



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Aspectos químicos y bioactivos de tres matrices naturales: *Calendula officinalis* L., *Mentha cervina* L. y *Macrolepiota procera* (Scop.) Singer

María Miguel Gordo

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

Isabel C.F.R. Ferreira

Pablo Anselmo García García

M^a Ángeles Castro González

Bragança

2015

Agradecimientos

La realización de este trabajo fin de máster nunca hubiese sido posible sin la ayuda y colaboración de muchas personas, a las que me gustaría demostrar mi sincero agradecimiento por su contribución.

A mis orientadores, la Doctora Isabel Ferreira del Laboratorio de Química y Bioquímica Aplicada del Instituto Politécnico de Bragança (IPB) de Portugal y a los Doctores Pablo A. García y M^a Ángeles Castro del Departamento de Química Farmacéutica de la Universidad de Salamanca (USAL) de España, por su apoyo, simpatía, disponibilidad y enseñanzas en la orientación científica de este trabajo, indispensables en la elaboración del mismo.

A la Doctora Lillian Barros y el Doctor Ricardo C. Calhella del Laboratorio de Química y Bioquímica Aplicada del Instituto Politécnico de Bragança (IPB) de Portugal, por su gran ayuda en la caracterización química y evaluación de la actividad antioxidante y antitumoral, por enseñarme los métodos de ensayo y por su disponibilidad respondiendo mis dudas, y al resto de compañer@s del laboratorio en especial a Carla Pereira por enseñarme con paciencia a desenvolverme en el laboratorio.

Al Doctor José M^a Miguel del Corral del Departamento de Química Farmacéutica de la Universidad de Salamanca (USAL), por su interés y ayuda en la caracterización química y fraccionamiento e identificación de compuestos y al resto de compañer@s del laboratorio.

Al cuerpo docente de este máster, de la Escuela Superior Agraria de Bragança (IPB) y de la Facultad de Farmacia (USAL), por su dedicación en la enseñanza y por todo lo aprendido en estos años.

A mi compañera de máster, Filipa Sobral, un gran apoyo en estos años de máster, por su paciencia y gran ayuda.

A mis amigas, que siempre están para ayudarme, apoyarme y hacerme reír, que aunque lejos siempre estamos cerca.

Y por último, y no menos importante, a mi familia, en especial a mis padres, Pablo y Sagra, y a mi hermano, Rober, que me han “soportado” todos estos años y que siempre están cuando los necesito. Por su cariño y amor incondicional, a ellos está dedicado este trabajo.

¡Muchísimas gracias a todos!

Índice de contenidos

| | |
|--|------|
| Lista de símbolos, siglas y abreviaturas | v |
| Índice de figuras | ix |
| Índice de tablas | xiii |
| Resumen | xv |
| Abstract..... | xvii |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. <i>Calendula officinalis</i> L. | 2 |
| 1.1.1. Nombres vernáculos | 3 |
| 1.1.2. Descripción botánica | 3 |
| 1.1.3. Aplicaciones | 4 |
| 1.1.4. Farmacología | 5 |
| 1.2. <i>Mentha cervina</i> L..... | 8 |
| 1.2.1. Nombres vernáculos | 8 |
| 1.2.2. Descripción botánica | 9 |
| 1.2.3. Aplicaciones | 10 |
| 1.2.4. Farmacología | 11 |
| 1.3. <i>Macrolepiota procera</i> (Scop.) Singer | 12 |
| 1.3.1. Nombres vernáculos | 12 |
| 1.3.2. Descripción | 13 |
| 1.3.3. Aplicaciones | 14 |
| 1.3.4. Farmacología | 14 |
| 1.4. Aspectos Químicos | 15 |
| 1.4.1. Compuestos hidrofílicos | 16 |
| 1.4.2. Compuestos lipofílicos | 19 |
| 1.4.3. Caracterización química de <i>Calendula officinalis</i> L. | 21 |

| | | |
|--------|--|----|
| 1.4.4. | Caracterización química de <i>Mentha cervina</i> L. | 23 |
| 1.4.5. | Caracterización química de <i>Macrolepiota procera</i> (Scop.) Singer | 24 |
| 1.5. | Actividad antioxidante | 26 |
| 1.5.1. | Estrés oxidativo y especies reactivas | 26 |
| 1.5.2. | Antioxidantes | 27 |
| 1.5.3. | Actividad antioxidante de <i>Calendula officinalis</i> L. | 28 |
| 1.5.4. | Actividad antioxidante de <i>Mentha cervina</i> L. | 30 |
| 1.5.5. | Actividad antioxidante de <i>Macrolepiota procera</i> (Scop.) Singer .. | 30 |
| 1.6. | Actividad antitumoral | 32 |
| 1.6.1. | Cáncer | 32 |
| 1.6.2. | Actividad antitumoral de <i>Calendula officinalis</i> L. | 33 |
| 1.6.3. | Actividad antitumoral de <i>Mentha cervina</i> L. | 34 |
| 1.6.4. | Actividad antitumoral de <i>Macrolepiota procera</i> (Scop.) Singer | 34 |
| 2. | OBJETIVOS | 35 |
| 3. | MATERIAL Y MÉTODOS | 37 |
| 3.1. | Material de estudio | 37 |
| 3.2. | Caracterización química y nutricional de <i>C. officinalis</i> y <i>M. cervina</i> y ensayos de bioactividad | 38 |
| 3.2.1. | Patrones y reactivos | 38 |
| 3.2.2. | Preparación de extractos hidrometanólicos e infusiones | 39 |
| 3.2.3. | Valor nutricional | 39 |
| 3.2.4. | Análisis de fitoquímicos | 40 |
| 3.2.5. | Actividad antioxidante | 44 |
| 3.2.6. | Actividad antitumoral | 47 |
| 3.2.7. | Análisis estadístico | 49 |
| 3.3. | Extracción, fraccionamiento, aislamiento e identificación de compuestos de <i>M. procera</i> | 50 |
| 3.3.1. | Patrones, reactivos, material y equipamiento | 50 |

| | |
|---|-----|
| 3.3.2. Obtención de extractos de <i>M. procera</i> | 52 |
| 3.3.3. Extracción de alcaloides de <i>M.procera</i> | 54 |
| 3.3.4. Extracción y estudio del extracto metanólico (E.MeOH)..... | 55 |
| 3.3.5. Fraccionamiento y aislamiento | 60 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 63 |
| 4.1. Caracterización química y nutricional de <i>C. officinalis</i> y <i>M. cervina</i> y ensayos de bioactividad | 63 |
| 4.1.1. Valor nutricional | 63 |
| 4.1.2. Caracterización de compuestos fenólicos | 65 |
| 4.1.3. Caracterización de azúcares, ácidos orgánicos, tocoferoles y ácidos grasos | 73 |
| 4.1.4. Bioactividad: Actividad antioxidante y actividad antitumoral | 79 |
| 4.2. Caracterización química de <i>M. procera</i> | 82 |
| 4.2.1. Extractos obtenidos de <i>M. procera</i> y sus rendimientos..... | 82 |
| 4.2.2. Análisis y estudio de los extractos y fracciones, e identificación de compuestos | 83 |
| 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS | 107 |
| Referencias | 111 |

Lista de símbolos, siglas y abreviaturas

| | |
|-------------------------|---|
| $^1\text{O}_2$ | Oxígeno singlete |
| A | Absorbancia |
| ABTS ⁺ | Ácido 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolín)-6- sulfónico |
| ACHN | Línea celular humana de cáncer de riñón |
| AcOEt | Acetato de Etilo |
| ADN/ DNA | Ácido desoxirribonucleico/ <i>Deoxyribonucleic acid</i> |
| Al.A | Extracto de alcaloides solubles en acetato de etilo |
| Al.B | Extracto de alcaloides solubles en butanol |
| Ando-2 | Línea celular de melanoma humano |
| AOAC | Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (<i>Association of Official Analytical Chemists</i>) |
| ARN/RNA | Ácido ribonucleico/ <i>Ribonucleic acid</i> |
| ASTM | <i>American Society of Testing Methods</i> |
| BHT | Butil-hidroxitolueno |
| CCl ₄ | Tetracloruro de carbono |
| CE | Comisión Europea |
| CEE | Comunidad Económica Europea |
| COLO-205 | Línea celular humana de cáncer de colon |
| DAD | Detector de red de diodos (<i>Diode Array Detector</i>) |
| dcha. | Derecha |
| DCM | Diclorometano |
| DMEM | Medio de cultivo celular Dulbecco's Modified Eagle |
| DPPH | 1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo |
| dw | Peso seco (<i>dry weight</i>) |
| E. MeOHsol.BuOHacet.Acs | Extracto metanólico soluble en butanol acetilado compuestos ácidos |
| E.AcOEt | Extracto de acetato de etilo |
| E.AcOEt.F | Fracciones de la cromatografía del E.AcOEt |
| E.DCM | Extracto de diclorometano |
| E.H ₂ O | Extracto acuoso |
| E.Hexano | Extracto de hexano |
| E.M.A | Reunión de extractos metanólicos solubles en acetato de etilo y una fracción del E.AcOEt |
| E.M.A.T. | Fracciones de la cromatografía de E.M.A. |
| E.M.A.T.pr | Fracciones de la cromatografía preparativa en capa fina de una fracción de E.M.A. |
| E.M.insol.AcOEt | Extracto metanólico insoluble en acetato de etilo |
| E.M.sol.AcOEt | Extracto metanólico soluble en acetato de etilo |
| E.MeOH | Extracto de metanol |

| | |
|-----------------------------------|---|
| E.MeOHacet. | Extracto metanólico acetilado |
| E.MeOHacet.Acs | Extracto metanólico acetilado compuestos ácidos |
| E.MeOHacet.Bs | Extracto metanólico acetilado compuestos básicos |
| E.MeOH-M1 | Extracto metanólico compuestos neutros y básicos solubles en n-BuOH |
| E.MeOH-M2 | Extracto metanólico compuestos ácidos solubles en butanol |
| E.MeOH-M2met. | Extracto metanólico compuestos ácidos solubles en butanol metilados |
| E.MeOH-M2met.acet.sol.A | Extracto metanólico compuestos ácidos solubles en butanol metilados y acetilados extraídos en acetato de etilo |
| E.MeOH-M2met.acet.sol.B | Extracto metanólico compuestos ácidos solubles en butanol metilados y acetilados extraídos en butanol |
| E.MeOHsol.AcOEt | Extracto metanólico soluble en acetato de etilo |
| E.MeOHsol.BuOH | Extracto metanólico soluble en butanol |
| E.MeOHsol.BuOHacet. | Extracto metanólico soluble en butanol acetilado |
| E.MeOHsol.BuOHacet.Bs | Extracto metanólico soluble en butanol acetilado compuestos básicos |
| E.MeOHsol.H₂O | Extracto metanólico soluble en agua |
| EB/AO | Bromuro de etidio/ naranja de acridina |
| EC₅₀ | Concentración de extracto correspondiente al 50% de actividad antioxidante o a 0,5 de absorbancia en el ensayo del poder reductor |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| ESI | Ionización por electrospray |
| EUA/USA | Estados Unidos de América/ <i>United States of America</i> |
| F.Org.AcOEt | Fase orgánica extraída con acetato de etilo |
| F.Org.BuOH | Fase orgánica extraída con butanol |
| FAME | Éster metílico de ácido graso (<i>Fatty acid methyl ester</i>) |
| Fem-x | Línea celular de melanoma humano |
| FID | Detector de ionización de llama (<i>Flame Ionization Detection</i>) |
| FRAP | Poder reductor antioxidante férrico (<i>Ferric reducing antioxidant power</i>) |
| GAE | Ácido gálico |
| GC | Cromatografía de gases |
| GI₅₀ | Concentración de muestra responsable del 50% de la inhibición del crecimiento celular |
| H₂O₂ | Peróxido de hidrógeno |
| HBSS | Solución salina de Hank (Hank's balanced salt solution) |
| HeLa | Línea celular humana de cáncer de cuello de útero |
| Hep2 | Línea celular cancerígena (<i>Human Epidermoid carcinoma strain #2</i>) |
| HepG2 | Línea celular humana de cáncer de hígado |

| | |
|-----------------------------------|--|
| HMPC | Committee on Herbal Medicinal Products |
| HO₂[·] | Radical hidroperoxilo |
| HOCI | Ácido hipocloroso |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta resolución (<i>High performance liquid chromatography</i>) |
| HRMS | Espectros de masas de alta resolución |
| HTC-15 | Línea celular humana de cáncer de colon |
| IPB | Instituto Politécnico de Bragança |
| IR | Espectroscopía infrarroja |
| izq. | Izquierda |
| K562 | Línea celular humana de leucemia mieloide crónica |
| LS174 | Línea celular humana de cáncer de colon |
| MCF-7 | Línea celular humana de cáncer de mama |
| MDA | Malondialdehído |
| MDA-MB-361 | Línea celular humana de cáncer de pecho |
| MIC | Concentración mínima inhibitoria (<i>Minimum inhibitory concentration</i>) |
| MLR | Mezcla reactiva de linfocitos |
| MRC5 | Línea celular humana de cáncer de pulmón |
| MS | Espectroscopía de masas |
| MTT | Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio |
| MUFA | Ácidos grasos monoinsaturados (<i>Monounsaturated fatty acids</i>) |
| NCI-H460 | Línea celular humana de cáncer de pulmón |
| NKL | Línea celular natural killer |
| NO | Óxido nítrico |
| np | No realizado |
| NRK-52E | Células epiteliales normales de riñón |
| O₂^{·-} | Anión superóxido |
| OH[·] | Radical hidroxilo |
| OMS/WHO | Organización mundial de la salud/ <i>World Health Organization</i> |
| ONOO⁻ | Peroxinitrito |
| PBLs | Linfocitos de sangre periférica |
| PHA | Fitohemaglutinina |
| PI | Patrón interno |
| PLP2 | Línea celular de hígado de cerdo |
| PMBC | Células mononucleares de sangre periféricas normales |
| PTLC | Cromatografía preparativa en capa fina (<i>Preparative Thin Layer Chromatography</i>) |
| PUFAs | Ácidos grasos poli-insaturados (<i>Polyunsaturated fatty acids</i>) |

| | |
|----------------------|--|
| RI | Índice de refracción |
| RMN/NMR | Resonancia magnética nuclear/ <i>Nuclear magnetic resonance</i> |
| RNS | Especies reactivas de nitrógeno |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| RPMI | Medio de cultivo celular Roswell Park Memorial Institute |
| RSA | Actividad captadora de radicales |
| RSS | Especies reactivas de azufre |
| SD | Desviación estándar |
| SFAs | Ácidos grasos saturados (<i>Saturated fatty acids</i>) |
| SFB | Suero fetal bovino |
| SRB | Sulforodamina B |
| TAP | Reactividad antioxidante total (<i>Total antioxidant reactivity</i>) |
| TBARS | Sustancias reactivas a ácido 2-tiobarbitúrico (<i>Thiobarbituric reactive substances</i>) |
| TBARS | Ácido tiobarbitúrico |
| TCA | Ácido tricloroacético |
| TEAC | TROLOX equivalent antioxidant capacity |
| TIU | Unidades inhibitoras de la tripsina (<i>Trypsin inhibitor units</i>) |
| TLC | Cromatografía en capa fina (<i>Thin Layer Chromatography</i>) |
| t_r | Tiempo de retención |
| TRAP | Parámetro de la actividad antioxidante total (<i>Total radical-trapping antioxidant parameter</i>) |
| TROLOX | Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico |
| UE | Unión Europea |
| UPLC | Cromatografía líquida ultrarápida (<i>Ultra Fast Liquid Chromatography</i>) |
| USAL | Universidad de Salamanca |
| UV | Espectroscopía ultravioleta |
| UVB | Radiación ultravioleta B (<i>Ultraviolet B</i>) |
| VIH /HIV | Virus de la inmunodeficiencia humana/ <i>Human immunodeficiency virus</i> |
| VIS | Espectroscopía visible |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1: Fotografía de <i>Calendula officinalis</i> L. (María Miguel) | 2 |
| Figura 2: <i>C. officinalis</i> from Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz, by Thomé, 1885 | 3 |
| Figura 3: Fotografía de <i>Mentha cervina</i> L. (Aguiar, 2014) | 8 |
| Figura 4: Partes de la especie <i>Mentha cervina</i> (Castillo, 1996)..... | 9 |
| Figura 5: Fotografía de <i>Macrolepiota procera</i> Singer (García Rollán, 2006) | 12 |
| Figura 6: <i>Macrolepiota procera</i> , ejemplar adulto (centro), y jóvenes (P. Alves, 2011) 13 | |
| Figura 7: Muestras de <i>C. officinalis</i> (izq.), <i>M. cervina</i> (centro) y <i>M. procera</i> (dcha.) . 37 | |
| Figura 8: Microplaca de 96 pocillos para la evaluación de la actividad captadora de radicales libres (DPPH) (izq.) y microplaca de 48 pocillos para la evaluación del poder reductor..... | 45 |
| Figura 9: Espectrómetro de resonancia magnética nuclear (izq.), cromatógrafo de gases (centro) y cromatógrafo líquido de alta resolución (dcha.) | 51 |
| Figura 10: Maceración de <i>M. procera</i> en disolventes y agitación (izq.), filtración a vacío (centro) y eliminación de agua por liofilización (dcha.)..... | 52 |
| Figura 11: Esquema de extracción para la obtención de extractos de <i>M. procera</i> | 53 |
| Figura 12: Extracción de alcaloides de <i>M. procera</i> en medio ácido con disolventes orgánicos..... | 54 |
| Figura 13: Esquema de la reacción de acetilación de alcoholes. | 55 |
| Figura 14: Esquema de extracción de compuestos acetilados con AcOEt y reextracción de las fases acuosas..... | 56 |
| Figura 15: Extractos obtenidos en el fraccionamiento del E.MeOH en AcOEt, BuOH y agua..... | 57 |
| Figura 16: Extracción ácido-base del E.MeOH de <i>M.procera</i> | 58 |
| Figura 17: Esquema de la reacción de esterificación de ácidos carboxílicos..... | 59 |
| Figura 18: PTLC de E.M.A.T.37-46 revelado a 254 nm (izq.), a 366 nm (centro) y rascado (dcha.)..... | 61 |

| | |
|--|-----|
| Figura 19: Perfil fenólico de <i>C. officinalis</i> registrado a 370 nm (izq.) y estructura de los compuestos mayoritarios (dcha.), compuesto 6 ^C (isoramnetina-3- <i>O</i> -ramnosilrutinosa) y compuesto 11 ^C (isoramnetina-3- <i>O</i> -rutinosa)..... | 71 |
| Figura 20: Perfil fenólico de <i>M. cervina</i> registrado a 280 nm, (izq.) y estructura de los compuestos mayoritarios (dcha.), compuesto 9M (ácido trans-rosmarínico) y compuesto 8M (ácido cis-rosmarínico) | 72 |
| Figura 21: Cromatograma CG-MS de E.Hexano con los picos correspondientes a los ácidos grasos y sus tiempos de retención | 88 |
| Figura 22: Cromatograma CG-MS de E.MeOH acetilado (izq.), espectros de masas de manitol peracetilado y de trehalosa peracetilada (dcha.)..... | 90 |
| Figura 23: Estructura y numeración de los átomos de los compuestos α,α y β,β -epidioxiergosterol..... | 92 |
| Figura 24: Ampliación ¹ H-RMN de la fracción E.AcOEtF.6-7 donde aparecen las señales características y las integrales de los compuestos identificados 7 ^P y 8 ^P (α,α y β,β -epidioxiergosterol) (δ sin calibrar)..... | 93 |
| Figura 25: HRMS de la fracción E.AcOEtF.6-7, donde se identificaron los compuestos 7P y 8P (α,α y β,β -epidioxiergosterol) | 93 |
| Figura 26: Estructura y numeración de los átomos de los compuestos 1,2-diacetina (izq.), 1,3-diacetina (centro) y 1-monoacetina (dcha.) | 94 |
| Figura 27: Espectros de masas de 1,3-diacetina (izq.) de 1,2-diacetina (dcha.) y 1-monoacetina (centro) | 96 |
| Figura 28: Cromatograma CG-MS de de la fracción E.M.A.Mat.B-C con los picos correspondientes a los ésteres de ácidos grasos y sus tiempos de retención | 98 |
| Figura 29: ¹ H-RMN (arriba) y ¹³ C-RMN (abajo) de la fracción de E.M.A.T.23-30 insoluble en DCM, donde se identificó el compuesto 16 ^P (uracilo)..... | 99 |
| Figura 30: ¹ H-RMN (arriba) y ¹³ C-RMN (abajo) de la fracción de E.M.A.T.37-46pr.A, donde se identificó el compuesto (ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico)..... | 101 |
| Figura 31: Estructura y numeración de los átomos de glicerol. | 102 |
| Figura 32: Estructura y numeración de los átomos de adenosina | 103 |

Figura 33: HRMS de la fracción E.M.A.T.37-46pr.D, donde se identificó el compuesto 19^P (adenosina) 103

Figura 34: Cromatograma de E.M.insol.AcOEt obtenido por HPLC semipreparativa 105

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1: Clasificación taxonómica de <i>Calendula officinalis</i> L. (The Encyclopedia of Life, 2003a) | 2 |
| Tabla 2: Clasificación taxonómica de <i>Mentha cervina</i> L. (The Encyclopedia of Life, 2003b) | 8 |
| Tabla 3: Clasificación taxonómica de <i>Macrolepiota procera</i> Singer (The Encyclopedia of Life, 2003c) | 12 |
| Tabla 4: Constituyentes fitoquímicos encontrados en <i>Calendula officinalis</i> (Tabla adaptada y datos porcentuales de (Andersen et al., 2010), completada con información de otros autores) | 21 |
| Tabla 5: Constituyentes fitoquímicos encontrados en <i>Mentha cervina</i> . Compuestos fenólicos (infusión y extracto hidroetanólico) y terpenos (aceite esencial). | 23 |
| Tabla 6: Constituyentes micoquímicos encontrados en <i>Macrolepiota procera</i> (Datos recogidos de varios autores) | 25 |
| Tabla 7: Resultados de algunos estudios que evalúan la actividad antioxidante de <i>C. officinalis</i> | 29 |
| Tabla 8: Resultados de algunos estudios que evalúan la actividad antioxidante de <i>M. procera</i> | 31 |
| Tabla 9: Composición nutricional y valor energético de las plantas secas y de las infusiones de <i>C. officinalis</i> y <i>M. cervina</i> . En cada línea, p-value<0,05 significa diferencias significativas en los resultados, (media±SD). | 63 |
| Tabla 10: Tiempos de retención (t_r), longitudes de onda de máxima absorción (λ_{max}), datos del espectro de masas e identificación de los compuestos fenólicos en infusiones y extractos hidrometanólicos de <i>C. officinalis</i> | 68 |
| Tabla 11: Tiempos de retención (t_r), longitudes de onda de máxima absorción (λ_{max}), datos del espectro de masas e identificación de compuestos fenólicos en infusiones y extractos hidrometanólicos de <i>M. cervina</i> | 69 |

| | |
|---|-----|
| Table 12: Cuantificación de los compuestos fenólicos de <i>Calendula officinalis</i> y <i>Mentha cervina</i> en infusiones ($\mu\text{g}/100\text{ mL}$) y en extractos hidrometanólicos ($\text{mg}/100\text{ g}$ extracto). (media \pm SD) | 70 |
| Tabla 13: Composición de azúcares, ácidos orgánicos y tocoferoles de las plantas y de las infusiones de <i>C. officinalis</i> y <i>M. cervina</i> . En cada línea, p -valor $<0,05$ significa diferencias significativas en los resultados, (media \pm SD)..... | 75 |
| Tabla 13 (continuación): Composición de azúcares, ácidos orgánicos y tocoferoles de las plantas y de las infusiones de <i>C. officinalis</i> y <i>M. cervina</i> . En cada línea, p -valor $<0,05$ significa diferencias significativas en los resultados, (media \pm SD). | 76 |
| Tabla 14: Caracterización de los ácidos grasos, en porcentaje relativo, presentes en las muestras de planta seca de <i>C. officinalis</i> y <i>M.cervina</i> . En cada línea, p -valor $< 0,05$ significa diferencias significativas en los resultados, (media \pm SD). | 77 |
| Tabla 15: Actividad antioxidante, actividad antitumoral y hepatotoxicidad, de los extractos metanólicos e infusiones de <i>C. officinalis</i> y <i>M. cervina</i> . En cada línea, p -valor $<0,05$ significa diferencias significativas en los resultados, (media \pm SD)..... | 81 |
| Tabla 16: Rendimiento de los extractos obtenidos por maceración de <i>M.procera</i> | 82 |
| Tabla 17: Rendimiento de los extractos obtenidos por diferentes procedimientos de <i>M.procera</i> | 83 |
| Tabla 18: Listado de compuestos identificados en los extractos de <i>M. procera</i> | 84 |
| Tabla 19: Fracciones y compuestos identificados en la cromatografía del E. AcOEt .. | 91 |
| Tabla 20: Fracciones y compuestos identificados en la cromatografía del E.M.A. | 97 |
| Tabla 21: Fracciones y compuestos identificados en la PTLC de E.M.A.T.37-46 | 100 |

Resumen

Desde la antigüedad se han utilizado las plantas y las setas como fuentes de nutrientes y por sus propiedades medicinales. En la actualidad, continua el interés, en la búsqueda de productos naturales que den lugar a nuevos fármacos, complementos dietéticos o nutraceuticos en alimentos funcionales, de ahí la importancia de su estudio químico y bioactivo.

Con el fin ampliar el conocimiento de estas fuentes naturales y por tanto de sus usos, en este trabajo se han estudiado dos especies de plantas medicinales, *Calendula officinalis* L. y *Mentha cervina* L., y una especie de seta comestible *Macrolepiota procera* (Scop.) Singer.

La caracterización química de *C. officinalis* y *M. cervina* 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-DAD, compuestos fenólicos por HPLC-DAD-MS y ácidos orgánicos por UFLC-DAD. También se evaluaron la actividad antioxidante de los extractos metanólicos e infusiones mediante ensayos *in vitro*: actividad captadora de radicales libres (DPPH), poder reductor, inhibición de la peroxidación lipídica TBARS e inhibición de la decoloración de β -caroteno; y la actividad antitumoral en cuatro líneas celulares tumorales humanas: MCF-7 (carcinoma de mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmón), HCT-15 (carcinoma de colon), HeLa (carcinoma cervical) y HepG2 (carcinoma hepatocelular); y evaluación de la citotoxicidad en cultivos primarios de células de hígado de cerdo (PLP2) por el método de la sulforodamina B (SRB).

El valor nutricional de ambas plantas reveló una composición elevada en hidratos de carbono y baja en lípidos, con un contenido superior en proteínas para *M. cervina*, y valores energéticos muy similares. Sin embargo, presentaron perfiles fenólicos diferentes, *C. officinalis* presentó principalmente flavonoles glicosilados, siendo mayoritario el flavonoide isoramnetina-3-*O*-ramnosilrutinosa; mientras que *M. cervina*, con una composición total de compuestos fenólicos superior, presentó principalmente derivados de cafeoilo, siendo mayoritario el ácido rosmarínico. En cambio, *C. officinalis* mostró la mayor concentración total de azúcares, compuestos

orgánicos y tocoferoles, siendo sus compuestos mayoritarios fructosa, ácido cítrico y α -tocoferol. Los perfiles de ácidos grasos también fueron diferentes, *C. officinalis* mostró una relación de ácidos grasos totales: SFA (76 %) > PUFA > MUFA, mayoritario el ácido palmítico; mientras que la relación de *M. cervina* fue de: PUFA (56 %) > SFA > MUFA, mayoritario el ácido α -linolénico. Los mejores resultados de actividad antioxidante y antitumoral se obtuvieron para el extracto hidrometanólico de *M. cervina* que presentó los valores más bajos de EC₅₀ y que resultó tener actividad antitumoral frente a las cuatro líneas celulares tumorales evaluadas, siendo más activo frente al carcinoma cervical (HeLa). Las infusiones no mostraron actividad antitumoral y ningún extracto presentó hepatotoxicidad.

La caracterización química de *M. procera* 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 diferentes metodologías como extracciones ácido-base, extracción de alcaloides, reacciones de acetilación y metilación, cromatografías en columna y en capa fina preparativas y HPLC. Los diferentes extractos, fracciones y subfracciones se analizaron por diferentes técnicas como ¹H-RMN, ¹³C-RMN, COSY, IR, UV, GC-MS y HRMS, y los resultados se compararon con patrones, bases de datos de espectros y con publicaciones, con el fin de identificar los compuestos presentes.

En total, fueron identificados 18 compuestos en los extractos de *M. procera*, principalmente productos del metabolismo primario: compuestos glucídicos o derivados, el polialcohol manitol y el disacárido trehalosa; compuestos lipídicos o derivados, los ácidos grasos (ácido pentadecílico, ácido palmítico y ácido linoleico), los ésteres metílicos de ácidos grasos (palmitato de metilo, oleato de metilo y linoleato de metilo), los acetilgliceroles (1,2 y 1,3-diacetilgliceroles y 1-monoacetilglicerol), glicerol, 1-octadeceno y dos derivados del ergosterol (α,α -epidioxiergosterol y β,β -epidioxiergosterol); compuestos de los ácidos nucleicos, la base pirimidínica uracilo y el nucleósido adenosina; y un ácido fenólico (ácido *p*-hidroxibenzoico).

De manera general, *C. officinalis*, *M. cervina* y *M. procera* poseen en su composición fitoquímicos de gran interés, lo que contribuye a ampliar su uso a nivel medicinal y su uso en la alimentación como ingredientes funcionales.

Abstract

Since ancient times, plants and mushrooms have been used as sources of nutrients and medicinal compounds. Nowadays, the search for natural products that lead to new drugs, dietary supplements, nutraceuticals or functional foods, is still a hot topic, which justify the importance of their chemical characterization and evaluation of bioactive properties.

In order to expand the knowledge on natural sources and therefore its use, in this work we have studied two species of medicinal plants, *Calendula officinalis* L. and *Mentha cervina* L., and an edible mushroom species, *Macrolepiota procera* (Scop.) Singer.

The chemical characterization of *C. officinalis* and *M. cervina* included the determination of the nutritional and energy value by analysis of protein, fat, ash and carbohydrates, particularly sugars by HPLC-RI and fatty acids by GC-FID, and the determination of other phytochemicals as tocopherols by HPLC-DAD, phenolic compounds by HPLC-DAD-MS and organic acids by UFLC-DAD. The antioxidant activity of the methanol extracts and infusions was evaluated by *in vitro* assays: free radical scavenging activity (DPPH), reducing power, lipid peroxidation inhibition by TBARS and β -carotene bleaching inhibition. The cytotoxicity was also screened in four human tumor cell lines: MCF-7 (breast carcinoma), NCI-H460 (lung carcinoma), HCT-15 (colon carcinoma), HeLa (cervical carcinoma) and HepG2 (hepatocellular carcinoma), and in primary cultures of porcine liver cells (PLP2), by the method of the sulforhodamine B (SRB).

The nutritional value of both plants revealed a high content of carbohydrates and low fat levels, with higher protein content for *M. cervina*, and very similar energy values. However, they presented different phenolic profiles; *C. officinalis* presented mainly glycosylated flavonols, with the flavonoid isorhamnetin-3-*O*-ramnosilrutinose as the most abundant; while *M. cervina*, with higher concentration in total phenolic compounds, presented mainly caffeoyl derivates, with rosmarinic acid as the most abundant. However, *C. officinalis* showed the highest concentration of total sugars, organic acids and tocopherols; the most abundant compounds were fructose, citric acid

and α -tocopherol, respectively. The fatty acid profiles were also different; *C. officinalis* showed: SFA (76%)> PUFA> MUFA, mainly palmitic acid; while *M. cervina* gave: PUFA (56%)> SFA> MUFA, mainly α -linolenic acid. The best results of antioxidant and cytotoxic activities were obtained for the methanolic extract of *M. cervina*, which presented the lowest values of EC₅₀ and exhibited cytotoxicity against the four tumor cell lines tested, being more active against cervical carcinoma (HeLa). Infusions showed no cytotoxicity for the tumor cell lines, and none the extracts showed toxicity against non-tumor cells.

The chemical characterization of *M. procera* included the preparation of extracts and fractions, by sequential maceration, using different polarity solvents: hexane, dichloromethane, ethyl acetate, methanol and water. These extracts were fractionated by different methodologies as acid-base extractions, alkaloids extractions, acetylation and methylation reactions, column and thin layer preparative chromatographs and HPLC. The different extracts, fractions and subfractions were analyzed by different techniques such as ¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, IR, UV, GC-MS and HRMS, and the results compared with standards, spectral databases and publications, in order to identify the compounds present.

In total, 18 compounds were identified in the extracts of *M. procera*, mainly products of primary metabolism: carbohydrates or compounds derivatives, the polyol mannitol and the disaccharide trehalose; lipids or compounds derivatives as fatty acids (pentadecylic acid, palmitic acid and linoleic acid), fatty acids methyl esters (methyl palmitate, methyl oleate and methyl linoleate), acetylated glycerols (1,2 and 1,3 diacetin and 1-monoacetin), glycerol, 1-octadecene and two derivatives of ergosterol (α,α -epidioxyergosterol and β,β -epidioxyergosterol); compounds of nucleic acids, the pyrimidine base uracil and the nucleoside adenosine; and a phenolic acid (*p*-hydroxybenzoic acid).

Overall, *C. officinalis*, *M. cervina* and *M. procera* contain phytochemicals that are of great interest, which contribute to extend its use as functional ingredients, and in medical purposes.

1. INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad se han utilizado las plantas y las setas como alimentos y medicina. Los sistemas de medicina tradicionales las han empleado para sus terapias y han dado lugar a algunos medicamentos importantes todavía en uso hoy en día. En la actualidad, los productos naturales y sus derivados representan más del 50 % de todos los fármacos de uso clínico, la utilización de la medicina tradicional es cada vez mayor y más generalizada, y en las últimas décadas los consumidores cada vez más creen que los alimentos contribuyen directamente a su salud y bienestar, de ahí que continua el interés por la Naturaleza en la búsqueda de productos naturales que den lugar a nuevos fármacos, nutracéuticos o alimentos funcionales. Además, es muy importante garantizar la calidad, eficacia y seguridad de estos productos, mediante la ampliación de la base de conocimientos y la investigación (Barros et al., 2006; Ferreira et al., 2010; Gurib-Fakim, 2006; WHO, 2013).

Con el fin de ampliar el conocimiento de estas fuentes naturales y por tanto de sus usos, en este trabajo se seleccionaron tres matrices naturales: dos especies de plantas medicinales, *Calendula officinalis* L. y *Mentha cervina* L., para caracterizar su composición química y evaluar sus propiedades bioactivas, tanto de la especies vegetales aisladas como de preparaciones (extractos hidrometanólicos e infusiones), y también una especie de seta comestible *Macrolepiota procera* (Scop.) Singer, para caracterizar su composición química en términos de aislamiento e identificación de compuestos.

De las matrices de estudio *C. officinalis* es una especie estudiada farmacológicamente y ampliamente utilizada en cosmética, aunque la información nutricional y caracterización química es escasa. *M. cervina*, en general, es una especie poco estudiada y *M. procera*, aunque presenta información sobre su valor nutricional y caracterización química, es una especie que hasta el momento no ha sido estudiada en la búsqueda de nuevos compuestos. Este trabajo complementa y amplía la información de todas ellas.

1.1. *Calendula officinalis* L.

Calendula officinalis L. (**Figura 1**) es una especie herbácea, de las aproximadamente 10-25 especies que conforman el género caléndula, dependiendo del tratamiento taxonómico, perteneciente a la familia asteraceae (compositae), (**Tabla 1**) (Nora et al., 2013). Sinónimos aceptados de esta especie son: *Calendula ×antamariae* Font Quer; *Calendula aurantiaca* Kotschy ex Boiss.; *Calendula eriocarpa* DC.; *Calendula sinuata* var. *aurantiaca* (Klotzsch ex Boiss.) Boiss.; *Calendula officinalis* var. *prolifera* Hort.; *Caltha officinalis* (L.) Moench; *Calendula hydruntina* (Fiori) Lanza *Calendula officinalis* var. *Officinalis* y *Calendula prolifera* Hort. ex Steud. (Flann, 2009).

No se conoce el origen, pero se cree que es una creación a partir de razas silvestres de caléndula, no muy distinta de la *Calendula arvensis* L. (Font Quer, 1961). Se utiliza en la región mediterránea desde la época de los antiguos griegos y con anterioridad era conocida por los hindús y los árabes. El nombre genérico, caléndula, deriva del latín calendulae que significa “a lo largo de los meses”, y alude al largo período de floración que tiene esta planta; el nombre específico, officinalis, expresa su carácter medicinal (Centeno, 2004).

Tabla 1: Clasificación taxonómica de *Calendula officinalis* L. (The Encyclopedia of Life, 2003a)



| Clasificación Científica | |
|--------------------------|---------------------------------|
| Reino | <i>Plantae</i> |
| División | <i>Magnoliophyta</i> |
| Clase | <i>Magnoliopsida</i> |
| Subclase | <i>Asteridae</i> |
| Orden | <i>Asterales</i> |
| Familia | <i>Asteraceae</i> |
| Subfamilia | <i>Asteroideae</i> |
| Tribu | <i>Calenduleae</i> |
| Género: | <i>Calendula</i> |
| Especie: | <i>Calendula officinalis</i> L. |

Figura 1: Fotografía de *Calendula officinalis* L. (María Miguel)

1.1.1. Nombres vernáculos

Es conocida vulgarmente en **castellano** como: caléndula, maravilla, caléndula oficial, clavel de muerto, corona de rey, chuncho, espantanovios, flamenquilla, flor de muerto, flor de todos los meses, maravilla de jardín, marquesita, mercadela, reinita, virreina; **catalán**: boixac, caldiró, calèndula, garronada, gojat, groguet, jaumet; **euskera**: ilherrilili, illen; **alemán**: ringelblume, todtenblume; **francés**: souci, souci des jardins, souci des vignes; **inglés**: marigold, calendula, common marigold, pot marigold, scotch marigold; **italiano**: calendola, calendula, calenzola, callandria, calta, calta di tutti i tempi, cappuccine, fior d'ogni messe, fior rancio, fiorrancio; **portugués**: belas noites, bem me queres, boas noites, calèndula hortense, cuidados, maravilha, maravilha bastarda (Aedo, 1999; Centeno, 2004).

1.1.2. Descripción botánica

Calendula officinalis L., es una planta herbácea, aromática, glandular, de anual a perenne, leñosa solo en la base. El tallo de (17-)20-50(-70) cm, es erecto o procumbente, ramificado y con hojas casi hasta el ápice. Las hojas son alternas, simples, oblongo lanceoladas, estrechamente obovadas, oblongas o espatuladas, cortamente agudas u obtusas de glandular-pubescente a esparcidamente aracnoideo-flocosas y generalmente de subenteras a dentadas. Las flores externas son liguladas y femeninas, a menudo de 2 cm, de color amarillo o anaranjado; las flores tubulosas son generalmente concoloras con las liguladas, a veces parduzcas. Los aquenios no presentan vilano, los exteriores son arqueados, con el dorso cubierto de espinas y alternan con otros cimbiformes más cortos, de forma navicular. Florece desde abril hasta noviembre (Centeno, 2004).



Figura 2: *C. officinalis* from Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz, by Thomé, 1885

1.1.3. Aplicaciones

Uso medicinal:

La medicina tradicional y las farmacopeas describen el uso de las flores de *C. officinalis* L. para el tratamiento externo de cortes superficiales, inflamaciones menores de la piel y de la mucosa bucal, heridas y *ulcus cruris*. En la medicina popular, sin evidencias experimentales o clínicas, también se describe su uso para el tratamiento de la amenorrea, angina de pecho, fiebre, gastritis, hipotensión, ictericia, reumatismo y vómitos (WHO, 2002).

El modo de empleo en la medicina tradicional es la administración tópica en forma de infusión, extracto líquido, tintura o aceite (Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), 2008).

Uso cosmético:

Tanto la sustancia vegetal derivada de la flor de *C. officinalis*, como su extracto y aceite tienen una función emoliente y se encuentran en el inventario de ingredientes empleados en los productos cosméticos (Comisión Europea, 2006).

Los extractos de *C. officinalis* L. se emplean en diferentes productos cosméticos y de higiene corporal, en formulaciones tan diversas como lociones, aceites, cremas, champús, geles, jabones, sprays, ..., incluyendo formulaciones específicas para bebés. Estos productos se pueden emplear en la piel, pelo y ojos, con usos variados como limpieza, maquillaje, depilación, afeitado y como desodorizantes entre otros (Andersen et al., 2010)

Uso alimentario:

Las flores externas son utilizadas como saborizante, ligeramente salino, y colorante, sustituto del azafrán (Khan & Abourashed, 2010).

1.1.4. Farmacología

Diversos estudios farmacológicos confirman que las flores de *C. officinalis* poseen varias actividades, que explican sus usos tradicionales y la posibilidad de futuras aplicaciones en medicina (Muley et al., 2009). Las actividades antioxidante y antitumoral se desarrollan en los apartados 1.5 y 1.6.

Actividad antiinflamatoria, antiedematosa y cicatrizante

La inhibición de la inflamación fue demostrada, en el modelo de edema auricular inducido por TPA en ratones, para varias fracciones, siendo la fracción de acetato de etilo del extracto metanólico la de mayor poder inhibitorio (84 %), y para algunos glucósidos triterpénicos del tipo oleanano aislados de esa fracción (Ukiya et al., 2006). También se demostró la reducción del edema auricular inducido por aceite de croton para ésteres de faradiol y ψ -taraxasterol aislados (Zitterl-Eglseer et al., 1997) y la reducción de la inflamación, dependiente de la dosis, en el modelo de edema plantar de rata inducido por carragenina para el extracto acuoso (Reza Farahpour, 2014). La actividad cicatrizante del extracto etanólico en ratas, fue comprobada en quemaduras térmicas y mucositis oral, por vía tópica, y en heridas inducidas por punción, por vía oral, apreciándose mejoría significativa en el proceso curativo (Parente et al., 2012; K Chandran Preethi & Kuttan, 2008; Tanideh & Tavakoli, 2013). En ensayos clínicos en humanos, una pomada a base de caléndula resultó altamente efectiva para la prevención de la dermatitis aguda durante la radiación contra el cáncer de pecho (Pommier et al., 2004), un aceite con extracto de caléndula parece acelerar la curación con efectos positivos sobre la epitelización de las úlceras venosas de las piernas (Duran et al., 2005) y un enjuague bucal parece efectivo en la reducción de la intensidad de la mucositis orofaríngea producida por la radiación, aunque no la previene completamente (Babae et al., 2013).

Actividad anti-VIH y antiviral

El extracto en diclorometano de las flores de caléndula causó la reducción de la actividad de la transcriptasa inversa del HIV-1, lo que sugiere actividad anti-VIH (Kalvatchev, Walder, & Garzaro, 1997). La tintura de las flores suprimió la replicación de los virus del herpes simple, influenza A2 e influenza APR-8 *in vitro* (WHO, 2010)

Actividad antibacteriana y antifúngica

El extracto metanólico de las flores de caléndula demostró actividad antibacteriana contra bacterias periodontales, anaerobias y facultativas. Los resultados mostraron inhibición para *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter jejuni*, *Veillonella parvula*, *Eikenella corrodens*, *Peptostreptococcus micros* y *Actinomyces odontolyticus* (MIC \geq 2048 mg/L) y para *Prevotella spp* (MIC \leq 2048 mg/L) (Iauk et al., 2003). Los extractos metánolicos y etanólicos mostraron actividad antimicrobiana, mediante el método de difusión de disco, frente a hongos y bacterias gram-positivas y gram-negativas como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger* (Efstratiou et al., 2012). El aceite esencial también mostró buena actividad antifúngica, mediante el método de difusión de disco, frente a *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii* y *Rhodotorella spp.* (Gazim et al., 2008)

Actividad inmunoestimulante e inmunomoduladora

Polisacáridos aislados de extractos de caléndula mostraron actividad inmunoestimulante, al mejorar la fagocitosis de granulocitos humanos, mediante varios test inmunológicos *in vitro* (Varljen et al., 1989; Wagner et al., 1984). El extracto etanólico (70 %) de caléndula reveló actividad inmunomoduladora, por la capacidad para mejorar la proliferación de linfocitos después de la estimulación con células alogénicas. Los resultados no mostraron actividad mitogénica directa sobre los linfocitos o timocitos humanos, pero si un efecto inhibitorio completo sobre la proliferación de linfocitos en presencia de PHA y un efecto estimulante sobre una mezcla reactiva de linfocitos (MLR) (Amirghofran et al., 2000).

Actividad hepatoprotectora

La actividad hepatoprotectora, del extracto etanólico, fue comprobada en hígados de rata intoxicadas por CCl₄ (Rusu et al., 2005). También se estudió la actividad hepatoprotectora, *in vivo* en ratas, de los extractos etanólico y acuoso de caléndula, frente al estrés oxidativo inducido por aflatoxinas. Los resultados revelaron que los extractos poseen potente actividad protectora, debido a sus propiedades antioxidantes y a su actividad como captadora de radicales libres (Abdel-Aziem et al., 2014; Hamzawy et al., 2013).

Actividad espasmolítica, espasmogénica y gastroprotectiva

Se comprobó la presencia de componentes espasmolíticos y espasmogénicos en las flores de caléndula, mediante su efecto bloqueante de los canales de calcio y su acción colinérgica respectivamente, en un estudio realizado *in vivo* en conejos (Bashir et al., 2006). El extracto metanólico y su fracción soluble en 1-butanol de las flores de caléndula mostraron efecto hipoglucémico, actividad inhibidora del vaciado gástrico, y efecto gastroprotector, asociada a la presencia de saponinas, en estudios realizados *in vivo* en ratones y ratas (Yoshikawa et al., 2001).

Actividad insecticida

El extracto de acetona:metanol 2:1 (v/v) presentó actividad insecticida frente a *Oncopeltus fasciatus* Dallas, mostrando toxicidad relativamente alta e impacto en su desarrollo (Alexenizer & Dorn, 2007).

Actividad inhibitoria de la frecuencia cardíaca y cardioprotectora

El extracto acuoso de caléndula fue probado en el corazón de ratas, encontrándose que inhibe la contractilidad del ritmo cardíaco hasta en un 100 % a una dosis de 0,3 mg/L (Pérez-Gutiérrez et al., 1998). La caléndula también demostró cardioprotección, contra la enfermedad isquémica del corazón, en un ensayo en corazones de rata perfundidos (Ray et al., 2010)

Actividad genotóxica y antígenotóxica

El extracto acuoso y el extracto etanólico-acuoso de caléndula mostraron efecto antígenotóxico a bajas concentraciones (ng/mL) mientras que a altas concentraciones (g/mL) exhibieron efecto genotóxico en el ensayo de síntesis de DNA no programada en cultivos de hígado de rata (Pérez-Carreón et al., 2002). Este efecto quimiopreventivo o genotóxico dependiendo de la dosis también se produjo en modelos de hepatocarcinoma *in vivo* en ratas (Barajas-Farias et al., 2006). El extracto de propilenglicol también mostró efecto antígenotóxico, por su actividad antioxidante, basándose en el estudio del daño oxidativo del DNA y de la peroxidación lipídica en cerdos jóvenes en crecimiento (Frankič et al., 2009).

1.2. *Mentha cervina* L.

Mentha cervina L. es una de las 20 especies de mentas que viven principalmente en Eurasia y África. Esta especie crece en bordes de zonas encharcadas, a veces temporalmente, preferentemente en lugares arenosos o con gravas, ha sido cultivada en Europa central desde el siglo XVI y utilizada como medicinal, en parte debido a su finísimo aroma (R. Morales, 2010). Otros sinónimos aceptados de esta especie son: *Preslia cervina* (L.) Fresenius, *Mentha multifida* Stokes, *Mentha punctata* Moench, *Preslia glabriflora* Opiz, *Preslia villiflora* Opiz y *Pulegium cervinum* (L.) Mill (The Plant List, 2010).

Tabla 2: Clasificación taxonómica de *Mentha cervina* L. (The Encyclopedia of Life, 2003b)



| Clasificación Científica | |
|--------------------------|--------------------------|
| Reino | <i>Plantae</i> |
| División | <i>Magnoliophyta</i> |
| Clase | <i>Magnoliopsida</i> |
| Orden | <i>Lamiales</i> |
| Familia | <i>Lamiaceae</i> |
| Subfamilia | <i>Nepetoideae</i> |
| Tribu | <i>Mentheae</i> |
| Género: | <i>Mentha</i> |
| Especie: | <i>Mentha cervina</i> L. |

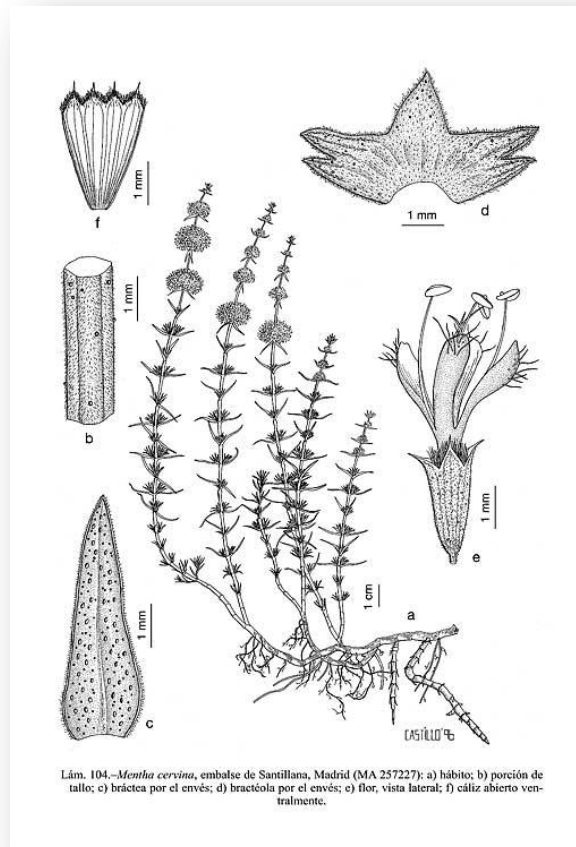
Figura 3: Fotografía de *Mentha cervina* L. (Aguiar, 2014)

1.2.1. Nombres vernáculos

M. cervina es conocida vulgarmente en **castellano** como: poleo, poleo cervuno, poleo de ciervo, poleo de hoja angosta, poleo de hoja estrecha, poleo de los mosquitos, poleo fino, poleo menudo; **catalán**: menta de cérvol, poliol blanch, poliol de cérvol; **gallego**: poeixo de cervo, poeixos; **inglés**: hart's pennyroyal; **portugués**: alecrim-dorrio, erva-peixeira, hortelã-crespa, hortelã-da-ribeira, hortelã-dos campos, hortelã-dos-pântanos, surguilheira (Aedo, 1999; Silva et al., 2010).

1.2.2. Descripción botánica

Es una planta herbácea de 10-42 cm, con estolones reptantes, a veces muy largos, los acuáticos que nacen de los tallos leñosos o de las raíces, rizomatosos, gruesos, de sección redondeada, color morado o blanquecino, con hojas reducidas, escuamiformes. Tallos glabros o con pelos muy pequeños, con frecuencia muy foliosos y con fascículos axilares de hojas pequeñas. Hojas 7-32 x 0,7-4,5 mm, lineares o estrechamente lanceoladas, con nervio central blanco y marcado por el envés, glabras o con pelos muy cortos, escábridas en el nervio central, las florales, a veces, cortamente ciliadas, puenteado-glandulares, a veces conduplicadas. Inflorescencia formada por 3-8 verticilastros de 1,5-2 cm diámetro, más o menos esféricos, en general con entrenudos visibles, coronada por un verticilio de hojas. Brácteas sobresalientes del contorno de la inflorescencia; bractéolas digitadas, con 3-5 grandes dientes, a veces mucronadas, con glándulas esferoidales por el envés. Cáliz 2-2,5(3,5) mm, con carpostegio; dientes mucronados, glabros o pelosos. Corola de 4 mm, color blanco o crema, con 4 lóbulos de 1,5-2,5 mm, finamente pelosos por su parte externa. Estambres hasta de 3,5 mm, exertos; anteras con filamento de inserción central y tecas separadas. Núculas elipsoides, trígonas, más o menos agudas, pelosillas, de color castaño (R. Morales, 2010).



Lám. 104.-*Mentha cervina*, embalse de Santillana, Madrid (MA 257227): a) hábito; b) porción de tallo; c) bráctea por el envés; d) bractéola por el envés; e) flor, vista lateral; f) cáliz abierto ventralmente.

Figura 4: Partes de la especie *Mentha cervina* (Castillo, 1996).

1.2.3. Aplicaciones

Uso alimentario y uso medicinal:

M. cervina L. es una planta aromática usada tradicionalmente en Portugal como condimento alimentario, principalmente en recetas de pescado, sopa de pescado y “açordas”, juntamente con *M. pulegium* L. o como sustituto. También se ha empleado por sus propiedades medicinales en la prevención de diferentes desórdenes gástricos e inflamaciones del tracto respiratorio (Póvoa et al., 2009; L Rodrigues et al., 2010). Se ha considerado tradicionalmente que posee las mismas propiedades que *M. pulegium* L. como tónico estomacal, digestivo y carminativo, administrada en forma de tisana o macerada en vino, y para ahuyentar las pulgas (Font Quer, 1961).

Uso industrial:

Las esencias de poleo tienen interés desde el punto de vista comercial por ser ampliamente utilizadas como saborizantes y aromatizante en la industria farmacéutica, alimenticia y confitera. Pequeñas diferencias en la composición química suponen grandes diferencias en sabor, aroma y precio. La pulegona, compuesto mayoritario del aceite esencial, es un compuesto tóxico, reportándose casos de hepatotoxicidad e intoxicación en humanos y animales (Anderson et al., 1996; Burzaco et al., 1992). La UE según la directiva 88/388/CEE estipula la concentración máxima permitida de la pulegona de 25 mg/kg en productos alimenticios y 100 mg/kg en bebidas, con excepción de 250 mg/kg en las bebidas aromatizadas con menta picante o con menta y 350 mg/kg en los productos de confitería con menta (CEE, 1988).

1.2.4. Farmacología

Además de las actividades antioxidante y antitumoral que se desarrollan en los apartados 1.5 y 1.6, se ha estudiado la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *M. cervina*.

Actividad antifúngica y antibacteriana

La actividad antifúngica del aceite esencial de *M. cervina* fue evaluada frente a levaduras, *Aspergillus* y cepas de dermatofitos. Los resultados mostraron actividad antifúngica frente a todos los microorganismos testados, siendo la muestra con menor contenido en pulegona (77,0 % isomentona y 8,7 % pulegona), más activa frente a los dermatofitos, principalmente *Epidermophyton floccosum* (Gonçalves et al., 2007).

Un estudio mediante el método de difusión en agar con pozos y discos, mostró que los extractos acuoso e hidroetanólico de *M. cervina* no inhibieron ninguno de los microorganismos testados (*Bacillus cereus*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Candida albicans* y *Yarrowia lipolytica*). El aceite esencial demostró una actividad antimicrobiana más elevada para *Y. lipolytica*, *C. albicans* y *E.coli* (Martins da Rocha, 2011).

La actividad antibacteriana del aceite esencial de *M. cervina*, fue evaluada frente a 23 cepas bacterianas, incluidas las multirresistentes. Los resultados mostraron que la mayor actividad fue contra las bacterias Gram-negativas, *Escherichia coli* y *Acinetobacter baumannii* (MIC ~1 mg/mL). Las mezclas complejas de los aceites esenciales revelaron mayor actividad que los componentes aromáticos individuales, lo que indica un efecto sinérgico de sus diferentes componentes aromáticos. Estos resultados muestran el papel potencial de *M. cervina* como agente antibacteriano y valida el uso tradicional de esta planta (Rodrigues et al., 2011).

1.3. *Macrolepiota procera* (Scop.) Singer

Macrolepiota procera (Scop.) Singer es un hongo de la familia agaricácea, anteriormente del género *Lepiota*, que agrupaba a especies de características tan diversas que dio lugar a nuevos géneros, entre ellos, el género *Macrolepiota*. Es frecuente en verano y otoño, sobre todo en suelos ácidos y abunda en huertas poco trabajadas, viñas y bosques claros (García Rollán, 2006). Sinónimos aceptados de *M. procera* son: *Lepiota procera*, *Macrolepiota* sp. Boekhout 1049, *Lepiota procera* (Scop.) Gray 1821 y *Macrolepiota procera* (Scop.) Singer 1948, siendo este último el más utilizado (García Rollán, 2006; The Encyclopedia of Life, 2003c).

Tabla 3: Clasificación taxonómica de *Macrolepiota procera* Singer (The Encyclopedia of Life, 2003c)



| Clasificación Científica | |
|--------------------------|--|
| Reino | <i>Fungi</i> |
| Filo | <i>Basidiomycota</i> |
| Clase | <i>Basidiomycetes</i> |
| Orden | <i>Agaricales</i> |
| Familia | <i>Agaricaceae</i> |
| Género: | <i>Macrolepiota</i> |
| Especie: | <i>Macrolepiota procera</i> (Scop.) Singer (1948) |

Figura 5: Fotografía de *Macrolepiota procera* Singer (García Rollán, 2006)

1.3.1. Nombres vernáculos

Es conocida vulgarmente en **castellano** como: Parasol, apagavelas, gallipierna, cocorra, potrecón, fonqueta, paloma, maneta; **euskera**: galamperna; **gallego**: choupín, cachote, patamella, monxo, zarrota; **alemán**: parasol; **francés**: lépiote élevé; **inglés**: parasol mushroom; **portugués**: guarda-sol, marifusa (García Rollán, 2006; The Encyclopedia of Life, 2003c)

1.3.2. Descripción

Es un hongo saprófito, bastante grande y alto, en forma de sombrilla, que se ve desde lejos (García Rollán, 2006). El sombrero de 8,5-40 cm de diámetro, al principio es ovoide, después convexo y finalmente aplanado con un mamelón más o menos pronunciado. El borde excedente con mechones algodonosos. Cutícula fácilmente separable con un disco central bien delimitado de marrón a pardo-ocráceo, disociada hacia la periferia en escamas concéntricas y contrastadas sobre el fondo algodonoso blanquecino o crema. Las láminas, bajo el sombrero, son libres, distantes del pie por un collarium, anchas, de aristas irregulares; blanquecinas de joven y crema con la edad. El pie de 10-40 x 1,5-3,2 cm, de fistuloso a hueco, cilíndrico o progresivamente engrosado hacia la base, para terminar en un engrosamiento bulboso; superficie de color blanquecina a crema por encima de la zona anular, por debajo con escamas dispuestas en zig-zag y de colores similares al sombrero. Anillo amplio, blanquecino y de consistencia algodonosa por arriba, pardo-ocráceo por debajo. La esporada es blanca. La carne es blanca, inmutable, blanda en el sombrero, parte comestible, y fibrosa en el pie, de olor suave agradable y sabor dulce (Hermosilla & Sánchez, 2007).



Figura 6: *Macrolepiota procera*, ejemplar adulto (centro), y jóvenes (P. Alves, 2011)

1.3.3. Aplicaciones

Uso alimentario:

M. procera es un hongo silvestre comestible muy apreciado, los sombreros admiten cualquier tipo de preparación culinaria y tienen fama de sabrosos (García Rollán, 2006). Es una fuente de nutrientes y antioxidantes importantes, pudiendo ser utilizado en la dieta como nutracéutico y/o alimento funcional para mantener y promover la salud, la longevidad y la calidad de vida (Fernandes et al., 2012).

1.3.4. Farmacología

Se han reportado estudios sobre la actividad antimicrobiana y la actividad como inhibidor enzimático de *M. procera*, además de las actividades antioxidante y antitumoral que se desarrollan en los apartados 1.5 y 1.6.

Actividad antimicrobiana

Un estudio sobre una cepa aislada y cultivada de *M. procera*, mediante el método de difusión de disco, frente a varios microorganismos, reveló su actividad como antibiótico frente a *Bacillus subtilis* (Dyakov et al., 2011).

La actividad antimicrobiana del extracto metanólico de *M. procera* fue determinada, mediante el método de disco, frente a bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*), Gram-negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) y *Candida albicans*. Los resultados mostraron baja actividad antimicrobiana frente a estos microorganismos (Ozen et al., 2011). En otro estudio también se determinó su actividad mediante el método de microdilución y ensayo colorimétrico, frente a bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli* y *Proteus mirabilis*), y Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, sensible y resistente a meticilina). Los resultados revelaron una mayor actividad frente a *S. aureus* (sin grandes diferencias entre muestras congeladas, liofilizadas o con irradiación γ) (Alves et al., 2015).

Actividad como inhibidor enzimático

La actividad de *M. procera* como inhibidor enzimático de tripsina, resultó ser baja (1,48-2,65 TIU/mg materia seca), aunque superior a ciertos cereales e inferior a algunas fabáceas. Esta actividad inhibidora de tripsina es importante en las especies comestibles, ya que puede influir en la digestión (Vetter, 2000).

1.4. Aspectos Químicos

Tanto las plantas como las setas son fuentes de productos naturales, cuya diversidad y complejidad es enorme, por lo que es necesario clasificarlos en grupos basándose en diferentes criterios: clasificación botánica, actividad farmacológica u origen biosintético. Según esta última clasificación se dividen en productos del metabolismo primario (glúcidos, lípidos, aminoácidos, péptidos y proteínas) 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, “sustancias que pueden considerarse un alimento o parte de un alimento y que proveen beneficios médicos o de salud, incluyendo la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad”. 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 (glutatión, selenio, etc) (Andlauer & Fürst, 2002).

1.4.1. Compuestos hidrofílicos

a) *Compuestos fenólicos*

Los compuestos fenólicos forman un amplio grupo, donde se han reportado más de 8000 estructuras fenólicas diferentes, distribuidas ampliamente en el reino vegetal (Crozier et al., 2008) y también en el reino fungi (Ferreira et al., 2009). Su biosíntesis involucra las rutas del shikimato, de los fenilpropanoides y de los flavonoides y como metabolitos secundarios muestran efectos de defensa, crecimiento y desarrollo. Contienen al menos un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo, y son capaces de formar desde moléculas de bajo peso molecular a estructuras grandes y complejas. Generalmente aparecen como glucósidos o ésteres, pero también libres debido a su estabilidad. (Carocho & Ferreira, 2013b). Son compuestos que poseen actividad antioxidante que depende de la participación del hidrógeno fenólico en las reacciones de oxidación, de la estabilidad del radical antioxidante formado durante la reacción y de las sustituciones químicas de la estructura (Ferreira et al., 2009).

Según su estructura, los compuestos fenólicos se dividen en varios grupos:

Los **ácidos fenólicos** están compuestos por los derivados de los ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinámico. Pertenecientes al grupo de **ácidos hidroxibenzoicos**, con un esqueleto C6-C1, se encuentran, por ejemplo, el ácido gálico, ácido protocatéquico, ácido vainillínico, ácido siríngico, y también el subgrupo de **taninos**, tanto hidrolizables como condensados. Los **ácidos hidroxicinámicos**, con un esqueleto C6-C3, como el ácido cafeico, el ácido *p*-cumárico y el ácido ferúlico, entre otros, raramente se encuentran libres. Su actividad antioxidante se debe a que actúan como quelantes y como captadores de radicales libres, con especial afinidad por los radicales hidroxilo y peroxilo, el anión superóxido y los peroxinitritos (Carocho & Ferreira, 2013a, 2013b).

Los **flavonoides** son el grupo más numeroso. Son compuestos polifenólicos de 15 carbonos, que derivan de las chalconas, formados por tres anillos aromáticos de esqueleto C6-C3-C6, con numerosos sustituyentes. Las principales subclases de flavonoides son los flavonoles, flavonas, flavanoles, isoflavonas, flavanonas y antocianidinas (Carocho & Ferreira, 2013b; Crozier et al., 2008). Su actividad antioxidante se debe a los grupos hidroxilo fenólicos unidos a los anillos que pueden actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno, desactivadores de oxígeno

singlete, captadores de radical superóxido e incluso como quelantes metálicos (Carocho & Ferreira, 2013a).

Las **cumarinas** son compuestos que derivan de los ácidos fenólicos, en cuya estructura C6-C3 un anillo bencénico se fusiona con un heterociclo de oxígeno. Se pueden clasificar en tres grupos: las hidroxycumarinas, como la umbeliferona, el esculetol y sus derivados, las furanocumarinas y las piranocumarinas. Las **xantonas** son compuestos heterocíclicos de esqueleto C6-C1-C6, y aparecen principalmente en familias de plantas superiores. Las **chalconas** poseen un esqueleto C6-C3-C6, sin anillo heterocíclico, y son intermediarios en la síntesis de flavonoides. Los **estilbenos** de estructura C6-C2-C6, derivan de la misma ruta biosintética que los flavonoides, siendo el más importante el resveratrol. Las **quinonas**, de estructuras muy diversas, son compuestos coloreados, que se clasifican en benzoquinonas (estructura bencénica), naftoquinonas (estructura de naftaleno) y antraquinonas (estructura antracénica). Las **ligninas** son polímeros muy ramificados, compuestos por tres alcoholes simples conocidos como monolignoles, presentes en la pared celular de algunos tejidos vegetales. Los **lignanós** son dímeros de unidades C6-C3, químicamente relacionados con la lignina (Carocho & Ferreira, 2013b; Castillo García & Martínez Solís, 2007).

b) Azúcares

Los azúcares, también llamados carbohidratos o hidratos de carbono, son los compuestos orgánicos más abundantes en la naturaleza, casi todas las plantas y los animales los sintetizan y metabolizan, usándolos como almacenamiento de energía para las células (Wade, 2013). Generalmente, se clasifican en dos grupos: simples y complejos. Los **azúcares simples** o **monosacáridos**, que no se pueden convertir por hidrólisis en azúcares más pequeños, como la glucosa y la fructosa. Los **azúcares complejos**, que están formados por la unión de dos (**disacáridos**) o más azúcares simples (**polisacáridos**), como la sacarosa, disacárido formado por glucosa y fructosa, o como la celulosa, polisacárido formado por muchas unidades de glucosa. La hidrólisis de los azúcares complejos los rompe en sus monosacáridos constituyentes (McMurry, 2001). Los carbohidratos se pueden unir a una gran variedad de compuestos formando **glucósidos**, lo que aumenta su solubilidad en agua. La estructura química y la actividad farmacológica de los glucósidos dependen del aglicón al que se unen los carbohidratos.

En farmacología, además de su utilidad como agentes de carga, 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 (polímeros de fructosa, por ejemplo, inulina), los ácidos algínicos, agar y gomas (Gurib-Fakim, 2006).

c) Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos son intermediarios fotosintéticos, que se forman principalmente en las mitocondrias a través del ciclo de Krebs, y en menor medida, en el glioxisoma como parte del ciclo del glioxilato. Algunos ácidos orgánicos pueden tener actividad biológica, importante para mantener la calidad y las características organolépticas de frutas, verduras y setas, y también por influir en la salud humana. El ácido tartárico, ácido málico, ácido cítrico y el ácido succínico muestran ser beneficiosos por sus propiedades antioxidantes, actuando como quelantes de metales o deslocalizando la carga electrónica de los radicales libres (Barros, Pereira, & Ferreira, 2013; López-Bucio, Nieto-Jacobo, Ramírez-Rodríguez, & Herrera-Estrella, 2000; P. Morales et al., 2014; Valentão et al., 2005).

1.4.2. Compuestos lipofílicos

a) *Tocoferoles*

Los tocoferoles y tocotrienoles, frecuentemente designados por vitamina E, son un grupo de compuestos químicos con una estructura común que consta de un anillo cromano y una cadena lateral de isoprenos. La vitamina E está compuesta por 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). Su actividad antioxidante se debe al grupo cromano, que inhibe la peroxidación lipídica, al donar el hidrogeno fenólico a los radicales peroxilo, formándose radicales tocoferoxilos que no son reactivos. 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. Existen estudios sobre la regeneración de la vitamina E, y por tanto, su capacidad antioxidante, a partir de su radical tocoferoxilo, mediante procesos que involucran a la vitamina C, entre otros compuestos, lo que sugiere un efecto sinérgico entre ambas vitaminas (Burton & Traber, 1990; Carocho & Ferreira, 2013a; Halpner, Handelman et al., 1998; Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996).

b) *Terpenos y esteroides*

Los terpenos son compuestos que derivan de la polimerización de unidades de isopreno, molécula de 5 carbonos que procede del ácido mevalónico. Se clasifican en función del número de átomos de carbono, que generalmente es múltiplo de 5. Los **monoterpenos** (C10), que pueden ser acíclicos, monocíclicos y bicíclicos, e incluyen a los iridoides y secoiridoides. Los **sesquiterpenos** (C15), que pueden ser acíclicos, mono, bi, tricíclicos y también tetracíclicos, algunos de ellos presentan actividad antifúngica, antibiótica, antiinflamatoria o espasmolítica. Los monoterpenos y sesquiterpenos junto con los compuestos aromáticos y moléculas no volátiles, forman los aceites esenciales de las plantas. Los **diterpenos** (C20), algunos de ellos con actividad antiancerígena y/o citotóxica, y también antifúngica, antirretroviral y antioxidante, ésta última de algunos diterpenos fenólicos. Los **triterpenos** (C30), la mayoría con estructura tetra o pentacíclica, e incluyen a los esteroides, moléculas con

estructura de perhidrociclopentano-fenantreno, a las saponinas o saponósidos, heterósidos cuya genina puede ser triterpénica o esteroídica y los heterósidos cardiotónicos. Los **tetraterpenos** (C₄₀) denominados con frecuencia carotenoides, son compuestos coloreados debido a que poseen un gran número de dobles enlaces conjugados, donde los extremos pueden ser cíclicos. Se denominan xantofilas si la molécula posee funciones hidroxilo, y caroteno si la molécula es un hidrocarburo. Poseen acción preventiva frente a distintos tipos de cáncer y son fuentes de vitamina A. Los **poliisoprenoides** son compuestos que resultan de la combinación de millares de moléculas de isopreno (Castillo García & Martínez Solís, 2007; Gurib-Fakim, 2006).

c) *Ácidos grasos*

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 (ω -3) y Omega-6 (ω -6). Los ácidos grasos ω -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 ω -6, como el ácido γ -linoleico, también poseen propiedades antiinflamatorias, siendo su fuente principal los aceites de semillas (Gurib-Fakim, 2006; Kauret al., 2012).

1.4.3. Caracterización química de *Calendula officinalis* L.

La composición química de *C. officinalis* está condicionada por la variedad de planta (Kishimoto et al., 2005; Olennikov & Kashchenko, 2013), por factores ambientales, como cultivo, clima, tipo de suelo, recolecta, y por el tratamiento y extracción del material vegetal (Cechinel Filho & Yunes, 1998).

Varios estudios fitoquímicos confirman que los principales constituyentes químicos de las flores de caléndula son flavonoides (libres y glucosilados), terpenos (saponósidos y alcoholes triterpénicos, triterpenos y sesquiterpenos), carotenoides, polisacáridos, ácidos fenólicos, cumarinas y aceite esencial (Muley et al., 2009). En la **Tabla 4** se resumen los fitoconstituyentes de *C. officinalis*.

Tabla 4: Constituyentes fitoquímicos encontrados en *Calendula officinalis* (Tabla adaptada y datos porcentuales de (Andersen et al., 2010), completada con información de otros autores)

| PHYTOCHEMICAL CONSTITUENTS OF <i>Calendula officinalis</i> L. | |
|---|---|
| PHENOLIC COMPOUNDS | |
| PHENOLIC ACIDS, FREE AND STERIFIED (0.1 %) | Lignin; caffeic acid; 1- <i>O</i> -caffeoylquinic acid; 3- <i>O</i> -caffeoylquinic acid; 4- <i>O</i> -caffeoylquinic acid; 5- <i>O</i> -caffeoylquinic acid; 1,3-di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid; 3,4-di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid; 3,5-di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid; 4,5-di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid; 1,3,5-tri- <i>O</i> -caffeoylquinic acid; 3,4,5-tri- <i>O</i> -caffeoylquinic acid; 1- <i>O</i> -caffeoylglucose; chlorogenic acid; ferulic acid; isoferulic acid; 5- <i>O</i> -ferulylquinic acid; gentisic acid; cinamic acid; o-coumaric acid; p-coumaric acid; 3- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroylquinic acid; <i>p</i> -hydroxybenzoic acid; <i>p</i> -hydroxyphenylacetic acid; protocatechuic acid; salicylic acid (trace only); sinapic acid; syringic acid; vanillic acid; veratric acid (Andersen et al., 2010; D. Olennikov & Kashchenko, 2013). |
| FLAVONOIDS (<1.5 %) | Astragalin; calendoflaside; calendoflavoside; calendoflavobioside; calendoside I (quercetin 3- <i>O</i> -(4''- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside); calendoside II (quercetin 3- <i>O</i> -(3''- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside); calendoside III (isorhamnetin 3- <i>O</i> -(4''- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside); calendoside IV (isorhamnetin 3- <i>O</i> -(3''- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside); isoquercitrin (quercetin-3- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside), isorhamnetin; isorhamnetin-3- <i>O</i> -neohesperidoside; isorhamnetin-3- <i>O</i> -(2'',6''-dirhamnosyl)-glucoside; isorhamnetin-3- <i>O</i> -(2''-rhamnosyl)-glucoside, isorhamnetin-3- <i>O</i> -(2''-rhamnosyl)-glucoside, isorhamnetin-3- <i>O</i> -glucoside; isorhamnetin-3- <i>O</i> -(2''-acetyl)- β -D-glucopyranoside; isorhamnetin-3- <i>O</i> -(2'',6''-diacetyl)- β -D-glucopyranoside; isorhamnetin-3-rhamnosyl-(1,2)-rhamnoside; isorhamnetin-3- β -D-glucopyranosyl-6-1- β -1-rhamnofuranoside, kaempferol, manghaslin (quercetin-3- <i>O</i> -2 ^G -rhamnosylrutinoside); narcissin (isorhamnetin 3- <i>O</i> -rutinoside); neohesperidin (closest match to neoliesperoside), quercetin, quercetin-3- <i>O</i> -neohesperidoside, quercetin-3- <i>O</i> -(2'',6''-dirhamnosyl)-glucoside; quercetin-3- <i>O</i> -(2''-rhamnosyl)-glucoside; rutin (quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside); syringin (closest match to syringentin); typhaneoside (isorhamnetin 3- <i>O</i> -2 ^G -rhamnosylrutinoside) (Andersen et al., 2010; Kurkin & Sharova, 2007; D N Olennikov & Kashchenko, 2014; D. Olennikov & Kashchenko, 2013; Ukiya et al., 2006; Yoshikawa et al., 2001). |
| TANNINS (6-10 %) | Pyrogallol; catechol types coumarins (Andersen et al., 2010). |
| COUMARINS | Esculetin; scopoletin; umbelliferon (7-hydroxycoumarin) (Andersen et al., |

| | |
|----------|---|
| | 2010). |
| QUINONES | 5-Phytyltoluquinone; 6-Phytyltoluquinon; α -tocopherolquinone (Andersen et al., 2010). |

TOCOPHEROLS

7-Methyltocol; 5,7-dimethyltocol; 5-methyltocol; 8-methyltocol; α -tocopherol (vitamin E); β -tocopherol; γ -tocopherol; δ -tocopherol (Andersen et al., 2010).

TERPENOIDS AND STEROIDS

| | |
|--|--|
| FREE AND STERIFIED TRITERPENIC ALCOHOLS (<5 %) | Arnidiol; brein (fatty acid esters); calenduladiol (fatty acid esters); coflotriol; erythrodiol; faradiol (fatty acid esters: major triterpenoid in flowers); heliantriol A0; heliantriol A1; heliantriol B0; heliantriol B1; heliantriol B2; heliantriol C; heliantriol F; longispinogenin; lupentrio; lupeol (and its esters); maniladiol; olean-12-ene-3- β , 16- β , 28-triol; pseudotaraxasterol/ ψ -taraxasterol; taraxasterol; ursodiol; ursatriol; α -amyrin; β -amyrin (Andersen et al., 2010) |
| TRITERPENIC GLYCOSIDES (2-10 %) | Calendulaside B, A–H (oleanolic acid glycosides); calendasaponins A, B, C, and D (oleanolic acid glycosides) (Andersen et al., 2010). |
| STEROLS AND STEROIDS (0.2 %) | 24-Methylcholest-5,22-dien-3-beta-ol; 24-methylcholest-7-en-7-beta-ol; 24-methylene cholesterol; 24-methylene-lophenol; fucosterol (28-isofucosterol); 4- α -methyl-24-methylene-cholest-7-en-3-beta-ol; 4- α -methylstigmasta-7, 24(28)-dien-3-beta-ol; 4- β -methylergosta-7,24(28)-dien-3-beta-ol; campestanol; campesterol; cholest-7-en-3- β -ol; cholestanol; cholesterol; stigmast-7-en-3- β -ol; stigmastanol (=fucostanol); stigmasterol; α -1-sitosterol (=citraostadeniol) and β -sitosterol; (Andersen et al., 2010). |
| MONOTERPENES AND SESQUITERPENES (0.2-0.4 %) | Carvone; geranylacetone; γ -terpinene; linalool; menthone; 4-cymene; sabinene; terpinenol-4; α -pinene; α -terpineol; α -thujene; isomenthone; aloaromadendrol; calamenene; caryophyllene; cubenol; δ -cadinene; δ -cadinol; epicubebol; γ -cadinene; germacrene D; guaiol; oplopanone; palustrol; T-cadinol; T-muurolol; caryophyllene oxide; α -cadinol (0.05–0.15%); α -humulene; α -muurolene; β -eudesmol; officinosides C and D (sesquiterpene oligoglycosides) (Andersen et al., 2010). |
| CAROTENES (3-5 %) | Antheraxanthin; auroxanthin; α -carotene; β -carotene; γ -carotene; δ -Carotene; citroxanthin; flavoxanthin; lycopene; lutein; mutaxanthin; rubixanthin; violaxanthin (Andersen et al., 2010; Bakó et al., 2002; Kishimoto et al., 2005). |

CARBOHYDRATES (12–25 %)

Arabinogalactan PSII 25 kDa (arabinose, galactose); arabinogalactan PSIII 35 kDa (arabinose, galactose); mucilage (1.5 %); rhamnoarabingalactan PSI 15 kDa (arabinose, galactose, rhamnose); galacturonic acid; arabinose; galactose; glucose; rhamnose; xylose; uronic acids (Andersen et al., 2010; Korzh et al., 2012).

ORGANIC ACIDS

Ascorbic acid; malic acid; pentadecanoid acid; salicylic acid (Andersen et al., 2010; Korzh et al., 2012).

FATTY ACIDS (mainly as esters, 5 %)

9-Hydroxy-trans-10,cis-12-octadecadienic-acid; capric acid; caprylic acid; dimorphecolic acid; lauric acid; linoleic acid; linolenic acid; myristic acid; palmitic acid; palmitoleic acid; pentadecanoic acid; stearic acid; calenic acid (Andersen et al., 2010; Ul'chenko & Glushenkova, 1998).

OTHERS

Mineral matter (K, Na, Mg, Ca, Fe); aminoacids and proteins; n-paraffins; resins ; bitter constituent, loliolide (calendin); calendulin (Andersen et al., 2010; D. Arora, Rani, & Sharma, 2013; Muley et al., 2009).

1.4.4. Caracterización química de *Mentha cervina* L.

En la composición del aceite esencial de *M. cervina* (Tabla 5), varios estudios concuerdan que los monoterpenos oxigenados constituyen la principal fracción (80-88 %), siendo los mayoritarios pulegona (52-75 %), isomentona (8-24 %), y mentona (1-2 %), mientras que el monoterpeno hidrocarbonado mayoritario es limoneno (4-6 %) (Gonçalves et al., 2007; Rodrigues et al., 2011).

Respecto a la variabilidad en la composición del aceite esencial, se encontraron diferencias cuantitativas entre poblaciones de la fase vegetativa y de la fase en floración, principalmente en las cantidades de pulegona (12,9–79,6 %) e isomentona (8,7–77,0 %) (Gonçalves et al., 2007). Entre poblaciones de diferentes lugares, en la misma fase de desarrollo y en las mismas condiciones ecológicas y edafológicas, no se observó polimorfismo químico y entre poblaciones con diferentes condiciones ecológicas, cultivadas y silvestres, tampoco se encontraron grandes diferencias en la composición, aunque sí en el rendimiento de la extracción. (Rodrigues et al., 2008).

La composición de compuestos fenólicos de *M. cervina* fue estudiada (Tabla 5). En el extracto acuoso (infusión) fueron identificados cinco compuestos y en el extracto hidroetanólico fueron identificados nueve compuestos, con mayor cantidad de ácido cafeico seguido de ácido clorogénico y rutina (Martins da Rocha, 2011).

Tabla 5: Constituyentes fitoquímicos encontrados en *Mentha cervina*. Compuestos fenólicos (infusión y extracto hidroetanólico) y terpenos (aceite esencial).

| PHYTOCHEMICAL CONSTITUENTS OF <i>Mentha cervina</i> L. | |
|--|---|
| PHENOLIC COMPOUNDS | |
| PHENOLIC ACIDS | Protocatechuic acid; ferulic acid; cumaric acid; caffeic acid; chlorogenic acid (Martins da Rocha, 2011; Politi et al., 2008) |
| FLAVONOIDS | Epicatechin; naringenin; orientin; quercetin; rutin (Martins da Rocha, 2011; Politi et al., 2008). |
| TERPENOIDS | |
| MONOTERPENES AND SESQUITERPENES (Essential oil) | 3-Methyl cyclohexanone; α -thujene; α -pinene; camphene; sabinene; 1-octen-3-ol; β -pinene; 2,5-dimethyl-1-hexene; 3-octanol; β -myrcene; <i>p</i> -cymene; 1,8-cineole; limonene; <i>cis</i> - β -ocimene; <i>trans</i> - β -ocimene; γ -terpinene; <i>n</i> -octanol; <i>cis</i> -linalool oxide; <i>trans</i> -limonene oxide; menthone; isomenthone; menthofuran; <i>cis</i> -isopulegone; terpinen-4-ol; verbenone; myrtenol; pulegone; piperitone; 4-hydroxy-piperitone; carvotanacetone; piperitenone; β -caryophyllene; β -caryophyllene oxide; humulene epoxide; <i>Z</i> - β -ocimene; <i>E</i> - β -ocimene; neo-menthol; menthol; <i>cis-p</i> -menth-2-en-1-ol; octan-3-one; α -phellandrene; <i>t</i> -sabinene hydrate and terpinolene (Burzaco Vidaurreta et al., 1992; Gonçalves et al., 2007; Rodrigues et al., 2011) |

1.4.5. Caracterización química de *Macrolepiota procera* (Scop.) Singer

Las setas silvestres comestibles son ampliamente apreciadas por su textura y sabor, pero también son una fuente importante de nutrientes y antioxidantes como proteínas y carbohidratos con baja cantidad de grasas. Además contienen nutraceuticos como PUFA, compuestos fenolicos, tocoferoles, ácido ascórbico y carotenoides (Barros et al., 2008).

Los resultados del valor nutricional de *M. procera* en muestras frescas fueron: humedad (85,9 g/100 g de peso fresco), cenizas (8,0 g/100 g de peso seco), grasas (2,9 g/100 g de peso seco), proteínas (19 g/100 g de peso seco), carbohidratos (70 g/100 g de peso seco, calculados por diferencia) y energía (383 kcal/100 g de peso seco, calculados). Los principales azúcares encontrados fueron manitol (5,2 g/100 g de peso seco) y trehalosa (9,1 g/100 g de peso seco), siendo el total de 15,7 g/100 g de materia seca. En el análisis de ácidos grasos, la cantidad total de SFAs fue de 25,2 %, la de MUFAs de 9,3 % y la de PUFAs de 65,5 %, siendo el ácido linoleico (C18:2) el mayoritario (65,0 %). El contenido de tocoferoles muestra un total de 178 µg/100 g de materia seca, siendo el mayoritario el δ-tocoferol (91 µg/100 g) (Fernandes et al., 2014). El contenido en compuestos fenolicos fue de 11 µg/g de materia seca, siendo el mayoritario el ácido protocatéquico (8 µg/g) y el contenido de ácidos orgánicos de 49 mg/g de materia seca, siendo el principal el ácido málico (28 mg/g de materia seca) (Fernandes & Barros et al., 2014). En la **Tabla 6** se resume la composición química de *M. procera* a partir de los estudios de varios autores.

Tabla 6: Constituyentes microquímicos encontrados en *Macrolepiota procera* (Datos recogidos de varios autores)

| MYCOCHEMICAL CONSTITUENTS OF <i>Macrolepiota procera</i> | |
|--|---|
| PHENOLIC COMPOUNDS | |
| PHENOLIC ACIDS | Cinnamic acid; protocatechuic acid; gallic acid; gentisic acid; vanillic acid; syringic acid; <i>p</i> -coumaric acid; caffeic acid; ferulic acid; tannic acid (Puttaraju et al., 2006) |
| TOCOPHEROLS | |
| α -tocopherol (vitamin E); β -tocopherol; γ -tocopherol; δ -tocopherol (mainly) (Fernandes et al., 2014). | |
| TERPENOIDS | |
| CAROTENES | β -Carotene; lycopene (Ozen et al., 2011) |
| CARBOHYDRATES | |
| Mannitol; trehalose (Barros et al., 2007). | |
| ORGANIC ACIDS | |
| Oxalic acid; quinic acid; mallic acid; citric acid; fumaric acid (Fernandes et al., 2014) | |
| FATTY ACIDS | |
| Capric acid; lauric acid; myristic acid; pentadecylic acid; palmitic acid; palmitoleic acid; margaric acid; stearic acid; oleic acid; linoleic acid; α -linolenic acid; arachidic acid; paullinic acid; eicosadienoic acid; behenic acid; tricosylic acid; lignoceric acid (Barros et al., 2007). | |
| OTHERS | |
| Minerals and metallic elements (Ag, Al, Ba, Ca, Cd, Co, Cu, Cr, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Na, P, Pb, Rb, Sr, and Zn) (Kuldo et al., 2013) | |

1.5. Actividad antioxidante

1.5.1. Estrés oxidativo y especies reactivas

El término estrés oxidativo es utilizado para describir la condición de desequilibrio entre las especies reactivas, producidas en el metabolismo normal de las células aerobias, y las defensas antioxidantes celulares, moléculas enzimáticas y no enzimáticas que las neutralizan. El mantenimiento de este equilibrio es una condición esencial para el normal funcionamiento del organismo y el desequilibrio puede producirse por una sobreproducción de estas especies reactivas o por la pérdida de la actividad antioxidante de las células (Ferreira et al., 2009; Lobo et al., 2010).

Las especies reactivas, en las que se incluyen los radicales libres, son átomos, moléculas o iones con electrones desapareados, altamente inestables y susceptibles de sufrir reacciones químicas con otras moléculas. Las principales son las especies reactivas de oxígeno (ROS): anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidropéroxilo (HO_2^{\cdot}), radical hidroxilo (OH^{\cdot}), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete (1O_2) y ácido hipocloroso (HOCl); pero también existen especies reactivas de nitrógeno (RNS): óxido nítrico (NO), peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$); y especies reactivas de azufre (RSS) (Carocho & Ferreira, 2013a; Lü et al., 2010).

La producción de estas especies reactivas puede deberse al normal funcionamiento del metabolismo dentro de la mitocondria, a través de la xantina oxidasa, los peroxisomas, los procesos inflamatorios, la fagocitosis, las vías del araquínodato, la isquemia y el ejercicio físico. Pero también factores externos pueden promover la producción de radicales libres como fumar, la contaminación, la radiación, las drogas, los pesticidas, los disolventes industriales y el ozono (Carocho & Ferreira, 2013a; Lobo et al., 2010).

Los principales objetivos de ROS, RNS y RSS son las proteínas, el ADN (ácido desoxirribonucleico) y el ARN (ácido ribonucleico), las moléculas de azúcares y los lípidos (Carocho & Ferreira, 2013a; Lü et al., 2010), pudiendo provocar su modificación o inhibir su normal funcionamiento (Valko et al., 2007). Estas especies reactivas se han vinculado a muchas enfermedades graves como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, incluyendo la aterosclerosis y los accidentes cerebrovasculares, afecciones neurológicas, trastornos renales, trastornos hepáticos, hipertensión, artritis reumatoide, síndrome de dificultad respiratoria del adulto,

enfermedades de deficiencia autoinmune, inflamación, trastornos degenerativos asociados con el envejecimiento, la diabetes mellitus, complicaciones de la diabetes, cataratas, la obesidad, autismo, enfermedad de Alzheimer, el Parkinson, vasculitis, glomerulonefritis, lupus eritematoso, úlceras gástricas, la hemocromatosis y la preeclampsia, entre otros (Carocho & Ferreira, 2013a; Lobo et al., 2010; Lü et al., 2010).

1.5.2. Antioxidantes

Los antioxidantes pueden definirse como “cualquier sustancia que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo de una molécula objetivo” (Halliwell, 2007). Los antioxidantes pueden directamente reaccionar con el radical reactivo y destruirlo, mientras ellos se convierten en nuevos radicales, los cuales son menos activos, con menor tiempo de vida y menos peligrosos que los radicales que han neutralizado, y a su vez pueden ser neutralizados por otros antioxidantes o por otros mecanismos para terminar su estado de radical (Lü et al., 2010). Su actividad antioxidante puede ser eficaz a través de diversas maneras: como inhibidores de las reacciones de oxidación por radicales libres (oxidantes preventivos), por inhibición de la formación de radicales libres lipídicos; interrumpiendo la propagación de la reacción en cadena de autooxidación (antioxidantes rompedores de cadena); como desactivadores de oxígeno singlete; a través del sinergismo con otros antioxidantes; como agentes reductores que convierten los peróxidos de hidrógenos en compuestos estables; como quelantes de metales que convierten los metales prooxidantes (derivados de hierro y cobre) en productos estables; y, finalmente, como inhibidores de enzimas prooxidativas (lipooxigenasas) (Carocho & Ferreira, 2013a).

Los antioxidantes pueden ser clasificados en enzimáticos y no enzimáticos. Algunos son productos endógenos, en los que se incluyen enzimas, moléculas de bajo peso molecular y cofactores enzimáticos. Entre los antioxidantes no enzimáticos se encuentran los obtenidos en la dieta, los cuales pueden ser clasificados en varias clases: polifenoles (ácidos fenólicos y flavonoides), vitaminas, carotenoides, compuestos organosulfurados y minerales (Liu, 2004; Ratnam et al., 2006), algunos de ellos descritos en el apartado 1.4.

1.5.3. Actividad antioxidante de *Calendula officinalis* L.

Varios estudios comprueban la actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo* de los extractos y compuestos aislados de las flores de caléndula.

Entre los métodos fotométricos para evaluar la actividad antioxidante *in vitro* destacan: actividad captadora de ABTS (ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico); actividad captadora de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo); actividad captadora del radical hidroxilo (OH[•]); actividad captadora de peróxido de hidrógeno (H₂O₂); actividad captadora de radical superóxido (O₂^{•-}); actividad captadora de óxido nítrico; inhibición de la peroxidación lipídica TBARS (sustancias reactivas a ácido tiobarbitúrico); poder reductor férrico FRAP; potencial antioxidante reactivo total TRAP (total radical-trapping antioxidant parameter) y reactividad antioxidante total TAP (total antioxidant reactivity). También se evalúa la actividad antioxidante por la determinación del contenido total de compuestos fenólicos, como con el método Folin-Citocalteu, y por la determinación del contenido total de flavonoides.

En ensayos *in vivo* en animales, algunos extractos han demostrado actividad hepatoprotectora y antígenotóxica frente al estrés oxidativo debido a su efecto antioxidante (Abdel-Aziem et al., 2014; Frankič et al., 2009), explicados en la apartado 1.1.4. Otro estudio *in vivo* en ratones demostró que el extracto metanólico de *C. officinalis* posee efecto protector de la piel frente al estrés oxidativo provocado por la radiación UVB (Fonseca et al., 2010). En la **Tabla 7** se muestran algunos resultados de ensayos, *in vivo* e *in vitro*, que evalúan la actividad antioxidante de la caléndula.

Tabla 7: Resultados de algunos estudios que evalúan la actividad antioxidante de *C. officinalis*

| Samples | Antioxidant activity assays | Antioxidant activity results | References |
|---|---|--|-------------------------|
| Butanolic fraction of ethanolic (50 %) extract of dried flowers | Total reactive antioxidant potential (TRAP) assay | 368.14 mM Trolox equivalents | (Cordova et al., 2002) |
| | Total antioxidant reactivity (TAR) assay | 249.19 mM Trolox equivalents | |
| | Lipid peroxidation induced by Fe ²⁺ /ascorbate in liver microsomes | EC ₅₀ = 0.15 mg/mL | |
| | Superoxide radical scavenging activity | EC ₅₀ = 1.0 mg/mL | |
| | Hydroxyl radical scavenging activity | EC ₅₀ = 0.5 mg/mL | |
| Yield of ethanolic extract of fresh flowers, redissolved in water | Superoxide radical scavenging activity | EC ₅₀ = 500 µg/mL | (Preethi et al., 2006) |
| | Hydroxyl radical scavenging activity | EC ₅₀ = 480 µg/mL | |
| | Lipid peroxidation inhibition | EC ₅₀ = 2000 µg/mL | |
| | DPPH radical scavenging activity | EC ₅₀ = 100 µg/mL | |
| | ABTS radical scavenging activity | EC ₅₀ = 6.5 µg/mL | |
| | Nitric oxide radical scavenging activity | EC ₅₀ = 575 µg/mL | |
| | Inhibition of nitric oxide produced by macrophages | Inhibition between 3.2% (10 µg) and 32.6 % (150 µg) | |
| | PMA-induced superoxide radical generation in peritoneal macrophages <i>in vivo</i> | Inhibition 12.6 % (100 mg/kg) and 38.7 % (250 mg/kg) | |
| Methanolic (70 %) extract of dried flowers (cultivated/ wild grow) | <i>In vivo</i> antioxidant activity in mice blood and liver after oral administration during 30days | Increase in catalase and intracellular glutathione are the major changes | (Ćetković et al., 2004) |
| | DPPH scavenging activity | EC ₅₀ ~ 0.45/0.9 mg/mL | |
| | Hydroxyl radical scavenging activity | EC ₅₀ ~ 0.3/0.7 mg/mL | |
| | Lipid peroxy radical scavenging activity | EC ₅₀ ~ 0.3/0.8 mg/mL | |
| | Total phenolic Folin-Citocalteu | 55.07/14.49 mg/g | |
| Aqueous extract of dried flowers cultivated (cultivated/ wild grow) | Total flavonoid | 18.48/ 5.26 mg/g | (Ćetković et al., 2004) |
| | DPPH scavenging activity | EC ₅₀ ~ 0.3/0.9 mg/mL | |
| | Hydroxyl radical scavenging activity | EC ₅₀ ~ 0.2/0.5 mg/mL | |
| | Lipid peroxy radical scavenging activity | EC ₅₀ ~ 0.2/0.75 mg/mL | |
| | Total phenolic Folin-Citocalteu | 57.47/15.12 mg/g | |
| | Total flavonoid | 18.62/5.31 mg/g | |

1.5.4. Actividad antioxidante de *Mentha cervina* L.

La actividad antioxidante de los extractos acuosos e hidroetanólicos de tallos, hojas y una mezcla de ambos de *M. cervina* fue evaluada mediante el método del radical catiónico ABTS⁺ y del aceite esencial mediante el método TEAC (TROLOX equivalent antioxidant capacity), así como el contenido de compuestos fenólicos totales con el reactivo Folin-Citocalteu y la determinación de la degradación de ADN por oxidación. Los resultados mostraron para el método ABTS una concentración equivalente de ácido ascórbico, de las soluciones hidroetanólicas que varía entre 0,066 g/L del tallo extraído con 100 % de etanol hasta 0,695 g/L de las hojas extraídas con 40% de etanol, y de la infusión del polvo de 0,160 g/L. En los resultados del método Folin-Citocalteu se observó que la concentración equivalente de ácido gálico, de las soluciones hidroetanólicas varía entre 0,099 g/L del tallo extraído con 100 % de etanol hasta 0,859 g/L de la hoja con 65 % etanol, y de la infusión de polvo de 0,154 g/L. En relación al efecto oxidante y prooxidante de los extractos, infusiones y aceite esencial sobre el ADN, todos ellos mostraron protección antioxidante excepto el aceite esencial que junto con los valores del método TEAC se demostró que los compuestos presentes en el aceite esencial actúan de forma diferente sobre moléculas biológicas (Martins da Rocha, 2011).

1.5.5. Actividad antioxidante de *Macrolepiota procera* (Scop.) Singer

La actividad antioxidante de *M. procera* fue evaluada en diferentes extractos, comparando diferentes técnicas de conservación y mediante métodos diferentes. Los métodos espectrofotométricos evaluados fueron la actividad captadora de radicales DPPH, poder reductor, la inhibición de la decoloración de β -caroteno, la inhibición de la peroxidación lipídica con TBARS, actividad antioxidante total por el método del fosfomolibdeno, inhibición de la peroxidación del ácido linoleico, actividad captadora de superóxido, actividad captadora de peróxido de hidrógeno, actividad quelante de metales con hierro y por el contenido de compuestos fenólicos totales con el reactivo Folin-Citocalteu (Barros et al., 2007; Fernandes et al., 2014; Ozen et al., 2011; Puttaraju et al., 2006; Witkowska et al., 2011). En la **Tabla 8** se presentan algunos de los resultados.

Tabla 8: Resultados de algunos estudios que evalúan la actividad antioxidante de *M. procera*

| Samples | Antioxidant activity assays | Antioxidant activity results | References | |
|-------------------------------------|--|---------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Aqueous extract of dried sample | DPPH scavenging activity | EC ₅₀ = 3.70 mg/mL | (Puttaraju et al., 2006) | |
| | Reducing power | 2.81 mg GAE/g of sample | | |
| | Inhibition of Lipid Peroxidation in Rat Liver Homogenate | 109.5 nm of MDA/mg of phenolics | | |
| | Total phenolic Folin-Ciocalteu | 10.2 mg/g | | |
| Methanolic extract of dried sample | DPPH scavenging activity | EC ₅₀ = 3.70 mg/mL | | |
| | Reducing power | 7.1 mg GAE/g of sample | | |
| | Inhibition of Lipid Peroxidation in Rat Liver Homogenate | 187.5 nm of MDA/mg of phenolics | | |
| | Total phenolic Folin-Ciocalteu | 6.0 mg/g | | |
| Methanolic extract of fresh sample | DPPH scavenging activity | EC ₅₀ = 6 mg/mL | | (Fernandes et al., 2014) |
| | Reducing power | EC ₅₀ = 1,5 mg/mL | | |
| | β-carotene bleaching inhibition | EC ₅₀ = 4 mg/mL | | |
| | Lipid peroxidation inhibition | EC ₅₀ =1.7 mg/mL | | |
| Methanolic extract of dried sample | Total phenolic Folin-Ciocalteu | 19 mg GAE/g extract | | |
| | DPPH scavenging activity | EC ₅₀ = 2.8 mg/mL | | |
| | Reducing power | EC ₅₀ = 1.32 mg/mL | | |
| | β-carotene bleaching inhibition | EC ₅₀ = 4 mg/mL | | |
| Methanolic extract of frozen sample | Lipid peroxidation inhibition | EC ₅₀ = 7 mg/mL | | |
| | Total phenolic Folin-Ciocalteu | 21 mg GAE/g extract | | |
| | DPPH scavenging activity | EC ₅₀ = 4 mg/mL | | |
| | Reducing power | EC ₅₀ = 1.4 mg/mL | | |
| Methanolic extract of frozen sample | β-carotene bleaching inhibition | EC ₅₀ = 8 mg/mL | | |
| | Lipid peroxidation inhibition | EC ₅₀ =3 mg/mL | | |
| | Total phenolic Folin-Ciocalteu | 15 mg GAE/g extract | | |

1.6. Actividad antitumoral

1.6.1. Cáncer

“Cáncer” es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo. En 2012 hubo unos 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer, y se prevé que el número de nuevos casos aumente en los próximos 20 años aproximadamente un 70 %. En 2012, 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 son debidas a cinco factores de riesgo conductuales y dietéticos: índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y de alcohol (WHO, 2015).

Se ha sugerido que a pesar de la variedad de tipos de cáncer, el crecimiento maligno es una manifestación de seis alteraciones esenciales en la fisiología celular: la autosuficiencia en las señales de crecimiento, la insensibilidad a las señales inhibitoras del crecimiento, la evasión de la muerte celular programada (apoptosis), el potencial de replicación ilimitado, sostenida angiogénesis y la invasión de tejidos y metástasis (Hanahan & Weinberg, 2000).

Hoy en día, más del 60% de los medicamentos contra el cáncer provienen de compuestos naturales o se derivan de ellos. Se sabe que los extractos de plantas pueden mostrar efectos anticancerígenos interesantes en líneas celulares y modelos murinos, produciendo efectos superiores en comparación con compuestos naturales o sintéticos puros. A pesar de este efecto notable, es difícil evaluar qué compuestos están interactuando con las células cancerosas o si este efecto se debe a la sinergia entre diversos compuestos (Carocho & Ferreira, 2013b; da Rocha, 2001).

1.6.2. Actividad antitumoral de *Calendula officinalis* L.

Diversos extractos de la hoja, flor y toda la planta de caléndula resultaron citotóxicos para MRC5, Hep2 y células del tumor ascítico de Ehrlich *in vitro*. La fracción rica en saponinas de estos extractos mostró actividad antitumoral *in vivo* en el modelo de carcinoma Ehrlich en ratones (Boucaudmaitre et al., 1988). La fracción soluble en *n*-butanol del extracto metanólico de las flores de caléndula también mostró actividad citotóxica *in vitro*. Los resultados revelaron que dos glucósidos triterpénicos, aislados de esa fracción, exhibieron sus efectos citotóxicos más potentes contra el cáncer de colon, leucemia, y células de melanoma (Ukiya et al., 2006). El extracto activado por láser de caléndula mostró una potente inhibición de la proliferación de células tumorales *in vitro* (70-100 %), al ser ensayado en varias líneas de células tumorales humanas y murinas. Los mecanismos de inhibición fueron identificados como la detención del ciclo celular en la fase G0/G1 y la apoptosis inducida por caspasa-3. El extracto mostró un efecto opuesto cuando se probó en linfocitos de sangre periférica humana (PBLs) y en la línea celular natural killer (NKL), en el que se observó la inducción de la proliferación y activación de estas células *in vitro*. La inyección intraperitoneal o la administración oral del extracto en ratones inhibió el crecimiento tumoral *in vivo* de las células de melanoma Ando-2 y prolongó el día de supervivencia de los ratones (Jiménez-Medina et al., 2006). Se estudió la citotoxicidad de la infusión de caléndula en líneas celulares tumorales humanas: adenocarcinoma de cuello de útero (HeLa), melanoma Fem-x, adenocarcinoma de pecho MDA-MB-361, carcinoma de colon LS174 y células de leucemia mieloide crónica K562. Los resultados revelaron selectividad dependiente de la dosis del efecto citotóxico, siendo mayor contra las células Fem-x y pronunciado en las células de HeLa y K562. La infusión de caléndula también mostró una notable citotoxicidad frente a las células mononucleares de sangre periféricas normales (PMBC) estimuladas con fitohemaglutinina (PHA) y sin estimular (Matić et al., 2013).

1.6.3. Actividad antitumoral de *Mentha cervina* L.

No se han encontrado estudios que evalúen la actividad antitumoral de los extractos de *M. cervina*.

1.6.4. Actividad antitumoral de *Macrolepiota procera* (Scop.) Singer

En un estudio fueron evaluados los efectos citotóxicos, antiproliferativos, y antiapoptóticos de los extractos acuoso y etanólico de *M. procera* en líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7), colon (COLO-205) y riñón (ACHN). El extracto etanólico mostró el efecto citotóxico más alto en las 3 líneas celulares de cáncer, especialmente COLO-205. Los datos científicos obtenidos hasta el momento mostraron que los extractos acuosos tienen un efecto antiproliferativo irreversible notable en COLO-205 en comparación con otras líneas celulares de cáncer. Esta disminución de la viabilidad celular, los cambios morfológicos y características apoptóticas observadas tras el tratamiento con los extractos validó la propiedad anticancerosa (S. Arora et al., 2013).

Un estudio posterior sobre terapias complementarias y alternativas en el tratamiento del cáncer evaluó los efectos antiproliferativos y citotóxicos del extracto acuoso de *M. procera* en células epiteliales normales de riñón (NRK-52E), comparando con el fármaco quimioterápico 5-fluorouracilo, mediante varios métodos. El ensayo de citotoxicidad MTT reveló para *M. procera* un $GI_{50} = 279,12 \mu\text{g/L}$, mucho menor que el fármaco; el ensayo de formación de colonias mostró un efecto insignificante del extracto en la proliferación celular, comparada con el fármaco; y el extracto no mostró daño en el ADN de las células normales, ni en el ensayo de fragmentación de ADN, ni en el ensayo de apoptosis con tinción bromuro de etidio y naranja de acridina (S. Arora et al., 2014).

2.OBJETIVOS

Los objetivos de este proyecto han sido:

- 1) Caracterizar químicamente y determinar la bioactividad (actividad antioxidante y antitumoral) de infusiones y extractos metanólicos preparados a partir de muestras comerciales de dos especies de plantas: *Calendula officinalis* L. (flores) y *Mentha cervina* L. (hojas).
- 2) Caracterizar químicamente los extractos y fracciones obtenidos a partir de muestras silvestres de la seta *Macrolepiota procera* (Scop.) Singer (cuerpos fructíferos).

Para lograr estos objetivos, se fijaron como objetivos particulares los siguientes:

- a) Caracterización química y evaluación de la bioactividad de *C. officinalis* y *M. cervina*:
 - Determinar el valor nutricional/valor energético y composición química (tocoferoles, azúcares libres, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos) por técnicas cromatográficas.
 - Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos e infusiones mediante ensayos *in vitro*: actividad captadora de radicales libres (DPPH), poder reductor, inhibición de la peroxidación lipídica TBARS e inhibición de la decoloración de β -caroteno.
 - Evaluación de la actividad antitumoral de los extractos metanólicos e infusiones en cuatro líneas celulares tumorales humanas: MCF-7 (carcinoma de mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmón), HCT-15 (carcinoma de colon), HeLa (carcinoma cervical) y HepG2 (carcinoma hepatocelular); y evaluación de la citotoxicidad en cultivos primarios de células de hígado de cerdo (PLP2) por el método de la sulforodamina B (SRB).

b) Caracterización química de *M. procera*:

- Preparación de extractos y fracciones utilizando disolventes de diferentes polaridades: hexano, diclorometano, acetato de etilo, *n*-butanol, metanol y agua.
- Caracterización química de cada extracto o fracción utilizando métodos espectroscópicos y cromatográficos: RMN, GC-MS, HPLC
- Aislamiento y purificación de los compuestos presentes en los extractos o fracciones utilizando métodos cromatográficos preparativos.
- Identificación de los compuestos presentes utilizando técnicas espectroscópicas: 1D y 2D RMN, MS, IR y UV; y comparación con los datos de la literatura.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material de estudio

Las muestras de material vegetal se adquirieron de forma comercial. Los pétalos de las flores de *Calendula officinalis* L. se obtuvieron de la empresa Soria Natural[®], empresa española dedicada al mercado de la Medicina Natural desde 1982, ubicada en Garray (Soria, España), cuya actividad abarca desde el cultivo a la producción de productos naturales, cosméticos y alimentarios. Las hojas de *Mentha cervina* L. se obtuvieron de la empresa Cantinho das Aromáticas[®], empresa portuguesa dedicada al cultivo biológico y comercialización de plantas aromáticas desde 2002, ubicada en Canidelo (Vila Nova de Gaia, Portugal). Ambas muestras vegetales secas, comercializadas en bolsa, se trituraron y homogeneizaron, y se almacenaron en desecador, protegidas de la luz, hasta su posterior análisis.

Los cuerpos fructíferos de *M. procera* se recolectaron en noviembre de 2011, en el Nordeste de Portugal. Posteriormente, una vez limpios y cortados, se liofilizaron empleando el equipamiento Ly-8-FM-ULE (Snijders, Holanda), se redujeron a polvo (20 mesh), utilizando un molino, y se mantuvieron a -20 °C hasta su posterior análisis.



Figura 7: Muestras de *C. officinalis* (izq.), *M. cervina* (centro) y *M. procera* (dcha.)

3.2. Caracterización química y nutricional de *C. officinalis* y *M. cervina* y ensayos de bioactividad

3.2.1. Patrones y reactivos

Los disolventes acetonitrilo, *n*-hexano y acetato de etilo empleados fueron de pureza HPLC (Lab-Scan; Lisboa, Portugal). Los otros disolventes utilizados fueron de grado analítico y fueron adquiridos en fuentes comunes. El agua desionizada fue obtenida en un sistema de purificación de agua Millipore Direct-Q (TGI Water Systems, EUA).

Para los análisis de micronutrientes y macronutrientes se emplearon 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 α , β , γ y δ ; análisis de azúcares 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 y el análisis de compuestos fenólicos.

Para la evaluación de la actividad antioxidante se utilizaron los patrones: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (Alfa Aesar; Ward Hill, MA), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromato-2-carboxílico (Trolox) y ácido tricloroacético (TCA) (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA).

Para la evaluación de la actividad antitumoral y citotóxica se utilizaron las siguientes soluciones: suero fetal bovino (SFB), L-glutamina, solución salina de Hank's (HBSS), tripsina-EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), aminoácidos esenciales (2 mM), penicilina/estreptomicina (100 U/mL y 100mg/mL, respectivamente) y medios de cultivo RPMI-1640 y DMEM (Hyclone; Logan, Utah, EUA). También se utilizó ácido acético, elipticina, sulforodamina B (SRB), azul tripano y tris[2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol] (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA).

3.2.2. Preparación de extractos hidrometanólicos e infusiones

Para la preparación de los extractos hidrometanólicos cada muestra (1 g) se extrajo en una disolución de metanol:agua 8:2 (v/v) (30 mL) en agitación a temperatura ambiente, durante 1 h, y posterior filtración a través de papel de filtro. Los residuos se extrajeron con otros 30 mL siguiendo el procedimiento anterior, uniéndose ambos extractos. Posteriormente se evaporó el disolvente de los extractos en un rotavapor a 40 °C (Buchi R-2010) y se redisolvieron en un volumen conocido de metanol:agua 8:2 (v/v) de forma que la concentración final fuese de 20 mg/mL (solución madre). A partir de la solución madre y mediante diluciones sucesivas con metanol:agua 8:2 (v/v), se prepararon disoluciones de diferentes concentraciones para evaluar la actividad antioxidante (10,0-0,01 mg/mL).

Para la preparación de las infusiones cada muestra (1 g) se extrajo con 200 mL de agua desionizada en ebullición, reposando a temperatura ambiente durante 5 min y posterior filtración con papel de filtro. A partir de la disolución madre de 5 mg/mL y mediante diluciones sucesivas con agua desionizada, se prepararon disoluciones de diferentes concentraciones para evaluar la actividad antioxidante (10,0-0,01 mg/mL).

Los extractos metanólicos y las infusiones restantes de hacer las disoluciones, se congelaron y liofilizaron (Liofilizador Ly-8- FM-ULE).

3.2.3. Valor nutricional

Para estudiar el valor nutricional de las muestras se analizaron las proteínas, los lípidos, los glúcidos o carbohidratos y las cenizas siguiendo los métodos oficiales de análisis de la AOAC (AOAC International, 1995). El contenido de proteínas totales ($N \times 6,25$) de las muestras secas se estimó por el método macro-Kjeldahl, los lípidos se determinaron por extracción con éter de petróleo de una masa conocida de muestra (3 g), usando un equipo de extracción Soxhlet y el contenido de cenizas se determinó por incineración a 660 ± 15 °C. Los carbohidratos se calcularon por diferencia (valores en g/100g):

$$\text{Carbohidratos (g/100g)} = (100 - (\text{proteínas} + \text{lípidos} + \text{cenizas}))$$

y la energía total se calculó usando la siguiente ecuación (valores en g/100g):

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

3.2.4. Análisis de fitoquímicos

a) *Compuestos fenólicos*

Los compuestos fenólicos se determinaron a partir de los extractos metanólicos e infusiones liofilizadas (apartado 3.2.2), mediante cromatografía líquida de alta resolución y detectores de diodos y de masas (**HPLC-DAD-MS**), según el procedimiento optimizado por el grupo de investigación de Polifenoles de la USAL (Guimarães, Barros, Dueñas, Carvalho, et al., 2013), ligeramente modificado.

Las muestras liofilizadas (10 mg) se redisolviéron en 2 mL de metanol, filtrándose, con discos de nylon 0,22 µm (Millipore), a viales, antes de su inyección.

Los compuestos fenólicos se determinaron por HPLC (Hewlett-Packard 1100, Agilent Technologies), sistema compuesto por bomba cuaternaria, y doble detección online: detector de diodos (DAD), empleando longitudes de onda desde 280 hasta 370 nm y detector de masas con fuente de ionización por electrospray y analizador de cuadrupolo (ESI-MS) (API 3200 Qtrap, Applied Biosystems). Para la separación se empleó una columna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C18 (4,6 × 150 mm, 3 µm), operando a 35 °C, y como fase móvil una mezcla de (A) ácido fórmico:agua (0,1 %) y (B) acetonitrilo, con flujo 0,5 mL/min. El gradiente establecido fue 15% B hasta 5 min, 15-20 % B hasta 5 min, 20-25 % B más 10 min, 25-35 % B más 10 min, 35-50 % B más 10 min y estabilización de la columna. Los compuestos fenólicos se identificaron comparando su tiempo de retención, espectros de masas y de UV/VIS con los obtenidos a partir de compuestos patrón cuando eran disponibles o, si no, comparando esos datos con la información disponible en la literatura. El análisis cuantitativo, se realizó mediante recta de calibración, en base a la señal UV, de los patrones comerciales o, cuando no eran disponibles, de los de otros compuestos con el mismo grupo fenólico.

b) *Azúcares*

Los azúcares libres, de las muestras secas y de las infusiones, se determinaron 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).

Las muestras secas (1 g), previa etapa de desgrasado, se enriquecieron con melecitosa como patrón interno (PI, 25 mg/mL) y se extrajeron con etanol 80 % (40 mL) durante 1 h 30 min a 80 °C. La suspensión resultante se centrifugó (centrífuga Centorion K240R-2003) a 15000 g durante 10 min. El sobrenadante se concentró en rotavapor a 60 °C, posteriormente se lavó 3×10 mL éter etílico y se volvió a concentrar en rotavapor a 40 °C. El residuo sólido final se disolvió en agua enrasando a 5 mL. Las infusiones (soluciones madre o stock) se midieron directamente utilizando el método del patrón externo. Todas las muestras fueron filtradas con discos de nylon 0,22 µm (Millipore) a viales 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 NH₂ 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.

c) Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos, de las muestras secas y de las infusiones liofilizadas, 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).

Las muestras secas (1 g) se extrajeron con ácido metafosfórico 4,5 % (25 mL), en agitación durante 15 min a T ambiente. Posteriormente se filtraron con papel de filtro. Las infusiones liofilizadas (apartado 3.2.2) (1 g) se redisolviéron en 2 mL. Todas las muestras fueron filtradas con discos de nylon de 0,20 µm (Millipore), a viales, 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.

d) Tocoferoles

Los tocoferoles, de las muestras secas y de las infusiones liofilizadas, 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).

A las muestras secas (500 mg) y a las infusiones liofilizadas (100 mg) se les adicionó 100 µL de una disolución de butil-hidroxitolueno en hexano (BHT, antioxidante, 10 mg/mL) y 250 µL de una disolución de tocol en hexano (PI, 50 µg/mL). Después se adicionaron 4 mL de metanol, homogeneizándose en el vortex durante 1 min, y 4 mL de hexano agitándose nuevamente en el vortex durante 1 min. Posteriormente se añadieron 2 mL de una disolución acuosa de cloruro de sodio saturada, seguida de homogeneización en el vortex durante 1 min y centrifugación (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, posteriormente se redisolvió en 2 mL de hexano y se filtró con disco de nylon de 0,20 µm a un vial para su 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).

e) Ácidos grasos

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

La masa obtenida después de las extracción Soxhlet (muestra seca desgrasada), se mezcló con 5 mL de metanol:ácido sulfúrico:tolueno 2:1:1 (v/v/v), permaneciendo en un baño a 50 °C con agitación de 160 rpm durante por lo menos 12 h. Seguidamente se adicionaron 3 mL de agua desionizada con el objetivo de separar las diferentes fases. Se recuperaron los FAMES con 3 mL de éter agitando en el vortex, se eliminó el agua con 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.

3.2.5. Actividad antioxidante

Se evaluó la actividad antioxidante de los extractos metanólicos y de las infusiones de *C. officinalis* y *M. cervina* empleando disoluciones de diferentes concentraciones (apartado 3.2.2), mediante los ensayos que se describen a continuación y siguiendo la metodología descrita por (Barros et al., 2010; Guimarães et al., 2010). En todos los ensayos se utilizó trolox como control.

a) *Efecto captador de radicales libres (DPPH)*

Este ensayo se desarrolló empleando un lector de microplacas ELX800 (Bio-Tek Instruments, Inc; Winooski, VT, EUA). Los extractos de diferentes concentraciones se depositaron en las microplacas de 96 pocillos (30 µL), donde se adicionaron 270 µL de una disolución metanólica de DPPH (6×10^{-5} mol/L) (**Figura 8**). Después de un intervalo de 60 min de incubación, se midió la reducción del radical DPPH a través de la lectura de absorbancia a 515 nm.

La actividad captadora de radicales (RSA) se calculó en función del porcentaje de la decoloración de la disolución de DPPH, según la siguiente ecuación:

$$\% RSA = [(A_{DPPH} - A_S) / A_{DPPH}] \times 100$$

Siendo A_{DPPH} la absorbancia de la disolución de DPPH y A_S la absorbancia de la disolución en presencia de las diferentes concentraciones de muestra. Los resultados se expresan en base a la concentración de la muestra capaz de inhibir el 50 % de los radicales DPPH (EC_{50}), que se calculó a partir del gráfico de % RSA frente a la concentración del extracto.

b) *Poder reductor*

Este ensayo se desarrolló empleando el lector de microplacas descrito anteriormente. Los extractos de diferentes concentraciones (500 µL), se mezclaron con 500 µL de tampón fosfato de sodio (200 mmol/L; pH 6,6) y 500 µL de ferricianuro de potasio (0,1 % w/v). La mezcla se incubó a 50 °C durante 20 min. Pasado ese periodo se adicionaron 500 µL de ácido tricloroacético (10 % w/v). Las mezclas (800 µL) se transfirieron a la microplaca de 48 pocillos, donde se adicionaron 800 µL de agua

desionizada y 160 μL de cloruro de hierro (**Figura 8**). De la misma forma se prepararon blancos con el disolvente de extracción, agua o metanol:agua 8:2 (v/v). La absorbancia se midió a 690 nm. Los resultados se expresan en base a la concentración del extracto que muestra el 0,5 de absorbancia (EC_{50}), que se calculó a partir del gráfico de absorbancia a 690 nm en frente a la concentración del extracto.

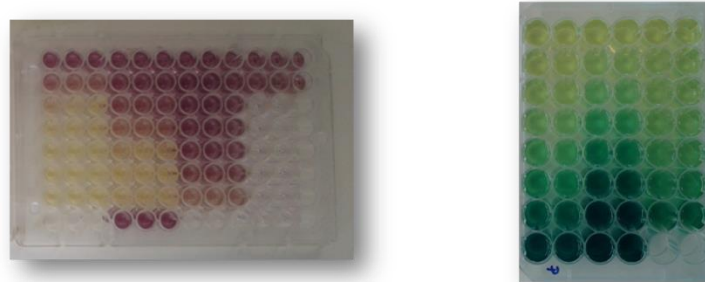


Figura 8: Microplaca de 96 pocillos para la evaluación de la actividad captadora de radicales libres (DPPH) (izq.) y microplaca de 48 pocillos para la evaluación del poder reductor.

c) Inhibición de la decoloración de β -caroteno

En primer lugar se preparó la solución de β -caroteno disolviendo el β -caroteno (2 mg) en cloroformo (10 mL). Se transfirieron 2 mL de esta disolución a un matraz redondo donde se evaporó el disolvente en el rotavapor a 40 °C. Después se adicionaron ácido linoleico (40 mg), Tween 80 (400 mg) y agua destilada (100 mL) y se agitó vigorosamente. Se transfirieron alícuotas (4,8 mL) de esta emulsión a tubos de ensayos que contenían las diferentes concentraciones de los extractos e infusiones (0,2 mL), y seguidamente se agitaron y se midió a tiempo cero la absorbancia a 470 nm (espectrofotómetro AnalytikJena). Posteriormente se incubaron en baño a 50 °C durante 2 h y pasado ese tiempo se determinó nuevamente la absorbancia a 470 nm. De la misma forma se prepararon blancos con el disolvente de extracción, agua o metanol:agua 8:2 (v/v). La inhibición de la decoloración de β -caroteno se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\%Decoloración = (A_{470 \text{ después } 2h} / A_{470 \text{ inicial}}) \times 100$$

Los resultados se expresan en base a la concentración del extracto que muestra el 50 % de la capacidad antioxidante (EC_{50}), que se calculó a partir del gráfico del porcentaje de decoloración frente a la concentración del extracto.

d) *Inhibición de la peroxidación lipídica utilizando sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS)*

Para la realización de este ensayo se empleó tejido cerebral de cerdo (*Sus scrofa*), que se homogeneizó en frío con tampón tris-HCl (20 mM; pH 7,4), centrifugando (centrífuga refrigerada Centorion K24OR) a 3000 g durante 10 min, con el fin de producir un homogeneizado de tejido cerebral en proporción 1:2 (w/v). Se incubó una alícuota (100 µL) de sobrenadante con las diferentes concentraciones de los extractos (200 µL), en presencia de 100 µL FeSO₄ (10µM) y 100 µL de ácido ascórbico (0,1 mM) a 37 °C durante 1 h. La reacción se finalizó con la adición de 500 µL ácido tricloroacético (28 %, v/v), seguida de 380 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA, 2%, w/v) y se calentó la mezcla a 80 °C durante 20 min. Después de centrifugarla a 3000 g durante 10 min, para eliminar el precipitado de proteínas, la intensidad de color del complejo malonaldehído (MDA)-TBA del sobrenadante se midió a través de su absorbancia a 532 nm. De la misma forma se prepararon blancos con el disolvente de extracción, agua o metanol:agua 8:2 (v/v) y con el tampón tris-HCl. El porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = [(A - B)/A] \times 100$$

Donde A y B son la absorbancia del blanco y del extracto, respectivamente. Los resultados se expresan en base a la concentración del extracto que muestra el 50 % de la inhibición de la peroxidación lipídica (EC₅₀), que se calculó a partir del gráfico del porcentaje de inhibición TBARS frente a la concentración del extracto.

3.2.6. Actividad antitumoral

Para evaluar la actividad antiproliferativa in vitro se seleccionaron cuatro líneas celulares tumorales humanas: MCF-7 (adenocarcinoma de mama), NCI-H460 (cáncer de pulmón), HeLa (carcinoma cervical) y HepG2 (carcinoma hepatocelular); y un cultivo primario de células de hígado de cerdo: PLP2 (porcine liver primary cell culture) desarrollada en el laboratorio donde se realizaron los ensayos.

Los extractos metanólicos liofilizados preparados en el apartado 3.2.2 (8 mg) se disolvieron en 1 mL de agua desionizada a fin de obtener una concentración final de 8 mg/mL, mientras que las infusiones se midieron directamente (5 mg/mL). A partir de estas disoluciones se realizaron diluciones sucesivas en las microplacas de 96 pocillos, con las siguientes concentraciones para los extractos metanólicos: 400; 100; 25; 6,25 y 1,56 µg/mL; y para las infusiones: 250; 62,5; 15,625; 3,906 y 0,977 µg/mL. Se realizaron por lo menos tres ensayos por duplicado para cada muestra.

Se empleó el ensayo colorimétrico de la sulforodamina B (SRB) para determinar la densidad celular al incubar las células con las diferentes concentraciones de las muestras. Los resultados se expresan en base a la concentración de muestra responsable del 50% de la inhibición del crecimiento celular (GI₅₀), que se calculó a partir del gráfico del porcentaje de inhibición celular frente a la concentración de la muestra. Se empleó elipticina como control positivo.

a) Actividad antiproliferativa en líneas celulares tumorales humanas

Las células se mantuvieron rutinariamente en un medio de cultivo para células adherentes (RPMI-1640) conteniendo 10 % de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor y glutamina (2mM), a 37 °C en incubadora de aire humidificado conteniendo 5 % de CO₂ (HF 151, Heal Force). (Guimarães et al., 2013). Todas las experiencias se realizaron en ambiente aséptico en una cámara de flujo laminar vertical (TLStar, AV-30/70). Se retiró el medio de cultivo de cada caja de cultivo con las respectivas líneas celulares. Se adicionó el medio de lavado HBSS (2,0 mL) y después de retirarlo se adicionó tripsina (8,0 mL). La caja de cultivo se colocó en la incubadora durante 3 min para la desagregación de las células y posteriormente se adicionó medio de cultivo (3,0 mL) para inactivar la tripsina. La suspensión celular se transfirió a un tubo estéril y se centrifugó (1200 rpm, 5 min). El sobrenadante se desechó y las células se volvieron a

suspender en medio de cultivo. Se retiraron 50 μL de suspensión y se adicionaron 50 μL de azul de tripano para contar el número de células en una cámara Neubauer.

Cada línea celular se depositó con una densidad apropiada ($7,5 \times 10^3$ células/pocillo para MCF-7 y NCI-H460 o $1,0 \times 10^4$ células/pocillo para HeLa y HepG2) en una microplaca de 96 pocillos. Se adicionaron 10 μL de cada concentración de las muestras en cada pocillo y 190 μL de la suspensión celular anteriormente preparada. Las microplacas se incubaron durante 48 h hasta el test de la sulforodamina B (SRB). En este test, se adicionó a cada pocillo ácido tricloroacético frío (TCA, 10 %; 100 μL) y se incubó seguidamente durante 60 min a 4 °C. Las microplacas se lavaron con agua destilada y se secaron. Se adicionó a cada pocillo solución de SRB (0,1 % en 1 % ácido acético; 100 μL). La microplaca se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó con ácido acético 1 % para eliminar el exceso de SRB y se secó. Se adicionó en cada pocillo Tris (10 mM, pH 7,4; 200 μL) y se agitó en un agitador de microplacas (Stat Fax-2100), para solubilizar SRB. Se midió la absorbancia a 540 nm en el lector de microplacas referido anteriormente.

b) *Hepatotoxicidad en células no tumorales*

Se preparó un cultivo de células primarias a partir de hígado fresco de cerdo, obtenido en un matadero, designada por PLP2, siguiendo el procedimiento descrito por el grupo de investigación del IPB, donde se incluye este trabajo (Abreu et al., 2011). Los tejidos se lavaron en solución salina de Hank, conteniendo 100 U/mL de penicilina y 100 $\mu\text{g/mL}$ estreptomina, y divididos en explantes de $1 \times 1 \text{ mm}^3$. Los explantes se colocaron en cajas de cultivo con medio DMEM suplementado con SFB (10 %), 2 mM de aminoácidos no esenciales, 100 U/mL de penicilina y 100 $\mu\text{g/mL}$ estreptomina, y se incubaron a 37 °C. El medio de cultivo se cambió cada 2 días, monitorizando con microscopio invertido (Nikon Eclipse Ts 100). Las células se transfirieron a una microplaca de 96 pocillos con una densidad de $1,0 \times 10^4$ células/pocillo, y cultivadas en medio DMEM con SFB (10 %), 100 U/mL de penicilina y 100 $\mu\text{g/mL}$ estreptomina. Las células se trataron con las diferentes concentraciones de muestra y se realizó el test de SRB descrito anteriormente.

3.2.7. Análisis estadístico

Para cada especie, fueron analizadas tres muestras y todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Los resultados fueron expresados en: valor medio \pm desviación estándar (SD) y se analizaron mediante la prueba *t*-Student, con el programa SPSS v. 20.

3.3. Extracción, fraccionamiento, aislamiento e identificación de compuestos de *M. procera*

3.3.1. Patrones, reactivos, material y equipamiento

Los disolventes utilizados en estos procesos fueron hexano, diclorometano, acetato de etilo, *n*-butanol, metanol y acetona (*Carlo Erba Reagents Group*), todos ellos de grado analítico, excepto el hexano que fue purificado en el laboratorio. El agua desionizada fue obtenida en un sistema de purificación de agua Millipore Direct-Q (*TGI Water Systems, EUA*).

Los extractos y fracciones se concentraron sobre presión reducida a temperatura de 40 °C, excepto el butanol a 50 °C, en un rotavapor (*Buchi R-210*) con baño calefactor (modelo B-491) de la misma marca. El agua del extracto acuoso se eliminó en un liofilizador (modelo Lyoquest) de marca Telstar.

Para las cromatografías preparativas se empleó, como fase estacionaria o empaquetamiento de las columnas, gel de sílice 60 granulado de 0,063-0,200 mm (70-230 mesh ASTM) y 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 100 °C. La cromatografía preparativa en capa fina (PTLC) se desarrolló en placa de vidrio de gel de sílice 60 F254 (20 x 20 cm, 1 mm de anchura) (*Merck*).

Para la elucidación estructural de las sustancias aisladas se utilizaron los siguientes equipamientos:

- Espectrómetro de infrarrojos (*Nicolect Impact 410*) **IR**: Se prepararon pastillas de KBr al 1 % (m/m) con la muestra. Los valores del número de onda de máxima vibración (ν_{\max}) se expresan en cm^{-1} .
- Espectrómetro de resonancia magnética nuclear (*Varian modelo Mercury Vx 400 MHz*) **RMN (Figura 9)**: Utilizado para la obtención de los espectros de RMN de ^1H (400 MHz), ^{13}C (100 MHz), DEPT y COSY. Las muestras se solubilizaron

en cloroformo deuterado (CDCl_3), en metanol deuterado (CD_3OD) y en dimetilsulfóxido deuterado (DMSO) (*Cambridge Isotope Laboratories*). Como referencia interna se utilizó la señal del tetrametilsilano (TMS). Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en hercios (Hz).

- Cromatógrafo de gases (*Hewlett Packard 5890 Series II*) acoplado a detector de masas (*MSD Hewlett Packard 5972*) **GC/MS (Figura 9)**: Columna cromatográfica de composición (5 %-fenil)-metilpolisiloxano *HP-5ms* de *Agilent* ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$) con helio como gas portador. 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).
- Espectros de masas de alta resolución **HRMS**: Obtenidos mediante un espectrómetro de masas (*Applied Biosystems QSTR XL*), con modo de ionización por electrospray a 5500 V y detector de cuadrupolo-tiempo de vuelo ESI-Q-TOF en el Servicio General de Masas de la USAL. Los iones observados se expresan según su relación m/z .
- Cromatógrafo líquido de alta resolución (*Waters 600*) acoplado a detector de fotodiodo array (*Waters 2996*) con inyector automático (*Waters 2707*) **HPLC (Figura 9)**: Columna analítica *Waters XTerra C18 MS 5 mm* ($4,6 \times 150 \text{ mm}$) y columna semipreparativa *Waters XTerra C18 MS 5 mM* ($10 \times 150 \text{ mm}$).



Figura 9: Espectrómetro de resonancia magnética nuclear (izq.), cromatógrafo de gases (centro) y cromatógrafo líquido de alta resolución (dcha.)

3.3.2. Obtención de extractos de *M. procera*

Los extractos de *M. procera* se obtuvieron por maceración del material liofilizado en diferentes disolventes, siguiendo la secuencia hexano, DCM, AcOEt, MeOH y H₂O, a temperatura ambiente y con agitación constante. Posteriormente se filtraron con embudo Büchner y se eliminó el disolvente por evaporación en el rotavapor y en el caso del agua mediante liofilización (**Figura 10**).

Se realizaron dos extracciones: Extracción I, preliminar, con 15,0 g de muestra, donde se emplearon 300 mL de cada disolvente y Extracción II, con el resto de la muestra 32,2 g, donde se emplearon 644 mL de cada disolvente realizándose la extracción por duplicado (2×644 mL) y reuniendo ambos extractos (**Figura 11**).

De esta forma se obtuvieron los extractos designados por **E.Hexano**, **E.DCM**, **E.AcOEt**, **E.MeOH** y **E.H₂O**, analizándose todos ellos por ¹H-RMN en cloroformo deuterado y/o metanol deuterado, y los más apolares también por CG-MS.



Figura 10: Maceración de *M. procera* en disolventes y agitación (izq.), filtración a vacío (centro) y eliminación de agua por liofilización (dcha.).

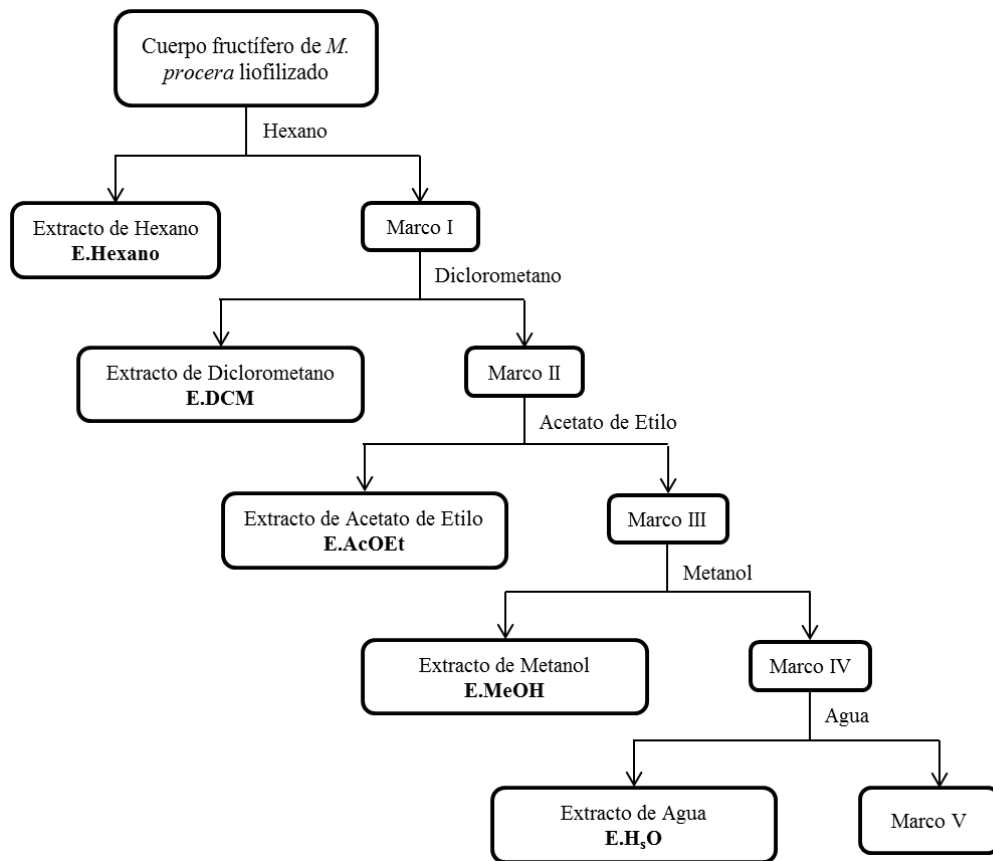


Figura 11: Esquema de extracción para la obtención de extractos de *M. procera*

3.3.3. Extracción de alcaloides de *M.procera*

A la muestra liofilizada se le realizó una extracción de alcaloides con disolventes orgánicos, AcOEt y *n*-BuOH, en medio ácido (**Figura 12**), obteniéndose los extractos de alcaloides solubles en AcOEt (**Al.A**) y alcaloides solubles en *n*-BuOH (**Al.B**).

A la muestra (1 g) se adicionó ácido sulfúrico (0,5 M; 50 mL), se agitó durante 30 min a temperatura ambiente y se filtró. A la disolución obtenida se le añadió amoniaco concentrado (30 %) hasta pH >10, comprobándose con papel identificador, y se llevó a un embudo de decantación donde se extrajo con acetato de etilo (3×25 mL) y después con butanol (3×25 mL). Las fases orgánicas se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se evaporaron en el rotavapor, obteniéndose los extractos Al.A (0,971 g) y Al.B (1,397 g), que se analizaron por ¹H-RMN y Al.A también por IR.

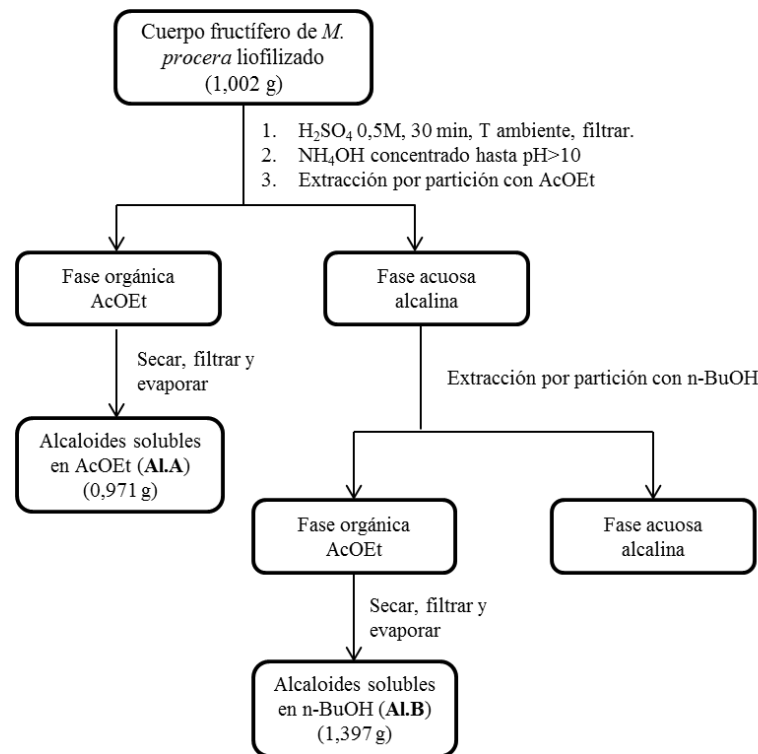


Figura 12: Extracción de alcaloides de *M. procera* en medio ácido con disolventes orgánicos

3.3.4. Extracción y estudio del extracto metanólico (E.MeOH)

a) Acetilación de E.MeOH y extracción de compuestos acetilados

Para la reacción de acetilación, el extracto metanólico (E.MeOH; 500 mg) se disolvió en 3 mL de piridina, y después se adicionaron 3 mL de anhídrido acético. Esta reacción tuvo lugar durante por lo menos 12 h, en oscuridad, agitación eficaz, temperatura ambiente (Bhan et al., 1988) (**Figura 13**).

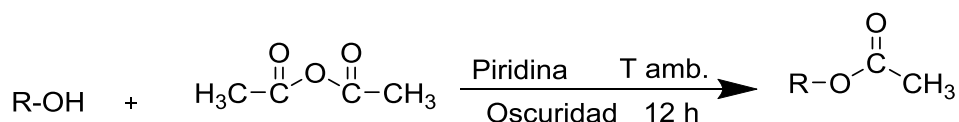


Figura 13: Esquema de la reacción de acetilación de alcoholes.

Después del período de reacción, se adicionó hielo picado para hidrolizar el exceso de anhídrido acético. Pasada 1 h, la mezcla se transfirió a un embudo de decantación donde los compuestos acetilados se extrajeron con AcOEt, lavándose la fracción orgánica sucesivamente con HCl 2 N (3×25 mL) y soluciones acuosas saturadas de NaHCO₃ (3×25 mL) y NaCl hasta pH neutro (**Figura 14**). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó obteniéndose el extracto metanólico acetilado (**E.MeOHacet.**; 358 mg).

También se realizó la reextracción de las aguas de lavado (**Figura 14**), generadas en la extracción anterior. La fase acuosa ácida, con los compuestos básicos en disolución, se basificó hasta pH > 10 con NaOH 2 N y se extrajo con AcOEt (3×30 mL); mientras que la fase acuosa básica, con los compuestos ácidos en disolución, se acidificó hasta pH < 3 con HCl 2 N y se extrajo con AcOEt (3×30 mL). Ambas fases orgánicas se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se evaporaron en el rotavapor, obteniéndose los extractos: E.MeOH acetilado compuestos básicos, de las aguas de extracción, (**E.MeOHacet.Bs**; 8 mg) y E.MeOH acetilado compuestos ácidos, de las aguas de extracción, (**E.MeOHacet.Acs**; 75 mg). Los extractos E.MeOHacet., E.MeOHacet.Bs y E.MeOHacet.Acs se analizaron por ¹H-RMN en cloroformo deuterado y por CG-MS.

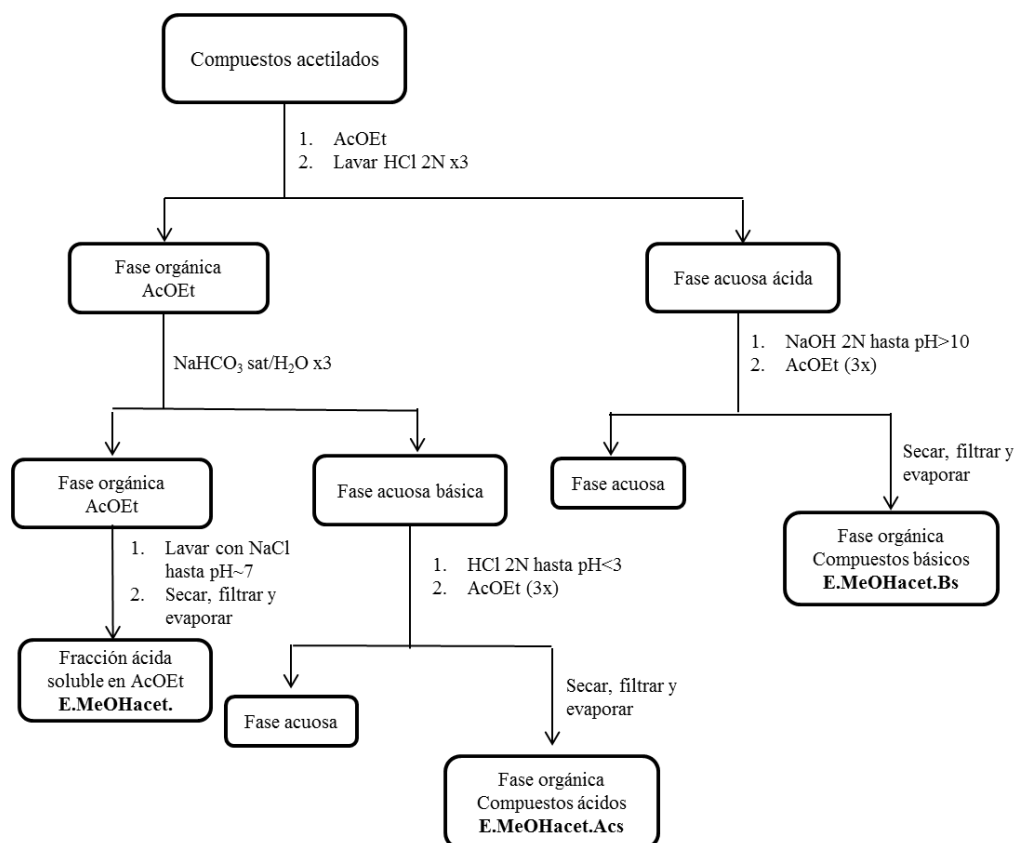


Figura 14: Esquema de extracción de compuestos acetilados con AcOEt y reextracción de las fases acuosas

b) Fraccionamiento del E.MeOH en AcOEt, BuOH y agua

El extracto metanólico evaporado fue suspendido en agua y extraído sucesivamente con disolventes, AcOEt y BuOH (**Figura 15**). Al extracto metanólico (E.MeOH; 500 mg) se añadió agua desionizada (50 mL) y se agitó vigorosamente. La mezcla se llevó a un embudo de decantación donde se extrajo con AcOEt (3×20 mL) y posteriormente la fase acuosa resultante se extrajo con *n*-BuOH (3×20 mL). Las fases orgánicas se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se evaporaron en el rotavapor, obteniéndose los extractos: **E.MeOHsol.AcOEt** y **E.MeOHsol.BuOH**; mientras que la fase acuosa se liofilizó obteniéndose el extracto: **E.MeOHsol.H₂O**. Los extractos se analizaron por ¹H-RMN en metanol deuterado.

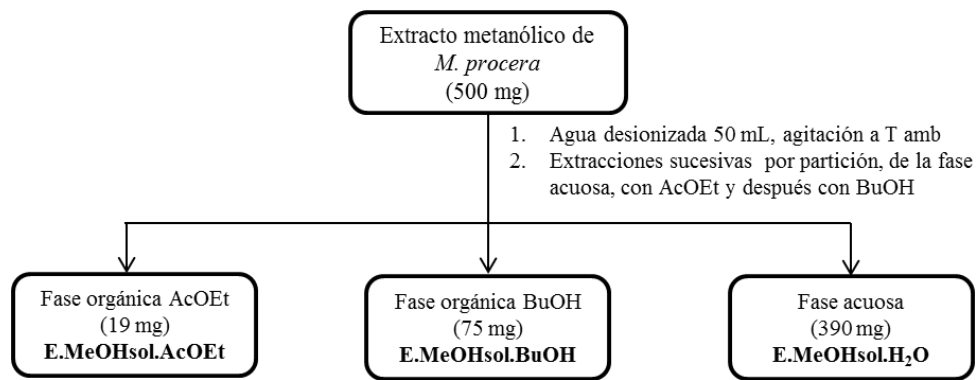


Figura 15: Extractos obtenidos en el fraccionamiento del E.MeOH en AcOEt, BuOH y agua

➤ **Acetilación de E.MeOH soluble en *n*-BuOH (E.MeOHsol.BuOH)**

Los compuestos solubles en BuOH del E.MeOH (E.MeOHsol.BuOH.; 75 mg) se acetilaron, para su estudio, siguiendo el mismo procedimiento explicado anteriormente en el apartado 3.3.4.a); para ello se emplearon 500 μ L de piridina y 500 μ L de anhídrido acético. Los compuestos acetilados fueron extraídos con AcOEt y también se realizó la reextracción de las fases acuosas obtenidas. Se obtuvieron los extractos: E.MeOH soluble en *n*-BuOH acetilado (**E.MeOHsol.BuOHacet.**; 65 mg); compuestos básicos, de las aguas de extracción, del E.MeOH soluble en BuOH (**E.MeOHsol.BuOHacet.Bs**; 8 mg); y compuestos ácidos, de las aguas de extracción, del E.MeOH soluble en BuOH (**E. MeOHsol.BuOHacet.Acs**; 21 mg). Los extractos se analizaron por ^1H -RMN en metanol deuterado y por CG-MS.

c) **Extracción ácido-base del E.MeOH con *n*-BuOH**

El extracto metanólico se fraccionó mediante extracción ácido-base con el fin de separar este tipo de compuestos (**Figura 16**). Al extracto metanólico (E.MeOH; 500 mg) se añadió carbonato de sodio saturado en agua (50 mL) y se mantuvo en agitación efectiva durante 30 min. La mezcla se transfirió a un embudo de decantación donde se extrajo con *n*-BuOH (3 \times 20 mL), añadiendo disolución acuosa saturada de NaCl para resolver y lavar las fases. Posteriormente la fracción acuosa se acidificó con ácido sulfúrico (0,5 M) hasta pH<1 y se extrajo con *n*-BuOH (3 \times 30 mL). Las fases orgánicas se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se evaporaron en el rotavapor, obteniéndose los extractos: **E.MeOH-M1** (compuestos neutros y básicos solubles en *n*-BuOH; 219 mg) y **E.MeOH-M2** (compuestos ácidos solubles en *n*-BuOH; 141 mg). De

la misma forma, se repitió el proceso con 1,5 g de E.MeOH, obteniéndose **E.MeOH-M1'** (267 mg) y **E.MeOH-M2'** (614 mg). Todos los extractos se analizaron por ^1H -RMN en metanol deuterado.

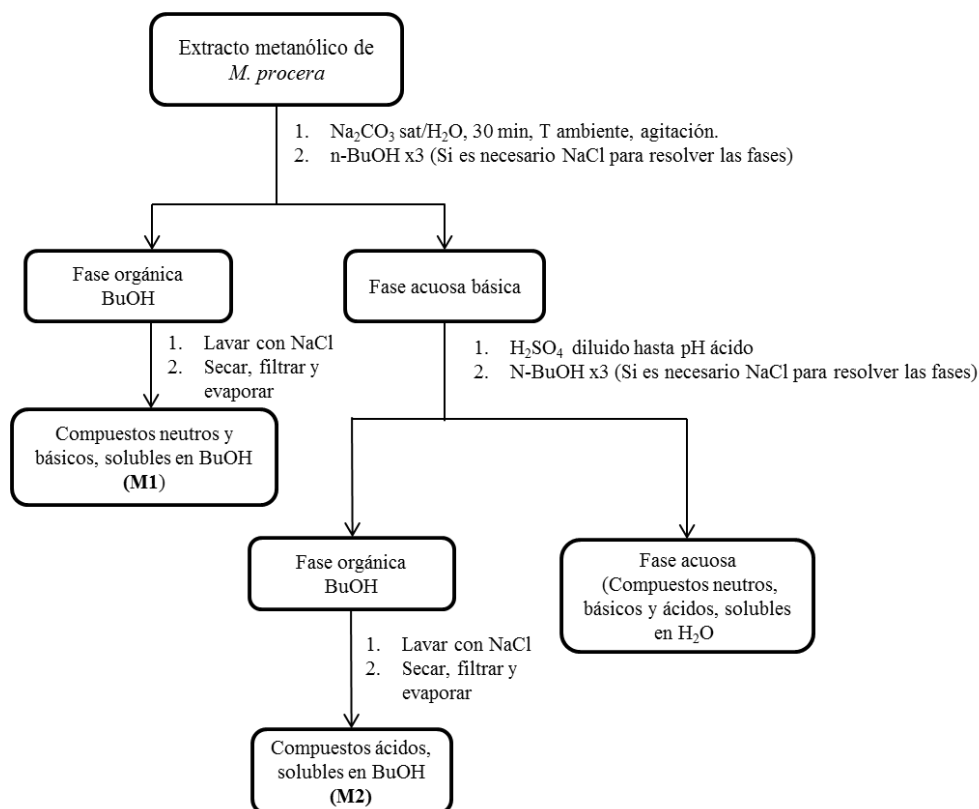


Figura 16: Extracción ácido-base del E.MeOH de *M.procera*

➤ ***Esterificación de E.MeOH compuestos ácidos solubles n-BuOH (E.MeOH-M2)***

Los compuestos ácidos extraídos de E.MeOH se esterificaron, con el fin de disminuir su polaridad y poder estudiarlos mejor. El extracto M2 (141 mg) se disolvió en 10 mL de una mezcla de tolueno: metanol 3:2 (v/v) y después se adicionaron 2 mL de trimetilsilildiazometano (TMSCHN₂) como agente alquilante (Hashimoto et al., 1981). Esta reacción tuvo lugar durante 12 h a temperatura ambiente (**Figura 17**).

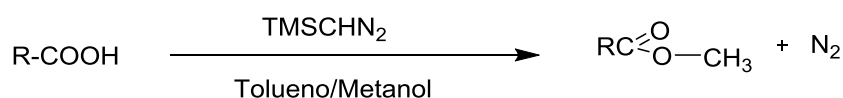


Figura 17: Esquema de la reacción de esterificación de ácidos carboxílicos

Pasado ese tiempo, se evaporó el disolvente, obteniéndose el extracto M2 metilado (**E.MeOH-M2met.**). El extracto M2.met se analizó por ¹H-RMN en cloroformo y metanol deuterado.

➤ ***Acetilación de E.MeOH compuestos ácidos solubles n-BuOH metilados (E.MeOH-M2met.)***

Los compuestos ácidos metilados extraídos de E.MeOH (E.MeOH-M2met.; 77 mg) se acetilaron, para su estudio, siguiendo el mismo procedimiento explicado anteriormente en el apartado 3.3.4.a; para ello se emplearon 500 μL de piridina y 500 μL de anhídrido acético. Los compuestos acetilados fueron extraídos con AcOEt y también con n-BuOH. Se obtuvieron los extractos: Fracción ácida soluble en AcOEt (**E.MeOH-M2met.acet.sol.A**; 58 mg) y fracción ácida soluble en n-BuOH (**E.MeOH-M2met.acet.sol.B**; 130 mg). Ambos extractos se analizaron por ¹H-RMN en cloroformo y metanol deuterado y por CG-MS.

d) Extracción del E.MeOH con AcOEt

El extracto metanólico restante (6 g), fue macerado, a temperatura ambiente y con agitación, en 250 mL de AcOEt durante 48 h. Pasado ese tiempo se filtró y evaporó la disolución obtenida. El sólido filtrado se recuperó con MeOH reuniéndolo con la parte insoluble y se evaporó. De esta forma se obtuvieron dos fracciones: E.MeOH soluble en AcOEt (**E.M.sol.AcOEt**; 0,246 g) y E.MeOH insoluble en AcOEt (**E.M.insol.AcOEt**; 5,827 g). Ambos extractos se analizaron por $^1\text{H-RMN}$.

3.3.5. Fraccionamiento y aislamiento

a) Cromatografía del E.AcOEt

El E.AcOEt obtenido en el apartado 3.3.2, se fraccionó por cromatografía en columna sobre gel de sílice 60 en DCM. La muestra (176 mg) se disolvió en un mezcla de DCM:MeOH y se depositó en forma de papilla por no ser soluble en DCM. La selección del eluyente se hizo mediante el estudio por TLC del E.AcOEt. y consistió en: DCM, DCM:AcOEt (8:2), AcOEt y DCM:MeOH (7:3). Se recogieron 3 matraces de 100 mL y 40 tubos de aproximadamente 25 mL. Las fracciones se reunieron, según su semejanza de los perfiles cromatográfico y espectral observados por TLC y por $^1\text{H-RMN}$.

b) Cromatografía del E.MeOH soluble en AcOEt (E.M.A.)

Los extractos solubles en AcOEt: E.MeOHsol.AcOEt, E.M.sol.AcOEt y E.AcOEt-F.32-34, se reunieron, denominándolos a partir de ahora como **E.M.A** (329 mg), y se fraccionaron por cromatografía en columna sobre gel de sílice P60 en DCM. La muestra se disolvió en un mezcla de DCM:MeOH y se depositó en forma de papilla por no ser soluble en DCM. La selección del eluyente se hizo mediante el estudio por TLC de la muestra y consistió en: DCM, DCM:AcOEt (1:1), DCM:MeOH (95:5), (9:1), (8:2), (7:3), (1:1), acetona y MeOH. Se recogieron 9 matraces de 100 mL, 56 tubos de aproximadamente 25 mL y 2 matraces de 250 mL. Las fracciones se reunieron según su semejanza, del perfil cromatográfico observado por TLC y por $^1\text{H-RMN}$.

c) *PTLC de E.M.A.T.37-46*

La fracción, que reunía a los tubos 37 a 46 de la cromatografía anterior, E.M.A.T.37-46 (68 mg), se sometió a cromatografía preparativa en capa fina (PTLC) usando como eluyente DCM:AcOEt:MeOH (3:4:3). Se efectuaron dos eluciones sucesivas, obteniéndose 8 fracciones, designadas por E.M.A.T.37-46pr.A a H, de menor a mayor polaridad: H, D, C, F, B, E, A y G. Las fracciones se marcaron empleando una lámpara UV, se rascaron y se eluyeron con MeOH (2×20 mL), asegurándose por pesada de la correcta extracción y teniendo en cuenta que pueden extraerse pequeñas cantidades de sílice (**Figura 18**).

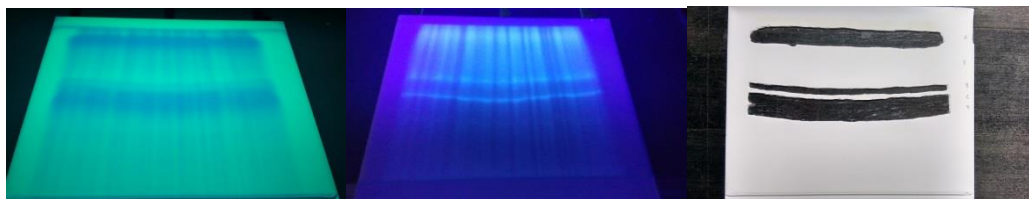


Figura 18: PTLC de E.M.A.T.37-46 revelado a 254 nm (izq.), a 366 nm (centro) y rascado (dcha.).

d) *Extracción ácido –base de fracciones del E.M.A.*

Se reunieron las 4 fracciones E.M.A.T.47-49, E.M.A.T.50-56, E.M.A.T.37-46pr.C y E.M.A.T.37-46pr.H; y se fraccionaron mediante extracciones ácido-base con AcOEt y *n*-BuOH. A la mezcla de fracciones (47 mg) se adicionaron 100 mL de AcOEt y fue extraída con NaOH (2 N; 3×20 mL), reservando la fase orgánica (**F.Org.AcOEt-Comp.neutros**; 10 mg). La fase acuosa resultante fue extraída con *n*-BuOH (3×20 mL), reservando la fase orgánica (**F.Org.BuOH-Comp.neutros**; 293 mg). Finalmente la fase acuosa resultante, de esta segunda extracción, se acidificó con HCl (2 N) hasta pH<3 y fue extraída con AcOEt (3×20 mL) (**F.Org.AcOEt-Comp.ácidos**; 10 mg). Las fases orgánicas se lavaron con una disolución saturada de NaCl, se secaron con Na₂SO₄ y se evaporaron. También se analizaron por ¹H-RMN.

e) ***HPLC semipreparativa del E.M.insol.AcOEt***

El extracto metanólico insoluble en AcOEt (E.M.insol.AcOEt) obtenido en el apartado 3.3.4.d), se fraccionó mediante cromatografía líquida de alta resolución semipreparativa (HPLC semipreparativa), haciendo un estudio previo en HPLC analítica para optimizar las condiciones de trabajo.

Se realizaron dos cromatografías, en cada una, 100 mg de E.M.insol.AcOEt disueltos en 2 mL de MeOH y 1 mL de agua y filtrados previa inyección manual. Como fase móvil se empleó una mezcla de (A) acetonitrilo y (B) agua, con flujo 5 mL/min, operando a temperatura ambiente. El gradiente establecido fue 50 % A hasta 5 min, 50-100 % A hasta 15 min, 100 % A hasta 35 min, 100-50 % A hasta 38 min y 50 % A hasta el final. Se recogieron, por cada cromatografía, 40 tubos (1 tubo/min; 0-40 min) y un matraz de 50 mL (41-50 min) correspondientes a los minutos del cromatograma. Posteriormente algunas fracciones se analizaron por ¹H-RMN.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización química y nutricional de *C. officinalis* y *M. cervina* y ensayos de bioactividad

4.1.1. Valor nutricional

Los resultados del estudio del valor nutricional (proteínas, lípidos, glúcidos y cenizas) y del valor energético obtenido, en la planta seca e infusiones de *C. officinalis* y *M. cervina*, se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9: Composición nutricional y valor energético de las plantas secas y de las infusiones de *C. officinalis* y *M. cervina*. En cada línea, p -value < 0,05 significa diferencias significativas en los resultados, (media \pm SD).

| | Planta | | | Infusión de la planta | | |
|--------------------------------------|-----------------------|-------------------|---|-----------------------|-------------------|---|
| | <i>C. officinalis</i> | <i>M. cervina</i> | Prueba <i>t</i> -Student (<i>p</i> -valor) | <i>C. officinalis</i> | <i>M. cervina</i> | Prueba <i>t</i> -Student (<i>p</i> -valor) |
| Cenizas (g/100 g dw) | 14 \pm 1 | 6,9 \pm 0,1 | <0,001 | np | np | - |
| Proteínas (g/100 g dw) | 2,4 \pm 0,5 | 5,9 \pm 0,2 | <0,001 | - | - | - |
| Grasas (g/100 g dw) | 5,5 \pm 0,2 | 1,4 \pm 0,1 | <0,001 | - | - | - |
| Carbohidratos (g/100 g dw) | 78 \pm 2 | 85,8 \pm 0,2 | <0,001 | 0,038 \pm 0,003 | 0,048 \pm 0,003 | 0,012 |
| Energía (kcal/100 g dw) | 373 \pm 6 | 379,2 \pm 0,2 | 0,075 | 0,15 \pm 0,01 | 0,19 \pm 0,01 | 0,012 |

np = No realizado. dw = Peso seco. El valor de carbohidratos y de energía en las infusiones se expresa por 100 mL de infusión.

Los carbohidratos o glúcidos calculados fueron los macronutrientes más abundantes en ambas plantas, y los únicos analizados en las infusiones porque son prácticamente los únicos compuestos que contribuyen para el valor energético de las mismas; siendo los valores superiores para *M. cervina*, tanto en las infusiones (0,05 g/100 mL) como en la planta seca (86 g/100 g). También los niveles más altos de proteínas fueron para *M. cervina* (6 g/100 g), mientras que *C. officinalis* presentó mayor contenido en cenizas y en grasas (14 g/100 g y 6 g/100g, respectivamente).

El valor energético calculado para las plantas secas (376 g/100 g, de media), no mostró diferencias significativas entre *C. officinalis* y *M. cervina* ($p>0,05$), mientras que para las infusiones fue mayor para *M. cervina* (0,19 g/100 mL).

Ambas plantas revelaron elevado poder nutricional con una baja contribución energética. En la literatura, no se han encontrado datos sobre el valor nutricional de estas plantas, aunque en el caso de la caléndula sí que se ha encontrado información sobre su composición como ingrediente cosmético (Andersen et al., 2010).

4.1.2. Caracterización de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos encontrados en *C. officinalis* y *M. cervina*, infusiones y extractos hidrometanólicos están listados en las **Tablas 10, 11 y 12**, y sus perfiles HPLC pueden observarse en la **Figura 19**. El estudio de las muestras presentaron perfiles completamente diferentes; *C. officinalis* presentó trece compuestos diferentes, principalmente flavonoles glicosilados, mientras que *M. cervina* presentó once compuestos, principalmente derivados de cafeoil (dímeros, trímeros y tetrámeros del ácido cafeico). En la literatura, la información relacionada con la composición fenólica de *C. officinalis* y *M. cervina* es muy escasa.

El perfil fenólico de *C. officinalis* presentó dos ácidos fenólicos (**compuestos 1^C y 2^C**) y once derivados de flavonoles (**compuestos 3^C-13^C**). Ácido 5-*O*-cafeoilquínico (ácido clorogénico, **compuesto 2^C**), quercetina-3-*O*-rutinosido (**compuesto 4^C**), isoramnetina-3-*O*-rutinosido (**compuesto 11^C**) y isoramnetina-3-*O*-glucósido (**compuesto 12^C**), se identificaron positivamente de acuerdo con sus tiempos de retención, masa y características UV-vis por comparación con patrones comerciales. Los **compuestos 2^C, 4^C y 11^C** han sido descritos por otros autores en infusiones y decocciones de caléndula (Matić et al., 2013) y en hojas de caléndula (Olennikov & Kashchenko, 2014). El **compuesto 1^C** ([M-H]⁻ a *m/z* 341) se identificó como un derivado hexósido del ácido cafeico.

Los restantes compuestos fenólicos correspondían con derivados del flavonol, a partir de quercetina (λ_{\max} alrededor de 350 nm, fragmento MS² a *m/z* 301), canferol (λ_{\max} alrededor de 348 nm, fragmento MS² a *m/z* 285) e isoramnetina (λ_{\max} a 354 nm, fragmento MS² a *m/z* 315) (**Tabla 10**). Los **compuestos 3^C** ([M-H]⁻ a *m/z* 755), **5^C** ([M-H]⁻ a *m/z* 739) y **6^C** ([M-H]⁻ a *m/z* 769), deben corresponderse con derivados de quercetina, canferol e isoramnetina que incluyen dos residuos desoxihexosilo y uno hexosilo. El hecho de que solo se liberó un fragmento MS² correspondiente a la aglicona sugiere que los tres azúcares constituyen un trisacárido. Compuestos similares se han descrito en infusiones y decocciones de caléndula por (Matić et al., 2013), siendo identificados como manghaslin (quercetina 3-*O*-2G-ramnosilrutinosa) y typhaneoside (isoramnetina 3-*O*-2G-ramnosilrutinosa), los cuales corresponden a los **compuestos 3^C y 6^C** respectivamente. Los **compuestos 7^C y 8^C** corresponden a derivados de quercetina, en los cuales el pico 7 presentó un ion pseudomolecular [M-H]⁻ a *m/z* 595, liberando un fragmento MS² a *m/z* 301 ([M-H-132-162]⁻, pérdida de resto pentosilo y hexosilo); este

compuesto se identificó tentativamente como quercetina-O-pentosilhexosa. El **compuesto 8^C** ([M-H]⁻ a m/z 651) presentó 42 u (residuo acetilo) más que el **compuesto 4^C**, por lo que se asignó tentativamente como quercetin-*O*-acetildesoxyhexosilhexosa. El **compuesto 9^C** ([M-H]⁻ a m/z 623) se correspondió con isoramnetina-*O*-desoxihexosilhexosa, el cual difiere del **compuesto 11^C** (isoramnetin 3-*O*-glucosa) en el tipo de azúcar o en la posición de sustitución. Por lo que sabemos, estos compuestos no han sido descritos con anterioridad en muestras de caléndula.

Los **compuestos 10^C** y **13^C** presentaron un ión pseudomolecular [M-H]⁻ a m/z 505 y 519 liberando un fragmento MS² a m/z 301 (quercetina) y a m/z 301 (isoramnetina), respectivamente, perdiendo un residuo de acetilhexosa ([M-H-42-162]⁻). Un compuesto similar al pico 13 ha sido descrito en infusiones y decocciones de caléndula (Matić et al., 2013), isoramnetina 3-*O*-acetilglucosa, y por tanto, este supuesto se ha empleado para identificar el compuesto de nuestra muestra. (Olennikov & Kashchenko, 2014), identificaron quercetina-3-*O*-(6''-acetil)-β-D-glucosa en hojas de calendula, y esta identificación puede asumirse tentativamente para el **compuesto 10^C**.

Isoramnetina-3-*O*-ramnosilrutinosa (**compuesto 6^C**) fue el flavonoide más abundante presente en caléndula, lo cual está de acuerdo con los resultados reportados por (Matić et al., 2013). (Olennikov & Kashchenko, 2014) describieron isoquercetina y ácido clorogénico como los compuestos más abundantes en hojas de *C. officinalis*.

Como se menciona anteriormente, *M. cervina* presentó derivados del cafeoilo (dímeros, trímeros y tetrámeros del ácido cafeico). Ácido cafeico (**compuesto 2^M**) y ácido *trans* rosmarínico (**compuesto 9^M**), se identificaron positivamente según sus tiempos de retención, características UV-vis y de masas por comparación con patrones comerciales. El **compuesto 5^M** (m/z a 521) dio un fragmento a m/z 359 (ácido rosmarínico) de la pérdida de 162 mu (residuo de hexosa), así como otros fragmentos idénticos a aquellos observados en el compuesto 9^M, lo que permite la identificación tentativa como hexósido del ácido rosmarínico. Además, el **compuesto 8^M** con características similares al compuesto 9^M, se identificó tentativamente como el isómero *cis* del ácido rosmarínico. El **compuesto 1^M** ([M-H]⁻ a m/z 433) se asignó como un derivado del ácido cafeico basándose en las características de los iones de los fragmentos a m/z 179 [ácido cafeico-H]⁻ y 135 [ácido cafeico-CO₂-H]⁻. Sin embargo,

ninguna estructura definida se podría corresponder con el ión molecular del compuesto, por lo que permanece nombrado como derivado del ácido cafeico.

El **compuesto 3^M** presento un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a m/z 537, UV, espectro y patrón de fragmentación coherente con el trímero del ácido cafeico, ácido litospérmico A. Este compuesto puede perder fácilmente el grupo 8''-carboxilo (-44 u) liberando un fragmento a m/z 493 que después se descompone en los fragmentos iónicos a m/z 313 y 295. Los ácidos salvianólicos H/I, con el mismo peso molecular que el ácido litospérmico A, se descartaron como posibles identificaciones porque presentan patrones de fragmentación bastante diferentes (Ruan et al., 2012). El ácido litospérmico A se esperaría que eluyese más tarde que el ácido rosmarínico (Chen et al., 2011), mientras que el compuesto 3^M podría corresponder a un isómero del ácido litospérmico A, compuesto similar que ya ha sido descrito por el grupo de investigación en una muestra de *Melissa officinalis* (Barros et al., 2013). Los **compuestos 4^M y 6^M** ($[M-H]^-$ a m/z 539) presentaron el mismo ión pseudomolecular y se identificaron como isómeros del ácido yunaneico D, basándose en sus características UV y de masas según lo reportado por (Chen et al., 2011) en las partes aéreas de *Salvia miltiorrhiza*. El **compuesto 7^M** mostró un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a m/z 719 y un fragmento mayoritario MS² a m/z 359 que correspondería a $[M-2H]^{2-}$; esta masa característica coincidió con la del ácido sagerínico, un dímero del ácido rosmarínico, que ha sido publicado por el grupo de investigación en otras muestras de plantas (Barros et al., 2013; Martins et al., 2015). Los **compuestos 10^M y 11^M** también presentan el mismo ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a m/z 493, que junto con los fragmentos iónicos característicos a m/z 313, 295 y 197 (Chen et al., 2011; Ruan et al., 2012) y el espectro UV permitieron asignarlo como ácido salvianólico A.

El ácido rosmarínico (compuesto 9^M) fue el compuesto fenólico más abundante en *M. cervina* y, por lo que sabemos, no se ha reportado previamente la composición fenólica individual de esta especie.

Tabla 10: Tiempos de retención (t_r), longitudes de onda de máxima absorción (λ_{\max}), datos del espectro de masas e identificación de los compuestos fenólicos en infusiones y extractos hidrometanólicos de *C. officinalis*.

| Compuesto | t_r (min) | λ_{\max} (nm) | Ion molecular [M-H] ⁻ (m/z) | MS ² (m/z) | Identificación (Tentativa) |
|------------------------------|----------------|--------------------------|---|---------------------------------------|---|
| <i>Calendula officinalis</i> | | | | | |
| 1 ^C | 7,0 | 320 | 341 | 179(100),161(3),135(40) | (Hexósido del ácido cafeico) |
| 2 ^C | 7,6 | 328 | 353 | 191(100),179(8),173(6),161(11),135(3) | Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico |
| 3 ^C | 15,1 | 350 | 755 | 301(100) | (Quercetina-3- <i>O</i> -ramnosilrutinosa) |
| 4 ^C | 16,7 | 354 | 609 | 301(100) | Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosa |
| 5 ^C | 17,1 | 348 | 739 | 285(100) | (Kaempferol- <i>O</i> -ramnosilrutinosa) |
| 6 ^C | 17,5 | 356 | 769 | 315(100),300(10) | (Isoramnetina-3- <i>O</i> -ramnosilrutinosa) |
| 7 ^C | 18,3 | 350 | 595 | 301(100) | (Quercetina- <i>O</i> -pentosilhexosa) |
| 8 ^C | 18,5 | 350 | 651 | 609(5),301(50) | (Quercetina-3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -acetil)-glucosa) |
| 9 ^C | 19,6 | 356 | 623 | 315(100),300(18) | (Isoramnetina desoxihexosil hexosa) |
| 10 ^C | 21,2 | 356 | 505 | 301(65) | (Quercetina- <i>O</i> -acetilhexosa) |
| 11 ^C | 22,7 | 356 | 623 | 315(100),300(10) | Isoramnetina-3- <i>O</i> -rutinosa |
| 12 ^C | 24,2 | 354 | 477 | 315(100),300(15) | Isoramnetina-3- <i>O</i> -glucosa |
| 13 ^C | 26,9 | 354 | 519 | 315(100),300(37) | (Isoramnetina 3- <i>O</i> -acetilglucosa) |

Tabla 11: Tiempos de retención (t_r), longitudes de onda de máxima absorción (λ_{\max}), datos del espectro de masas e identificación de compuestos fenólicos en infusiones y extractos hidrometanólicos de *M. cervina*.

| Compuesto | t_r (min) | λ_{\max} (nm) | Ion molecular [M-H] ⁻ (m/z) | MS ² (m/z) | Identificación (Tentativa) |
|-----------------------|----------------|--------------------------|---|--|------------------------------------|
| <i>Mentha cervina</i> | | | | | |
| 1 ^M | 4,7 | 282 | 433 | 235(100),197(25),179(17),135(6) | (Derivado del ácido cafeico) |
| 2 ^M | 10,7 | 324 | 179 | 135(100) | Ácido cafeico |
| 3 ^M | 15,4 | 326 | 537 | 493(59),339(100),313(21),295(37),269(14),229(8),197(33),179(22), 135(24) | (Isómero del ácido litospérmico A) |
| 4 ^M | 16,6 | 272,324sh | 539 | 495(13),359(21),297(100),279(64),197(34),179(36),161(34),135(18) | (Isómero del ácido yunaneico D) |
| 5 ^M | 18,2 | 322 | 521 | 359(100),197(21),179(34),161(73),135(15) | (Hexósido del ácido rosmarínico) |
| 6 ^M | 18,5 | 274,324sh | 539 | 495(44),359(28),297(100),279(11),197(33),179(31),161(84),135(16) | (Isómero ácido yunaneico D) |
| 7 ^M | 20,0 | 276 | 719 | 539(12),521(10),359(65)197(6),179(8),161(17),135(3) | (Ácido sagerínico) |
| 8 ^M | 22,4 | 328 | 359 | 197(22),179(27),161(100),135(14) | (Ácido isorosmarínico) |
| 9 ^M | 23,3 | 328 | 359 | 197(30),179(54),161(100),135(7) | Ácido rosmarínico |
| 10 ^M | 26,7 | 326 | 493 | 359(85),313(9),295(71),269(8),197(33),179(44),161(100),135(90) | (Ácido salvianólico A) |
| 11 ^M | 31,6 | 324 | 493 | 359(84),313(13),295(58),269(7),197(31),179(41),161(91),135(86) | (Ácido salvianólico A) |

Table 12: Cuantificación de los compuestos fenólicos de *Calendula officinalis* y *Mentha cervina* en infusiones ($\mu\text{g}/100 \text{ mL}$) y en extractos hidrometanólicos ($\text{mg}/100 \text{ g}$ extracto). (media \pm SD)

| Compuestos | <i>Calendula officinalis</i> | | <i>Mentha cervina</i> | | |
|--|------------------------------|--------------------------|----------------------------------|---------------|--------------------------|
| | Infusión | Extracto hidrometanólico | Compuestos | Infusión | Extracto hidrometanólico |
| Hexósido del ácido cafeico | 41 \pm 1 | 6,41 \pm 0.02 | Derivado del ácido cafeico | 104 \pm 2 | 16,1 \pm 0.2 |
| Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico | 149 \pm 3 | 33,32 \pm 0.01 | Ácido cafeico | 96 \pm 1 | 23 \pm 2 |
| Quercetina-3- <i>O</i> -ramnosilrutinosa | 134 \pm 3 | 28,58 \pm 0.04 | Isómero del ácido litospérmico A | 162 \pm 16 | 10 \pm 1 |
| Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosa | 95 \pm 3 | 22 \pm 1 | Isómero del ácido yunaneico D | 262 \pm 8 | 31 \pm 3 |
| Kaempferol- <i>O</i> -ramnosilrutinosa | 59 \pm 6 | 10,0 \pm 0.4 | Hexósido del ácido rosmarínico | 195 \pm 1 | 30 \pm 5 |
| Isoramnetina-3- <i>O</i> -ramnosilrutinosa | 1547 \pm 9 | 305 \pm 8 | Isómero del ácido yunaneico D | 295 \pm 15 | 30,2 \pm 0.4 |
| Quercetina- <i>O</i> -pentosilhexosa | 34 \pm 1 | 8,0 \pm 0.1 | Ácido sagerínico | 333 \pm 7 | 42 \pm 1 |
| Quercetina-3- <i>O</i> -(6''-acetil)-glucosa | 23 \pm 2 | 3,8 \pm 0.1 | Ácido <i>cis</i> -rosmarínico | 441 \pm 25 | 68 \pm 4 |
| Isoramnetina desoxihexosil hexosa | 316 \pm 8 | 66,5 \pm 0.4 | Ácido <i>trans</i> -rosmarínico | 3224 \pm 88 | 754 \pm 2 |
| Quercetina- <i>O</i> -acetilhexosa | 102 \pm 5 | 20 \pm 1 | Ácido salvianólico A | 31 \pm 2 | 27 \pm 1 |
| Isoramnetina-3- <i>O</i> -rutinosa | 1408 \pm 11 | 288 \pm 1 | Ácido salvianólico A | 234 \pm 23 | 23 \pm 1 |
| Isoramnetina-3- <i>O</i> -glucosa | 111 \pm 3 | 18 \pm 1 | | | |
| Isoramnetina 3- <i>O</i> -acetilglucosa | 334 \pm 4 | 51 \pm 2 | | | |
| Total ácidos fenólicos | 190 \pm 2 | 39,73 \pm 0.02 | | 5376 \pm 88 | 1053 \pm 13 |
| Total flavonoides | 4161 \pm 19 | 821 \pm 9 | | nd | nd |
| Total compuestos fenólicos | 4351 \pm 19 | 861 \pm 9 | | 5376 \pm 88 | 1053 \pm 13 |

nd: no detectado

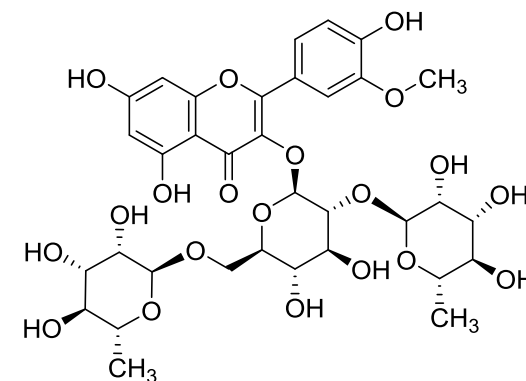
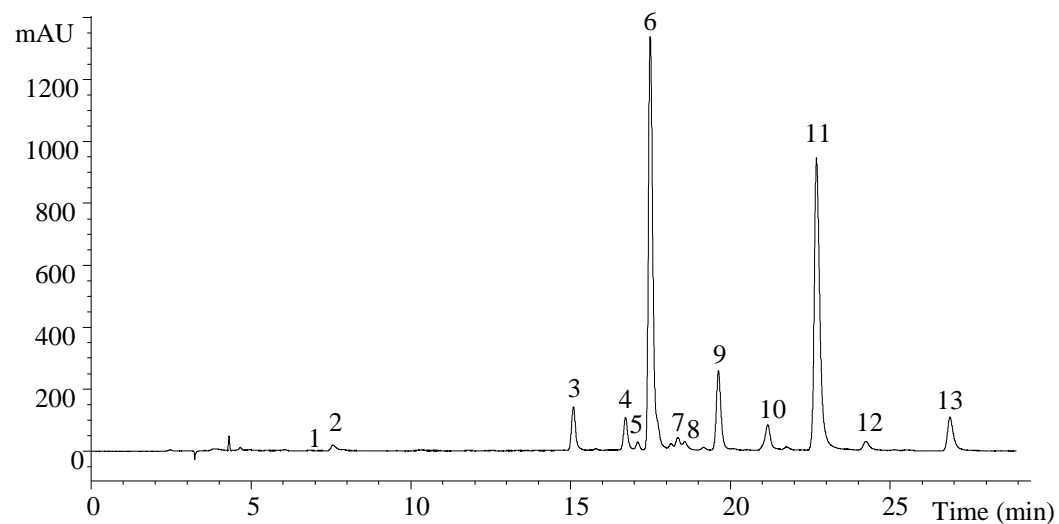
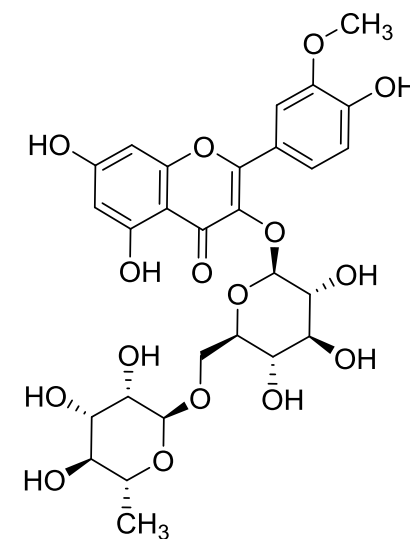
Compuesto 6^CCompuesto 11^C

Figura 19: Perfil fenólico de *C. officinalis* registrado a 370 nm (izq.) y estructura de los compuestos mayoritarios (dcha.), compuesto 6^C (isoramnetina-3-*O*-ramnosilrutinosa) y compuesto 11^C (isoramnetina-3-*O*-rutinosa)

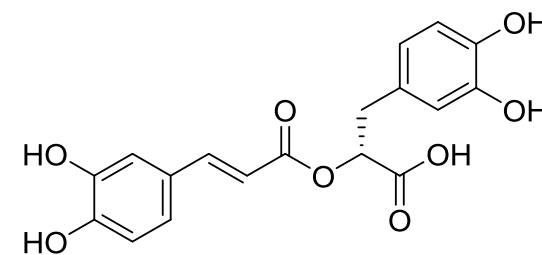
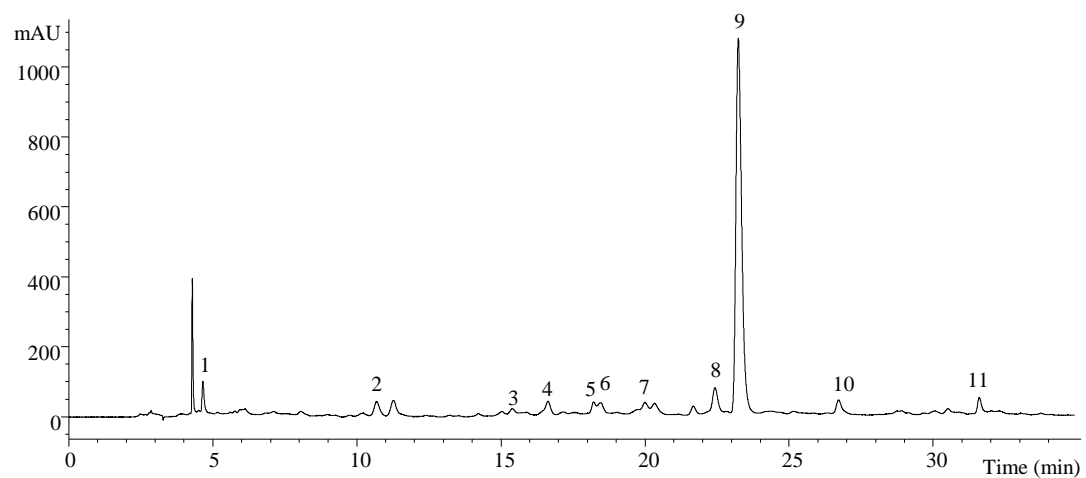
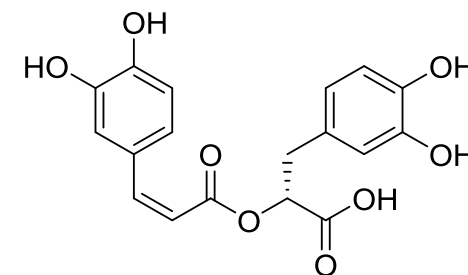
Compuesto 9^M

Figura 20: Perfil fenólico de *M. cervina* registrado a 280 nm, (izq.) y estructura de los compuestos mayoritarios (dcha.), compuesto 9^M (ácido trans-rosmarínico) y compuesto 8^M (ácido cis-rosmarínico)

Compuesto 8^M

4.1.3. Caracterización de azúcares, ácidos orgánicos, tocoferoles y ácidos grasos

En la literatura, la información relacionada con la caracterización de azúcares, ácidos orgánicos, tocoferoles y ácidos grasos de *C. officinalis* es muy escasa, sí que hay un estudio sobre su composición en polisacáridos solubles en agua (Korzh et al., 2012), e información general sobre su composición química como ingrediente cosmético (Andersen et al., 2010). En el caso de *M. cervina*, no se ha encontrado información sobre su caracterización química, solo hay información sobre la caracterización de su aceite esencial (Gonçalves et al., 2007).

Los resultados relativos a la composición química en azúcares, ácidos orgánicos y tocoferoles, de las dos especies de plantas en estudio, *C. officinalis* y *M. cervina*, y de sus respectivas infusiones, se presentan en la **Tabla 13**.

Se identificaron en *C. officinalis* cinco azúcares libres (xilosa, fructosa, glucosa, sacarosa y trehalosa) y en *M. cervina* cuatro, ya que no se encontró xilosa. *C. officinalis* presentó niveles más altos de fructosa (5 g/100 g, planta; 19 mg/100 mL infusión), sacarosa (4 g/100 g, planta; 14 mg/100 mL infusión), y azúcares totales (12 g/100 g, planta; 49 mg/100 mL infusión), mientras que *M. cervina* presentó mayores niveles de glucosa (4 g/100 g, planta; 16 mg/100 mL infusión), tanto en las plantas secas como en las infusiones. En las muestras de plantas no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la composición de trehalosa (0,6 g/100 g de media, planta), aunque en la infusión de *M. cervina* no se detectó este azúcar.

Se identificaron, cinco ácidos orgánicos (ácido oxálico, ácido quínico, ácido málico, ácido cítrico y ácido fumárico) en *C. officinalis* y *M. cervina*. La mayor cantidad de ácidos orgánicos se encontró para *C. officinalis* (2830 mg/100 g, planta; 3,0 mg/100 mL infusión), siendo el ácido cítrico el mayoritario (963 mg /100 g, planta; 2,6 mg/100 mL infusión). En las infusiones solo se detectaron ácido oxálico, ácido cítrico y ácido fumárico en la caléndula y ácido cítrico en la menta (0,8 mg/100 mL), probablemente debido a la degradación de algunos ácidos orgánicos por el calor en el proceso de preparación de las infusiones.

En el análisis de tocoferoles, *C. officinalis* presentó tres isoformas (α , β y γ), mientras que *M. cervina* sólo presentó dos (α y δ). En las infusiones sólo se detectó α -tocoferol, que puede deberse a la oxidación de los tocoferoles inducida por el calor durante el proceso de preparación de las infusiones. La mayor concentración total de tocoferoles se encontró para *C. officinalis* (23 mg/100 g, planta; 0,9 μ g/100 mL, infusión), siendo α -tocoferol el mayoritario en todas las muestras (19 mg/100 g, caléndula planta; 2 mg/100 mL, menta planta), y la isoforma con mayor actividad antioxidante (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996).

Tabla 13: Composición de azúcares, ácidos orgánicos y tocoferoles de las plantas y de las infusiones de *C. officinalis* y *M. cervina*. En cada línea, p-valor<0,05 significa diferencias significativas en los resultados, (media±SD).

| | Planta | | | Infusión | | |
|-------------------------|-----------------------|-------------------|--|-----------------------|-------------------|--|
| | <i>C. officinalis</i> | <i>M. cervina</i> | Prueba <i>t</i> -Student (<i>p</i> -valor) | <i>C. officinalis</i> | <i>M. cervina</i> | Prueba <i>t</i> -Student (<i>p</i> -valor) |
| Azúcares | (g/100 g) | (g/100 g) | | (mg/100 mL) | (mg/100 mL) | |
| Xilosa | 1,70 ± 0.02 | nd | - | nd | nd | - |
| Fructosa | 4,7 ± 0.3 | 3,3 ± 0,1 | <0,001 | 19 ± 1 | 12 ± 1 | <0,001 |
| Glucosa | 0,8 ± 0.1 | 3,5 ± 0,1 | <0,001 | 7 ± 1 | 16 ± 1 | <0,001 |
| Sacarosa | 3,9 ± 0.1 | 2,13 ± 0,04 | <0,001 | 14 ± 1 | 10 ± 1 | 0,022 |
| Trehalosa | 0,6 ± 0.1 | 0,65 ± 0,01 | 0,248 | 9 ± 1 | nd | - |
| Suma | 11,7 ± 0.2 | 9,66 ± 0,01 | <0,001 | 49 ± 1 | 38 ± 5 | 0,012 |
| Ácidos orgánicos | (mg/100 g) | (mg/100 g) | | (mg/100 mL) | (mg/100 mL) | |
| Ácido oxálico | 718 ± 7 | 275 ± 2 | <0,001 | 0,35 ± 0,01 | tr | - |
| Ácido quínico | 392 ± 3 | 54 ± 2 | <0,001 | tr | tr | - |
| Ácido málico | 743 ± 15 | 144 ± 2 | <0,001 | tr | tr | - |
| Ácido cítrico | 963 ± 23 | 226 ± 7 | <0,001 | 2,64 ± 0,05 | 0,82 ± 0,02 | <0,001 |
| Ácido fumárico | 13,6 ± 0,3 | 0,46 ± 0,01 | <0,001 | 0,04 ± 0,00 | tr | - |
| Suma | 2830 ± 12 | 700 ± 5 | <0,001 | 3,02 ± 0,04 | 0,82 ± 0,02 | <0,001 |

nd: no detectato; tr: trazas

Tabla 13 (continuación): Composición de azúcares, ácidos orgánicos y tocoferoles de las plantas y de las infusiones de *C. officinalis* y *M. cervina*. En cada línea, p -valor $< 0,05$ significa diferencias significativas en los resultados, (media \pm SD).

| | Planta | | | Infusión | | |
|---------------------|-----------------------|-------------------|---|-----------------------|-------------------|---|
| | <i>C. officinalis</i> | <i>M. cervina</i> | Prueba <i>t</i> -Student (p -valor) | <i>C. officinalis</i> | <i>M. cervina</i> | Prueba <i>t</i> -Student (p -valor) |
| Tocoferoles | (mg/100 g) | (mg/100 g) | | (μ g/100 mL) | (μ g/100 mL) | |
| α -Tocoferol | 19,40 \pm 0,01 | 1,94 \pm 0,04 | <0,001 | 0,881 \pm 0,001 | 0,143 \pm 0,003 | <0,001 |
| β -Tocoferol | 1,48 \pm 0,08 | nd | - | nd | nd | - |
| γ -Tocoferol | 2,45 \pm 0,06 | nd | - | nd | nd | - |
| δ -Tocoferol | nd | 0,050 \pm 0,001 | - | nd | nd | - |
| Suma | 23,33 \pm 0,01 | 1,99 \pm 0,04 | <0,001 | 0,881 \pm 0,001 | 0,143 \pm 0,003 | <0,001 |

nd: no detectado

Los resultados de la composición de ácidos grasos, ácidos grasos saturados (SFA), ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de las plantas secas de *C. officinalis* y *M. cervina* se presenta en la **Tabla 14**.

Tabla 14: Caracterización de los ácidos grasos, en porcentaje relativo, presentes en las muestras de planta seca de *C. officinalis* y *M.cervina*. En cada línea, *p*-valor < 0,05 significa diferencias significativas en los resultados, (media±SD).

| | <i>Calendula officinalis</i> | <i>Mentha cervina</i> | Prueba <i>t</i> -Student (<i>p</i> -valor) |
|-----------------|------------------------------|-----------------------|--|
| C4:0 | 1,43 ± 0,08 | - | - |
| C6:0 | 0,51 ± 0,03 | 0,37 ± 0,01 | <0,001 |
| C8:0 | 0,66 ± 0,02 | 0,27 ± 0,01 | <0,001 |
| C10:0 | 0,28 ± 0,01 | 0,11 ± 0,00 | <0,001 |
| C12:0 | 3,66 ± 0,09 | 0,31 ± 0,00 | <0,001 |
| C13:0 | 0,05 ± 0,00 | 1,85 ± 0,02 | <0,001 |
| C14:0 | 24,93 ± 0,27 | 1,22 ± 0,16 | <0,001 |
| C14:1 | 0,10 ± 0,01 | - | - |
| C15:0 | 0,46 ± 0,01 | - | - |
| C16:0 | 35,57 ± 0,11 | 20,95 ± 0,48 | <0,001 |
| C16:1 | 0,21 ± 0,03 | 1,06 ± 0,02 | <0,001 |
| C17:0 | 0,47 ± 0,02 | 0,66 ± 0,07 | 0,003 |
| C18:0 | 5,93 ± 0,18 | 4,01 ± 0,34 | <0,001 |
| C18:1n9 | 2,47 ± 0,01 | 8,04 ± 0,80 | <0,001 |
| C18:2n6 | 9,32 ± 0,02 | 10,45 ± 0,23 | <0,001 |
| C18:3n3 | 11,08 ± 0,10 | 45,65 ± 0,50 | <0,001 |
| C20:0 | 0,80 ± 0,01 | 1,95 ± 0,07 | <0,001 |
| C20:1 | 0,12 ± 0,00 | - | - |
| C20:3n3+C21:0 | 0,77 ± 0,02 | 0,31 ± 0,06 | <0,001 |
| C22:0 | 0,33 ± 0,02 | 1,30 ± 0,02 | <0,001 |
| C22:1n9 | - | 0,40 ± 0,02 | - |
| C23:0 | - | 0,19 ± 0,02 | - |
| C24:0 | 0,88 ± 0,02 | 0,89 ± 0,02 | 0,261 |
| SFA (%) | 76,70 ± 0,16 | 34,08 ± 0,98 | <0,001 |
| MUFA (%) | 2,78 ± 0,05 | 9,51 ± 0,56 | <0,001 |
| PUFA (%) | 20,51 ± 0,13 | 56,42 ± 0,21 | <0,001 |

SFA: Ácidos grasos saturados; MUFA: Ácidos grasos monoinsaturados;

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados

Los perfiles de ácidos grasos que presentaron ambas plantas son significativamente diferentes. *C. officinalis* mostró una relación de ácidos grasos totales:

SFA>PUFA>MUFA, donde son mayoritarios los ácidos grasos saturados (76 %); mientras que la relación de *M. cervina* fue de: PUFA>SFA>MUFA, donde fueron mayoritarios los ácidos grasos poliinsaturados (56 %). Los ácidos grasos mayoritarios en la caléndula fueron el ácido palmítico (C16:0, 36 %) y el ácido mirístico (C14:0, 25 %), y en la menta fueron el ácido α -linolénico (C18:3n3, 46 %), y el ácido palmítico (C16:0, 21 %).

4.1.4. Bioactividad: Actividad antioxidante y actividad antitumoral

Los resultados de la actividad antioxidante, de la actividad antitumoral y de la citotoxicidad en células no tumorales, de los extractos hidrometanólicos y de las infusiones de *C. officinalis* y *M. cervina* se muestran en la **Tabla 15**.

Para la evaluación de la actividad antioxidante no existe un único método que pueda proporcionar resultados inequívocos, por ello, la mejor solución es usar varios ensayos, enfocados en diferentes mecanismos de protección contra la oxidación, como puede ser la captación de radicales libres (DPPH), el poder reductor, la inhibición de la decoloración de β -caroteno y la peroxidación lipídica (TBARS).

Los mejores resultados de actividad antioxidante se mostraron para *M. cervina*. Su extracto hidrometanólico presentó los valores más bajos de EC_{50} en todos los ensayos, demostrando mayor capacidad antioxidante, y su infusión también, excepto en el ensayo de la inhibición de β -caroteno donde la infusión de *C. officinalis* mostró mayor actividad antioxidante. Estas diferencias en la actividad antioxidante de las muestras, pueden explicarse por su diferente perfil fenólico, donde en *M. cervina*, sólo están presentes ácidos fenólicos, compuestos cuya actividad antioxidante se debe a que actúan como quelantes y como captadores de radicales libres, mientras que en *C. officinalis* son mayoritarios los flavonoides cuya actividad antioxidante se debe a los grupos hidroxilo fenólicos unidos a los anillos, como también se explica en el apartado 2.1.1 (Carocho & Ferreira, 2013a, 2013b). Además los mecanismos involucrados en los ensayos para evaluar la actividad antioxidante son diferentes y, por lo tanto, cada preparación vegetal puede tener diferentes compuestos con capacidades específicas para participar en esos mecanismos.

En la literatura, se han encontrado varios estudios que evalúan la actividad antioxidante de *C. officinalis* en diferentes extractos y mediante diferentes metodologías, *in vitro* e *in vivo* (**Tabla 7**). Los resultados de los extractos estudiados revelaron una actividad captadora de radicales DPPH inferior a la de los extractos hidrometanólicos y extractos acuosos publicados por (Ćetković et al., 2004). (EC_{50} : 0,45-0,90 mg/mL, extracto hidrometanólico y EC_{50} : 0,30-0,80 mg/mL, extracto acuoso). En todos los estudios, se confirma experimentalmente la capacidad antioxidante de *C. officinalis*, sugiriendo que muchas de sus actividades terapéuticas se deben a esa

capacidad (Ćetković et al., 2004; Cordova et al., 2002; K.C. Preethi et al., 2006). En el caso de *M. cervina*, la información es muy escasa.

La evaluación de la actividad antitumoral de los extractos hidrometanólicos y de las infusiones de las plantas se desarrolló sobre cuatro líneas celulares tumorales humanas: MCF-7 (adenocarcinoma de mama), NCI-H460 (cáncer de pulmón), HeLa (carcinoma cervical) y HepG2 (carcinoma hepatocelular) y la hepatotoxicidad sobre un cultivo primario de células de hígado de cerdo: PLP2.

Los mejores resultados de actividad antitumoral se obtuvieron para el extracto hidrometanólico de *M. cervina*, que resultó tener actividad antitumoral frente a las cuatro líneas celulares tumorales, siendo más activo frente al carcinoma cervical (HeLa, $GI_{50} = 223 \mu\text{g/mL}$). El extracto hidrometanólico de *C. officinalis* también presentó actividad frente al carcinoma cervical (HeLa, $GI_{50} = 256 \mu\text{g/mL}$), siendo su mayor actividad, y frente al carcinoma hepatocelular (HepG2). Las infusiones de ambas plantas no mostraron efecto antitumoral.

Ninguno de los extractos analizados presentó hepatotoxicidad frente a los cultivos primarios de células de hígado de cerdo (PLP2).

En la literatura, se han encontrado varios estudios que evalúan la actividad antitumoral de *C. officinalis*, en diferentes extractos y compuestos aislados, y en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*. En ellos se demuestra su capacidad antitumoral asociándola a su composición en glucósidos triterpénicos (Boucaudmaitre et al., 1988; Ukiya et al., 2006). Los glucósidos triterpénicos con mayor actividad citotóxica, según (Ukiya et al., 2006), fueron el calendulósido F 6'-*O*-*n*-butil éster y el calendulósido G 6'-*O*-metil éster. Además, muchos compuestos fenólicos han sido estudiados presentando actividad antitumoral (Carocho & Ferreira, 2013b), pudiendo contribuir o ser partícipes de las actividades vistas en ambas plantas. Los resultados obtenidos por (Matić et al., 2013) al evaluar la actividad antitumoral de la infusión de caléndula frente a HeLa ($GI_{50} = 750 \mu\text{g/mL}$), entre otras líneas celulares tumorales, no está en desacuerdo con este estudio ($GI_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$). En el caso de *M. cervina* no se ha encontrado información sobre su actividad antitumoral.

Tabla 15: Actividad antioxidante, actividad antitumoral y hepatotoxicidad, de los extractos metanólicos e infusiones de *C. officinalis* y *M. cervina*. En cada línea, p -valor $< 0,05$ significa diferencias significativas en los resultados, (media \pm SD).

| | Extracto hidrometanólico | | | Infusión | | |
|---|--------------------------|-------------------|--|-----------------------|-------------------|--|
| | <i>C. officinalis</i> | <i>M. cervina</i> | Prueba <i>t</i> -Student (<i>p</i> -valor) | <i>C. officinalis</i> | <i>M. cervina</i> | Prueba <i>t</i> -Student (<i>p</i> -valor) |
| Actividad antioxidante (EC₅₀ mg/mL) | | | | | | |
| Actividad captadora DPPH | 4,6 \pm 0,1 | 0,21 \pm 0,01 | <0,001 | 6,5 \pm 0,1 | 0,81 \pm 0,02 | <0,001 |
| Poder reductor | 0,82 \pm 0,03 | 0,14 \pm 0,01 | <0,001 | 2,61 \pm 0,04 | 0,24 \pm 0,01 | <0,001 |
| Inhibición decoloración β -caroteno | 2,17 \pm 0,02 | 1,12 \pm 0,01 | <0,001 | 0,91 \pm 0,04 | 1,24 \pm 0,01 | <0,001 |
| Inhibición TBARS | 1,21 \pm 0,01 | 0,070 \pm 0,001 | <0,001 | 2,9 \pm 0,1 | 0,06 \pm 0,01 | <0,001 |
| Actividad antitumoral (GI₅₀ μg/mL) | | | | | | |
| MCF-7 (adenocarcinoma de mama) | >400 | 294 \pm 2 | - | >250 | >250 | - |
| NCI-H460 (cancer de pulmón) | >400 | 320 \pm 4 | - | >250 | >250 | - |
| HeLa (carcinoma cervical) | 256 \pm 4 | 223 \pm 4 | <0,001 | >250 | >250 | - |
| HepG2 (carcinoma hepatocelular) | 330 \pm 8 | 339 \pm 9 | <0,001 | >250 | >250 | - |
| Hepatotoxicidad (GI₅₀ μg/mL) | | | | | | |
| PLP2 (células hepáticas de cerdo) | >400 | >400 | - | >250 | >250 | - |

4.2. Caracterización química de *M. procera*

4.2.1. Extractos obtenidos de *M. procera* y sus rendimientos

En el proceso de extracción por maceración con diferentes disolventes del material liofilizado de *M. procera* se obtuvieron los extractos y rendimientos que se muestran en la **Tabla 16**.

Tabla 16: Rendimiento de los extractos obtenidos por maceración de *M. procera*

| Extractos | Extracción I (15 g) | | Extracción II (32,2 g) | |
|-------------------------|---------------------|-------------|------------------------|-------------|
| | Masa (mg) | Rendimiento | Masa (mg) | Rendimiento |
| E.Hexano | 218 | 1,45 % | 406 | 1,26 % |
| E.DCM | 213 | 1,42 % | 538 | 1,67 % |
| E.AcOEt | 90 | 0,60 % | 127 | 0,39 % |
| E.MeOH | 2563 | 17,09 % | 6129 | 19,03 % |
| E.H₂O | 890 | 5,93 % | - | - |

El mayor rendimiento se obtuvo para el extracto metanólico (E.MeOH), lo que indica que la mayoría de los compuestos son bastante polares.

En el resto de extracciones y reacciones, descritas en la metodología, se obtuvieron los extractos y rendimientos que se muestran en la **Tabla 17**.

En general, el estudio de los compuestos químicos de *M. procera*, estuvo limitado por la poca cantidad de muestra, que en muchos casos llevó a la obtención de extractos o fracciones de poca masa, imposibilitando su estudio.

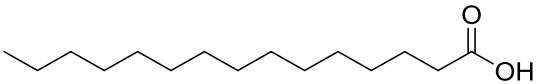
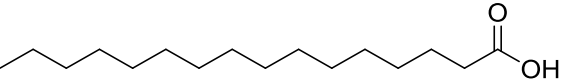
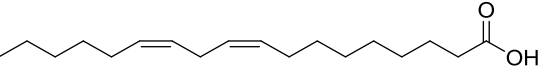
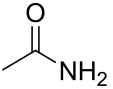
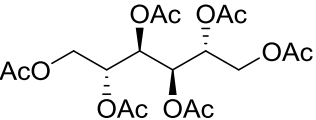
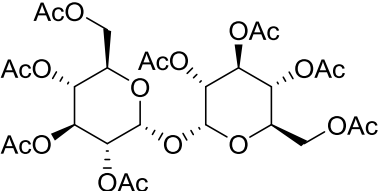
Tabla 17: Rendimiento de los extractos obtenidos por diferentes procedimientos de *M.procera*

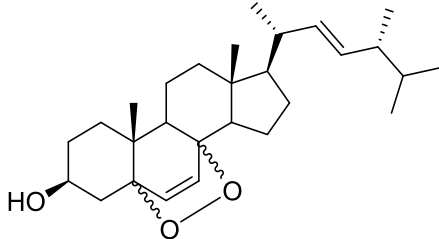
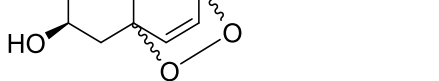
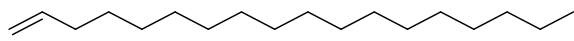
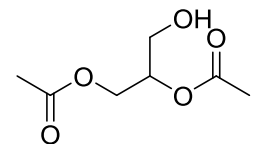
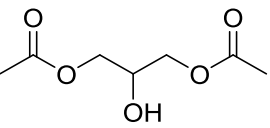
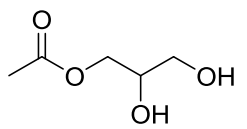
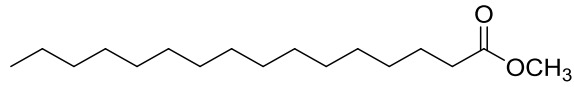
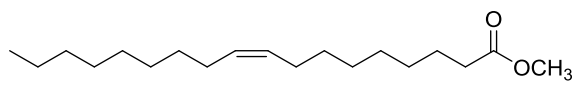
| Muestra o extracto de partida | Masa (mg) | Extractos obtenidos | Masa (mg) | Rendimiento |
|-------------------------------|-----------|----------------------------|-----------|-------------|
| <i>M. procera</i> liofilizada | 1002 | Al.A | 971 | 96,9 % |
| | | Al.B | 1397 | 139,4 % |
| E.MeOH | 500 | E.MeOHacet. | 358 | 71,6 % |
| | | E.MeOHacet.Bs | 8 | 1,6 % |
| | | E.MeOHacet.Acs | 75 | 15,0 % |
| E.MeOH | 500 | E.MeOHsol.AcOEt | 19 | 3,8 % |
| | | E.MeOHsol.BuOH | 75 | 15,0 % |
| | | E.MeOHsol.H ₂ O | 390 | 78,0 % |
| E.MeOHsol.BuOH | 75 | E.MeOHsol.BuOHacet | 65 | 86,7 % |
| | | E.MeOHsol.BuOHacet.Bs | 8 | 10,7 % |
| | | E.MeOHsol.BuOHacet.Acs | 21 | 28,0 % |
| E.MeOH | 500 | E.MeOH-M1 | 219 | 43,8 % |
| | | E.MeOH-M2 | 141 | 28,2 % |
| E.MeOH | 1500 | E.MeOH-M1' | 267 | 17,8 % |
| | | E.MeOH-M2' | 614 | 40,9 % |
| E.MeOH-M2 | 141 | E.MeOH-M2met. | 77 | 54,6 % |
| E.MeOH-M2met. | 77 | E.MeOH-M2met.acet.sol.A | 58 | 75,3 % |
| | | E.MeOH-M2met.acet.sol.B | 13 | 16,7 % |
| E.MeOH | 6000 | E.M.sol.AcOEt | 246 | 4,1 % |
| | | E.M.insol.AcOEt | 5827 | 97,1 % |

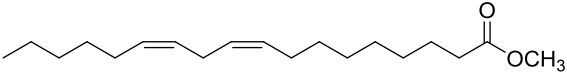
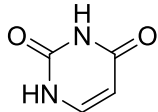
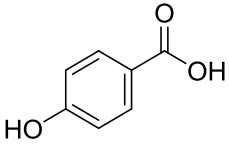
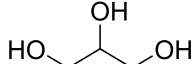
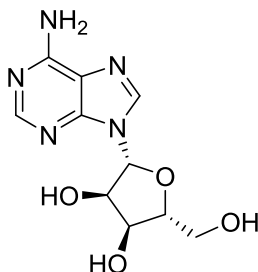
4.2.2. Análisis y estudio de los extractos y fracciones, e identificación de compuestos

Los procedimientos descritos en la metodología permitieron la identificación de los compuestos descritos en la **Tabla 18**.

Tabla 18: Listado de compuestos identificados en los extractos de *M. procera*

| Nº | Nombre comun | Nombre IUPAC | Estructura | Extracto/Fracción en la que aparecen |
|----------------|-----------------------------|---|---|--|
| 1 ^P | Ácido pentadecílico (C15:0) | Ácido pentadecanoico |  | E.Hexano |
| 2 ^P | Ácido palmítico (C16:0) | Ácido hexadecanoico |  | E.Hexano ;E.DCM; E.AcOEt |
| 3 ^P | Ácido linoleico (C18:2) | Ácido (9Z,12Z)-9,12-Octadecadienóico |  | E.Hexano; E.DCM; E.AcOEt |
| 4 ^P | Acetamida* | Etanamida |  | Al.A; Al.B |
| 5 ^P | Manitol hexaacetilado | 1,2,3,4,5,6-Hexacetoxi (2R, 3R, 4R, 5R)-Hexano |  | E.MeOHacet.;E.MeOHacet.Acs; E.MeOHsol.BuOH.acet.; |
| 6 ^P | Trehalosa octaacetilada | Octaacetil (α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosido) |  | E.MeOHacet. |

| Nº | Nombre comun | Nombre IUPAC | Estructura | Extracto/Fracción en la que aparecen |
|-----------------|--|---|---|---|
| 7 ^P | α,α -Epidioxiergosterol | 5 $\alpha,8\alpha$ -Epidioxiergosta-6,22-dien-3 β -ol |  | Cromatografía E.AcOEt F.6-7 |
| 8 ^P | β,β -Epidioxiergosterol | 5 $\beta,8\beta$ -Epidioxiergosta-6,22-dien-3 β -ol |  | |
| 9 ^P | 1-Octadeceno | Octadec-1-eno |  | Cromatografía E.AcOEt F.10-20 y F.21-31 |
| 10 ^P | Glicerol 1,2-diacetilado; 1,2-Diacetilglicerol (1,2-Diacetina) | Diacetato de 3-hidroxiopropano-1,2-diilo |  | Cromatografía E.AcOEt F.10-20 |
| 11 ^P | Glicerol 1,3-diacetilado; 1,3-Diacetilglicerol; 1,3-Diacetina | Diacetato de 2-hidroxiopropano-1,3-diilo |  | Cromatografía E.AcOEt F.10-20 |
| 12 ^P | Glicerol monoacetilado; Monoacetilglicerol; 1-Monoacetina | Acetato de 2,3-dihidroxipropilo |  | Cromatografía E.AcOEt F.21-31 |
| 13 ^P | Palmitato de metilo | Hexadecanoato de metilo |  | Cromatografía E.M.A. Mat.B-C |
| 14 ^P | Oleato de metilo | (9Z)-octadec-9-enoato de metilo |  | Cromatografía E.M.A. Mat.B-C |

| N° | Nombre comun | Nombre IUPAC | Estructura | Extracto/Fracción en la que aparecen |
|-----------------|---------------------------------|--|--|---|
| 15 ^P | Linoleato de metilo | (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato de metilo |  | Cromatografía E.M.A. Mat.B-C |
| 16 ^P | Uracilo | Pirimidina-2,4(1H,3H)-diona |  | Cromatografía E.M.A. T. 23-30 insoluble en DCM |
| 17 ^P | Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico | Ácido 4-hidroxibenzoico |  | E.M.A.T.37-46pr.A y E; F.Org.AcOEt-Comp.ácidos |
| 18 ^P | Glicerol Glicerina | 1,2,3-Propanotriol |  | E.M.A.T.37-46pr.B, C, D, F y H |
| 19 ^P | Adenosina | (2R,3R,4R,5R)-2-(6-amino-9H-purin-9-yl)-5-(hidroximetil)oxolano-3,4-diol |  | E.M.A.T.37-46pr.D |

*Acetamida, no se puede confirmar que su presencia sea natural

a) Extractos de *M. procera*

En los extractos más apolares, obtenidos por maceración de *M. procera*: E.Hexano, E.DCM y E.AcOEt; se identificaron varios ácidos grasos, mediante sus espectros $^1\text{H-RMN}$ y por CG-MS, donde se obtuvieron los picos con sus tiempos de retención (t_r) (**Figura 21**) y donde se compararon sus espectros de masas con los espectros de masas existentes en la base de datos usada como referencia. En el E.Hexano se identificaron los **compuestos 1^P** (ácido pentadecílico), **2^P** (ácido palmítico) y **3^P** (ácido linoleico). En el E.DCM y en el E.AcOEt se identificaron los **compuestos 2^P** y **3^P**, en éste último extracto también aparecieron varias señales sin identificar. Los ácidos grasos mayoritarios fueron el ácido palmítico y el ácido linoleico. Estos resultados concuerdan con los publicados anteriormente por el grupo de investigación, donde evalúan la composición de ácidos grasos de *M. procera*, resultando esos mismos ácidos grasos los mayoritarios (Fernandes et al., 2014).

Datos del E.Hexano (Mezcla de ácido pentadecílico, ácido palmítico y ácido linoleico)

$^1\text{H-RMN/CDCl}_3$, δ (ppm): 5,33 (m), 2,76 (t), 2,31 (t), 2,02 (m), 1,60 (m), 1,25 (m) y 0,87 (t)

Datos del compuesto 1^P (Ácido pentadecílico C15:0)

CG-MS: $t_r= 17,20$ min; ión molecular $[\text{M}]^+ 242 m/z$

Datos del compuesto 2^P (Ácido palmítico C16:0)

CG-MS: $t_r= 18,46$ min; ión molecular $[\text{M}]^+ 256 m/z$

Datos del compuesto 3^P (Ácido linoleico C18:2)

CG-MS: $t_r= 20,06$ min; ión molecular $[\text{M}]^+ 280 m/z$

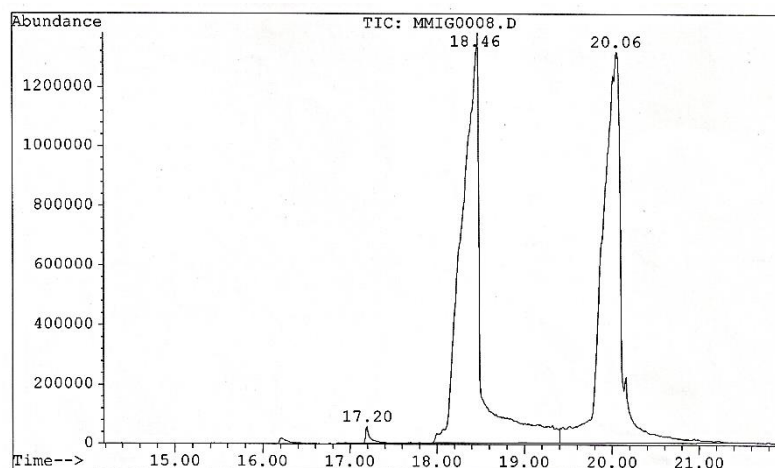


Figura 21: Cromatograma CG-MS de E.Hexano con los picos correspondientes a los ácidos grasos y sus tiempos de retención

b) Extracción de alcaloides de *M. procera*

En la extracción de alcaloides de *M. procera*, donde se obtuvieron los extractos, Al.A y Al.B, apareció una sustancia cristalina incolora delicuescente **compuesto 4^P**, identificada como acetamida, utilizando la base de datos *Spectral Database for Organic Compounds SDBS* (AIST, 2004). La confirmación del compuesto se realizó comparando sus datos experimentales, de ¹H-RMN, ¹³C-RMN e IR, con los datos espectrales de la base de datos y con los datos obtenidos al analizar un patrón de acetamida adquirida a *Fluka*. El extracto Al.B, además del **compuesto 4^P**, contenía otras sustancias amarillentas. El rendimiento de esta extracción fue superior al 100 % (236 %), por lo que no podemos asegurar que el compuesto 4^P sea de la muestra, siendo una posibilidad que se haya producido durante el proceso de extracción de alcaloides.

Datos del compuesto 4^P (Acetamida)

¹H-RMN/CD₃OD, δ (ppm): 7,59 (1H, s ancho), 6,77 (1H, s ancho) y 1,91 (3H, s).

¹³C-RMN/CD₃OD, δ (ppm): 176,99 (C=O) y 22,79 (CH₃).

IR, ν (cm⁻¹): 3360, 3166, 2813, 2326, 1677, 1460, 1396, 1353, 1149, 1046, 1003, 873 y 709.

Datos del patrón de acetamida:

^1H -RMN/ CD_3OD , δ (ppm): 7,59 (1H, s ancho), 6,83 (1H, s ancho) y 1,93 (3H, s).

^{13}C -RMN/ CD_3OD , δ (ppm): 177,14 (C=O) y 22,92 (CH_3).

c) Fracciones del estudio de E.MeOH

En la reacción de acetilación del E.MeOH, donde se obtuvo el extracto E.MeOHacet., se identificaron un polialcohol (manitol) y un disacárido (trehalosa) peracetilados, los **compuestos 5^P y 6^P** respectivamente, mediante sus señales en los espectros ^1H -RMN y por su análisis por CG-MS, donde se obtuvieron los picos con sus tiempos de retención (t_r) (**Figura 22**) y donde se compararon sus espectros de masas con los espectros de masas existentes en la base de datos usada como referencia. En la extracción de las aguas de acetilación, que se realizó debido a la baja señal en el espectro del grupo acetilo y a la pérdida de rendimiento en peso (71,6 %), sólo se identificó el **compuesto 5^P** en el E.MeOHacet.Acs, aunque en el cromatograma de gases aparecieron otras dos señales sin identificar. Esta identificación concuerda con los resultados publicados anteriormente por el grupo de investigación, donde aparecen manitol y trehalosa como los azúcares mayoritarios en *M. procera* (Fernandes et al., 2014)

Datos del compuesto 5^P (D-Manitol hexaacetilado)

CG-MS: t_r = 19,69 min; ión 375 m/z formación por pérdida de un grupo $-\text{OAc}$, ión 361 m/z formación por pérdida de CH_2OAc .

Datos del compuesto 6^P (Trehalosa octacetilada)

CG-MS: t_r = 32,53 min; ión 331 m/z formación por la ruptura del enlace *O*-glucosídico.

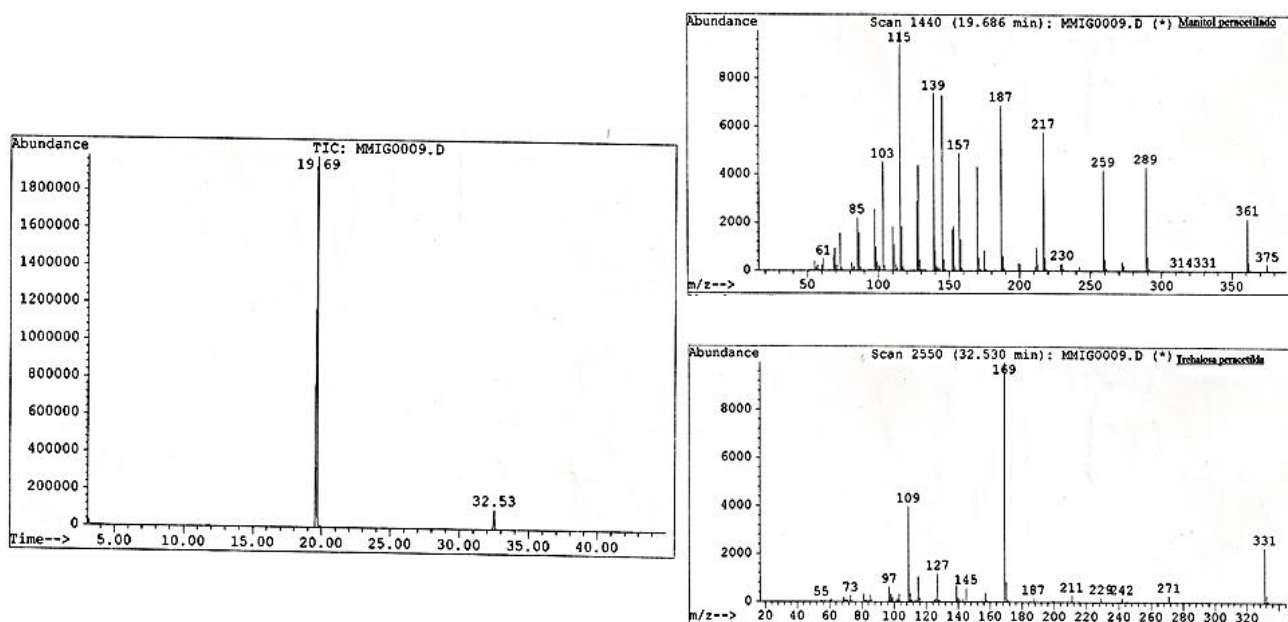


Figura 22: Cromatograma CG-MS de E.MeOH acetilado (izq.), espectros de masas de manitol peracetilado y de trehalosa peracetilada (dcha.)

En la extracción del E.MeOH en agua con AcOEt y BuOH, se obtuvieron los extractos E.MeOHsol.AcOEt, E.MeOHsol.BuOH y E.MeOHsol.H₂O, que se analizaron por ¹H-RMN en metanol deuterado y en todos ellos aparecieron señales por encima de 7 ppm, correspondientes a compuestos aromáticos. Para estudiar mejor el E.MeOHsol.BuOH se acetiló y también se realizó la extracción de las aguas de acetilación resultando un rendimiento total superior al 100 % (125,4 %), posiblemente debido al residuo que deja el propio disolvente *n*-butanol (6 mg/100 mL). El análisis por CG-MS del E.MeOHsol.BuOH.acet mostró la presencia del **compuesto 5^P**, pero en su espectro ¹H-RMN, al igual que en los espectros de E.MeOHsol.BuOH.acet.Bs y E.MeOHsol.BuOH.acet.Acs desaparecieron las señales aromáticas.

En los extractos obtenidos mediante la extracción ácida del E.MeOH con butanol, tanto los compuestos básicos y neutros (E.MeOH-M1 y E.MeOH-M1') como los compuestos ácidos (E.MeOH-M2 y E.MeOH-M2') se analizaron por ¹H-RMN en metanol deuterado, apareciendo señales por encima de 7 ppm, correspondientes a compuestos aromáticos minoritarios. En todos los extractos también apareció un sólido blanco insoluble en MeOH y BuOH que no se pudo identificar. El extracto E.MeOH-M2 se esterificó (E.MeOHM2.met) y se analizó por ¹H-RMN en cloroformo y metanol deuterado, donde aparecieron las señales del grupo -OMe (3,41 ppm en CDCl₃; 3,68

ppm en CD₃OD) de los ésteres metílicos. También se analizó por CG-MS, donde no aparecieron señales de compuestos conocidos. Posteriormente, ese extracto se acetiló obteniéndose la fracción ácida soluble en AcOEt (E.MeOH-M2met.acet.sol.A) y fracción ácida soluble en *n*-BuOH (E.MeOH-M2met.acet.sol.B), que también fueron analizados por ¹H-RMN en cloroformo y metanol deuterado y por CG-MS, pero en cuyos espectros de RMN desaparecieron las señales de grupos metilo y de grupos acetilo y cuyos cromatogramas de gases no mostraron la presencia de ningún compuesto conocido.

d) *Fracciones de la cromatografía del E.AcOEt*

En la cromatografía del E.AcOEt (176 mg) solamente se tuvieron en cuenta las fracciones de la **Tabla 19**, que corresponden al 67,0 % (118 mg), mientras que las otras fracciones no se estudiaron por tener una masa despreciable. En estas fracciones se identificaron nuevos compuestos: **compuestos 7^P y 8^P** (α,α y β,β -epidioxiergosterol), **compuesto 9^P** (1-octadeceno) y los **compuestos 10^P, 11^P y 12^P** (1,3 y 1,2-diacilglicerol y monoacilglicerol, respectivamente).

Tabla 19: Fracciones y compuestos identificados en la cromatografía del E. AcOEt

| Fracción de E.AcOEt | Eluyente | Masa (mg) | Compuestos identificados | Análisis efectuados |
|---------------------|----------------|-----------|--|---|
| F.6-7 | 8 DCM: 2 AcOEt | 3 | Compuestos 7^P y 8^P | ¹ H-RMN; ¹³ C-RMN; COSY ; HRMS; CG-MS |
| F.10-20 | 8 DCM: 2 AcOEt | 22 | Compuestos 2^P, 3^P, 9^P, 10^P y 11^P | ¹ H-RMN; ¹³ C-RMN; COSY ; CG-MS |
| F.21-31 | AcOEt | 29 | Compuestos 2^P, 3^P, 9^P y 12^P | ¹ H-RMN; ¹³ C-RMN; COSY ; CG-MS |
| F.32-34 | 7 DCM: 3MeOH | 64 | Posterior fraccionamiento por cromatografía | ¹ H-RMN |

Los **compuestos 7^P** (α,α -epidioxiergosterol) y **8^P** (β,β -epidioxiergosterol) (**Figura 23**) se identificaron por sus señales en los espectros de ¹H-RMN, ¹³C-RMN y COSY, al compararlos con los datos aportados en la literatura ya que, son compuestos descritos en otras especies de setas (Kim et al., 2008; Rösecke & König, 2000; Yue et al., 2001). La integral de sus señales características en los espectros de ¹H-RMN (6,43 y 6,45 ppm para el compuesto 7^P; 6,52 y 6,54 ppm para el compuesto 8^P), permitieron

establecer la relación entre $\alpha,\alpha:\beta,\beta$ siendo de 3,8:1, mayoritario el compuesto 7^P (**Figura 24**). La confirmación fue a través de su fórmula molecular deducida a partir del aducto con sodio de su ion molecular $[M+Na]^+$ observado en su espectro de HRMS a 451,3183 m/z (calculado para $C_{28}H_{44}O_3Na$: 451,318267 u) (**Figura 25**).

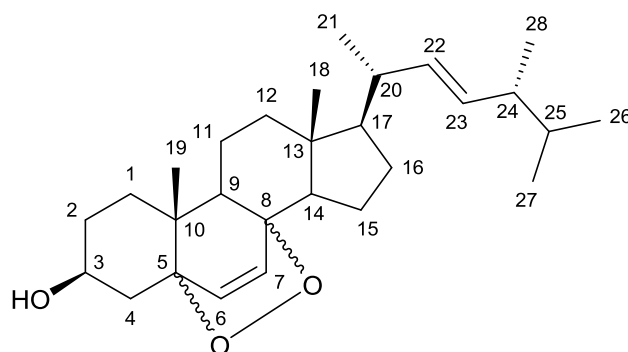


Figura 23: Estructura y numeración de los átomos de los compuestos α,α y β,β -epidioxiergosteroles

Datos del compuesto 7^P (α,α -epidioxiergosterol)

1H -RMN/ $CDCl_3$, δ (ppm): 6,49 (1H, d, 8,6 Hz, H-7), 6,23 (1H, d, 8,6 Hz, H-6), 5,20 (1H, dd, 15,2 y 7,2 Hz, H-23), 5,12 (1H, dd, 15,2 y 7,8 Hz, H-22), 3,96 (1H, m, H-3), 0,98 (3H, d, 6,4 Hz, H-21), 0,89 (6H, d, 6,4 Hz, H-28), 0,87 (3H, s, H-19), 0,82 (6H, d, 6,4 Hz, H-26, 27) y 0,81 (3H, s, H-18).

^{13}C -RMN/ $CDCl_3$, δ (ppm): 135,4 (C-6), 135,2 (C-22), 132,3 (C-23), 130,7 (C-7), 82,1 (C-5), 79,4 (C-8), 66,5 (C-3), 56,2 (C-17), 51,7 (C-14), 51,1 (C-9), 44,5 (C-13), 42,8 (C-24), 39,7 (C-20), 39,5 (C-12), 36,9 (C-4 y C-10), 34,7 (C-1), 33,1 (C-25), 30,1 (C-2), 28,6 (C-16), 23,4 (C-11), 20,9 (C-21), 20,6 (C-15), 19,9 (C-27), 19,6 (C-26), 18,2 (C-19), 17,6 (C-28) y 12,8 (C-18).

Datos del compuesto 8^P (β,β -epidioxiergosterol)

1H -RMN/ $CDCl_3$, δ (ppm): 6,58 (1H, d, 8,6 Hz, H-7), 6,27 (1H, d, 8,6 Hz, H-6) y resto de señales no diferenciables del compuesto 7^P .

^{13}C -RMN/ $CDCl_3$, δ (ppm): Señales no diferenciables del compuesto 7^P

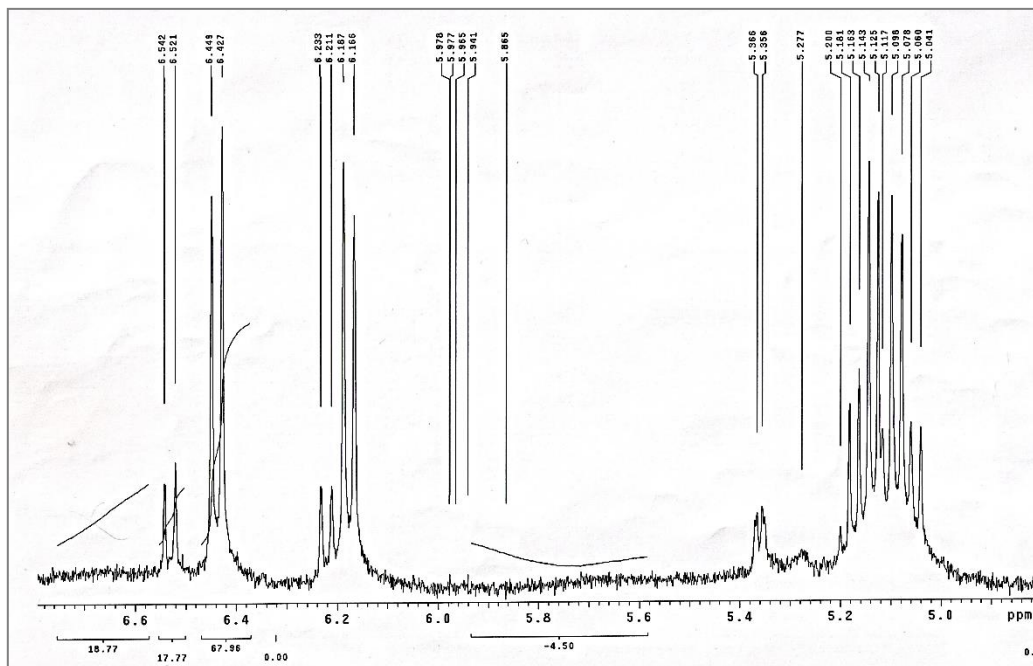


Figura 24: Ampliación ^1H -RMN de la fracción E.AcOEtF.6-7 donde aparecen las señales características y las integrales de los compuestos identificados 7^{P} y 8^{P} (α,α y β,β -epidioxisteroles) (δ sin calibrar)

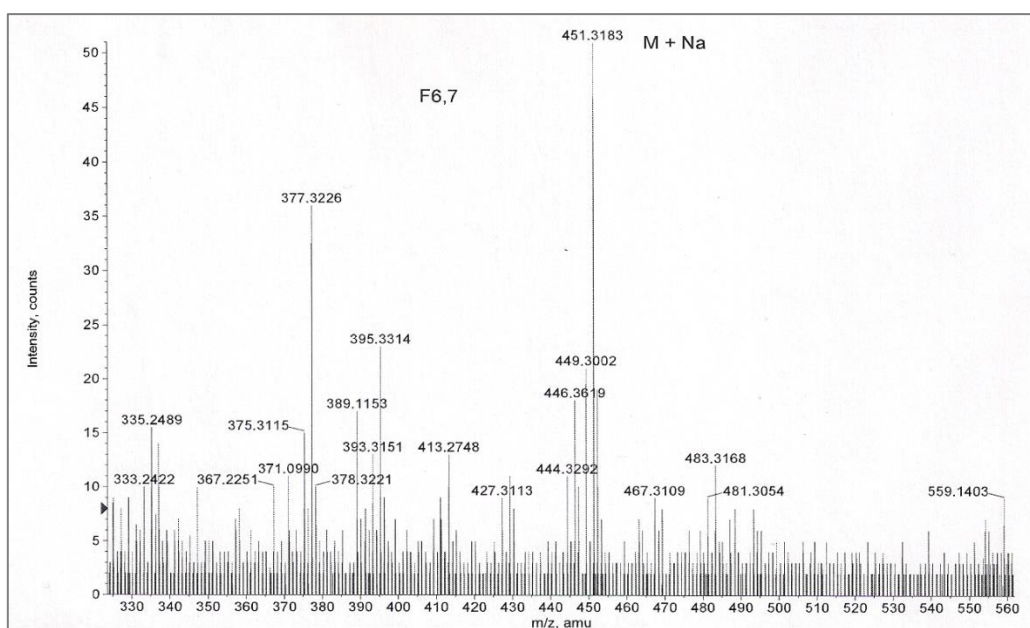


Figura 25: HRMS de la fracción E.AcOEtF.6-7, donde se identificaron los compuestos 7^{P} y 8^{P} (α,α y β,β -epidioxisteroles)

El **compuesto 9^P**, 1-octadeceno, se identificó en el análisis por CG-MS por comparación de su espectro de masas con el espectro de masas existente en la base de datos usada como referencia.

Datos del compuesto 9^P (1-octadeceno)

CG-MS: $t_r = 12,97$ min; ión molecular $[M]^+$ 252 m/z

Los **compuestos 10^P, 11^P y 12^P** (acetilgliceroles: 1,3 y 1,2-diacetilados y 1-monoacetilado, respectivamente) (**Figura 26**) se identificaron por CG-MS, donde se obtuvieron los picos con sus tiempos de retención (t_r) y donde se compararon sus espectros de masas con los espectros de masas existentes en la base de datos de usada como referencia. Se confirmó su estructura comparando las intensidades de los fragmentos de los espectros de masas según el estudio de (Nebel et al., 2008), que permite su diferenciación por las intensidades, a pesar de que presentan patrones de fragmentación similares (**Figura 27**). También se confirmó la presencia de estos compuestos mediante las señales de sus espectros de $^1\text{H-RMN}$, $^{13}\text{C-RMN}$, comparándolas con los datos publicados (Meireles & Pereira, 2013; Sustere et al., 2014) y mediante el experimento COSY. El compuesto 10^P (1,3-diacetilglicerol o 1,3-diacetina) resultó ser mayoritario respecto al compuesto 11^P (1,2-diacetilglicerol o 1,2-diacetina), apareciendo en la misma fracción como mezcla de regioisómeros. El compuesto 12^P (1-monoacetilglicerol o 1-monoacetina) se identificó en una fracción diferente más polar.

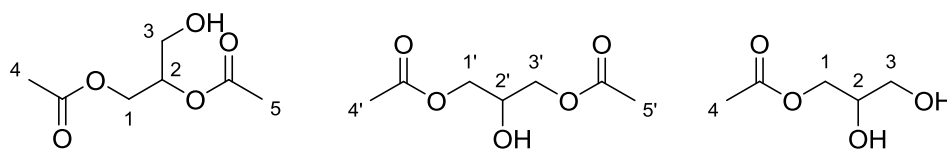


Figura 26: Estructura y numeración de los átomos de los compuestos 1,2-diacetina (izq.), 1,3-diacetina (centro) y 1-monoacetina (dcha.)

Datos del compuesto 10^P (1,3-diacetilglicerol o 1,3-diacetina)

CG-MS: t_r = 7,76 min; m/z (% intensidad): 61 (6), 74 (14), 86 (5), 103 (100), 115 (2), 116 (2) y 145 (1).

¹H-RMN/ $CDCl_3$, δ (ppm), mezcla de regioisómeros (1,3 y 1-2-diacetilglicerol): 5,02 (1H, m, H-2), 4,35-4,07 (7H, m, H-1, H-1', H-2' y H-3'), 3,74 (2H, d, H-3) y 2,07 (12H, m, H-4, H-5, H-4' y H-5').

¹³C-RMN/ $CDCl_3$, δ (ppm), estereoisómero 1,3-diacetilglicerol (mayoritario): 171,13 (COO-), 68,11 (CH-2'), 65,19 (CH₂-1' y 3') y 20,77 (CH₃-4' y 5').

Datos del compuesto 11^P (1,2-diacetilglicerol o 1,2-diacetina)

CG-MS: t_r = 8,28 min; m/z (% intensidad): 61 (10), 74 (11), 86 (34), 103 (100), 115 (1), 116 (5) y 145 (17).

¹H-RMN/ $CDCl_3$, δ (ppm), mezcla de estereoisómeros (1,3 y 1-2-diacetilglicerol): Datos anteriores

Datos del compuesto 12^P (1-monoacetilglicerol o 1-monoacetina)

CG-MS: t_r = 7,03 min; m/z (% intensidad): 61 (41), 73 (5), 74 (51), 86 (11), 103 (100).

¹H-RMN/ $CDCl_3$, δ (ppm): 4,13 (1H, dd, H-1a), 4,11 (1H, dd, H-1b), 3,89 (1H, m, H-2), 3,66 (1H, dd, H-3b), 3,56 (1H, dd, H-3a) y 2,06 (3H, s, H-4).

¹³C-RMN/ $CDCl_3$, δ (ppm): 171,6 (COO-), 70,2 (CH-2), 65,3 (CH₂-1), 63,3 (CH₂-3) y 20,8 (CH₃-4).

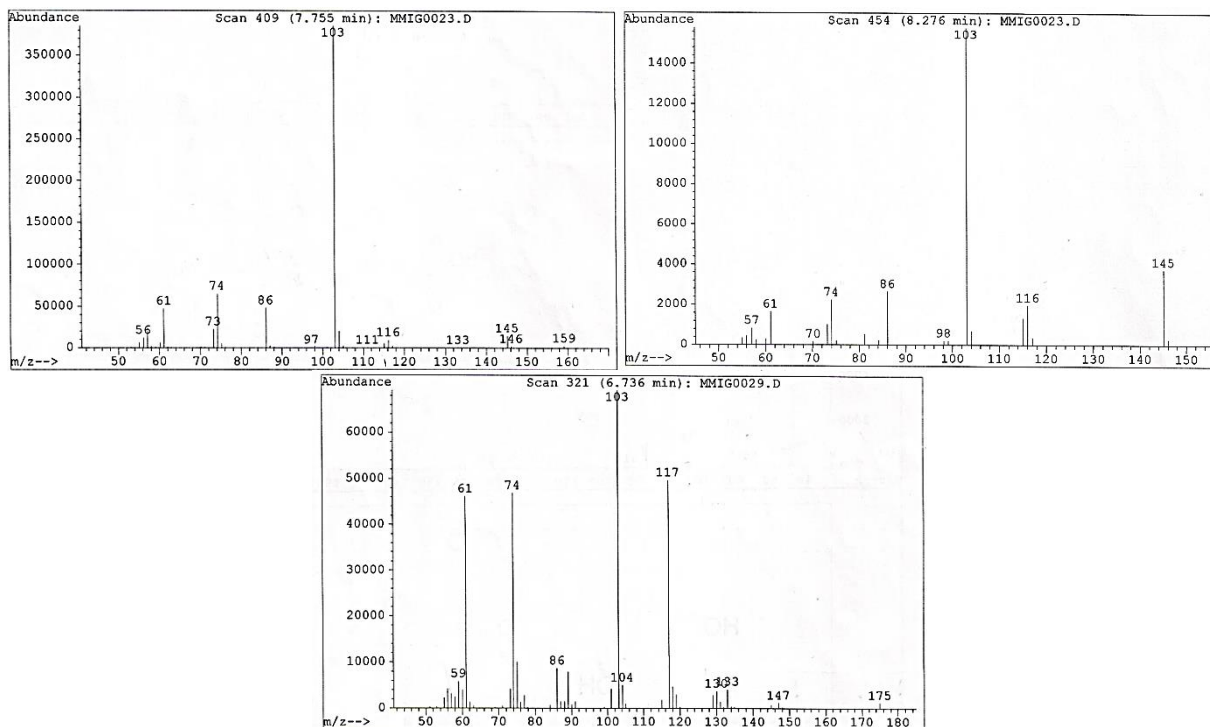


Figura 27: Espectros de masas de 1,3-diacetina (izq.) de 1,2-diacetina (dcha.) y 1-monoacetina (centro)

e) *Fracciones de la cromatografía del E.MeOH soluble en AcOEt (E.M.A.)*

En la cromatografía de los extractos solubles en AcOEt (E.M.A.; 329 mg) se reunieron los extractos: E.MeOHsol.AcOEt, E.M.sol.AcOEt y E.AcOEt-F.32-34, por tener espectros $^1\text{H-RMN}$ similares y así conseguir separar sus compuestos. Solamente se tuvieron en cuenta las fracciones de la **Tabla 20**, que corresponden al 35,0 % (115 mg) mientras que las otras fracciones no se estudiaron por tener una masa despreciable. En estas fracciones se identificaron nuevos compuestos: **compuestos 13^P, 14^P y 15^P**, ésteres metílicos de ácidos grasos (palmitato de metilo, oleato de metilo y linoleato de metilo, respectivamente) y el **compuesto 16^P** (uracilo).

Tabla 20: Fracciones y compuestos identificados en la cromatografía del E.M.A.

| Fracción de E.M.A | Eluyente | Masa (mg) | Compuestos identificados | Análisis efectuados |
|--------------------------|---------------|-----------|---|--|
| Mat B-C | DCM | 3 | Compuestos 13^P, 14^P y 15^P | ¹ H-RMN; CG-MS |
| T.18-22 | 9 DCM: 1 MeOH | 7 | Compuesto 12^P | ¹ H-RMN |
| T.23-30 insoluble en DCM | 9 DCM: 1 MeOH | 6 | Compuesto 16^P | ¹ H-RMN; ¹³ C-RMN; HRMS; CG-MS |
| T.37-46 | 8 DCM: 2 MeOH | 68 | Posterior fraccionamiento por TLC preparativa | ¹ H-RMN |
| T.47-49 | 7 DCM: 3 MeOH | 7 | Posterior extracción ácido-base | ¹ H-RMN |
| T.50-56 | 7 DCM: 3 MeOH | 14 | Posterior extracción ácido-base | ¹ H-RMN |

Los **compuestos 13^P, 14^P y 15^P**, ésteres metílicos de ácidos grasos (palmitato de metilo, oleato de metilo y linoleato de metilo, respectivamente), se identificaron por sus señales en el espectro ¹H-RMN y por su análisis por CG-MS, donde se obtuvieron los picos con sus tiempos de retención (*t_r*) (**Figura 28**) y donde se compararon sus espectros de masas con los espectros de masas existentes en la base de datos de usada como referencia. El compuesto 14^P (oleato de metilo) resultó ser el mayoritario. En el estudio publicado anteriormente por el grupo de investigación, donde se evalúa la composición de ácidos grasos de *M. procera* (Fernandes et al., 2014), además de los ácidos grasos mayoritarios, destaca la presencia de ácido oleico, que en este estudio sólo se ha encontrado en forma de éster metílico.

Datos de la fracción E.M.A.Mat.B-C (Mezcla de palmitato de metilo, oleato de metilo y linoleato de metilo entre otros compuestos)

¹H-RMN/CDCl₃, δ (ppm): 5,29 (m), 3,60 (s), 2,69 (m), 2,25 (t), 1,99 (m), 1,22 (s) y 0,80 (t).

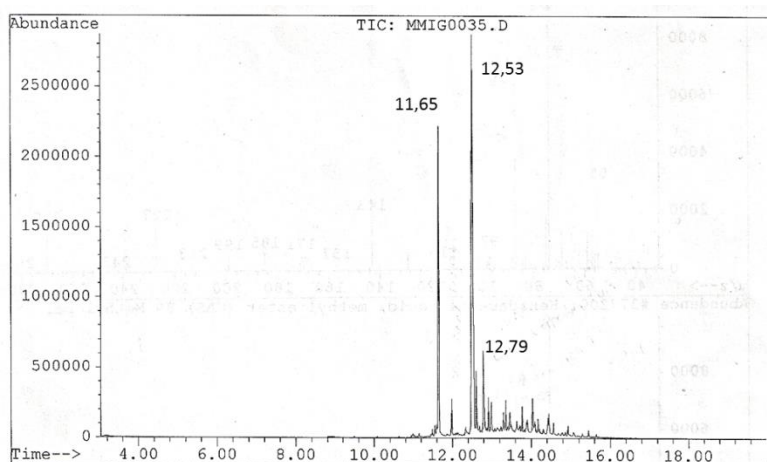
Datos del compuesto 13^P (Palmitato de metilo)CG-MS: $t_r = 11,66$ min; ión molecular $[M]^+$ 270 m/z **Datos del compuesto 14^P** (Oleato de metilo)CG-MS: $t_r = 12,52$ min; ión molecular $[M]^+$ 296 m/z **Datos del compuesto 15^P** (Linoleato de metilo)CG-MS: $t_r = 12,79$ min; ión molecular $[M]^+$ 294 m/z 

Figura 28: Cromatograma CG-MS de de la fracción E.M.A.Mat.B-C con los picos correspondientes a los ésteres de ácidos grasos y sus tiempos de retención

El **compuesto 16^P**, uracilo, se identificó utilizando la base de datos *Spectral Database for Organic Compounds SDBS* (AIST, 2004). La confirmación del compuesto se realizó comparando sus datos experimentales de ¹H-RMN y ¹³C-RMN con los datos espectrales de la base de datos (**Figura 29**). Este compuesto es una base púrica, que ya ha sido identificado en otras especies de setas del género *Cordyceps* y *Ganoderma* (Yuan et al., 2008),

Datos del compuesto 16^P (Uracilo)

¹H-RMN/CD₃OD, δ (ppm): 7,39 (1H, d, 7,6 Hz) y 5,60 (1H, d, 7,2 Hz).

¹³C-RMN/ CD₃OD, δ (ppm): 142,1 (CH) y 100,3 (CH).

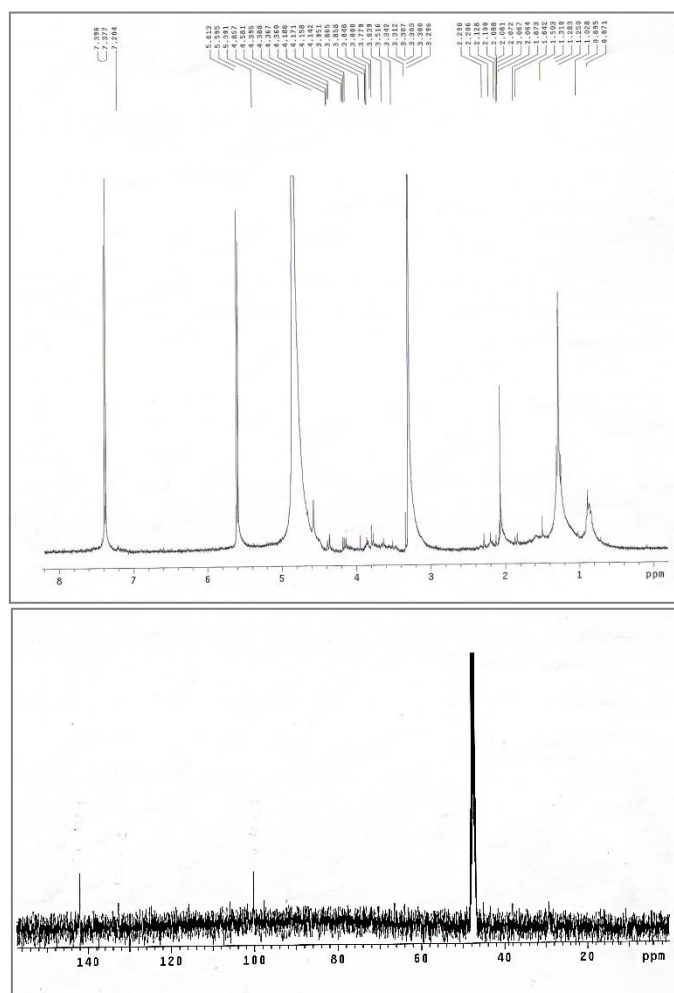


Figura 29: ¹H-RMN (arriba) y ¹³C-RMN (abajo) de la fracción de E.M.A.T.23-30 insoluble en DCM, donde se identificó el compuesto 16^P (uracilo)

f) Fracciones de la PTLC de E.M.A.T.37-46

La fracción de mayor masa de la cromatografía de E.M.A., (E.M.A.T.37-46; 68 mg), presentaba en su espectro $^1\text{H-RMN}$ señales de varios compuestos y se sometió a cromatografía preparativa en capa fina (PTLC) para intentar separarlos. Las fracciones obtenidas, los análisis realizados y los compuestos identificados, se resumen en la **Tabla 21**. En estas fracciones se identificaron nuevos compuestos: **compuesto 17^P** (ácido *p*-hidroxibenzoico), **compuesto 18^P** (glicerol) y **compuesto 19^P** (adenosina).

Tabla 21: Fracciones y compuestos identificados en la PTLC de E.M.A.T.37-46

| Fracción de E.M.A.T.37-46pr. | Masa (mg) | Compuestos identificados | Análisis efectuados |
|------------------------------|-----------|--|--|
| H | 8 | Compuesto 18^P Posterior extracción ácido-base | $^1\text{H-RMN}$ |
| D | 6 | Compuestos 18^P y 19^P | $^1\text{H-RMN}$; $^{13}\text{C-RMN}$; HRMS |
| C | 18 | Compuesto 18^P Posterior extracción ácido-base | $^1\text{H-RMN}$ |
| F | 12 | Compuesto 18^P | $^1\text{H-RMN}$ |
| B | 3 | Compuesto 18^P | $^1\text{H-RMN}$; $^{13}\text{C-RMN}$ |
| E | 11 | Compuesto 17^P (minoritario) | $^1\text{H-RMN}$ |
| A | 7 | Compuesto 17^P | $^1\text{H-RMN}$; $^{13}\text{C-RMN}$ |
| G | 6 | - | $^1\text{H-RMN}$ |

El **compuesto 17^P**, ácido *p*-hidroxibenzoico, se identificó utilizando la base de datos *Spectral Database for Organic Compounds SDBS* (AIST, 2004). La confirmación del compuesto se realizó comparando sus datos experimentales de $^1\text{H-RMN}$ y $^{13}\text{C-RMN}$ con los datos espectrales de la base de datos (**Figura 30**). En un estudio publicado anteriormente por el grupo de investigación (Barros et al., 2009), este compuesto fenólico no se había detectado en esta especie de seta, por lo que es la primera vez que se identifica en esta especie.

Datos del compuesto 17^P (Ácido *p*-hidroxibenzoico)

¹H-RMN/CD₃OD, δ (ppm): 7,78 (2H, d, 4,8 Hz) y 6,70 (2H, d, 4,8 Hz).

¹³C-RMN/ CD₃OD, δ (ppm): 131,5 (CH) y 114,5 (CH). Sólo se ven las señales más intensas.

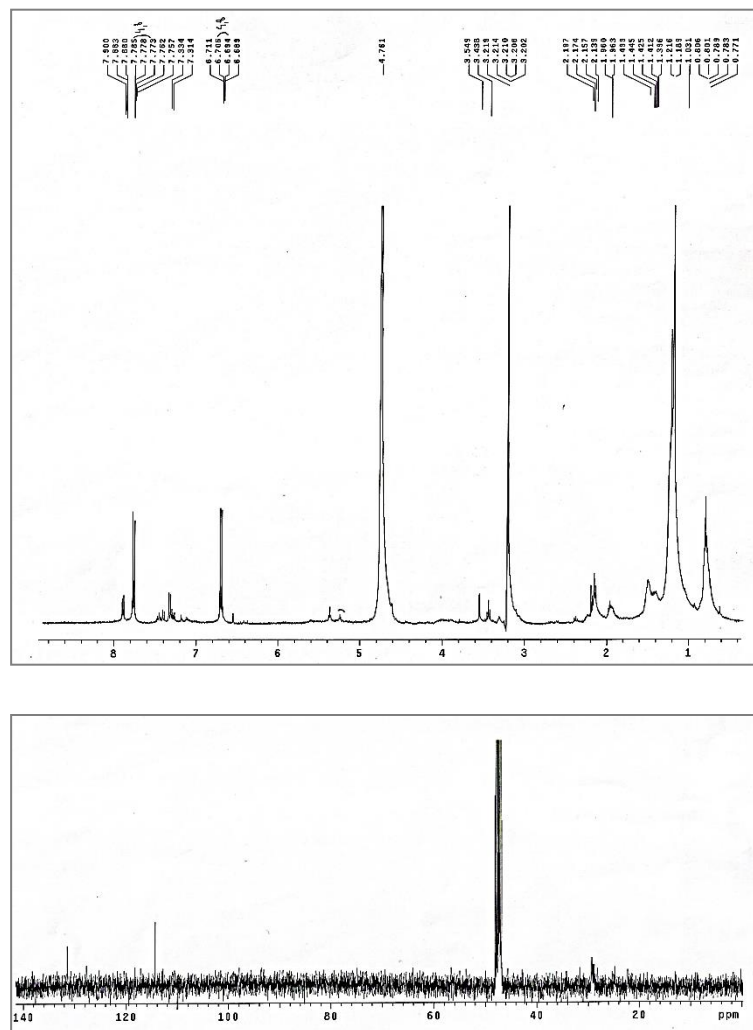


Figura 30: ¹H-RMN (arriba) y ¹³C-RMN (abajo) de la fracción de E.M.A.T.37-46pr.A, donde se identificó el compuesto (ácido *p*-hidroxibenzoico)

El **compuesto 18^P**, glicerol (**Figura 31**), se identificó utilizando la base de datos *Spectral Database for Organic Compounds SDBS* (AIST, 2004). La confirmación del compuesto se realizó comparando sus datos experimentales de ¹H-RMN y ¹³C-RMN con los datos espectrales de la base de datos y con los datos obtenidos al analizar un patrón de glicerol.

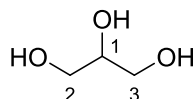


Figura 31: Estructura y numeración de los átomos de glicerol.

Datos del compuesto 18^P (Glicerol)

¹H-RMN/CD₃OD, δ (ppm): 3,63 (1H, m, H-1), 3,56 (2H, dd, 4,8 y 11,0 Hz, H-2a y 3a) y 3,50 (2H, dd, 6,0 y 11,0 Hz, H-2b y 3b).

¹³C-RMN/ CD₃OD, δ (ppm): 72,4 (CH-1) y 62,9 (CH₂-2 y 3).

Datos del patrón de glicerol

¹H-RMN/CD₃OD, δ (ppm): 3,65 (1H, m, H-1), 3,58 (2H, dd, 4,8 y 11,2 Hz, H-2a y 3a) y 3,51 (2H, dd, 6,4 y 11,2 Hz, H-2b y 3b).

¹³C-RMN/ CD₃OD, δ (ppm): 72,4 (CH-1) y 63,0(CH₂-2 y 3).

El **compuesto 19^P**, adenosina (**Figura 32**), se identificó utilizando la base de datos *Spectral Database for Organic Compounds SDBS* (AIST, 2004). La confirmación del compuesto se realizó comparando sus datos experimentales de ¹H-RMN y ¹³C-RMN con los datos espectrales de la base de datos y a través de su fórmula molecular deducida de su espectro HRMS a partir del aducto con sodio de su ion molecular [M+Na]⁺ a 290,0869 *m/z* (calculada para C₁₀H₁₃N₅O₄Na 290,085975 u) (**Figura 33**). La adenosina es un nucleósido, que ya ha sido detectado en otras especies de setas del género *Cordyceps* y *Ganoderma* (Yuan et al., 2008).

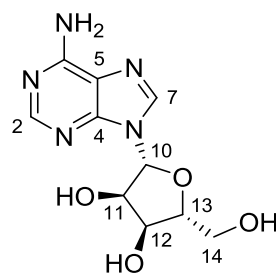


Figura 32: Estructura y numeración de los átomos de adenosina

Datos del compuesto 19^P (Adenosina)

¹H-RMN/CD₃OD, δ (ppm): 8,30 (1H, s, H-7), 8,12 (1H, s, H-2), 5,96 (1H, d, 6,8 Hz, H-10), 4,36 (1H, dd, H-12), 4,17 (1H, dd, H-12), 3,88 (1H, dd, H-14a) y 3,74 (1H, dd, H-14b).

¹³C-RMN/ CD₃OD, δ (ppm): 152,1 (CH-2), 140,6 (CH-7), 88,1 (CH-10), 86,8 (CH-13), 74,0 (CH-12), 71,2 (CH-13) y 62,1 (CH₂-14). Sólo se ven las señales más intensas.

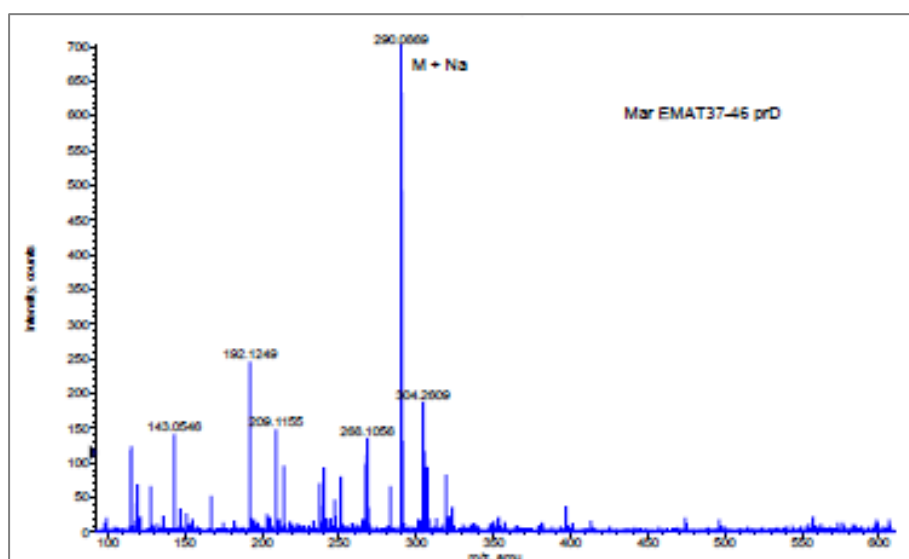


Figura 33: HRMS de la fracción E.M.A.T.37-46pr.D, donde se identificó el compuesto 19^P (adenosina)

g) Fracciones de la extracción ácido-base de fracciones del E.M.A.

En el fraccionamiento ácido-base de las 4 fracciones, E.M.A.T.47-49, E.M.A.T.50-56, E.M.A.T.37-46pr.C y E.M.A.T.37-46pr.H (47 mg), que se reunieron por presentar espectros $^1\text{H-RMN}$ similares, se obtuvieron las fracciones F.Org.AcOEt-Comp.neutros (10 mg), F.Org.BuOH-Comp.neutros (293 mg) y F.Org.AcOEt-Comp.ácidos (10 mg). Con esta extracción ácido-base se pretendía eliminar ciertos compuestos presentes en las fracciones de partida, como el glicerol (compuesto 18^P), y aislar otros desconocidos para poder identificarlos. Pero en el procedimiento de extracción, se perdieron los compuestos de interés (bien por solubilidad en las fases acuosas o bien por evaporación en el rotavapor), quedando sólo compuestos minoritarios que no se pudieron identificar. En F.Org.AcOEt-Comp.ácidos, se consiguió determinar el **compuesto 17^P**, aunque era minoritario.

h) Estudio del E.M.insol.AcOEt mediante HPLC semipreparativa

En el estudio del extracto metanólico insoluble en AcOEt (E.M.insol.AcOEt) mediante HPLC semipreparativo, se intentaron separar los compuestos más polares mediante cromatografía en fase reversa. Aunque los cromatogramas mostraron la presencia de varios compuestos (**Figura 34**), los espectros $^1\text{H-RMN}$ de las fracciones sólo mostraron la presencia de ácidos grasos e impurezas, siendo sus masas despreciables, excepto para la fracción del minuto 3 que mostró el mismo espectro que la muestra de partida. Debido a esto, se deduce que la separación de la muestra no fue efectiva, posiblemente por una sobrecarga de la columna cromatográfica. Estas diferencias entre los cromatogramas y los espectros RMN pueden deberse a que el detector UV del HPLC no es universal, es decir, la intensidad de las señales para los distintos compuestos está relacionada sobre todo con la presencia de grupos cromóforos en la estructura de cada uno de ellos, más que con su masa.

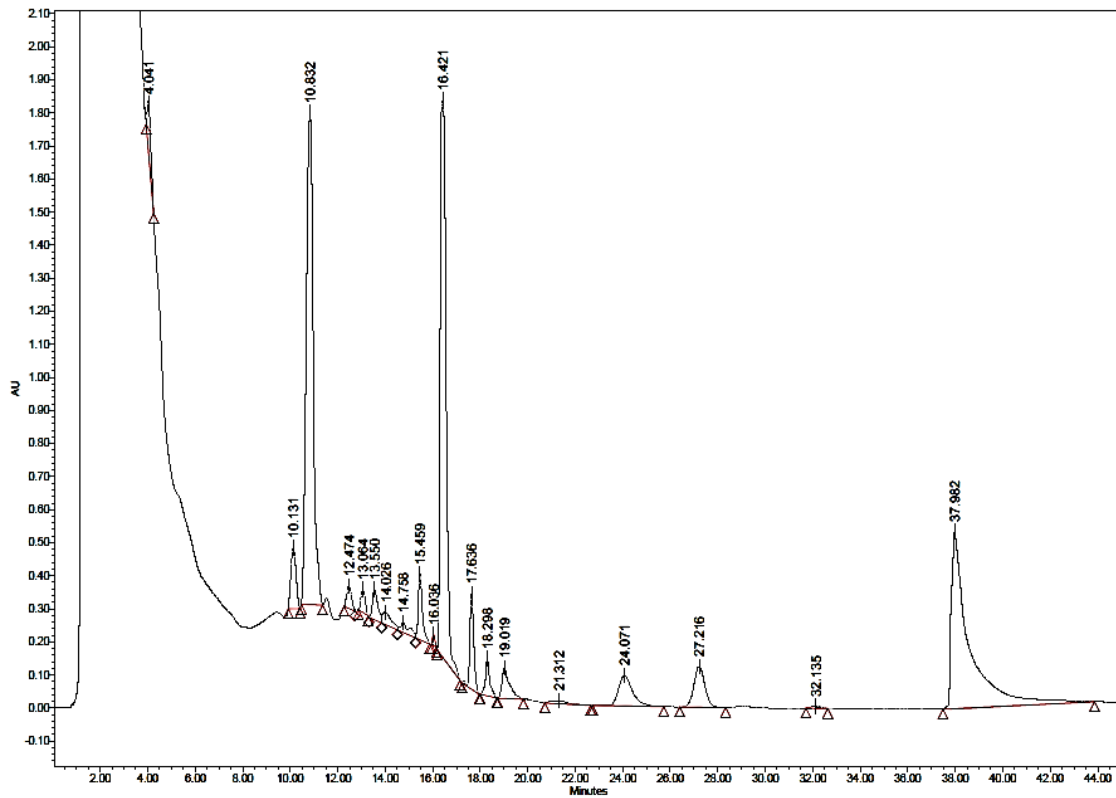


Figura 34: Cromatograma de E.M.insol.AcOEt obtenido por HPLC semipreparativa

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En este trabajo se ha llevado a cabo, por un lado, la caracterización química (valor nutricional/valor energético y composición en compuestos fenólicos, azúcares libres, tocoferoles, ácidos orgánicos y ácidos grasos) de dos especies de plantas, *C. officinalis* y *M. cervina*, y la determinación de la actividad antioxidante y antitumoral, de sus infusiones y de sus extractos metanólicos. Por otro lado, se ha realizado la caracterización química de los extractos y fracciones de una especie de seta, *M. procera*.

El valor nutricional (proteínas, lípidos, glúcidos y cenizas), de las plantas secas reveló una composición mayoritaria en hidratos de carbono y baja en lípidos, siendo superior el contenido de proteínas en *M. cervina*. El valor energético de ambas plantas secas fue similar y muy bajo, revelando buenas propiedades nutricionales que las hacen adecuadas para una dieta variada y equilibrada baja en calorías.

El perfil fenólico, de las infusiones y de los extractos hidrometanólicos, de *C. officinalis* presentó trece compuestos diferentes, principalmente flavonoles glicosilados, siendo mayoritario el flavonoide isoramnetina-3-*O*-ramnosilrutinosa; mientras que *M. cervina* presentó once compuestos, principalmente derivados de cafeoil (dímeros, trímeros y tetrámeros del ácido cafeico), siendo mayoritario el ácido rosmarínico. La composición total de compuestos fenólicos fue mayor para *M. cervina*.

En cuanto a la composición total de azúcares, compuestos orgánicos y tocoferoles, *C. officinalis* demostró una composición total de todos ellos mayor que *M. cervina*, tanto en la planta seca como en la infusión, siendo sus compuestos mayoritarios fructosa, ácido cítrico y α -tocoferol.

El perfil de ácidos grasos de *C. officinalis* mostró una relación de ácidos grasos totales: SFA (76 %) > PUFA > MUFA, mayoritario el ácido palmítico; mientras que la relación de *M. cervina* resultó ser más saludable: PUFA (56 %) > SFA > MUFA, mayoritario el ácido α -linolénico, un ácido graso esencial Omega-3, beneficioso para la salud.

En la evaluación de la actividad antioxidante de los extractos hidrometanólicos e infusiones de las plantas, los mejores resultados se mostraron para *M. cervina*, cuyo extracto hidrometanólico presentó los valores más bajos de EC₅₀ en todos los ensayos, demostrando mayor capacidad antioxidante, y su infusión también, excepto en el ensayo de la inhibición de β-caroteno donde la infusión de *C. officinalis* mostró mayor actividad antioxidante. Estas diferencias en la actividad antioxidante de ambas plantas, pueden deberse a su diferente perfil fenólico y a que cada preparación (infusión y extracto hidrometanólico), pueden tener diferentes compuestos con capacidades específicas para participar en los mecanismos involucrados en los ensayos realizados.

En la evaluación de la actividad antitumoral, de los extractos hidrometanólicos e infusiones de las plantas, los mejores resultados se obtuvieron para el extracto hidrometanólico de *M. cervina*, que resultó tener actividad antitumoral frente a las cuatro líneas celulares tumorales, siendo más activo frente al carcinoma cervical (HeLa). El extracto hidrometanólico de *C. officinalis* también presentó actividad frente al carcinoma cervical, siendo su mayor actividad, y frente al carcinoma hepatocelular (HepG2). Las infusiones de ambas plantas no mostraron citotoxicidad en células tumorales y ninguno de los extractos analizados presentó hepatotoxicidad frente a los cultivos primarios de células de hígado de cerdo (PLP2).

El material liofilizado de *M. procerca* fue extraído por maceración con diferentes disolventes, obteniéndose los diferentes extractos de hexano (E.Hexano), diclorometano (E.DCM), acetato de etilo (E.AcOEt), metanol (E.MeOH) y acuoso (E.H₂O), siendo el de mayor rendimiento el extracto metanólico (17 %).

Los extractos más apolares de *M. procerca* presentaron en su composición ácidos grasos. En el E.Hexano fueron identificados ácido pentadecílico, ácido palmítico y ácido linoleico, y en los extractos, E.DCM y E.AcOEt, ácido palmítico y ácido linoleico. Además el E.AcOEt reveló la presencia de α,α-epidioxiergosterol y β,β-epidioxiergosterol, 1-octadeceno y los acetilgliceroles (1,2 y 1,3-diacetina y 1-monoacetina).

El estudio de E.MeOH reveló la presencia del polialcohol manitol y del disacárido trehalosa peracetilados. Además en su fracción más apolar, la fracción soluble en acetato de etilo, fueron identificados los ésteres metílicos de ácidos grasos (palmitato de metilo, oleato de metilo y linoleato de metilo), el compuesto fenólico

ácido *p*-hidroxibenzoico, el glicerol, la base pirimidínica uracilo y el nucleósido adenosina.

En la extracción de alcaloides de *M. procera* se identificó el compuesto acetamida pero sin poder confirmar que su presencia fuese natural.

En total, fueron identificados 18 compuestos en los extractos de *M. procera*, principalmente productos del metabolismo primario: compuestos glucídicos o derivados (manitol y trehalosa peracetilados), compuestos lipídicos o derivados (ácidos grasos, ésteres metílicos de ácidos grasos, acetilgliceroles, glicerol, 1-octadeceno, dos derivados del ergosterol (epididoxiergosteroles)), compuestos de los ácidos nucleicos (uracilo y adenosina) y un ácido fenólico (ácido *p*-hidroxibenzoico).

Como futuro trabajo sería interesante evaluar la actividad antioxidante y antitumoral de los extractos obtenidos de *M. procera* y continuar el estudio de los extractos más polares, mediante su separación por HPLC semipreparativo, en la búsqueda e identificación de otros metabolitos.

De manera general, se puede concluir que las tres matrices naturales estudiadas, *C. officinalis*, *M. cervina* y *M. procera* poseen en su composición compuestos químicos de gran interés. Este trabajo contribuye al conocimiento de estas especies en cuanto a composición química y, en el caso de las especies vegetales, 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

- Abdel-Aziem, S. H., Hassan, A. M., El-Denshary, E. S., Hamzawy, M. A., Mannaa, F. A., & Abdel-Wahhab, M. A. (2014). Ameliorative effects of thyme and calendula extracts alone or in combination against aflatoxins-induced oxidative stress and genotoxicity in rat liver. *Cytotechnology*, *66*, 457–470.
- 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.
- Aedo, C. (director). (1999). Anthos. Sistema de información sobre las plantas de España. Consultado en <http://www.anthos.es>
- Aguiar, C. (CIMO). (2014). Flora-on: Flora de Portugal Interactiva. Consultado en <http://www.flora-on.pt/pt>
- AIST, & National Institute of Advanced Industrial Science and Technology. (2004). Spectral Database for Organic Compounds SDBS. Consultado 7 de Julio, 2015, en <http://sdb.db.aist.go.jp>
- Alexenizer, M., & Dorn, A. (2007). Screening of medicinal and ornamental plants for insecticidal and growth regulating activity. *Journal of Pest Science*, *80*, 205–215.
- Alves, M. J., Fernandes, Â., Barreira, J. C. M., Lourenço, I., Fernandes, D., Moura, A., ... Ferreira, I. C. F. R. (2015). How gamma-rays and electron-beam irradiation would affect the antimicrobial activity of differently processed wild mushroom extracts? *Journal of Applied Microbiology*, *118*, 592–598.
- Alves, P. (2011). *Macrolepiota procera*. Consultado 23 de Febrero, 2015, en <https://riscosapenas.wordpress.com/tag/macrolepiota-procera/>
- Amirghofran, Z., Azadbakht, M., & Karimi, M. (2000). Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, *72*, 167–172.
- Andersen, F. A., Bergfeld, W. F., Belsito, D. V, Hill, R. a, Klaassen, C. D., Liebler, D. C., ... Snyder, P. W. (2010). Final report of the Cosmetic Ingredient Review Expert Panel amended safety assessment of *Calendula officinalis*-derived cosmetic ingredients. *International Journal of Toxicology*, *29*, 221S–43.
- Anderson, I. B., Mullen, W. H., Meeker, J. E., Khojasteh-Bakht, S. C., Oishi, S., Nelson, S. D., & Blanc, P. D. (1996). Pennyroyal toxicity: Measurement of toxic metabolite levels in two cases and review of the literature. *Annals of Internal Medicine*, *124*, 726–734.

- Andlauer, W., & Fürst, P. (2002). Nutraceuticals: A piece of history, present status and outlook. *Food Research International*, 35, 171–176.
- AOAC International. (1995). *AOAC: Official Methods of Analysis*.
- Arora, D., Rani, A., & Sharma, A. (2013). A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus *Calendula*. *Pharmacognosy Reviews*, 7, 179–187.
- Arora, S., Goyal, S., Balani, J., & Tandon, S. (2013). Enhanced antiproliferative effects of aqueous extracts of some medicinal mushrooms on colon cancer cells. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 15, 301–14.
- Arora, S., Tandon, C., & Tandon, S. (2014). Evaluation of the cytotoxic effects of CAM therapies: An in vitro study in normal kidney cell lines. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Babae, N., Moslemi, D., & Khalilpour, M. (2013). Antioxidant capacity of *Calendula officinalis* flowers extract and prevention of radiation induced oropharyngeal mucositis in patients with head and neck cancers: a randomized controlled clinical study. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21, 1–7.
- Bakó, E., Deli, J., & Tóth, G. (2002). HPLC study on the carotenoid composition of *Calendula* products. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 53, 241–50.
- Barajas-Farias, L. M., Pérez-Carreón, J. I., Arce-Popoca, E., Fattel-Fazenda, S., Alemán-Lazarini, L., Hernández-García, S., ... Villa-Treviño, S. (2006). A dual and opposite effect of *Calendula officinalis* flower extract: Chemoprotector and promoter in a rat hepatocarcinogenesis model. *Planta Medica*, 72, 217–221.
- Barros, L., Baptista, P., Correia, D. M., Morais, J. S., & Ferreira, I. C. F. R. (2007). Effects of conservation treatment and cooking on the chemical composition and antioxidant activity of Portuguese wild edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4781–8.
- Barros, L., Calhelha, R. C., Vaz, J. a., Ferreira, I. C. F. R., Baptista, P., & Estevinho, L. M. (2006). Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. *European Food Research and Technology*, 225, 151–156.
- 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., Cruz, T., Baptista, P., Estevinho, L. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2008). Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 46, 2742–7.

- Barros, L., Dueñas, M., Dias, M. I., Sousa, M. J., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Phenolic profiles of cultivated, in vitro cultured and commercial samples of *Melissa officinalis* L. infusions. *Food Chemistry*, *136*, 1–8.
- Barros, L., Dueñas, M., Ferreira, I. C. F. R., Baptista, P., & Santos-Buelga, C. (2009). Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food and Chemical Toxicology*, *47*, 1076–9.
- 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*(3), 544–550.
- Barros, L., Oliveira, S., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2010). In vitro antioxidant properties and characterization in nutrients and phytochemicals of six medicinal plants from the Portuguese folk medicine. *Industrial Crops and Products*, *32*, 572–579.
- Barros, L., Pereira, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Optimized Analysis of Organic Acids in Edible Mushrooms from Portugal by Ultra Fast Liquid Chromatography and Photodiode Array Detection. *Food Analytical Methods*, *6*, 309–316.
- Bashir, S., Janbaz, K. H., Jabeen, Q., & Gilani, A. H. (2006). Studies on Spasmogenic and Spasmolytic Activities of *Calendula officinalis* Flowers Samra. *Phytotherapy Research*, *20*, 906–910.
- Bhan, S., Kumar, R., Kalla, A. K., & Dhar, K. L. (1988). Triterpenoids from *Swertia petiolata*. *Phytochemistry*, *27*, 539–542.
- Boucaudmaitre, Y., Algernon, O., & Raynaud, J. (1988). Cito-toxic and antitumoral activity of *Calendula Officinalis* extracts. *Pharmazie*, *43*, 220–221.
- Burton, G. W., & Traber, M. G. (1990). Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annual Review of Nutrition*, *10*, 357–382.
- Burzaco Vidaurreta, A., Pérez-Alonso, M. J., & Velasco Negueruela, A. (1992). Estudio mediante cromatografía en capa fina de algunas plantas con pulegona: *Mentha pulegium* L. *Mentha cervina* (L.) Fresen. *Botanica Complutensis*, *17*, 79–85.
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013a). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, *51*, 15–25.
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013b). The role of phenolic compounds in the fight against cancer - a review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, *13*, 1236–58.
- Castillo. (1996). *Mentha* L. In S. Castroviejo, C. Aedo, M. Laínz, F. Muñoz Garmendia, G. Nieto Feliner, J. Paiva, & C. Benedí (Eds.), *Flora Ibérica* (p. 338). Madrid: Real Jardín Botánico, CSIC.

- Castillo García, E., & Martínez Solís, I. (2007). *Manual de Fitoterapia*. Elsevier Masson.
- Cechinel Filho, V., & Yunes, R. a. (1998). Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, 21(Xiv), 99–105.
- CEE. (1988). DIRECTIVA DEL CONSEJO de 22 de junio de 1988 relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en el ámbito de los aromas que se utilizan en los productos alimenticios y de los materiales de base para su producción.
- Centeno, L. (2004). Plantas medicinales españolas *Calendula officinalis* L.(Asteraceae). *Medicina Naturista*, 5, 257–261.
- Ćetković, G. S., Djilas, S. M., Čanadanović-Brunet, J. M., & Tumbas, V. T. (2004). Antioxidant properties of marigold extracts. *Food Research International*, 37, 643–650.
- Chen, H., Zhang, Q., Wang, X., Yang, J., & Wang, Q. (2011). Qualitative analysis and simultaneous quantification of phenolic compounds in the aerial parts of *Salvia miltiorrhiza* by HPLC-DAD and ESI/MS. *Phytochemical Analysis*, 22, 247–257.
- Comisión Europea. Diario Oficial de la Unión Europea, L 97, 05 de abril de 2006, Diario Oficial de la Unión Europea (2006).
- Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). (2008). Community Herbal Monograph on *Calendula officinalis* L., Flos. Consultado en <http://www.emea.europa.eu>
- Cordova, C. a S., Siqueira, I. R., Netto, C. a, Yunes, R. a, Volpato, A. M., Cechinel Filho, V., ... Creczynski-Pasa, T. B. (2002). Protective properties of butanolic extract of the *Calendula officinalis* L. (marigold) against lipid peroxidation of rat liver microsomes and action as free radical scavenger. *Redox Report: Communications in Free Radical Research*, 7, 95–102.
- Crozier, A., Clifford, M. N., & Ashihara, H. (2008). *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*.
- Da Rocha, a. (2001). Natural products in anticancer therapy. *Current Opinion in Pharmacology*, 1, 364–369.
- Duran, V., Matic, M., Jovanovc, M., Mimica, N., Gajinov, Z., Poljacki, M., & Boza, P. (2005). Results of the clinical examination of an ointment with marigold (*Calendula officinalis*) extract in the treatment of venous leg ulcers. *International Journal of Tissue Reactions-Experimental and Clinical Aspects*, 27, 101–106.
- Dyakov, M. Y., Kamzolkina, O. V., Shtaer, O. V., Bis'ko, N. a., Poedinok, N. L., Mikhailova, O. B., ... Efremenkova, O. V. (2011). Morphological characteristics

- of natural strains of certain species of basidiomycetes and biological analysis of antimicrobial activity under submerged cultural conditions. *Microbiology*, *80*, 274–285.
- Efstratiou, E., Hussain, A. I., Nigam, P. S., Moore, J. E., Ayub, M. a, & Rao, J. R. (2012). Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, *18*, 173–6.
- Fernandes, Â., Barreira, J. C. M., Antonio, A. L., Oliveira, M. B. P. P., Martins, A., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Effects of gamma irradiation on chemical composition and antioxidant potential of processed samples of the wild mushroom *Macrolepiota procera*. *Food Chemistry*, *149*, 91–8.
- Fernandes, Â., Barros, L., & Antonio, A. L. (2014). Using Gamma Irradiation to Attenuate the Effects Caused by Drying or Freezing in *Macrolepiota procera* Organic Acids and Phenolic Compounds, *7*, 3012–3021.
- Fernandes, Â., Oliveira, M. B. P. P., Martins, A., & Ferreira, I. C. F. R. (2012). Add-value of *Lactarius deliciosus* and *Macrolepiota procera* wild mushrooms due to their nutritional and nutraceutical potential. In *International Congress on Promotion of Tradicional Food Products*.
- Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., & Abreu, R. M. V. (2009). Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, *16*, 1543–1560.
- Ferreira, I. C. F. R., Vaz, J. a, Vasconcelos, M. H., & Martins, A. (2010). Compounds from wild mushrooms with antitumor potential. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, *10*, 424–436.
- Flann, C. (2009). *Calendula*. Consultado 13 de Enero, 2015, en <http://dixon.iplantcollaborative.org/compositaeweb/Default.aspx>
- Fonseca, Y. M., Catini, C. D., Vicentini, F. T. M. C., Nomizo, A., Gerlach, R. F., & Fonseca, M. J. V. (2010). Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. *Journal of Ethnopharmacology*, *127*, 596–601.
- Font Quer, P. (1961). *Plantas medicinales. El dioscórides renovado* (3^a ed.). Barcelona: Península.
- Frankič, T., Salobir, K., & Salobir, J. (2009). The comparison of in vivo antigenotoxic and antioxidative capacity of two propylene glycol extracts of *Calendula officinalis* (marigold) and vitamin E in young growing pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *93*, 688–694.
- García Rollán, M. (2006). *Manual para buscar setas*. (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, Ed.) (6^a edición). Ediciones Mundi-Prensa.

- Gazim, Z. C., Rezende, C. M., Fraga, S. R., Inez, T., Svidzinski, E., Aparicio, D., & Cortez, G. (2008). Antifungal activity of the essential oil from *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) growing in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 61–63.
- Gonçalves, M. J., Vicente, a M., Cavaleiro, C., & Salgueiro, L. (2007). Composition and antifungal activity of the essential oil of *Mentha cervina* from Portugal. *Natural Product Research*, 21, 867–71.
- 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.
- Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Calhella, R. C., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., ... Ferreira, I. C. F. R. (2013). Infusion and decoction of wild German chamomile: Bioactivity and characterization of organic acids and phenolic compounds. *Food Chemistry*, 136, 947–954.
- Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Queiroz, M. J. R. P., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Characterisation of phenolic compounds in wild fruits from Northeastern Portugal. *Food Chemistry*, 141, 3721–3730.
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 1–93.
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35, 1147–1150.
- Halpner, a D., Handelman, G. J., Harris, J. M., Belmont, C. a, & Blumberg, J. B. (1998). Protection by vitamin C of loss of vitamin E in cultured rat hepatocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 359, 305–309.
- Hamzawy, M. a, El-Denshary, E. S. M., Hassan, N. S., Mannaa, F. a, & Abdel-Wahhab, M. a. (2013). Dietary Supplementation of *Calendula officinalis* Counteracts the Oxidative Stress and Liver Damage Resulted from Aflatoxin. *ISRN Nutrition*, 2013, 1–9.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. a. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57–70.
- Hashimoto, N., Aoyama, T., & Shioiri, T. (1981). New methods and reagents in organic synthesis. 14. A simple efficient preparation of methyl esters with trimethylsilyldiazomethane (TMSCHN₂) and its application to gas chromatographic analysis of fatty acids. *Chem. Pharm. Bull.*, 29, 1475–1478.
- Hermosilla, C. E., & Sánchez, J. (2007). *Guía de campo de las setas de Burgos*. (D. de Burgos, Ed.). Caja de Burgos.
- Iauk, L., Bue, a M. Lo, Milazzo, I., Rapisarda, A., Blandino, G., & Melissa, L. (2003). Antibacterial activity of medicinal plant. *Phytotherapy Research*, 17, 599–604.

- Jiménez-Medina, E., García-Lora, A., Paco, L., Algarra, I., Collado, A., & Garrido, F. (2006). A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual in vitro effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. *BMC Cancer*, *6*, 119.
- Kalvatchev, Z., Walder, R., & Garzaro, D. (1997). Anti-HIV activity of extracts from *Calendula* flowers. *Biomed and Pharmacotherapy*, *51*, 176–180.
- Kamal-Eldin, A., & Appelqvist, L. A. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, *31*, 671–701.
- 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.
- Khan, I. A., & Abourashed, E. A. (2010). *Leung's Encyclopedia of Common Natural Ingredients used in food, drugs and cosmetics*. (Wiley, Ed.) John Wiley & Sons, New York (3^a ed.). Nueva Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Kim, K. H., Choi, S. U., Park, K. M., Seok, S. J., & Lee, K. R. (2008). Cytotoxic constituents of *Amanita subjunquillea*. *Archives of Pharmacal Research*, *31*, 579–586.
- Kishimoto, S., Maoka, T., Sumitomo, K., & Ohmiya, A. (2005). Analysis of carotenoid composition in petals of *Calendula officinalis* L.). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *69*, 2122–2128.
- Korz, A. P., Gur, A. M., Belousov, M. V., & Yusubov, M. S. (2012). Medicinal plants composition of water-soluble polysaccharides from *Calendula officinalis* L. flowers. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, *46*, 219–221.
- Kuřdo, E., Jarzyńska, G., Gućia, M., & Falandysz, J. (2013). Mineral constituents of edible parasol mushroom *Macrolepiota procera* (Scop. ex Fr.) Sing and soils beneath its fruiting bodies collected from a rural forest area. *Chemical Papers*, *68*, 484–492.
- Kurkin, V. a., & Sharova, O. V. (2007). Flavonoids from *Calendula officinalis* flowers. *Chemistry of Natural Compounds*, *43*, 216–217.
- Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, *134*, 3479S–3485S.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, *4*, 118.
- 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.

- Lü, J.-M., Lin, P. H., Yao, Q., & Chen, C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *14*, 840–860.
- Martins da Rocha, J. S. (2011). Estudo das propriedades antioxidante e antimicrobiana de extractos de *Mentha cervina*. Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa.
- Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Henriques, M., Silva, S., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L. *Food Chemistry*, *170*, 378–385.
- Matić, I. Z., Juranić, Z., Savikin, K., Zdunić, G., Nađvinski, N., & Godevac, D. (2013). Chamomile and marigold tea: chemical characterization and evaluation of anticancer activity. *Phytotherapy Research : PTR*, *27*, 852–8.
- McMurry, J. (2001). *Química Orgánica* (5^a ed.). International Thomson Editores.
- Meireles, B. a., & Pereira, V. L. P. (2013). Synthesis of bio-additives: Transesterification of ethyl acetate with glycerol using homogeneous or heterogeneous acid catalysts. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *24*, 17–25.
- Morales, P., Ferreira, I. C. F. R., Carvalho, A. M., Sánchez-Mata, M. C., Cámara, M., Fernández-Ruiz, V., ... Tardío, J. (2014). Mediterranean non-cultivated vegetables as dietary sources of compounds with antioxidant and biological activity. *LWT - Food Science and Technology*, *55*, 389–396.
- Morales, R. (2010). *Mentha* L. In S. Castroviejo, C. Aedo, M. Laínz, F. Muñoz Garmendia, G. Nieto Feliner, J. Paiva, & C. Benedí (Eds.), *Flora Ibérica* (pp. 336–347). Madrid: Real Jardín Botánico, CSIC.
- Muley, B., Khadabadi, S., & Banarase, N. (2009). Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *8*, 455–465.
- Nebel, B., Mittelbach, M., & Uray, G. (2008). Determination of the Composition of Acetylglycerol mixtures by H NMR followed by GC investigation determination of the composition of acetylglycerol mixtures by 1 H NMR followed by GC Investigation. *Analytical chemistry*, *80*, 8712–8716.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2000). *Lehninger Principios de Bioquímica*. Ediciones Omega.
- Nora, S., Castro, S., Loureiro, J., Gonçalves, A. C., Oliveira, H., Castro, M., ... Silveira, P. (2013). Flow cytometric and karyological analyses of *Calendula* species from Iberian Peninsula. *Plant Systematics and Evolution*, *299*, 853–864.

- Olennikov, D., & Kashchenko, N. (2013). New Isorhamnetin Glycosides and other Phenolic Compounds from *Calendula officinalis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 49, 717–723.
- Olennikov, D. N., & Kashchenko, N. I. (2014). Calendosides I – IV, new quercetin and isorhamnetin rhamnoglucosides from *Calendula officinalis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 50, 549–553.
- Olennikov, D. N., & Kashchenko, N. I. (2014). Componential profile and amylase inhibiting activity of phenolic compounds from *Calendula officinalis* L. leaves. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–9.
- Ozen, T., Darcan, C., Aktop, O., & Turkecul, I. (2011). Screening of antioxidant, antimicrobial activities and chemical contents of edible mushrooms wildy grown in the black sea region of Turkey. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 14, 72–84.
- Parente, L. M. L., Lino Júnior, R. D. S., Tresvenzol, L. M. F., Vinaud, M. C., De Paula, J. R., & Paulo, N. M. (2012). Wound healing and anti-inflammatory effect in animal models of *Calendula officinalis* L. growing in Brazil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
- 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.
- Pérez-Carreón, J. I., Cruz-Jiménez, G., Licea-Vega, J. a., Arce Popoca, E., Fattel Fazenda, S., & Villa-Treviño, S. (2002). Genotoxic and anti-genotoxic properties of *Calendula officinalis* extracts in rat liver cell cultures treated with diethylnitrosamine. *Toxicology in Vitro*, 16, 253–258.
- Pérez-Gutiérrez, S., Vargas-Solís, R., Zavala, M., Pérez-G., C., & Pérez-G., R. M. (1998). Inhibitory effect of five plant extracts on heart rates of rats. *Phytotherapy Research*, 12, S49–S50.
- Politi, M., Rodrigues, C. L., Gião, M. S., Pintado, M. E., & Castro, P. M. L. (2008). Antioxidant principles and volatile constituents from the North-western Iberian mint “erva-peixeira”, *Mentha cervina*. *Natural Product Communications*, 3, 2065–2068.
- Pommier, P., Gomez, F., Sunyach, M. P., D’Hombres, A., Carrie, C., & Montbarbon, X. (2004). Phase III randomized trial of *Calendula Officinalis* compared with trolamine for the prevention of acute dermatitis during irradiation for breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 22, 1447–1453.
- Póvoa, O., Ribeiro, G., Rodrigues, L., Lobato, P., Monteiro, P., & Monteiro, A. (2009). Effect of storage time on physico-chemical characteristics of *Mentha pulegium* L. and *Mentha cervina* L. «Piso», a traditional food sauce. *Acta Hort.*, 806, 193–200.

- Preethi, K. C., Kuttan, G., & Kuttan, R. (2006). Antioxidant potential of an extract of *Calendula officinalis*. Flowers *in vitro* . and *in vivo* . *Pharmaceutical Biology*, *44*, 691–697.
- Preethi, K. C., & Kuttan, R. (2008). Effect of *Calendula officinalis* flower extract on acute phase proteins, antioxidant defense mechanism and granuloma formation during thermal burns. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, *43*, 58–64.
- Puttaraju, N. G., Venkateshaiah, S. U., Mallaiah, S., Mysore, S., Urs, N., & Somasundaram, R. (2006). Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 9764–9772.
- Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K., & Kumar, M. N. V. R. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, *113*, 189–207.
- Ray, D., Mukherjee, S., Falchi, M., Bertelli, A., & Das, D. (2010). Amelioration of Myocardial Ischemic Reperfusion Injury with *Calendula Officinalis*. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *11*, 849–854.
- Reza Farahpour, M. (2014). Antioxidant activity , Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Pot marigold hydroalcoholic extract on experimental animals. *International Journal of PharmTech Research*, *6*, 1640–1646.
- Rodrigues, L., Duarte, A., Figueiredo, A. C., Brito, L., Teixeira, G., Moldão, M., & Monteiro, A. (2012). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils from the medicinal plant *Mentha cervina* L. grown in Portugal. *Medicinal Chemistry Research*, *21*, 3485–3490.
- Rodrigues, L., Duarte, A., Monteiro, A., Brito, L., Figueiredo, A., & Póvoa, O. (2010). Antibacterial and antifungal activity of *Mentha cervina* essential oils and their main components. *Planta Medica*, *76*, 452.
- Rodrigues, L., Monteiro, P., Póvoa, O., Teixeira, G., Moldão, M., Figueiredo, A., & Monteiro, A. (2008). Chemodiversity studies on *Mentha cervina* L. populations from Portugal. *Planta Medica*, *74*, PI41.
- Rösecke, J., & König, W. A. (2000). Constituents of the fungi *Daedalea quercina* and *Daedaleopsis confragosa* var. tricolor. *Phytochemistry*, *54*, 757–762.
- Ruan, M., Li, Y., Li, X., Luo, J., & Kong, L. (2012). Qualitative and quantitative analysis of the major constituents in Chinese medicinal preparation Guan-Xin-Ning injection by HPLC-DAD-ESI-MS n. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *59*, 184–189.
- Rusu, M. a., Tamas, M., Puica, C., Roman, I., & Sabadas, M. (2005). The hepatoprotective action of ten herbal extracts in CCl₄ intoxicated liver. *Phytotherapy Research*, *19*, 744–749.

- Silva, V., Póvoa, O., & Espírito-Santo, M. (2010). *Mentha cervina* communities in Portugal. *Lazaroa*, 30, 73–79.
- Sustere, Z., Kampare, R., Liepins, E., & Kampars, V. (2014). The composition of commercial acetylated glycerol samples determined by ¹³C and ¹H NMR. The comparison with gas chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*, 69, 763–768.
- Tanideh, N., & Tavakoli, P. (2013). Healing acceleration in hamsters of oral mucositis induced by 5-fluorouracil with topical *Calendula officinalis*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 115, 332–338.
- The Encyclopedia of Life. (2003a). Información taxonómica sobre *Calendula officinalis* - Clasificaciones biológicas y nombres. Consultado 17 de Febrero, 2015, en <http://eol.org/pages/467729/names>
- The Encyclopedia of Life. (2003b). Información taxonómica sobre *Mentha Cervina* - Clasificaciones biológicas y nombres. Consultado 17 de Febrero, 2015, en http://eol.org/pages/5362905/hierarchy_entries/57257791/names
- The Encyclopedia of Life. (2003c). Parasol Mushroom (*Macrolepiota procera*) - Information on Parasol Mushroom. Consultado 17 de Febrero, 2015, en <http://eol.org/pages/2870280/overview>
- The Plant List. (2010). *Mentha cervina* L. Consultado February 17, 2015, en <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-124554>
- Ukiya, M., Akihisa, T., Yasukawa, K., Tokuda, H., Suzuki, T., & Kimura, Y. (2006). Anti-inflammatory, anti-tumor-promoting, and cytotoxic activities of constituents of marigold (*Calendula officinalis*) flowers. *Journal of Natural Products*, 69, 1692–1696.
- Ul'chenko, N. T., & Glushenkova, A. I. (1998). Lipids of *Calendula officinalis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 34, 272–274.
- Valentão, P., Andrade, P. B., Rangel, J., Ribeiro, B., Silva, B. M., Baptista, P., & Seabra, R. M. (2005). Effect of the conservation procedure on the contents of phenolic compounds and organic acids in chanterelle (*Cantharellus cibarius*) mushroom. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4925–4931.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44–84.
- Varljen, J., Lipták, A., & Wagner, H. (1989). Structural analysis of a rhamnoarabinogalactan and arabinogalactans with immuno-stimulating activity from *Calendula officinalis*. *Phytochemistry*, 28, 2379–2383.
- Vetter, J. (2000). Trypsin inhibitor activity of basidiomycetous mushrooms. *European Food Research and Technology*, 211, 346–348.

- Wade, L. G. J. (2013). *Organic Chemistry* (8^a ed.). Pearson.
- Wagner, H., Proksch, A., Riess-Maurer, I., Vollmar, A., Odenthal, S., Stuppner, H., ... Heur, Y. H. (1984). Immunostimulant action of polysaccharides (heteroglycans) from higher plants. *Arzneimittel-Forschung*, *34*, 659–661.
- WHO. (2002). Flos calendulae. In *WHO monographs on selected medicinal plants. Volumen 2* (pp. 35–44). Ginebra.
- WHO. (2010). *WHO monographs on medicinal plants commonly used in the Newly Independent States (NIS)*.
- WHO. (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023.
- WHO. (2015). Cáncer. Consultado 26 de Febrero, 2015, en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Witkowska, A. M., Zujko, M. E., & Mirończuk-Chodakowska, I. (2011). Comparative study of wild edible mushrooms as sources of antioxidants. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, *13*, 335–341.
- Yoshikawa, M., Murakami, T., Kishi, A., Kageura, T., & Matsuda, H. (2001). Medicinal flowers. III. Marigold. (1): hypoglycemic, gastric emptying inhibitory, and gastroprotective principles and new oleanane-type triterpene oligoglycosides, calendasaponins A, B, C, and D, from Egyptian *Calendula officinalis*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, *49*, 863–70.
- Yuan, J. P., Zhao, S. Y., Wang, J. H., Kuang, H. C., & Liu, X. (2008). Distribution of nucleosides and nucleobases in edible fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 809–815.
- Yue, J. M., Chen, S. N., Lin, Z. W., & Sun, H. D. (2001). Sterols from the fungus *Lactarium volemus*. *Phytochemistry*, *56*, 801–806.
- Zitterl-Eglseer, K., Sosa, S., Jurenitsch, J., Schubert-Zsilavec, M., Della Loggia, R., Tubaro, A., ... Franz, C. (1997). Anti-oedematous activities of the main triterpendiol esters of marigold (*Calendula officinalis* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, *57*, 139–44.