erba
- Acetato de etilo (AcOEt) para análisis de la marca Carlo Erba
- Etanol 96% (EtOH) puro grado farmacéutico de la marca Panreac
- Agua desionizada: obtenida en un sistema de purificación de agua Millipore Direct-Q (TGI Water Systems, EUA)
- n-Butanol (BuOH) para análisis de la marca Carlo Erba

9.2.2 Evaluación del poder antitumoral y la citotoxicidad de los extractos

Se utilizaron los reactivos recomendados en el método colorimétrico de la sulforodamina B:

- Los medios de cultivo fueron RPMI-1640 y DMEM a los que se le añadió 1% L-glutamina, 1% penicilina/estreptomina (100 U/mL y 100 µg/mL respectivamente), 1% aminoácidos no esenciales y 10% suero fetal bovino (SFB) (Hyclone; Logan, Utah, EUA), ácido tricloroacético (TCA) al 10% de la marca Panreac
- Agua desionizada y autoclavada
- Tripsina-EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) de la marca Gibco Invitrogen Life Technologies
- Solución salina de Hank's (HBSS) de la marca Gibco Invitrogen Life Technologies
- Tris [2-amino-2-(hidroximetil) propano-1,3-diol] de la marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)

- Dimetil sulfoxido (DMSO) de la marca Fisher Chemical
- Ácido acético al 1% de la marca Fisher Chemical
- Elipticina (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA)
- Azul tripano de la marca Gibco

9.2.3 Fraccionamiento de los extractos, mediante VLC con mayor actividad antitumoral

- Hexano (95% alcanos) para síntesis de la marca Panreac
- Metanol (HPLC-gradiente) PAI-ACS de la marca Panreac
- Acetato de etilo para análisis de la marca Carlo Erba
- Sílice: Silicagel 60 (0,063-0,200 nm) Merck
- Diclorometano para análisis de la marca Carlo Erba

9.2.4 Espectroscopia RMN (^1H y ^{13}C)

- Cloroformo deuterado (CDCl_3) (Cambridge Isotope Laboratories)
- Metanol deuterado (CD_3OD) (Cambridge Isotope Laboratories)
- Dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$) (Cambridge Isotope Laboratories)

9.2.5 Cromatografía de capa fina

- Placas de DC-Fotigfolien ALUGRAM®Sil G/UV254, de 0,20 mm de anchura (Macherey-Nagel)
- Diclorometano para análisis de la marca Carlo Erba
- Acetato de etilo para análisis de la marca Carlo Erba
- Metanol (HPLC-gradiente) PAI-ACS de la marca Panreac
- Hexano (95% alcanos) para síntesis de la marca Panreac

9.2.6 Fraccionamiento en columna

- Arena de Mar lavada, grano fino QP de la marca Panreac
- Gel de sílice 60 (0,040-0,063 mm) de la marca Merck
- Diclorometano para análisis de la marca Carlo Erba
- Acetato de etilo para análisis de la marca Carlo Erba
- Metanol (HPLC-gradiente) PAI-ACS de la marca Panreac

9.3 Material y equipamiento

Para la identificación de estructural de los compuestos presentes en las distintas fracciones se utilizó el siguiente equipamiento:

- Espectrómetro de resonancia magnética nuclear Varian modelo Mercury Vx 400 MHz (400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C) (**figura 3**).
- Cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 Series II acoplado a detector de masas MSD Hewlett Packard 5972 (Figura 9): Columna cromatográfica de composición (5 %-fenil)-metilpolisiloxano HP-5ms de Agilent (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm) con helio como gas portador (**figura 3**).
- Espectrómetro de masas Applied Biosystems QSTR XL, con modo de ionización por electrospray a 5500 V y detector de cuádruplo-tiempo de vuelo ESI-Q-TOF del Servicio General de Masas de la USAL.



Figura 3: Cromatógrafo de gases (izq.) y Espectrómetro de resonancia magnética nuclear (dcha.)

9.4 Extracción

Las extracciones se realizaron siguiendo el esquema de la **figura 5**. Para eso se utilizaron distintos disolventes progresivos en polaridad. Para todos los extractos se utilizó la misma relación de muestra y disolvente, concretamente 1:50. La cantidad de cada muestra utilizada en las extracciones fue de 3,00 g tanto en el caso de las hojas como de las flores. Teniendo en cuenta la cantidad de muestra y la relación muestra:disolvente (g:mL), se utilizaron 150 mL de disolvente en cada extracción. Todas las extracciones tuvieron una duración superior a 20 horas con agitación (**figura 4**), y se realizaron por duplicado para extraer el máximo número de compuestos solubles en cada disolvente. Excepto las extracciones realizadas en EtOH/H₂O (70:30) y la decocción acuosa.

Para la concentración de los extractos obtenidos se utilizó un rotavapor (Buchi R-210) con baño calefactor (modelo B-491) de la misma marca; las condiciones para ello fueron de 40 °C y presión reducida, excepto en el butanol que la temperatura fue de 50 °C. El agua del extracto acuoso se eliminó en un liofilizador (modelo Lyoquest) de marca Telstar.

Mediante este proceso obtuvimos seis extractos por cada parte de la planta: extracto en Hex, extracto en DCM, extracto en AcOEt, extracto en EtOH/H₂O soluble en butanol (sBuOH), extracto en EtOH/H₂O insoluble en butanol (sH₂O) y decocción acuosa.

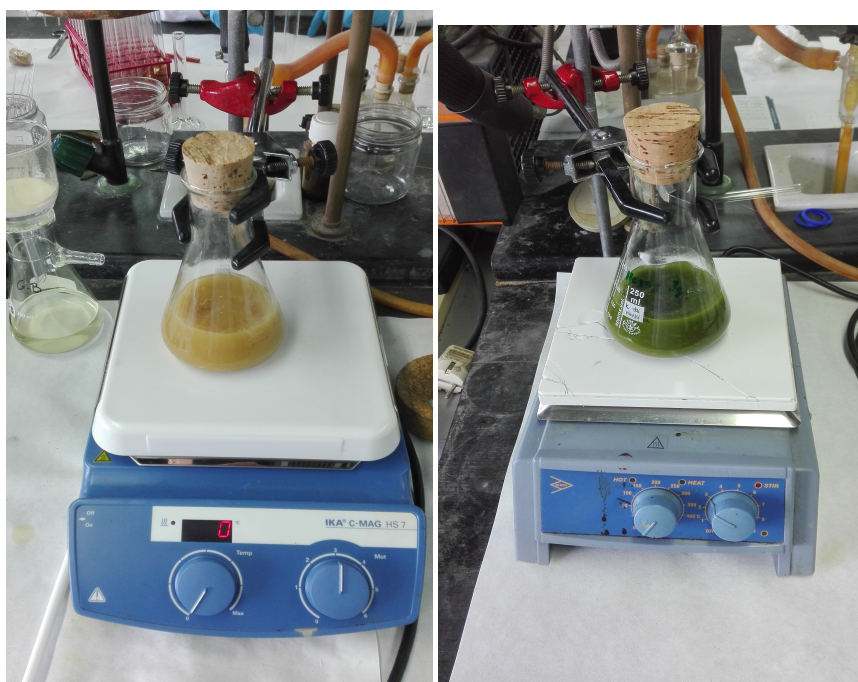


Figura 4: Extracción por maceración y agitación de las flores (izq.) y hojas (dcha.)

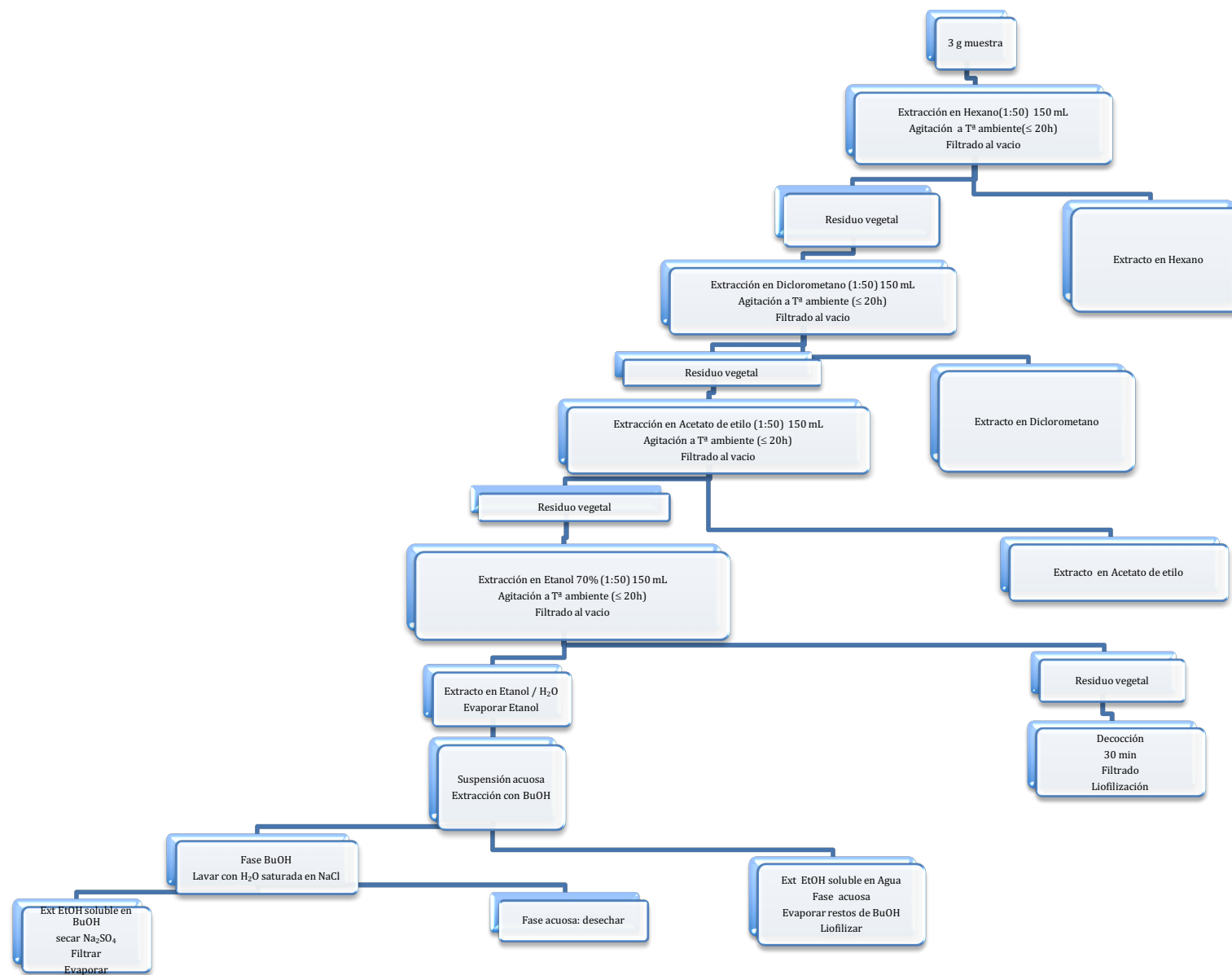


Figura 5: Esquema que se siguió para la obtención de los extractos

9.5 Evaluación de la actividad citotóxica

Las líneas celulares utilizadas para evaluar la actividad antitumoral *in vitro* fueron: MCF-7 (adenocarcinoma de mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmón), HeLa (carcinoma cervical) y HepG2 (carcinoma hepatocelular). Para evaluar la hepatotoxicidad de los extractos se utilizó un cultivo primario de células de hígado de cerdo, PLP2 (*porcine liver primary cell culture*).

La evaluación de la actividad citotóxica se realizó a partir de los extractos que obtuvimos en el **apartado 9.4**; para ello se disolvieron 8 mg de cada extracto en 500 μ L de DMSO; excepto los extractos etanólicos solubles en agua y los obtenidos en las decocciones, estos se disolvieron directamente en 500 μ L de agua desionizada y autoclavada. A todas las disoluciones se les añadió 500 μ L de agua desionizada y autoclavada para obtener una concentración final de 8 mg/mL. A partir de estas disoluciones se realizaron diluciones sucesivas en las microplacas de 96 pocillos, se diluyeron $\frac{1}{4}$ para utilizarlas en el ensayo, es decir se pipetearon 75 μ L de la disolución primaria y se le añadieron 225 μ L de agua desionizada y autoclavada, se obtuvieron cuatro disoluciones con las siguientes concentraciones: 8 mg/mL, 2 mg/mL, 0,5 mg/mL y 0,125 mg/mL.

Para la evaluación de la actividad citotóxica se pipetearon 10 μ L de cada disolución en una microplaca de 96 pocillos. Se realizaron dos pipeteos por cada placa y el ensayo se realizó por duplicado para obtener la mayor representatividad posible, es decir cada muestra se ensayó cuatro veces. Finalmente se añadieron 190 μ L de suspensión de las líneas celulares tumorales con 50 000 células/mL.

Para determinar la densidad celular después de incubar las líneas celulares con las distintas concentraciones de los extractos se utilizó el ensayo colorimétrico de la sulforodamina B (SRB) (Vichai *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos se expresan en GI₅₀, es decir la concentración de la muestra en la que se inhibe la proliferación celular al 50%. Esta se calcula utilizando el gráfico del porcentaje de inhibición celular frente a la concentración de la muestra. La ellipticina se utilizó como control positivo.

9.5.1 Actividad antiproliferativa en líneas celulares tumorales humanas

Las células tumorales se mantuvieron en un medio de cultivo para células adherentes (RPMI-1640) enriquecido con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado mediante calor, 1% L-glutamina (2 mM), 1% penicilina/estreptomicina (100 U/mL y 100 µg/mL respectivamente), 1% aminoácidos no esenciales, en incubadoras de aire humidificado con 5% de CO₂ a 37 °C (HF 151, Heal Force). Todos los ensayos se realizaron en un ambiente aséptico, para ello se realizaron dentro de una cámara de flujo laminar vertical (Telstar, AV- 30/70).

El primer paso que realizamos fue retirar el medio de cultivo de cada caja de cultivo. Después se les adicionó HBSS (2 mL), el medio que se utiliza para el lavado, a continuación, se retiró y se les añadió tripsina (1,5 mL), las cajas se incubaron (5% de CO₂ a 37 °C) durante 3 min, para favorecer la disgregación de las células de las cajas. Seguidamente se les añadió medio de cultivo (3 mL) para saturar la tripsina. Las suspensiones celulares que se obtuvieron se transfirieron a tubos de Falcon estériles para su posterior centrifugado (1200 rpm durante 5 min). El sobrenadante se desechó y las células se volvieron a suspender en medio de cultivo (5 mL), se retiraron 75 µL de suspensión y se le añadieron 75 µL de azul tripano para realizar el conteo de las células en una cámara Neubauer.

Se prepararon suspensiones de células con una densidad celular de 50000 células/mL y se colocaron 190 µL de las suspensiones celulares junto a 10 µL de las distintas concentraciones de las muestras que preparamos con anterioridad. Con esto conseguimos unas concentraciones de extracto en los pocillos de 400 µg/mL, 200 µg/mL, 25 µg/mL y 6,26 µg/mL.

Después de incubar las microplacas durante 48 horas a 37 °C y 5% de CO₂ se realizó la evaluación de la densidad celular de cada pocillo utilizando el ensayo de la SRB, anteriormente mencionado. Para realizar este ensayo se adicionaron 100 µL de ácido tricloroacético frío (TCA, 10%) en cada pocillo y se incubaron las microplacas a 4 °C durante 60 min; después se limpiaron con agua destilada, este proceso se repitió tres veces para garantizar la eliminación de todo el TCA, y luego se secaron. El siguiente paso fue adicionar 100 µL de una solución de SRB (0,1% en 1% de ácido acético), se dejó actuar a temperatura ambiente durante 30 min. Posteriormente se les añadió ácido acético (1%)

para limpiar el SRB sobrante y se secó, este paso se repitió tres veces para asegurar una limpieza máxima. El último paso fue adicionar 200 μL de la base TRIS (10 mM, pH 7,4). Después se realizó la lectura, para ello se agitaron las microplacas con un agitador específico (Stat Fax-2100), esto se realizó para solubilizar el SRB; la absorbancia se midió a 540 nm en el lector de microplacas (BioTek® ELx800). **(Figura 6)**



Figura 6: Agitador de microplacas (izq.) y lector (dcha.)

9.5.2 Evaluación de la hepatotoxicidad de los extractos en células de hígado no tumorales de cerdo

El hígado que se utilizó para realizar un cultivo primario se obtuvo de un matadero local. Para ello se siguió el procedimiento descrito por el grupo de investigación del IPB donde se ha realizado el presente trabajo (Abreu et al., 2011). Los tejidos se limpiaron usando una solución salina Hanks que contenía 100 U/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomina para después dividirlos en explantes de $1 \times 1 \text{ mm}^3$. Los explantes se colocaron en cajas de cultivo de 25 cm^2 con medio DMEM enriquecido con suero fetal bovino (SFB al 10%), aminoácidos no esenciales (2mM) y 100 U/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomina y se incubaron a 37°C con atmosfera humedecida con 5% de CO_2 . El medio se cambió cada dos días. La monitorización del cultivo se realizó utilizando un microscopio invertido (Nikon Eclipse Ts 100). Para realizar la evaluación de la hepatotoxicidad de cada muestra se transfirió 190 μL del cultivo a una microplaca de 96 pocillos, la densidad celular fue de 1×10^4 células/pocillo; a estos se les añadieron 10 μL de cada extracto. Se cultivaron durante 48 h y se realizó el método SRB que he descrito antes, tras la lectura de los resultados se pudo observar la hepatotoxicidad de cada extracto.

9.6 Fraccionamiento de los extractos

Los extractos que fraccionamos fueron los que tuvieron un poder antitumoral mayor, es decir el extracto de las hojas en hexano (HH) y diclorometano (DH), y el extracto en diclorometano de las flores (DF). Las cantidades obtenidas de extractos fueron inferiores a las necesarias para un fraccionamiento óptimo, por lo que se realizó una extracción como las realizadas anteriormente, pero partiendo de una muestra mayor, exactamente de 28,4 g de flores y 29,2 g de hojas respectivamente. La relación muestra:disolvente fue la misma, es decir 1:50. Por lo demás el proceso de extracción fue exactamente igual al explicado anteriormente en el **apartado 9.4**, pero realizando solo la extracción hasta la etapa de obtención de los extractos HH, DH y DF que son los que fraccionamos por presentar efecto antitumoral.

Para el proceso de fraccionamiento de los extractos utilizamos la técnica cromatográfica denominada Vacuum Liquid Chromatography o VLC (J.C.Coll *et al.*, 1986 y S.W.Pelletier *et al.*, 1986) (**figura 7**). Esta técnica se basa en el fraccionamiento de los extractos mediante cromatografía rápida a vacío. Para ello utilizamos una placa de filtrado sobre la que añadimos 35 g de silicagel; con esto obtuvimos una fase fija con una relación extracto:sílice (g/g) de: 1:67 en el caso de extracto DH; 1:85 en el de HH y 1:123 en el de DF. Los extractos se disolvieron en una pequeña cantidad de disolvente, exactamente en el utilizado para su extracción. El extracto se distribuyó por encima del soporte de sílice, obteniendo una fina capa homogénea de extracto en la parte superior.



Figura 7: Fraccionamiento mediante cromatografía VLC

Después se añadieron consecutivamente los eluyentes, secando a vacío entre cada una de las etapas. Para decidir la composición de los eluyentes a utilizar en este proceso se realizaron Fraccionamiento y aislamiento de bioactivos con potencial citotóxico en células tumorales de flores y hojas de *Castanea sativa* Miller

cromatografías de capa fina (TLC) con antelación. En nuestro caso se utilizarón 50 mL de cada eluyente y la relación fue cambiando para obtener las distintas fracciones de polaridad creciente. En el caso de los extractos en diclorometano estas fueron las fracciones y los disolventes utilizados:

- HD1 y FD1: Hexano
- HD2 y FD2: Hexano:Acetato de Etilo (90:10)
- HD3 y FD3: Hexano:Acetato de Etilo (75:25)
- HD4 y FD4: Hexano:Acetato de Etilo (50:50)
- HD5 y FD5: Hexano:Acetato de Etilo (25:75)
- HD6 y FD6: Hexano:Acetato de Etilo (10:90)
- HD7 y FD7: Acetato de Etilo
- HD8 y FD8: Acetato de Etilo:Metanol (90:10)
- HD9 y FD9: Acetato de Etilo:Metanol (75:25)
- HD10 y FD10: Acetato de Etilo:Metanol (50:50)
- HD11 y FD11: Metanol

En el caso de los extractos de las hojas en hexano antes del fraccionamiento se realizó un descerado. Para esto se disolvió el extracto en metanol caliente, después se filtró para separar la parte insoluble (fracción insoluble en metanol caliente, Fi, fracción de ceras duras).

La fracción soluble en metanol caliente se dejó enfriar a -20 °C durante 24 h, con esto conseguimos que las ceras se precipitasen, consiguiendo un primer descerado al filtrar el líquido (fracción cerosa, Fc, fracción de ceras blandas) repetimos el proceso para optimizar el descerado, la fracción cerosa la añadimos a la Fc. Mediante este proceso obtuvimos dos fracciones que también utilizamos en el ensayo antitumoral de las fracciones. Para el fraccionamiento del extracto de hexano se utilizó el mismo procedimiento que en los extractos de diclorometano pero se cambiaron los eluyentes:

- HH1: Hexano
- HH2: Hexano:Diclorometano (95:5)
- HH3: Hexano:Diclorometano (90:10)
- HH4: Hexano:Diclorometano (75:25)
- HH5: Hexano:Diclorometano (50:50)
- HH6: Hexano:Diclorometano (10:90)
- HH7: Diclorometano
- HH8: Diclorometano:Acetato de Etilo (50:50)
- HH9: Acetato de Etilo
- HH10: Acetato de Etilo:Metanol (50:50)
- HH11: Metanol

Las cantidades de algunas fracciones fueron muy inferiores a las necesarias para realizar el ensayo antitumoral y el posterior estudio espectroscópico en gases/masas y RMN(¹H), por eso se realizaron varias espectroscopias en capa fina (TLC). Dependiendo de los resultados que obtuvimos, algunas fracciones se mezclaron consiguiendo las distintas fracciones:

- | | | |
|--------|---------|---------|
| ○ HD1 | ○ HH1-7 | ○ FD1-3 |
| ○ HD2 | ○ HH8 | ○ FD4 |
| ○ HD3 | ○ HH9 | ○ FD5 |
| ○ HD4 | ○ HH10 | ○ FD6 |
| ○ HD5 | ○ HH11 | ○ FD7 |
| ○ HD6 | ○ Fi | ○ FD8 |
| ○ HD7 | ○ Fc | ○ FD9 |
| ○ HD8 | | ○ FD10 |
| ○ HD9 | | ○ FD11 |
| ○ HD10 | | |
| ○ HD11 | | |

9.7 Evaluación citotóxica de las fracciones

La evaluación citotóxica de las fracciones obtenidas mediante el proceso descrito en el **apartado 9.6** se realizó siguiendo el mismo procedimiento del **apartado 9.5**. Así consiguió identificar las fracciones con mayor actividad antitumoral. Estas fracciones se analizaron y se purificaron para intentar obtener distintas fracciones o incluso en el mejor de los casos algún compuesto aislado. Para ello se realizaron los procesos explicados a continuación.

9.8 Identificación de los compuestos presentes en las fracciones

La identificación de las fracciones con mayor actividad antitumoral se realizó mediante las técnicas espectroscópicas RMN de ^1H y ^{13}C , y GC/MS. Para realizar la primera técnica (Resonancia Magnética Nuclear) las fracciones se solubilizaron en cloroformo deuterado (CDCl_3), en metanol deuterado (CD_3OD) y/o en dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6). Como referencia interna se utilizó la señal del disolvente sin deuterar. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en hercios (Hz).

Para realizar la segunda técnica, es decir la cromatografía de gases – espectrometría de masas, las fracciones se disolvieron en el disolvente en el que se extrajeron y se inyectó 1 μL de la disolución en el cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro de masas. La identificación de los compuestos volátiles se llevó a cabo por comparación con los espectros de masas presentes en la biblioteca Wiley W9N08 del National Institute of Standards and Technology (NIST).

Por último, para confirmar la fórmula molecular de los compuestos aislados se realizaron espectros de masas de alta resolución (HRMS). Los iones observados se expresaron según su relación m/z y se comparan con los valores teóricos calculados para las fórmulas moleculares posibles dentro del rango de tolerancia.

9.9 Cromatografía en columna

Se realizó otro fraccionamiento por medio del procedimiento de la cromatografía de columna (**figura 8**) de las dos fracciones con mayor poder antitumoral para intentar purificar e identificar algún compuesto:

- **HD 6-8:** Fracción formada por las fracciones HD6, HD7 y HD8; se agruparon por la similitud de sus espectros de RMN de ^1H y poder partir de mayor masa en la purificación.

Se fraccionó por cromatografía en columna sobre gel de sílice 60. La muestra (87 mg) se disolvió en DCM y se depositó en la parte superior de la columna. Para seleccionar los eluyentes se realizó un estudio preliminar por TLC. Fueron los siguientes: DCM (aprox. 50 mL), 200 ml DCM:AcOEt (9:1), 200 mL DCM:AcOEt (8:2), 200mL DCM:AcOEt (1:1), 200 mL AcOEt, 200 mL AcOEt:MeOH (9:1), MeOH (aprox. 50 mL). Se recogieron 58 tubos de unos 15-20 mL y dos matraces, los que aproximadamente contenían los 50 mL de las fases móviles inicial y final. Las fracciones se agruparon, dependiendo de la semejanza de sus perfiles cromatográficos y espectrales observados por TLC y por RMN de ^1H .

- **HH 8-9:** Esta fracción está formada por las fracciones HH8 y HH9, que se agruparon por la misma razón que los de la fracción anterior.

Antes de comenzar el proceso de fraccionamiento se realizó otra separación por insolubilización, mediante la que se obtuvieron dos matraces: X (insoluble en Hexano:DCM, 1:1) y 0 (solubles en Hexano:DCM, 1:1). El contenido del matraz 0 fue el que se fraccionó mediante la cromatografía de columna. Para esto se realizó el mismo proceso que para la fracción anterior. Lo único que cambió fue el peso de la muestra, en este caso de 94 mg, y los eluyentes utilizados: Hexano (aprox. 50 mL), 9 Hexano: 1 AcOEt (100 mL), 8 Hexano: 2 AcOEt (200 mL), 6 Hexano: 4 AcOEt (100 mL), 2 Hexano: 8 AcOEt (100 mL), AcOEt (100 mL), MeOH (aprox. 50 mL). Se recogieron 36 tubos de aproximadamente 25 mL y dos matraces que contenían aproximadamente 50 mL.

Las fracciones obtenidas mediante este proceso se agruparon, dependiendo de la semejanza de sus perfiles cromatográficos y espectrales observados por TLC y por RMN de ^1H .



Figura 8: Cromatografía en columna

9.10 Evaluación de la actividad citotóxica de los compuestos aislados

Mediante el proceso de aislamiento y purificación llevado a cabo en el **apartado 9.9** se obtuvieron dos fracciones con un compuesto muy mayoritario en cada una, prácticamente puros. Se realizó el ensayo descrito en el **apartado 9.5** para evaluar la actividad citotóxica de estos compuestos aislados. Con esto podremos saber si el efecto citotóxico se debe a estas moléculas mayoritarias o a otras presentes en las fracciones o bien a sinergias entre estas moléculas.

10 Resultados y discusión

10.1 Rendimientos de la extracción

Para obtener los rendimientos de las extracciones realizadas que se presentan en las siguientes tablas se utilizaron las masas exactas de partida de las plantas: 3,001 g en las hojas y 3,002 g en las flores.

Tabla 3: Rendimientos de cada extracción de las hojas, representada en masa (mg) y porcentaje.

Disolvente	1ª Extracción		2ª Extracción		Total	
	Masa mg	%	Masa mg	%	Masa mg	%
Hexano	49	1,6	8	0,27	57	1,9
DCM	42	1,4	6	0,20	48	1,6
AcOEt	35	1,2	2	0,07	37	1,2
EtOH/H ₂ O (70:30) soluble H ₂ O	658	21,9	—	—	658	21,9
EtOH/H ₂ O (70:30) soluble BuOH	490	16,3	—	—	490	16,3
Decocción en H ₂ O	37	1,2	—	—	37	1,2

Nota: Las extracciones de los extractos EtOH/H₂O (70:30) y la decocción no se realizaron extracciones sucesivas, por lo que el rendimiento de la 1ª extracción es el total.

Tabla 4: Rendimientos de cada extracción de las flores, representada en masa (mg) y porcentaje.

Disolvente	1ª Extracción		2ª Extracción		Total	
	Masa mg	%	Masa mg	%	Masa mg	%
Hexano	36	1,2	8	0,27	44	1,5
DCM	28	0,93	3	0,10	31	1,0
AcOEt	42	1,4	11	0,37	51	1,7
EtOH/H ₂ O (70:30) soluble H ₂ O	984	32,8	—	—	984	32,8
EtOH/H ₂ O (70:30) soluble BuOH	515	17,2	—	—	515	17,2
Decocción en H ₂ O	54	1,8	—	—	54	1,8

Nota: Las extracciones de los extractos EtOH/H₂O (70:30) y la decocción no se realizaron extracciones sucesivas, por lo que el rendimiento de la 1ª extracción es el total.

Tras observar los resultados del rendimiento podemos concluir que los componentes mayoritarios de las hojas y de las flores de *Castanea sativa* Miller son muy polares, ya que los mayores rendimientos se han obtenido con los disolventes más polares, es decir con H₂O/EtOH, extracto que fue fraccionado para dar lugar a los extractos “soluble H₂O” y “soluble BuOH”.

10.2 Evaluación de la actividad citotóxica

Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad citotóxica de los extractos de hojas y flores sobre las cuatro líneas celulares tumorales humanas: MCF-7 (adenocarcinoma de mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmón), HeLa (carcinoma cervical) y HepG2 (carcinoma hepatocelular); y de la hepatotoxicidad sobre un cultivo primario de células de hígado de cerdo: PLP2 (no-tumorales). Son los que aparecen a continuación en las **tablas 5 y 6**:

Tabla 5: Actividad citotóxica de los extractos de las hojas; valores expresados en GI₅₀(μg/mL) (media ± SD).

	Hexano	DCM	AcOEt	sH ₂ O	sBuOH	Decocción	Ellipticina
NCI-H460	57 ± 5	69 ± 7	98 ± 1	204 ± 18	253 ± 17	225 ± 14	1
HeLa	16 ± 1	45 ± 4	75 ± 7	75 ± 17	189 ± 14	67 ± 2	1
MCF-7	48 ± 4	55 ± 2	58 ± 6	206 ± 9	164 ± 17	254 ± 7	1
HepG2	41 ± 1	41 ± 4	61 ± 10	89 ± 6	55 ± 5	120 ± 9	1
PLP 2	88 ± 4	126 ± 9	105 ± 10	228 ± 22	218 ± 5	291 ± 16	2

Nota: DCM (diclorometano), AcOEt (acetato de etilo), sH₂O (ext. en EtOH/H₂O soluble en agua), sBuOH (ext. en EtOH/H₂O soluble en BuOH).

Tabla 6: Actividad citotóxica de los extractos de las flores; valores expresados en GI₅₀ (μg/mL) (media ± SD)

	Hexano	DCM	AcOEt	sH ₂ O	sBuOH	Decocción	Ellipticina
NCI-H460	57 ± 5	56 ± 2	164 ± 11	224 ± 16	238 ± 18	185 ± 18	1
HeLa	60 ± 1	22 ± 2	51 ± 2	141 ± 11	176 ± 7	58 ± 4	1
MCF-7	61 ± 2	49 ± 1	63 ± 1	228 ± 13	174 ± 15	238 ± 3	1
HepG2	70 ± 6	24 ± 2	81 ± 6	78 ± 5	92 ± 1	49 ± 3	1
PLP 2	88 ± 4	126 ± 9	92 ± 6	248 ± 23	2501 ± 17	200 ± 2	2

Nota: DCM (diclorometano), AcOEt (acetato de etilo), sH₂O (ext. en EtOH/H₂O soluble en agua), sButOH (ext. en EtOH/H₂O soluble en BuOH).

Los mejores resultados de actividad citotóxica en líneas tumorales se obtuvieron para los extractos de diclorometano y de hexano de las hojas. El extracto en hexano de las hojas fue el más activo frente al carcinoma de pulmón (NCI-H460, $GI_{50}=57 \pm 5 \mu\text{g/mL}$, al adenocarcinoma de mama (MCF-7, $GI_{50}=48 \pm 4 \mu\text{g/mL}$) y frente al carcinoma cervical (HeLa, $GI_{50}=16 \pm 1 \mu\text{g/mL}$). En cambio, el extracto de las flores en diclorometano resultó ser el más activo frente al carcinoma hepatocelular (HepG2, $GI_{50}=24 \pm 2 \mu\text{g/mL}$). El extracto de diclorometano de las flores resultó citotóxico para todas las líneas celulares, pero en menor medida que los anteriormente mencionados.

Los extractos no mostraron una hepatotoxicidad considerable frente al cultivo primario de células de hígado de cerdo (valores de GI_{50} superiores a los obtenidos para las líneas tumorales), con la excepción del extracto de AcOEt en NCI-H460. Por eso se optó por fraccionar los tres extractos antes mencionados, es decir hojas diclorometano (HD), hojas hexano (HH) y flores diclorometano (FD), para purificar los extractos e intentar aislar algún compuesto responsable por la bioactividad.

Los extractos se enviaron al Laboratorio de parasitología de Dr. Julio López de Cietus de la USAL y fueron evaluados por Sergio Parejo frente a larvas *Strongyloides venezuelensis* para detectar una posible actividad antihelmíntica. Pero los resultados fueron negativos para todos los extractos, con lo cual se puede concluir que las flores y las hojas de castaño no tienen actividad antihelmíntica.

10.3 Fraccionamiento de los extractos

Los pesos obtenidos para las fracciones obtenidas tras la cromatografía VLC de los extractos seleccionados fueron los siguientes:

Tabla 7: Peso obtenido en cada fracción (con indicación de los eluyentes utilizados) en el fraccionamiento del extracto en diclorometano (524 mg en total) de las hojas de *Castanea sativa* Miller.

Fracción	Eluyente	Peso (mg)
HD1	Hexano (100)	15
HD2	Hexano:Acetato de Etilo (90:10)	5
HD3	Hexano:Acetato de Etilo (75:25)	10
HD4	Hexano:Acetato de Etilo (50:50)	38
HD5	Hexano:Acetato de Etilo (25:75)	48
HD6	Hexano:Acetato de Etilo (10:90)	49
HD7	Acetato de Etilo (100)	36
HD8	Acetato de Etilo:Metanol (90:10)	24
HD9	Acetato de Etilo:Metanol (75:25)	77
HD10	Acetato de Etilo:Metanol (50:50)	88
HD11	Metanol (100)	68
Total	—	458

Tabla 8: Peso obtenido en cada fracción (con indicación de los eluyentes utilizados) en el fraccionamiento del extracto en diclorometano (286 mg en total) de las flores de *Castanea sativa* Miller.

Fracción	Eluyente	Peso(mg)
FD1	Hexano (100)	1
FD2	Hexano:Acetato de Etilo (90:10)	0
FD3	Hexano:Acetato de Etilo (75:25)	5
FD4	Hexano:Acetato de Etilo (50:50)	11
FD5	Hexano:Acetato de Etilo (25:75)	19
FD6	Hexano:Acetato de Etilo (10:90)	20
FD7	Acetato de Etilo (100)	15
FD8	Acetato de Etilo:Metanol (90:10)	9
FD9	Acetato de Etilo:Metanol (75:25)	53
FD10	Acetato de Etilo:Metanol (50:50)	58
FD11	Metanol (100)	54
Total	—	245

Tabla 9: Peso obtenido en cada fracción (con indicación de los eluyentes utilizados) en el fraccionamiento del extracto en hexano (441 mg en total) de las hojas de *Castanea sativa* Miller.

Facción	Eluyente	Peso(mg)
Fc	—	73
Fi	—	34
HH1	Hexano (100)	2
HH2	Hexano:Diclorometano (95:5)	0
HH3	Hexano:Diclorometano (90:10)	1
HH4	Hexano:Diclorometano (75:25)	1
HH5	Hexano:Diclorometano (50:50)	2
HH6	Hexano:Diclorometano (10:90)	5
HH7	Diclorometano (100)	2
HH8	Diclorometano:Acetato de Etilo (50:50)	34
HH9	Acetato de Etilo (100)	79
HH10	Acetato de Etilo:Metanol (50:50)	77
HH11	Metanol(100)	45
Total	—	355

10.4 Evaluación de la actividad citotóxica de las fracciones

Como se puede observar en las **tablas 10, 11 y 12** las fracciones con las que obtuvimos mejores resultados fueron: HD6, HD7, HD8, HD9, HH8 HH9. En todas ellas se puede observar una mejora de la citotoxicidad frente a las cuatro líneas celulares, esto se debe a que los compuestos citotóxicos están más concentrados en esas fracciones que en los extractos iniciales. Estas fueron las fracciones con las que continuamos la investigación, primero intentado identificar algún compuesto para después purificarlo mediante la cromatografía de columna en gel de sílice.

Dependiendo de la línea celular, la fracción más activa varía. Entre las fracciones mencionadas anteriormente el valor más llamativo fue el de la fracción HD9 frente al adenocarcinoma de mama (MCF-7, $GI_{50} = 9 \pm 1 \mu\text{g/ml}$). La fracción HD8 fue la más activa frente al carcinoma hepatocelular (HepG2, $GI_{50} = 12 \pm 1 \mu\text{g/ml}$). En cuanto a la actividad citotóxica frente al carcinoma cervical la fracción más activa fue la HD7 (HeLa, $GI_{50} = 16 \pm 1 \mu\text{g/ml}$); en cambio la fracción con mayor actividad citotóxica frente al cáncer de pulmón fue la fracción HH9 (NCI-H460, $GI_{50} = 25 \pm 2 \mu\text{g/ml}$). También observamos otros valores interesantes; por ejemplo, el de la fracción cerosa (Fc) del extracto de hexano de las hojas frente al cáncer cervical (HeLa, $GI_{50} = 15 \pm 1 \mu\text{g/ml}$) y el de FD7 frente al cáncer de mama (MCF-7, $GI_{50} = 15 \pm 1 \mu\text{g/ml}$).

La mayoría de las fracciones no mostraron una hepatotoxicidad considerable, (valores de GI₅₀ superiores a los obtenidos para las líneas tumorales), con la excepción de las fracciones HD7, HD8, HD11, FD1-3 y HH1-7 en NCI-H460. pero se observó un aumento de esta ya que los compuestos están más concentrados.

Tabla 10: Actividad citotóxica de las fracciones obtenidas a partir del extracto de las hojas en diclorometano; valores expresados en GI₅₀ (μg/mL) (media ± SD).

	HD1	HD2	HD3	HD4	HD5	HD6	HD7	HD8	HD9	HD10	HD11
NCI-H460	283 ± 12	375 ± 19	321 ± 18	69 ± 2	62 ± 6	51 ± 4	59 ± 2	61 ± 4	53 ± 5	66 ± 5	73 ± 6
HeLa	198 ± 5	242 ± 9	70 ± 4	62 ± 4	18 ± 1	20 ± 3	16 ± 1	17 ± 2	54 ± 6	58 ± 3	64 ± 2
MCF-7	220 ± 10	234 ± 11	77 ± 5	43 ± 1	17 ± 1	13 ± 1	13 ± 1	19 ± 2	9 ± 1	54 ± 4	24 ± 3
HepG2	276 ± 17	340 ± 17	81 ± 6	41 ± 2	19 ± 1	22 ± 1	17 ± 1	11 ± 1	58 ± 3	47 ± 4	58 ± 3
PLP2	358 ± 24	>400	285	189 ± 17	100 ± 5	66 ± 5	47 ± 5	50 ± 4	72 ± 5	66 ± 4	70 ± 6

Nota: MCF-7 (adenocarcinoma humano de mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmón humano), HeLa (carcinoma cervical humano) y HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) y PLP2 (células no tumorales de hígado de cerdo).

Tabla 11: Actividad citotóxica de las fracciones obtenidas a partir del extracto de las flores en diclorometano; valores expresados en GI₅₀ (μg/ml) (media ± SD).

	FD1-3	FD4	FD5	FD6	FD7	FD8	FD9	FD10	FD11
NCI	345 ± 24	251 ± 24	73 ± 5	72 ± 4	66	65 ± 2	62 ± 3	68 ± 6	63 ± 7
HeLa	197 ± 17	188 ± 9	72 ± 4	58 ± 5	55 ± 2	54 ± 2	39 ± 2	53 ± 4	61 ± 3
MCF-7	160 ± 8	157 ± 14	43 ± 4	42 ± 3	15 ± 2	18 ± 2	59 ± 5	62 ± 5	57 ± 2
HepG2	173 ± 17	149 ± 14	105 ± 7	117 ± 4	61 ± 2	72 ± 5	45 ± 1	62 ± 2	71 ± 7
PLP2	323 ± 32	267 ± 22	170	140 ± 11	92 ± 4	99 ± 7	71 ± 1	78 ± 4	100 ± 9

Nota: MCF-7 (adenocarcinoma humano de mama), NCI-H460 (carcinoma humano de pulmón), HeLa (carcinoma humano cervical) y HepG2 (carcinoma humano hepatocelular) y PLP2 (células no tumorales de hígado de cerdo)

Tabla 12: Actividad citotóxica de las fracciones obtenidas a partir del extracto de las hojas en hexano; valores expresados en GI₅₀(μg/ml) (media ± SD)

	Fc	Fi	HH1-7	HH8	HH9	HH10	HH11
NCI-H460	272 ± 26	300 ± 15	307 ± 17	70 ± 5	25 ± 2	35 ± 2	63 ± 4
HeLa	15 ± 1	219 ± 20	229 ± 14	20 ± 1	19 ± 2	20 ± 2	50 ± 5
MCF-7	180 ± 2	212 ± 10	172 ± 10	20 ± 2	17 ± 2	21 ± 2	50 ± 1
HeG2	72 ± 6	211 ± 20	101 ± 3	66 ± 4	15 ± 2	41	71 ± 4
PLP2	286 ± 10	361 ± 25	278 ± 28	366 ± 2	72 ± 4	107 ± 8	103 ± 6

Nota: MCF-7 (adenocarcinoma humano de mama), NCI-H460 (carcinoma humano de pulmón), HeLa (carcinoma humano cervical) y HepG2 (carcinoma humano hepatocelular) y PLP2 (células no tumorales de hígado de cerdo)

10.5 Identificación de los compuestos presentes en las fracciones

Para la identificación de los compuestos mayoritarios en las fracciones HD6, HD7, HD8, HD9, HH8 y HH9 se utilizaron las dos técnicas descritas en el apartado Materiales y métodos, la Resonancia Magnética Nuclear y la Espectrometría de Masas acoplada a un cromatógrafo de Gases. Los compuestos identificados fueron los descritos en la **tabla 13**.

El **compuesto 1** (Lupeol) fue el mayoritario entre los compuestos volátiles de las fracciones HH8 y HH9, y ya había sido identificado con anterioridad en las hojas de castaño por investigadores de la Universidad de Pisa (A. Marsili *et al.*, 1972).

En cuanto al **compuesto 9** (Loliolida), este fue el mayoritario en las fracciones HD7 y HD8; pero también lo conseguimos identificar en la fracción HD6, aunque estaba en menor cantidad.

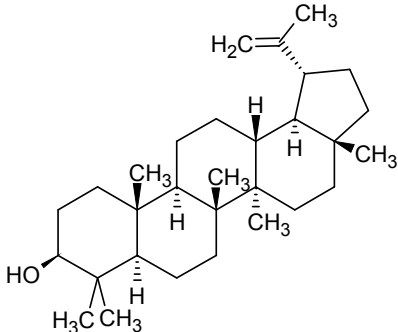
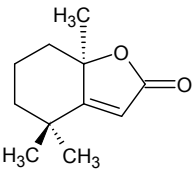
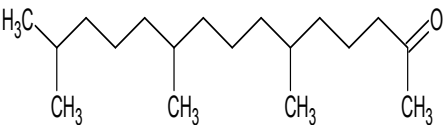


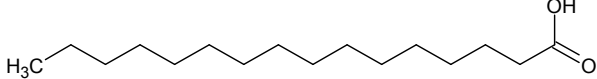
Tras una primera identificación a través de los espectros de masas, no se confirmó si eran los compuestos o podrían ser isómeros. La confirmación completa de sus estructuras se realizó a partir de los experimentos de RMN de ^1H y ^{13}C mono y bidimensional y de masas de alta resolución (HRMS) que se realizaron sobre los compuestos aislados y purificados a partir de las cromatografías en columna sobre gel de sílice que se hicieron a las fracciones donde estos compuestos estaban presentes.

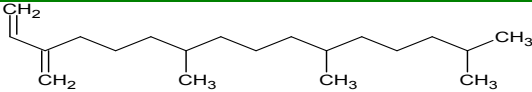
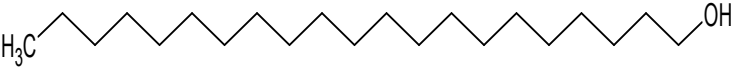
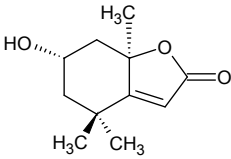
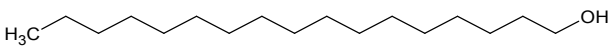
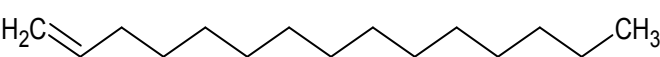
Tras buscar en la bibliografía encontramos varios artículos en los que se relacionaba al Lupeol con el cáncer; por ejemplo: *Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene* (Saleem, 2009). En este artículo de revisión se mencionan todos los efectos y mecanismos de acción de esta molécula sobre muchas células con cáncer. Todos estos artículos sugieren que el Lupeol es un agente anticanceroso que actúa sobre varias dianas. Entre otros es capaz de inhibir el crecimiento celular; provocar la apoptosis de las células carcinogénicas, inhibir el tumor y parar el ciclo celular.

El grupo de investigación de la universidad india de Hamdard dirigido por S. Sultana (Sultana *et al.*, 2003) realizó un estudio en el que confirmaron que el poder quimioprotector del Lupeol, que también afecta a las células tumorales, protegiendo las cadenas de ADN de la mutagénesis provocada por los radicales libres.

Por el contrario, no hay ningún artículo en el que se relacione la Loliolida con el cáncer directamente. Pero en el artículo *Isololiolide, a carotenoid metabolite isolated from the brown alga Cystoseira tamariscifolia, is cytotoxic and able to induce apoptosis in hepatocarcinoma cells through caspase-3 activation, decreased Bcl-2 levels, increased p53 expression and PARP cleavage* (C. Vizetto-duarte et al.,2016) se relaciona su isómero, la isololiolida, con la apoptosis de las células del hepatocarcinoma y se explica el mecanismo de acción.

Tabla 13: Compuestos identificados y fracciones en los que aparecieron.

N°	Nombre común	Estructura	Fracción
1	Lupeol		HH8
			HH9
2	Desoxiloliolida		HH8
			HH9
3	6,10,14-Trimetilpentadecan-2-ona		HH8
			HH9
			HD7
			HD8
			HD9
4	1-Docosanol		HH8
			HH9
5	<i>n</i> -Tetraconosol		HH9
6	Acido palmítico		HH9
			HD6
			HD7
			HD8
			HD9

7	Neofitadieno		HD6 HD9
8	1-Heneicosanol		HD9
9	Loliolida		HD7 HD8
10	1-Heptadecanol		HD9
11	1-Pentadeceno		HD9

10.6 Cromatografía en columna

Se realizó el segundo fraccionamiento de las fracciones en las que se consiguió identificar algún compuesto interesante con la intención de purificar estos compuestos. Se unieron las fracciones HH8 y HH9 por la similitud observada en los análisis mediante TLC y RMN de ^1H realizados, pudiendo contar con una mayor cantidad de compuestos a la hora de fraccionarlos, 94 mg en total de fracción HH8-9. Se hizo lo mismo con las fracciones HD6, HD7, HD8, teniendo en total 87 mg de fracción HD6-8. En las siguientes tablas se recogen los pesos de las fracciones que se obtuvieron tras la cromatografía en columna de HH8-9 y HD6-8:

Tabla 14: Fracciones de HH8 y HH9 (HH8-9) reunidas tras TLC y RMN(H) y el peso de cada una.

Fracción	Peso(mg)
1-6	10
7+9	10
8	11
10-11	6
12-19	13
20-21	8
22-24	11
25-26	9
27-36	24
37	22
Total	121

Nota: Los números que aparecen en las fracciones son el primer y último tubo reunido en cada fracción. Excepto la fracción 7+9, en esta no añadimos la fr. 8 ya que parecía ser un compuesto muy puro.

Tabla 15: Fracciones de HD6, HD7 y HD8 (HD6-8) reunidas tras TLC y RMN(H) y el peso de cada una.

Fracción	Peso(mg)
1-13	9
14-15	6
16-23	4
24-31	8
32-35	6
36-38	9
39-41	6
42-48	6
49	9
50-54	21
55-58	5
59	25
Total	114

Nota: Los números que aparecen en las fracciones son el primer y último tubo reunidos en cada fracción.

10.7 Identificación de los compuestos presentes en las fracciones

❖ Loliolida: Se identificó en la fracción HD6-8 fr16-23, de la que se obtuvieron 4 mg, siendo el rendimiento del compuesto de un 0,014 %. Su espectro HRMS (ESI) confirmó la fórmula molecular $C_{11}H_{16}O$, al observarse el aducto con sodio del ion molecular a 219,0995 m/z (calculada para $C_{11}H_{16}O_3Na$ 219,0992). Después de confirmar la fórmula molecular, las señales observadas en sus espectros de RMN de 1H se compararon con los descritos en bibliografía (Kimura *et al.*, 2002) para Loliolida. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en hercios (Hz).

RMN de 1H ($CDCl_3$), δ (ppm): 1,53 (dd; 14,7 y 3,7 Hz); 1,97 (ddd; 14,5, 3 y 2,3 Hz); 4,33 (q; 3,4 Hz); 1,78 (dd; 13,5 y 3,7); 2,46 (ddd; 14, 3,2 y 2,3 Hz); 5,69(s); 1,47(s); 1,27(s); 1,78(s).

Las señales observadas en su espectro de RMN de ^{13}C datos de carbono se compararon con los del artículo realizado por investigadores de la Universidad Nacional de Taiwán (Kuo *et al.*, 2002):

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$), δ (ppm): 26,5 (q, C-11), 27,0 (q, C-10), 30,6 (q, C-9), 35,9 (s, C-4), 45,6(t, C-5), 47,3 (t, C-7), 66,8 (d, C-6), 86,7 (s, C-8), 112,9 (d, C-2), 171,5 (s, C-3), 182,4 (s, C-1).

❖ Lupeol: Este compuesto se identificó en la fracción HH8-9 fr 8. Al evaporar el disolvente de esta fracción se observó que aparecían unos cristales muy blanquecinos, con un peso de 11 mg y rendimiento de 0,038 %. La aparición de los cristales quiere decir que conseguimos aislar y purificar el compuesto con mucha eficacia. El HRMS confirmó que la fórmula molecular era C₃₀H₅₀O al observarse el aducto con sodio del ion molecular a 449,3761 *m/z* (calculada para C₃₀H₅₀ONa 449,3754). Los datos de los desplazamientos químicos y de las constantes de acoplamiento de RMN de ¹H y ¹³C, se compararon con los del artículo realizado por investigadores de Toronto junto a investigadores del Centro Médico Nacional (México) (Reinolds *et al.*, 1986), confirmando que este compuesto era Lupeol.

Una herramienta útil en la búsqueda de las señales de estos compuestos fue la base de datos Natural Products C13 NMR Database (NAPROC13).

10.8 Evaluación de la actividad citotóxica de las fracciones finales

Se realizó siguiendo el mismo procedimiento que se utilizó en las anteriores evaluaciones de citotoxicidad, siendo las líneas celulares las mismas, obteniendo los resultados que se muestran en la **tabla 16**:

Tabla 16: Actividad citotóxica de las fracciones HH8-9 fr8 y HD6-8 fr16-23; valores expresados en GI₅₀(µg/mL) (media ± SD)

	HH8-9 fr. 8 (Lupeol)	HD 6-8 fr. 16-13 (Loliolida)
NCI-H460	304 ± 14	118 ± 11
HeLa	239 ± 11	97 ± 8
MCF-7	102 ± 9	83 ± 5
HepG2	268 ± 23	90 ± 8
PLP2	>400	196 ± 8

Los resultados obtenidos en este último ensayo no fueron los esperados. Si los compuestos fuesen los responsables únicos de la actividad; los resultados deberían ser mejores, es decir su GI₅₀ (µg/mL) debería ser menor.

11 Conclusiones y perspectivas futuras

En este proyecto se ha llevado a cabo la evaluación de la actividad citotóxica de distintos extractos de las hojas y flores de *Castanea sativa* Miller. Para ello se realizaron extracciones sucesivas con distintos disolventes, progresivos en su polaridad: hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etilo (AcOEt), hidroalcohólica (EtOH/H₂O,70:30) y deccoción acuosa (H₂O, D). El extracto EtOH/H₂O (70:30) se fraccionó para obtener la fracción soluble en H₂O (sH₂O) y la soluble en butanol (sBuOH). Se ha observado que la mayoría de los compuestos presentes en las hojas y las flores son muy polares, ya que las extracciones con disolventes polares fueron las que más rendimiento mostraron.

Los extractos que mostraron mayor actividad citotóxica se fraccionaron, se evaluó la actividad citotóxica de las fracciones y se volvieron a fraccionar, con el objetivo de aislar y purificar algún compuesto presente en las hojas o las flores de *C. sativa* responsable de la actividad detectada frente a distintas células tumorales. Por ello, se realizó una caracterización química de las fracciones bioactivas, buscando el aislamiento de algún compuesto.

Después de la primera evaluación citotóxica de los extractos, los que mostraron mayor actividad fueron FD (flores DCM), HH (hojas Hex) y HD (hojas DCM). Después del primer fraccionamiento se evaluó la citotoxicidad de las fracciones, siendo las más citotóxicas las HD6, HD7, HD8, HD9, HH8 y HH9.

Tras realizar una caracterización química preliminar de estas fracciones, se encontraron dos moléculas muy mayoritarias e interesantes: lupeol en las fracciones de HH y loliolida en las fracciones de HD. También se encontraron otros compuestos: desoxiloliolida, 6,10,14-trimetilpentadecan-2-ona, 1-docosanol, *n*-tetraconasol, ácido palmítico, neofitadieno, 1-heneicosanol, 1-heptadecanol y 1-pentadeceno.

Con la intención de aislar y purificar estos compuestos para poder evaluar su citotoxicidad se realizó un segundo fraccionamiento. La estructura de los compuestos aislados se confirmó mediante espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear, y por comparación de los datos obtenidos con lo publicado en la bibliografía.

La actividad citotóxica observada en los compuestos aislados ha sido menor que la observada en las fracciones, por lo que una primera hipótesis podría ser que dicha actividad podría ser responsabilidad de estos compuestos, pero se potenciaría considerablemente gracias a las

sinergias o interacciones con otros compuestos presentes también en las fracciones. La segunda posibilidad sería que en las fracciones existieran otros compuestos minoritarios y mucho más potentes que loliolida y lupeol, lo que abre la posibilidad de seguir estudiando estos dos tipos de muestras y sus compuestos.

Tras los resultados obtenidos en este trabajo se pueden obtener las siguientes conclusiones generales:

- 1.- Los extractos obtenidos con mayor rendimiento son los extraídos con disolventes polares, con lo cual la mayoría de componentes son polares.
- 2.- Las hojas son más activas que las flores, ya que los resultados obtenidos son mejores en los extractos de las hojas que en los de las flores. Esto se puede deber a que las hojas tienen una composición más compleja, esto repercute en la bioactividad de los extractos.
- 3.- La actividad citotóxica observada en los extractos y fracciones no se debe exclusivamente a los compuestos identificados (lupeol y loliolida), porque los resultados de los ensayos de citotoxicidad muestran una potencia menor que las fracciones. Si la bioactividad observada se debiera a ellos, tendría que verse potenciado su efecto en presencia de otros compuestos presentes en las hojas.

Sería necesario volver a planificar el aislamiento de nuevos compuestos, pero partiendo de una cantidad mucho mayor de muestra en las extracciones. Esto facilitaría que las fracciones tuviesen un mayor peso para poder aislar e identificar un mayor número de compuestos. Así, poder demostrar a qué compuestos se debe la actividad citotóxica de algunos extractos de las hojas y de las flores. Y También se pueden hacer otros tipos de ensayos con los extractos obtenidos, para aprovechar los esfuerzos realizados en la obtención de los extractos y también para obtener la mayor cantidad de información con vistas a un posible uso de *C. sativa*, ya sea sobre su composición química como de su bioactividad.

12 Bibliografía

- Abreu R.M.V, Ferreira I.C., Calhella R. & 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*, Vol. 46: 5800–5806.
- Barreira J.C.M, Ferreira I.C., Oliveira M.B., Pereiro J.A. (2008). Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food chemistry*, Vol. 107: 1106-1111
- Carocho M., Calhella R., Queiroz M.-J., Bento A., Morales P., Soković M., Ferreira I.C. (2014). Infusions and decoctions of *Castanea sativa* flowers as effective antitumor and antimicrobial matrices. *Industrial crops and products*, Vol. 62: 42-46
- Carvalho A.M. (2005). *Etnobotánica del Parque natural de Montesinho. Plantas, tradición y saber popular en el nordeste de Portugal [tesis doctoral]*. Madrid: Universidad autónoma de Madrid;
- Coll J.C. and Bowden B.F. (1986). The application of the vacuum liquid Chromatography to separation of terpene mixture. *Journal of natural products*, Vol.49: 934-936
- Díaz-Reinoso B., Moure A., Domínguez H., Parajó J.C. (2011). Membrane concentration of antioxidants from *Castanea sativa* leaves aqueous extracts. *Chemical Engineering Journal*, Vol. 175: 95-102
- Do Carmo M., de Vasconcelos B.M., Bennett R.N., Quideau S., Jacquet R., Rosa E.A.S., Ferreira-Cardoso J.V. (2010). Evaluating the potencial of chestnut (*Castanea sativa* Miller) fruit pericarp and integument as a source of tocopherols, pigments and polyphenols. *Industrial Crops and Products*, Vol. 31: 301-311

- Hsiung Kuo Y., Mehng Lo J., Fwu Chan Y. (2002). Cytotoxic components from the leaves of *Schefflera taiwaniana*. Journal of the Chinese Chemical Society, Vol.49: 427-431
- Kimura J., Maki N. (2002). New Loliolide derivatives from the Brown Alga *Undaria pinnatifida*. Journal of Natural Products, Vol. 65: 57-58
- Lampire O., Mila I., Raminosa M., Michon V., du Penhoat C.H., Faucheur N., Laprevote O., Scalbert A. (1998). Polyphenols isolated from the bark of *castanea sativa* Miller (Chemical structures and auto-association). Phytochemistry, Vol. 49: 623-631
- López, J.L. USAL Natural Products C13 NMR Database (Naproc-13). <http://c13.usal.es/c13/usuario/views/inicio.jsp?lang=es&country=ES>
- Marsili A., Morelli I. (1972). Some constituents of the leaves of *castanea sativa*. Phytochemistry, Vol. 11: 2634-263
- Neves J.M., Matos C., Moutinho C., Queiroz G., Gomes L.R. (2009). Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Tras-os-Montes (northern of Portugal). Journal of Ethnopharmacology, Vol. 124: 270-283
- Pelletier S.W., Chokshi H.P., Desai H.K. (1986). Separation of diterpenoid alkaloid mixtures using vacuum liquid chromatography. Journal of natural products, Vol. 49: 892-900
- Real Jardín Botánico. Flora Ibérica. 1990; vol. 2:13-15
- Ribeiro B., Rangel J., Valentão P., Andrade P. B., Pereira J. A., Bölke H., Seabra R. M. (2007). Organic acids in two Portuguese chestnut (*Castanea sativa* Miller). Food Chemistry, Vol. 100: 504-508

- Saleem M. (2009). Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. *Cancer Letters*, Vol. 285: 109-115

- Sultana S., Saleem M., Sharma S., Khan N. (2003). Lupeol, a triterpene, prevents free radical mediated macromolecular damage and alleviates benzoílo peroxide induced biochemical alteration murine skin. *Indian Journal of Experimental biological*, Vol.41: 827-831

- Vallejo J.R., Pacheco D.P., Pardo F.V., Jimenez P.M. (2005). Conocimientos de medicina popular de los ancianos de Guadiana del Caudillo. *Revista de estudios extremeños*, Vol. 61: 93-94

- Vichai V., Kirtikara K. (2006). Sulforhodamine B colorimétrico assay for cytotoxicity screening. National center for genetic and biotechnology (BIOTEC).

- Vizetto-Duarte C., Custodio, L. Gangadhar K.N., Lago J.H.G., Dias C., Matos A.M., Neng N., Nogueira J.M., Barreira L., Albericio F., Rauter A.P., Varela J. (2016). Isololiolide, a carotenoid metabolite isolated from the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*, is cytotoxic and able to induce apoptosis in hepatocarcinoma cells through caspase-3 activation, decreased Bcl-2 levels, increased p53 expression and PARP cleavage. *Phytomedicine*, Vol. 23: 550-557

- Cancer. OMS (Organización mundial de la salud). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>; 2015

- Pubchem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/44559699#section=Top>. Última actualización 09-04-2016