

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Analítica

"Profesor Fermín Capitán García"



TESIS DOCTORAL

ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE EXTRACTOS DE *Phlebodium decumanum*

Presentada por: **Laura Martín Pozo**

Para optar al grado de: **Doctor Internacional**
por la **Universidad de Granada**

Programa de Doctorado en Farmacia

Granada, 2020

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Martín Pozo, Laura
ISBN: 978-84-1306-638-7
URI: <http://hdl.handle.net/10481/63915>

**ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN Y
ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE EXTRACTOS DE
*Phlebodium decumanum***

Por

Laura Martín Pozo

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

"Profesor Fermín Capitán García"

**UNIVERSIDAD DE
GRANADA**

MEMORIA presentada para
aspirar al Grado de Doctor en
Farmacia por la Universidad de
Granada

Fdo. Dr. José Luis Vílchez Quero
Catedrático del Departamento de
Química Analítica de la Universidad
de Granada

VISADA en Granada a 10
de diciembre de 2019

Fdo. Dr. Alberto Zafra Gómez
Catedrático del Departamento de
Química Analítica de la Universidad
de Granada

Laura Martín Pozo
Graduada en Bioquímica

ÍNDICE

RESUMEN/SUMMARY	
ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	1
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	15
OBJETIVOS DE LA TESIS	19
INTRODUCCIÓN	23
1. PLANTAS MEDICINALES, ALIMENTACIÓN FUNCIONAL Y NUTRACÉUTICOS	26
1.1. <i>Alimentos funcionales</i>	26
1.2. <i>Nutracéuticos</i>	28
1.3. <i>Propiedades terapéuticas de P.decumanum</i>	29
2. EXTRACTOS VEGETALES COMO FUENTE DE COMPUESTOS BIOACTIVOS	31
2.1. <i>Calaguala en el pasado</i>	34
2.2. <i>Calaguala en el presente</i>	36
2.3. <i>Propiedades terapéuticas de P. decumanum</i>	37
3. FITOQUÍMICOS COMO COMPUESTOS BIOACTIVOS	41
4. DETERMINACIÓN DE FITOQUÍMICOS Y COMPUESTOS BIOACTIVOS EN MATRICES VEGETALES	43
4.1. <i>Métodos para la extracción, aislamiento y purificación de los compuestos fenólicos</i>	43
4.1.1. <i>Extracción sólido-líquido (SLE)</i>	44
4.1.2. <i>Extracción asistida por ultrasonido (UAE)</i>	44
4.1.3. <i>Extracción asistida por microondas(MAE)</i>	45

4.1.4.	<i>Extracción sólido-líquido (SLE)</i>	47
4.1.5.	<i>Extracción acelerada con disolventes (ASE)</i>	48
4.2.	<i>Técnicas analíticas para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos</i>	49
4.2.1.	<i>Técnicas separativas para el análisis de compuestos fenólicos</i>	50
A.	<i>Cromatografía de gases (GC). Fundamento</i> ...	50
B.	<i>Cromatografía de líquidos (LC). Fundamento</i>	51
4.2.2.	<i>Sistemas de detección</i>	53
A.	<i>Espectroscopía de absorción UV-Vis (DAD)</i>	53
B.	<i>Espectroscopía de fluorescencia (FLD)</i>	53
C.	<i>Espectrometría de masas</i>	53
5.	TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR EN LA EVALUACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS	55
5.1.	<i>Citometría de flujo</i>	55
5.1.1.	<i>Fundamento</i>	55
5.1.2.	<i>Aplicaciones</i>	59
A.	<i>Caracterización de poblaciones y subpoblaciones celulares</i>	59
B.	<i>Seguimiento de la proliferación celular</i>	60
C.	<i>Tinción de citocinas intracelulares</i>	61
5.2.	<i>Técnicas para la medida de la viabilidad celular</i>	62
5.2.1.	<i>Ensayo Cell Counting Kit-8 (CCK-8)</i>	63
5.2.2.	<i>Determinación de la IC₅₀</i>	64

6. REFERENCIAS	66
CAPÍTULO I: ESTABLECIMIENTO DEL PERFIL CROMATOGRÁFICO, HUELLA DACTILAR, DE <i>PHLEBODIUM DECUMANUM</i> MEDIANTE HPLC-UV-Vis (DAD).. 75	
1. INTRODUCCIÓN	77
2. OBJETIVO	80
3. MATERIALES Y MÉTODOS	81
3.1. <i>Reactivos y disolventes</i>	81
3.2. <i>Material de laboratorio</i>	81
3.3. <i>Instrumentación y software</i>	82
3.4. <i>Preparación y análisis del extracto</i>	85
3.4.1. <i>Proceso de extracción</i>	85
3.4.2. <i>Preparación de la muestra</i>	86
3.4.3. <i>Análisis mediante HPLC-UV-Vis (DAD)</i>	86
3.4.4. <i>Análisis mediante UHPCL-PDA</i>	87
3.5. <i>Evaluación de la estabilidad</i>	87
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	88
4.1. <i>Método cromatográfico. Optimización de parámetros cromatográficos</i>	88
4.1.1. <i>Composición de la fase móvil</i>	88
4.1.2. <i>Optimización del gradiente y del flujo</i>	90
4.1.3. <i>Selección de la fase estacionaria</i>	93
4.1.4. <i>Optimización de la longitud de onda</i>	96
4.1.5. <i>Influencia de la temperatura</i>	98

4.1.6. Optimización del volumen de inyección	99
4.2. Perfil cromatográfico (huella dactilar) de <i>Phlebodium decumanum</i> . Resumen de condiciones óptimas.....	101
4.3. Adaptación del método para UHPLC.....	101
4.4. Perfil cromatográfico (huella dactilar) de <i>Phlebodium decumanum</i> mediante UHPLC-PDA (DAD).....	102
4.5. Estudio de la estabilidad del extracto en función de las condiciones de almacenamiento.....	103
5. CONCLUSIONES	106
6. REFERENCIAS	107
CAPÍTULO II: IDENTIFICACIÓN DE FITOCOMPUESTOS PRESENTES EN EL EXTRACTO DE <i>PHLEBODIUM DECUMANUM</i>	109
1. INTRODUCCIÓN	111
2. OBJETIVO	119
3. MATERIALES Y MÉTODOS	114
3.1. Reactivos y disolventes	114
3.2. Material de laboratorio	114
3.3. Instrumentación y software.....	115
3.4. Preparación y análisis del extracto.....	116
3.4.1. Proceso de extracción y preparación de la muestra de extracto.....	116
3.4.2. Análisis mediante HPLC-ESI-TOF-MS.....	116
3.5. Procesamiento de los datos y asignación de los metabolitos	117
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	118

4.1. Identificación de los compuestos.....	118
4.1.1. Ácidos orgánicosl.....	131
4.1.2. Amino-azúcares y derivados	133
4.1.3. Ácidos fenólicos y derivados.....	134
A. Derivados del ácido hidroxibenzoico.....	134
B. Derivados del ácido hidroxicinámico	135
4.1.4. Flavonoides y derivados	140
4.1.5. Lignanos y derivados	140
4.1.6. Otros compuestos.....	141
5. CONCLUSIONES	142
6. REFERENCIAS	143
CAPÍTULO III: IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE DOS ESTEROIDES ANDROGÉNICOS, ANDROSTENEDIONA Y ANDROSTADIENEDIONA, EN PHLEBOSIUM DECUMANUM Y ALIMENTOS MEDIANTE GC-MS/MS	149
1. INTRODUCCIÓN	151
2. OBJETIVOS	155
3. MATERIALES Y MÉTODOS	156
3.1. Reactivos y disolventes.....	156
3.2. Instrumentación y software.....	156
3.3. Preparación y análisis de las muestras	159
3.3.1. Muestras	159
3.3.2. Tratamiento. Extracción asistida por ultrasonidos (UAE)	160

A. <i>Extracto y cápsulas</i>	160
B. <i>Alimentos</i>	160
C. <i>Derivatización de esteroides</i>	161
3.4. <i>Preparación del calibrado y muestras dopadas</i>	162
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	163
4.1. <i>Optimización del análisis mediante GC-MS/MS</i>	163
4.1.1. <i>Optimización de las condiciones cromatográficas</i> 163	
4.1.2. <i>Optimización de los parámetros MS/MS</i>	164
4.2. <i>Análisis cuantitativo MRM</i>	166
4.3. <i>Parámetros analíticos y validación</i>	167
4.3.1. <i>Rango dinámico lineal y linealidad</i>	168
4.3.2. <i>Sensibilidad – Límites de detección y cuantificación</i>	168
4.3.3. <i>Exactitud: precisión y veracidad</i>	168
4.3.4. <i>Selectividad</i>	169
4.4. <i>Determinación de 4-androsteno-3,17-diona y 1,4- androstadieno-3,17-diona en P. decumanum</i>	170
4.5. <i>Determinación de 4-androsteno-3,17-diona y 1,4- androstadieno-3,17-diona en muestras de alimentos</i>	173
5. CONCLUSIONES	175
6. REFERENCIAS	177
CHAPTER IV: POTENTIALLY IMMUNOMODULATORY EFFECT OF PHLEBODIUM DECUMANUM IN T CELLS AND MONOCYTES DERIVED FROM BONE MARROW	181

1. INTRODUCTION	183
2. OBJECTIVES	187
3. MATERIALS AND METHODS	188
3.1. <i>Reagents</i>	188
3.2. <i>Mice</i>	189
3.3. <i>Preparation of naïve and Th1 T cells</i>	189
3.4. <i>T cell proliferation assay anti-CD3ε</i>	190
3.5. <i>Preparation of bone marrow derived dendritic cells (BMDCs)</i>	191
3.6. <i>OT-II T cell proliferation assays DCs co-culture</i>	192
3.7. <i>Intracellular staining</i>	193
3.8. <i>Bone marrow monocyte isolation and M1 differentiation</i> ..	193
3.9. <i>RNA extraction and Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)</i>	194
3.10. <i>Flow cytometry and cell sorting</i>	195
3.11. <i>Statistical analysis</i>	195
4. RESULTS AND DISCUSSION	196
4.1. <i>EXPLY-37® modulates differentiation of CD4+ T cells to Th1 decreasing IFN-γ production</i>	196
4.2. <i>EXPLY-37® inhibits T cell proliferation after in vitro anti-CD3ε stimulation</i>	200
4.3. <i>OT-II CD4+ T cell proliferation is suppressed by EXPLY-37® after specific Ag-presentation response</i>	201

4.4. <i>EXPLY-37® modulates the differentiation of BM monocytes toward M1 proinflammatory macrophage phenotype by decreasing iNOS expression</i>	205
5. CONCLUSIONS	207
6. REFERENCES	209
CAPÍTULO V: EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIPROLIFERATIVO POTENCIAL DEL EXTRACTO DE <i>PHLEBODIUM DECUMANUM</i> SOBRE CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS AISLADAS DE DISTINTAS LÍNEAS CELULARES	213
1. INTRODUCCIÓN	215
2. OBJETIVO	217
3. MATERIALES Y MÉTODOS	218
3.1. <i>Reactivos y disolventes</i>	218
3.2. <i>Instrumentación y software</i>	218
3.3. <i>Preparación y análisis del extracto</i>	221
3.3.1. <i>Proceso de extracción y preparación de la muestra</i>	221
3.3.2. <i>Aislamiento de los compuestos mediante HPLC semi-preparativa</i>	222
3.3.3. <i>Análisis mediante HPLC-UB-Vis (DAD)</i>	223
3.4. <i>Cultivo celular</i>	223
3.4.1. <i>Líneas celulares</i>	223
3.4.2. <i>Condiciones de cultivo</i>	225
3.4.3. <i>Método de congelación celular</i>	226
3.4.4. <i>Método de descongelación celular</i>	227
3.4.5. <i>Recuento celular</i>	227

3.5.	<i>Tratamiento de las líneas celulares con el extracto de P. decumanum y sus fracciones</i>	228
3.5.1.	<i>Ensayo de formación de esferas secundarias</i>	228
3.5.2.	<i>Citotoxicidad in vitro. Ensayo CCK-8</i>	228
3.5.3.	<i>Determinación de la IC₅₀</i>	230
3.5.4.	<i>Análisis estadísticos</i>	231
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	231
4.1.	<i>Separación y análisis de las fracciones recogidas del extracto de P. decumanum</i>	231
4.2.	<i>Actividad anticancerígena de P. decumanum</i>	233
4.2.1.	<i>Estudio de la citotoxicidad del extracto EXPLY-37® sobre las esferas secundarias de CMCs</i>	233
4.2.2.	<i>Evaluación de la citotoxicidad de las fracciones sobre las CMCs</i>	237
4.2.3.	<i>Fitocompuestos con actividad biológica presentes en P. decumanum</i>	239
	A. <i>Quercetina</i>	240
	B. <i>Rutina</i>	241
	C. <i>Ácido isoclorogénico A</i>	242
	D. <i>Kaempferol y luteolina</i>	243
4.2.4.	<i>P. decumanum: potencial terapéutico contra el cáncer</i>	244
5.	CONCLUSIONES	246
6.	REFERENCIAS	248

CONCLUSIONES: ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE EXTRACTOS DE <i>PHLEBODIUM DECUMANUM</i>	253
ANEXO I: PUBLICACIÓN.....	259
ANEXO II: OTRAS PUBLICACIONES.....	42

RESUMEN / SUMMARY

RESUMEN

En la presente Tesis Doctoral se reúnen los resultados obtenidos en los estudios de caracterización química y de la actividad biológica del helecho *Phlebodium decumanum*. Se ha evaluado el potencial del extracto hidroetanólico de las hojas de dicha especie como fuente de compuestos químicos bioactivos para su posible uso en el desarrollo de nutraceuticos y en el tratamiento de determinadas enfermedades, como el cáncer. La memoria se ha estructurado en tres secciones principales: introducción, parte experimental y conclusiones. La parte experimental se divide en cinco capítulos, cada uno de ellos centrados en uno de los objetivos propuestos al inicio del desarrollo de la Tesis.

En la **introducción** se describen, en primer lugar, las principales características de los alimentos funcionales, los nutraceuticos y las plantas medicinales. En este contexto, se detallan las características de la especie de *Phlebodium decumanum* como matriz vegetal objeto de estudio, su uso tradicional como planta medicinal, su uso en la actualidad así como sus propiedades terapéuticas. A continuación se describen los fitoquímicos como importante fuente de compuestos bioactivos y las diferentes etapas del procedimiento analítico para su determinación. Se recogen los diferentes métodos de extracción de compuestos fenólicos a partir de plantas y extractos vegetales, así como las principales técnicas analíticas utilizadas para su detección y cuantificación. Por último, se describen las técnicas de biología molecular utilizadas en la determinación de la actividad biológica utilizadas a lo largo del desarrollo de esta investigación. En éstas se incluyen la citometría de flujo y los ensayos de viabilidad celular.

La **parte experimental** se divide en cinco capítulos, cada uno de ellos estructurado en siete secciones: breve introducción, objetivos, materiales y métodos, resultados y discusión, conclusiones y, finalmente, bibliografía.

En el **primer capítulo** se aborda el desarrollo de un método cromatográfico mediante HPLC-UV Vis (DAD) para el establecimiento del perfil químico representativo de *P. decumanum*, y la optimización de todas las variables que influyen en la separación cromatográfica (fase móvil, fase estacionaria, volumen de inyección, gradientes, temperatura). Se incluye su adaptación a UHPLC-PDA (DAD), además de un estudio de estabilidad del extracto a lo largo del tiempo bajo diferentes temperaturas.

El **segundo capítulo** recoge la caracterización de la mayor parte de los componentes químicos presentes en el extracto de *P. decumanum*. El análisis se ha llevado a cabo mediante HPLC-ESI-TOF-MS en las instalaciones del Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada (UGR) empleando el método cromatográfico desarrollado en previamente en el capítulo anterior. La información del espectrómetro de masas aportada junto con la información de la bibliografía permitió identificar la gran mayoría de los compuestos presentes en el extracto del helecho. En resultados, se describen todos los compuestos tentativamente identificados agrupados por familias.

El **tercer capítulo** se centra en la identificación y determinación de dos esteroides de especial interés, con actividad androgénica y prohibidos por la World Anti-Doping Agency (WADA) mediante GC-MS/MS. Se detalla el procedimiento analítico, tratamiento de la muestra, y el desarrollo del método cromatográfico. Los análisis se realizaron en el CIC de la UGR y en colaboración con el laboratorio europeo de referencia para el análisis de

pesticidas en frutas y verduras (EURL-FV) de la Universidad de Almería (UAL).

El **cuarto capítulo**, se ha realizado durante mi estancia en la Universidad de Tufts, Boston, MA. En él se estudia el potencial efecto inmunomodulador de *P. decumanum* en cultivos primarios de células inmunes. Se detalla el procedimiento metodológico de aislamiento de linfocitos T y de monocitos seguido, a partir del bazo y médula ósea de ratones, respectivamente, los ensayos realizados y los análisis obtenidos mediante citometría de flujo.

Finalmente, en el **quinto capítulo** se evalúa el potencial efecto antitumoral de *P. decumanum in vitro* sobre la población de células madre tumorales de diversas líneas de cáncer. Estos ensayos se han desarrollado en colaboración con el Dr. Marchal en las instalaciones de la Facultad de Medicina de la UGR. Igualmente, se describe la metodología utilizada para el aislamiento de las células madre, la formación de tumoresferas y los ensayos de viabilidad celular realizados.

Los resultados obtenidos en el capítulo I y II han permitido la publicación de un trabajo científico que se encuentra en la revista científica internacional "*Analytical Letters*":

Martín-Pozo, L., Zafra-Gómez, A., Cantarero-Malagón, S., y Vílchez, J.L. (2019). Analysis of *Phlebodium decumanum* fronds by High-Performance Liquid Chromatography by Ultraviolet-Visible and Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry (HPLC-UV-VIS-QTOF-MS/MS). *Analytical Letters* 52(13), 2107-2032. Doi: 10.1080/00032719.2019.1594866

El resto de investigaciones, se encuentran en fase de escritura para su próxima publicación.

Por otro lado, estas investigaciones han sido presentadas en varios congresos y / o reuniones científicas:

- Martín-Pozo, L., Zafra-Gómez, A., y Vílchez, J.V. “Perfil químico del extracto hidroetanólico del *Phlebodium decumanum*”. Presentado en la “XVI reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica (GRASEQA)”. Celebrada en el Palacio de Congresos, Granada, del 2 al 4 de octubre de 2018. **Póster.**
- Martín-Pozo, L., Zafra-Gómez, A., Cuadros-Ojeda, M.A., y Vílchez, J.L. “Caracterización de la Composición Química y de la Actividad Biológica del extracto de *Phlebodium decumanum*”. Presentado en las “III Jornadas / Primer Congreso Nacional de Investigadores en Formación: Fomentando la Interdisciplinariedad (JIFFI)”. Celebrado en la Antigua Facultad de Medicina, Granada, del 20 al 22 de junio del 2018. **Comunicación oral.**
- Martín-Pozo, L., Zafra-Gómez, A., y Vílchez, J.V. “Chemical Characterization of *Phlebodium decumanum* by using High-Performance Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry time of Flight Analyzer”, referencia: O-YS-06. Presentado en la “XVII Reunión Científica de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines (SECyTA 2017). Celebrado en Barcelona, España, del 3 al 5 de octubre de 2017. **Comunicación oral.**

- Martín-Pozo, L., Zafra-Gómez, A., y Vílchez, J.V. “Phlebodium decumanum: Chromatographic Characterization of a Natural Extract”, referencia: O-NP-2. Presentado en la XVI Reunión Científica de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines (SECyTA 2016). Celebrada en Sevilla, España, del 2 al 4 de noviembre de 2016. **Comunicación oral.**

- Martín-Pozo, L., Zafra-Gómez, A., y Vílchez, J.V. “Caracterización Cromatográfica de un Extracto: *Phlebodium decumanum*”. Presentado en el “I Congreso de Jóvenes Químicos y Bioquímicos Terapéuticos (QuimBioQuim)”. Celebrado en Granada, España, del 3 al 4 de octubre de 2016. **Comunicación oral.**

- Martín-Pozo, L., Zafra-Gómez, A., y Vílchez, J.V. “*Phlebodium decumanum*: caracterización cromatográfica de un extracto”. Presentado en las “I Jornadas de Investigadores en Formación: Fomentando la Interdisciplinariedad (JIFFI)”. Celebradas en la Facultad Medicina, Granada, España, del 18 al 20 de mayo de 2016. **Póster.**

SUMMARY

This Doctoral Thesis includes all the results obtained in the studies of chemical characterization and biological activity of *P. decumanum*. The potential of the leaves as a source of bioactive chemical compounds have been evaluated since they may be use in the development of nutraceuticals and in the improving of some diseases, including cancer.

The manuscript has been structured in three main sections: introduction, experimental part, and conclusions. The experimental part is divided into five chapters, each of them focused on one of the objectives proposed at the initial research plan of the Thesis.

First, **introduction** describes the main characteristics of characteristics of functional foods, nutraceuticals and medicinal plants. In this context, the characteristics of the *Phlebodium decumanum* species as a studied plant matrix, its traditional use as a medicinal herb, its use today as well as its therapeutic properties are detailed. Phytochemicals as an important source of bioactive compounds and the different stages of the analytical procedure for their determination are described below. The different methods of extraction of phenolic compounds from plant and vegetal extracts are collected, as well as the main analytical techniques used for their detection and quantification. Finally, the molecular biology techniques used in the determination of the biological activity used throughout the development of this research are explained. These include flow cytometry and cell viability assays.

The experimental part is divided into five chapters, each one structured into seven sections: brief introduction, objectives, materials and methods, results and discussion, conclusions and, finally, bibliography.

The **first chapter** deals with the development of a chromatographic method using HPLC-UV Vis (DAD) for the establishment of the representative chemical profile of *P. decumanum*, and the optimization of all the variables that influence the chromatographic separation (mobile phase, stationary phase, injection volume, gradients, temperature). Its adaptation to UHPLC-PDA (DAD) is included, in addition to a study of stability of the extract over time at different temperatures.

The **second chapter** includes a characterization of the large part of the components present in *P. decumanum*. The analysis has been carried out by HPLC-ESI-TOF-MS in the facilities of the Center for Scientific Instrumentation (CIC) of the University of Granada (UGR) using the chromatographic method previously developed in the previous chapter. The MS information provided together with the information reported in bibliography allowed to identify the vast majority of phytocomponents present in the fern. In results, all tentatively identified compounds grouped by families are described.

The **third chapter** focuses on the identification and determination of two sterols of special interest, with androgenic activity and prohibited by the World Anti-Doping Agency (WADA) through GC-MS/MS. The analytical procedure, sample treatment, and the development of the chromatographic method are detailed. These analyzes were carried out at the CIC of the UGR and in collaboration with the European reference

laboratory for the analysis of pesticides in fruits and vegetables (EURL-FV) of the University of Almeria (UAL).

The potential immunomodulatory effect of *P. decumanum* on primary cultures of immune cells is studied in the **fourth chapter**, conducted during my stay at Tufts University, Boston MA. The methodological procedure for isolation of T lymphocytes and monocytes from the spleen and bone marrow of mice, respectively, the *in vitro* assays performed and the analyzes obtained by flow cytometry are detailed.

Finally, in the **fifth chapter**, the potential antitumor effect of *P. decumanum in vitro* on the tumor stem cell population of various cancer lines is evaluated. These assays have been developed recently, in collaboration with Dr. Marchal in the facilities of the Faculty of Medicine of the University of Granada. Likewise, the methodology used for the isolation of the stem cells, the formation of tumorspheres and the viability assays performed are described.

Additionally, the results obtained in chapter I and II have allowed the development of a scientific work that is published in the journal "Analytical Letters":

Martín-Pozo, L., Zafra-Gómez, A., Cantarero-Malagón, S., y Vílchez, J.L. (2019). Analysis of *Phlebodium decumanum* fronds by High-Performance Liquid Chromatography by Ultraviolet-Visible and Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry (HPLC-UV-VIS-QTOF-MS/MS). *Analytical Letters* 52(13), 2107-2032. Doi: 10.1080/00032719.2019.1594866

The rest of research carried out during the development of the Thesis is being now prepared for publication.

As well it has been presented at the following congresses and / or scientific meetings:

- Martín-Pozo, L., Zafra-Gómez, A., y Vílchez, J.V. “Perfil químico del extracto hidroetanólico del *Phlebodium decumanum*”. Presented in the “XVI reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica (GRASEQA)”. Celebrated at the Congress Palace, Granada, from October 2 to 4, 2018. **Poster.**
- Martín-Pozo, L., Zafra-Gómez, A., Cuadros-Ojeda, M.A., y Vílchez, J.L. “Caracterización de la Composición Química y de la Actividad Biológica del extracto de *Phlebodium decumanum*”. Presented in the “III Jornadas / Primer Congreso Nacional de Investigadores en Formación: Fomentando la Interdisciplinariedad (JIFFI)”. Celebrated at the Old Faculty of Medicine, Granada, from June 20 to 22, 2018. **Oral communication.**
- Martín-Pozo, L., Zafra-Gómez, A., y Vílchez, J.V. “Chemical Characterization of *Phlebodium decumanum* by using High-Performance Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry time of Flight Analyzer”, reference: O-YS-06. Presented in the “XVII Reunión Científica de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines (SECyTA 2017). Celebrated at Barcelona, Spain, from October 3 to 5, 2017. **Oral communication.**
- Martín-Pozo, L., Zafra-Gómez, A., y Vílchez, J.V. “*Phlebodium decumanum*: Chromatographic Characterization on a Natural

Extract”, referencia: O-NP-2. Presented in the “XVI Reunión Científica de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines (SECyTA 2016)”. Celebrated at Sevilla, Spain, from November 2 to 4, 2016. **Oral communication.**

— Martín-Pozo, L., Zafra-Gómez, A., y Vílchez, J.V. “Caracterización Cromatográfica de un Extracto: *Phlebodium decumanum*”. Presented in the “I Congreso de Jóvenes Químicos y Bioquímicos Terapéuticos (QuimBioQuim)”. Celebrated at Granada, Spain, from October 3 to 4, 2016. **Oral communication.**

— Martín-Pozo, L., Zafra-Gómez, A., y Vílchez, J.V. “*Phlebodium decumanum*: caracterización cromatográfica de un extracto”. Presented in the “I Jornadas de Investigadores en Formación: Fomentando la Interdisciplinariedad (JIFFI)”. Celebrated at the Faculty of Medicine, Granada, Spain, from May 18 to 20, 2016. **Poster.**

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

ADD	1,4-androstadieno-3,17-diona
AED	4-androsteno-3,17-diona
APC	Antigen-presenting cell (célula presentadora de antígenos)
ASE	Accelerated Solvent Extraction
BMDC	Bone marrow derived dendritic cell (célula dendrítica derivada de la médula ósea marrón)
BMDM	Bone marrow derived monocyte (monocito derivado de la médula ósea marrón)
CCK-8	Cell Counting Kit-8
CD	Clusters of Differentiation
CFDA-SE	CarboxyFluorescein Diacetate Succinimidyl Ester
CFSE	CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester
CMC	Célula madre cancerígena
COX	Cyclooxygenase
DAD	Dyode-array detector
DC	Dendritic Cell (célula dendrítica)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium®
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTE	Dithioerythitol
EC	Energía de Colisión
EI	Electron ionization
ESI	Electrospray Ionization
EXPLY-37®	Extracto de <i>Phlebodium decumanum</i> del Lago Yojoa

FBS	Fetal bobine serum (suero bovino fetal)
FID	Flame ionization detector
FLD	Fluorescence detector
FS	Forward Scatter
GC	Gas chromatography (cromatografía de gases)
GLC	Gas Liquid Chromatography
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos)
GSC	Gas Solid Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (cromatografía de líquidos de alta presión)
IC₅₀	Inhibitory concentration of 50% (concentración inhibitoria del 50% de la viabilidad).
IFN-γ	Interferón gamma
IL	Interleuquina
iNOS	Inducible Oxid Nitric Synthase (óxido nítrico sintasa inducible)
LC	Liquid Chromatography (cromatografía de líquidos)
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
LPS	Lipopolidacárido
MAE	Microwave-Assisted Extraction
MeOH	Metanol
MHC	Major Histocompatibility Complex (complejo mayor de histocompatibilidad)

MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Mass Spectrometry (espectrometría de masas)
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry (espectrometría de masas en tándem)
MSTFA	N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NO	Nitric Oxide (óxido nítrico)
OH	Grupo hidroxilo
PBS	Phosphate Buffered Saline (tampón fosfato salino)
PCR	Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
PDA	Photometric Diode Array
Q-TOF	Quadrupole Time Of Flight
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RSD	Relative Standard Deviation
SFE	Supercritical Fluid Extraction
SIM	Selected Ion Monitoring
SLE	Solid Liquid Extraction
SQDG	Sulfoquinovosil diacilglicerol 1,2-di-O-palmitol-3-O (6-sulfo- α-D-

	quinovopiranosil)-glicerol
SS	Side Scatter
sTNFR2	Receptor 2 del factor de necrosis tumoral
Tc	Cytotoxic T Cell (célula T citotóxica)
TCR	T cell receptor (receptor de las células T)
Th	Helper T Cell (célula T colaboradora)
TMIS	Trimethyliodosilane
TNF-α	Tumor Necrosis Factor Alpha (factor de necrosis tumoral Alpha)
Treg	Regulatory T Cell
UAE	Ultrasound-Assisted Extraction
UHPLC	Ultra-High Performance Liquid Chromatography
UV-vis	Ultravioleta-visible
WST-8	(2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt)
WT	Wild-Type (tipo natural o silvestre)
XTT	2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Reproducción fotográfica de una de las páginas del manuscrito chino "Pen T'Sao" sobre raíces y pastos (Obra de Domino público) **29**
- Figura 2.** Correlación entre alimentos funcionales, plantas medicinales y nutraceuticos y sus roles para la mejora de la salud **31**
- Figura 3.** A: Detalle de los Soros de las hojas de *P. decumanum*; B: Fronde de *P. decumanum*; C: Hábitat de *P. decumanum* **33**
- Figura 4.** A: Hipólito Ruiz López. B: Ilustración de la calaguala que aparece en el libro "Memoria sobre la legítima calaguala y otras raíces que con el mismo nombre nos vienen de América meridional", de Hipólito Ruiz **35**
- Figura 5.** Representación esquemática de un equipo de extracción asistida por ultrasonido (UAE) **45**
- Figura 6.** Representación esquemática de un equipo de extracción asistida por microondas para su uso en laboratorio (MAE) **46**
- Figura 7.** Representación esquemática de un sistema de extracción de fluidos supercríticos **47**
- Figura 8.** Modelo esquemático de un equipo de extracción acelerada con disolventes (ASE) **48**
- Figura 9.** Diagrama esquemático de los métodos para el análisis de compuestos extraídos de plantas **49**
- Figura 10.** Esquema típico de un cromatógrafo de gases **50**
- Figura 11.** Esquema de un cromatógrafo de líquidos **52**
- Figura 12.** Esquema general de un espectrómetro de masas **54**
- Figura 13.** Componentes principales de un citómetro **56**

Figura 14. <i>Dispersión de la luz cuando el láser de luz incide sobre la célula</i>	57
Figura 15. <i>Representaciones de los datos de citometría de flujo. Ejemplos</i>	58
Figura 16. <i>Representación de los fenómenos moleculares que tienen lugar en el marcaje de células con CFSE</i>	61
Figura 17. <i>Mecanismo de detección de la viabilidad celular con CCK8</i>	64
Figura 18. <i>Ejemplo de curva de dosis-respuesta que muestra el % de inhibición en función de la concentración del fármaco</i>	65
Figura 1.1. <i>Cromatógrafo de líquidos convencional con detector de fotodiodos array, Agilent 1100 Series</i>	83
Figura 1.2. <i>Cromatógrafo de líquidos de ultra resolución acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolo simple (UHPLC-MS (QdA)) empleado para la caracterización del extracto de P. decumanum</i>	84
Figura 1.3. <i>Columna AQCUIITY UPLC HSS T3; 1.8 µm; 10cm empleada en la caracterización del extracto de P. decumanum en UHPL-PDA</i>	84
Figura 1.4. <i>Perfil cromatográfico obtenido con el gradiente inicial (gradiente 01)</i>	90
Figura 1.5. <i>Cromatogramas de los gradientes ensayados</i>	92
Figura 1.6. <i>Columnas ensayadas en la optimización de la fase estacionaria</i>	94
Figura 1.7. <i>Perfiles cromatográficos de las diferentes columnas obtenidos mediante HPLC-DAD a una longitud de onda de 310 nm</i>	95
Figura 1.8. <i>Ensayos a diferentes longitudes de onda</i>	97

- Figura 1.9.** Cromatogramas del perfil del extracto a diferentes temperaturas obtenidos con el gradiente y fase estacionaria óptimos **98**
- Figura 1.10.** Ensayos a diferentes volúmenes de inyección. Se mantuvieron las condiciones óptimas de separación ($\lambda=310$ nm)..... **100**
- Figura 1.11.** Huella dactilar del extracto de *Phlebodium decumanum* en LC-PDA ($\lambda=310$ nm) **101**
- Figura 1.12.** Cromatograma (Huella dactilar) del extracto de *Phlebodium decumanum* obtenido por UHPLC-PDA ($\lambda=310$ nm)..... **103**
- Figura 1.13.** Perfiles químicos del extracto de *Phlebodium decumanum* después de un año conservado a las temperaturas indicadas obtenidos mediante HPLC-DAD ($\lambda=310$ nm) **104**
- Figura 2.1.** Cromatógrafo de líquidos Alliance 2795 acoplado a un espectrómetro de masas con analizador QTOF utilizado para la identificación de los componentes de *P. decumanum*..... **115**
- Figura 2.2.** Cromatograma obtenido en el análisis HPLC-ESI/MS (Q-ToF) de *P. decumanum*. (a) Cromatograma en modo ESI positivo y (b) cromatograma en ESI negativo..... **131**
- Figura 2.3.** Estructuras de algunos de los ácidos orgánicos detectados en frondes de *Phlebodium decumanum* **132**
- Figura 2.4.** Estructuras de algunos de los derivados fitoquímicos caracterizados en el extracto de *Phlebodium decumanum* **136**
- Figura 2.5.** Cromatograma y espectros MS/MS de los isómeros del ácido cafeoilquínico en el extracto hidroalcohólico de *Phlebodium decumanum* **137**
- Figura 3.1.** Estructuras químicas de 4-androstene-3,17-dione (A) y 1,4-androstadiene-3,17-dione (B) **154**

- Figura 3.2.** Cromatógrafo de gases Agilent y espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolo (triple-quad) empleado para la caracterización e identificación de los esteroides en el extracto de *P. decumanum* **157**
- Figura 3.3.** Cromatógrafo de gases Agilent Intuvo 9000 GC provisto de un espectrómetro de masas triple cuadrupolo utilizado para la cuantificación de los esteroides estudiados. Se muestra un detalle del inyector..... **158**
- Figura 3.4.** Espectros de masas de 1,4-androstadiene-3,17-dione (A) y 4-androstene-3,17-dione (B)..... **165**
- Figura 3.5.** Cromatograma GC-MS/MS del patrón de AED y ADD **165**
- Figura 3.6.** Cromatograma GC-MS/MS del análisis MRM de una muestra dopada (25 ng g^{-1}) **170**
- Figura 3.7.** Cromatogramas GC-MS/MS obtenidos en el análisis MRM de la muestra del extracto hidroetanólico de *P. decumanum*..... **171**
- Figure 4.1.** Experimental design for obtaining naïve and Th1 T cells **190**
- Figure 4.2.** Experimental design for proliferation assay of naïve T cells ... **191**
- Figure 4.3.** Experimental design for proliferation assay of OT-II T cells **193**
- Figure 4.4.** Experimental design for BMDMs differentiation towards M1 polarized macrophages **194**
- Figure 4.5.** Naïve CD4+ T cells isolated from the spleen and lymph nodes of C57/BL6 mice were cultured under Th1 cell induction conditions during 5 days, in presence or absence of EXPLY-37® at $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ or $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ at the indicated time course **197**

- Figure 4.6.** EXPLY-37[®] has no significant effect on the number of CD4+ IFN- γ + T cells. (A) Representative blots of the gated CD4+/IFN γ + subsets are shown. (B) Frequency of IFN- γ + population gated on CD4+ T cells**198**
- Figure 4.7.** EXPLY-37[®] decreases the IFN- γ fluorescence intensity per cell in a dependent manner. (A) Representative blots of the median fluorescence intensity (MFI) are shown. (B) Relative per cell IFN- γ MFI.....**199**
- Figure 4.8.** Suppression of T cell proliferation by EXPLY-37[®] in vitro**201**
- Figure 4.9.** Treatment with EXPLY-37[®] suppresses OT-II CD4+ T cell proliferation after specific Ag-presentation response**203**
- Figure 4.10.** Suppression of OT-II CD4+ T cell expansion by EXPLY-37[®] after specific Ag-presentation response is APCs independent**204**
- Figure 4.11.** EXPLY-37[®] decreases LPS-induced iNOS expression toward the M1 proinflammatory phenotype differentiation**206**
- Figura 5.1.** Cromatógrafo de líquidos semipreparativo, con colector de fracciones y detector de fotodiodos array, Agilent 1100 Series (A) y configuración del inyector manual (B)**219**
- Figura 5.2.** Rotavapor (A) y liofilizador (B) empleados para densificar y liofilizar las fracciones obtenidas de la recolección.....**220**
- Figura 5.3.** Perfil HPLC preparativo del extracto crudo de *P. decumanum* a distintas longitudes de onda (257, 250 y 310 nm)**231**
- Figura 5.4.** Perfil cromatográfico de las distintas fracciones de *P. decumanum* obtenidas mediante cromatografía semipreparativa (310 nm)**232**
- Figura 5.5.** Efecto del *P. decumanum* en tumoresferas secundarias derivadas de HCT-116 y NCI-1650 a las 72 h de tratamiento.....**234**

Figura 5.6. *Curvas sigmoideas de dosis-respuesta. Se representan las gráficas de inhibición de la viabilidad celular para las CMCs de las siguientes líneas tumorales: BxPC3, HCT-116, MDA-MB-231, NCI-H1650 y NCI-1975 (A, B, C, D y E) en presencia de P. decumanum..... 235*

Figura 5.7. *Valores IC₅₀ derivados de las gráficas de inhibición de las líneas estudiadas en presencia de P. decumanum tras tratar las CMCs de las esferas de primera generación durante 72h 236*

Figura 5.8. *Efectos de P. decumanum y sus fracciones aisladas sobre la viabilidad celular de esferas de segunda generación de dos líneas cancerígenas de colón y de pulmón, HCT-116 y NCI-H1650, respectivamente 238*

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los fitoquímicos.....	42
Tabla 1.1. Gradiente inicial (gradiente 01)	88
Tabla 1.2. Gradientes ensayados	91
Tabla 1.3. Condiciones del método UHPLC-PDA	102
Tabla 1.4. Gradiente optimizado para UHPLC	102
Tabla 2.1. Compuestos químicos detectados y caracterizados en <i>P. decumanum</i> mediante HPLC-Q-TOF en modos de ionización por electrospray negativa y positiva. Los números de pico fueron asignados de acuerdo con el orden de elución.....	119
Tabla 3.1. Transiciones MRM y energías de colisión	164
Tabla 3.2. Parámetros estadísticos de calibración	167
Tabla 3.3. Exactitud del método. Ensayo de recuperación, precisión y veracidad	169
Tabla 3.4. Aplicación del método a las muestras de <i>P. decumanum</i>.....	171
Tabla 3.5. Concentración de los esteroides en los alimentos	173

OBJETIVOS DE LA TESIS

El objetivo central de esta Tesis Doctoral lo constituye el estudio bioanalítico del extracto hidroalcohólico del *Phlebodium decumanum*, desde su caracterización química hasta el estudio de su actividad biológica global frente a diferentes líneas celulares de interés. Para ello se han propuesto los siguientes **objetivos específicos** contemplados dentro del plan de investigación y que, a su vez, constituyen los cinco capítulos que se desarrollan dentro de esta memoria:

- I. **Establecimiento de un perfil químico “huella dactilar” representativo y reproducible del extracto hidro-etanólico de *P. decumanum* mediante cromatografía de líquidos de altar resolución (HPLC-DAD) y cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución (UHPLC-DAD).** Optimización de aquellas variables que afectan a la resolución y la simetría de los picos cromatográficos (influencia de la fase móvil, el gradiente de elución, las características de la columna y el flujo de la fase móvil). Una vez establecida la huella dactilar característica, se lleva a cabo la evaluación de la estabilidad a largo plazo bajo distintas condiciones de temperatura.
- II. **Caracterización de los compuestos químicos presentes en un extracto hidroetanólico de las hojas de *P. decumanum* mediante HPLC-ESI-MS-TOF.** Interpretación y contraste de los datos de espectrométricos obtenidos, e identificación tentativa de los diferentes componentes fenólicos que pueden ser obtenidos a partir del extracto.
- III. **Estudio de la presencia de dos esteroides, 4-androsteno-3,17-diona (AED) y 1,4-androstadieno-3,17-diona (ADD) en dos complementos nutricionales cuyo principal componente es *P. decumanum* (EXPLY37® y cápsulas EXPLIVAR) y en varias muestras de alimentos**

de consumo habitual: carne de ternera, carne de cerdo y huevos de gallina mediante GC-MS/MS. Desarrollo de un método analítico, que incluye el tratamiento previo de la muestra, la optimización de los parámetros cromatográficos y de masas, su validación y, finalmente, detección y cuantificación de los esteroides estudiados en muestras reales.

- IV. **Estudio del potencial efecto modulador y anti-inflamatorio del extracto hidroalcohólico de *P. decumanum* sobre células del sistema inmune.** Aislamiento de células T CD4+ y monocitos a partir del bazo y médula ósea, respectivamente, de ratones adultos. Evaluación del efecto modulador del extracto en la activación y diferenciación de células T naïve a linfocitos del linaje colaborador tipo 1 (Th1), relacionados con los procesos inflamatorios. Estudio del efecto del extracto, sobre la proliferación de células T activadas con anti-CD3 o en co-cultivo con células dendríticas presentadoras de antígeno. Análisis de la expresión génica en la diferenciación de monocitos a macrófagos proinflamatorios en presencia del extracto.
- V. **Estudio del potencial efecto anticancerígeno del extracto completo de *P. decumanum*, y de diferentes fracciones, sobre células madre cancerígenas aisladas de distintas líneas de cáncer.** Fraccionamiento del extracto hidroetanólico mediante cromatografía de líquidos semi-preparativa, y evaluación del efecto del extracto completo y de las fracciones obtenidas en células madre tumorales. Aislamiento de las células madre a partir de líneas tumorales, formación de tumoresferas, y realización de ensayos de citotoxicidad.

INTRODUCCIÓN

Estudios de caracterización y actividad
biológica de extractos de *Phlebodium*
decumanum

Desde tiempos inmemoriales el hombre ha tratado de mitigar sus dolencias y prolongar su vida, empleando los recursos que le otorgaba la naturaleza. Entre éstos destaca el reino vegetal, las plantas. Fue así como cada región del mundo desarrolló su forma de curar a partir de plantas medicinales que con el tiempo pasó a conformar la llamada medicina tradicional (Gurib-Fakim, 2006; Avello and Cisternas, 2010;).

Aunque la realidad terapéutica hoy día está regida mayoritariamente por la química sintética, tanto la comunidad científica como la industria han desarrollado un especial interés por el empleo de plantas medicinales debido a las propiedades funcionales y nutraceuticas que presentan algunos nutrientes y compuestos naturales, y el alto valor añadido que representa su incorporación a determinados alimentos (Caleja et al., 2017).

En este sentido, el *Phlebodium decumanum* (*P. decumanum*) junto con otros helechos tropicales relacionados, pertenecientes al género *Polypodium*, se han venido utilizando por antiguas civilizaciones en ciertas partes de Centro y Sudamérica como hierbas medicinales, para tratar multitud de condiciones relacionadas con procesos inflamatorios, desórdenes dermatológicos e incluso el cáncer (Ruiz 1805; Liu et al., 1998; Yesares Ferrer et al., 2001; Gattuso, Amalia, and Gattuso 2008; González-Jurado et al., 2008). Hoy día, estas plantas podrían representar una buena alternativa para la prevención de ciertas patologías, para reducir la sintomatología y efectos negativos de determinadas enfermedades, e incluso como ayuda en su tratamiento.

Sin embargo, los estudios científicos sobre su caracterización química y efectos y propiedades biológicas son escasos, especialmente en el caso del *P. decumanum*, lo que hace necesario un estudio más profundo que permita

justificar científicamente su comportamiento. Este vacío científico es el que ha incitado el trabajo desarrollado durante los cuatro años de Tesis Doctoral y que se recoge en los siguientes capítulos.

1. PLANTAS MEDICINALES, ALIMENTACIÓN FUNCIONAL Y NUTRACÉUTICOS

En los últimos años, se ha puesto de manifiesto la importancia de un buen estado nutricional, pues es sinónimo de salud y prevención de enfermedad o disminución del riesgo de enfermar. Esta preocupación en la sociedad ha dado lugar a la aparición de nuevas disciplinas de especial interés, orientadas al estudio de productos naturales con potencial actividad preventiva o terapéutica, los llamados nutraceuticos y alimentos funcionales. A su vez, éstos se relacionan con las plantas medicinales primitivas, en tanto que ambos comparten el poseer principios activos y se les atribuyen efectos beneficiosos para el ser humano. A continuación, se describirán con más detalle.

1.1. Alimentos funcionales

El término "**alimento funcional**" apareció por primera vez en la década de los 80 en Japón en referencia a los productos alimenticios enriquecidos con componentes especiales que tienen efectos fisiológicos beneficiosos (Bibliardi and Galati, 2013). Uno de los principales retos a los que se enfrentan estos nuevos conceptos es la ausencia de una definición universal y única, así como de una normativa legal de los mismos. En la Unión Europea no hay legislación vigente sobre alimentos funcionales. Japón es el único país que los considera como una categoría adecuada (Arai, 1996) y, por lo general, cada país se rige por su propia legislación (Serafini et al., 2011).

Dentro de las diversas definiciones existentes, según el Consejo Internacional de Información sobre Alimentos, es *“todo aquel alimento semejante en apariencia física al alimento convencional, consumido como parte de la dieta diaria, pero capaz de producir demostrados efectos metabólicos o fisiológicos, útiles en el mantenimiento de una buena salud física y mental, en la reducción del riesgo de enfermedades crónico-degenerativas, además de sus funciones nutricionales básicas”* (IFIC, 2006).

Por tanto, un alimento puede clasificarse como *“funcional”* si, más allá de los efectos nutricionales adecuados, demuestra beneficios en una o más funciones diana en el cuerpo humano, relevantes para mejorar la salud y el bienestar y / o reducir el riesgo de enfermedades. Estos alimentos pueden ser naturales o sin modificar (también llamados alimentos saludables), o alimentos modificados a los que se les ha agregado o eliminado un componente por medios tecnológicos, y son ingeridos habitualmente en la dieta. Según esta clasificación se distinguen:

- 1) **Alimentos no alterados** (naturalmente contienen un alto nivel de nutrientes o componentes con efectos beneficiosos).
- 2) **Alimentos fortificados** (el contenido de estos componentes se ha incrementado).
- 3) **Alimentos enriquecidos** (se han añadido componentes adicionales beneficiosos que naturalmente no contienen).
- 4) **Alimentos alterados** (un componente específico ha sido eliminado o sustituido) (Spence, 2006; Bibliardi and Galati, 2013).

1.2. *Nutracéuticos*

Los **nutracéuticos** pueden definirse como suplementos dietéticos o productos generados en procesos biotecnológicos que contienen nutrientes o sustancias bioactivas, preparados a partir de matrices crudas de alimentos y utilizados en formas de presentación farmacéutica con dosificación unitarias (tabletas, cápsulas, comprimidos, líquidos, etc.) Por lo tanto, el agente bioactivo está en este caso más concentrado que en el alimento del que proceden, en la dosis efectiva para presentar los efectos fisiológicos positivos en el cuerpo humano. No podría, por tanto, obtenerse de la ingesta normal de alimentos para alcanzar los efectos beneficiosos esperados (Dudeja and Gupta, 2015).

Hoy en día, el uso de formulaciones nutraceuticas en suplementos dietéticos como complemento para prevenir algunas enfermedades es muy común (Braithwaite et al., 2014). No obstante, es importante distinguirlos de los medicamentos, ya que éstos últimos no tienen un origen biológico natural y se utilizan más para tratar enfermedades en lugar de prevenir, a diferencia de los nutraceuticos (Dudeja and Gupta, 2015).

Por lo general, el procesamiento de nutraceuticos sigue cuatro pasos: pretratamiento (incluye homogeneización, molienda, maceración y secado de la muestra), extracción (selección de un método adecuado que permita extraer el compuesto o los compuestos bioactivos de interés con la máxima recuperación), aislamiento / purificación de estos compuestos y, finalmente, encapsulación (Carocho et al., 2014).

1.3. Plantas medicinales

Se denominan **plantas medicinales** a aquellas plantas que pueden utilizarse en su totalidad o por partes específicas (hojas, flores, frutos, cortezas, tallos o raíces), para tratar enfermedades o aliviar sus síntomas, debido a que contienen principios activos con acción terapéutica.

El uso de las plantas en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades se remonta a los orígenes del ser humano. Los primeros reportes de su uso terapéutico datan de los años 5000 A.C. en Asia, para el tratamiento y prevención de desórdenes muy diversos, desde procesos inflamatorios, intestinales y cutáneos, hasta incluso cáncer (Gurib-Fakim, 2006). El primer texto escrito sobre el uso de plantas medicinales tiene unos



Figura 1. Reproducción fotográfica de una de las páginas del manuscrito chino "Pen T'Sao" sobre raíces y pastos (Obra de Domino público). Fuente: Meggs, Philip B. A History of Graphic Design. John Wiley & Sons, Inc. 1998. (p 25).

4000 años de antigüedad y aparece en una tablilla de arcilla en la cultura de los Sumerios. Otra de las evidencias escritas más antiguas es el libro chino "Pen T'Sao", escrito por el emperador Shen Nung alrededor del año 2500 a. C., en el que trata 365 medicamentos (partes secas de plantas medicinales), muchos de los cuales se usan incluso hoy en día (Biljana, 2012). Se estima que, en un

momento u otro de la historia, de las 75000 especies de plantas superiores existentes en la tierra, aproximadamente hasta el 10% se ha utilizado con fines medicinales (WHO, 1998; Ratra and Gupta, 2015).

Hoy día, la medicina tradicional es una de las principales fuentes de atención médica. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente el 80% de la población mundial (principalmente los de los países en desarrollo) aún recurre a productos de origen vegetal para sus necesidades de atención primaria de la salud (WHO, 2013; Gurib-Fakim, 2006).

Las plantas se consideran recursos potenciales de compuestos bioactivos. La seguridad y la eficacia de las plantas medicinales han sido bien aceptadas como se ve en los usos tradicionales a largo plazo y la investigación científica. Además, las terapias vegetales son más accesibles y asequibles en comparación con las medicinas modernas (Thanchanit et al., 2018). También es un hecho que los productos naturales y sus derivados representan más del 50% de todos los fármacos en uso clínico en el mundo y que las plantas superiores contribuyen en una cuarta parte (Gurib-Fakim, 2006). Por otro lado, los numerosos efectos secundarios descritos en los fármacos sintéticos han fomentado el uso de las plantas medicinales como una fuente confiable de nuevas terapias (Uritu et al., 2018). Por estas razones, las plantas medicinales se han convertido en una parte importante del sistema de salud primario hoy en día.

En cualquier caso, la clasificación de una planta en el grupo de medicinales se torna un tanto ambigua. Ya que una planta, extracto, o producto derivado de ella con propiedades terapéuticas demostradas, puede utilizarse como planta medicinal, tal y como tradicionalmente se ha venido haciendo en la medicina natural; pero también y darle un uso como alimento funcional incluyéndolo en la dieta (en forma de infusiones, como condimento, en recetas) o bien emplearse para elaborar formulaciones

nutracéuticos (al ser posible extraer los principios activos responsables del efecto beneficioso para la salud).

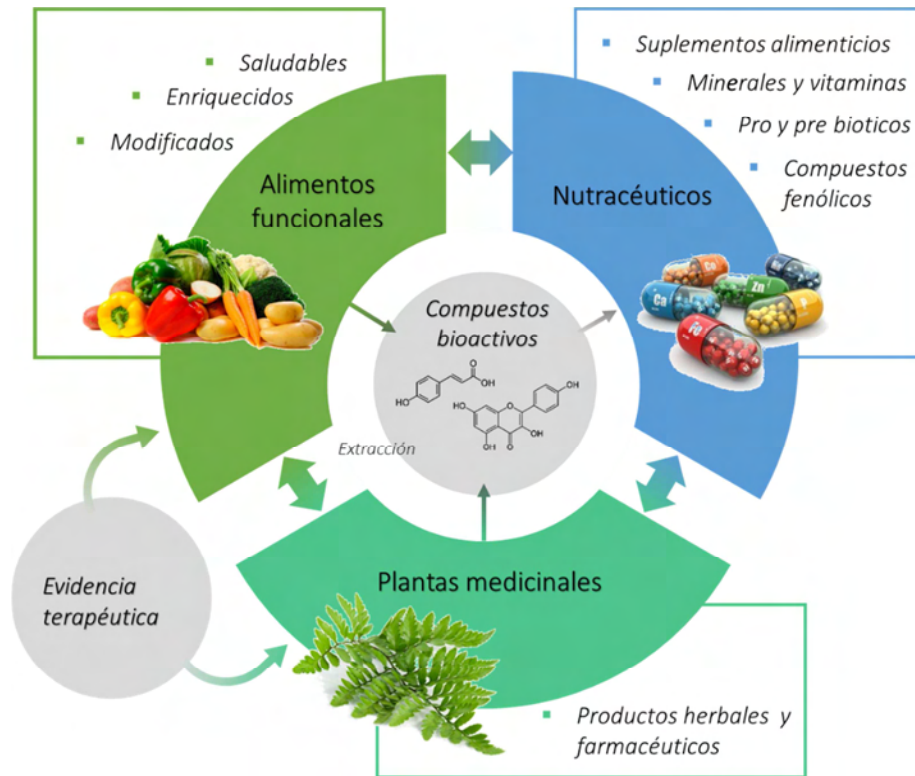


Figura 2. Correlación entre alimentos funcionales, plantas medicinales y nutracéuticos y sus roles para la mejora de la salud.

2. EXTRACTOS VEGETALES COMO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

Recientemente, el uso medicinal de las plantas ha evolucionado hacia el aislamiento de compuestos químicos farmacológicamente activos presentes en su composición. De hecho, la extracción de compuestos bioactivos de fuentes vegetales se ha convertido en las últimas décadas en una de las áreas de investigación más importantes para las industrias farmacéutica y alimentaria (Sasidharan et al., 2011; Brusotti et al., 2014).

Las plantas pueden considerarse "*fábricas químicas verdes*" pues constituyen un vasto suministro de apreciados compuestos naturales de amplia diversidad química. Como fuentes productivas, sintetizan una enorme variedad de metabolitos secundarios, y entre ellos compuestos bioactivos de alto valor, que podrían ser seleccionados para encontrar potenciales moléculas diana (principios activos) en la expansión de nuevos fármacos y en el desarrollo de nuevos ingredientes funcionales. Además, es un hecho que numerosos principios activos utilizados hoy día provienen de forma directa o indirectamente de plantas. Es importante destacar que la fitoquímica es una de las madres de la farmacología actual y que el reino vegetal es una fuente casi inagotable de moléculas bioactivas (Ratra and Gupta, 2015; Xu et al., 2017).

En este contexto, en la presente Tesis Doctoral se ha estudiado el extracto de frondes de *P. decumanum* (llevando a cabo su caracterización química y de actividad biológica) como potencial fuente de compuestos bioactivos, que puedan servir para el desarrollo de ingredientes funcionales o nutracéuticos y/o desarrollo de terapias farmacológicas que puedan ayudar a hacer frente a patologías diversas, incluyendo el cáncer, desordenes atópicos, procesos inmunológicos, entre otros. A continuación, se describen las principales características de esta fuente vegetal.

P. decumanum (Will.) J. Sm., es un helecho polipodiáceo (de la familia *Polypodiaceae*) que crece en algunas áreas específicas de América Central. Pertenece al género *Phlebodium*, estrechamente relacionado con el género *Polypodium*, que incluye unas 50 variedades de plantas.

Fue descrita por John Smith y William Jackson Hooker en 1842 (Hooker and Bauer, 1842) y, anteriormente por el botánico alemán Carl Ludwig

Willdenow, director del jardín botánico de Berlín, que descubrió la especie en 1811 analizando en París las plantas traídas por Alexander von Humboldt en su viaje por Sudamérica (Bröwer, 2009).

Esta especie se encuentra bastante extendida por el continente centro y sudamericano, con presencia en los países de México, Guatemala, Honduras, Costa Rica, Nicaragua, República Dominicana, Venezuela, Perú, Brasil, Bolivia y Paraguay (EOL, 2019).

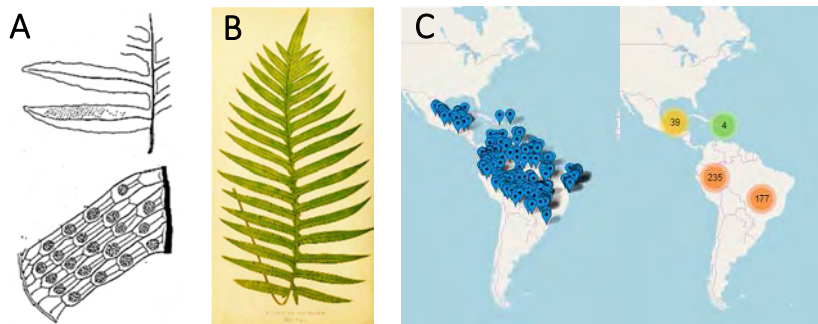


Figura 3. A: Detalle de los soros de las hojas de *P. decumanum*; B: Fronde de *P. decumanum*; C: Hábitat de *P. decumanum*. Imágenes extraídas de: Gattuso et al., 2008; The Institute for Regional Conservation; Encyclopedia of Life (EOL).

El estudio morfológico y anatómico reciente llevado a cabo por Gattuso y colaboradores (2008), ha puesto de manifiesto caracteres comunes y no comunes de las especies de *Phlebodium*. Esto ha permitido finalmente la identificación de estas especies. *P. decumanum* es un helecho de color verde parduzco, de hojas pinnatisectas y articuladas al rizoma. Éstos últimos son generalmente farinosos, miden unos 1-3 cm de ancho y están cubiertos por escamas basipeltadas, concoloras y denticuladas (de 6-15 mm). Los soros de sus hojas son orbiculares, miden 1.5 mm de diámetro y se disponen en series de 3 y 5 entre el margen y la costa (Gattuso et al., 2008).

P. decumanum, junto con las especies *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger y *Phlebodium aureum* (L.) J. Sm., son conocidas con los nombres comunes de “calaguala”, “calahuala”, “polipodio” o “helecho azul”, de las que se han utilizado tradicionalmente sus rizomas y hojas (Gupta, 1995; Ocampo-Sánchez et al., 2006). Se les atribuyen multitud de propiedades mostrando poseer actividad analgésica, expectorante, febrífuga, depurativa, tranquilizante, antiinflamatoria, entre otras (Gattusso et al., 2008).

En la presente memoria centramos nuestro interés en la actividad inmunomoduladora y anticancerígena de *P. decumanum*, ya que existen evidencias de que posee ciertos compuestos naturales capaces de modular la activación de macrófagos in vitro, y de inhibir la promoción de diferentes tipos de cáncer. La variedad utilizada en este estudio fue cultivada en forma de monocultivo puro y procesada de manera orgánica por la empresa HELSINT S.A.L. en las cercanías del Lago Yojoa localizado en el Norte de Honduras.

2.1. Calaguala en el pasado

La incorporación de productos medicinales americanos comienza en 1570, cuando Felipe II, solicitó a los médicos en sus expediciones, la tarea de registrar las prácticas médicas locales y anotar cada árbol, hierba o semilla medicinal que se encontraran (Ruiz, 1796).

Durante el siglo XVIII, la necesidad de reemplazar los productos medicinales importados de Oriente a Europa, también se vio reflejada en las expediciones que centraban sus investigaciones en la búsqueda de plantas que pudieran sustituirlos para poder modificar así su política de importaciones (Olearte, 2006).

Una de estas plantas medicinales americanas introducidas en España es la Calaguala. Los indios de Perú en la América precolombina ya utilizaban la calaguala antes de que los españoles entraran en los países con sus expediciones político-científicas. De hecho, ésta aparece en la Pharmacopea Matritensis de 1762 (Guerra et al., 1762) antes de que en 1777 partiera la expedición española al Virreinato del Perú, dirigida por el botánico Hipólito Ruiz López a bordo de “El Peruano”. Incluso se puede encontrar esta planta con el nombre de *Polypodium calaguala Ruiz* en honor a él.

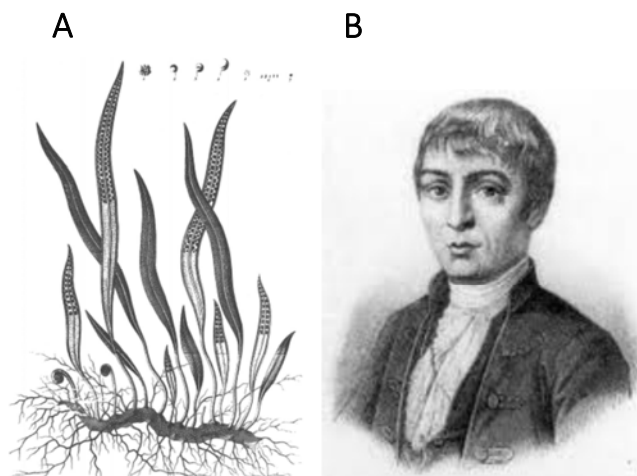


Figura 4. A: Hipólito Ruiz López. B: Ilustración de la calaguala que aparece en el libro “*Memoria sobre la legítima calaguala y otras raíces que con el mismo nombre nos vienen de América meridional*”, de Hipólito Ruiz.

Hipólito Ruiz recogió en su libro “*Memoria sobre la legítima calaguala y otras raíces que con el mismo nombre nos vienen de América meridional*”, disertaciones que buscaban diferenciar una única especie entre varias plantas que se comercializaban con el mismo nombre. Llegaba a ser mezclada incluso por los recolectores con otras raíces de la familia

Polypodium, similares a simple vista. El término se aplicó para todas las especies de helechos, pasando como auténticas durante su comercio y contrabando (Ruiz, 1805).

Explica que, bajo el nombre de calaguala se conocen tres especies de raíces que vienen de Perú pero ya los indios les dieron distintos nombres para caracterizar cada una de ellas pues tenían propiedades distintas. La primera y legítima se denominó Calaguala o Callahuala, la segunda Puntu-puntu y la tercera y última, Huacsaro (Ruiz, 1805).

De la verdadera calaguala se conocen sus usos en caídas, golpes, contusiones o para el cansancio general de cuerpo. También como remedio sudorífico, resolutivo, descoagulante y antirreumático. Su forma habitual de uso era en forma de infusiones de agua con raíces frescas cortadas, y cociéndolas a fuego lento, tapado, hasta consumir la mitad del volumen y sacando sin colar, tras haberse decantado, la cantidad a tomar. Los efectos de la calaguala fresca son más inmediatos y eficaces que cuando se encuentra seca, pero no por ello pierde su eficiencia.

2.2. Calaguala en el presente

En la actualidad, el término vulgar calaguala adquiere algún otro sinónimo como "**polipodio**" o "**helecho azul**" (Gupta, 1995; Ocampo-Sánchez et al., 2006), y engloba también tres especies bien diferenciadas. Estas especies son *Phlebodium decumanum* (Will.) J. Sm., *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger y *Phlebodium aureum* (L.) J. Sm. (Gattuso et al., 2008). La coincidencia o no de las tres raíces que los indios consideraban calaguala con la equivalencia real de estas especies no ha sido demostrada.

Asimismo, de estos tres helechos se utilizan actualmente, sus rizomas desecados y sus hojas, por sus propiedades documentadas, ya comentadas anteriormente. En el mercado actual encontramos diversos productos fitofarmacéuticos representados en formulaciones a base de fracciones hidrosolubles de estas especies. Los podemos encontrar como mezclas de las tres especies, de dos de ellas, o de cada una individualmente. Algunos ejemplos son RAINTREE® (*P. aureum* y *P. decumanum*), destinado a la mejora de la salud de la piel o Kalawalla® (Calaguala) (*P. aureum* o *P. leucotomos*) diseñado como suplemento alimenticio para mejorar la salud general y la función del sistema inmunológico.

En relación con la variedad de *P. decumanum*, de nuestro interés en este estudio, las formulaciones a base de fracciones hidrosolubles de sus hojas, purificadas y estandarizadas, se encuentran registradas bajo el nombre de EXPLY-37® (marca registrada de HELSINT S.A.L.), utilizado para designar al Extracto de *Phlebodium decumanum* del Lago Yojoa. A su vez existen suplementos nutricionales comercialmente disponibles utilizados para fines diversos, como los productos EXPLIVAR® de Infisport®, destinados a la prevención del sobreesfuerzo físico y de la fatiga (Yesares et al., 2001).

2.1.3. Propiedades terapéuticas de *P. decumanum*:

La búsqueda bibliográfica sobre *P. decumanum* reporta datos escasos, poco precisos e incluso algunos de ellos antiguos. Sin embargo, existen diversos estudios con evidencia científica que han demostrado las propiedades terapéuticas o actividad biológica del helecho:

— **Efecto inmunosupresivo en la psoriasis.** *P. decumanum* mostró inhibir *in vitro* la formación de leucotrieno B4, uno de los mediadores inflamatorios que ha sido aislado en grandes cantidades de la piel de

pacientes psoriásicos. Esta inhibición es debida a la acción de varios ácidos poli insaturados presentes en el helecho, en concreto, a los ácidos linolénico, linoléico y araquidónico (Vasänge et al., 1994).

- Más tarde, investigaron el **efecto de *P. decumanum* sobre neutrófilos** en cultivo, y demostraron que uno de constituyentes de la planta poseía actividad inhibitoria en el factor activador de plaquetas en una exocitosis inducida, factor implicado también en los procesos de psoriasis. El compuesto se identificó como sulfoquinovosil diacilglicerol 1,2-di-O-palmitol-3-O (6-sulfo- α -D-quinovopiranosil)-glicerol (SQDG) por medios espectroscópicos (Vasänge et al., 1997).
- Posteriormente, los compuestos activos identificados, el SQDG junto con los ácidos poliinsaturados (linolénico, linoleico y araquidónico) y el triflavonoide selliguaeain, fueron aislados y cuantificados en diferentes especies de *Phebotium*, incluyendo el *P. decumanum* mediante HPLC, y se demostró su **actividad antiinflamatoria con bioensayos in vitro** (Liu et al., 1998).
- **Efecto anti-neoplásico.** Extractos de hojas y rizomas de *P. decumanum* preparados con distintos solventes mostraron tener una actividad antitumoral sobre las líneas celulares de leucemia mieloide HL-60, al inhibir la proliferación e inducir la muerte celular en diferentes magnitudes. El extracto de diclorometano inhibió el crecimiento un 80%, el de metanol un 60% mientras que el acuoso causó una inhibición del 25% de la proliferación (Gridling et al., 2009).
- **Efecto inmunomodulador sobre macrófagos humanos activados.** Fracciones hidrosolubles de *P. decumanum* demostraron poseer un efecto modulador sobre células del sistema inmune *in vitro*. El extracto

inhibió la producción del factor de necrosis tumoral (TNF) por macrófagos tras ser activados con lipopolisacárido (LPS) e interferón gamma (IFN- γ). Además incrementó la liberación del receptor 2 de TNF soluble (sTNFR2) y del antagonista IL1R, capaces de neutralizar la actividad de IL-1 y TNF. *P. decumanum* mostró poseer actividades antiinflamatorias, disminuyendo la producción de TNF e incrementando la de estos receptores (Punzón et al., 2003).

- ***Efecto inmunomodulador sobre la respuesta inmune durante el desarrollo de ejercicio físico.*** El entrenamiento físico se considera un buen modelo para provocar diferentes grados de disfunción inmune, que afecta al rendimiento físico y a algunas respuestas fisiológicas relacionadas con el estrés oxidativo y la inflamación. Por ello, diversas investigaciones han centrado su interés en realizar estudios clínicos basados en suplementación oral de *P. decumanum* para investigar su efecto durante la realización de actividad física. Los resultados de estos estudios demuestran que *P. decumanum*:
 - ***Modifica la respuesta del cortisol frente al estrés físico.*** Como consecuencia, los sujetos que suplementaron su alimentación con el extracto manifestaron un menor grado de estrés físico (González-Jurado et al., 2009).
 - ***Induce efectos inmunomoduladores,*** específicamente dirigidos a la liberación de citoquinas durante el ejercicio físico, disminuyendo la producción de las proinflamatorias (TNF α , IL-6) e incrementando las antiinflamatorias (González-Jurado et al., 2011).
 - ***Reduce la inflamación y el estrés oxidativo,*** al descender la generación de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina e isoprostanos (mediadores de estrés

oxidativo) e incrementando la actividad antioxidante en eritrocitos y el estado antioxidante total del plasma (Díaz-Castro et al., 2012).

- **Efecto protector del daño muscular.** Las propiedades inmunomoduladoras y antioxidantes de *P. decumanum*, mostraron una mejora en el rendimiento físico y disminución de la fatiga durante el ejercicio físico al atenuar el daño muscular, así como un aumento de las capacidades de fuerza y potencia (Esteban-Fernández et al., 2005; Vargas-Corzo et al., 2014).

Incluso se han elaborado tesis doctorales cuyo tema principal era el estudio de *P. Decumanum*: sobre su efecto sobre el estrés oxidativo durante el ejercicio físico (Sotomayor, 2002; Morales, 2007) y sobre la fatiga muscular y el rendimiento físico-deportivo (Jurado, 2003).

A pesar de las evidencias reportadas sobre las propiedades bioactivas de *P. decumanum*, se conoce muy poco de su composición química. El desconocimiento de los compuestos presentes en esta especie, así como de los principios activos responsables de dichas propiedades, hace necesario un estudio más profundo, comenzando por el establecimiento de su perfil cromatográfico así como de su caracterización para la comprensión de los mecanismos subyacentes de esta planta.

3. FITOQUÍMICOS COMO COMPUESTOS BIOACTIVOS

Los **compuestos bioactivos** pueden definirse como aquellos componentes naturales que se encuentran en pequeñas cantidades en plantas y ciertos alimentos, que influyen en la actividad celular y los mecanismos fisiológicos, y que conducen efectos beneficiosos para la salud, como pueden ser la disminución del riesgo de padecer alguna enfermedad o la mejora de determinadas funciones del organismo. Existen una amplia variedad de sustancias bioactivas descritas en la naturaleza, con diferente estructura molecular y con actividades biológicas diversas. Muchas plantas contienen altas concentraciones de fitoquímicos beneficiosos que impactan en la salud de forma positiva. Un ejemplo son los compuestos con acción antioxidante, que protegen contra el daño de los radicales libres, como son las vitaminas y los compuestos fenólicos, tales como flavonoides, taninos y ligninas (Altemimi et al., 2017). Aparte de la actividad antioxidante, otros fitocompuestos juegan, además, un papel dinámico en retrasar el envejecimiento, reducir la inflamación y prevenir ciertos tipos de cáncer, como es el caso del betacaroteno, el ácido ascórbico y muchos fenólicos (Duthie et al., 1996).

La **Tabla 1** recoge los principales compuestos bioactivos que pueden encontrarse en alimentos y fuentes vegetales y sus actividades biológicas más destacadas. Dentro de los compuestos bioactivos, los compuestos fenólicos despiertan un especial interés en la comunidad científica y han sido objeto de estudio en numerosas investigaciones, por su amplia diversidad estructural y en lo referente a las actividades biológica, pero también porque las plantas superiores son una importante fuente de polifenoles. Por este motivo, en los siguientes apartados se hablará de fitoquímicos en general, prestando especial atención a los compuestos fenólicos.

Tabla 1. Clasificación de los fitoquímicos (adaptado de Upadhyay y Dixit, 2015).

Principales compuestos bioactivos	Efectos terapéuticos	Referencias
Compuestos fenólicos (polifenoles) <ul style="list-style-type: none"> — Ácidos fenólicos — Curcuminoides — Flavonoides — Chalconas — Stilbenos — Lignanós — Isoflavonoides — Taninos 	<ul style="list-style-type: none"> — Antioxidantes — Antiinflamatorios — Reguladores del metabolismo — Antidiabéticos — Antitumorales — Inhibidores de la proliferación — Antiangiogénicos — Antimicrobiales 	Upadhyay and Dixit, 2015; Abbas et al., 2017.
Terpenoides <ul style="list-style-type: none"> — Carotenoides — Sesquiterpenos — Tocoferoles — Tocotrienoles — Saponinas 	<ul style="list-style-type: none"> — Antioxidantes — Antiinflamatorios — Anticancerígenos — Neuroprotectores 	Upadhyay and Dixit, 2015
Lípidos <ul style="list-style-type: none"> — Ácidos grasos <ul style="list-style-type: none"> ▪ Ácido linoleico ▪ De cadena larga Ω-3 — Fitoesteroles — Esfingolípidos — Fosfolípidos 	<ul style="list-style-type: none"> — Reguladores del metabolismo — Antiinflamatorios — Reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares y de determinados cánceres 	Abuajah et al., 2015)
Carbohidratos y derivados <ul style="list-style-type: none"> — Oligosacáridos — Polisacáridos 	<ul style="list-style-type: none"> — Antioxidantes — Anticancerígenos — Antiangiogénicos — Anticoagulantes — Antidiabéticos — Inmunomoduladores — Cardio- y hepato-protectores 	Xie et al., 2015
Proteínas y derivados <ul style="list-style-type: none"> — Aminoácidos — Péptidos — Indoles — Folato — Isotiocianatos 	<ul style="list-style-type: none"> — Antioxidantes — Antimicrobiales — Antitumorales — Antiinflamatorios e inmunomoduladores — Estimuladores de la hematopoyesis 	Liu et al., 2016; Rajendran et al., 2017
Minerales y vitaminas <ul style="list-style-type: none"> — P — Mg — Ca — Zn — Na — Vitamina A — Vitamina B12, etc. 	<ul style="list-style-type: none"> — Esenciales para el organismo como componentes estructurales y reguladores. 	

4. DETERMINACIÓN DE FITOQUÍMICOS Y COMPUESTOS ACTIVOS EN MATRICES VEGETALES

La identificación de los constituyentes químicos presentes en una muestra vegetal es una tarea sumamente compleja que requiere del empleo conjunto de técnicas analíticas sofisticadas. De forma general, un procedimiento analítico para la caracterización de la composición química de una matriz de ese tipo implica tres etapas fundamentales: tratamiento de muestra y extracción de los compuestos fenólicos, separación analítica de los compuestos, y finalmente detección e identificación. A continuación, se detallan cada una de estas fases que forman el proceso analítico.

4.1. Métodos para la extracción, aislamiento y purificación de compuestos fenólicos.

La extracción es el primer paso en el proceso de identificación y cuantificación de compuestos químicos y en el descubrimiento de nuevos compuestos activos de las plantas. La operación básica incluye pasos como pre-lavado, secado o liofilización de la matriz vegetal y molienda para obtener una muestra homogénea, aumentar la superficie en contacto con el disolvente y, mejorar la cinética de la extracción (Sasidharan et al., 2011).

La selección de los disolventes de extracción depende en gran medida de la polaridad de los compuestos bioactivos de interés (Khoddami et al., 2013). Así, en la extracción de compuestos hidrofílicos se usan disolventes polares como metanol, etanol o acetato de etilo. Para la extracción de compuestos lipofílicos disolventes apolares, como diclorometano y hexano, éste último en algunos casos para eliminar las clorofilas (Sasidharan et al., 2011).

Son muchos los métodos que han sido explorados y utilizados para la extracción y el análisis de fitoquímicos a partir matrices vegetales. Más allá de las metodologías tradicionales de extracción sólido-líquido (SLE), tales como maceración, infusión, decocción y ebullición bajo reflujo, durante las últimas décadas se han introducido una amplia gama de técnicas modernas. Éstas incluyen la extracción asistida por ultrasonido (UAE), la extracción asistida por microondas (MAE), la extracción con fluidos supercríticos (SFE), y la extracción acelerada con disolventes (ASE) (Brusotti et al., 2014). La idoneidad de la técnica debe ser considerada, pues va a depender de las propiedades químicas de los compuestos a extraer, principalmente de la polaridad y, en especial, de la termo estabilidad (Sasidharan et al., 2011).

4.1.1. Extracción sólido-líquido (SLE)

La **extracción sólido-líquido**, SLE de las siglas en inglés Solid-Liquid Extraction, es la técnica más simple y comúnmente utilizada para la extracción de compuestos fenólicos en plantas. Consiste en la extracción directa de matrices frescas o liofilizadas de plantas con diferentes disolventes, como metanol, etanol, acetona, etc., o mezclas de ellos. Tras la extracción, suele requerir de un paso adicional, como cromatografía en columna o la extracción de fase sólida (SPE), para la eliminación de sustancias indeseables que puedan interferir en el análisis (lípidos, taninos, etc.) Aunque es muy fácil de utilizar presenta varias desventajas, como la necesidad de usar grandes cantidades de reactivos orgánicos, el largo tiempo de extracción y la baja eficiencia (Xu et al., 2017).

4.1.2. Extracción asistida por ultrasonido (UAE)

La **extracción asistida por ultrasonido**, UAE del inglés Ultrasound-Assisted Extraction, es una técnica útil y económica ampliamente utilizada

para la extracción de fitoquímicos. La sonicación produce ondas de sonido que crean burbujas de cavitación cerca del tejido de la muestra, que rompen las paredes celulares de las plantas, liberando así el contenido celular. La eficiencia de extracción se ve influenciada no sólo por el tiempo de sonicación, la temperatura y la frecuencia de onda ultrasónica, sino también por las propiedades del disolvente utilizado y la muestra. Usa equipamiento común de laboratorio, como un baño de ultrasonidos, por lo que es un método simple, fácil y económico (Khoddami et al., 2013; Altemimi et al., 2017).

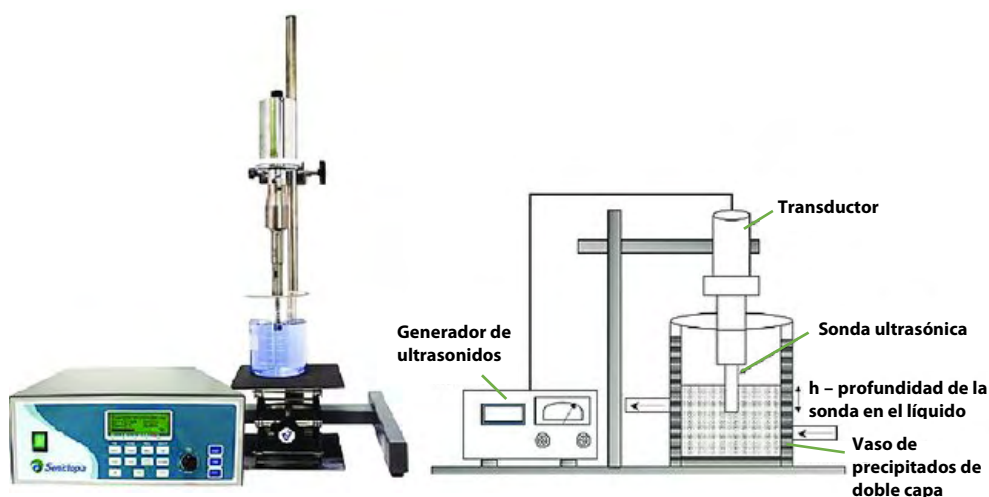


Figura 5. Representación esquemática de un equipo de extracción asistida por ultrasonido (UAE) (Imagen tomada de Rojas-Molina et al., 2016).

4.1.3. Extracción asistida por microondas (MAE)

La **extracción asistida por microondas (MAE**, de las siglas en inglés ***Microwave-Assisted Extraction***), es una técnica más moderna útil para la extracción de fitoquímicos termoestables. Utiliza el efecto directo de la energía de microondas para facilitar el reparto de analitos de la muestra al disolvente. Los principales parámetros de este método incluyen la potencia de microondas, el tiempo de extracción, la solubilidad, la constante

dieléctrica, y las propiedades del disolvente utilizado. Éste último es un factor importante porque los disolventes con altas constantes dieléctricas pueden absorber más energía de microondas (Xu et al., 2017). Los disolventes más comúnmente utilizados para la extracción de compuestos fenólicos son el metanol, el etanol y el agua. Es una técnica que consume menos cantidad de disolvente y tiempo de extracción. Además, se ha demostrado que los productos de MAE presentan actividad antioxidante mayores que cuando se utilizan otras técnicas de extracción, lo que sugiere que incrementa el contenido de antioxidantes extraídos (Dahmoune et al., 2015). La desventaja de esta técnica en relación con los fitoquímicos de las plantas es que muchos de ellos poseen un alto número de sustituyentes con grupos hidroxilo (-OH) en su estructura, y son sensibles a las altas temperaturas. MAE no es adecuada para estos analitos debido a que se degradan y oxidan bajo tales condiciones (Brusotti et al., 2014).

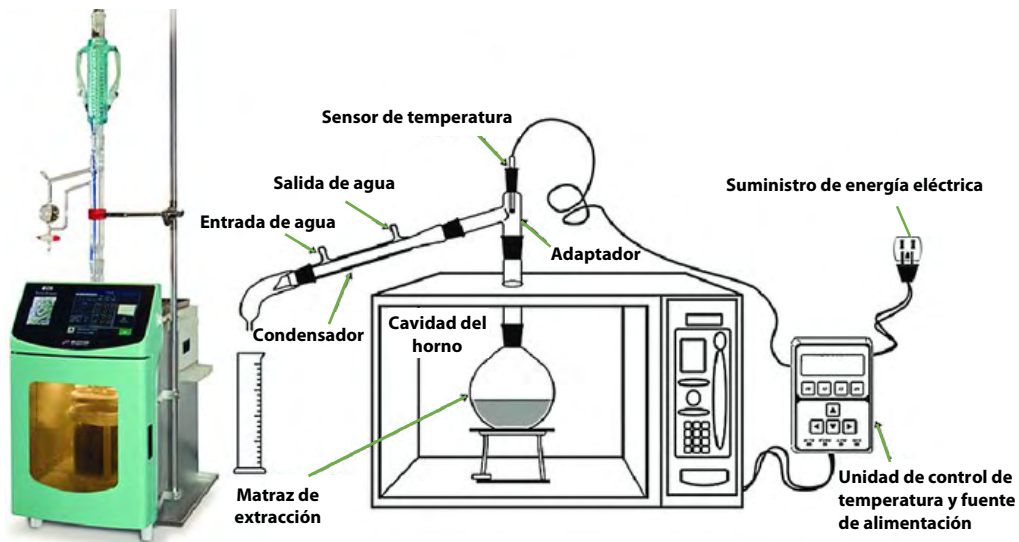


Figura 6. Representación esquemática de un equipo de extracción asistida por microondas para su uso en laboratorio (MAE) (Imagen tomada de Rojas-Molina et al., 2016).

4.1.4. Extracción de fluido supercrítico (SFE)

La **extracción con fluidos supercríticos (SFE, del inglés Supercritical Fluid Extraction)** es una técnica ecológica que puede ser una alternativa eficiente para la extracción de compuestos fenólicos. El fluido supercrítico más utilizado es el CO₂ en estado supercrítico. Otro tipo de fluidos que pueden utilizarse para la extracción de estos compuestos, son el etano, butano, pentano, amonio, óxido nitroso y trifluorometano. Comparado con otras técnicas, la SFE consume menos disolventes orgánicos y menos tiempo de extracción, y ofrece una mayor selectividad evitando, además, la oxidación de la muestra por la presencia de aire. Sin embargo, el CO₂ no es polar por lo que la técnica es incompatible para la extracción de compuestos fenólicos polares. Un punto débil de la técnica es la elevada inversión que requiere (Rojas-Molina et al., 2016; Xu et al., 2017).

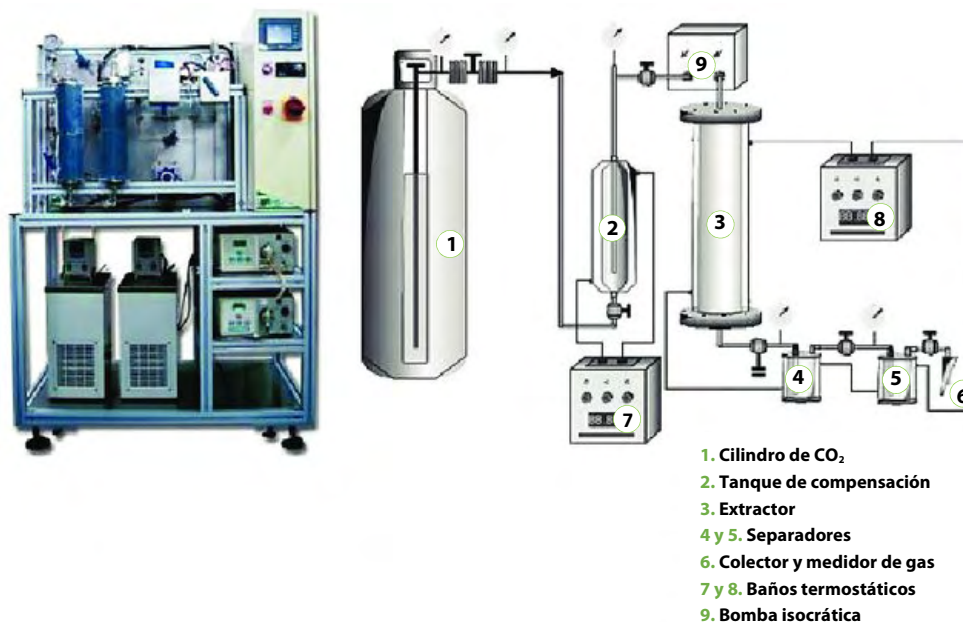


Figura 7. Representación esquemática de un sistema de extracción de fluidos supercríticos (Imagen tomada de Rojas-Molina et al., 2016).

4.1.5. Extracción acelerada con disolventes (ASE)

La **extracción acelerada con disolventes (ASE)**, del inglés *Accelerated Solvent Extraction*) es una técnica avanzada que permite extraer compuestos químicos a altas temperaturas y presión. La elevada presión y temperatura contribuye a la rápida penetración del solvente en las células vegetales y con ello, a su extracción. Al igual que MAE, es incompatible para la extracción de aquellos compuestos que son termolábiles. Comparado con los métodos convencionales proporciona procesos de extracción más rápidos que requieren poca cantidad de disolvente (Xu et al., 2017).

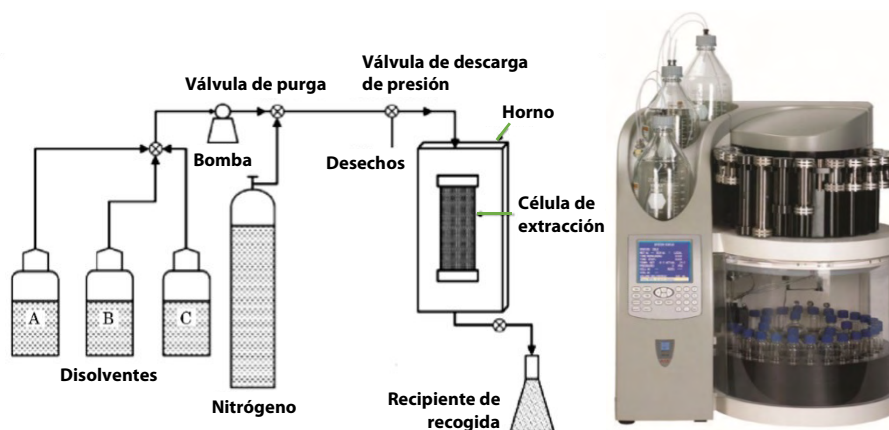


Figura 8. Modelo esquemático de un equipo de extracción acelerada con disolventes (ASE) (Imagen tomada de Sharid et al., 2015).

Generalmente, una vez seleccionada la técnica de extracción más adecuado para el análisis de los compuestos de interés, se procede a la optimización de las condiciones experimentales. El método de extracción debe optimizarse, cambiando o modificando las variables que más influyan en el proceso (cantidad de muestra, volumen de disolvente, temperatura, etc.) y, a su vez, evaluando su influencia mutua y en el proceso general (Brusotti et al., 2014). El objetivo es determinar los parámetros óptimos para lograr máximo rendimiento en la extracción en el menor tiempo.

4.2. Técnicas analíticas para la identificación y cuantificación de fitoquímicos

La cuantificación de compuestos fenólicos depende de diferentes parámetros, como como la naturaleza química de los compuestos, el método de extracción utilizado, el tamaño de partícula y las sustancias e impurezas que interfieren. Con el avance de la química analítica, se han utilizado numerosas técnicas para cuantificar compuestos químicos obtenidos a partir de fuentes vegetales, como son la espectrofotometría, la cromatografía de capa fina, la electroforesis capilar, la espectroscopía de infrarrojo, y en especial, la espectrofotometría, la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), la cromatografía de gases, y sus combinaciones (**Figura 9**) (Xu et al., 2017).

En la presente memoria se prestará especial atención a la GC y LC, por ser las técnicas separativas empleadas en el estudio de la caracterización de los componentes del *P. decumanum*.

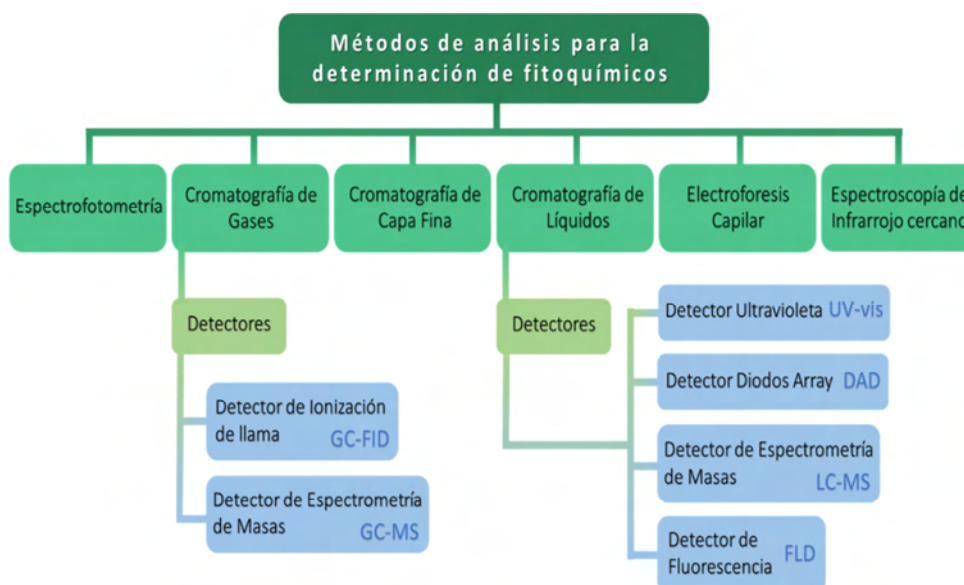


Figura 9. Diagrama esquemático de los métodos para el análisis de compuestos extraídos de plantas (Modificado de Xu et al., 2017).

4.2.1. Técnicas separativas para el análisis de compuestos fenólicos.

A. Cromatografía de gases (CG). Fundamento.

La cromatografía de gases es una técnica cromatográfica donde la separación de los componentes de la muestra tiene lugar gracias al equilibrio de distribución existente entre una fase móvil, que es un gas, y una fase estacionaria, que puede ser sólido (GSC) o un líquido (GLC, la más utilizada). A diferencia de las otras técnicas separativas, la fase móvil no interactúa con las moléculas del analito, solo lo transporta a través de la columna (Skoog et al., 2003). En un cromatógrafo de gases, la muestra se volatiliza, lo que hace a la CG la técnica analítica ideal en el análisis de compuestos volátiles. Un equipo de CG típicamente consta del gas portador, un sistema de inyección de muestra, una columna, un horno termostático, y un detector (Figura 10).

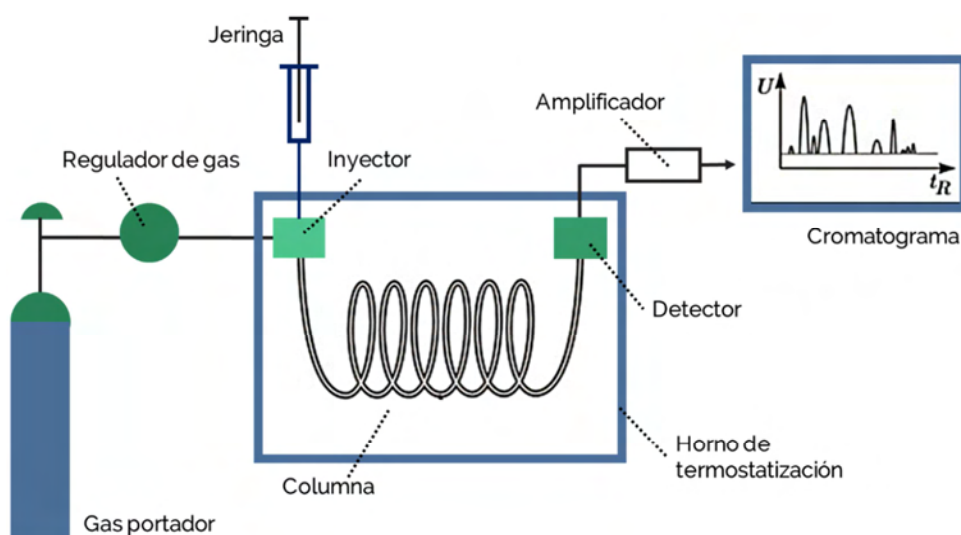


Figura 10. Esquema típico de un cromatógrafo de gases (imagen modificada de Skoog et al., 2003).

La CG ha sido empleada para la separación, identificación, y cuantificación de ciertos lignanos (Willför et al., 2006) y de algunos polifenoles en plantas, como taninos, flavonoides y antocianinas (Nolvachai y Marriot, 2013; Xu et al., 2017). El detector mas común ha sido el de ionización de llama (FID). Sin embargo, en los últimos años la GC acoplada a la detección por espectrometría de masas (MS) ha ganado popularidad en el análisis de matrices complejas dada su alta sensibilidad y selectividad (Kohddami et al., 2013).

La CG sin embargo presenta ciertas desventajas en el análisis de fitoquímicos y compuestos fenólicos. El principal inconveniente es la baja volatilidad de muchos de esos compuestos, que se debe a la presencia de grupos hidroxilo con capacidad de formar enlaces de hidrógeno. Esta característica común de muchos compuestos fenólicos se traduce en un aumento de su punto de ebullición y, en consecuencia, en una baja volatilidad. Por este motivo, generalmente es necesario un proceso de derivatización que transforme los compuestos en derivados más volátiles mediante metilación o silanización (trimetilsilil derivados) (Rohloff, 2015). Además, la cuantificación de compuestos fenólicos a partir de matrices complejas generalmente implica pasos de limpieza previos, como la eliminación de lípidos y la ruptura de los enlaces glucósido y estér, ya sea mediante medios enzimáticos, alcalinos o ácidos (Kohddami et al., 2013).

B. Cromatografía de Líquidos (CL). Fundamento

Es una técnica cromatográfica donde los componentes de una muestra se separan al distribuirse entre una fase móvil líquida (disolvente) y una fase estacionaria sólida (relleno de la columna). La separación se basa en la polaridad de los analitos y en la diferente afinidad que tienen hacia cada

una de estas fases. Se distinguen dos tipos en función de la polaridad relativa entre fase móvil y fase estacionaria: de fase normal (cuando la fase estacionaria es polar y la fase móvil apolar) y en fase inversa (cuando la fase estacionaria es apolar y la fase móvil polar). En una separación mediante CL, la fase móvil es impulsada gracias a una bomba a través del sistema hacia la columna cromatográfica, donde tiene lugar la separación. Los analitos son retenidos en función de sus propiedades físicoquímicas en la fase estacionaria y eluyen primero los que sienten más afinidad por la fase móvil. Un equipo de CL consta de una serie de componentes básicos: bomba, inyector, columna, sistema de control de la temperatura, y detector (**Figura 11**) (Skoog et al., 2003).

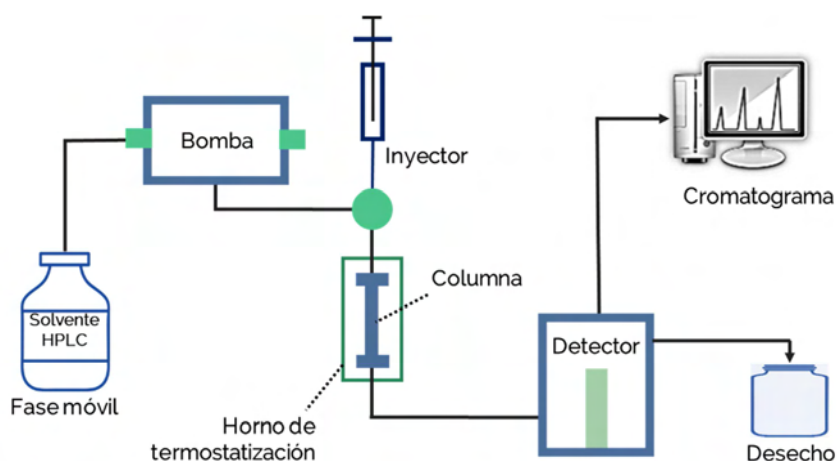


Figura 11. Esquema de un cromatógrafo de líquidos (imagen modificada de Skoog et al., 2003).

La cromatografía de líquidos generalmente en fase inversa, es la técnica más utilizada para la separación y detección de fitoquímicos en matrices vegetales. Es importante considerar las propiedades de los compuestos que se quieren analizar, así como los factores que afectan al análisis, como el tipo de columna utilizada, la fase móvil y el tipo de detector utilizado (Kohddami et al., 2013).

4.2.2. Sistemas de detección

Entre los detectores más ampliamente utilizados en la detección de este tipo de analitos se encuentran el detector de ultravioleta-visible (UV-Vis) el de diodos array (DAD), el de fluorescencia (FLD) y el detector de masas (MS) (Xu et al., 2017).

- A. Espectroscopía de absorción UV-Vis (DAD).** El detector de **ultravioleta-visible (UV-Vis)** se basa en la absorción UV-Vis. Pueden ser la longitud de onda de absorción única (miden la radiación absorbida de una determinada longitud de onda fijada); o de longitud de onda variable, también conocidos como detector de diodos en fila o “diodo array” (DAD) (adquieren espectros completos). En general, los compuestos fenólicos presentan bandas de absorción en la región UV e incluso en el visible. Se han podido determinar multitud de flavonoides y compuestos fenólicos. El ácido gálico, cafeico, siríngico, *p*-cumárico, clorogénico, *p*-hidroxibenzoico, ferúlico, la rutina, isoquercetina, son solo algunos de ellos (Kohdammi et al., 2013).
- B. Espectroscopía de fluorescencia (FLD).** El **detector de fluorescencia (FLD)** se basa en la medición de la fluorescencia emitida. Se puede utilizar para detectar sustancias que emiten fluorescencia de forma natural o bien tras una adecuada reacción de derivatización, por lo que es un sistema más limitado. No obstante, ha permitido detectar en fuentes vegetales compuestos como la curcumina, el ácido gálico, el ácido cafeico y la luteolina entre otros compuestos (Xu et al., 2017).
- C. Espectrometría de masas.** Constituye el sistema de detección por excelencia. Se basa en la separación a vacío de iones en fase gaseosa de acuerdo a su relación masa/carga (m/z) (Skoog et al., 2003). La

cromatografía de líquidos acoplada a la detección de MS en tándem (MS/MS) es la técnica habitual de elección debido a su alta sensibilidad y selectividad. Además, proporciona información estructural, lo que ayuda a dilucidar e identificar compuestos desconocidos de fuentes naturales. Gran cantidad de estudios han desarrollado métodos de análisis basados en LC-MS/MS para la caracterización fitoquímica de una gran variedad de matrices de origen vegetal, incluyendo plantas medicinales y alimentos (frutas, zumos, especias, frutos secos, etc.) permitiendo la identificación y cuantificación inequívoca de multitud de compuestos fenólicos, ácidos fenólicos, flavonoles, catequinas, ácidos benzoicos, etc. (Kohdammi et al., 2013). La **Figura 12** muestra el diagrama de un espectrómetro de masas y los elementos básicos que lo componen. El sistema de ionización más empleado en la determinación de compuestos fenólicos, es ionización por electrospray (ESI), al ser muy eficaz en el análisis de compuestos polares y baja masa molecular.

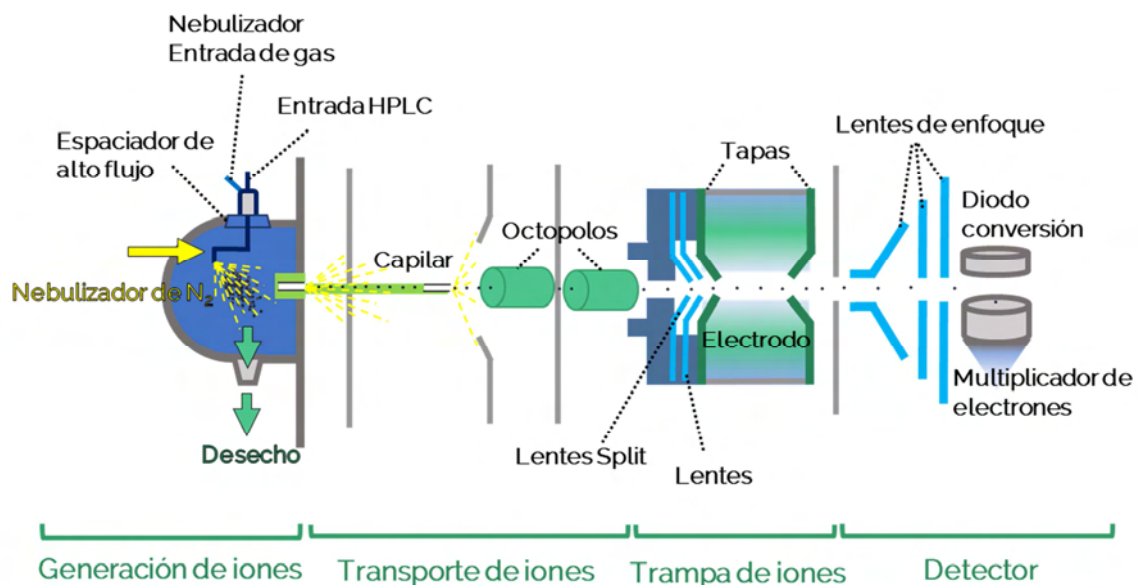


Figura 12. Esquema general de un espectrómetro de masas equipado con una fuente de ionización por electrospray (Imagen modificada de Cozma, 2014).

5. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR EN LA EVALUACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

5.1. Citometría de flujo

La **citometría de flujo** es una técnica ampliamente empleada para analizar la expresión de la superficie celular y las moléculas intracelulares, y para caracterizar y definir diferentes tipos de células en una población celular heterogénea. Esto se consigue mediante la evaluación de la pureza de las subpoblaciones aisladas y el análisis del tamaño y el volumen de las células. Se utiliza principalmente para medir la intensidad de fluorescencia producida por anticuerpos marcados con fluoróforos que detectan proteínas o ligandos que se unen a moléculas específicas asociadas a las células. Es útil por tanto, en los ensayos para la evaluación de compuestos con bioactividad y de extractos vegetales, ya que permite visualizar efectos en los procesos de diferenciación, proliferación celular, y cambios en la expresión de proteínas y citoquinas, entre otros (McKinnon, 2018).

5.1.1. Fundamento

Se trata de una técnica de análisis celular multiparamétrico basada en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas (de una en una), por delante de un haz de láser focalizado. Un citómetro de flujo típico está formado por un sistema de fluidos, un sistema óptico y un sistema electrónico. En el momento de análisis las células pueden estar vivas o fijadas, pero deben estar obligatoriamente en suspensión y en forma individual. Las células fluyen alineadas una a una frente a un haz láser en flujo continuo. Cada célula al pasar dispersa la luz y emite fluorescencia como consecuencia del impacto y de la excitación laser a la que es sometida. Ambas, luz dispersada y fluorescencia emitida, son filtradas y

recogidas por distintos detectores, y convertidas en señales electrónicas que son almacenadas (**Figura 13**). El análisis se realiza a velocidades de miles de células/segundo, lo que permite obtener datos de gran fiabilidad estadística, así como identificar poblaciones representativas de baja frecuencia dentro de la población global (Hawley and Hawley, 2011).

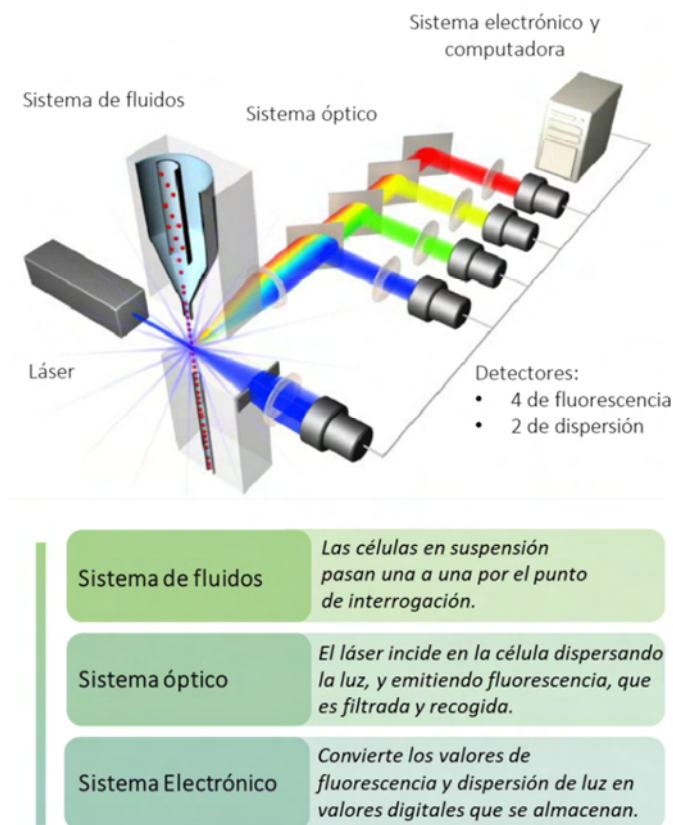


Figura 13. Componentes principales de un citómetro (Imagen modificada de Invitrogen, Flow Cytometry).

Los parámetros que se analizan de forma simultánea por célula en la citometría de flujo son:

- La dispersión de la luz, relacionada con las características físicas de la partícula.

— La intensidad de fluorescencia a diferentes longitudes de onda de los fluoróforos asociados a la partícula.

Las células o partículas que pasan a través del haz dispersan la luz, que se detecta como dispersión frontal (FS, *Forward Scatter*) y dispersión ortogonal (SS, *Side Scatter*). FS se correlaciona con el tamaño celular mientras que SS es proporcional a la granularidad o complejidad de la célula. Por tanto, es posible distinguir las distintas poblaciones celulares de la suspensión celular, en función solo de las diferencias en su tamaño y granularidad (**Figura 14**) (Sinobiological, Flow Cytometry).

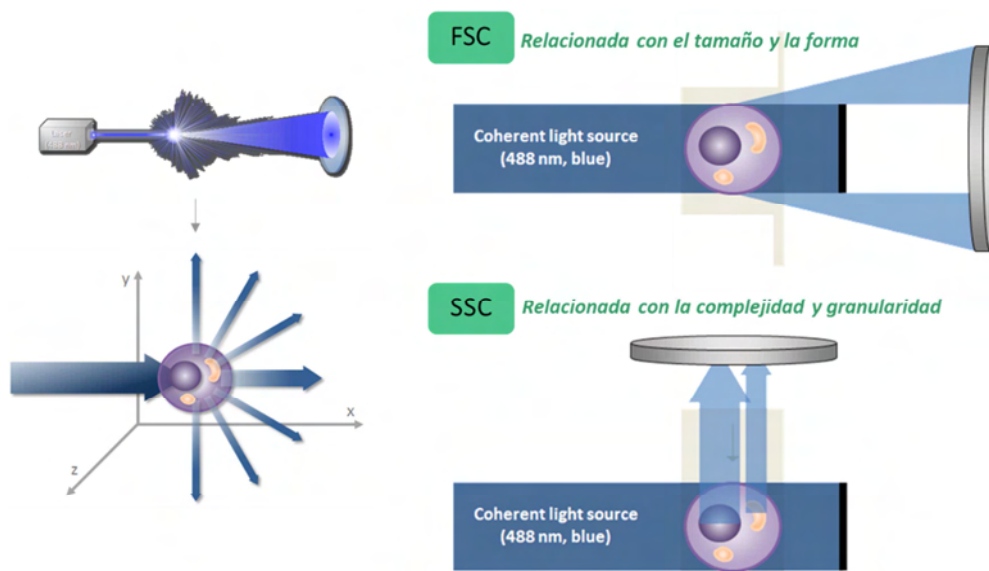


Figura 14. Dispersión de luz cuando el láser de luz incide sobre la célula. La dirección de la luz dispersada por la célula se correlaciona con el tamaño y la granularidad de la célula. FSC, *Forward Scatter*; SSC, *Side Scatter* (Imagen modificada de Sinobiological, *Flow Cytometry*).

Los datos obtenidos por técnicas de citometría de flujo se representan en forma de distribuciones de frecuencia o histogramas de una o dos dimensiones. En los histogramas se representa el número de células o partículas (en el eje de ordenadas) frente a la intensidad de fluorescencia de

un parámetro (en el eje de abscisas) (**Figura 15A**). Las distribuciones de frecuencia de dos parámetros representan en cada eje la intensidad de fluorescencia de un parámetro diferente. Las más comunes son las distribuciones de frecuencia de puntos (*dot plots*) donde cada punto representa una partícula analizada (**Figura 15B**). Una característica propia del análisis de datos de esta técnica es el uso de ventanas de análisis (*gates*) tanto para seleccionar de manera específica la población de células o partícula de interés, como para simplificar el análisis de poblaciones heterogéneas en las que se analizan simultáneamente un elevado número de parámetro (**Figura 15C**).

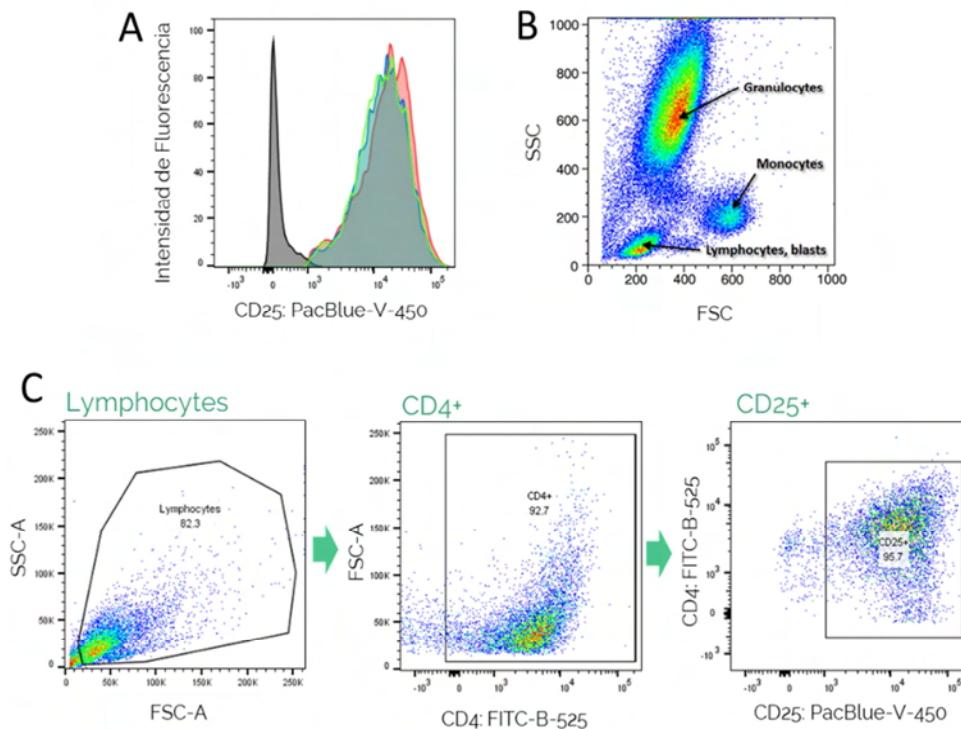


Figura 15. Representaciones de los datos de citometría de flujo. Ejemplos. A: histograma; B: distribución de frecuencia (*dot plot*) de poblaciones de células sanguíneas; C: ventanas de análisis (*gating strategy*) para seleccionar la población de linfocitos CD4+ y CD25+.

5.1.2. Aplicaciones

A. **Caracterización de poblaciones y subpoblaciones celulares.** La citometría de flujo es la principal alternativa para la caracterización y el aislamiento de células (subpoblaciones) en poblaciones heterogéneas. Una población o subpoblación de células se distingue del resto de poblaciones, entre otros rasgos, por las moléculas específicas que expresa, únicas de ese tipo celular. Estas moléculas son los llamados **marcadores celulares**, la mayoría de los cuales pueden ser detectados mediante anticuerpos monoclonales específicos marcados.

Los marcadores celulares pueden incluir tanto proteínas intracelulares (factores de transcripción, marcadores relacionados con vías metabólicas) como moléculas que se encuentran en la superficie celular (como receptores, glucoproteínas, proteínas de membrana, moléculas de adhesión). Dentro de los marcadores de superficie celular se distingue el sistema *clusters de diferenciación* o antígenos CD (del inglés, *Clusters of Differentiation*). Son un sistema de antígenos de superficie de células del sistema inmune que son reconocidas por ciertos anticuerpos y usadas para la identificación del tipo celular, estadio de diferenciación y/o actividad. Por tanto, se emplea como marcador en células del sistema inmune, como los leucocitos y otras células hematopoyéticas. Pueden considerarse varias clases de marcadores: de linaje, de maduración y de activación (Hawley and Hawley, 2011). Un ejemplo son las moléculas CD4 y CD8, que aparecen de forma temprana en la maduración de las células T en el timo y que se utilizan, en general, como marcadores para distinguir los linfocitos T de tipo colaborador (Th) y de tipo citotóxico (Tc) (Prointech, Markers for immune cells).

B. Seguimiento de la proliferación celular. En las últimas décadas, numerosos estudios han confirmado que los polifenoles de la dieta son capaces de inhibir la proliferación celular, induciendo detención del ciclo celular y apoptosis en líneas celulares tumorales y leucémicas, contribuyendo a prevenir la progresión de tumores (Mahbub et al., 2013). La citometría de flujo es una técnica muy útil para el seguimiento y monitorización de la proliferación de las células (Tario et al., 2011).

Existen multitud de colorantes fluorescentes comercialmente disponibles para este fin. Uno de los marcajes más utilizados para el seguimiento de la proliferación *in vitro* y que se ha utilizado en el presente trabajo, es el éster succinimidílico de carboxifluoresceína **CFSE** (del inglés, *CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester*). El CFSE es una molécula que penetra con facilidad las membranas celulares. Una vez en el interior de la célula las esterasas intracelulares escinden los grupos acetato del compuesto produciendo una molécula con fluorescencia verde. El grupo succinimidil éster reacciona con las aminas libres de intracelulares generando conjugados covalentes de colorante-proteína. El resultado son células vivas con un marcador fluorescente celular altamente estable y de larga duración. De esta manera, cuando una célula marcada con CFSE se divide, su progenie está dotada con la mitad del número de moléculas fluorescentes, y por lo tanto, cada división celular puede evaluarse midiendo la disminución correspondiente en la fluorescencia celular mediante citometría de flujo (Abcam, CFSE Cell Labeling Kit; ThermoFisher, Cell Trace CFSE Cell proliferation Kit). Dado que es un tinte a base de fluoresceína, es compatible con una amplia gama de otros fluorocromos, siendo aplicable a la citometría de flujo multicolor (Quah and Parish, 2010).

Aunque el acrónimo genérico que se utiliza para describir el reactivo es “CFSE”, el compuesto se vende de forma comercial como CFDA-SE (*Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*), ya que tiene una mayor capacidad de penetrar las membranas celulares por la presencia de los dos grupos acetato (Quah and Parish, 2010). En la **Figura 16**, se muestran las reacciones químicas que tienen lugar en el interior de las células cuando se tiñen con CFSE.

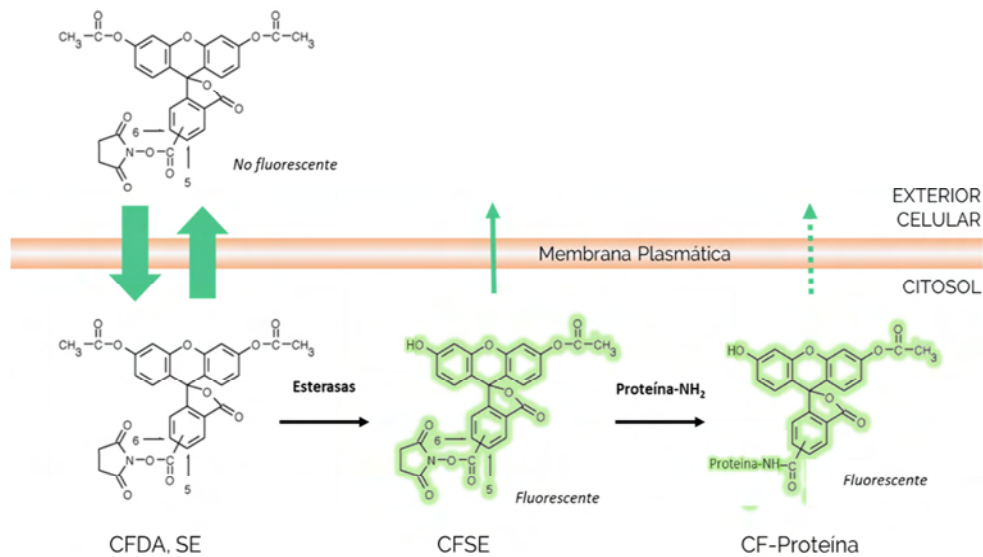


Figura 16. Representación de los fenómenos moleculares que tienen lugar en el marcaje de células con CFSE (Imagen modificada de Quah y Parish, 2010).

C. Tinción de citocinas intracelulares. Muchos polifenoles han mostrado, entre el amplio rango de actividades biológicas, ser capaces de modular el sistema inmunitario. En este contexto, la modulación del balance de citoquinas es uno de los mecanismos más comunes mediante los cuales ejercen. Por ejemplo, algunos flavonoides de la dieta modulan mediadores de la inflamación como la IL-6, como es el caso de flavonoles presentes en el té y el cacao (Stote et al., 2012).

La citometría de flujo mediante la tinción de citoquinas intracelulares, es una técnica muy útil para visualizar este tipo de respuesta ante compuestos con actividad inmunomoduladora. La técnica se basa en el marcaje de proteínas intracelulares diana (citoquinas), con anticuerpos específicos conjugados con algún compuesto fluorescente. Son necesarios el uso de inhibidores de secreción, como monensina o brefeldina A, para que las citoquinas secretadas y otras proteínas puedan ser retenidas en el interior de las células, y queden disponibles para el marcaje, tras previa fijación con alcohol o formaldehído (Hawley and Hawley, 2011).

5.2. Técnicas para la medida de la viabilidad celular

Los **ensayos de proliferación *in vitro*** permiten estudiar la velocidad de división de células en cultivo después de la exposición a un estímulo específico. La medición de la tasa de crecimiento (o división celular) de la población proporciona información sobre la salud básica y el mantenimiento celular, así como la respuesta a determinados fármacos o compuestos bioactivos.

Existen múltiples ensayos de proliferación celular clasificados en cuatro grupos principalmente, en función de los parámetros que controlan: el contenido o síntesis de ADN, la actividad metabólica, la actividad de la proteasa (ATP) y la intensidad del colorante de seguimiento. Cada uno requiere instrumentación diferente, y todos tienen ventajas y desventajas (Smith, 2013). La elección de la técnica depende del tipo de células o tejido a estudiar y de los objetivos experimentales específicos (Romar et al., 2016). A continuación, se describe el fundamento del ensayo que se ha llevado a cabo en la presente memoria.

A. **Ensayo Cell Counting Kit-8 (CCK-8).** Es una técnica colorimétrica muy sensible que permite determinar la viabilidad celular en ensayos de citotoxicidad y proliferación mediante la medida de la actividad metabólica de las células. En este tipo de técnicas se utilizan sales de tetrazolio que las células metabólicamente activas reducen para formar un formazán coloreado, que luego se detecta mediante un espectrofotómetro a una determinada longitud de onda. La cantidad de colorante de formazán generado por el metabolismo de las células en cultivo es directamente proporcional al número de células vivas. En este caso la sal de tetrazolio utilizada es WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium *monosodium salt*), de un color ligeramente amarillo y altamente soluble en agua. Ésta se reduce por la actividad de las proteínas deshidrogenasas de las células, en presencia de un portador de electrones (1-metoxi PMS). La biorreducción produce un colorante formazán de color naranja, soluble también en el medio de cultivo **(Figura 17)**.

El procedimiento es fácil, rápido y requiere sólo de tres pasos: adición de la solución CCK-8, incubación durante 1-4h y finalmente medida de la absorbancia a 450 nm. Tiene la ventaja de que, dado que la solución CCK-8 es muy estable y tiene poca citotoxicidad, son posibles incubaciones más largas, de hasta 48 horas. Además, la sensibilidad de detección con CCK-8 es mucho más alta que con cualquier otra sal de tetrazolio, como MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) o MTS (3-(4,5-

dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) (Cell Counting Kit-8, Dojindo).

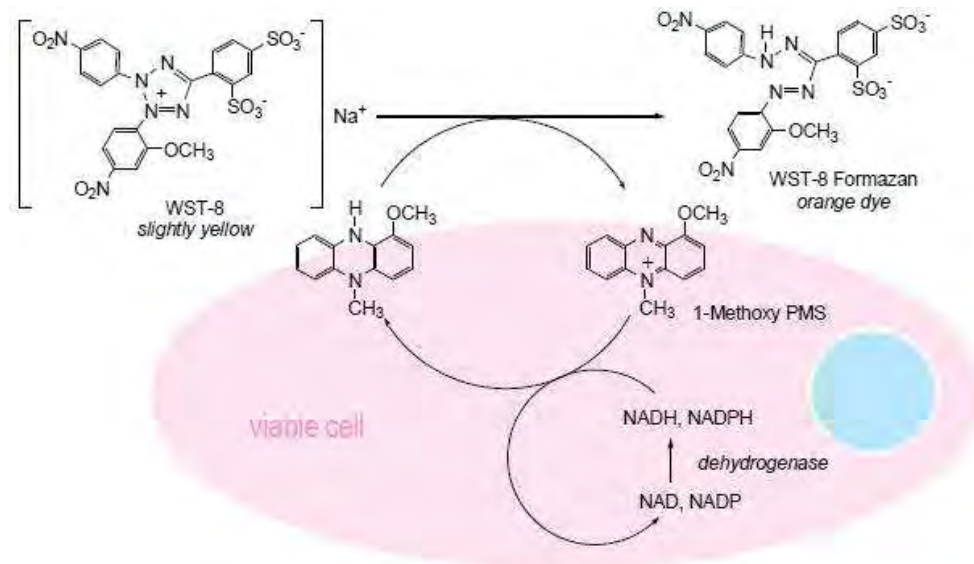


Figura 17. Mecanismo de detección de la viabilidad celular con CCK-8 (Fuente: Cell Counting Kit-8, Dojindo).

B. Determinación de la IC₅₀. Cuando se realizan ensayos de viabilidad y citotoxicidad, es posible calcular la concentración del compuesto o extracto añadido que causa un efecto letal o inhibición en el 50% de la población celular. A esta concentración media se le denomina IC₅₀ (del inglés, *half maximal Inhibitory Concentration of 50%*). Es por ejemplo, una medida cuantitativa e informativa de la eficacia de un fármaco. Este valor es útil para determinar la capacidad citotóxica de los compuestos, a la vez que permite comparar su toxicidad y evaluar si existen diferencias entre las líneas celulares mediante análisis estadísticos (Aykul and Martinez-Hackert, 2016).

Para la estimación de la IC₅₀ en pruebas de viabilidad son muy recomendados los modelos de regresión lineal. Para ello se tratan las

células con diluciones crecientes del compuesto o extracto a ensayar y, una vez pasado el tiempo de tratamiento y medida la viabilidad, se establece la curva dosis respuesta. La curva, que en este caso es de inhibición, se obtiene habitualmente de forma gráfica, representando el porcentaje de población afectado (% de inhibición), frente a la dosis en abscisas, y sigue una forma simétrica sigmoidea (**Figura 18**).

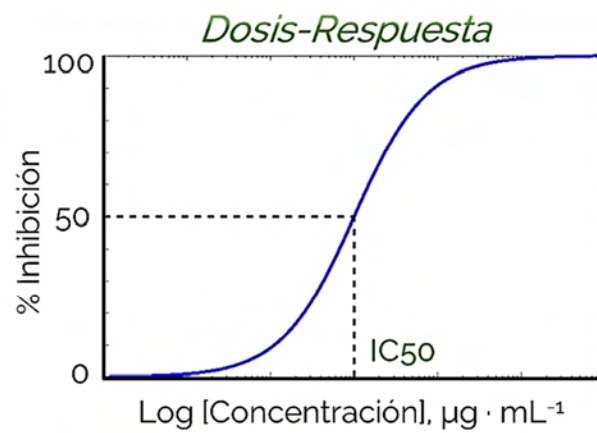


Figura 18. Ejemplo de curva de dosis-respuesta que muestra el % de inhibición en función de la concentración del fármaco.

6. REFERENCIAS

- Abbas, M., Saeed, F., Anjum, F.M., Afzaal, M., Tufail, T., Bashir, M.S., Ishtiaq, A., Hussain, S., Suleria, H.A.R. (2017). Natural polyphenols: An overview. *International Journal of Food Properties* 20(8), 1689-1699.
- Abcam, CSFE Cell Labeling Kit. Consulta: 29/10/2019, <https://www.abcam.com/cfse-cell-labeling-kit-ab113853.html>
- Abuajah, C.L., Ogbonna, A.C., Osuji, C.M. (2015). Functional components and medicinal properties of food: A review. *Journal Food Science and Technology* 52(5), 2522-2529.
- Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D.G., Lightfoot, D.A. (2017). Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants* 6(4), 42.
- Arai, S. (1996). Studies on functional foods in Japan. State of the art. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 60, 9-15.
- Avello M.L., Cisternas, I.F. (2010). Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Revista Médica de Chile* 138, 1288-1293.
- Aykul, S., Martinez-Hackert, E. (2016). Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. *Analytical Biochemistry* 508, 97-103.
- Bibliardi B., Galati, F. (2013). Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. *Trends in Food Science & Technnology* 31, 118-129.
- Biljana, B.P. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Reviews* 6(11), 1-5.
- Braithwaite, M.C., Tyagi, C., Tomar, L.K., Kumar, P., Choonara, Y.E., Pillay, V. (2014). Nutraceutical-based therapeutics and formulation strategies augmenting their efficiency to complement modern medicine: An overview. *Journal of Functional Foods* 6, 82-99.

- Brömer, R. (2009). *Annals of the History and Philosophy of Biology*, Vol. 14. Giessen, Alemania: Ed. Deutsche Gesellschaft für Geschichte und Theorie der Biologie.
- Brusotti, G., Cesari, I., Dentamaro, A., Caccialanza, G., Massolini, G. (2014). Isolation and characterization of bioactive compounds from plant sources: The role of analysis in the ethnopharmacoecological approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 87, 218-228.
- Caleja, C., Ribeiro, A., Filomena-Barreiro, M., y Ferreira, I.C.F.R. (2017). Phenolic compounds as nutraceuticals or functional food ingredients. *Current Pharmaceutical Design* 23(19), 2787-2806.
- Carocho, M., Barreiro, M., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13, 377-399.
- Cell Counting Kit-8. Cell proliferation Assay and Cytotoxicity Assay. Technical Manual. Dojindo Molecular Technologies, Inc. Consulta: 27/11/2019, https://www.dojindo.com/TechnicalManual/Manual_CK04.pdf
- Cozma, C. (2014). Determination of primary structure and affinity characterization of naturally occurring β -amyloid autoantibodies. Doctoral Thesis. Department of Chemistry, University of Konstanz.
- Dahmoune, F., Nayak, B., Moussi, K., Remini, H., Madani, K. (2015). Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves [J]. *Food Chemistry* 166, 585-595.
- Díaz-Castro, J., Guisado, R., Kajarabille, N., García, C., Guisado, M., De Teresa, C., Ochoa, J.J. (2012). *Phlebodium decumanum* is a natural supplement that ameliorates the oxidative stress and inflammatory signalling induced by strenuous exercise in adult humans. *European Journal of Applied Physiology* 112(8), 3119-3128.

- Dudeja P., Gupta, R.K. (2016). *Nutraceuticals. Food Safety in the 21st Century: Public Health Perspective*. Cambridge, MA, US: editorial Academic Press.
- Duthie, S.J., Ma, A., Ross, M.A., Collins, A.R. (1996). Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Research* 56, 1291-1295.
- EOL. Encyclopedia of Life. Consulta: 20/10/2019, <https://eol.org/pages/597265>
- Esteban Fernández, E., Guisado Barrilao, R., Teresa Galván, C., Vargas Corzo, M.C., Alejo Hervás, J.L., García Morales, C. (2005). Aporte de *Phlebodium decumanum* y acondicionamiento físico - salud para incremento de fuerza - potencia de miembro inferior: estrategias preventivas. *MD Revista científica en Medicina del Deporte* 2, 3-16.
- Gattuso, M.A., A. Amalia, S.J. Gattuso. (2008). Caracteres morfoanatómicos de especies de *Phlebodium*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas* 7, 10-17.
- González-Jurado, J.A., R. Guisado-Barrilao, E. Molina-Sotomayor, C. de Teresa Galván. (2008). Efecto protector del *Phlebodium decumanum* sobre la fatiga muscular inducida por el ejercicio en sujetos no entrenados. *Cultura, Ciencia y Deporte* 3(8), 101-106.
- González-Jurado, J.A., Teresa, C., Molina, E., de la Pradas, F., Guisado, B.R., Naranjo, O.J. (2009). Effects of the consumption of *Phlebodium decumanum* on plasma cortisol and testosterone levels in subjects participating in an exercise program. *Revista Médica de Chile* 337, 497-503.
- González-Jurado, J.A., Pradas De la Fuente, F., Molina, E., de Teresa, C. (2011). Effect of *Phlebodium decumanum* on the immune response induced by training in sedentary university students. *Journal of Sports Science and Medicine* 10(2), 315-321.

- Gridling, M., Stark, N., Madlener, S., Lackner, A., Popercu, R., Benedek, B., Krupitza, G. (2009). *In vitro* anti-cancer activity of two ethnopharmacological healing plant from Guatemala *Pluchea odorata* and *Phlebodium decumanum*. *International Journal of Oncology* 34, 1117-1128.
- Guerra, F., Pérez de Soto, A., Ibañez, M. (1762). *Pharmacopoeia matritensis*. Editio secunda locupletior, et longè emendatior. Tyq Antonio Perez de Soto.
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 27, 1-93.
- Gupta, M.P. (1995). *270 Plantas Medicinales Iberoamericanas*. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Convenio Andrés Bello. Colombia: Ed. Presencia Ltd., páginas 451-453.
- Hawley, T.S., Hawley, R.G. (2011). *Flow Cytometry Protocols*. 3ª Ed. Methods in Molecular Biology. Washington, DC, USA: Humana Press.
- Hooker, W.J., Bauer, F.A. (1842). *Genera Filicum: Or illustrations of the ferns, and other Allied genera*. London, UK: H. G. Bohn.
- IFIC. International Food Information Council. *Functional foods: Attitudinal research*. Consulta: 18/10/2019, <https://foodinsight.org>
- Invitrogen. Flow cytometry. Consulta: 28/10/2019, <http://media.invitrogen.com.edgesuite.net/tutorials/4IntroFlow/player.html>
- Jurado, J.A.G. (2003). Efectos del BK-4 (*Phlebodium decumanum*) sobre la fatiga muscular y el rendimiento físico-deportivo en adultos jóvenes sometidos a un programa de acondicionamiento físico general. Tesis Doctoral. Departamento de Enfermería, Universidad de Granada.
- Khoddami, A., Wilkes, M.A., Roberts, T.H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* 18, 2328-2375.

- Liu, B., Diaz, F., Bohlin, L., Vasänge, M. (1998). Quantitative determination of antiinflammatory principles in some Polypodium species as a basis for standardization. *Phytomedicine* 5, 187-94.
- Liu, M., Wang, Y., Liu, Y., Ruan, R. (2016). Bioactive peptides derived from traditional Chinese medicine and traditional Chinese Food: A review. *Food Research International* 89, 63-73.
- Lordan, R., Zabetakis, I. (2017). The anti-inflammatory properties of dairy lipids. *Journal of Dairy Science* 100(6), 4197-4212.
- Mckinnon, K.M (2018). Flow cytometry: An overview. *Current Protocols in Immunology* 21, 120-125.
- Martín-Blas, T., Serrano-Fernández, A. Espectrometría de Masas. Universidad Politécnica de Madrid (UPM), España. Consulta: 31/10/2019, <http://www2.montes.upm.es/dptos/digfa/cfisica/magnet/espectro metro.html>
- Morales, M.C.G. (2007). Efectos de la melatonina, coenzima Q10 y *Phlebodium decumanum* sobre el estrés oxidativo en el ejercicio físico intenso. Tesis Doctoral. Departamento de Enfermería, Universidad de Granada.
- Nolvachai, Y., Marriott, P.J. (2013). GC for flavonoids analysis: Past, current, and prospective trends. *Journal of Separation Sciences* 36(1), 20-36.
- Ocampo, R.A., Martínez, J.V., Cáceres, A. (2007). *Manual de agrotecnología de plantas medicinales nativas*. San José, Costa Rica: Ed. Sanabria, páginas 105-119.
- Olarte, M.N. (2006). *Remedios para el imperio: historia natural y la apropiación del Nuevo Mundo*. Universidad de los Andes, Colombia.
- Prointech. Markers for immune cells. Consulta: 31/10/2019, <https://www.labome.com/method/T-Cell-Markers-and-B-Cell-Markers.html>

- Punzon, C., Alcaide, A., Fresno, M. *In vitro* anti-inflammatory activity of *P. decumanum*. Modulation of tumor necrosis factor and soluble TNF receptors. *International Immunopharmacology* 3(9), 1293-1299.
- Quah, B.J.C., Parish, C.R. (2010). The use of carbocyclofluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation. *Journal of Visualized Experiments* 44, 2259.
- Rajendran S.R.C.K., C.E.C.C. Ejike, C.E.C.C., Gong, M., Hannah, W., Udenigwe, C.C. (2017). Preclinical evidence on the anticancer properties of food peptides. *Protein and Peptide Letters* 24(1), 126-136.
- Ratra, M., Gupta, R. (2015). Future prospects and aspects of herbal drug discovery in herbal medicinal plants. *Columbia Journal of Pharmaceutical Sciences* 2(2), 16-21.
- Rohloff, J. (2015). Analysis of phenolic and cyclic compounds in plants using derivatization techniques in combination with GC-MS-based metabolite profiling. *Molecules* 20, 3131-3462.
- Rojas-Molina, R., Castro-López, C., Sánchez-Alejo, E.J., Niño-Medina, G., Cristian-Martinez, G. (2016). *Phenolic compound recovery from grapefruit and by-products: An overview of extraction methods*. En: Morata, A., and Loira, I. (Eds.) *Grape and wine biotechnology*. 1ª Ed. InTech: Reino Unido, 103-123.
- Romar, G.A., Kupper, T.S., Divito, S.J. (2016). Research techniques made simple: Techniques to assess cell proliferation. *Journal of Investigative Dermatology* 136(1), e1-e7.
- Ruiz, H. (1796). *Disertaciones sobre la raiz de la ratánhia, de la calaguala y de la china, y acerca de la yerba llamada canchalagua*. En la Imprenta Real. Madrid, España.
- Ruiz, H. (1805). *Memoria sobre la legítima calaguala y otras dos raíces que con el mismo nombre nos vienen de la América meridional*, Imprenta de D. José del Collado, Digitalized by Complutense University of Madrid, Spain, 60 pp.

- Sadidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K.M., Latha, L.Y. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 8(1), 1-10.
- Shahid, M., Yusuf, M., Mohammad, F. (2015). *Plant phenolics: A review on Modern extraction techniques*. En: Govil, J.N., and Pathak, M. (Eds.), Analytical and Processing Techniques. Series: *Recent Progress in Medicinal Plants*. Studium Press LLC: USA.
- Sinobiological. Flow Cytometry (FCM) /FACS. What is Flow Cytometry. Consulta: 28/10/2019, <https://www.sinobiological.com/flow-cytometry-fcm-facs-what-is-flow-cytometry.htm>
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A. (2003). Cromatografía de gases. En: *Principios de análisis instrumental. Quinta edición*. Madrid, España: McGraw Hill/Interamericana de España, S.A.U.
- Smith, C. (2013). Common methods of measuring cell proliferation. Biocompare. The buyer's guide for life scientists. Consulta: 27/10/2019, <https://www.biocompare.com/Editorial-Articles/146165-Common-Methods-of-Measuring-Cell-Proliferation>
- Sotomayor, E.M. (2002). Efectos del *Phlebodium decumanum* en el estrés oxidativo y la disfunción inmune provocado por el ejercicio físico extenuante. Tesis Doctoral. Departamento de Enfermería, Universidad de Granada.
- Spence, J.T. (2006). Challenges related to the composition of functional foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 19, S4-S6.
- Stote, K., Clevidence, B., Novotny, J., Henderson, T., Radecki, S., Baer, D. (2012). Effect of cocoa and green tea on biomarkers of glucose regulation, oxidative stress, inflammation and hemostasis in obese adults at risk for insulin resistance. *European Journal of Clinical Nutrition*, 66, 1153-1159.

- Tario, J.D., Muirhead, K.A., Pan, D., Munson, M.E., Wallace, P.K. (2011). Tracking immune cell proliferation and cytotoxic potential using flow cytometry. En *Flow Cytometry Protocols. Methods in Molecular Biology*. 3ª Ed. Hawley, T.S., y Hawley, R.G. (Eds.). Humana Press.
- Thaipitakwong, T., Numhom, S., Aramwit, P. (2018). Mulberry leaves and their potential effects against cardiometabolic risks: A review of chemical compositions, biological properties and clinical efficacy. *Pharmaceutical Biology* 56(1), 109-118.
- The Institute for Regional Conservation. Delray Beach, Florida. Consulta: 20/10/2019, <https://www.regionalconservation.org/index.html>
- ThermoFisher Scientific. Cell Trace™ CFSE Cell Proliferation Kit for flow cytometry. Consulta: 29/10/2019. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C34554#/C34554>
- Upadhyay, S., Dixit, M. (2015). Role of polyphenols and other phytochemicals on molecular signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015:504253.
- Vargas-Corzo, M.C., Aguilar-Cordero, M.J., de Teresa-Galván, C., Segura-Millán, D., Miranda-León, M.T., Castillo-Rueda, G., Guisado-Barrilao, R. (2014). Beneficios de la ingesta del *Phlebodium decumanum* sobre el daño muscular al efectuar ejercicio físico intenso en sujetos sedentarios. *Nutrición Hospitalaria* 29(6), 14068-1418.
- Vasänge-Tuominen, M., Perera-Ivarsoon, P., Shen, J., Bohlin, L., Rolfsen, W. (1994). *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 50, 279-284.
- Vasänge, M., Rolfsen, W., Bohlin, L. (1997). A sulphoglycolipid from the fern *Polypodium decumanum* and its effect on the platelet activating-factor receptor in human neutrophils. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 49(5), 562-566.
- WHO. World Health Organization. (1998). *Guidelines for the appropriate use of herbal medicine*, 88 pages.

- WHO. World Health Organization. (2013). *Traditional medicine strategy: 2014- 2023*. World Health Organization; Geneva, Switzerland.
- Willför, S.M., Smeds, A.I., Holmbom, B.R. (2006). Chromatographic analysis of lignans. *Journal of Chromatography A* 1112 (1-2), 64-77.
- Xie, J.H., Jin, M.J., Morris, G.A., Zha, X.Q., Chen, H.Q., Yi, Y., Nie, S.P. (2015). Advances on bioactive polysaccharides from medicinal plants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56, S60-S84.
- Xu, C.C., Wang, B., Pu, T.Q., Tao, J.S., Zhang, T. (2017). Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plants materials. *Chinese Journal of Natural Medicines* 15(10), 721-731.
- Yesares Ferrer, M., Mendoza Medina, J.A., Ruíz Cáceres, G.M., Alcaide García, A., Yesares Morillas, E. (2001). Hydrosoluble fractions of *Phlebodium decumanum* and use thereof as nutritional complements in aids and cancer patients. United States Invention Patent, US 6,228,366B1. Helsint, S.A.L.

CAPÍTULO I

Establecimiento del perfil
cromatográfico, *huella dactilar*,
de *Phlebodium decumanum*
mediante HPLC-UV-Vis (DAD)

Los ensayos realizados en este capítulo I se han desarrollado en los laboratorios de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada (FQ338) y se han concretado junto con el siguiente capítulo en un trabajo que se encuentra publicado en la revista "Analytical Letters" 2019, VOL. 52, NO. 13, 2107-2132 (ver anexo I).

1

Establecimiento del perfil cromatográfico, *huella dactilar*, de *Phlebodium decumanum* mediante HPLC-UV Vis (DAD)

1. INTRODUCCIÓN

Como ya se dijo en el capítulo de introducción, *Phlebodium decumanum* (*P. decumanum*), ha sido utilizado desde tiempos remotos por las civilizaciones de Centro y Sud América como planta medicinal, en forma de infusión de fronde y rizoma, para el tratamiento de una gran variedad de afecciones relacionadas con trastornos dermatológicos, procesos inflamatorios e incluso cáncer (Ruiz, 1805; Liu et al., 1998; Yesares Ferrer et al., 2001; Gattuso, Amalia and Gattuso, 2008; González-Jurado et al., 2008). Horvath et al., demostraron el efecto antitumoral *in vitro* e *in vivo* de una fracción acuosa de dicho helecho. Desde entonces, se han estudiado profundamente extractos obtenidos de *P. decumanum*, describiéndose su perfil inmunomodulador / inmunosupresor y sus propiedades antioxidantes y antirradicales libres (Punzón et al., 2003; Gonzalez-Jurado et al., 2011; Díaz-Castro et al., 2012).

Actualmente, se comercializan diferentes formulaciones a partir de una fracción hidrosoluble, purificada y estandarizada de los frondes de *P. decumanum*, patentada y registrada como EXPLY-37®, desarrolladas para su uso como suplementos nutricionales. Estas formulaciones son útiles, por ejemplo, para mejorar el estado de debilitamiento general y el síndrome caquético de pacientes de SIDA y cáncer. Mejoran la eficacia de los tratamientos convencionales y ayudan a la recuperación de los pacientes sometidos a dichos tratamientos (Yesares-Ferrer et al., 2001). Además, Helsint S.A.L. ha desarrollado juntamente con la empresa distribuidora INFISPORT, el complemento nutricional EXPLIVAR®, destinado al desarrollo y mejora de la actividad física.

Hoy en día, el desconocimiento de los compuestos presentes en esta especie, así como sus potenciales propiedades, hace necesario un estudio más profundo, comenzando con el estudio de su perfil cromatográfico.

En primer lugar, es necesario el establecimiento de un método cromatográfico de calidad que permita una adecuada separación de los compuestos y la obtención de un perfil químico representativo “*huella dactilar*” de los diferentes componentes extraídos del helecho con picos bien resueltos. Dadas las propiedades fisicoquímicas de los analitos a separar, la cromatografía de líquidos es la técnica más idónea, por ser altamente eficiente en el análisis de productos naturales. Como en toda técnica cromatográfica, el desarrollo del método es un proceso laborioso, que requiere de la optimización de todos los parámetros operativos (selección de la columna analítica, las fases móviles efectivas, gradiente) para lograr la máxima resolución de los picos cromatográficos en el menor tiempo de análisis. La simplicidad debe ser un objetivo importante al diseñar la estrategia de desarrollo del método para evitar así la complejidad

innecesaria. Por ejemplo, no es necesario un gradiente, cuando los analitos se pueden separar fácilmente bajo condiciones isocráticas.

El óptimo desarrollo del método analítico es crucial para el posterior análisis de los componentes y la identificación de estructuras desconocidas. Además, la separación química permite el aislamiento y purificación de compuestos de interés a partir del extracto que, seguida de ensayos de actividad farmacológica (bioensayos), es la base para el descubrimiento de nuevos componentes activos de provenientes de fuentes naturales. Y finalmente, no debemos olvidar que las “*huellas dactilares*” pueden usarse como una herramienta de identificación para la identificación de hierbas y sus especies (Alaerts et al., 2007) y para determinar su estabilidad (CHMP, junio de 2018). La Organización Mundial de la Salud acepta la cromatografía de la huella dactilar como técnica de identificación, evaluación de calidad y estandarización para hierbas medicinales (WHO, 1991). Esto es muy importante desde la perspectiva del *P. decumanum* como producto nutricional, ya que el establecimiento del perfil químico característico es la base para la seguridad y el control de calidad de toda planta medicinal.

2. OBJETIVO

El objetivo principal del presente capítulo es la **propuesta de un método analítico que permita establecer el perfil químico “huella dactilar” representativo y reproducible de los diferentes compuestos extraídos del extracto hidro-etanólico de *P. decumanum* mediante cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de Diodos Array (HPLC-DAD)**. Para ello es necesaria la optimización de aquellos parámetros químicos e instrumentales que afectan a la resolución y la simetría de los picos cromatográficos: probar la influencia de la fase móvil, el gradiente de elución, las características de la columna y finalmente, el flujo de la fase móvil. Una vez establecida la huella dactilar característica del extracto, se evaluó además la estabilidad a corto y largo plazo, bajo distintas condiciones de temperatura.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos y disolventes

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Para el establecimiento del perfil cromatográfico característico del extracto de *P. decumanum* se utilizaron los siguientes disolventes obtenidos de distintas casas comerciales: agua desionizada obtenida de un sistema de purificación de agua Milli-Q® Advantage A10 de Millipore (Bedford, MA, USA); ácido fórmico ≥ 98 % usado para el ajuste de pH proporcionado por MERCK (Darmstadt, Alemania); metanol de calidad masas UHPLC-MS obtenido de Scharlab (Barcelona, España); y acetonitrilo $\geq 99.9\%$ grado gradiente HiPerSolv CHROMANORM® para HPLC. El metanol de grado técnico fue proporcionado por VWR™ ProLaboChemicals (Barcelona, España).

3.2. Material de laboratorio

Para el desarrollo del trabajo experimental de esta parte, se utilizaron los siguientes materiales de laboratorio:

- Matraces aforados de clase A de diferentes volúmenes.
- Viales de vidrio ámbar de 10 mL.
- Vasos de precipitados de diferentes capacidades.
- Tubos Eppendorf de 1.5 y 2 mL de capacidad.
- Micropipetas de 100, 200 y 1000 μL .
- Pipetas *Pasteur* de vidrio y tetinas de goma.
- Botellas de vidrio graduadas de 1L Pyrex®.

- o Parafilm M® Laboratory Film.
- o Viales de vidrio ámbar para inyección cromatografía de líquidos de 1.5 mL.
- o Tapones de rosca para viales cromatográficos.
- o Sistema refrigerador capaz de alcanzar y mantener una temperatura de $4.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ y $-20 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$.

La limpieza y mantenimiento del material de vidrio empleado en contacto con el extracto se realizó con detergente, mezcla crómica y posterior enjuague con abundante agua y metanol. El resto de material de vidrio que no estuvo en contacto con ningún tipo de residuo orgánico se lavó únicamente con detergente y agua, e igualmente se enjuagó con abundante agua desionizada y metanol.

3.3. Instrumentación y software

Las muestras de extracto de *P. decumanum* resultantes tras la extracción (**ver apartado 3.4.1**) se liofilizaron usando un equipo de liofilización SCANVAC CoolSafe™ (LaboGene™, Skanderborg, Dinamarca). Otro material de laboratorio empleado incluye agitador vortex (IKA, Staufen, Alemania), balanza analítica Mettler-Toledo AND GX400 (Columbus, OH, USA) y centrífuga Spectrafuge™ 24D de Labnet International, Inc. (Nueva Jersey, USA). El perfil químico del extracto de *P. decumanum* se obtuvo empleando un cromatógrafo de líquidos Agilent 1100 series provisto de desgasificador a vacío, muestreador automático, bomba binaria, y detector de diodos array (DAD) (modelo G1315B; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) (**Figura 1.1**). Para el establecimiento del perfil cromatográfico se ensayaron las siguientes columnas analíticas: LiChrosphere C8 (125 x 4.0

mm, 5 μm) y Gemini C18 (150 x 4.6 mm, 5 μm) obtenidas de Phenomenex (Torrance, CA, USA); Mediterranean Sea C18 (100 x 4.6 mm, 3 μm) de Teknokroma (Barcelona, Spain); LichroCARTLiChrospher C18 (250 x 4.0 mm, 5 μm) de Merck (Darmstadt, Germany); Atlantis C18 T3 (150 x 4.6 mm, 5 μm), X-Bridge C18 (150 x 4.6 mm, 5 μm) y SunFire C18 (150 x 4.6 mm, 5 μm) de Waters (Manchester, UK) (**Figura 1.6**).



Figura 1.1. Cromatógrafo de líquidos convencional con detector de fotodiodos array, Agilent 1100 Series.

Durante el desarrollo del proyecto, se adquirió un equipo de cromatografía de líquidos de ultra alta resolución ACQUITY UPLC H-Class PLUS System (Waters, Manchester, UK) (**Figura 1.2**), provisto de una bomba cuaternaria (Quaternary Solvent Manager, Acquity UPLC H Class, Waters), un inyector (Sample Manager-FTN Flow-Through Needle, Acquity UPLC,

Waters) y dos detectores: Fotodiodos Array (PDA) y Espectrómetro de Masas de cuadrupolo simple (QDa), que también se utilizó para el establecimiento de la huella dactilar del extracto. La fase estacionaria empleada en este caso fue una columna AQCUITY UPLC HSS T3 (2.1 x 100 mm; 1.8 μm). La columna se muestra en la **Figura 1.3**.

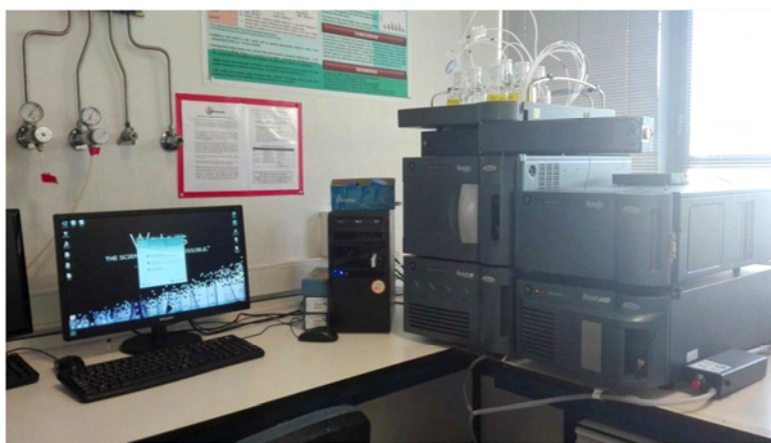


Figura 1.2. Cromatógrafo de líquidos de ultra resolución acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolo simple (UHPLC-MS (QdA)) empleado para la caracterización del extracto de *P. decumanum*.

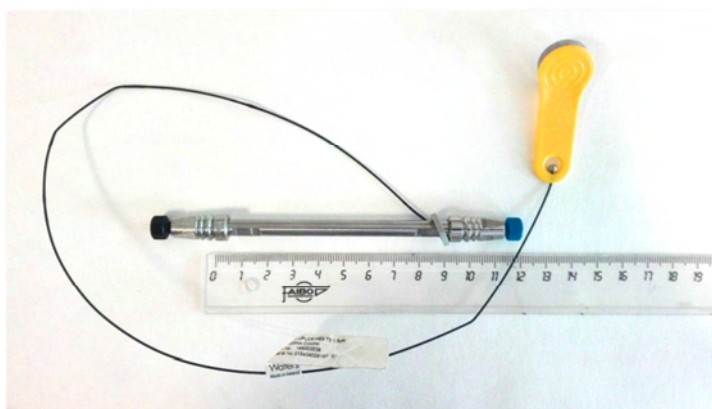


Figura 1.3. Columna AQCUITY UPLC HSS T3; 1.8 μm ; 10cm empleada en la caracterización del extracto de *P. decumanum* en UHPL-PDA.

Los softwares empleados para el control de los equipos y la adquisición y análisis de los cromatogramas, mediante HPLC y UPLC respectivamente, fueron ChemStation B.03.02 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) (HPLC) y Acquity UPLC Console versión 1.51.3347 conjuntamente con Empower® 3 Build 3471 (UPLC) (Waters).

3.4. Preparación y análisis del extracto

3.4.1. Proceso de extracción

El extracto se preparó a partir de las hojas de *P. decumanum* de acuerdo con la patente US 6228366 propiedad de Helsint (Yesares-Ferrer et al., 2001). Para ello se partió de las hojas esporuladas recién cosechadas y picadas que se prensaron y secaron con con aire a una temperatura entre 40 y 50°C. Posteriormente, fueron molidas obteniéndose una mezcla de pequeñas partículas y polvo fino. Se pesaron 100 g de la mezcla y se extrajo tres veces con 400 mL de etanol/agua desionizada (7:3, v/v) a 40°C durante 12 h. El extracto hidroetanólico resultante se concentró a presión reducida hasta la completa eliminación del alcohol.

La fina suspensión obtenida se trató tres veces con un volumen igual de disolvente no polar, éter de petróleo o mezclas de éter de petróleo / diclorometano, para eliminar los lípidos residuales. La fracción una vez deslipidada se purificó haciéndola pasar a través de una columna de resina de intercambio iónico, seguida de una filtración con carbón activado y metabisulfito de sodio. La fracción purificada obtenida se concentró a presión reducida hasta obtener una composición constante y reproducible dentro de un rango estrecho (con un contenido final de agua del 20% y 5-10% de

extracto, 5-10 g). Este extracto se liofilizó a -110°C y 200 hPa, y se almacenó en viales ámbar en oscuridad a 4°C hasta su análisis.

3.4.2. Preparación de la muestra

Una alícuota de 0.3 g de muestra de extracto previamente liofilizado se disolvió completamente en 10 mL de la fase móvil inicial utilizada en el análisis de HPLC. En todos los análisis se utilizó como disolvente la fase móvil de partida ya que una composición de la muestra semejante mejora en muchos casos la sensibilidad de la señal y forma de los picos. Seguidamente, la disolución se centrifugó a $16.300 \times g$ durante 10 min y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de jeringa de nylon de $0.22 \mu\text{m}$ en viales de vidrio ámbar de 2 mL. Las muestras ya listas para el análisis se inyectaron directamente en el sistema HPLC-DAD.

3.4.3. Análisis mediante HPLC-UV Vis (DAD)

La separación de los compuestos fitoquímicos del extracto de *P. decumanum* se llevó a cabo en una columna Atlantis C18 T3 (4.6 x 150 mm; tamaño de partícula $5 \mu\text{m}$). El análisis se realizó a una temperatura de 30°C con un programa de elución en gradiente. Los disolventes de la fase móvil utilizados fueron agua (A) y metanol (B), ambos acidificados con 0.1 % de ácido fórmico. El gradiente final empleado fue el siguiente: 0.0 – 5.0 min, 5% B; 5.0 – 45.0 min, 100% B; 45.0 – 48.0 min, 100% B y, finalmente, de vuelta al 5% en 0.1 min (tiempo total de ejecución = 48.1 min). El tiempo de equilibrado de la columna fue de 4.9 min. La velocidad de flujo fue de 0.7 mL min^{-1} y el volumen de inyección $20 \mu\text{L}$. La detección UV-vis se realizó simultáneamente a las longitudes de onda de 257.8 nm, 310.8 nm, 350.8 nm, 230.16 nm y 280.16 nm.

3.4.4. Análisis mediante UHPLC-PDA

Partiendo de las condiciones óptimas anteriormente optimizadas para el análisis del extracto mediante HPLC-DAD, se desarrolló un método UHPLC-PDA. La separación cromatográfica de los compuestos se realizó usando una columna AQCUITY UPLC HSS T3 (2.1 x 100 mm; tamaño de partícula 1.8 μm). En las condiciones cromatográficas adaptadas a UPLC que se detallan a continuación. Se mantuvieron las mismas fases móviles, 0.1 % de ácido fórmico en agua (fase A) y 0.1 % de ácido fórmico en metanol (fase B). Se usó el siguiente gradiente: 0.0-0.41 min, 5% B; 0.41-12.17 min, 100 % B, 12.17-12.60 min, 100% B, y vuelta al 5% en 0.02 min hasta el min 17. La velocidad de flujo se fijó en 0.3 mL min⁻¹ y el volumen de inyección en 10 μL .

3.5. Evaluación de la estabilidad

Se evaluó el efecto del tiempo y la temperatura de almacenamiento del extracto etanólico de *P. decumanum* durante 1 año a $-20 \pm 1.0^\circ\text{C}$, $4 \pm 1.0^\circ\text{C}$ y $25 \pm 2.0^\circ\text{C}$. Se prepararon disoluciones de 10 mL de extracto a una concentración de 300 mg mL⁻¹ en la fase móvil inicial tal y como se indica en **apartado 3.4.2**. La disolución final se transfirió a viales de ámbar de 1.5 mL que se cubrieron con papel de aluminio para evitar la incidencia de la luz. Finalmente, fue almacenado durante 12 meses a las temperaturas anteriormente comentadas. El perfil químico del extracto se estudió mediante HPLC-DAD con el método analítico previamente desarrollado y descrito en este capítulo. Las muestras de extracto se analizaron periódicamente una vez a la semana durante el transcurso del primer mes, y después una vez cada 30 días hasta llegar al año.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Método cromatográfico. Optimización de parámetros cromatográficos

Como se ha comentado con anterioridad, el primer objetivo de la tesis fue obtener un perfil químico característico y reproducible (huella dactilar) del extracto de *P. decumanum* mediante HPLC-DAD. Para optimizar la separación cromatográfica se estudió la influencia de la composición de la fase móvil, el gradiente de elución, las características de la columna analítica y finalmente la velocidad de flujo.

4.1.1. Composición de la fase móvil

Con objeto de mejorar la resolución y la simetría de los picos cromatográficos, se ensayaron diferentes composiciones de fase móvil y gradientes. El estudio de la fase móvil es crucial, debido a que puede afectar de manera notable a la separación cromatográfica. El extracto de *P. decumanum* es extremadamente soluble en agua y, dada la naturaleza polar de los compuestos que lo componen, se optó por la modalidad de cromatografía en *fase inversa*.

Inicialmente se seleccionó una columna cromatográfica de relleno apolar C18 (LichroCARTLiChrospher, 250 x 4.0 mm, 5 μ m) y se establecieron las siguientes condiciones de partida:

Tabla 1.1. Gradiente inicial (gradiente 01).

Tiempo (min)	A%	B%	Flujo (mL min ⁻¹)
0	95	5	0.35
15	0	100	0.35
25	95	5	0.35

Los disolventes polares más utilizados en fase inversa son el agua, el metanol y el acetonitrilo. El agua desionizada se eligió como eluyente de cromatografía del canal A (fase A) mientras que el metanol y el acetonitrilo, así como diversas mezclas de estos disolventes se evaluaron como fases móviles orgánicas (fase B). El acetonitrilo dio resultados poco satisfactorios debido a su tendencia a reducir el tiempo de análisis y producir la superposición de los picos cromatográficos, por lo que se descartó. Se optó por el metanol como fase B debido a la mejora en la sensibilidad, la forma de los picos y la capacidad de resolución.

Por otro lado, se evaluó la influencia del pH sobre el perfil cromatográfico mediante la acidificación o alcalinización de la fase móvil. La estabilidad de una columna analítica depende en gran medida del pH. Las columnas de fase inversa toleran valores de pH comprendidos entre 2.5 y 8. Valores por encima o por debajo de este rango, pueden deteriorar drásticamente la fase estacionaria y disminuir su tiempo de vida. La modificación del pH tiene mucha importancia ya que la concentración de iones H^+ afecta a la carga de los grupos silanoles enlazados en la fase estacionaria y contribuye en la ionización de los compuestos de la muestra, pudiendo en muchos casos modificar la separación cromatográfica.

Como aditivos de la fase móvil se ensayaron ácido fórmico y ácido acético (de 0% a 0.2%, v/v), amoníaco (de 0% a 0.050%, p/v), y diferentes mezclas de ellos. Los cromatogramas mostraron una mejora en los parámetros cromatográficos cuando se emplearon las fases móviles a pH ácido. La respuesta y forma de pico óptimas se obtuvieron utilizando ácido fórmico al 0.1 % (v/v). Por tanto, la composición óptima de la fase móvil fue agua (fase A) y metanol (fase B) ambos acidificados con un 0.1% (v/v) de ácido fórmico.

4.1.2. Optimización del gradiente y del flujo

Una vez seleccionada la fase móvil y su composición óptima, se procedió a la optimización conjunta del gradiente y del flujo, con el fin de encontrar un compromiso entre el consumo de eluyente, la sensibilidad y la resolución.

El análisis cromatográfico puede llevarse a cabo en dos modalidades distintas: manteniendo constante la composición de la fase móvil (modo *isocrático*) y variando de forma proporcional la composición de la fase móvil (*modo gradiente*). El método isocrático no fue adecuado para resolver todos los picos debido a la complejidad del extracto y el gran número de compuestos analizados. En consecuencia, se procedió a llevar a cabo una elución en gradiente. Partiendo de las condiciones iniciales descritas en la **Tabla 1.1**, se ensayaron numerosos gradientes con objeto de evaluar cuál producía una mejor resolución cromatográfica. El resto de los parámetros cromatográficos, como el volumen de inyección y composición de las fases móviles, se mantuvieron constantes. A continuación, se muestran algunos de los resultados obtenidos junto con los cromatogramas correspondientes.

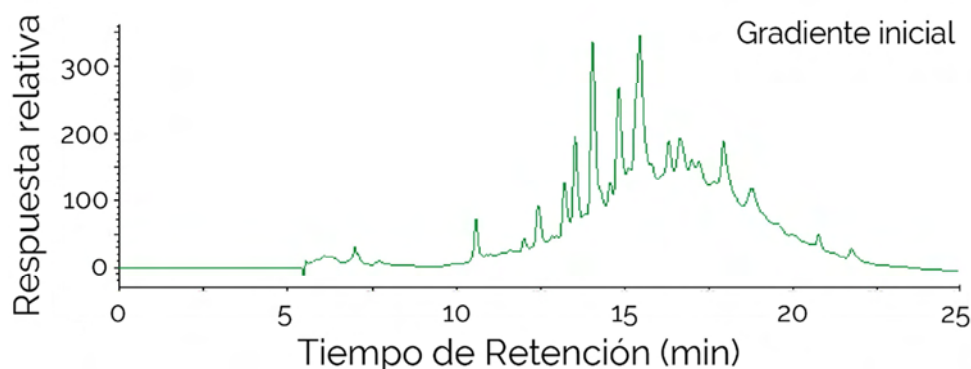


Figura 1.4. Perfil cromatográfico obtenido con el gradiente inicial (gradiente 01).

Tabla 1.2. Gradientes ensayados.

	Tiempo (min)	A%	B%	Flujo (mL min ⁻¹)
Gradiente 02	0	100	0	0.35
	5	95	5	0.35
	15	0	100	0.35
	25	100	0	0.35
Gradiente 03	0	95	5	0.35
	15	0	100	0.35
	30	95	5	0.35
Gradiente 04	0	95	5	0.35
	15	0	100	0.35
	25	0	100	0.35
	25.1	95	5	0.35
Gradiente 05	0	95	5	0.70
	15	0	100	0.70
	25	0	100	0.70
	25.1	95	5	0.70
Gradiente 06	0	95	5	0.70
	35	0	100	0.70
	38	0	100	0.70
	38.1	95	5	0.70
Gradiente 07	0	95	5	0.70
	45	0	100	0.70
	48	0	100	0.70
	48.1	95	5	0.70
Gradiente 08	0.0	95	5	0.70
	5.0	95	5	0.70
	35.0	0	100	0.70
	38.0	0	100	0.70
	38.1	95	5	0.70
	43.0	95	5	0.70
Gradiente 09	0.0	95	5	0.70
	5.0	95	5	0.70
	45.0	0	100	0.70
	48.0	0	100	0.70
	48.1	95	5	0.70
	50.0	95	5	0.70
Gradiente 10	0.0	95	5	0.70
	5.0	95	5	0.70
	55.0	0	100	0.70
	58.0	0	100	0.70
	58.1	95	5	0.70
	60.0	95	5	0.70

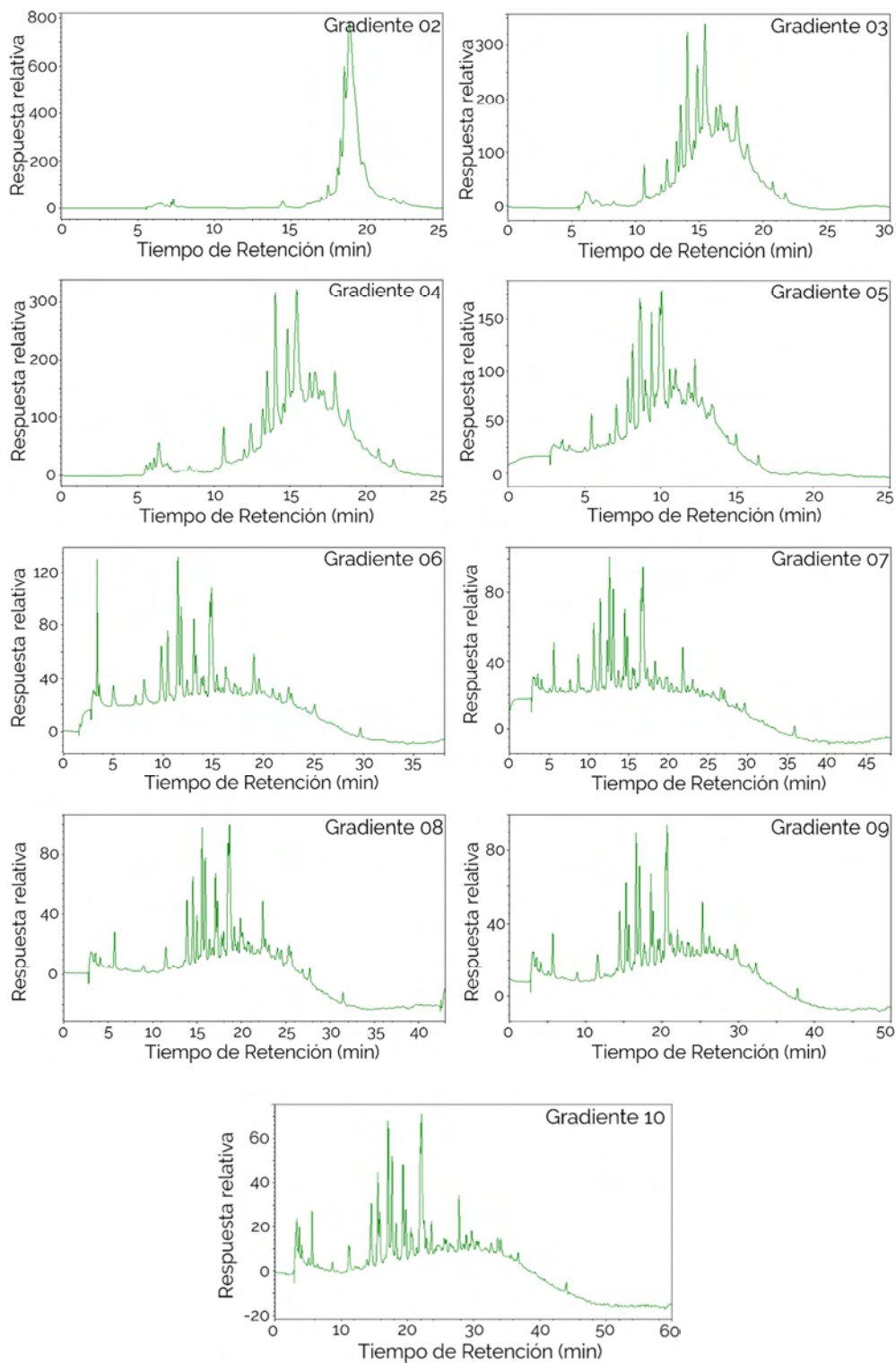


Figura 1.5. Cromatogramas de los gradientes ensayados.

A la vista de los resultados obtenidos, se adoptó como solución de compromiso el **gradiente lineal 09** (flujo de 0.70 mL min^{-1}), resultado de la combinación de los gradientes 07 y 08 (**Tabla 1.2**): 0.0-5.0 min, 5% B; 5.0-45.0 min, 100% B; 45.0-48.0 min, 100% B; 48.0-48.1, 5%B (vuelta a las condiciones iniciales), manteniéndose hasta el min 50 para el equilibrado de la columna. Aunque el gradiente 10 produjo la misma resolución de los picos cromatográficos, se seleccionó el gradiente 09 por ser el tiempo de análisis más corto.

4.1.3. Selección de la fase estacionaria

Con el fin de optimizar la separación cromatográfica de los distintos componentes del extracto, se estudiaron distintas fases estacionarias. Se realizó un estudio de diferentes columnas de cromatografía de fase inversa de distinta longitud, diámetro y relleno.

El relleno más común utilizado en la fase inversa es sílice enlazada a cadenas alquílicas de longitud variable que muestran distintos grados de polaridad. Para la separación de los componentes químicos del extracto se han seleccionado varios tipos de columnas de buenas características que ofrecen un empaquetamiento uniforme y una elevada resistencia física y química con relleno apolar. Se ensayaron una columna RP C8 y seis columnas RP C18:

- Columna 1: LiChrosphere C8 $5 \mu\text{m}$, $4.0 \times 125 \text{ mm}$.
- Columna 2: Gemini C18 $5 \mu\text{m}$, $4.6 \times 150 \text{ mm}$.
- Columna 3: Mediterranean Sea C18 $3 \mu\text{m}$, $4.6 \times 100 \text{ mm}$.
- Columna 4: LichroCART LiChrospher 100 C18, $5 \mu\text{m}$ $4.0 \times 250 \text{ mm}$.

- o Columna 5: Atlantis C18 T3 5 μm , 4.6 x 150 mm.
- o Columna 6: X-Bridge C18 5 μm , 4.6 x 150 mm.
- o Columna 7: SunFire C18 5 μm , 4.6 x 150 mm.



Figura 1.6. Columnas ensayadas en la optimización de la fase estacionaria.

De las columnas estudiadas, las columnas C18 proporcionaron mejores perfiles de pico. De las C18 ensayadas, las columnas Gemini, Atlantis y Sunfire fueron las que presentaron una mejor relación entre separación, tiempo de análisis y resolución de los analitos presentes. Finalmente, se seleccionó la columna Atlantis T3 C18 debido a su estabilidad y robustez y la mejor resolución y picos más estrechos obtenidos. La **Figura 1.7** muestra el perfil cromatográfico obtenido a 310 nm de cada una de las columnas ensayadas.

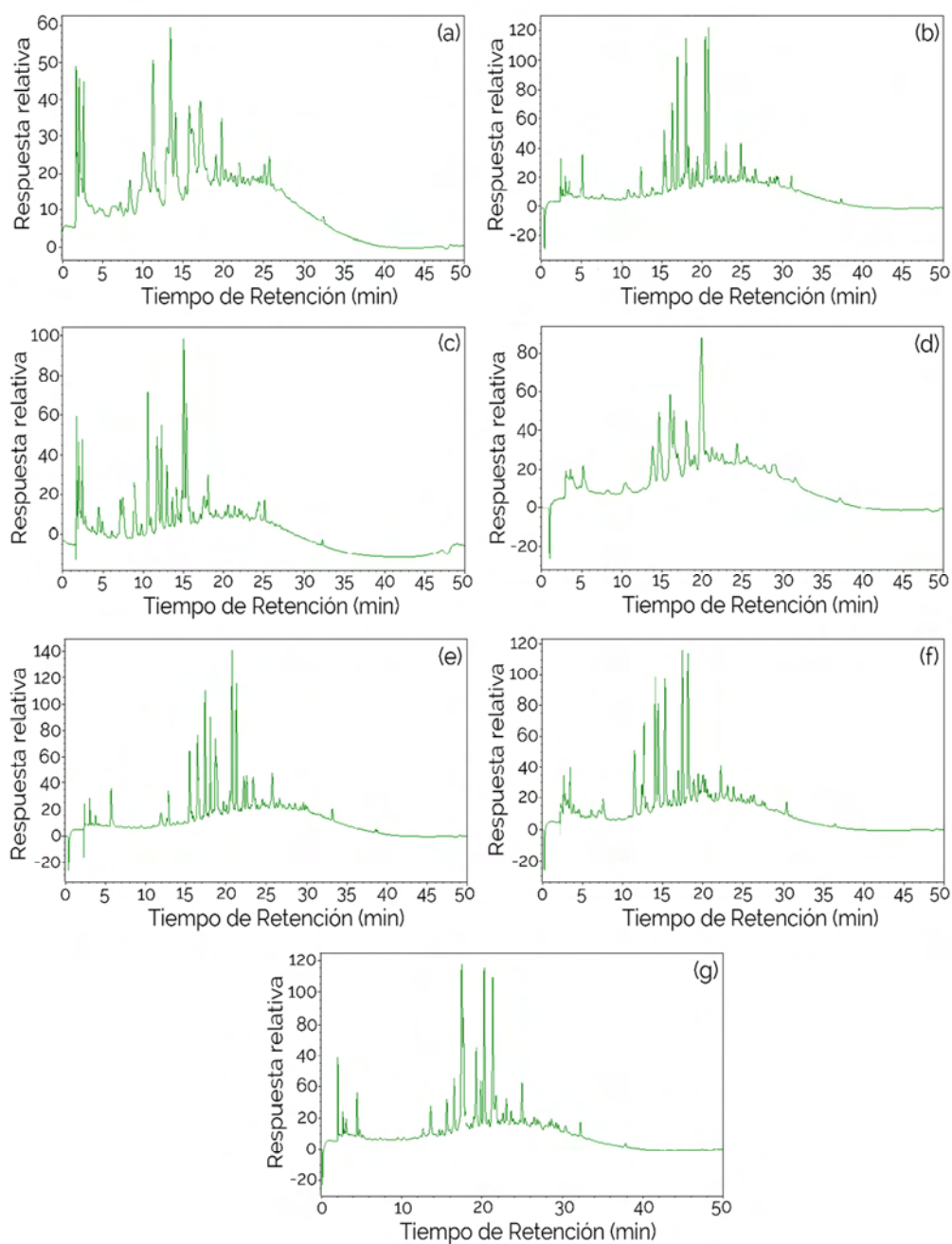


Figura 1.7. Perfiles cromatográficos de las diferentes columnas obtenidos mediante HPLC-DAD a una longitud de onda de 310 nm: (a) LiChrosphere C8 (125 x 4.0 mm, 5 μ m); (b) Gemini C18 (150 x 4.6 mm, 5 μ m); (c) Mediterranean Sea C18 (100 x 4.6 mm, 3 μ m); (d) LichroCARTLiChrospher C18 (250 x 4.0 mm, 5 μ m); (e) Atlantis C18 T3 (150 x 4.6 mm, 5 μ m); (f) X-Bridge C18 (150 x 4.6 mm, 5 μ m); (g) SunFire C18 (150 x 4.6 mm, 5 μ m).

4.1.4. Optimización de la longitud de onda

Al coexistir compuestos orgánicos de diferente naturaleza y con diferentes grupos funcionales, se registraron cromatogramas a diferentes longitudes de onda: 257 nm, 310 nm, 350 nm, 230 nm y 280 nm. En la **Figura 1.8** se puede observar que los compuestos de mayor polaridad presentan absorbancia mayor a 257 nm. Los de polaridad media a 310 nm y los de mayor polaridad a 350 nm.

De todas las longitudes de onda estudiadas, como compromiso de todos los analitos, finalmente se seleccionó 310 nm para la caracterización de la huella dactilar de *P. decumanum* (**Figura 1.8**).

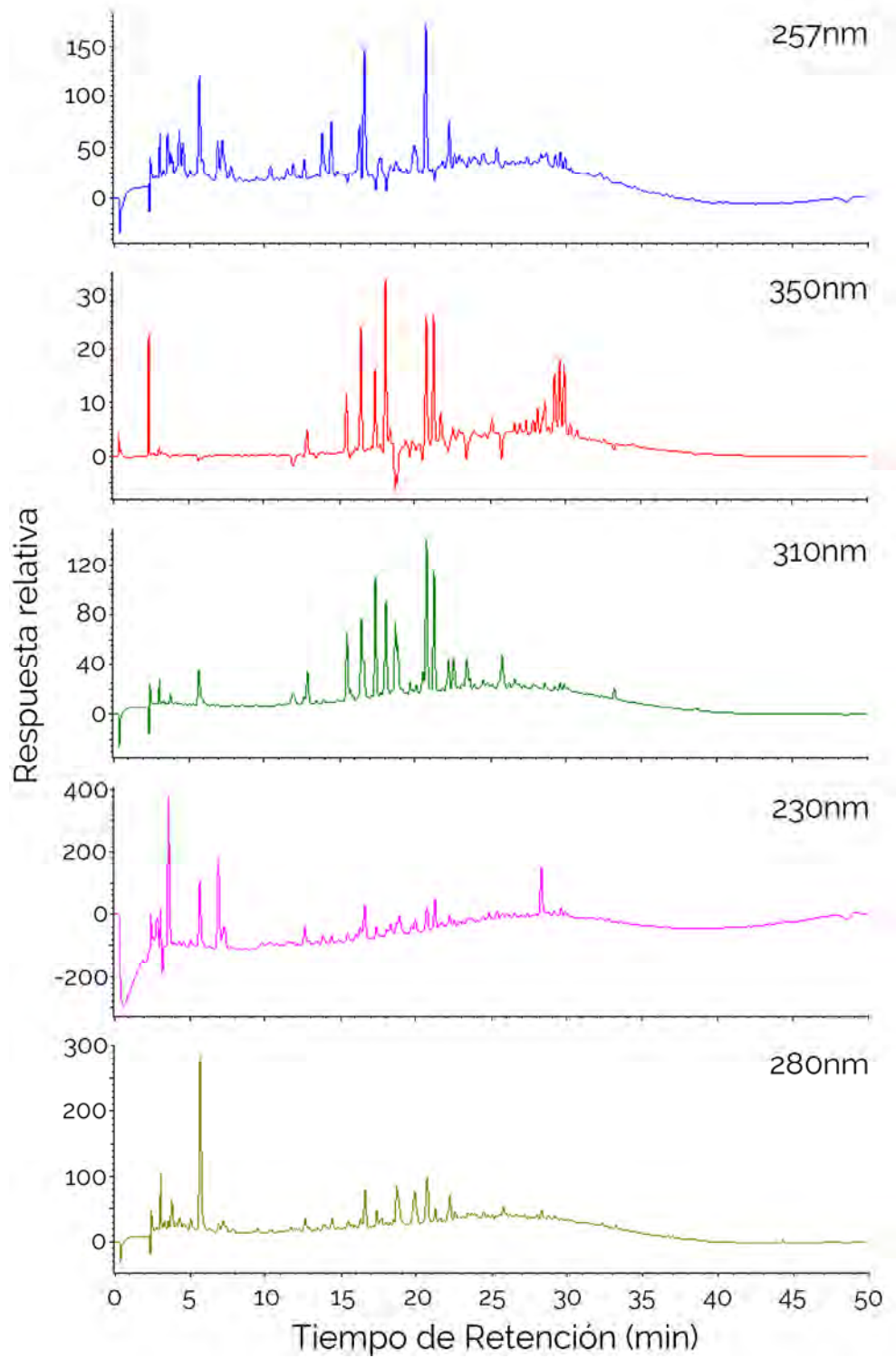


Figura 1.8. Ensayos a diferentes longitudes de onda.

4.1.5. Influencia de la temperatura

La temperatura de la columna es un parámetro que puede influir en la resolución cromatográfica por lo que debe ser controlada para obtener resultados reproducibles. A mayor temperatura, menor factor de capacidad K' , viscosidad de la fase móvil y presión del sistema, afectándose el tiempo de retención. Sin embargo, una temperatura elevada puede provocar la hidrólisis de los compuestos e incluso de la propia fase estacionaria, con la consecuente pérdida de información, resolución y eficacia en la separación. A pesar de que la resolución a temperatura ambiente fue aceptable, es necesario realizar el análisis controlando la temperatura. En el caso de estudio se mantuvo la temperatura de la columna a 30, 40 y 50°C. En la figura se muestran los perfiles obtenidos.

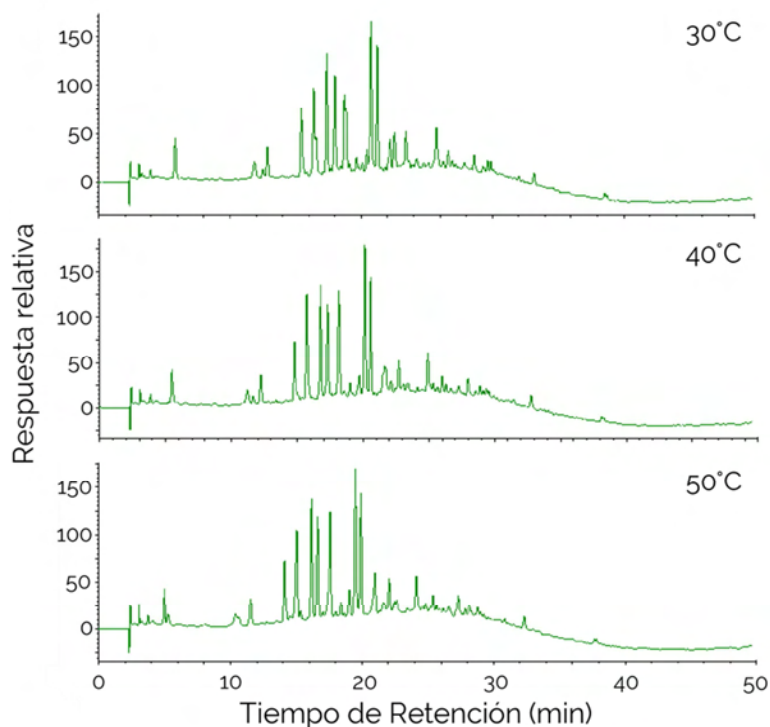


Figura 1.9. Cromatogramas del perfil del extracto a diferentes temperaturas obtenidos con el gradiente y fase estacionaria óptimos.

Las tres temperaturas proporcionaron perfiles cromatográficos muy similares. No observándose cambios resaltables en los tiempos de retención a medida que se aumentó la temperatura. Se fijó una temperatura de 30°C, próxima a la temperatura ambiente del laboratorio.

4.1.6. Optimización del volumen de inyección

El volumen de inyección es un factor a estudiar en la optimización de un método de cromatografía de líquidos. El volumen de muestra inyectado afecta principalmente calidad del pico cromatográfico, pues a medida que se aumenta el volumen puede sufrir ensanchamiento. En el método propuesto, se realizaron varios ensayos a diferentes volúmenes de inyección (5 µL, 20 µL, 50 µL y 100 µL del extracto) aplicando las condiciones óptimas de flujo y gradiente obtenidas en los apartados anteriores. En la figura se muestran los resultados obtenidos.

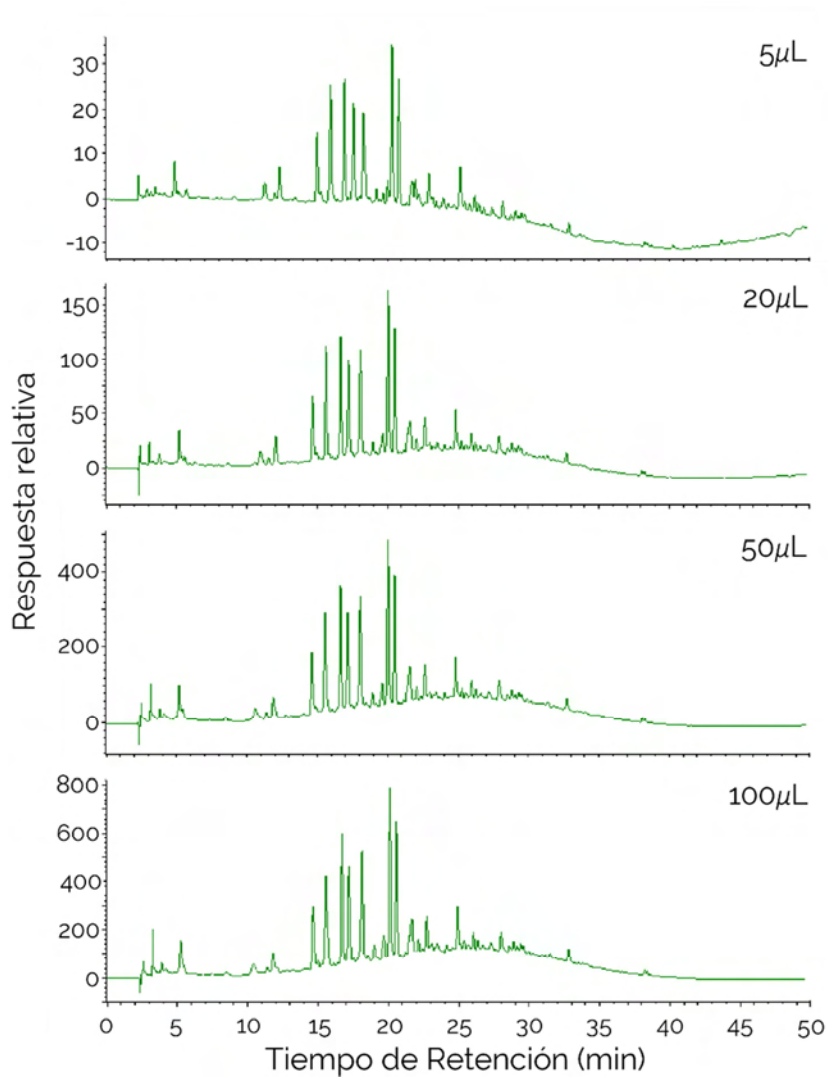


Figura 1.10. Ensayos a diferentes volúmenes de inyección. Se mantuvieron las condiciones óptimas de separación ($\lambda=310$ nm).

A medida que aumenta el volumen de inyección puede observarse un ligero incremento en el ensanchamiento de banda (poco apreciable). A volúmenes inferiores, aunque se obtiene una separación similar, la sensibilidad es inferior (**Figura 1.10**). Se seleccionaron 20 μ L como volumen de inyección ya que proporcionó un aumento notable de la sensibilidad sin pérdida de resolución.

4.2. Perfil cromatográfico (huella dactilar) de *Phlebodium decumanum*.

Resumen de condiciones óptimas

Considerando todas las variables optimizadas se estableció como *huella dactilar* y perfil representativo y reproducible del extracto de *P. decumanum* el siguiente perfil cromatográfico:

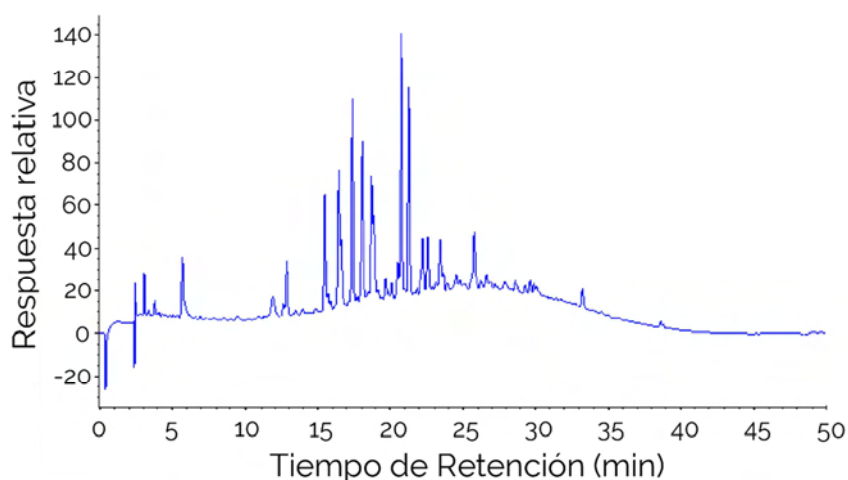


Figura 1.11. Huella dactilar del extracto de *Phlebodium decumanum* en LC-PDA ($\lambda=310$ nm).

Las condiciones del método optimizado y el gradiente lineal empleado son los que se describen en el apartado 3.4.3 de la sección de *Materiales y métodos*.

4.3. Adaptación del método para UHPLC

Partiendo de las condiciones óptimas anteriormente mostradas, se adaptó el método a UHPLC-PDA. El método desarrollado es una conversión del método HPLC-UV-vis (DAD) optimizado en el apartado 4.1 a UHPLC, mediante la herramienta de conversión que la casa comercial Waters cromatografía puso a nuestra disposición.

Las condiciones operatorias del método cromatográfico adaptadas a UHPLC se recogen en las siguientes tablas. El cromatograma y perfil del extracto obtenido se muestra en el **apartado 4.4**.

Tabla 1.3. Condiciones del método UHPLC-PDA.

Variable	Valor
Volumen de inyección	10 μ L
Columna	AQCUITY UPLC HSS T3; 1.8 μ m; 2.1 x 100 mm
Concentración	30 mg mL ⁻¹ de H ₂ O:MeOH (95:5, v/v)
Fase móvil A	H ₂ O 0.1% ácido fórmico (v/v)
Fase móvil B	MeOH 0.1% ácido fórmico (v/v)

Tabla 1.4. Gradiente optimizado para UHPLC.

Tiempo (min)	A%	B%	Flujo
0.00	95.0	5.0	0.3
0.41	95.0	5.0	0.3
12.17	0.0	100.0	0.3
12.60	0.0	100.0	0.3
12.62	95.0	5.0	0.3
17.00	95.0	5.0	0.3

4.4. Perfil cromatográfico (huella dactilar) de *Phlebodium decumanum* mediante UHPLC-PDA (DAD)

La cromatografía de líquidos de ultra alta resolución presenta la ventaja de proporcionar cromatogramas con mayor resolución, picos de mayor calidad (estrechos y altos) y tiempos de retención entre 3 y 10 veces menores de los obtenidos en cromatografía de líquidos convencional. La **Figura 1.12** muestra el perfil cromatográfico del extracto de *P. decumanum*

obtenido en esta técnica cromatográfica con las condiciones óptimas de las Tablas 1.3 y 1.4.

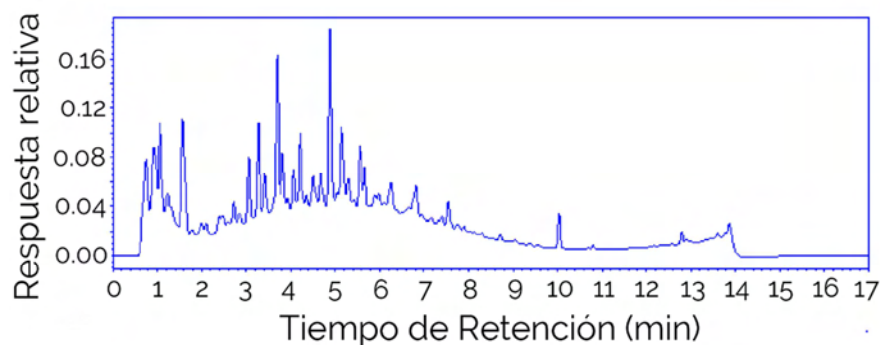


Figura 1.12. Cromatograma (Huella dactilar) del extracto de *Phlebodium decumanum* obtenido por UHPLC-PDA ($\lambda=310$ nm).

Como se observa en el cromatograma, el tiempo de análisis con esta técnica se reduce desde los 50 minutos de la cromatografía de líquidos de alta resolución a los 17 minutos, y a un flujo notablemente inferior. El extracto se preparó en una mezcla de H₂O y metanol (95:5, v/v), condición inicial del gradiente del método, tal y como se describe en el apartado 3.4.2. de la sección de *Materiales y Métodos*. Al igual que en el análisis mediante HPLC-DAD, se seleccionó como longitud de onda 310 nm.

4.5. Estudio de la estabilidad del extracto en función de las condiciones de almacenamiento.

Se estudió el perfil del extracto de *P. decumanum* disuelto en una mezcla de agua y metanol a lo largo de un año, mantenido bajo distintas condiciones de temperatura (-20, 4 y 25 ± 2.0°C). Los resultados mostraron que la temperatura tiene un efecto directo en la conservación del extracto vegetal (**Figura 1.13**). El perfil se vio considerablemente modificado a temperatura ambiente mientras que a 4°C desapareció algún pico.

Únicamente bajo las condiciones más drásticas de congelación, -20°C , se conservó el perfil cromatográfico sin cambios y la composición química del extracto intacta. A temperatura ambiente el extracto mostró estabilidad aproximadamente hasta los tres meses y a los seis meses se observó la formación de sedimentos y la aparición de colonias de hongos. En la **Figura 1.13** se muestra la comparación de los perfiles obtenidos.

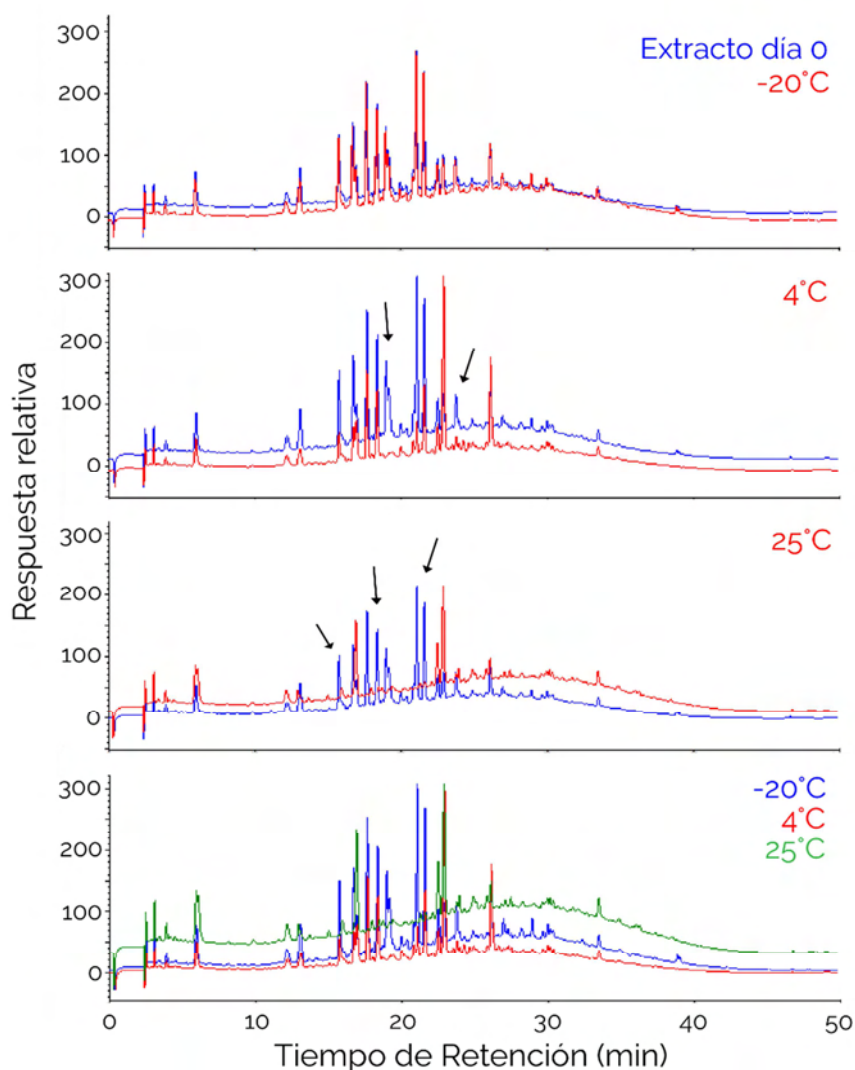


Figura 1.13. Perfiles químicos del extracto de *Phlebotium decumanum* después de un año conservado a las temperaturas indicadas obtenidos mediante HPLC-DAD ($\lambda=310\text{ nm}$). Las flechas señalan las zonas del cromatograma en los que han desaparecido picos cromatográficos.

El efecto de la temperatura puede estar relacionado con el carácter termolábil de los componentes fenólicos. Bayer y colaboradores (1987) explicaron que los metabolitos secundarios, especialmente los fenoles, se descomponen total o parcialmente a temperatura ambiente, debido a la ruptura de los anillos de benceno, los cuales son la base estructural de muchos de ellos. Por otro lado Rosas (2004) indicó que las bajas temperaturas favorecen la conservación e las características químicas de los extractos vegetales, explicando por qué los extractos almacenados a bajas temperaturas no pierden su efectividad.

Los resultados de este estudio indican que existe una relación directa entre el tiempo y la temperatura, y consecuentemente, en la efectividad del extracto. Por tanto, de los resultado se concluye que disoluciones preparadas del extracto deben mantenerse -20°C si van ser conservadas durante largos periodos de tiempo, o bien deben ser preparadas frescas a partir del extracto hidro-etanólico inmediatamente antes de su análisis y, especialmente, para los futuros experimentos de ensayos celulares.

5. CONCLUSIONES

Como resultado del estudio realizado en este capítulo I de la Tesis Doctoral se han obtenido las conclusiones que se resumen a continuación:

- I. Se ha desarrollado y optimizado un método cromatográfico reproducible para el análisis del extracto de *P. decumanum* mediante HPLC-UV-Vis (DAD) y UHPLC-PDA (DAD). Todos los parámetros que influyen en la separación cromatográfica, incluyendo la composición de la fase móvil, el gradiente de elución, la temperatura de la columna, la fase estacionaria y el flujo de fase móvil, fueron estudiados y optimizados.
- II. Se ha establecido un perfil cromatográfico **“huella dactilar”** representativo y característico de los diferentes compuestos químicos presentes en el extracto. Esta huella dactilar puede ser utilizada como herramienta de identificación y evaluación de calidad de los extractos producidos de forma sistemática para su comercialización.
- III. El tiempo de conservación del el extracto de *P.m decumanum* depende de las condiciones de temperatura. Disoluciones preparadas del extracto son estables durante largos periodos de tiempo conservadas congeladas (a -20°C). A temperaturas superiores el perfil químico del extracto se ve considerablemente comprometido (temperatura ambiente) o ligeramente afectado (4°C) indicando que algunos de sus metabolitos son termolábiles.

6. REFERENCIAS

- Alaerts, G., Matthijs, N., Smeyers-Verbeke, J., Heyden, Y.V. (2007). Chromatographic fingerprint development for herbal extracts: A screening and optimization methodology on monolithic columns. *Journal of Chromatography A* 1172(1), 1-8.
- Bayer, H., Barluenga, J., Wolfgan, W. (1987). *Manual de química orgánica*. Editorial Reverte S.A., 548-579.
- CHMP. Guideline on quality of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products. Committee for medicinal products for human use (CHMP), European Medicines Agency Inspections, June 05, 2018, EMA/HMPC/201116/2005 Rev. 3. Consulta: 05/03/2019, <https://www.ema.europa.eu/en>
- Díaz-Castro, J., Guisado, R., Kajarabille, N., García, C., Guisado, I.M., De Teresa, C., Ochoa, J.J. (2012). *Phlebodium decumanum* is a natural supplement that ameliorates the oxidative stress and inflammatory signalling induced by strenuous exercise in adult humans. *European Journal of Applied Physiology* 112(8), 3119-3128.
- Gattuso, M.A., Amalia, A., Gattuso, S.J. (2008). Caracteres morfoanatómicos de especies de *Phlebodium*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 7, 10-17.
- González-Jurado, J.A., Guisado-Barrilao, R., Molina-Sotomayor, E., de Teresa Galván, C. (2008). Efecto protector del *Phlebodium decumanum* sobre la fatiga muscular inducida por el ejercicio en sujetos no entrenados. *Cultura, Ciencia y Deporte* 3(8), 101-106.
- González-Jurado, J.A., Pradas, F., Molina, E.S., de Teresa, C. (2011). Effect of *Phlebodium decumanum* on the immune response induced by training in sedentary university students. *Journal of Sports Science and Medicine* 10(2), 315-321.

- Horvath, A., Alvarado, F., Szocs, J., de Alvarado, Z.N., Padilla, G. (1967). Metabolic effects of calaguanine, an antitumor saponin of *Polypodium leucotomos*. *Nature* 214 (5094), 1256-1258.
- Liu, B., Diaz, F., Bohlin, L., Vasänge, M. (1998). Quantitative determination of anti-inflammatory principles in some *Polypodium* species as a basis for standardization. *Phytomedicine* 5, 187-194.
- Punzón, C., Alcaide, A., Fresno, M. (2003). *In vitro* anti-inflammatory activity of *Phlebodium decumanum*. Modulation of tumor necrosis factor and soluble TNF receptors. *International Immunopharmacology* 3(9), 1293-1299.
- Rosas, A. (2004). Nuevas fuentes de antioxidantes vegetales. Subprograma IV-Biomasa como fuente de productos químicos y energéticos. Ministerio de Ciencia y Tecnología. Cooperación Iberoamericana CYTED. Caracas, 416.
- Ruiz, H. (1805). Memoria sobre la legítima calaguala y otras dos raíces que con el mismo nombre nos vienen de la América meridional, Imprenta de D. José del Collado, Digitalized by Complutense University of Madrid, Spain, 60 pp.
- WHO. World Health Organization. (1991). Guidelines for the Assessment of Herbal Medicine, World Health Organization, Munich, Germany, p. 2. Consulta: 05/03/2019 [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/58865/WHO TRM 91.4.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/58865/WHO_TRM_91.4.pdf)
- Yesares Ferrer, M., Mendoza Medina, J.A., Ruíz Cáceres G.M., Alcaide García, A., Yesares Morillas, E. (2001). Hydrosoluble fractions of *Phlebodium decumanum* and use thereof as nutritional complements in aids and cancer patients. United States Invention Patent, US 6,228,366B1. Helsint, S.A.L.

CAPÍTULO II

Identificación de fitocompuestos presentes en el extracto de *Phlebodium* *decumanum*

Las experiencias realizadas en este capítulo II se han desarrollado en los laboratorios de Química Analítica de la Facultad de ciencias de la Universidad de Granada (FQ338) y se han publicado junto con el capítulo I en la revista "Analytical Letters" 2019, VOL. 52, NO. 13, 2107-2132 (ver anexo I).

2

Identificación de fitocompuestos presentes en el extracto de *Phlebodium decumanum*

1. INTRODUCCIÓN

Desde principios de la historia humana, los productos naturales procedentes de plantas han sido investigados y utilizados como fuente de principios activos para el tratamiento de numerosas enfermedades por sus propiedades beneficiosas. Muchas las plantas conocidas (aproximadamente el 20%) se han utilizado en estudios farmacéuticos demostrándose que tienen un efecto positivo sobre la salud (Naczk et al., 2006). Como fuente productiva, proporcionan un gran número de moléculas que pueden seleccionarse para encontrar posibles compuestos en el descubrimiento de nuevos fármacos. Entre los metabolitos sintetizados por las plantas se incluyen compuestos fenólicos, taninos, lignanos, carotenoides, ácidos orgánicos, antocianinas, tocoferoles, flavonoides, entre otros, que han demostrado tener una gran variedad de propiedades (vasodilatadoras, antitrombóticas, antibacterianas, antioxidantes, anticancerígenas, cardiotónicas, antiinflamatorias, etc.) (Naczk et al., 2006). Aunque un extracto vegetal contiene cientos de componentes químicos, tan solo unos pocos son bioactivos. Por tanto, la caracterización química y la identificación

de todos los componentes activos es un paso esencial en el estudio farmacológico (Wu et al., 2013; Altemimi et al., 2017).

La identificación de los componentes y moléculas activas de *P. decumanum* es de gran interés ya que, históricamente, el extracto ha mostrado una efectos biológicos beneficiosos, relacionados especialmente con desórdenes inmunológicos y con el cáncer. Trabajos previos realizados en extractos acuosos de *Polypodium leucotomos* (*P. leucotomos*) han caracterizado compuestos fenólicos mediante HPLC con distintos sistemas de detección como DAD, electroquímica o MS/MS (García et al., 2006); y calaguanina, una saponina antitumoral (Horvath et al., 1967). Se han aislado cinco flavonoides de dos especies de *Polypodium* y se han elucidado sus estructuras utilizando diferentes técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) (Vasänge et al., 1997a; Liu et al., 1998). Sin embargo, los fitoquímicos presentes en *P. decumanum* han sido poco investigados, por lo que es escasa la información disponible sobre su composición química.

La separación, identificación y cuantificación de los componentes en extractos vegetales siempre ha sido una tarea difícil. Sin embargo, hoy en día hay una gran variedad de técnicas de separación, fases estacionarias específicas y detectores disponibles, que ayudan a lograr la selectividad, sensibilidad y velocidad deseadas para cualquier problema de separación. La técnica más destacada en este área de investigación es la combinación de la cromatografía de líquidos y la espectrometría de masas (Ganzera et al., 2018). Esta combinación permite una identificación rápida y precisa de compuestos químicos en hierbas medicinales, especialmente cuando un estándar puro no está disponible (De Villers et al., 2016; Altemimi et al., 2017). La espectrometría de masas proporciona además información estructural de los compuestos para la determinación de su identidad.

2. OBJETIVO

El objetivo principal del trabajo desarrollado en este capítulo es determinar la composición química de un extracto hidro-alcohólico obtenido de las frondes del helecho *P. decumanum*, La caracterización química se llevará a cabo mediante HPLC con detección por espectrometría de masas de alta resolución con analizador de tiempo de vuelo (TOF) con ionización por electrospray (ESI). Se empleará el método cromatográfico desarrollado en el capítulo anterior para el establecimiento de la “huella dactilar” del helecho. El análisis de los datos obtenidos permitirá la identificación de los diferentes componentes fenólicos presentes en el extracto. El conocimiento de los metabolitos de esta especie posibilitará el conocimiento de las especies químicas concretas responsables de su actividad biológica.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos y disolventes

Todos los reactivos utilizados en el presente capítulo fueron de grado analítico. El agua desionizada (18.2M Ω cm) se purificó utilizando un sistema Milli-Q® Advantage A10 obtenido de Millipore (Bedford, MA, USA). El metanol (de grado HPLC) usado para la preparación de los estándares y para la preparación de las fases móviles fue obtenido de Scharlab (Barcelona, España). El ácido fórmico ≥ 98 % para el ajuste del pH fue proporcionado por MERCK (Darmstadt, Alemania).

Los estándares de metabolitos comercialmente disponibles se obtuvieron de diferentes fuentes: los ácidos lactobiónico, 3-hidroxibenzoico, 4-hidroxibenzoico, L-piroglutámico, trans-ferúlico, D-ribónico-1,4-lactona, D-(-)-quínico y la D-(-)-fructosa fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Chemical Company (Madrid, España); los ácidos clorogénico, glutárico, mícico y D-(+)-málico fueron de Alfa-Aesar (Karlsruhe, Alemania); y el ácido cítrico anhidro de Panreac (Barcelona, España).

El extracto de *P. decumanum* fue suministrado por Helsint S.A.L. (Granada, España). El extracto utilizado procede de monocultivos cultivados en el lago Yojoa (norte de Honduras). El cultivo, cosecha y secado de las frondes, así como la extracción y purificación de los diferentes extractos, son llevados a cabo por la compañía.

3.2. Material de laboratorio

Los materiales de laboratorio necesarios para el desarrollo de la parte experimental de este trabajo fueron los mismos que se emplearon para el establecimiento del perfil cromatográfico característico del helechó,

descrito en el capítulo I de la Tesis doctoral. El material de vidrio utilizado fue lavado siempre previamente a su uso con detergente, y posteriormente, enjuagado con abundante agua desionizada y metanol. Aquel material de vidrio en contacto con algún tipo de residuo orgánico, como mismo extracto de *P. decumanum*, se lavó además con mezcla crómica.

3.3. Instrumentación y software

Para el estudio de la composición química del extracto se utilizó un sistema de cromatografía HPLC Alliance 2795 acoplado a una fuente de ionización electrospray (ESI) y un espectrómetro de masas con un analizador QTOF SYNAPT G2 HDMS y un analizador TOF LCT Premier XE de Waters (Manchester, UK) (**Figura 2.1**). Como fase estacionaria se utilizó una columna Atlantis C18 T3 (4.6 x 150 mm, 5 μm de tamaño de partícula).



Figura 2.1. Cromatógrafo de líquidos Alliance 2795 acoplado a un espectrómetro de masas con analizador QTOF utilizado para la identificación de los componentes de *P. decumanum*.

ChemStation B.03.02 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), y MassLynx™ 4.1 (Waters, Manchester, UK) fueron los softwares empleados

para el control del equipo y para la adquisición y análisis de los datos. La herramienta de búsqueda *elemental composition* de MassLynx proporcionó una lista de posibles fórmulas de los componentes químicos extraídos.

3.4. Preparación y análisis del extracto.

3.4.1. Proceso de extracción y preparación de la muestra de extracto

El extracto se preparó a partir de las frondes de *P. decumanum* de acuerdo con la patente US 6228366 de Helsint (Yesares-Ferrer et al., 2001). El procedimiento de extracción seguido se describe con detalle en el **apartado 3.4.1** de la sección de *Materiales y Métodos* del capítulo I.

Una vez liofilizado el extracto, se preparó una disolución de 30 mg mL⁻¹ de concentración con la fase móvil inicial utilizada en el análisis, que fue inyectada en el sistema HPLC-ESI-MS (QTOF). En el **apartado 3.4.2** de la sección de *Materiales y Métodos* del capítulo anterior se indica el proceso completo seguido para la preparación de la muestra.

3.4.2. Análisis mediante HPLC-ESI-TOF-MS

La separación de los distintos componentes de *P. decumanum* mediante LC-QTOF MS/MS se llevó a cabo con el método cromatográfico desarrollado y optimizado en el **capítulo I** de esta tesis. Se utilizó la columna Atlantis C18 T3 como fase estacionaria y, como disolventes de la fase móvil se emplearon agua (A) y metanol (B), ambos acidificados con un 0.1% (v/v) de ácido fórmico. El análisis se realizó a 30°C, el flujo fue de 0.7 mL min⁻¹ y el volumen de inyección de muestra de 10 µL. El gradiente fijado fue el que sigue: 0.0 – 5.0 min, 5% B; 5.0 – 45.0 min, 100% B; 45.0 – 48.0 min, 100% B; 48.0 – 48.1 min, 5% B durante 4.9 min (tiempo total 50.0 min).

El espectrómetro de masas (MS) operó en ESI en modo positivo y negativo, con un rango de masas entre 50 a 2000 Da, para obtener ambas huellas dactilares. Los valores MS/MS óptimos fueron los siguientes: voltaje del capilar, 2.0 kV; voltaje del cono de muestra, 10 V; voltaje del cono de extracción, 7 V; flujo de gas del cono y de desolvatación, 40 L h⁻¹ y 600 L h⁻¹. Las temperaturas de la fuente y de desolvatación fueron 100°C y 400°C, respectivamente. El espectro de masas fue obtenido usando helio como gas de colisión, con una energía de colisión entre 10 y 30 eV.

3.5. Procesamiento de los datos y asignación de los metabolitos

Los datos brutos se procesaron con el software MassLynx 4.1, que proporcionó una lista de posibles fórmulas elementales. Los compuestos fueron caracterizados tentativamente por medio de los datos de MS y doble comparación con su perfil de fragmentación MS/MS. Primero, se compararon con los compuestos estándar analizados bajo las mismas condiciones experimentales y, luego, se correlacionaron con sus fragmentos hipotéticos utilizando el software *Mass Fragment* de MassLynx. La exactitud aceptada para la confirmación de composiciones elementales se ha establecido a 5 ppb para la mayoría de los compuestos, como se recomienda en la literatura científica (Abu-Reidah et al., 2013a). No todos los estándares comerciales estuvieron disponibles para los compuestos detectados en este trabajo. En estos casos, su identificación fue contrastada con *Mass Fragment* y la literatura indicada en la **Tabla 2.1**.

Durante el proceso de asignación, algunas bases de datos, como ChemSpider (<http://www.chemspider.com>), METLIN (<https://metlin.scripps.edu>), MassBank (<http://www.massbank.jp>) y HMDB (<http://www.hmdb.ca>), fueron también consultadas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Identificación de los compuestos

La **Tabla 2.1** muestra una lista de todos los compuestos del extracto de *P. decumanum* que han sido caracterizados mediante HPLC-ESI/MS (QTOF) en modo de ionización positivo y negativo. En dicha tabla se recogen además los tiempos de retención, $[M\pm H]^\pm$ (m/z), el error (en ppm y mDa), la primera asignación de fórmula molecular, los iones de los fragmentos MS/MS experimentales y teóricos, así como las referencias bibliográficas utilizadas en el proceso de caracterización de los compuestos.

En la **Figura 2.2** se muestran los cromatogramas obtenidos en los modos ESI positivo y negativo. Se han caracterizado un total de 122 compuestos en el extracto de *P. decumanum*, entre los que se incluyen 47 ácidos fenólicos, 23 flavonoides, 9 amino derivados, entre otros.

Tabla 2.1. Compuestos químicos detectados y caracterizados en *P. decumanum* mediante HPLC-Q-TOF en modos de ionización por electrospray negativa y positiva. Los números de pico fueron asignados de acuerdo con el orden de elución.

Nº	Nombre del compuesto	Tipo de compuesto	t _R (min)	Masa exacta calculada (m/z)		Error		Fórmula molecular	MS/MS (m/z) de ion(es) fragmento		Referencias
				[M-H] ⁻	[M+H] ⁺	mDa	ppm		Experimental	Referencia	
1.	Valina	Aminoácido	2.46	116.0712	118.0868	-0.8	-6.8	C ₅ H ₁₁ NO ₂	-	72.081 55.0545 57.0578	Ledesma-Escobar, Priego-Capote, and Luque de Castro (2015)
2.	Ácido lactobiónico	Ácido orgánico	2.49	357.1033	359.1190	1.4	3.9	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₂	358.1064 129.0200	358.1063 129.0171	Patrón
3.	Ácido ribónico	Ácido orgánico	2.50	165.0399	167.0556	0.6	3.6	C ₅ H ₁₀ O ₆	147.0264	339.0735 146.9780	Patrón (ion tentativo)
4.	Ácido cítrico I	Ácido orgánico	2.52	191.0192	193.0348	0.8	4.2	C ₆ H ₈ O ₇	192.0286 111.0108 87.0091	192.0188 111.0089 87.0124	Patrón (ion tentativo). PR100481 Abu-Reidah et al., (2015b)
5.	Ácido múcico (galactárico) o ácido glucárico I	Ácido orgánico	2.53	209.0297	211.0454	1.3	6.2	C ₆ H ₁₀ O ₈	191.0213 85.0318	191.0206 85.0273	Patrón. HMDB0000639 HMDB0000663 MID3343 MID4227
6.	L-Prolina betaína	Aminoácido	2.87	142.0868	144.1025	-0.4	-2.8	C ₇ H ₁₃ NO ₂	-	102.0551 84.0819 58.0664	Ledesma-Escobar, Priego-Capote, and Luque de Castro (2015) (dudoso)
7.	Ácido quínico I	Ácido orgánico	2.87	191.0556	193.0712	0.9	4.7	C ₇ H ₁₂ O ₆	173.0505 127.0398, 109.0239 85.0310	173.0485 127.0356 109.0060 85.0330 173.0442 109.0302	Patrón. Abu-Reidah et al., (2015a)
8.	Ácido quínico II	Ácido orgánico	2.97	191.0556	193.0712	0.7	3.7	C ₇ H ₁₂ O ₆	173.0365 127.0418 109.0113 85.0222	173.0485 127.0356 109.0060 85.0330 173.0442 109.0302	Patrón. Abu-Reidah et al., (2015a)

9.	No identificado I	Derivado amino	3.29	327.0959		1.8 0.5	5.5 1.5	$C_{12}H_{16}N_4O_7$ $C_{13}H_{10}N_8O_3$	271.0516	-	-	
10.	Hexósido de ácido málico	Glucósido de ácido orgánico	3.62	295.0665	297.0822	-1.1	-3.7	$C_{10}H_{16}O_{10}$	133.0150 115.0040	133.0140 115.0030		Abu-Reidah et al., (2015a)
11.	Ácido málico	Ácido orgánico	3.62	133.0137	135.0293	1.3	4.8	$C_4H_6O_5$	267.0363 115.0043	267.0352 115.0014 115.0036		Patrón. Abu-Reidah et al., (2015b)
12.	No identificado II	-	4.32	665.2141		0.1	0.2	$C_{24}H_{41}O_{21}$	606.0779	-	-	
13.	Ácido glutámico hexosa	Azúcar amino	5.52	290.0876	292.1032	0.4	1.4	$C_{11}H_{17}NO_8$	200.0569 170.0472 128.0356	200.0560 170.0447 128.0346		Abu-Reidah et al., (2015b)
14.	Ácido piroglutámico I	Aminoácido	5.52	128.0351	130.0504	0.3	2.3	$C_5H_7NO_3$	-	-		HMDB0000267 MID3251
15.	Ácido cítrico II	Ácido orgánico	6.05	191.0192	193.0348	0.8	4.2	$C_6H_8O_7$	192.0208 111.0096 87.0016	192.0188 111.0089 87.0124		Patrón. PR100481 Abu-Reidah et al., (2015b)
16.	No identificado III	-	6.05	335.0502	-	-	-	-	-	-	-	
17.	Ácido piroglutámico II	Aminoácido	6.69	128.0351	130.0504	0.5	3.9	$C_5H_7NO_3$	-	-		HMDB0000267 MID3251
18.	Ácido <i>N</i> -acetyl-glutámico	Aminoácido	6.69	188.0559	190.0715	0.6	3.2	$C_7H_{11}NO_5$	170.0455 144.0656 128.0351 102.0546	170.0446 144.0654 128.0345 102.0555		KO000053 MID3325
19.	No identificado IV	-	9.02	422.1301	446.1291	-0.6	-1.4	$C_{31}H_{18}O_2$	200.0573 156.0676	-	-	
20.	Ácido <i>p</i> -Coumaroilquinico I a	Ácido hidroxicinámico	10.87	337.0923	339.1080	-1.5	-4.4	$C_{16}H_{18}O_8$	191.0633 167.0419	191.0553 163.0380		Clifford et al., (2003), Abu-Reidah et al., (2013d), Oszmiański, et al., (2015)
21.	Ácido gálico	Ácido hidroxibenzoico	11.64	169.0137	171.0293	0.3	1.8	$C_7H_6O_5$	125.0250	125.0250		Restivo et al., (2014) (ion tentativo)
22.	Galoil-hexosa (β -glucogallin)	Glucósido de ácido hidroxibenzoico	11.64	331.0665	333.0822	0.1	0.6	$C_{13}H_{16}O_{10}$	169.0114 151.0060 125.0185	169.0142 151.0049 125.0234		Rodríguez-Pérez et al., (2013), Abu-Reidah et al., (2015a)

23.	Ácido cítrico III	Ácido orgánico	12.04	191.0192	193.0348	0.6	3.1	C ₆ H ₈ O ₇	192.0462 111.0445	192.0188 111.0089 87.0124	Patrón (ión tentativo) PR100481 Abu-Reidah et al., (2015b)
24.	Ácido múcico (galactárico) o ácido glucárico (sacárico) II	Ácido orgánico	12.06	209.0297	211.0454	0.2	1.0	C ₆ H ₁₀ O ₈	191.0210 85.0342	191.0206 85.0273 209	Patrón (ion tentativo)
25.	Ácido cafeoilglucárico I	Ácido hidroxicinámico	12.06	371.0614	373.0771	-1.1	-3.0	C ₁₅ H ₁₆ O ₁₁	743.1287 209.0299	209	Patrón. El-Sayed, Al-Gendy, Hamdan, and El-Shazly (2017)
26.	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico (protocatechuico) I a	Ácido hidroxibenzoico	12.35	153.0188	155.0344	0.7	4.6	C ₇ H ₆ O ₄	109.0300	109.0192 109.0290	PR100601 Restivo et al., (2014)
27.	Glucósido del ácido dihidroxibenzoico (glucósido del ácido protocatechuico o del ácido gentísico) I	Ácido hidroxibenzoico	12.93	315.0706	317.0873	-1.0	-3.2	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	153.0198, 109.0280	153.0195 152.0115 109.0277	Abu-Reidah et al., (2013b), Rodríguez-Pérez et al., (2013)
28.	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico II a	Ácido hidroxibenzoico	12.95	153.0188	155.0344	-0.1	-0.7	C ₇ H ₆ O ₄	109.0280	109.0192 109.0290	PR100601 (ion tentativo) Restivo et al., (2014)
29.	No identificado V	-	14.00	502.1320		-2.9 - 0.2	-5.8 - 0.4	C ₂₄ H ₂₅ NO ₁₁ C ₂₁ H ₂₇ NO ₁₄	464.0847	-	-
30.	Ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico (siríngico)	Ácido hidroxibenzoico	14.22	197.0450	198.0528	0.5	2.5	C ₉ H ₉ O ₅	197.0450	197	Restivo et al., (2014) (ion tentativo)
31.	Derivado hexóxido del ácido siríngico	Ácido hidroxibenzoico	14.22	359.0978	360.1056	0.3	0.8	C ₁₅ H ₁₉ O ₁₀	197.0455	197.0425	Abu-Reidah et al., (2015a) (tentative ion)
32.	Ácido cafeíco pentosa-O-hexosido	Ácido hidroxicinámico	14.23	473.1295	475.1452	1.0	2.1	C ₂₀ H ₂₆ O ₁₃	311.0786 267.0794 177.0569 135.0400	341 312	El-Sayed et al., (2017)
33.	Ácido cafeoilquiníco glucósido I	Ácido hidroxicinámico	14.34	515.1401	517.1557	-0.9	-1.7	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₄	353.0858 191.0463	353.0859 191.0547	Abu-Reidah et al., (2013c)
34.	Ácido múcico (galactárico) o ácido glucárico (sacárico) III	Ácido orgánico	14.45	209.0297	211.0454	0.5	2.4	C ₆ H ₁₀ O ₈	191.0244 85.0320	191.0206 85.0273	Patrón (ion tentativo)

35.	Ácido cafeoilglucárico II	Ácido hidroxicinámico	14.45	371.0614	373.0771	0.8	2.2	C ₁₅ H ₁₆ O ₁₁	743.1328 209.0302	209	Patrón. El-Sayed et al., (2017)
36.	Ácido cítrico IV	Ácido orgánico	14.46	191.0192	193.0348	1.0	3.5	C ₆ H ₈ O ₇	192.0201 111.0089 87.0052	192.0188 111.0089 87.0124	Patrón (ion tentativo). PR100481 Abu-Reidah et al., (2015b)
37.	Ácido vanílico a	Ácido hidroxibenzoico	15.09	167.0344	169.0501	-0.4	-2.4	C ₈ H ₈ O ₄	152.0138 123.0350 108.0196 85.0110	152.0199 123.0436 108.0246	ML005851 BS003126 Kumar, Singh, and Kumar (2017)
38.	Ácido vanílico hexósido	Ácido hidroxibenzoico	15.09	329.0873	331.1029	3.3	5.0	C ₁₄ H ₁₈ O ₉	167.0340	167.0349	Abu-Reidah et al., (2013b) (trazas)
39.	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico (protocatechuico) III a	Ácido hidroxibenzoico	15.17	153.0188	155.0344	0.2	1.3	C ₇ H ₆ O ₄	109.0275	109.0192 109.0290	PR100601 (ion tentativo) Restivo et al., (2014)
40.	Glucósido del ácido dihidroxibenzoico (glucósido del ácido protocatechuico o del ácido gentísico) II	Ácido hidroxibenzoico	15.17	315.0706	317.0873	-0.5	-1.6	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	153.0198 152.0122 109.0275	153.0195 152.0115 109.0277	Abu-Reidah et al., (2013b), Rodríguez-Pérez et al., (2013) (trazas)
41.	Ácido múxico (galactárico) o ácido glucárico (sacárico) IV	Ácido orgánico	15.35	209.0297	211.0454	0.4	1.9	C ₆ H ₁₀ O ₈	191.0242 85.0296	191.0206 85.0273	Patrón (ion tentativo)
42.	Ácido cafeoilglucárico III	Ácido hidroxicinámico	15.35	371.0614	373.0771	0.2	0.5	C ₁₅ H ₁₆ O ₁₁	743.1298 209.0311	209	Patrón. El-Sayed et al., (2017)
43.	Ácido cítrico V	Ácido orgánico	15.36	191.0192	193.0348	-0.1	-0.5	C ₆ H ₈ O ₇	192.0197 111.0113	192.0188 111.0089 87.0124	Patrón (ion tentativo). PR100481 Abu-Reidah et al., (2015b)
44.	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico (protocatechuico) VI a	Ácido hidroxibenzoico	15.68	153.0188	155.0344	0.0	0.0	C ₇ H ₆ O ₄	109.0281	109.0192 109.0290	PR100601 (ion tentativo) Restivo et al., (2014)
45.	Ácido cafeoilquínico glucósido II	Ácido hidroxicinámico	16.03	515.1401	517.1557	0.1	0.2	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₄	353.0881 191.0560	353.0859 191.0547	Abu-Reidah et al., (2013c) (trazas)
46.	Dímero del ácido cafeoilquínico I	Ácido hidroxicinámico	16.11	705.1667	707.1823	0.3	0.4	C ₃₂ H ₃₄ O ₁₈	513.1023 339.0502	513.1016 339.0528	Schilling et al., (2008), Abu-Reidah et al., (2013c) (trazas)

47.	Ácido quínico III	Ácido orgánico	16.24	191.0556	193.0712	0.3	1.6	C ₇ H ₁₂ O ₆	173.0472 127.0524 85.0345	173.0485 127.0356 109.0060 85.0330 173.0442 109.0302	Patrón (ion tentativo) Abu-Reidah et al., (2015a)
48.	Ácido cafeoilquínico I Ácido clorogénico Ácido 3-O-cafeoilquínico a b	Ácido hidroxicinámico	16.24	353.0873	355.1029	0.8	2.3	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	707.1826 376.0724 191.0560 135.0466	707.1820 191.0564 179.0355 135.0397	Patrón. Clifford et al., (2003), Madala, Tugizimana, and Steenkamp (2014), Ncube et al., (2014)
49.	Ácido trans-cafeico I a	Ácido hidroxicinámico	16.25	179.0344	181.0501	0.8	4.5	C ₉ H ₈ O ₄	135.0449	135.0000 97.0000	HMDB0001964 MID3316 (ion tentativo)
50.	Dímero del ácido cafeoilquínico II	Ácido hidroxicinámico	16.47	705.1667	707.1823	-0.6	-0.9	C ₃₂ H ₃₄ O ₁₈	513.0980 339.0498	513.1016 339.0528	Schilling et al., (2008), Abu-Reidah et al., (2013c)
51.	Ácido cítrico VI	Ácido orgánico	16.92	191.0192	193.0348	0.6	3.1	C ₆ H ₈ O ₇	192.0229 111.0059	192.0188 111.0089 87.0124	Patrón (ion tentativo) PR100481 Abu-Reidah et al., (2015b)
52.	Ácido múcico (galactárico) o ácido glucárico (sacárico) V	Ácido orgánico	16.95	209.0297	211.0454	0.8	3.8	C ₆ H ₁₀ O ₈	191.0250 85.0316	191.0206 85.0273	Patrón (ion tentativo)
53.	Ácido cafeoilglucárico IV	Ácido hidroxicinámico	16.95	371.0614	373.0771	1.0	2.7	C ₁₅ H ₁₆ O ₁₁	743.1313 209.0312	209	Patrón. El-Sayed et al., (2017)
54.	Dímero del ácido cafeoilquínico III	Ácido hidroxicinámico	17.14	705.1667	707.1823	-2.2	-3.1	C ₃₂ H ₃₄ O ₁₈	513.1048 339.0498	513.1016 339.0528	Schilling et al., (2008), Abu-Reidah et al., (2013c)

55.	Alcohol bencílico-hexosa-pentosa I	Derivado del alcohol bencílico	17.47	401.1448	403.1604	0.7	1.7	C ₁₈ H ₂₆ O ₁₀	269.1022 191.0582 161.0496 149.0525 131.0353 101.0243 89.0274 71.0321	293 269.1041 233.06 191.04 161.04 149 131.03 101.02 89.02 71.01	Moco et al., (2006), Bystrom et al., (2008), Mintz-Oron et al., (2008), Karar and Kuhnert (2015)
56.	Ácido cumárico I a	Ácido hidroxicinámico	17.47	163.0395	165.0552	0.7	-1.7	C ₉ H ₈ O ₃	119.0474 93.0506	119.0502 93.0345	MID306 (ion tentativo)
57.	Ácido trans-cafeico II a	Ácido hidroxicinámico	17.58	179.0344	181.0501	0.5	2.8	C ₉ H ₈ O ₄	135.0465	135.0000 97.0000	HMDB0001964 MID3316 (ion tentative)
58.	Cafeoil-hexosa I	Ácido hidroxicinámico	17.58	341.0873	343.1029	-1.2	-3.5	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	179.0354 135.0455	179.0348 135.0445	Abu-Reidah et al., (2013b, 2015b)
59.	Ácido hidroxibenzoico a	Ácido hidroxibenzoico	17.78	137.0239	139.0395	0.6	4.4	C ₇ H ₆ O ₃	93.0279	93.0365	Patrón (trazas)
60.	Dímero del ácido cafeoilquínico IV	Ácido hidroxicinámico	18,18	705.1667	707.1823	-2.1	-3.0	C ₃₂ H ₃₄ O ₁₈	513.1022 339.0475	513.1016 339.0528	Schilling et al., (2008), Abu-Reidah et al., (2013c)
61.	Ácido glutárico	Ácido orgánico	18.34	131.0344	133.0501	0.2	1.5	C ₅ H ₈ O ₄	116.5310	116.9154 87.0449 77.3248	Patrón (trazas)
62.	No identificado VI	-	18.35	445.1346	469.1311			C ₁₉ H ₂₆ O ₁₂ C ₁₉ H ₂₆ O ₁₂ N a	401.1445(-) 335.09358(+)	- -	-

63.	Alcohol bencílico-hexosa-pentosa II	Derivado del alcohol bencílico	18.37	401.1448	403.1604	-0.3	-0.7	$C_{18}H_{26}O_{10}$	293.0936 269.1021 233.0664 191.0475 161.0441 149.0499 131.0308 101.0203 89.0301	293 269.1041 233.06 191.04 161.04 149 131.03 101.02 89.02 71.01	Moco et al., (2006), Bystrom et al., (2008), Mintz-Oron et al., (2008), Karar and Kuhnert (2015)
64.	Ácido cumárico II a	Ácido hidroxicinámico	18.48	163.0395	165.0552	0.8	4.9	$C_9H_8O_3$	119.0515	119.0502 93.0345	MID306 (ion tentativo)
65.	Ácido <i>p</i> -coumaroilquinico II a	Ácido hidroxicinámico	18.53	337.0923	339.1080	0.9	2.7	$C_{16}H_{18}O_8$	191.0547 163.0411	191.0553 163.0380	Clifford et al., (2003), Abu-Reidah et al., (2013d), Oszmiański, et al., (2015)
66.	Penstemida	Iridoide	18.72	443.1917	445.2074	-1.1	-2.5	$C_{21}H_{32}O_{10}$	100.9419	101.0229 340.8748	Rodríguez-Pérez et al., (2013), Abu-Reidah et al., (2015a)
67.	Ácido cafeoilquinico glucósido III	Ácido hidroxicinámico	19.32	515.1401	517.1557	-0.1	-0.2	$C_{22}H_{28}O_{14}$	355.0669 191.0212	353.0859 191.0547	Abu-Reidah et al., (2013c)
68.	Cafeoil-hexosa II	Ácido hidroxicinámico	19.34	341.0873	343.1029	1.2	3.5	$C_{15}H_{18}O_9$	179.0375 135.0501	179.0348 135.0445	Abu-Reidah et al., (2013b, 2015b)
69.	Ácido trans-cafeico III a	Ácido hidroxicinámico	19.36	179.0344	181.0501	-0.3	-1.7	$C_9H_8O_4$	135.0461	135.0000 97.0000	HMDB0001964 MID3316 (ion tentativo)
70.	Ácido cumárico III a	Ácido hidroxicinámico	19.43	163.0395	165.0552	-0.1	-0.6	$C_9H_8O_3$	119.0514 93.0977	119.0502 93.0345	MID306 (ion tentativo)
71.	Coumaril-hexosa	Ácido hidroxicinámico	19.43	325.0923	327.1080	-0.3	-0.9	$C_{15}H_{18}O_8$	163.0414 119.0512	163.0393 145.0296 119.0501	Abu-Reidah et al., (2013b, 2015b) (trazas)
72.	Ácido cafeoilquinico II Ácido neo-clorogénico Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquinico a b	Ácido hidroxicinámico	19.53	353.0873	353.0881	0.5	1.4	$C_{16}H_{18}O_9$	707.1821 191.0559 135.0476	707.1820 191.0591 135	Clifford et al., (2003), Madala, Tugizimana, and Steenkamp (2014), Ncube et al., (2014)

73.	Ácido quínico IV	Ácido orgánico	19.55	191.0556	193.0712	0.3	1.6	C ₇ H ₁₂ O ₆	173.0411 127.0409 109.0518 85.0215	173.0485 127.0356 109.0060 85.0330 173.0442 109.0302	Patrón (ion tentativo). Abu-Reidah et al., (2015a)
74.	Ácido trans-cafeico IV a	Ácido hidroxicinámico	20.05	179.0344	181.0501	0.9	5.0	C ₉ H ₈ O ₄	135.0442	135.0000 97.0000	HMDB0001964 MID3316 (ion tentativo)
75.	Ácido cafeoilquínico III Ácido cripto-clorogénico Ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquínico a b	Ácido hidroxicinámico	20.06	353.0873	353.0881	-0.2	-0.6	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	707.1788 191.0390 179.0353 173.0441 135.0447	191.0146 179.0306 173.0052 135.0390	Clifford et al., (2003), Madala, Tugizimana, and Steenkamp (2014), Ncube et al., (2014)
76.	Ácido (-)-shikímico	Ácido orgánico	20.06	173.0450	175.0606	-0.8	-4.6	C ₇ H ₁₀ O ₅	129.0176 111.0245 93.0358	129.0552 111.0446 93.0348	HMDB0003070 PR100485 (ion tentativo)
77.	No identificado Derivado del ácido shikímico	Ácido fenólico	20.06	313.0559	315.0716	-0.1	-0.3	C ₁₃ H ₁₄ O ₉	173.0441 129.0176 111.0245 93.0358	129.0552 111.0446 93.0348	HMDB0003070 PR100485 (ion tentativo)
78.	Ácido quínico V	Ácido orgánico	20.08	191.0556	193.0712	-0.9	-4.7	C ₇ H ₁₂ O ₆	173.0439 109.0041 85.0302	173.0485 127.0356 109.0060 85.0330 173.0442 109.0302	Patrón (ion tentativo). Abu-Reidah et al., (2015a)
79.	Ácido cítrico VII	Ácido orgánico	20.09	191.0192	193.0348	0.7	3.7	C ₆ H ₈ O ₇	192.0180 111.0099 87.0823	192.0188 111.0089 87.0124	Patrón (ion tentative). PR100481
80.	Ácido trans-ferúlico I a	Ácido hidroxicinámico	20.72	193.0501	195.0657	0.4	2.1	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	178.0354 149.0441 134.0357	178.0264 149.0638 134.0374	Patrón. Restivo et al., (2014) (ion tentativo)

81.	Ácido trans-ferúlico II a	Ácido hidroxicinámico	21.26	193.0501	195.0657	-0.2	-1.0	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	179.0348 149.0558 134.0359	178.0264 149.0638 134.0374	Patrón. Restivo et al., (2014) (ion tentativo)
82.	Ácido cafeoilshikímico I	Ácido hidroxicinámico	21.65	335.0767	337.0923	-0.3	-0.9	C ₁₆ H ₁₆ O ₈	191.0411 179.0518 173.0481 161.0287 135.0421	179.0355 161.0240 135.0448 191, 173	Fang, Yu, and Prior (2002), Abu-Reidah et al., (2013b, 2015b), Karar and Kuhnert (2015), Said et al., (2016) (trazas)
83.	Kaempferol- <i>O</i> -rutinósido- <i>O</i> -glucosa	Flavonol glucósido	21.69	755.2034	757.2191	-0.1	-0.1	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	593.1497 285.0740	593.1553 531.2419	Abu-Reidah et al., (2013a, 2015b)
84.	Dihidroxiopropiofenona-hexósido	Ácido hidroxicinámico	21.85	327.1080	329.1236	-0.4	-1.2	C ₁₅ H ₂₀ O ₈	165.0563	165.0551	Abu-Reidah et al., (2013c)
85.	Ácido <i>p</i> -Coumaroilquinico III a	Ácido hidroxicinámico	22.15	337.0923	339.1080	-1.6	-4.7	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	191.0557 173.0448 163.0420	191.0553 173.0500 163.0380	Clifford et al., (2003), Abu-Reidah et al., (2013d), Oszmiański, et al., (2015)
86.	Ácido quínico VI	Ácido orgánico	22.17	191.0556	193.0712	-0.5	-2.6	C ₇ H ₁₂ O ₆	173.0463 127.0410 109.0284 85.0289	173.0485 127.0356 109.0060 85.0330 173.0442 109.0302	Patrón (ion tentativo). Abu-Reidah et al., (2015a)
87.	Ácido cumárico III a	Ácido hidroxicinámico	22.27	163.0395	165.0552	-0.1	-0.6	C ₉ H ₈ O ₃	119.0475	119.0502 93.0345	MID306 (ion tentative)
88.	Ácido cafeoilshikímico II	Ácido hidroxicinámico	22.71	335.0767	337.0923	-0.2	-0.6	C ₁₆ H ₁₆ O ₈	191.0453 179.0346 173.0358 161.0224 135.0455	179.0355 161.0240 135.0448 191, 173	Fang, Yu, and Prior (2002), Abu-Reidah et al., (2013b, 2015b), Karar and Kuhnert (2015), Said et al., (2016)
89.	Isolariciresinol 9'-β-D-glucopiranosido	Lignano	23.13	521.2023	523.2179	1.9	3.6	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₁	359.1494	359.1493	Abu-Reidah et al., (2013b, 2013c)
90.	Fenilalanina	Aminoácido	23.93	164.0712	166.0868	0.1	0.6	C ₉ H ₁₁ NO ₂	147.0547 103.0340	164.0724 147.0446 103.0544	Mintz-Oron et al., (2008), Abu-Reidah et al., (2013d, 2015b)

91.	No identificado VII	-	24.29	535.1816		-0.4	-0.7	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₂	373.1301 355.1183 343.1193	-	-	
92.	1-Hidroxipinoresinol 1-O-β-D-glucósido	Lignano	24.40	535.1816	537.1972	1.4	2.6	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₂	357.1275 373.1349	357.1349		Abu-Reidah et al., (2013c)
93.	Triptófano	Aminoácido	24.79	203.0821	204.0899	-0.5	-2.5	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	203.0816 159.1085 142.0738 116.0393	203.0826 186.06 159.09 142.07 116.05 74.02		BML81641 (ion tentativo) Mintz-Oron et al., (2008)
94.	Ácido dicafeolquínico (ácido isoglorogénico A) I	Ácido hidroxicinámico	25.38	515.1190	517.1346	0.7	1.4	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	353.1018 191.0603 179.0384 135.0433	353.0872 191.0561 179.0352 135.0465		Clifford, Knight, and Kuhnert (2005), Abu-Reidah et al., (2013d), Abdennacer et al., (2015) (trazas)
95.	No identificado VIII	-	25.58	523.2179	525.2336	0.0	0.0	C ₂₆ H ₃₆ O ₁₁	-	-		-
96.	Kaempferol 3-sambubiósido I	Flavonol glucósido	25.74	579.1350	581.1506	-0.4	-0.7	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	285.0569 284.0410	285		Abu-Reidah et al., (2013a)
97.	Kaempferol o luteolina I	Flavonoide	25.75	285.0399	287.0556	-1.3	-4.6	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-	255.0219 227.0356		HMDB0005801 Kumar, Singh, and Kumar (2017)
98.	No identificado IX	-	26.07	497.3337		1.1	2.2	C ₂₄ H ₅₀ O ₁₀	487.3040 451.3288	-		-
99.	Kaempferol o luteolina II	Flavonoide	26.14	285.0399	287.0556	-0.3	-1.1	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-	255.0219 227.0356		HMDB0005801 Kumar, Singh, and Kumar (2017)
100.	Kaempferol 3-sambubiósido II	Flavonol glucósido	26.19	579.1350	581.1506	0.1	0.2	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	285.0707 284.0439	285		Abu-Reidah et al., (2013a)
101.	Kaempferol 3-sambubiósido III	Flavonol glucósido	26.92	579.1350	581.1506	0.9	1.6	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	285.0540 284.0362	285		Abu-Reidah et al., (2013a)
102.	Kaempferol o luteolina III	Flavonoide	26.94	285.0399	287.0556	-0.5	-1.8	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-	255.0219 227.0356		HMDB0005801 Kumar, Singh, and Kumar (2017)
103.	Quercetina I	Flavonol	27.15		303.0505	0.8	2.7	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	285.1173 273.1522	285.0399 273.0399		HMDB0005794

104.	Rutina (Quercetin 3-rutinósido) I b	Flavonol glucósido	27.22	609.1456	611.1612	2.9	4.8	$C_{27}H_{30}O_{16}$	301.048 463.0915	463.0397 301.0277 151.0034	Sánchez-Rabaneda et al., (2003), Abu-Reidah et al., (2013a, 2013b, 2015a), Oszmiański, et al., (2015), Kumar, Singh, and Kumar (2017)
105.	Quercetina II	Flavonol	27.22	301.0348	303.0505	-0.2	-0.7	$C_{15}H_{10}O_7$	217.1107 191.0575 151.0389	217.0060 191.0389 151.0054	PB002409 Abu-Reidah et al., (2015a)
106.	Quercetin hexosa	Flavonol glucósido	27.27	463.0877	465.1033	-0.2	-0.4	$C_{21}H_{20}O_{12}$	301.0330 300.0323	300.0292 301.0367	Abu-Reidah et al., (2013d) (ion tentativo) (trazas)
107.	Ácido dicafeoilquínico (ácido isoclorogénico A) II	Ácido hidroxicinámico	27.30	515.1190	515.1141	-0.3	-0.6	$C_{25}H_{24}O_{12}$	353.0812 191.0574 173.0437 135.0445	353.0872 191.0561 179.0352 135.0465	Clifford, Knight, and Kuhnert (2005), Abu-Reidah et al., (2013d), Abdennacer et al., (2015) (trazas)
108.	Rutina (Quercetin 3-rutinósido) II a	Flavonol glucósido	27.44	609.1456	611.1612	0.9	1.5	$C_{27}H_{30}O_{16}$	301.0343	463.0397 301.0277 151.0034	Sánchez-Rabaneda et al., (2003), Abu-Reidah et al., (2013a, 2013b, 2015a), Oszmiański, et al., (2015), Kumar, Singh, and Kumar (2017)
109.	Quercetina III	Flavonol	27.45	301.0348	303.0505	-0.5	-1.7	$C_{15}H_{10}O_7$	217.1082 191.0554 151.9345	217.0060 191.0389 151.0054	PB002409 Abu-Reidah et al., (2013a)
110.	Kaempferol 3-sambubiosido IV	Flavonol glucósido	27.66	579.1350	581.1506	0.8	1.4	$C_{26}H_{28}O_{15}$	285.0715 284.0556	285	Abu-Reidah et al., (2013a)
111.	Kaempferol o luteolina IV	Flavonoide	27.96	285.0399	287.0556	-0.7	-2.5	$C_{15}H_{10}O_6$	-	255.0219 227.0356	HMDB0005801 Kumar, Singh, and Kumar (2017)
112.	Kaempferol 3,4'-dixiloside Derivado glucósido del kaempferol I	Flavonol glucósido	28.01	549.1244	551.1401	2.7	4.7	$C_{25}H_{26}O_{14}$	520.1656 284.0329 285.0416	284	-
113.	Kaempferol 3,4'-dixyloside Derivado glucósido del kaempferol II	Flavonol glucósido	28.36	549.1244	551.1401	1.5	2.7	$C_{25}H_{26}O_{14}$	285.0415 284.0318	284	-

114.	Nicotiflorina (Kaempferol-3- <i>O</i> - rutinósido) or luteolin-7- rutinósido I	Flavonoide glucósido	28.69	593.1506	595.1663	0.3	0.5	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	447.1240 285.0471	447.0968 285.0187 287.0567(+) 285.0427	Abu-Reidah et al., (2013c, 2015a), Oszmiański, et al., (2015)
115.	Kaempferol or luteolina VI	Flavonoide	28.70	285.0399	287.0556	-1.1	-3.9	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-	255.0219 227.0356	HMDB0005801 Kumar, Singh, and Kumar (2017)
116.	Hexósido del kaempferol o la luteolina	Flavonoide glucósido	28.71	447.0927	448.1006	-1.1	-2.5	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	285.0420 284.0345	285.0415 284.0318	Abu-Reidah et al., (2015a) (ion tentativo) (trazas)
117.	Nicotiflorina (Kaempferol-3- <i>O</i> - rutinoside) or Luteolin 7- rutinoside II	Flavonoide glucósido	29.10	593.1506	595.1663	1.9	3.2	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	285.0566	447.0968 285.0187 287.0567(+) 285.0427	Abu-Reidah et al., (2013c, 2015a), Oszmiański, et al., (2015)
118.	Kaempferol o luteolina VII	Flavonoide	29.12	285.0399	287.0556	1.4	4.9	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-	255.0219 227.0356	HMDB0005801 Kumar, Singh, and Kumar (2017)
119.	No identificado X	-	30.00	723.5039		-0.8	-1.1	C ₄₁ H ₇₂ O ₁₀	713.4751 701.4951(+) 677.4969	-	-
120.	Kaempferol o luteolina VIII	Flavonoide	30.03		287.0556	0.2	0.7	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-	255.0219 227.0356	HMDB0005801 Kumar, Singh, and Kumar (2017)
121.	No identificado XI	-	34.29	413.2175		1.5	3.4	C ₂₁ H ₃₄ O ₈	327.2177 216.1255	-	-
122.	No identificado XII	-	35.92	415.2484	417.2641	-3.3	-7.9	C ₂₅ H ₃₆ O ₅	439.2427 327.2182 216.1248	-	-

I, II, III, etc. denotan isómeros. ^a Ya reportados en algunas especies de *Phlebodium* incluyendo *Phlebodium aureum* y *Polypodium decumanum*. ^b Ya reportados en otras especies de la familia *Polypodiaceae*.

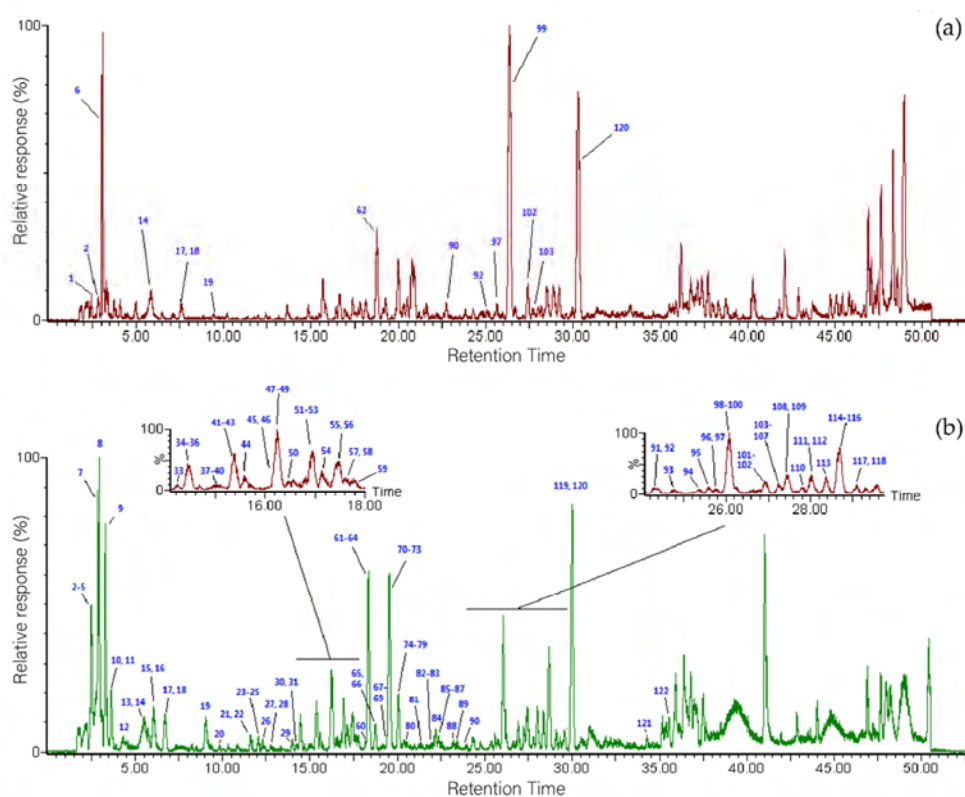


Figura 2.2. Cromatograma obtenido en el análisis HPLC-ESI/MS (Q-ToF) de *P. decumanum*. (a) Cromatograma en modo ESI positivo y (b) cromatograma en ESI negativo. La detección se realizó en un rango de masas comprendido entre 50 m/z hasta 2000 m/z . Se indica el tiempo de retención de cada pico. Los números (en azul) corresponden a aquellos recogidos en la Tabla 2.1.

4.1.1. Ácidos orgánicos

Los primeros compuestos en eluir detectados en el extracto hidroetanólico del *P. decumanum* fueron los más polares, los ácidos orgánicos libres y sus derivados. Se caracterizaron un total de 8 de ácidos orgánicos bien conocidos, junto con isómeros y derivados, correlacionando los datos de MS y la fragmentación MS/MS de los estándares comerciales y la información de la literatura. Específicamente, se detectaron el ácido lactobiónico (m/z 357.1033, tiempo de retención 2.49 min, pico 2), el ácido ribónico (m/z 162.0399, tiempo

de retención 2.50 min, pico 3), el ácido múxico o glucárico (m/z 209.0297, picos 5, 24, 34, 41, y 52), el ácido quínico (m/z 191.0556, picos 7, 8, 47, 73, 78, y 86) (**Figura 2.3a**), el ácido málico (m/z 133.0137, tiempo de retención 3.62 min, pico 11) (**Figura 2.3b**), el ácido málico hexosa (m/z 295.0665, min 3.62, pico 10), los isómeros del ácido cítrico (m/z 191.0344, picos 4, 15, 23, 36, 43, 51, 79), el ácido glutárico (m/z 131.0344, min 18.34, pico 61), y el ácido shikímico (m/z 173.0450, min 20.06, pico 76) (Parrado et al., 2016). En la **Figura 2.3** se muestran las estructuras de algunos de estos compuestos.

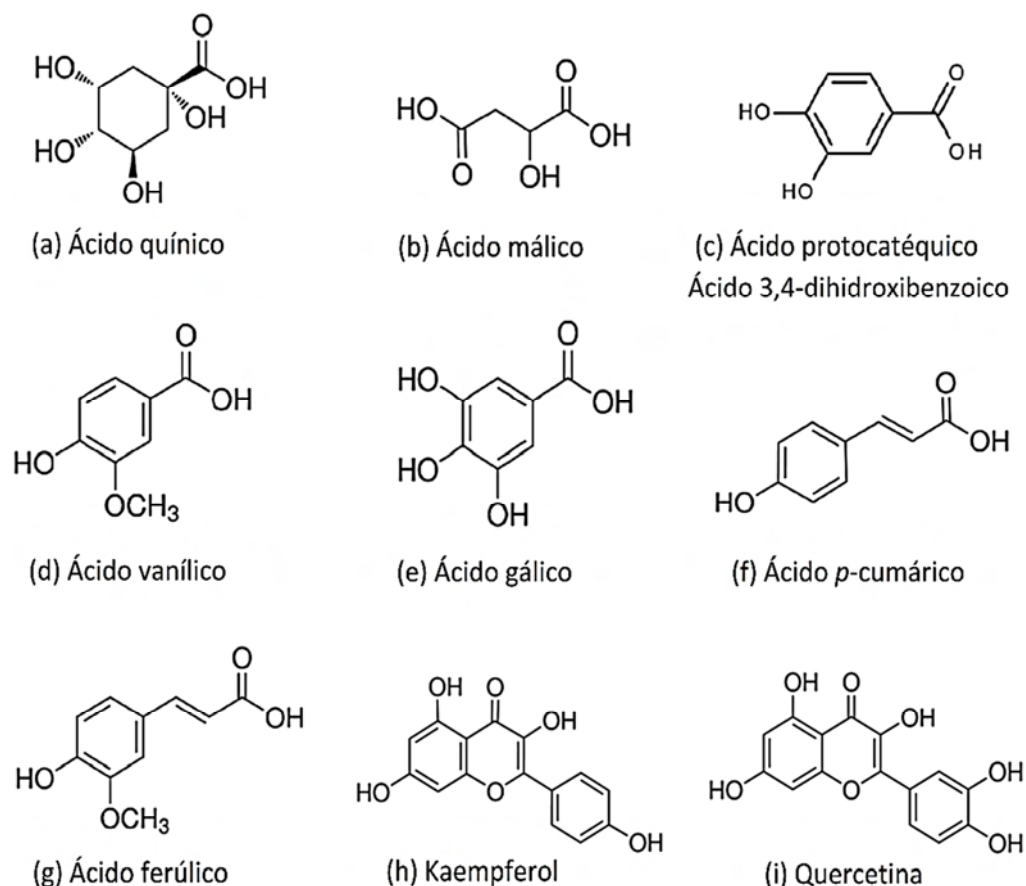


Figura 2.3. Estructuras de algunos de los ácidos orgánicos detectados en frondes de *Phlebodium decumanum*.

4.1.2. Amino azúcares y derivados

Se han identificado un total de nueve amino-azúcar derivados. El pico 13 (de fórmula molecular $C_{11}H_{17}NO_8$), que eluye en un tiempo de retención de 5.52 min, fue identificado como ácido glutámico-hexosa, ya que mostró una pérdida neutra de una molécula de azúcar (glucosa o fructosa), dando como resultado un ion producto m/z 128.0356 (residuo de amino ácido que corresponde al ácido piroglutámico en estructura). El patrón de fragmentación de este compuesto ha sido previamente publicado en otras fuentes bibliográficas (Abu-Reidah et al., 2015b). El pico 18, con ion principal de m/z 188.0565/190.0690 en modo negativo y positivo, respectivamente, fue identificado como ácido N-acetilglutámico. Su caracterización se basó en los datos conocidos de MS y en la aparición del ion fragmento m/z 144.0656 (que corresponde al ácido glutámico al perder un grupo acetilo $[M-H-COCH_3]^-$), y los iones producto típicos de m/z 170.0455, $[M-H-H_2O]^-$, y 128.0351, $[Glu-H_2O]^-$. Adicionalmente, el pico 90 (tiempo de retención 23.93 min) fue detectado y caracterizado en base a los datos de masas publicados por Mint-Oron et al., 2018. Los iones detectados a m/z 118.0853 y a m/z 144.1013 (picos 1 y 6) en modo de ionización positivo y con fórmulas elementales $C_5H_{11}NO_2$ y $C_7H_{13}NO_2$, fueron tentativamente asignados a valina y L-prolina betaína, respectivamente (Ledema-Escobar, Priego-Capote, and Luque de Castro, 2015). Finalmente, el pico 93 (tiempo de retención de 24.79 min, $C_{11}H_{12}N_2O_2$), se asignó a otro aminoácido aromático, al triptófano (Abu-Reidah et al., 2013b).

4.1.3. Ácidos fenólicos y derivados

Se caracterizaron y clasificaron más de 45 derivados fenólicos, de acuerdo a su naturaleza química, en dos grupos principales: derivados del ácido hidroxibenzoico y derivados del ácido hidroxicinámico.

A. Derivados del ácido hidroxibenzoico. El método propuesto fue muy útil para la caracterización de 13 derivados del ácido hidroxibenzoico. Los compuestos detectados al minuto 12.93 y 15.17 (picos 27 y 40) produjeron un espectro de MS/MS con los iones característicos $[M-2H-153.0188]^-$ y $[M-2H-109.0277]^-$, que es consistente con la pérdida de restos de glucosa y CO_2 , respectivamente. Estos compuestos fueron tentativamente identificados como isómeros glicósidos del ácido dihidroxibenzoico (isómeros glicósidos del ácido protocatéquico o del ácido gentísico), y el ion fragmento de m/z 153 asignado como el ácido dihidroxibenzoico (ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido protocatéquico [**Figura 2.3c**]; ácido 2,5-dihidroxibenzoico, ácido gentísico) (Abu-Reidah, et al., 2013b; Rodríguez-Pérez et al., 2013; Restivo et al., 2014).

El ácido protocatéquico ha sido caracterizado previamente en un extracto formado a partir de las partes aéreas de *P. leucotomos* (*Phlebodium aureum*), helecho que pertenece al mismo género que *P. decumanum* (García et al., 2006). Del mismo modo, el ion molecular identificado con m/z 329.0906 (pico 38), fue asignado al hexóxido del ácido vanílico, mostrado por la presencia de un ion fragmento en m/z 167.0349, indicativo del ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico (ácido vanílico) (**Figura 2.3d**) (Kumar, Singh, and Kumar, 2017). Asimismo, el ácido vanílico ha sido previamente identificado a un tiempo de retención de 15.09 en *P. Leucotomos* (García et al., 2006).

El pico 22 (m/z 331.0665) fue asignado como galoilhexosa en base a los espectros MS/MS obtenidos y la literatura. Los datos espectrales de MS-MS mostraron un ion producto a m/z 169.0114 (ácido gálico) (**Figura 2.3e**) secundario a la pérdida neutra del residuo hexosa (-162 Da). Además, el pico también mostró otros dos fragmentos a m/z 151.0060 y 125.0185 relacionados con la deshidratación y descarboxilación subsiguientes del grupo galoil (Rodríguez-Pérez et al., 2013; Abu-Reidah et al., 2015a).

En el modo de ionización negativo, el pico 31 (tiempo de retención de 14.22 min) con los iones producto de m/z 359.0981 y m/z 197.0450 fue asignado como un derivado hexósido del ácido siríngico, basado en la pérdida neutra de la porción de hexosa (-162 da) y el ion producto de m/z 197.0450 (ácido siríngico) (Abu-Reidah et al., 2015a).

B. Derivados del ácido hidroxicinámico. Los derivados hidroxicinámicos caracterizados en el extracto de *P. decumanum* fueron identificados como ácido 3,4-dihidroxicinámico (ácido cafeico), ácido 4-hidroxicinámico (ácido *p*-cumárico) (**Figura 2.3f**), y derivados del ácido cafoilquínico, en base a la comparación de sus tiempos de retención y espectros de MS/MS con sus estándares y la literatura relacionada. Estos ácidos fenólicos, así como el ácido 3-metoxi-4-hidroxicinámico (ácido ferúlico, picos 80 y 81) (**Figura 2.3g**), se han identificado en otras plantas de la familia Polypodiaceae (Gombau et al., 2006; Nilesh, Kshirsagar, and Vipin, 2011; Parrado et al., 2016). Las estructuras de algunos de estos compuestos se muestran en la **Figura 2.4**.

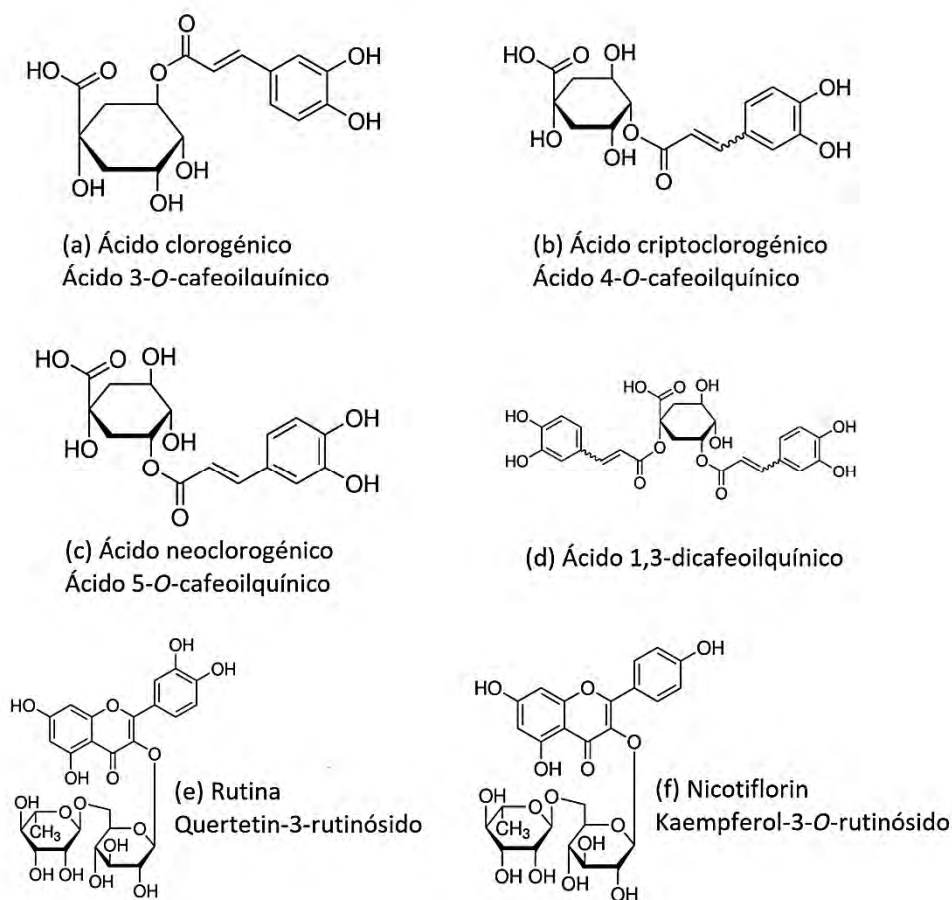


Figura 2.4. Estructuras de algunos de los derivados fitoquímicos caracterizados en el extracto de *Phlebodium decumanum*.

Los picos 48, 72 y 75 (tiempos de retención de 16.24, 19.53, y 20.06 min respectivamente) produjeron el mismo ion $[M-H]^-$ a m/z 353.0878 el cual corresponde a la fórmula molecular $C_{16}H_{17}O_9$ (**Figura 2.5**). Estos tres compuestos fueron designados como isómeros del ácido mono-cafeoilquínico (**Figura 2.4a, b, c**), basados en la pérdida neutra del resto de ácido cafeico (-162 da) y el ion producto de m/z 191 (ácido quínico) (**Figura 2.3a**) (Clifford et al., 2003; Madala, Tugizimana, and Steenkamp, 2014; Ncube et al., 2014). En efecto, los isómeros del ácido clorogénico han sido descritos previamente en la literatura en otras especies de

Phlebodium (García et al., 2006; Gombau et al., 2006; Nilesh, Kshirsagar, and Vipin, 2011), así como en otras especies de la familia *Polypodiaceae* (Wen et al., 2012).

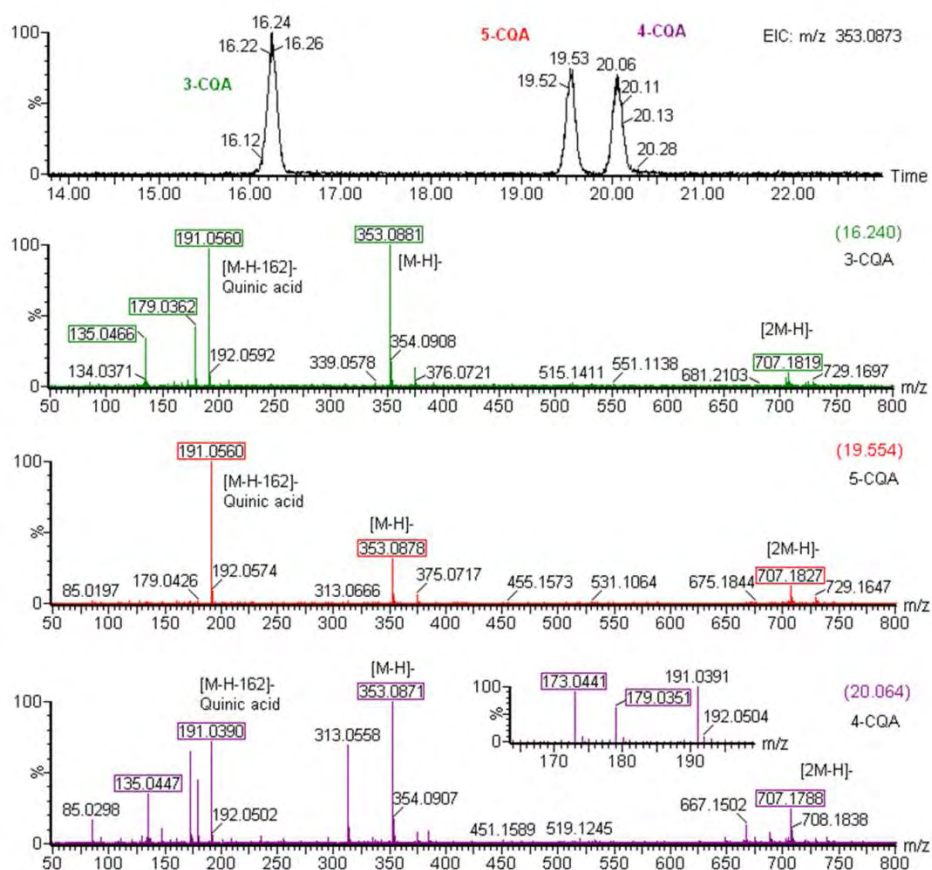


Figura 2.5. Cromatograma y espectros MS/MS de los isómeros del ácido cafeoilquínico en el extracto hidroalcohólico de *Phlebodium decumanum*.

Los picos 46, 50, 54, y 60 fueron detectados en los tiempos de retención 16.11, 16.47, 17.14 y 18.18 min, con m/z 705.1667 y fórmula molecular $C_{32}H_{34}O_{18}$. Los datos ESI-QTOF de estos compuestos en modo de ion negativo mostraron el mismo patrón de fragmentación dando como iones principales en 513.1040 y 339.0529 m/z. Estos compuestos fueron

identificados como isómeros del dímero del ácido cafeoilquínico, en base a los datos de MS encontrados en la bibliografía (Schilling et al., 2008; Abu-Reidah et al., 2013c).

Los picos 94 y 107 (de m/z 515.1190) (**Figura 2.3d**) fueron también caracterizados en el extracto de *P. decumanum* como dos isómeros del ácido dicafeoilquínico, basados en los datos de MS y la literatura (Clifford, Knight, and Kuhnert, 2005; Abu-Reidah et al., 2013d; Abdennacer et al., 2015).

Los picos 82 y 88 (m/z 335.0767, y $C_{16}H_{18}O_8$) fueron asignados a isómeros del ácido cafeoilshikímico. En el análisis QTOF-MS, los datos de MS/MS han mostrado los iones producto con m/z 179.0346 $[M-H-156]^-$ y 135.0455 $[M-H-156-44]^-$ después de la pérdida neutral del ácido shikímico y CO_2 , respectivamente (Fang, Yu, and Prior, 2002; Karar and Kuhnert 2015; Said et al., 2016).

El pico 84 (m/z 327.1055, y $C_{25}H_{23}O_{13}$) fue caracterizado como un dihidroxipropiofenona-hexósido basado en los datos de MS y el ion producto de m/z 165.0563 tras la pérdida de una hexosa $[M-H-162]^-$ (Abu-Reidah et al., 2013c).

Los picos 20, 64 y 85 correspondieron a tres isómeros del ácido *p*-cumarilquínico (ácido 4-hidroxicinamoil-quínico). El espectro de MS/MS en el modo de ionización negativo fue caracterizado con el ion padre m/z 337.0923 y fragmentación m/z 191.0556 (como ácido quínico) y m/z 163.0395 (como *p*-cumárico) (**Figura 2.3f**) (Abu-Reidah et al., 2013d; Ncube et al., 2014; Oszmiański et al., 2015). Estos compuestos han sido previamente encontrados en *P. aureum* (García et al., 2006).

Se detectaron en el extracto de *P. decumanum* varias formas conjugadas y glucosiladas del ácido cafeico y *p*-cumárico. Así, los picos 58 y 68 (iones pseudo-moleculares en m/z 341.0873 en el modo de ionización negativo, $C_{15}H_{18}O_9$) fueron caracterizados como cafeoilhexosas en base a los datos de MS y el patrón de fragmentación, que muestra la pérdida neutral de una molécula de glucosa (162 Da) a m/z 179.0344 (indicativo de la estructura del ácido cafeico).

En este contexto, los picos 33, 45 y 67 (detectados a 14.34, 16.03, y 19.32 min en el ESI-QTOF en modo de ion negativo) mostraron una fórmula molecular idéntica ($C_{22}H_{28}O_{14}$). Estos compuestos dieron el mismo ion molecular m/z 515.1401 y mostraron fragmentos de iones a m/z 353.0858 y m/z 191.0562, siendo tentativamente asignados al ácido mono-cafeoilquínico (**Figura 2.4c**) y al ácido quínico (**Figura 2.3a**), respectivamente. Por tanto, estos isómeros fueron identificados como cafeoilquínico glucósido, basado en la literatura.

El pico 71 ($[M-H]^-$ m/z 325.0923 en el modo negativo, y $C_{15}H_{18}O_8$), fue identificado como ácido *p*-cumárico (**Figura 2.3f**) en base a los espectros MS/MS y el ion fragmento de m/z 163.0414. Por lo tanto, este compuesto fue designado como coumaril-hexosa (Abu-Reidah et al., 2013b, 2013c, 2015b).

Finalmente, el pico 32 (m/z 473.1305, $C_{20}H_{26}O_{13}$) fue asignado al ácido cafeico pentosa-*O*-hexosa. El MS2 de este ión mostró picos a m/z 311.0786 y 177.0569, correspondiente a la pérdida de un hexósido $[M-H-162]^-$ y un pentósido $[M-2H-162-132]^-$ (El-Sayed et al., 2017).

4.1.4. Flavonoides y derivados

Se han caracterizado un total de 23 derivados de flavonoides junto con sus isómeros. El pico 116 (tiempo de retención de 28.71 min) se caracterizó como kaempferol hexósido o luteolina hexósido, ya que produce un ion fragmento a m/z 285.0420, que resulta de una pérdida neutral de $[M-H-162]^-$ (resto de glucosa), y corresponde al kaempferol (**Figura 2.3h**) o a la luteolina en estructura (Abu-Reidah et al., 2013a, 2015a; Kumar, Singh, and Kumar, 2017).

Los iones producto correspondientes a la quercetina (**Figura 2.3i**), m/z 300.0276 (*odd electron ion*) y/o 301.0354 (*even electron ion*), se observaron en el espectro MS/MS del pico 106 (m/z 463.0877). Por tanto, este flavonol se asignó a la quercetina hexosa, produciendo los iones fragmento compatibles con la pérdida del monómero de glucosa (Abu-Reidah et al., 2013d).

Para el ion precursor de m/z 609.1456 (picos 104 y 108) se propuso la quercetina 3-rutinósido (rutina) (**Figura 2.4e**) o isómeros de ésta, con la fórmula $C_{27}H_{30}O_{16}$. El espectro MS/MS reveló el ion fragmento característico a m/z 301.0348 [Y], que puede ser indicativo de quercetina (**Figura 2.3a**), correspondiente a la pérdida neutral de la fracción rutinósido $[M-H-308]^-$ de acuerdo con la literatura.

4.1.5. Lignanos y derivados

Con respecto a los lignanos, se caracterizaron dos derivados. Un glucósido de lignano, pico 89 (tiempo de retención 23.13 min) con un ion producto en el espectro MS/MS a 359.1493 m/z (indicativo de isolariciresinol), relacionado con la pérdida neutral de un residuo de glucosa (-162 Da). Por lo tanto, se sugirió que el ion precursor era isolariciresinol 9'- β -D-glucopiranosido (Abu-Reidah et al., 2013b). El pico 92 (tiempo de retención 24.40 min), dio un ion

molecular de m/z 537.1949 y 535.1816, en los modos de ionización positivo y negativo, respectivamente. La identificación de un ion fragmento a m/z 357.1275 $[M-H-178]^-$ es indicativo de pinoresinol. Además, el espectro MS/MS produjo un ion m/z 373.1349 $[M-H-162]^-$ después de la pérdida neutra de una molécula de glucosa. De acuerdo con la fragmentación MS/MS reportada en la literatura, este compuesto se asignó tentativamente al 1-hidroxipinoresinol 1-O- β -D-glucósido (Abu-Reidah et al., 2013c).

4.1.6. Otros compuestos

Además de los compuestos descritos, se identificaron otros componentes del extracto que no se pudieron asignar a ningunos de los grupos anteriores. El pico 66, un derivado iridoide, se detectó y caracterizó como penstemida (Rodríguez-Pérez et al., 2013). Los picos 55 y 63, dos derivados del ácido benzoico (tiempos de retención de 17.47 min y 18.37 min respectivamente; m/z 401.1445, y $C_{18}H_{25}O_{10}$) fueron designados como bencil alcohol-hexosa-pentosa en base a los datos de MS/MS reportados previamente en la literatura. Los espectros de MS de estos picos proporcionaron un ion secundario en m/z 269.1021 ($C_{13}H_{17}O_6$) resultado de la pérdida neutral de la unidad de pentosa (Moco et al., 2006; Bystrom et al., 2008; Mintz-Oron et al., 2008; Karar and Kuhnert, 2015).

5. CONCLUSIONES

Como resultado de la investigación realizada en este capítulo II de la Tesis Doctoral se han obtenido las siguientes conclusiones:

- I. El presente trabajo representa el primer estudio profundo realizado sobre la composición fitoquímica de un extracto obtenido de los frondes de *P. decumanum*.
- II. La determinación de los componentes químicos del extracto se llevó a cabo mediante HPLC-ESI/MS (QTOF) en modo de ionización positivo y negativo. La combinación de la cromatografía de líquidos con la detección QTOF-MS ha permitido caracterizar el extracto en profundidad en base a la precisión de masa y la espectrometría de masas en tándem.
- III. Se han caracterizado un total de 122 metabolitos a partir de la información de MS disponible y la información previamente reportada en la literatura. Entre los compuestos identificados se incluyen 23 flavonoides, 47 ácidos fenólicos (34 ácidos hidroxicinámicos y 13 ácidos benzoicos), 9 amino derivados, 24 ácidos orgánicos y derivados, 2 lignano derivados, y otros compuestos que no pudieron ser asignados en ninguno de estos grupos.
- IV. El estudio de identificación desarrollado en este trabajo proporciona la primera caracterización integral disponible sobre la composición química de las hojas de *P. decumanum*.

6. REFERENCIAS

- Abdennacer, B., Karim, M., Yassine, M., Nesrine, R., Mouna, D., Mohamed, B. (2015). Determination of phytochemicals and antioxidant activity of methanol extracts obtained from the fruit and leaves of tunisian *Lycium intricatum* Boiss. *Food Chemistry* 174, 577-584.
- Abu-Reidah, I. M., Arráez-Román, D., Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2013a). Phytochemical characterisation of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by using high performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *Phytochemical Analysis* 24, 105-116.
- Abu-Reidah, I.M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2013b). Profiling of phenolic and other polar constituents from hydro-methanolic extract of watermelon (*Citrullus lanatus*) by means of accurate-mass spectrometry (HPLC-ESI-QTOF-MS). *Food Research International* 51, 354-362.
- Abu-Reidah, I.M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2013c). Extensive characterisation of bioactive phenolic constituents from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) by HPLC–DAD-ESI-QTOF-MS. *Food Chemistry* 141, 2269-2277.
- Abu-Reidah, I.M., Contreras, M.M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2013d). Reversed-phase ultra-high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry as a powerful tool for metabolic profiling of vegetables: *Lactuca sativa* as an example of its application. *Journal of Chromatography A* 1313, 212-227.
- Abu-Reidah, I.M., Ali-Shtayeh, M.S., Jamous, R.M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A. (2015a). HPLC–DAD–ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. *Food Chemistry* 166, 179-191.
- Abu-Reidah, I.M., Ali-Shtayeh, M.S., Jamous, R.M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A. (2015b). Comprehensive metabolite profiling of *Arum*

- palaestinum* (Araceae) leaves by using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Research International* 70, 74-86.
- Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D.G., Lightfoot, D.A. (2017). Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants* 6(4), 42.
- Bystrom, L.M., Lewis, B.A., Brown, D.L., Rodríguez, E., Obendorf, R.L. (2008). Characterization of phenolics by LC-UV/vis, LC-MS/MS and sugars by GC in *Melicoccus bijugatus* Jacq 'Montgomery' fruits. *Food Chemistry* 111(4), 1017-1102.
- Clifford, M.N., Johnston, K.L., Knight, S., Kuhnert, N. (2003). Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. *Journal of agricultural and food chemistry* 51(10), 2900-2911.
- Clifford, M.N., Knight, S., Kuhnert, N. (2005). Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MS. *Journal of agricultural and food chemistry* 53(10), 3821-3832.
- De Villiers, A., Venter, P., Pasch, H. (2016). Recent advances and trends in the liquid-chromatography-mass spectrometry analysis of flavonoids. *Journal of Chromatography A* 1430, 16-78.
- El-Sayed, M.A., Al-Gendy, A.A., Hamdan, D.I., El-Shazly, A.M. (2017). Phytoconstituents, LC-ESI-MS profile, antioxidant and antimicrobial activities of *Citrus x limon* L. Burm. f. Cultivar variegated pink lemon. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 9(4), 375-391.
- Fang, N., Yu, S., Prior, R.L. (2002). LC/MS/MS characterization of phenolic constituents in dried plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(12), 3579-3585.
- Ganzer, M., Sturm, S. (2018). Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis. An update covering 2011-2016. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 147, 211-233.
- García, F., Pivel, J.P., Guerrero, A., Brieva, A., Martínez-Alcázar, M.P., Caamano-Somoza, M., González, S. (2006). Phenolic components and antioxidant

- activity of Fernblock, an aqueous extract of the aerial parts of the fern *Polypodium leucotomos*. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 28, 157-60.
- Gattuso, M.A., Amalia, A., Gattuso, S.J. 2008. Caracteres morfoanatómicos de especies de *Phlebodium*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas Source* 7, 10-17.
- Gombau, L., García, F., Lahoz, A., Fabre, M., Roda-Navarro, P., Majano, P., González, S. (2006). *Polypodium leucotomos* extract: antioxidant activity and disposition. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 20(4), 464-471.
- Horvath, A., Alvarado, F., Szöcs, J., De Alvarado, Z. N., Padilla, G. (1967). Metabolic effects of calaguanine, an antitumor saponin of *Polypodium leucotomos*. *Nature* 214 (5094), 1256-1258.
- Karar, M.G.E., Kuhnert, N. (2015). UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS characterization of phenolics from *Crataegus monogyna* and *Crataegus laevigata* (Hawthorn) leaves, fruits and their herbal derived drops (Crataegutt Tropfen). *Journal of Chemical Biology & Therapeutics* 1, 1.
- Kumar, S., Singh, A., Kumar, B. (2017). Identification and characterization of phenolics and terpenoids from ethanolic extracts of *Phyllanthus* species by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis* 7(4), 214-222.
- Ledesma-Escobar, C.A., Priego-Capote, F., Luque de Castro, M.D. (2015). Characterization of lemon (*Citrus limon*) polar extract by liquid chromatography–tandem mass spectrometry in high-resolution mode. *Journal of Mass Spectrometry* 50(11), 1196-1205.
- Liu, B., Diaz, F., Bohlin, L., Vasänge, M. (1998). Quantitative determination of anti-inflammatory principles in some *Polypodium* species as a basis for standardization. *Phytomedicine* 5(3), 187-94.
- Madala, N.E., Tugizimana, F., Steenkamp, P.A. (2014). Development and optimization of an UPLC-QTOF-MS/MS method based on an in-source

- collision induced dissociation approach for comprehensive discrimination of chlorogenic acids isomers from *Momordica* plant species. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. ID 650879, 7 pages.
- Mintz-Oron, S., Mandel, T., Rogachev, I., Feldberg, L., Lotan, O., Yativ, M., Aharoni, A. (2008). Gene expression and metabolism in tomato fruit surface tissues. *Plant Physiology* 147(2), 823-851.
- Moco, S., Bino, R.J., Vorst, O., Verhoeven, H.A., de Groot, J., van Beek, T.A., Ric de Vos, C.H. (2006). A liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato. *Plant Physiology* 141(4), 1205-1218.
- Naczki, M., Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41, 1523-1542.
- Ncube, E.N., Mhlongo, M.I., Piater, L.A., Steenkamp, P.A., Dubery, I.A., Madala, N.E. (2014). Analyses of chlorogenic acids and related cinnamic acid derivatives from *Nicotiana tabacum* tissues with the aid of UPLC-QTOF-MS/MS based on the in-source collision-induced dissociation method. *Chemistry Central Journal* 8(1), 66.
- Nilesh, K., Kshirsagar, M.D., Vipin, S. (2011). GC-MS analysis of ethanolic extracts of *Polypodium decumanum*. *International Research Journal of Pharmacy* 2(9), 155-156.
- Oszmiański, J., Wojdyło, A., Nowicka, P., Teleszko, M., Cebulak, T., Wolanin, M. (2015). Determination of phenolic compounds and antioxidant activity in leaves from wild *Rubus* L. species. *Molecules* 20(3), 4951-4966.
- Parrado, C., Mascaraque, M., Gilaberte, Y., Juarranz, A., González, S. (2016). Fernblock (*Polypodium leucotomos* extract): Molecular mechanisms and pleiotropic effects in light-related skin conditions, photoaging and skin cancers, a review. *International Journal of Molecular Sciences* 17(7), 1026.
- Restivo, A., Degano, I., Ribechini, E., Colombini, P. (2014). Development and optimisation of an HPLC-DAD-ESI-QToF method for the determination of phenolic acids and derivatives. *PLoS One* 9(2), e88762.

- Rodríguez-Pérez, C., Quirantes-Piné, R., Amessis-Ouchemoukh, N., Madani, K., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutierrez, A. (2013). A metabolite-profiling approach allows the identification of new compounds from *Pistacia lentiscus* leaves. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 77, 167-174.
- Said, R.B., Hamed, A.I., Mahalel, U.A., Al-Ayed, A.S., Kowalczyk, M., Moldoch, J., Stochmal, A. (2016). Tentative characterization of polyphenolic compounds in the male flowers of *Phoenix dactylifera* by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and DFT. *International Journal of Molecular Sciences* 18(3), 512.
- Sánchez-Rabaneda, F., Jáuregui, O., Lamuela-Raventós, R.M., Bastida, J., Viladomat, F., y Codina, C. (2003). Identification of phenolic compounds in artichoke waste by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1008(1), 57-72.
- Schilling, S., Sigolotto, C.I., Carle, R., Schieber, A. (2008). Characterization of covalent addition products of chlorogenic acid quinone with amino acid derivatives in model systems and apple juice by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22(4), 441-448.
- Vasänge, M., Liu, B., Welch, C. J., Rolfsen, W., Bohlin, L. (1997a). The flavonoid constituents of two *Polypodium* species (Calaguála) and their effect on the elastase release in human neutrophils. *Planta Medica* 63 (6), 511-517.
- Wen, J., Kang, L., Huan, L., Xiao, Y., Zhang, X., Chen, Y. (2012). A validated UV-HPLC method for determination of chlorogenic acid in *Lepidogrammitis drymoglossoides* (Baker) Ching, Polypodiaceae. *Pharmacognosy Research* 4(3), 148-153.
- Wu, H., Guo, J., Chen, S., Liu, X., Zhou, Y., Zhang, X., Xu, X. (2013). Recent developments in qualitative and quantitative analysis of phytochemical constituents and their metabolites using liquid chromatography – mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 72, 267-291.

Yesares Ferrer, M., Mendoza Medina, J.A., Ruíz Cáceres, G.M., Alcaide García, A., Yesares Morillas E. (2001). Hydrosoluble fractions of *Phlebodium decumanum* and use thereof as nutritional complements in aids and cancer patients. United States Invention Patent, US 6,228,366B1. Helsint, S.A.L.

CAPÍTULO III

Identificación y cuantificación de
dos esteroides androgénicos,
androstenediona y
androstadienediona, en
Phlebodium decumanum y
alimentos mediante GC-MS/MS.

La parte experimental realizada en este capítulo III se ha desarrollado en los laboratorios de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada (FQ338). Los análisis GC-MS/MS se han llevado a cabo en el centro de instrumentación científica de la Universidad de Granada y en el laboratorio europeo de referencia para el análisis de pesticidas en frutas y verduras (EURL-FV) dirigido por el Dr. Rodríguez, de la Universidad de Almería.

3

Identificación y cuantificación de dos esteroides androgénicos, *androstenodiona* y *androstadienodiona*, en *Phlebodium decumanum* y alimentos mediante GC-MS/MS

1. INTRODUCCIÓN

El consumo de medicamentos y suplementos a base de hierbas en el deporte por parte de los atletas ha aumentado durante las últimas décadas. La mayoría de estos suplementos se utilizan para mejorar la fuerza muscular y la masa corporal. Aunque su empleo está muy extendido, sin embargo, está regulado y restringido a aquellos que no contengan compuestos ni principios activos prohibidos por el Comité Olímpico Internacional (COI).

En este contexto, son muchos los estudios publicados que han demostrado los efectos beneficiosos de *P. decumanum* en el deporte. Como respuesta normal al entrenamiento se producen diferentes grados de disfunción inmune lo que afecta al rendimiento físico y a procesos fisiológicos relacionados con el estrés y la inflamación. Es por eso, que los efectos positivos del helecho se han relacionado principalmente con su

demostrado efecto modulador del sistema inmune, específicamente dirigido a la modulación de la liberación de citoquinas (Punzón et al., 2003; González-Jurado et al., 2011).

La gran mayoría de estudios se han basado en la administración oral del extracto durante el ejercicio de alta intensidad, en una diversidad de sujetos. En primer lugar, la suplementación oral reduce de manera efectiva el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria. Díaz-Castro y colaboradores (2012) demostraron que se reduce la generación de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina e isoprostanos, marcadores del estrés oxidativo, además de disminuir el estadio inflamatorio, con la disminución del TNF α y el aumento de su receptor soluble. Otro estudio obtuvo resultados similares, demostrando tener un efecto favorable en el balance de citoquinas, al reducir los niveles plasmáticos de las proinflamatorias e incrementar las antiinflamatorias, lo cual resalta su efecto protector y modulador sobre la respuesta inmune (González-Jurado et al., (2011).

Los beneficios de su ingesta se han demostrado también sobre el daño muscular. *P. decumanum* tiene un papel protector y amortiguador del daño tisular que forma parte de la respuesta aguda al ejercicio físico, en base al mejor perfil enzimático evidenciado tras el periodo de entrenamiento del grupo de estudio que tomó el extracto (González-Jurado et al., 2008; Vargas-Corzo et al., 2014;). Además, mostró tener un efecto sobre los niveles plasmáticos de cortisol inducidos por el ejercicio sugiriendo que podría modular la respuesta de esta hormona al estrés físico (González-Jurado et al., 2009).

Todos estos hallazgos proporcionan una base para la administración de suplementos de *P. decumanum* para reducir los efectos indeseables

asociados al ejercicio físico, altamente ventajosa para retrasar la fatiga, disminuir el estrés oxidativo, la inflamación y, en general, mejorar el rendimiento deportivo. En este contexto, HELSINT S.A.L. ha desarrollado juntamente con la empresa distribuidora INFISPORT, el complemento nutricional EXPLIVAR® a base de *P. decumanum*, destinado al desarrollo y mejora de la actividad física y la nutrición científica aplicada al deporte y a la salud (Helsint S.A.L.).

Independientemente de la comercialización de estos suplementos naturales destinados a la mejora de la salud y el rendimiento físico, debe tenerse en cuenta que algunas plantas pueden tener sustancias dopantes en su composición, así como algunos productos pueden estar contaminados o adulterados por agentes prohibidos en deporte (Sellami et al., 2018). Aquí, los laboratorios acreditados por el Comité Olímpico Internacional desempeñan un papel clave en la defensa del principio del juego limpio y la habilidad innata, mediante el análisis y detección de cualquier tipo de sustancia exógena que pueda ser considerada dopaje (Kickman and Gower, 2003). Sin embargo, sustancias actualmente prohibidas en el deporte son producidas de forma natural por algunas plantas y animales por lo que la misma dieta implica su consumo, muchas veces sin conocimiento alguno. Esto es lo que ocurre con los esteroides anabolizantes andrógenicos, conocidos comúnmente como **“esteroides anabólicos”**. Se ha descubierto la presencia natural de hormonas sexuales (incluyendo las esteroideas) en ciertas plantas capaces que son capaces de sintetizarlas a partir de otros fitoesteroles, y que en la planta cumplen una función en el crecimiento (Poelmans et al., 2003; Janecko and Skoczowski, 2005; Tarkowská, 2019).

Estos nuevos descubrimientos, incitaron a un laboratorio certificado del Reino Unido a realizar una prueba de screening para la detección de

sustancias prohibidas en *P. decumanum*. Los resultados indicaron la presencia en el producto EXLIVAR de dos esteroides anabólicos; el 1,4-androstadieno-3,17-diona (**androstadienediona** o también conocido como **Boldiona**) y el 4-androsteno-3,17-diona (**androstenediona**); cuyo suministro exógeno en deportistas está prohibido. Estos compuestos pueden encontrarse de forma natural en carnes, algunas plantas, y en el ser humano. Son biosintetizados a partir del colesterol predominantemente en las glándulas suprarrenales y gónadas de mamíferos y son precursores de otras hormonas esteroideas anabólicas como la testosterona (Da et al., 2018). Por tanto, pueden estar presentes de forma natural, aunque no en elevadas cantidades, en productos de consumo de origen animal, como pueden ser carnes (Hartmann et al., 1998). No obstante, su presencia también se ha confirmado y documentado en algunas plantas (Da et al., 2018; Tarkowská, 2019) (**Figura 3.1**).

En base a esto, y a petición de la empresa Helsint S.A.L., este trabajo pretende confirmar la existencia de estos dos esteroides de cuestionable origen vegetal, androstadienediona y androstenediona, en muestras de extracto de *P. decumanum* (EXPLY-37®) y en las cápsulas EXPLIVAR.

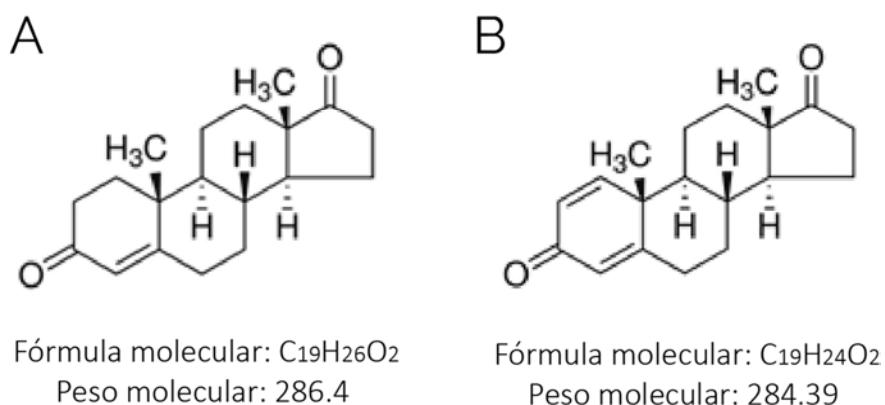


Figura 3.1. Estructuras químicas de 4-androstene-3,17-dione (A) y 1,4-androstadiene-3,17-dione (B).

2. OBJETIVOS

Los principales objetivos del trabajo de investigación desarrollado en el presente capítulo son los siguientes:

- I. **Desarrollo de un método analítico empleando la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS)** para la identificación y cuantificación de dos esteroides, el 4-androsteno-3,17-diona y el 1,4-androstadieno-3,17-diona en dos complementos nutricionales cuyo principal componente es *P. decumanum* (EXPLY37® y cápsulas EXPLIVAR) y en varias muestras de alimentos de consumo habitual: carne de ternera, carne de cerdo y huevos de gallina.
- II. **Aplicación de un tratamiento previo de las muestras** que consiste en la extracción de los esteroides a partir de la muestra compleja mediante extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos.
- III. **Demostrar la presencia de los esteroides de interés tanto en *P. decumanum* como en los alimentos**, con el objetivo de demostrar que la presencia de dichos esteroides, en cierta cantidad, no provoca alteraciones en el organismo y por tanto no deberían ser considerados como dopaje por las Agencias Internacionales y Nacionales Antidopaje.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos y disolventes

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. El acetato de etilo (grado LC-MS) y los reactivos derivatizantes *N-methyl-N-trimethylsilyl trifluoroacetamide* / *trimethyliodosilane* / *dithioerythritol* (MSTFA / TMIS / DTE) fueron proporcionados por Sigma-Aldrich Chemical Company (Madrid, España). Los dos esteroides fueron investigados: el compuesto patrón 4-androsteno-3,17-diona (**AED**) fue suministrado por Sigma-Aldrich Chemical Company y el 1,4-androstadieno-3,17-diona (**ADD**) fue obtenido de TCI Chemicals (Tokio, Japón). Las disoluciones stock de los estándares comerciales se prepararon (100 mg L^{-1}) en acetato de etilo. Las soluciones estándar de trabajo conteniendo los dos analitos se prepararon igualmente en acetato de etilo a partir de las soluciones stock y se guardaron a 4°C en recipientes de vidrio ámbar hasta su uso.

3.2. Instrumentación y software

En el análisis GC-MS se empleó un equipo Agilent modelo 7890A GC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolo (triple-quad) Quattro micro TM GC (Waters, Manchester, UK) con fuente iónica de impacto electrónico (**Figura 3.2**). La columna utilizada para la separación fue la ZB-5MS (30 m x 0.25 mm, 0.25 μm film), columna de carácter apolar de la casa comercial Phenomenex (Torrance, CA, USA). Para el manejo del equipo y la adquisición e interpretación de los datos se empleó el software MassLynxTM 4.1 (Waters, Manchester, UK).



Figura 3.2. Cromatógrafo de gases Agilent y espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolo (triple-quad) empleado para la caracterización e identificación de los esteroides en el extracto de *P. decumanum*.

Para la confirmación y cuantificación de ambos esteroides en las muestras suministradas se ha trabajado en el modo *multiple reaction monitoring (MRM)*. Este análisis se ha realizado en un sistema de cromatografía de gases ultra rápida Agilent Intuvo 9000 GC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipado con un muestreador Agilent 7693 y un espectrómetro de masas triple cuadrupolo 7010B GC/MS Triple Quad de la misma casa comercial (Agilent Technologies) con fuente iónica de impacto electrónico (**Figura 3.3**). Se utilizó una columna HP-5MS Ultra Inert (30 m x 0.25 mm, 0.25 μm film) (referencia 19091S-431UI-INT) de Agilent. La adquisición y procesamiento de datos fueron desarrollados con el software Agilent MassHunter Acquisition y Quantitative Analysis B.07.00 y B.08.00, respectivamente (Agilent Technologies).



Figura 3.3. Cromatógrafo de gases Agilent Intuvo 9000 GC provisto de un espectrómetro de masas triple cuadrupolo utilizado para la cuantificación de los esteroides estudiados. Se muestra un detalle del inyector.

Dentro del material de laboratorio utilizado para la preparación de las muestras se incluye un agitador vortex (IKA, Staufen, Alemania), una balanza analítica Mettler-Toledo AND GX400 (Columbus, OH, USA), una centrifuga Spectrafuge™ 24D de Labnet International, Inc. (Nueva Jersey, USA), un baño de ultrasonido P-Selecta de 1L de capacidad (JP Selecta; Barcelona, España) y una estufa MEMMERT modelo ULE 600 (Mettler-Toledo, Schwabach, Alemania).

El estudio se ha llevado a cabo en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada, en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada y en el laboratorio europeo de referencia para el análisis de pesticidas en frutas y verduras (EURL-FV) dirigido por el Prof. Amadeo Rodríguez Fernández-Alba, Este laboratorio está certificado por la Asociación Española de Normalización y

Certificación (AENOR) cumpliendo con los requerimientos de la Norma UNE-EN.ISO 9001-2008; y acreditado por Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) con el número de acreditación 7/PPI013.

3.3. Preparación y análisis de las muestras

3.3.1. Muestras

Los análisis se aplicaron a muestras de dos productos cuyo componente principal es el helecho *P. decumanum* y a muestras de una selección de alimentos. Se analizó una muestra del extracto hidro-alcohólico de *P. decumanum* (EXPLY-37®), estandarizado y biotipado, perteneciente al lote Bx115036 y dos réplicas de cajas de cápsulas EXPLIVAR del lote C.N 164233.2. Las muestras fueron proporcionadas por la empresa Helsint S.A.L (Granada, España) y subsidiaria Helsint Yojoa, Honduras. El extracto fue preparado y estandarizado a partir de las frondes de la planta de acuerdo con su patente US 6228366 (Yesares-Ferrer et al., 2001).

Por otro lado, se seleccionaron tres alimentos de consumo habitual para la determinación y cuantificación de esteroides naturales de acuerdo a otros trabajos publicados en la literatura científica: chuleta de lomo de cerdo, filete de ternera y huevos frescos de gallina. Las muestras de alimento fueron obtenidas de una cadena de supermercados.

Las dos muestras de carne y el extracto de *P. decumanum* fueron liofilizadas, trituradas y pesadas, para su conservación y, a su vez, para incrementar la eficiencia de extracción de los analitos de estudio. En el caso de los huevos y las cápsulas no fue necesaria su liofilización. Todas las muestras investigadas en este estudio fueron almacenadas en refrigeración a $4 \pm 0.2^\circ\text{C}$ hasta el día de su tratamiento.

3.3.2. Tratamiento. Extracción asistida por ultrasonidos (UAE)

Antes del análisis instrumental, es crucial la aplicación de un método de extracción adecuado que permita extraer los esteroides presentes en cada una de las muestras analizadas. La extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos ha demostrado ser una técnica rápida y eficiente para la extracción de analitos en matrices sólidas complejas, como son los alimentos y los extractos vegetales. Permite extraer los compuestos de interés contenidos en la matriz utilizando un disolvente en base a las diferencias de solubilidad de los compuestos en dicho disolvente.

- A. Extracto y cápsulas.** La extracción de los compuestos más apolares de las muestras de *P. decumanum* se realizó mediante extracción asistida por ultrasonidos utilizando como disolvente el acetato de etilo. Las muestras de extracto hidro-alcohólico fueron liofilizadas para eliminar totalmente el contenido en agua. Para ello, se pesaron 0.4 g de muestra de extracto o de cápsula (peso equivalente a una cápsula) en tubos eppendorf. Las muestras se agitaron con 1 mL de acetato de etilo en un vórtex durante 1 minuto y se sonicaron durante 45 minutos a temperatura ambiente en un baño de ultrasonidos. La disolución resultante fue centrifugada a $16.300 \times g$ durante 10 minutos y el sobrenadante se reservó en viales de vidrio de 2 mL a 4°C para su posterior derivatización y análisis.
- B. Alimentos.** En el caso de las muestras de alimentos se utilizó un procedimiento de extracción adaptado de Fitsche et al., (1999). Se pesaron 20 g de muestra liofilizada y se le añadieron 70 mL de metanol o acetato de etilo ultrapuro y 20 mL de agua milli-Q. Se homogenizó la muestra agitando y se introdujo en el baño de ultrasonidos durante 30

min a 60°C. Pasado este tiempo, el disolvente conteniendo los analitos se vertió en tubos de ensayo que se taparon adecuadamente y se centrifugaron durante 10 min a 4000 x *g*. A continuación, se tomó el sobrenadante y se realizaron dos extracciones con 20 mL de n-hexano para eliminar los lípidos de la muestra. En cada extracción se descartó la parte del hexano y se recogió la parte del disolvente polar en un matraz que se llevó al rotavapor, con el baño de agua a no más de 45°C, para reducir su volumen hasta 2-3 mL. El residuo obtenido se redisolvió en MeOH o acetato de etilo hasta un volumen total de 5 mL. En el caso de la carne de cerdo y la de ternera se añadió el doble de MeOH y agua milli-Q para realizar la extracción. Todas las muestras, y un calibrado de los esteroides preparado de la misma manera que en el caso del análisis de *P. decumanum*, fueron analizadas por GC-MS/MS.

C. **Derivatización de esteroides.** Todas las fracciones fueron analizadas por GC-MS/MS. Con el fin de mejorar la sensibilidad de los esteroides investigados, se derivatizaron con mezcla silanizante en exceso (*N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide / trimethyliodosilane/dithioerythitol, MSTFA/TMIS/DTE, 1000:2:2, v/v/v). Para ello, se tomaron 10 µL de muestra en un vial de cromatografía y tras añadir 80 µL de mezcla derivatizante y 10 µL de acetato de etilo, se mantuvieron en estufa a 60°C durante 15 minutos (Hartmann et al., 1998; Fritsche et al., 1999). La mezcla MSTFA/TMIS/DTE fue preparada inmediatamente antes de ser añadida a las muestras y en la campana extractora debido a los vapores tóxicos que desprende el TMIS. En el caso de las muestras de alimentos en los que se utilizó metanol como disolvente de extracción, los 10 µL de muestra metanólica se evaporaron bajo corriente de N₂ previamente a la reacción de derivatización. Luego, se

añadieron 80 μL de mezcla derivatizante y 20 μL de acetato de etilo y se siguió el mismo procedimiento del resto de muestras. Finalmente, las soluciones se inyectaron directamente en el GC con un volumen de inyección de 1 μL .

3.4. Preparación del calibrado y muestras dopadas

Debido a la ausencia de materiales de referencia certificados, para estudios de recuperación, se doparon muestras a diferentes concentraciones (10, 25, 50, y 100 ng g^{-1}), mediante la adición de disoluciones estándar a los 0.4 g de muestra de extracto. Con el fin de alcanzar el equilibrio, las mezclas fueron agitadas en vortex durante 1 min y se dejaron reposar durante 24 horas a 4°C en oscuridad antes de su procesamiento y posterior análisis. Esto permite que los analitos entren en contacto total con la muestra.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Optimización del análisis mediante GC-MS/MS

El objetivo de este estudio fue desarrollar un método cromatográfico con detección por espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS) para la identificación y cuantificación de los dos esteroides, **AED** y **ADD**, presentes en el extracto EXPLY-37® y las cápsulas de *P. decumanum*. La optimización del método se desarrolló en las instalaciones del Centro de Instrumentación científica de la Universidad de Granada. Una vez establecido el método y las condiciones operatorias del espectrómetro de masas optimizadas, se procedió al análisis cuantitativo de las muestras, que tuvo lugar en las instalaciones del laboratorio EURL-FV de la Universidad de Almería.

4.1.1. Optimización de las condiciones cromatográficas

En primer lugar, se propuso desarrollar un método cromatográfico que permitiera la identificación y detección de los esteroides en las muestras de *P. decumanum*. La caracterización y determinación de los espectros de masas se ha realizado en un equipo Agilent 7890A GC provisto de un espectrómetro de masas triple cuadrupolo Quattro micro™ GC. La separación cromatográfica de los compuestos se realizó en una columna capilar ZB-5MS (30 m x 0.25 mm, 0.25 μm). Las condiciones GC-MS de partida fueron establecidas de acuerdo con Fritsche y colaboradores (1999). Los parámetros como la temperatura del horno, de la línea de transferencia, de la fuente iónica y el flujo del gas portador fueron evaluados y optimizados. La temperatura del puerto de inyección fue mantenida a 260°C (1 min en *splitless*). El volumen de inyección fue de 1 μL. Como gas portador se utilizó helio de un 99.99999% de pureza y a un flujo constante de 1.0 mL min⁻¹. El programa de temperatura fue el siguiente: la temperatura inicial

del horno fue de 130°C (mantenida 1 min), seguida de una rampa de temperatura de 12°C min⁻¹ hasta alcanzar 275°C. Esta temperatura se mantuvo durante 2.40 minutos. El tiempo total de análisis fue de 15.48 minutos.

4.1.2. Optimización de los parámetros MS/MS

Con el objetivo de maximizar la relación señal ruido, se seleccionaron las transiciones y energías de colisión óptimas para cada analito. Se emplearon tres para cada hormona, la primera para la cuantificación y las otras dos para la confirmación. Además, se ensayaron distintas energías de colisión (EC) (5eV, 10eV, 15eV y 20eV) para cada transición. En la **Tabla 3.1** se muestran las transiciones seleccionadas y las energías óptimas para cada una de ellas. El espectrómetro de masas operó en modo de impacto electrónico (EI, *Electron Ionization*) a una energía de 70eV. La temperatura de la fuente se mantuvo a 220°C. El *Dwell time* se fijó en 0.025 s para cada transición y como gas de colisión se empleó argón de 99.99999% de pureza.

Tabla 3.1. Transiciones MRM y energías de colisión.

Analito	Transiciones	EC (V)
AED	430 → 415 ^a	15
	430 → 325 ^b	15
	430 → 209 ^b	15
ADD	428 → 413 ^b	15
	428 → 323 ^b	10
	428 → 206 ^a	15

EC: energía de colisión (eV) ^a transición usada para cuantificación. ^b transiciones usadas para confirmación.

En la **Figura 3.4** y **3.5** se muestran los espectros de masas y los iones producto de los patrones de cada analito (100 ppb de concentración), y el cromatograma correspondiente.

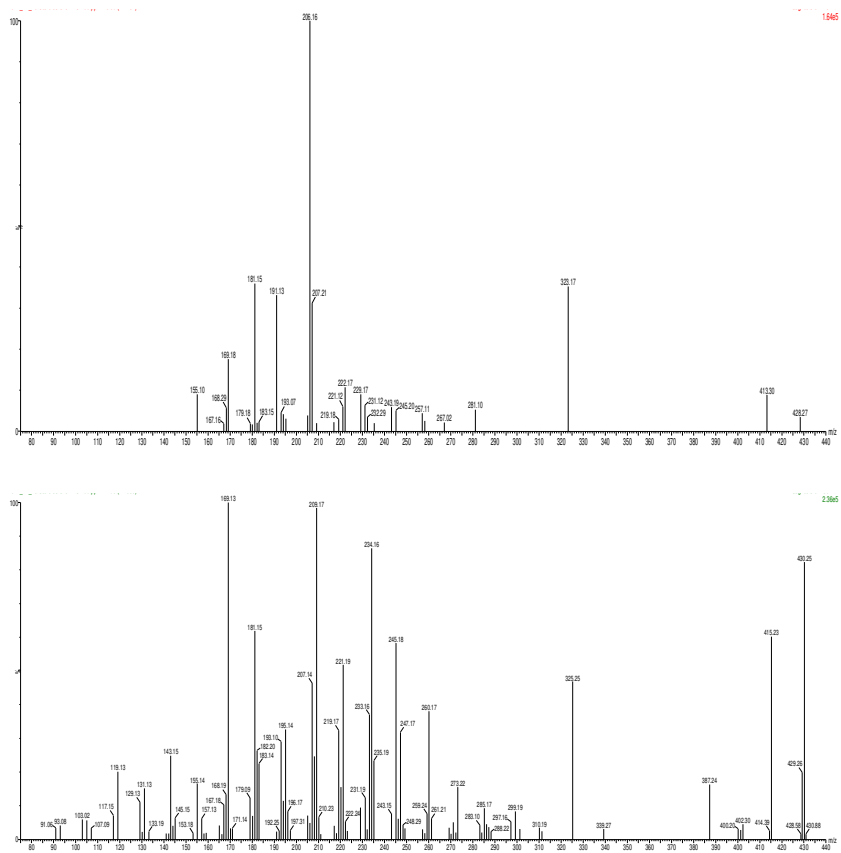


Figura 3.4. Espectros de masas de 1,4-androstadien-3,17-diona (A) y 4-androsteno-3,17-diona (B). Se muestran el patrón de fragmentación e iones producto del patrón de AED (Daughters of 428 Da) y de ADD (Daughters of 430 Da) con 15 eV de energía de colisión.

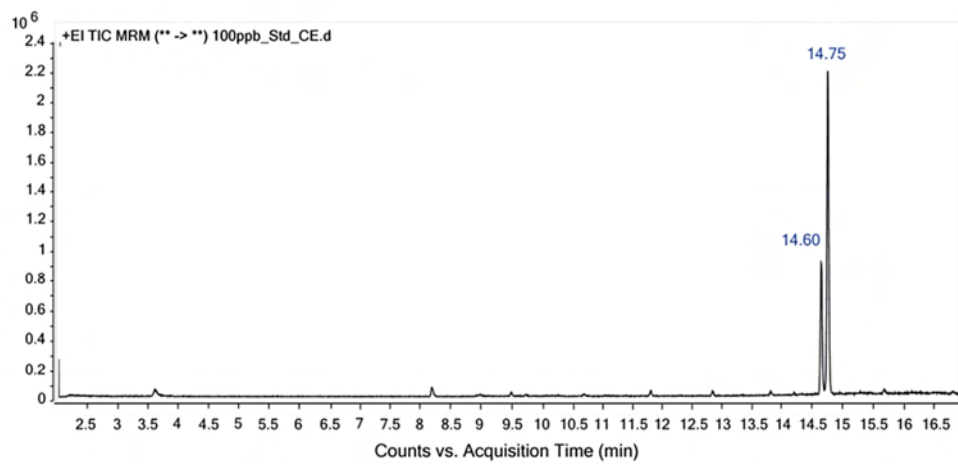


Figura 3.5. Cromatograma GC-MS/MS del patrón de AED y ADD.

En el cromatograma se observa la existencia de dos picos situados a $t_R=14.60$ min y $t_R=14.75$ min que corresponden con los tiempos de retención de ADD y AED respectivamente.

4.2. Análisis cuantitativo MRM

Una vez optimizado el método GC-MS/MS y confirmada la presencia de ambos esteroides en las muestras analizadas del extracto y las cápsulas de *P. decumanum*, se procedió a su cuantificación mediante la realización de un calibrado por adición de patrón.

Los cromatogramas fueron registrados en un equipo Agilent Intuvo 9000 GC a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo 7010B GC/MS Triple Quad con fuente iónica de impacto electrónico, empleando las condiciones anteriormente optimizadas con ligeras modificaciones para adaptar el método al nuevo equipo. Los analitos se separaron en una columna capilar HP-5MS Ultra Inert (30 m x 0.25 mm, 0.25 μm) de Agilent. El puerto de inyección se fijó a una temperatura de 80°C (durante 0.1 min en splitless) y se incrementó hasta 300°C (a 600°C min^{-1}). El volumen de inyección fue de 1 μL en modo splitless. El gas portador helio se mantuvo a un flujo constante de 1.5 mL min^{-1} . La línea de transferencia se mantuvo a 280°C. Las condiciones GC se establecieron como sigue: la temperatura inicial del horno se fijó a 130°C durante 1 min, seguida de una rampa de 12°C min^{-1} hasta alcanzar 290°C. Esta temperatura se mantuvo durante 3 min. El tiempo total de análisis fue de 17.333 min con un tiempo post-run de 2.0997 min.

En el análisis de espectrometría de masas, se utilizó el método *multiple reaction monitoring method (MRM)*, para asegurar así la máxima

especificidad y sensibilidad y obtener los resultados más precisos. Se establecieron las condiciones MS/MS optimizadas previamente en los laboratorios de la UGR (**Tabla 3.1**). Las transiciones se adquirieron para 5 ciclos/s por lo que el *Dwell time* se fijó en 0.049 s. Se empleó nitrógeno de 99.99999% de pureza como gas de colisión. El espectrómetro de masas operó igualmente en modo de impacto electrónico (EI) a una energía de 70eV y la temperatura de la fuente iónica fue de 280°C.

Posteriormente, se realizó la detección y cuantificación de los esteroides en las muestras de alimentos, bajo las mismas condiciones MS/MS optimizadas, en las instalaciones del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

4.3. Parámetros analíticos y validación

Para llevar a cabo la calibración analítica se prepararon cinco niveles de concentración entre 5 a 100 $\mu\text{g g}^{-1}$. Cada nivel se preparó por triplicado. La **Tabla 3.2** muestra los parámetros estadísticos y analíticos obtenidos para las dos hormonas analizadas.

Tabla 3.2. Parámetros estadísticos de calibración.

	b (g ng^{-1})	S_b (g ng^{-1})	$S_{y/x}$	% R^2	RDL (ng g^{-1})
AED	$6.62 \cdot 10^4$	$4.14 \cdot 10^2$	$2.27 \cdot 10^4$	99.8	0.8-100
ADD	$2.96 \cdot 10^4$	$1.22 \cdot 10^2$	$6.72 \cdot 10^3$	99.9	1.0-100

b : pendiente, S_b : desviación estándar de la pendiente, $S_{y/x}$: desviación estándar de la regresión; R^2 : coeficiente de regresión; RDL: Rango dinámico lineal.

La validación del método se llevó a cabo en términos de linealidad, sensibilidad, exactitud (veracidad y precisión) y selectividad.

4.3.1. Rango dinámico lineal y Linealidad

El rango dinámico lineal viene definido por el límite superior del intervalo de concentraciones en el que ha aplicado el método analítico y el límite de cuantificación de dicho método. En la **Tabla 3.2** se muestra el rango para ambos compuestos. Por otra parte, la linealidad indica el grado de ajuste de los valores de la señal medidos sobre la recta de calibrado. En la presente Memoria se han evaluado dos tipos de linealidad. La linealidad *in-line* (en línea) estimada con el valor P del test de fallo de ajuste que en ambos casos resultó ser mayor del 5% y portanto se puede concluir por la existencia de linealidad y *on-line* (*sobre la línea*), como el coeficiente de determinación (R^2). En la **Tabla 3.2** se muestran los valores obtenidos para este parámetro. En ambos casos la linealidad supera el 99.5 %.

4.3.2. Sensibilidad – Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) del método son dos aspectos fundamentales que deben ser examinados en un método analítico para determinar si un analito se encuentra presente en la muestra. El LOD es la mínima cantidad de analito que puede ser detectada en la muestra. El LOQ es la mínima cantidad que se puede cuantificar. Ambos valores se determinaron a partir de la relación señal-ruido del blanco (ADD, $S/N=1.0983$; AED, $S/N=0.4689$). Los LODs encontrados fueron 0.3 ng g^{-1} para ADD y 0.2 ng mL^{-1} para AED mientras que los LOQs fueron 1.0 ng g^{-1} y 0.8 ng g^{-1} respectivamente.

4.3.3. Exactitud: precisión y veracidad

Precisión. Se realizó un experimento con muestra de extracto de *P. decumanum* dopado a tres concentraciones (10, 25 y 50 ng g^{-1}) para cada

compuesto en seis días consecutivos. Se llevaron a cabo un total de 18 mediciones para cada nivel. La precisión, expresada como %DER, y la veracidad, evaluada como la recuperación de cantidades conocidas de los dos esteroides probadas en muestras de extracto, se muestran en la **Tabla 3.3**.

Tabla 3.3. Exactitud del método. Ensayo de recuperación, precisión y veracidad.

	Dopado (ng g ⁻¹)	Encontrado (ng g ⁻¹)	DER (%)	R (%)
AED	10	10.3 (0.2)	2.2	103
	25	24.9 (0.09)	0.4	99
	50	37.1 (9.1)	4.7	74
ADD	10	10.5 (0.3)	3.2	105
	25	24.8 (0.1)	0.5	99
	50	37.9 (8.6)	2.7	76

^aMedia de 18 determinaciones; DER: Desviación estándar relativa, R: recuperación.

Las recuperaciones de ambos compuestos analizados fueron muy similares (entre un 74% y un 105%). La precisión entre días (expresada como DER) fue menor del 5% en todos los casos. Puesto que las recuperaciones y DER son aceptables, los datos de precisión y veracidad indican que el método utilizado en la determinación de AED y ADD en las muestras de *P. decumanum* es significativamente exacto.

4.3.4. Selectividad

La especificidad el método se determinó comparando el cromatograma del blanco con el correspondiente a una muestra dopada de extracto de *P. decumanum*. No se observaron interferencias de sustancias endógenas a los tiempos de retención de los analitos en modo SRM. Estos hallazgos sugieren

que las condiciones espectrométricas aseguran la alta selectividad del método. La **Figura 3.6** muestra los cromatogramas obtenidos para una muestra de extracto dopada con los compuestos estándar a 25 ng g^{-1} .

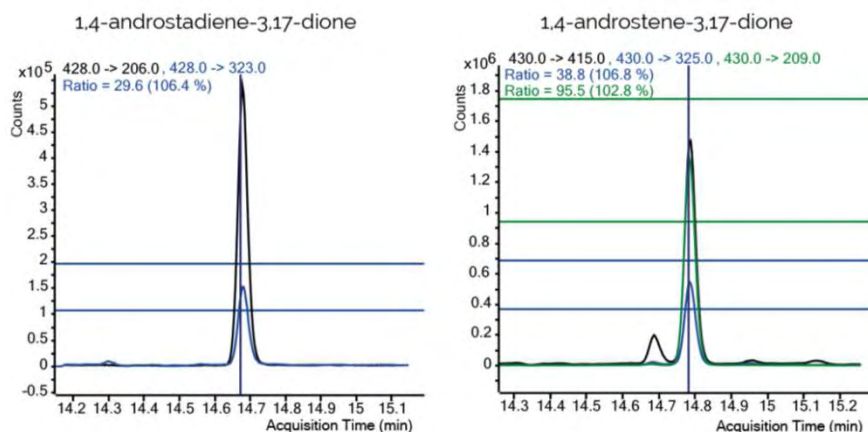


Figura 3.6. Cromatograma GC-MS/MS del análisis MRM de una muestra dopada (25 ng g^{-1}).

4.4. Determinación de 4-androsteno-3,17-diona y 1,4-androstadieno-3,17-diona en *P. decumanum*

El método se aplicó al análisis de ambos compuestos en una muestra de extracto hidro-etanólico (EXPLY-37®) del lote Bx115036 y dos réplicas de cajas de cápsulas Explivar pertenecientes al lote C.N 164233.2. Los resultados se obtuvieron como la media de 6 determinaciones. La **Figura 3.7** muestra un cromatograma de la muestra de extracto analizada.

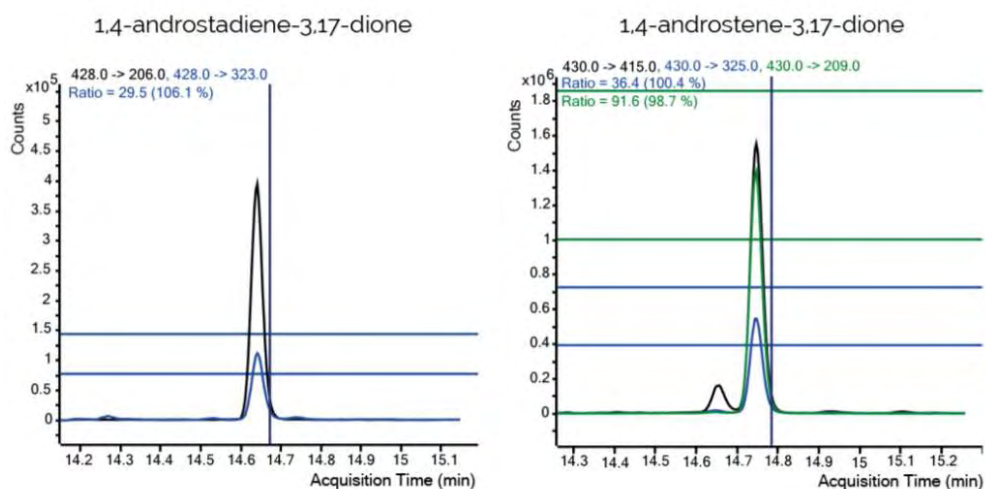


Figura 3.7. Cromatogramas GC-MS/MS obtenidos en el análisis MRM de la muestra del extracto hidroetanólico de *P. decumanum*.

De los resultados obtenidos, puede deducirse que podría existir algún isómero del AED puesto que, como se observa en el cromatograma, aparece un pico de menor área al tiempo de retención de ADD. La **Tabla 3.4** muestra los resultados obtenidos en la cuantificación de los compuestos.

Tabla 3.4. Aplicación del método a las muestras de *P. decumanum*.

	Concentración (ng mL ⁻¹)		Concentración (ng g ⁻¹)	
	AED	ADD	AED	ADD
Extracto	33.1 ± 0.2	15.7 ± 0.1	82.7 ± 0.5	39.4 ± 0.3
Cápsula I	15.1 ± 0.07	11.8 ± 0.1	37.8 ± 0.2	29.5 ± 0.3
Cápsula II	15.1 ± 0.1	11.2 ± 0.08	37.7 ± 0.3	27.9 ± 0.2

Los dos esteroides fueron detectados y cuantificados en cantidades significativas todas las muestras de *P. decumanum*. El ADD fue cuantificado a una concentración de 29.5 ng g⁻¹ en las cápsulas del primer lote, cantidad

muy similar a la encontrada en las cápsulas pertenecientes al segundo lote (27.9 ng g⁻¹). La muestra de extracto (EXPLY37®) dio un resultado estimado mayor conteniendo 39.4 ng g⁻¹. Respecto al AED fue el esteroide encontrado en mayor cantidad tanto en las muestras de las cápsulas como en la muestra de extracto de *P. decumanum*. Ambos lotes de cápsulas dieron un resultado positivo, detectándose 37.8 ng g⁻¹ y 37.7 ng g⁻¹ en primer y segundo lote, respectivamente. En el extracto la presencia este esteroide se ha determinado en 82.7 ng g⁻¹.

A la vista de estos resultados, se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica para conocer diferentes fuentes vegetales donde se han encontrado estos compuestos. El AED se ha determinado en el polen de pino de *P. sylvestris* (0.59 μg g⁻¹) y *Pinus nigra* (0.08 μg g⁻¹), utilizando diversos métodos analíticos (Šaden-Krehula et al., 1971, 1979). También se ha determinado en otras especies de plantas como el tabaco *Nicotiana tabacum*; 2.20 ng g⁻¹ FW en *Inula helenium* (3.20 ng g⁻¹ FW) (Simerský, et al., 2009); en trigo (0.48 ng g⁻¹) y patata (0.05 ng g⁻¹) (Hartmann et al., 1999); y en aceite de oliva, vino y cerveza (Tarkowská et al., 2019). Por otro lado, resultados de un estudio publicado recientemente sugieren la presencia del esteroide anabólico no declarado ADD en varios suplementos que contienen extractos de raíz o rizoma *Rhodiola rosea* L. detectándose en cantidades significativamente mayores a las detectadas en el extracto de *P. decumanum* 24-312 ng g⁻¹ (Walpurgis et al., 2016) aunque luego Da y colaboradores (2018) cuestionaron su presencia.

Por tanto, teniendo en cuenta los resultados y los hechos mencionados anteriormente, parece probado que estos dos esteroides andrógenos, de supuesto origen animal, también pueden tener un origen vegetal.

4.5. Determinación de 4-androsteno-3,17-diona y 1,4-androstadieno-3,17-diona en en muestras de alimentos

Basándonos en el trabajo publicado por Hartmann et al., (1999), sobre la presencia de hormonas esteroideas en alimentos, se llevó a cabo la determinación de los compuestos en muestras de alimentos de origen animal, concretamente, carne de ternera, de cerdo y huevos de gallina. La técnica empleada para el análisis fue la GC-MS/MS detectándose las cantidades de AED y ADD que se muestran en la **Tabla 3.5**.

Tabla 3.5. Concentración de los esteroides en los alimentos.

	Concentración (ng mL ⁻¹)		Concentración (ng g ⁻¹)	
	AED	ADD	AED	ADD
Ternera	2.3 ± 0.1	1.8 ± 0.1	0.60 ± 0.03	0.50 ± 0.02
Cerdo	2.5 ± 0.1	2.2 ± 0.1	0.63 ± 0.03	0.55 ± 0.03
Huevo	2.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.18 ± 0.03	0.10 ± 0.01

*La masa de huevo fue 58.9 g.

Ambos esteroides fueron detectados en las muestras analizadas. La carne de cerdo presentó los niveles más elevados de ambos con valores en torno a los 0.6 ng g⁻¹. Por su lado, en el caso de los huevos los niveles fueron menores (0.18 y 0.10 ng g⁻¹, respectivamente). Hartmann en su trabajo encuentra cantidades de AED similares a las encontradas en nuestro caso en la carne de cerdo (0.09 - 0.39 ng g⁻¹, llegando a cuantificar hasta 0.65 ng g⁻¹ en bacon. En la carne de ternera encuentran cantidades comprendidas entre los 0.2 y los 0.6 ng g⁻¹. En el caso de los huevos los valores obtenidos en este trabajo están muy por debajo de los valores de referencia reportados en su estudio (1.83 - 9.27 ng g⁻¹).

Los resultados de este trabajo demuestran que estas sustancias andrógenicas pueden aparecer naturalmente en plantas, al formarse endógenamente a partir de fitoesteroles, así como en alimentos de origen animal.

5. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en esta investigación llevada a cabo en el presente capítulo III de la Tesis Doctoral se han obtenido las conclusiones siguientes:

- I. Se ha desarrollado un método analítico para la determinación y cuantificación de dos esteroides, 4-androsteno-3,17-diona y 1,4-androstadieno-3,17-diona mediante GC-MS/MS en suplementos nutricionales de *P. decumanum*.
- II. El método implica un tratamiento previo de las muestras basado en la extracción asistida con ultrasonidos de los esteroides con acetato de etilo. El método fue satisfactoriamente validado utilizando la calibración en matriz y demostró ser veraz, preciso, selectivo y sensible. Los esteroides fueron detectados y cuantificados en las muestras de *P. decumanum* a niveles de ng g^{-1} .
- III. Basándonos en un método previamente publicado en la literatura científica, se detectó y cuantificó también la presencia de ambos esteroides en alimentos de origen animal.
- IV. La androstenodiona y la androstadienodiona, son dos esteroides endógenos, es decir, los produce el cuerpo humano. Su administración exógena está prohibida tanto en la alimentación de animales de cría que tienen como finalidad servir de alimento como en el mundo del deporte por estar considerados como dopaje según la World Anti-Doping Agency (WADA). Sin embargo, no hay unos límites establecidos para el consumo de estos esteroides. Dado que a lo largo de este trabajo de investigación se ha demostrado que están presentes en varios

alimentos de consumo habitual, deberían establecerse unos límites mínimos a partir de los cuales la detección de estos esteroides en un deportista sea considerado dopaje.

- V. El trabajo desarrollado en este estudio es el inicio de una investigación que dará lugar a ensayos clínicos tanto en personas no deportistas como en deportistas de alto rendimiento con el objetivo de proponer y poder establecer así los límites anteriormente mencionados y, a su vez, demostrar que la presencia de dichos esteroides, a nivel traza puede ser provocada por la ingesta previa de alimentos comunes y, por tanto, es un hecho que debería ser tenido en cuenta por las Agencias tanto Internacionales y Nacionales Antidopaje.

6. REFERENCIAS

- Da, J., Yang, L., Wu, W., Guo, D., Panossian, A.G. (2018). The pseudoendogenous anabolic steroid 1,4-androstadiene-3,17-dione does not occur naturally in *Rhodiola rosea* L. radix and rhizome. *Phytochemistry Letters* 23, 155-163.
- Díaz-Castro, J., Guisado, R., Kajarabille, N., García, C., Guisado, I.M., De Teresa, C., Ochoa, J.J. (2012). *Phlebodium decumanum* is a natural supplement that ameliorates the oxidative stress and inflammatory signalling induced by strenuous exercise in adult humans. *European Journal of Applied Physiology* 112, 3119-3128.
- Fritsche, S., Schmidt, G., Steinhart, H. (1999). Gas chromatographic-mass spectrometric determination of natural profiles of androgens, progestogens, and glucocorticoids in muscle tissue of male cattle. *European Food Research and Technology* 209, 393-399.
- González-Jurado, J.A., Guisado-Barrilao, R., Molina-Sotomayor, E., de Teresa-Galván, C. (2008). Efecto protector del *Phlebodium decumanum* sobre la fatiga muscular inducida por el ejercicio en sujetos no entrenados. *Cultura, Ciencia y Deporte* 3(8), 101-106.
- González-Jurado, J.A., de Teresa, C., Molina, E., Pradas, F., Guisado-Barrilao, R., Naranjo, J. (2009). Efecto del *Phlebodium decumanum* sobre los cambios en niveles plasmáticos de testosterona y cortisol inducidos por el ejercicio en sujetos no entrenados. *Revista Médica de Chile* 137, 497-503.
- Gonzalez-Jurado, J.A., Pradas, F., Molina, E.S., De Teresa, C. (2011). Effect of *Phlebodium decumanum* on the immune response induced by training in sedentary university students. *Journal of Sports Science and Medicine* 10, 315-321.
- Hartmann, S., Lacorn, M., Steinhart, H. (1998). Natural occurrence of steroid hormones in food. *Food Chemistry*, 62(1), 7-20.

- HELSINT, SAL. Cia. De Gestión e Investigación. Consulta: 07/11/2019.
Disponible en: <http://helsint.com>
- Janeczko, A., Skoczowski, A. (2005). Mammalian sex hormones in plants. *Folia histochemical et cytobiologica* 43(2), 71-79.
- Kickman, A.T., Gower, D.B. (2003). Anabolic steroids in sports: Biochemical, clinical and analytical perspectives. *Annals of Clinical Biochemistry* 40, 321-356.
- Poelmans, S., De Wasch, K., Martelé, Y., Schilt, R., Van Hoof, N., Noppe, De Brabander, H.F. (2003). The possible transformation of phytosterols to Boldenone. *Proceedings of the Euro Food Chem XII: Strategies for safe food*. Bruges, Belgium, 74-78.
- Punzón, C., Alcaide, A., Fresno, M. (2003). *In vitro* anti-inflammatory activity of *Phlebodium decumanum*. Modulation of tumor necrosis factor and soluble TNF receptors. *International Immunopharmacology* 3, 1293-1299.
- Šaden-Krehula, M., Tajić, M., Kolbah, D. (1971) Testosterone, epitestosterone and androstenedione in the pollen of Scotch pine *P. silvestris* L. *Experimentia* 27, 108-109.
- Šaden-Krehula, M., Tajić, M., Kolbah, D. (1979) Sex hormones and corticosteroids in pollen of *Pinus nigra*. *Phytochemistry* 18, 345-346.
- Sellami, M., Slimeni, O., Pokrywka, A., Kuvačić, G., Hayes, L. D., Milic, M., Padulo, J. (2018). Herbal medicine for sports: A review. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* 15, 14.
- Šimerský, R., Novák, O., Morris, D.A., Pouzar, V., Strnad, M. (2009). Identification and quantification of several mammalian steroid hormones in plants by UPLC-MS/MS. *Journal of Plant Growth Regulation* 28, 125–136.
- Tarkowská, D. (2019). Plants are capable of synthesizing animal steroid hormones. *Molecules* 24, 2585.

- Vargas-Corzo, M.C., Aguilar-Cordero, M.J., de Teresa Galván, C., Segura-Millán, D., Miranda-León, M.T., Castillo-Rueda, G., Guisado-Barrilao, R. (2014). Beneficios de la ingesta del *Phlebodium decumanum* sobre el daño muscular al efectuar ejercicio físico intenso en sujetos sedentarios. *Nutrición Hospitalaria* 29(6), 1408-1418.
- Walpurgis, K., Schultze, G., Mareck, U., Geyer, H., Schänzer, W., Thevis, M. (2016). Detection of endogenous and pseudoendogenous steroids in dietary supplements containing *Rhodiola rosea*. En: Schänzer, W., Thevis, M., Geyer, H., Mareck, U. (Eds.), *Recent Advances in Doping Analysis*, vol 24. Köln, Sportverlag Strauß, pp.131–134.
- Williams, M. (2006) Dietary supplements and sports performance: Herbal. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* 3(1), 1-6.
- WADA. World Anti-Doping Agency. Consulta: 10/11/2019. Disponible en: <https://www.wada-ama.org/>
- Yesares Ferrer, M., Mendoza Medina, J.A., Ruíz Cáceres, G.M., Alcaide García, A., Yesares Morillas, E. (2001). Hydrosoluble fractions of *Phlebodium decumanum* and its use as nutritional complements in aids and cancer patients. United States Invention Patent, US 6,228,366B1. Helsint, S.A.L.
- ZovkoKončić, M. (2017). Role of Selected Medicinal Plants in Sports Nutrition and Energy Homeostasis. En: Bagchi, D. (Ed.) *Sustained Energy for Enhanced Human Functions and Activity*. Academic Press (pp. 119-1357).

CHAPTER IV

Potentially Immunomodulatory effect
of *Phlebotium decumanum* in T cells
and monocytes derived from bone
marrow.

The scientific research carried out in this IV chapter have been developed in the Immunology laboratories of Pilar Alcaide (Alcaide Lab) at the Sackler School of Graduate Biomedical Sciences, Tufts University (Boston, MA) during the period of the international stay.

4

Potentially Immunomodulatory effect of
Phlebodium decumanum in T cells and monocytes
derived from bone marrow

1. INTRODUCTION

Inflammation is an essential immune response to lesions and infections mediated by a multifunctional network of immune cells, such as macrophages and lymphocytes, in conjunction with downstream mediators, including cytokines and reactive oxygen species (Xu et al., 2017; Sharma et al., 2018).

Macrophages are responsible for innate immune response. They secrete inflammatory mediators by recognizing and phagocytosing pathogens, and regulate acquired immunity (Nam et al., 2017). In different microenvironments, macrophages polarize into two types (Juhas et al., 2015). The M1 macrophage activation promotes inflammatory processes, nitric oxide (NO) generation and pro-inflammatory cytokine levels, including those of interleukin-6 (IL-6), interleukin-1b (IL-1b), and tumor necrosis factor alpha (TNF- α), which induce the recruitment of other inflammatory cells (Xu et al., 2017). They also increase inflammatory reactions by inducing

nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase (COX)-2. Meanwhile, the M2 or alternatively activated macrophages have anti-inflammatory properties (Juhas et al., 2015).

Lymphocytes are one of the main types of immune cells and are mainly divided into B and T cells. In very general terms, B lymphocytes are responsible for the antibody-mediated immune system, while T lymphocytes are responsible for the cell-mediated immune system. Within the group of T cells, T helper lymphocytes (Th) play pivotal roles in the acquired immunity. T helper (Th) cells are thought to differentiate into four major CD4+ functional classes, categorized into several subsets based on the cytokine production after stimulation: Th1, Th2, Th17 and regulatory T cells (Treg) (Abbas et al., 2009; Lugli, 2017).

Th1 cells are typically related to inflammatory processes. One of the main functions of these cells are against bacteria and protozoa which is important with respect to protection against intracellular infections (Abbas et al., 2009; Cheng et al., 2017; Lugli, 2017). They are predominantly induced by interleukin-12 (IL-12) and are fully activated by interleukin-2 (IL-2) and interferon gamma (IFN- γ) (Cheng et al., 2017). IL-12 is produced primarily by pathogen-activated antigen-presenting cells, particularly dendritic cells (DCs), macrophages, and neutrophils and is involved in the differentiation of naive helper T cells into Th1 cells (Lugli, 2017). In addition, Th1 cells produce a set of pro-inflammatory cytokines, including interferon gamma (IFN- γ) and IL-2 (Billiau and Matthys, 2009). In general, induction of mitotic activity and cytokine production are associated with Th cell functionality (Schmitt and Ueno, 2015). For example, IFN- γ has shown to regulate inflammatory immune response, promote Th1 cell differentiation, enhance major histocompatibility complex (MHC) class II expression on

antigen-presenting cells, and protect against tumor formation (Cheng et al., 2017).

Disturbances in the immune system cell pathways have shown to be involved in the pathophysiology of a variety of different immune disorders. (Abbas et al., 2009). Recent research has reported that a dysfunction of T cells, such as the imbalance of Th1/Th2 responses or an abnormal immunostimulation, may lead to different inflammatory diseases (Kidd, 2003). An example is the excessive production of IFN- γ , usually associated with Th1-mediated immune disorders, which can cause delayed type hypersensitivity, Crohn's disease, and multiple sclerosis, among others (Kidd, 2003; Cui et al., 2013; Cheng et al., 2017).

In this regard, immunosuppressants developed for the treatment of these overreactive immune responses, as well as other commercial anti-inflammatory therapeutic agents, are often associated with risk factors such as a decrease in the normal immune response, and thereby, an increased susceptibility to infections (Schmidt et al., 2007). Therefore, interest is growing in the identification of natural compounds, especially of herbal-based products, that can be developed as relatively safe and non-toxic immunomodulators, with less severe side effects and able to mitigate aggravated inflammatory disorders (Arulselvan et al., 2016; Yahfoudi et al., 2018).

The immunomodulatory capacity of *P. decumanum* has been evidenced in different *in vitro* and *in vivo* investigations. For example, different compositions of a purified and standardized water-soluble fraction obtained from the leaves of *P. decumanum* (EXPLY37®) have shown their immunomodulating effect, specifically directed to the release of TNF by

macrophages in response to various stimuli. They seem to have a regulation action on the levels of TNF, playing a role in the regulation of the homeostasis of pro-inflammatory cytokines (Punzón et al., 2003). In addition, many published studies have demonstrated its beneficial effect in sport, during high intensity exercise. Oral administration of the extract effectively reduced oxidative stress and inflammatory response with a protective effect of muscle damage and fatigue (González-Jurado et al., 2008; Díaz-Castro et al., 2012; Vargas-Corzo et al., 2014;). These positive effects have been mainly related to its regulatory effect on immune system, specifically targeted at modulating the cytokine release (González-Jurado et al., 2011).

However, these studies are limited and have only revealed very preliminary information on the potential modulatory effects of this plant. In addition, evidences are just focused on the function of macrophages, part of the adaptive defense mechanisms of the immune system and there is no information about lymphocytes, responsible for the cell-mediated immune response. To account for these deficiencies, in the present study we hypothesized that *P. decumanum* extract may have an immunomodulatory effect on the T cell proliferation and differentiation as well as in macrophage differentiation and polarization *in vitro* differentiation conditions, leading to a general decreased inflammation response. In essence, the main task is examine the potential ability of the extract to reduce inflammation effects, as it could be a potential candidate as an anti-inflammatory agent for the treatment of inflammation-related diseases.

2. OBJECTIVES

In this context, the work developed in the present chapter attempts to:

- I. **Evaluate the modulating effect of EXPLY-37® on the activation and differentiation towards type 1 T helper (Th1) lineage.** The well-known Th1 cell implication in inflammatory processes and the production of pro-inflammatory cytokines, such as IFN- γ , made us think about the potential effect of EXPLY-37® on the differentiation of this cell type. With this purpose, we studied the response of the extract on the activation and differentiation of naïve T cells to Th1 cells in a concentration dependent manner.
- II. **Study of the effect of EXPLY-37® on the proliferation of T cells, activated by anti-CD3 or in co-culture with presenting antigen dendritic cells.** Available data strongly suggest that some phytochemicals present in *P. decumanum* have an effect on T cell proliferation. According to those reports, we attempted to assess the potentially modulatory effect of EXPLY-37® on the proliferation of naïve CD4+ T cells: first, after anti-CD3 ϵ stimulation, and secondly, after specific antigen response.
- III. **Analyze gene expression in the monocyte to proinflammatory macrophage differentiation in presence of EXPLY-37®.** A preliminary study indicated that LPS-induced NO production was not affected by EXPLY-37® macrophages but to our knowledge there are no reports in the literature on its effects at transcriptional level. We wanted to investigate this finding in depth in a well-established in vitro monocyte to M1 macrophage differentiation model.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. Reagents

Recombinant mouse IL-12, IL-2 (clone JES6-1A12) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). IFN- γ (clone XMG 1.2) and the following Abs to mouse cytokines and adhesion molecules are all from BioLegend (San Diego, CA): aIL-4 (clone 11B11), aCD3 (clone 145-2C11) and aCD28 (clone 37.51). Fixation buffer (ref.420801) and intracellular staining Permeabilization wash Buffer (x10) (ref.421002) were purchased from BioLegend (San Diego, CA). PMA, ionomycin, brefeldin A, monesin and the Red Blood Cell Lysis Buffer were from Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO). Vibrant CFSE-SE Cell Tracer (Invitrogen) was from ThermoFisher Scientific (Carlsbad, CA). The RNeasy Mini Kit (50) (ref.74104) was obtained from QIAGEN (Germantown, MD). Monocyte Isolation Kit (BM) (ref.130-100-629) and anti-CD4 MACS beads (ref.130-117-043) were from MACS Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany).

Complete T cell media was prepared from RPMI 1640 medium (*Roswell Park Memorial Institute medium*) supplemented with sodium pyruvate (1mM), sodium bicarbonate 7.5% (1%, v/v), Non-Essential Amino Acids Solution (1x), Gluta-Max (1x), β -mercaptoethanol, penicillin-Streptomycin (1x) and fetal bovine serum (FBS) (10%, v/v). All reagents were from Gibco[®] purchased from ThermoFisher Scientific.

EXPLY-37[®] (lot.BX1150836, EtOH:H₂O (6:4, v/v)) was obtained from Helsint S.A.L. (Granada, Spain). Extracts were prepared by dissolving raw

extract in sterile phosphate buffered saline (PBS) at 10 mg mL^{-1} and added soluble fraction to cell cultures at 10 or $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ final concentrations.

3.2. Mice

Mice were bred and maintained in a pathogen-free facility at Tufts University School of Medicine, Ziskind Building, in accordance with the guidelines of the Committee of Animal Research at Tufts University School of Medicine and the National Institutes of Health animal research guidelines. C57BL/6 (wild-type [WT]) and OT-II mice used in this study were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). All mice used for experiments were 8–12 wk old.

3.3. Preparation of naïve and Th1 T cells

CD4⁺ cells were isolated from spleen and lymph node cell suspensions of WT or OT-II mice using positive selection by immunomagnetic anti-CD4 MACS beads with an AutoMACS separator (Miltenyi Biotec).

To achieve Th1 differentiation, naïve T cells from WT mice were stimulated with plate-bound anti-CD3 ϵ ($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) as well as soluble anti-CD28 ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) in the presence of mouse IL-12 (10 ng mL^{-1}), anti-IL4 (500 ng mL^{-1}), and IL-2 (25 ng mL^{-1}) and cultured in complete T cell medium (10% FBS) slightly modified to as previously described (Sekiya and Yoshimura, 2016). On day 3, Th1 cultures were diluted 1:1 with fresh medium containing IL-2 (25 U mL^{-1}) and transferred to fresh culture plates without anti-CD3 ϵ coating. EXPLY-37[®] was added to the treated T cells at a concentration of $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ or $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ on day 0, both day 0 and after 72h, or every 24 hours.

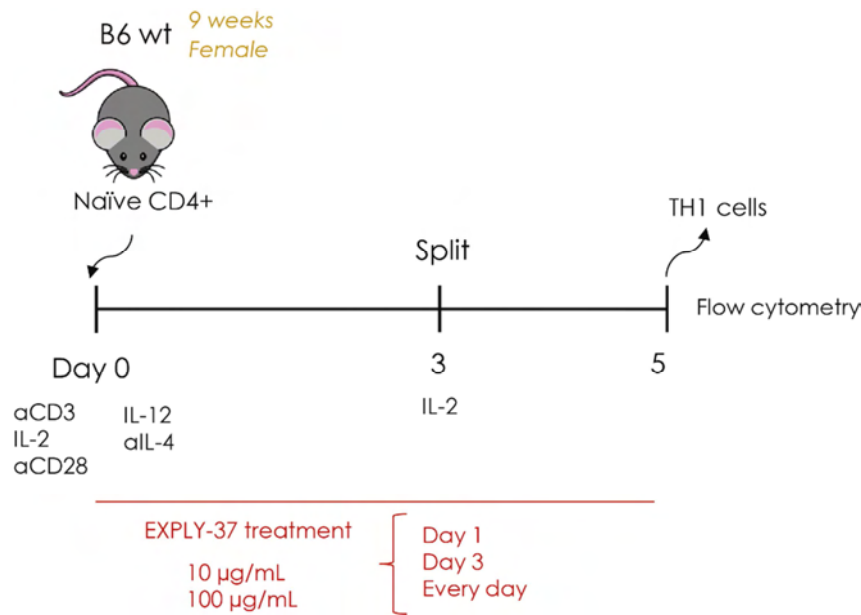


Figure 4.1. Experimental design for obtaining naïve and Th1 T cells

3.4. T cell proliferation assay anti-CD3ε

CD4⁺ cells for proliferation assay were isolated from spleen and lymph node cell suspensions of C57/BL6 mice using positive selection by immunomagnetic beads (Invitrogen) as previously is described and then stained with 2 µM CFSE for 15 min at 37°C. Labelled T cells were cultured and stimulated in complete T cell medium (10% FBS) ($1 \cdot 10^6$ cells/well) with covered anti-CD3ε ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) 24-well plate and in the presence of soluble anti-CD28 ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), IL-12 (10 ng mL^{-1}), anti-IL4 (500 ng mL^{-1}), and IL-2 (25 ng mL^{-1}) in order to enhance cell proliferation. EXPLY-37[®] was added at $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ every 24h. Cells were harvested on day 4 and immediately extracellular stained for CD4 (APC anti-CD4) and CD45 (Bv711 anti-CD45).

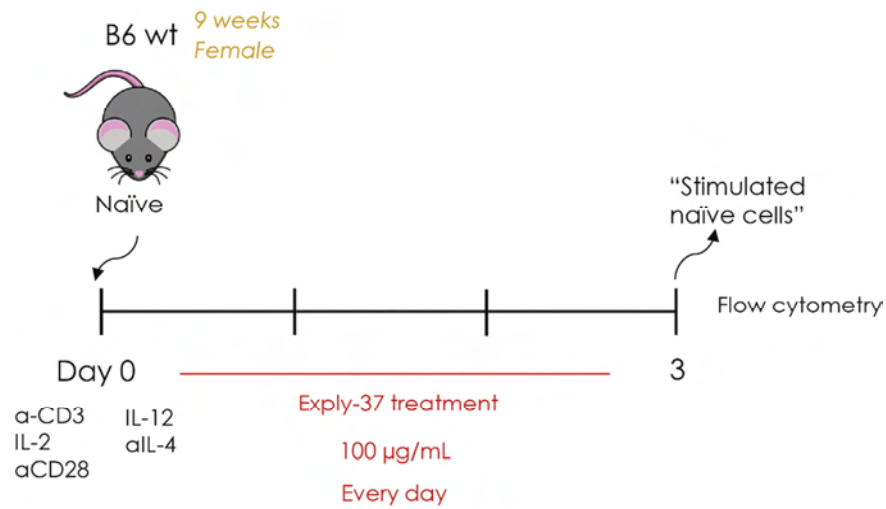


Figure 4.2. Experimental design for proliferation assay of naive T cells

3.5. Preparation of bone marrow derived dendritic cells (BMDCs)

Adult WT mice (6-8 wk old) were sacrificed. Femurs and tibias were excised and then flushed with buffer (PBS with 0.5% BSA) using a 25-gauge needle to collect the BM cells. Cell suspension was disaggregated and passed through a 40 µm cell strainer. BM cells were then centrifuged at 300 x *g* for 10 min and the pellet resuspended into 10 mL of complete RPMI 1640 medium (10% FBS) supplemented with 20 ng mL⁻¹. GM-CSF Cells were plated in 100 mm petri dishes at a density of 2 · 10⁶ viable cells per plate and incubated at 37°C with 5% CO₂. An additional 10 mL of fresh medium containing 20 ng mL⁻¹ of GM-CSF was added at day 3 to maximize DC yield. On day 7, non-adherent dendritic cells (DCs) were harvested for co-culture experiment with naive OT-II T cells.

3.6. OT-II T cell proliferation assay DCs co-culture

BMDCs were generated after a 7-day culture in complete RPMI 1640 medium supplemented with GM-CSF as is described above. At this point, non-adherent DCs were collected from 100 mm petri dishes by pipetting, counted and distributed in 6-well plates ($1 \cdot 10^5$ cells/well), cultured overnight with IFN- γ (1U mL^{-1}) in the presence or absence of EXPLY-37[®] ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) as pre-treatment. Cells were then washed in PBS twice and subsequently used for coculture experiment.

Splenocytes harvested from OT-II transgenic mice were purified by magnetic separation (Miltenyi Biotec) to get the CD4⁺ T cells. Cells were then extracellular labeled with APC anti-CD44, PE anti CD62L and APC/Cy7 anti TCR β (PE) and sorted using the MoFlo Legacy cell sorter (Beckman Coulter, Brea, CA) for a further purification of the naïve CD4⁺ T cells (CD44^{low}/CD62L⁺/TCR β ⁺).

Naïve OT-II CD4⁺ T cells were then stained with 2 μM CFSE for 15 min at 37°C and $1 \cdot 10^6$ cells were co-cultured with $1 \cdot 10^5$ DCs in 6-well plates (at responder stimulator cell ratio 10:1) in T cell medium. The CD4⁺ T cell/DC co-cultures were stimulated with ovalbumin protein (OVA) ($4 \mu\text{g mL}^{-1}$) plus lipopolysaccharide (LPS) (100ng mL^{-1}) in the presence or absence of EXPLY-37[®] ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) added every 24h for 3 days proliferation assay. At the end of the experiment, T cells were collected and stained with Bv711 anti-CD45.1 and APC anti-CD4 to gate on activated OT-II CD4⁺ T cells.

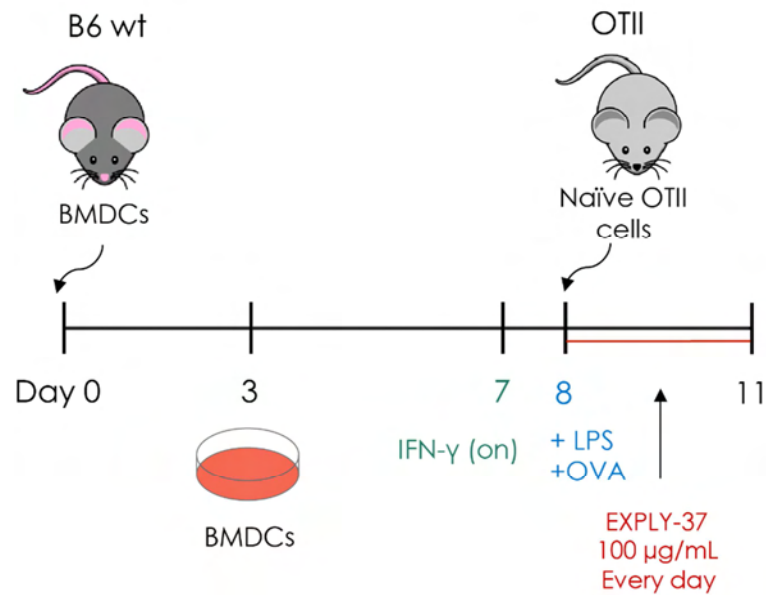


Figure 4.3. Experimental design for proliferation assay of OT-II T cells.

3.7. Intracellular staining

For intracellular staining for IFN- γ , Th1 cells differentiated from the WT naive T cells were stimulated during 4.5 h with PMA, ionomycin, brefeldin and monensin to enhance the sensitivity of intracellular cytokine detection. Cells were first stained for CD4 (FITC anti-CD4) to gate on live CD4+ T cells and then were fixed and permeabilized using Permeabilization wash Buffer (x1) (Biolegend) according to the manufacturer's protocol. After permeabilized, cells were stained with PE anti-IFN- γ antibody and analyzed by flow cytometry.

3.8. Bone Marrow Monocyte Isolation and M1 Differentiation

WT bone marrow (BM) cells were collected from femurs and tibias by flushing them with buffer (PBS with 0.5% BSA) using a 25-gauge needle. BM cells were disaggregated and passed through a 40- μ m cell strainer. From the resulting BM cell suspension, the Miltenyi Biotec isolation kit was used

to isolate BM-derived monocytes (BMDMs), which were incubated for 3 days with $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ LPS (sc-3535; Santa Cruz Biotechnology) for differentiation to M1-activated macrophages and treated with EXPLY-37[®] at $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ added every 24h. RNA was isolated at the end of the experiment.

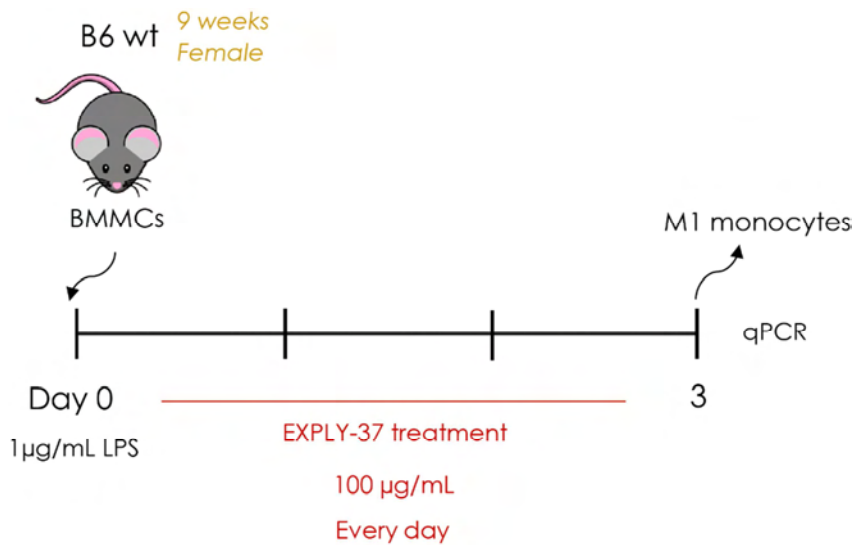


Figure 4.4. Experimental design for BMDMs differentiation towards M1 polarized macrophages

3.9. RNA extraction and Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

RNA from BMDMs was isolated using the Qiagen kit according to the manufacturer's instructions. Inducible nitric oxide synthase expression was determined through quantitative reverse transcription PCR for identifying the M1 population. RNA was reverse-transcribed to cDNA following Applied Biosystems' protocol using SuperScript[™] IV reverse transcriptase and amplified by real-time polymerase chain reaction (PCR) with SYBR green PCR mix (Applied Biosystems). Samples were quantified in triplicate using 40

cycles performed at 95°C for 30 s and 60°C for 1 min using a 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). The following primer sequences were used: *Gapdh*, forward 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC -3', reverse 5' -TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA - 3'. *Nos2*, forward 5'-GCC ACC AAC AAT GGC AAC A -3', reverse 5' -CGT ACC GGA TGA GCT GTG AAT T -3'.

3.10. Flow cytometry and cell sorting

Flow cytometry was performed to corroborate the differentiation of Th1 cells as described, evaluating the expression of IFN- γ , and to determine the proliferation of T cells. The data were acquired on an LSRII FACSCanto analyzer (Becton Dickinson) and analyzed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR). For the isolation of naïve OT-II CD4+ T cells, sorting was performed on a MoFlo Legacy cell sorter (Beckman Counter, Brea, CA) according to the following phenotype: CD44^{low}/CD62L+/ TCR- β +. IgG control and all the fluorophore antibody conjugates were from BioLegend: CD4-FITC (clone GK 1.5), CD4-APC (clone RM4-5), CD45-BV711 (clone 30-F11), CD44-APC (clone IM7), CD62L-PE (clone MEL-14), TCR- β -APC/Cy7 (H57-597) and IFN- γ -PE (clone XMG 1.2). Cells were surface stained by incubation with the relevant antibodies diluted in PBS plus 2% FBS for 20 minutes at room temperature, followed by 2 washes with PBS plus 2% FBS.

3.11. Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm SEM unless otherwise stated. Statistical analyses by Student t test or ANOVA followed by the Newman-Keuls post test were performed with GraphPad Prism software (GraphPad). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

4. RESULTS AND DISCUSSION

4.1. EXPLY-37® modulates differentiation of CD4+ T cells to Th1 decreasing IFN- γ production

Given the role of Th1 cells promoting cell-mediated inflammatory responses, we assessed the potentially activity of *P. decumanum* on differentiation of CD4+ T cells to Th1 lineage. Accordingly, Th1 cells were derived from the WT naive T cells and treated with EXPLY-37® at 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ or 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ added on day 0, both day 0 and after 72 h, or added every 24 h, throughout the differentiation process. We chose to test these different experimental groups given the lack of reported knowledge about the half life timeline of the extract and in order to determine the most sensitive condition for the T cells. In this study, it was found that the extract modulates the differentiation towards Th1 lineage in a time course dependent manner. Interestingly, EXPLY-37® decreases the per cell IFN- γ fluorescent intensity in the IFN- γ + cells in the highest concentration (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Figures 4.5 and 4.7). By contrast, we found that there was no difference on the % of IFN- γ + cells with the treatment in none of the conditions (Figure 4.6). Since the greatest effect observed is at 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, it was decided to establish this concentration as optimal for further experiments.

In addition, since the commercial formulation dose is 2 or 4 capsules daily (EXPLIVAR® (EXPLY-37®)), we choose to add the extract every 24 h. Taken together, our data indicate that *P. decumanum* modulates the differentiation towards Th1 lineage in a time course dependent manner decreasing IFN- γ per cell at high concentration.

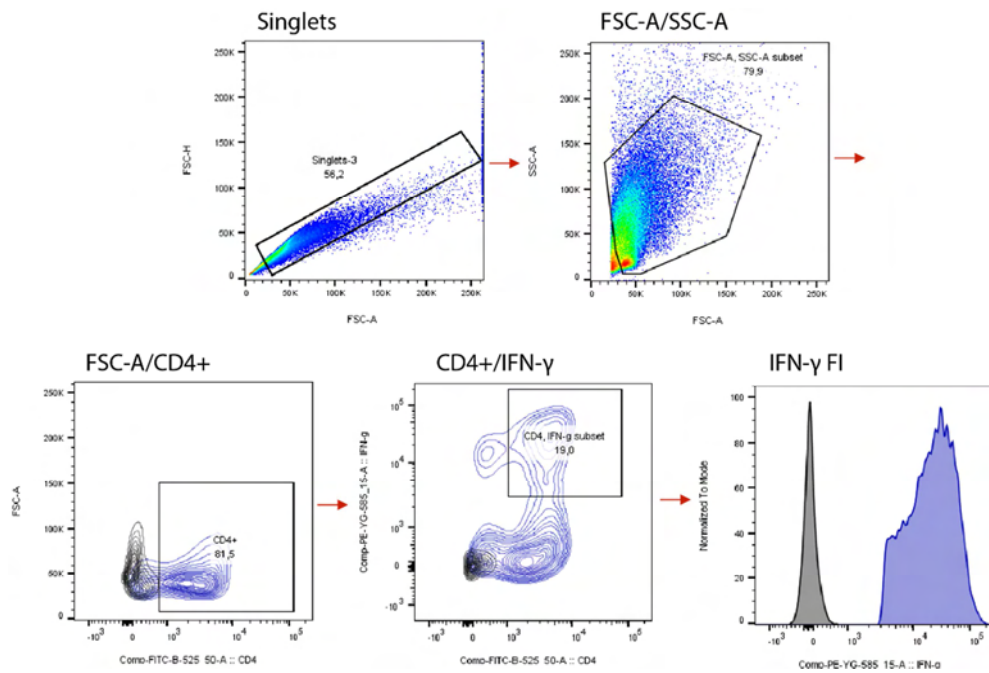


Figure 4.5. Naïve CD4⁺ T cells isolated from the spleen and lymph nodes of C57/BL6 mice were cultured under Th1 cell induction conditions during 5 days, in presence or absence of EXPLY-37[®] at 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ or 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ at the indicated time course. Intracellular IFN- γ was detected in PMA plus monensin, brefeldin A and ionomycin-stimulated Th cells by flow cytometry (see Materials and Methods). The % of CD4⁺/IFN- γ ⁺ cells and the per cell fluoresce intensity of IFN- γ were quantified. (A) A series of gating steps depicted in arrows involved gating on singlets (FSC-A/FSC-H), on total leukocytes (FSC-A/SSC-A), on CD4⁺ T cells (CD4/FSC-C) and on IFN- γ ⁺ cells (CD4/IFN- γ). FSC indicates, Forward Scatter; SSC, side scatter; FI, fluoresce intensity.

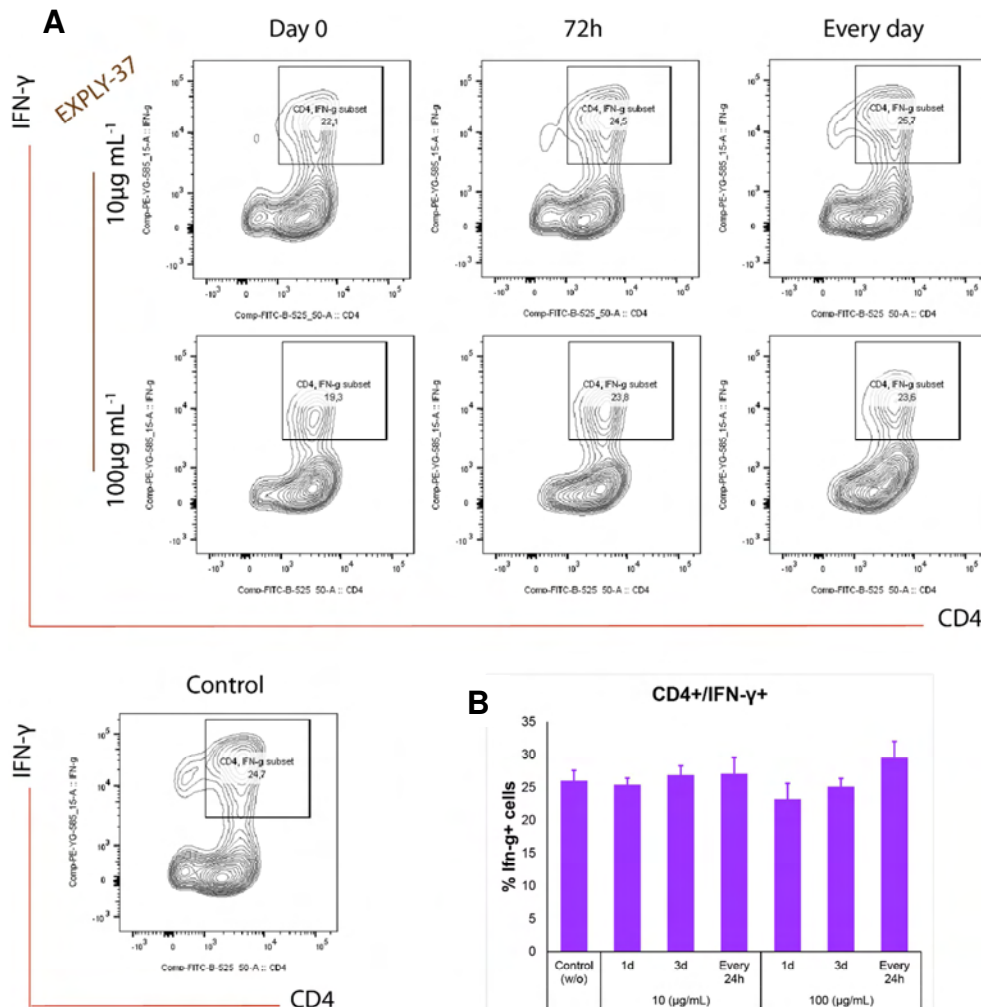


Figure 4.6. EXPLY-37® has no significant effect on the number of CD4+ IFN-γ + T cells. (A) Representative blots of the gated CD4+/IFNγ+ subsets are shown. (B) Frequency of IFN-γ+ population gated on CD4+ T cells. The bar graph data shown is representative of 3 separate cell preparations and data represent means ± SEM. No significant statistical differences were shown according to the Student's t-test.

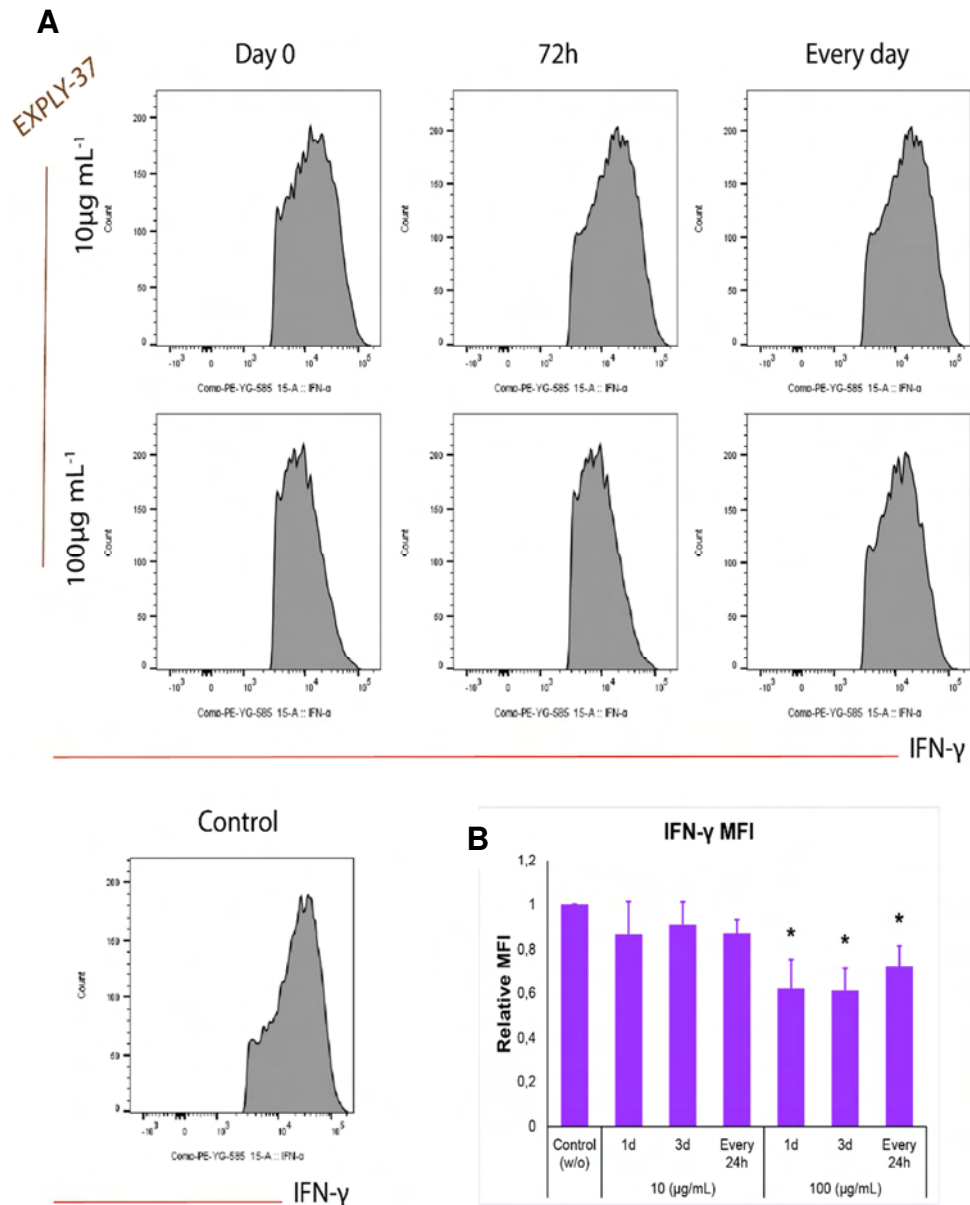


Figure 4.7. EXPLY-37® decreases the IFN- γ fluorescence intensity per cell in a dependent manner. (A) Representative blots of the median fluorescence intensity (MFI) are shown. (B) Relative per cell IFN- γ MFI. The expression levels were analyzed in the CD4⁺/high IFN γ ⁺ gated cells. Data is normalized to control without extract (w/o) WT FI and represented as the fold difference in IFN- γ T cells from three independent preparations. Data represent means \pm SEM and P values are indicated comparing each bar with control (w/o). *P < 0.05, by Student's t-test. MFI indicates median fluorescence intensity.

4.2. EXPLY-37® inhibits T cell proliferation after in vitro anti-CD3ε stimulation

In order to determine the potential role of EXPLY-37® in regulating T cell proliferation, it was utilized the response invoked by anti-CD3ε to activate naïve CD4+ T cells in vitro. Isolated CD4+ T cells were first stained with CFSE and then stimulated with plate-bound anti-CD3ε and soluble anti-CD28, anti-IL4, IL-12 and IL-2, in presence or not of the extract. The number of cell divisions was tracked using CFSE. This is a vital dye commonly used in proliferation assays that binds covalently to lysine residues of intracellular proteins. Thus, in each successive division CFSE fluorescence is reduced by half, giving a range of intermediate fluorescence intensity in actively dividing cells. Once in culture, the proliferation was monitored on day 3 by flow cytometry. Surprisingly, treatment with EXPLY-37® added every day resulted in a significant inhibition of T CD4+ cell expansion. As expected, stimulated cells with anti-CD3ε manifested an enhanced cell division in contrast to unstimulated cells. However, proliferation is reduced in stimulated T cells treated with the extract compared to non-treated cells (**Figure 4.8, B and C**). These results indicate that EXPLY-37® could suppress the Th1 response in splenocytes.

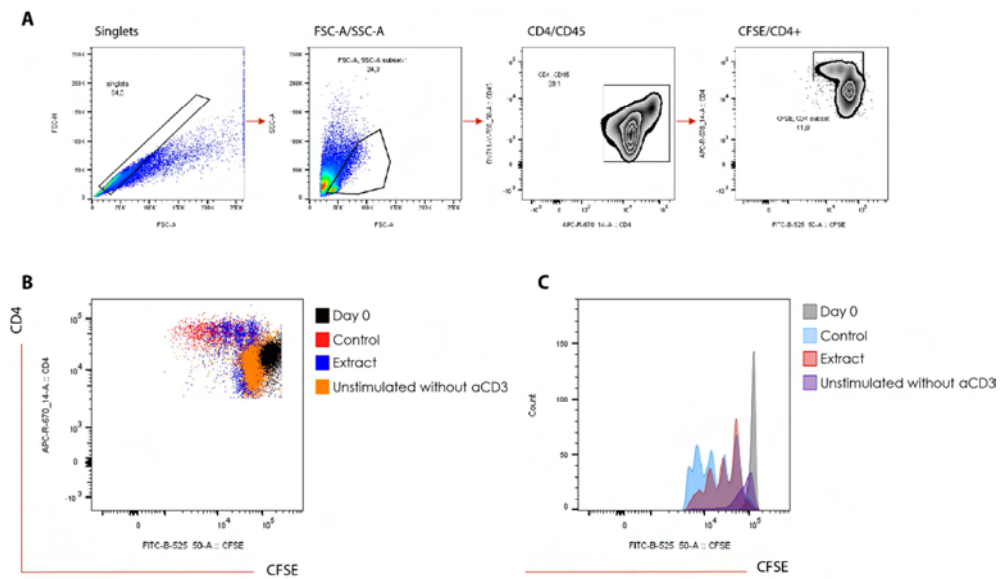


Figure 4.8. Suppression of T cell proliferation by EXPLY-37[®] *in vitro*. CFSE-labeled CD4⁺ T cells isolated from C57/BL6 mice were cultured and stimulated with covered anti-CD3 ϵ and the soluble anti-CD28, IL-12, anti-IL4, and anti-IL-2 for 3 days, in presence or absence of *P. decumanum* ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) added every 24h. (A) Gating scheme depicted in arrows: singlets (FSC-A/FSC-H), total leukocytes (FSC-A/SSC-A), on CD4⁺ T cells (CD4/FSC-C), and on CD4⁺ and CD45⁺ T cells (CD4/CD45). Finally, the CFSE fluorescence intensity gated on the proliferated CD4⁺ subset is detected. (B) Representative blot of CFSE/CD4⁺ populations. T cell proliferation was assessed following CFSE fluoresce at day 0 and in the presence of EXPLY-37[®] (extract), without EXPLY-37[®] (control) and without αCD3 stimulation (unstimulated cells) at day 3. (C) Relative per cell CFSE FI of the different groups. The expression levels were analyzed in the CFSE/CD4⁺ subset at day 0 and at day 3. FI, fluorescence intensity; CFSE, carboxyfluorescein succinimidyl ester.

4.3. OT-II CD4⁺ T cell proliferation is suppressed by EXPLY-37[®] after specific Ag-presentation response.

To further investigate the activity of EXPLY-37[®] on the DC function to prime CD4⁺ and antigen-specific T cell expansion, we developed an OT-II CD4⁺ T cell/bone marrow-derived dendritic cell (DC) co-culture system. Congenic DCs from wildtype C57BL/6 mice and OT-II CD4⁺ T cells were

stimulated IFN- γ in the presence of OVA peptide in the presence or absence of EXPLY-37[®] and then, CD4⁺ T cell expansion was assessed by CFSE as described in *Materials and Methods*.

Given that antigen-naïve CD4⁺ T cells differentiate into memory and effector T cells after antigen recognition with the consequent surface phenotype change, we first sorted the naïve population by its differential expression pattern of cell surface markers (CD44^{low}/CD62L⁺/TCR β ⁺) (Marusina et al., 2017) (data not shown). It has been well established that DCs differentiated from bone marrow progenitor cells with GM-CSF are efficient antigen-presenting cells (APCs) because they constitutively express high levels of costimulatory molecules (Banchereau et al., 1998). In accordance with that report, it was found that DCs loaded with OVA peptide, efficiently stimulated CD4⁺ T proliferation (**Figure 4.9 A-C**). Likewise, addition of EXPLY-37[®] suppressed CD4⁺ T cell expansion induced by OVA, which was expected in agreement with our latest results. Under this culture condition, the frequency of cells that proliferated at least once is slightly higher in the control group (stimulated cells with only OVA + LPS) than in cells that have been treated with the extract (OVA + LPS + extract), with a difference of almost 10% (**Figure 4.10 A-B**). In addition, no difference was shown in the pretreated DCs with *P. decumanum*, which means that it does not enhance the antigen presentation. In summary, these findings demonstrate that the inhibitory effect of cell proliferation in T cells found is APCs independent, depending on the T cell receptor (TCR)-antigen interaction and the transduction pathway of this cell type, and not on the APCs responsible for the initial triggering.

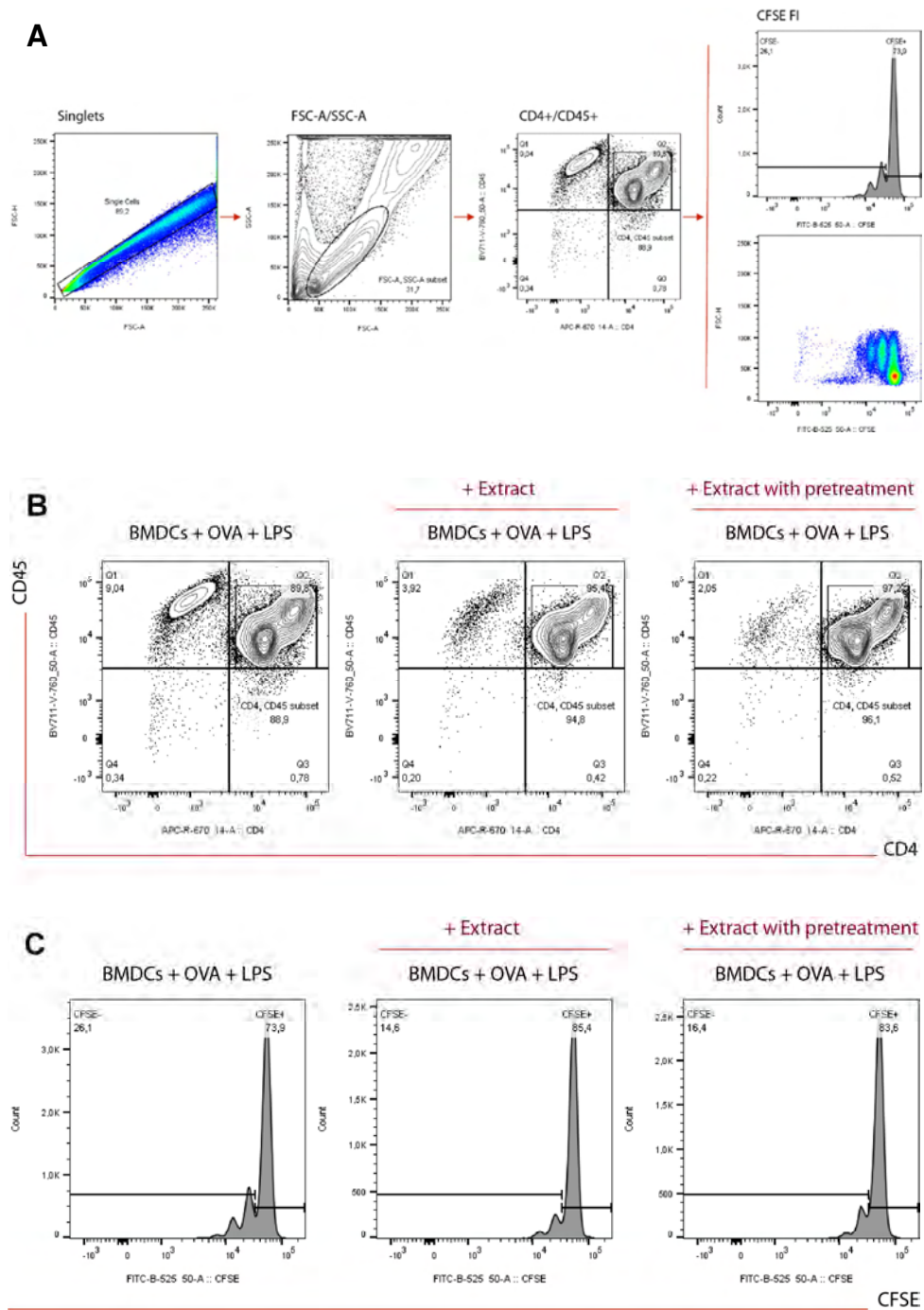


Figure 4.9. Treatment with EXPLY-37[®] suppresses OT-II CD4⁺ T cell proliferation after specific Ag-presentation response. OT-II CD4⁺ T cell/DC co-cultures stimulated with LPS (100 ng mL⁻¹) and OVA protein (4 μg mL⁻¹) were harvested to assess CD4⁺ T cell proliferation. DCs were cocultured with CFSE-labeled OT-II CD4⁺ T cells in the

presence or absence of the extract ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) for 72 h, and T cell proliferation was analyzed as CFSE dilution in the CD4⁺ CD45⁺ T cell gate. (A) Gating strategy involved illustrated in arrows: singlets (FSC-A/FSC-H), total leukocytes (FSC-A/SSC-A), on CD4⁺ and CD45⁺ T cells (CD4/CD45). Finally, the fluorescence intensity of CFSE is detected. (B) Representative blots of the gated CD4⁺/CD45⁺ population of T cells are shown. (C) Histograms show representative CFSE-dilution profiles of T cells (relative per cell CFSE FI): IC (isotype control), OVA + LPS (control), OVA + LPS + Extract pretreatment (pretreated BMDCs with *P. decumaum* for 24 h), and OVA + LPS + Extract (treatment with *P. decumanum*). The range and number in each histogram represent cells that proliferated at least one time (CFSE⁻) or not (CFSE⁺). BMDCs, bone marrow derived dendritic cells; OVA, ovalbumin.

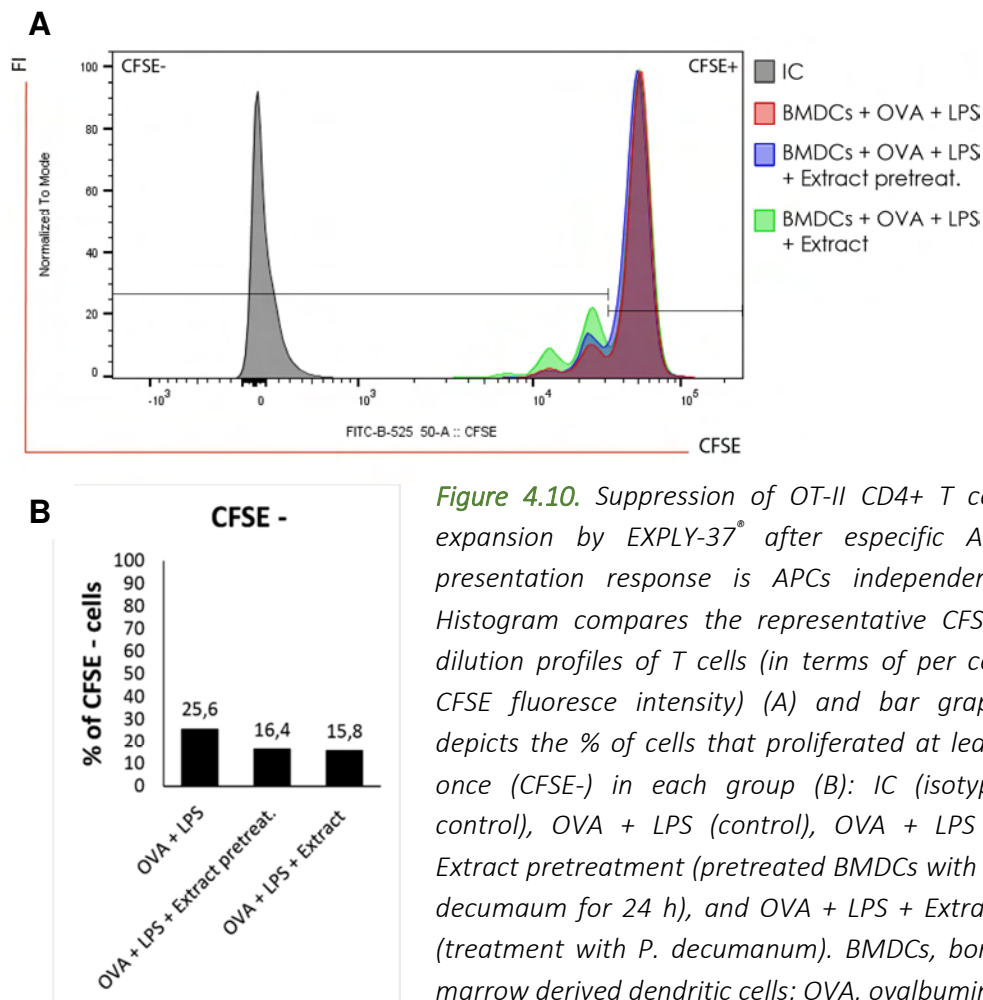


Figure 4.10. Suppression of OT-II CD4⁺ T cell expansion by EXPLY-37[®] after specific Ag-presentation response is APCs independent. Histogram compares the representative CFSE-dilution profiles of T cells (in terms of per cell CFSE fluoresce intensity) (A) and bar graph depicts the % of cells that proliferated at least once (CFSE⁻) in each group (B): IC (isotype control), OVA + LPS (control), OVA + LPS + Extract pretreatment (pretreated BMDCs with *P. decumaum* for 24 h), and OVA + LPS + Extract (treatment with *P. decumanum*). BMDCs, bone marrow derived dendritic cells; OVA, ovalbumin.

4.4. EXPLY-37® modulates the differentiation of BM monocytes toward M1 proinflammatory macrophage phenotype by decreasing iNOS expression

M1 and M2 macrophages are two major subtypes of macrophages, which have distinct functions in inflammatory response (Juhas et al., 2015). M1 macrophages are regarded as promoters of inflammation, while M2 macrophages function oppositely (Moore et al., 2013). *iNOS* is one of the commonly used markers for detecting M1 macrophages (Juhas et al., 2015). In order to investigate whether EXPLY-37® could affect on the differentiation of BM monocytes toward M1 phenotype, it was examined the mRNA expression of *iNOS* by quantitative RT-PCR. Isolated BM derived monocyte from femurs and tibias from C57BL/6 mice were polarized in the presence of 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of LPS for 3 days. EXPLY-37® (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was added on the treated cells every 24 h until the end of the experiment. Surprisingly, it was found that combined treatment with the extract and LPS reduced the expression of *iNOS* compared to LPS alone (**Figure 4.11**). By contrast, it was found that EXPLY-37® alone enhanced the expression of *iNOS* relative to control (without LPS). These findings suggest that the extract modulates the differentiation of BM monocytes toward M1 pro-inflammatory phenotype by decreasing LPS-induced *iNOS* expression. Our data demonstrate that *P. decumanum* cannot only modulate Th1 differentiation from naïve T cells *in vitro*, but can also mitigate M1 polarization from BM derived monocytes.

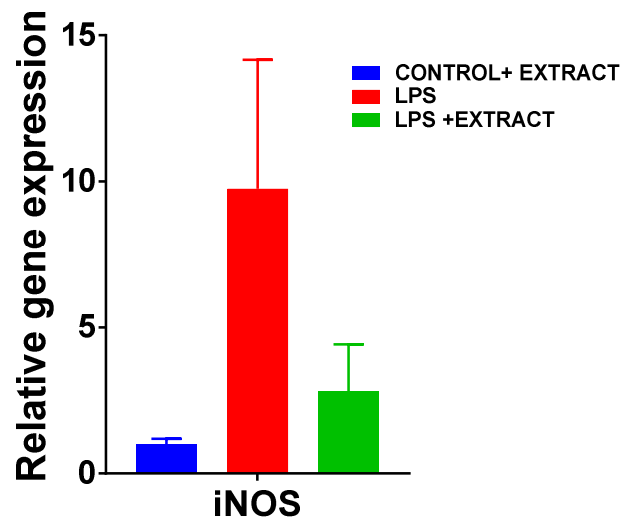


Figure 4.11. EXPLY-37[®] decreases LPS-induced iNOS expression toward the M1 proinflammatory phenotype differentiation. Bone marrow-derived monocytes polarized to M1 macrophages in the presence of $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS for 3 days and treated with $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ of EXPLY-37[®] added every day. Polarization was determined by mRNA expression of inducible nitric oxide synthase for M1 macrophages (Nos2 relative to Gapdh). $n=2$ untreated, treated with LPS, treated with $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ of extract, and LPS combined with extract. Statistical analysis used the unpaired *t* test. iNOS, inducible nitric oxide synthase.

Taking together the results of this work, it has been revealed that *P. decumanum* effectively inhibited the differentiation of CD4⁺ T cells towards Th1 (anti-CD3 and Ag-mediated response) and BMDCs towards M1 polarized macrophages, indicating that the extract may have potent anti-inflammatory activity in adaptive as well as innate immunity.

5. CONCLUSIONS

In conclusion, after interpreting the data obtained throughout this work, the results have shown that the presence of *P. decumanum*:

- I. Decreases the expression of IFN- γ per cell in Th1 lymphocytes. In some experiments, it was observed that the extract modulates the differentiation of CD4 + T cells into Th1 lymphocytes with the decrease in the production of pro-inflammatory cytokines, such as IFN- γ , and thereby may help to reduce inflammation.
- II. Decreases the proliferation of CD4 + T cells. In some assays, the extract attenuates the proliferation of T cells activated by anti-CD3 antibody or by specific antigen presentation by APCs-dendritic cells-. This behaviour is beneficial when the inflammatory response is very high and there is an overstimulation of the immune cells that results in chronic inflammation. Given this situation, *P. decumanum* is able to modulate and normalize the excessive expansion of activated T lymphocytes. Likewise, the data obtained have shown that the inhibitory effect of cell proliferation in the T cells found depends on the TCR-ag interaction and the transduction pathway of this cell type, and not on the APCs cells responsible for the initial activation.
- III. Modulates the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in primary cultures of monocytes M1. M1 phenotype is typically promoter of inflammation. iNOS is a protein whose expression is induced as an adaptive response to stress and inflammation processes. This work attempted to evaluate the role of *P. decumanum* in iNOS expression induced by LPS in primary macrophages, and the results obtained suggested an anti-inflammatory effect in monocytes.

- IV. These results, if consistently repeat in enough numbers that allow appropriate statistical analysis, would provide the first *in vitro* evidence of *P. decumanum* extract in the differentiation and proliferation of T cells, and in primary isolated macrophages, thus suggesting mechanisms for immunomodulation. At the same time, it is advisable to carry out a deeper study to know its mechanism of action, and then perform *in vivo* tests. The extract of *P. decumanum* represents a promising therapeutic agent for inflammatory and related diseases. Therefore, it is of great interest to carry out a more research to identify those compounds capable of acting beneficially on the immune system.

6. REFERENCES

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Shiv-Pillai, S. (2009). *Introduction to the immune system. Nomenclature, general properties, and components*. Basic immunology: Functions and disorders of the immune system. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier, 3rd edition.
- Arulselvan, P., Fard, M.T., Tan, W.S., Gothai, S., Fakurazi, S. (2016). Role of antioxidants and natural products in inflammation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016, 15.
- Banchereau, J., Steinman R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Billiau, A., Matthys, P. (2009). Interferon-gamma: A historical perspective. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 20, 97-113.
- Cheng, Y.H., Lin, Y.C., Chen, I.S., Liu, S.D., Li, J.H., Wang, C.C. (2017). Immunomodulatory effects of taiwanese *Neolitsea* species on Th1 and Th2 functionality. *Journal of Immunology Research* 2017, 1-13.
- Cui, D., Huang, G., Yang, D., Huang, B, An, B. (2013) Efficacy and safety of interferon-gamma-targeted therapy in Crohn's disease: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* 37(5), 507-513.
- Díaz-Castro, J., Guisado, R., Kajarabille, N., García, C., Guisado, I.M., De Teresa, C., Ochoa, J.J. (2012). *Phlebodium decumanum* is a natural supplement that ameliorates the oxidative stress and inflammatory signalling induced by strenuous exercise in adult humans. *European Journal of Applied Physiology* 112(8), 3119-3128.
- González-Jurado, J.A., Guisado-Barrilao, R., Molina-Sotomayor, E., de Teresa-Galván, C. (2008). Efecto protector del *Phlebodium decumanum* sobre la fatiga muscular inducida por el ejercicio en sujetos no entrenados. *Cultura, Ciencia y Deporte* 3(8), 101-106.

- Gonzalez-Jurado, J.A., Pradas, F., Molina, E.S., De Teresa, C. (2011). Effect of *Phlebodium decumanum* on the immune response induced by training in sedentary university students. *Journal of Sports Science and Medicine* 10, 315-321.
- Kidd, P. (2003). Th1/Th2 Balance: The hypothesis, its limitations, and Implications for health and disease. *Alternative Medicine Reviews* 8(3), 223-246.
- Lugli E. (2017). The vast universe of T cell diversity: Subsets of memory cells and their differentiation. *T-Cell Differentiation. Methods and Protocols*. (pp. 1-19). New York, NY: Editorial Humana Press.
- Marusina, A.I., Ono, Y., Merleev, A.A., Shimoda, M., Ogawa, H., Wang, E.A., Maverakis, E. (2017). CD4+ virtual memory: Antigen-inexperienced T cells reside in the naïve, regulatory, and memory T cell compartments at similar frequencies, implications for autoimmunity. *Journal of Autoimmunity* 77, 76-88.
- Nam, S.Y., Kim, K.Y., Kim, M.H., Jang, J.B., Rah, S.Y., Lee, J.M., Jeong, H.J. (2017). Anti-inflammatory effects of a traditional Korean medicine: Ojayeonjonghwan. *Pharmaceutical Biology* 55(1), 1856-1862.
- Punzón, C., Alcaide, A., Fresno, M. (2003). *In vitro* anti-inflammatory activity of *Phlebodium decumanum*. Modulation of tumor necrosis factor and soluble TNF receptors. *International Immunopharmacology* 3(9), 1293-1299.
- Schmidt, E., Seitz, C.S., Benoit, S., Bröcker, E.B., Goebeler, M. (2007) Rituximab in autoimmune bullous diseases: mixed responses and adverse effects. *The British Journal of Dermatology* 156(2), 352-356.
- Schmitt, N., Ueno, H. (2015). Regulation of human helper T cell subset differentiation by cytokines. *Current Opinion in Immunology* 34, 130-136.

- Sekiya, T., Yoshimura, A. (2016). *In Vitro* Th differentiation protocol. In: Feng, X.H., Xu, P., Lin, X. (Eds.) *TGF- β Signaling. Methods in Molecular Biology*, vol 1344. Humana Press, New York, NY.
- Sharma A., Joshi, R., Kumar, S., Sharma, R., Rajneesh, Padwad, Y., Gupta, M. (2018). Prunus cerasoides fruit extract ameliorates inflammatory stress by modulation of iNOS pathway and Th1/Th2 immune homeostasis in activated murine macrophages and lymphocytes. *Inflammopharmacology* 26, 1483-1495.
- Vargas-Corzo, M.C., Aguilar-Cordero, M.J., de Teresa Galván, C., Segura-Millán, D., Miranda-León, M.T., Castillo-Rueda, G., Guisado-Barrilao, R. (2014). Beneficios de la ingesta del Phlebodium decumanum sobre el daño muscular al efectuar ejercicio físico intenso en sujetos sedentarios. *Nutrición Hospitalaria* 29(6), 1408-1418.
- Xu, J., Zhao, Y., Aisa, H.A. (2017). Anti-inflammatory effect of pomegranate flower in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 macrophages. *Pharmaceutical Biology* 55(1), 2095-2101.
- Yahfoudi, N., Alsadi, N., Jambi, M., Matar, C. (2018). The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients* 10(11), 1618.

CAPÍTULO V

Evaluación del efecto antiproliferativo
potencial del extracto de *Phlebodium*
decumanum sobre células madre
cancerígenas aisladas de distintas
líneas celulares.

La experimentación que se recoge en este capítulo V se ha desarrollado en los laboratorios de Química Analítica de la Facultad de ciencias de la Universidad de Granada (FQ338) en los laboratorios de cultivo celular de la Facultad de Medicina gracias a la colaboración con el grupo CTS-963 liderado por el Prof. Juan Antonio Marchal Corrales.

5

Evaluación del efecto antiproliferativo potencial del extracto de *Phlebodium decumanum* sobre células madre cancerígenas aisladas de distintas líneas celulares

1. INTRODUCCIÓN

Las células madre cancerígenas (CMCs) son una pequeña sub-población de células dentro del tumor, que poseen la capacidad de autorrenovación y la habilidad de diferenciarse en múltiples tipos celulares. Una teoría sugiere que son capaces de dar resistencia a la quimioterapia y radioterapia y causar la aparición de metástasis y recaídas. Por estas razones, recientemente se están convirtiendo en una potencial diana para la terapia contra el cáncer (Cianciosi et al., 2018).

Numerosos estudios científicos han demostrado una estrecha asociación entre el alto consumo de compuestos naturales y la disminución del riesgo de incidencia de cáncer. Son muchas las evidencias que revelan que determinados fitoquímicos y extractos vegetales, son capaces de atacar y matar las CMCs. Estos compuestos bioactivos son, por tanto, capaces de contrarrestar el proceso de carcinogénesis y/o mejorar terapia del tumor.

De hecho, se han descrito muchos de los genes y proteínas que sostienen la capacidad de autorrenovación y resistencia a los medicamentos de estas células y se ha demostrado que ciertos fitoquímicos son capaces de interferir con estos sistemas de señalización, tanto *in vitro* como *in vivo* (Scarpa and Ninfali, 2015; Cianciosi et al., 2018;).

El uso de compuestos naturales y su asociación con el descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas, ha sido siempre un tema de gran interés para la comunidad científica. *Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm. (*P. decumanum*) ha sido ampliamente utilizado desde tiempos remotos para tratar multitud de enfermedades, incluidas el cáncer. Aunque son más los trabajos publicados que se centran la actividad anti-inflamatoria del helecho, sus propiedades anticancerígenas son también una evidencia. Un ejemplo son los experimentos *in vitro* realizados por Gridling y colaboradores, que revelaron su capacidad antitumoral sobre la línea de leucemia HL-60. El extracto exhibió un potente efecto anti-proliferativo llegando a inhibir el crecimiento en un 80%. Además, la fracción hidrosoluble del extracto ha sido registrada como complemento nutricional en pacientes de SIDA y cáncer, siendo indicada contra el debilitamiento general y el síndrome caquético. Las formulaciones para dicho fin se describen en la patente US 6.228.366B1 (Yesares Ferrer et al., 2001).

A pesar del vínculo existente entre *P. decumanum* y el cáncer, nada se conoce sobre la aplicación del extracto contra las CMCs, las células más resistentes del tumor. Este ámbito aún desconocido, nos impulsó a realizar un estudio sobre el potencial efecto citotóxico del helecho contra esta pluripotente población celular de creciente interés en los últimos años.

2. OBJETIVO

En el contexto descrito, el objetivo principal en el que se centra este capítulo de la tesis doctoral es **estudiar el posible efecto anticancerígeno del extracto en su totalidad y de distintas fracciones obtenidas mediante cromatografía de líquidos semi-preparativa sobre células madre cancerígenas aisladas de distintas líneas de cáncer.** Bien es sabido, que estas células pluripotentes persisten en los tumores y son la principal causa de recaída y metástasis. De la bibliografía consultada, se extrae que existen claras evidencias del efecto anti-proliferativo del *P. decumanum* sobre determinadas líneas tumorales. De acuerdo a este hecho, se pretende investigar la potencial actividad citotóxica del extracto y sus fracciones sobre la subpoblación de CMCs aislada de distintas líneas tumorales, en concreto cáncer de colon, páncreas, mama y pulmón.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos y disolventes

El agua ultrapura (18.2 MΩ/cm) se obtuvo empleando un sistema Milli-Q Advantage A10 de Millipore (Bedford, MA, USA). El ácido fórmico ($\geq 98\%$) usado como aditivo en las fases móviles fue proporcionado por MERCK (Darmstadt, Alemania) y el metanol de grado analítico por Scharlab (Barcelona, España).

Los medios de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles Medium*) y RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium*) y *Advanced DMEM/F12 (1x) Medium* de la marca Gibco® fueron obtenidos de Thermo Thermo Scientific. El medio de esferas DMEM/F12, la L-glutamina, la penicilina, la estreptomina y el resto de factores (hidrocortisona, heparina, insulina, Efg y FGF) fueron proporcionados por Sigma-Aldrich (St Luis, MO, USA). Otros reactivos como la solución de tripsina-EDTA, el buffer fosfato salino, (PBS del inglés, *phosphate buffered saline*) y el suero bobino fetal (FBS del inglés, *fetal bobine serum*) fueron obtenidos también de Sigma-Aldrich. El dimetilsulfóxido (DMSO) de grado de cultivo celular utilizado en el medio de congelación fue obtenido de PanReac AppliChem (Barcelona, España). El reactivo CKK8 (Cell Counting Kit-8) para medir la viabilidad celular fue proporcionado por Sigma-Aldrich Chemical Company.

3.2. Instrumentación y software

La separación de los fitocomponentes de *P. decumanum* para su fraccionamiento se realizó en un equipo de cromatografía de líquidos Agilent 1100 series equipado con un sistema de bombeo (331/332 Gilson), un detector DAD (modelo 171/172; Agilent Technologies, Palo Alto, CA,

USA), un inyector manual (modelo 7725) de la marca Rheodyne® proporcionado por Teknokroma (Barcelona, Spain), y un colector de fracciones PREPFC 200-Series™ de la marca Gilson (Middleton, WI, USA)(Figura 5.1).

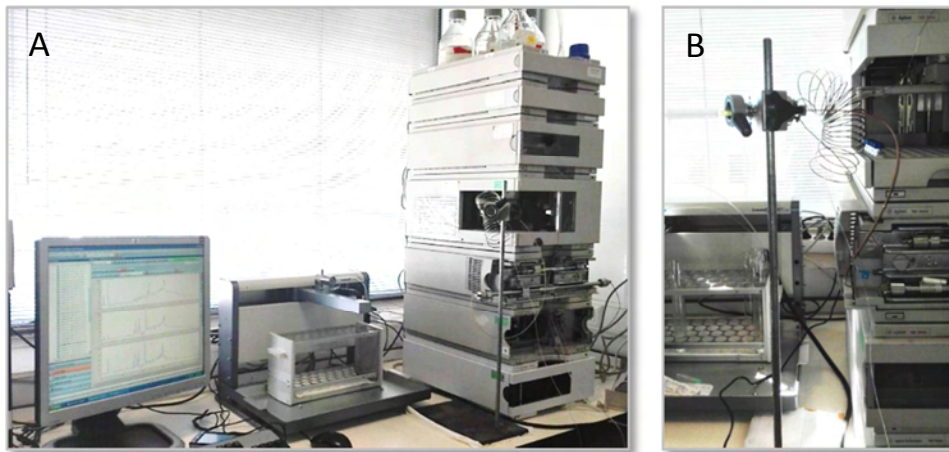


Figura 5.1. Cromatógrafo de líquidos semipreparativo, con colector de fracciones y detector de fotodiodos array, Agilent 1100 Series (A) y configuración del inyector manual (B).

La condensación de cada una de las fracciones obtenidas en la cromatografía semi-preparativa se llevó a cabo en un rotavapor de la marca BÜCHI R-200 con *heating bath* B-490 (BÜCHI, México) y la posterior deshidrogenación del extracto y las fracciones mediante un sistema de liofilización SCANVAC CoolSafe™ (LaboGene™, Skanderborg, Dinamarca). Otro material de laboratorio utilizado fueron un agitador vortex (IKA, Staufen, Germany), una balanza analítica Mettler-Toledo AND GX400 (Columbus, OH, USA) y una centrifuga Spectrafuge™ 24D de Labnet International, Inc. (Nueva Jersey, USA).

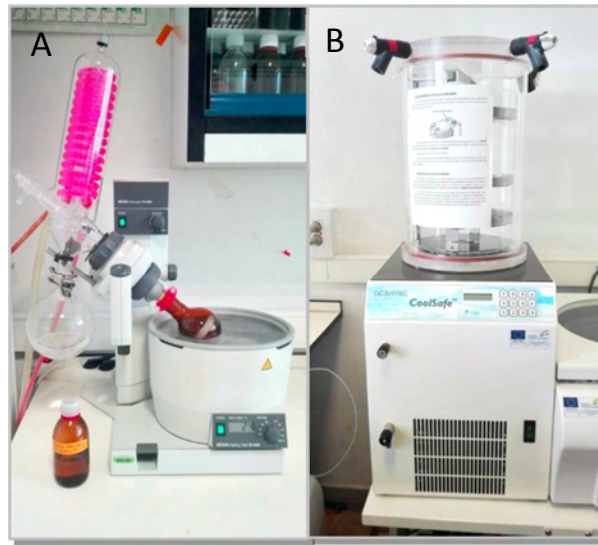


Figura 5.2. Rotavapor (A) y liofilizador (B) empleados para densificar y liofilizar las fracciones obtenidas de la recolección.

Los cultivos celulares se realizaron bajo condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar (Micro-V, Telstar, España). El incubador de CO₂ Steri-Cult CO₂ incubator fue obtenido de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Los frascos de cultivo de 75 o 25 cm² (T75 y T25) así como las placas de 6 y 96 pocillos fueron suministrados por Corning Inc. (Corning, NY, EEUU). La cámara de recuento BLAUBRAND® Neubauer improved empleada fue proporcionada por Sigma-Aldrich. Otro equipamiento utilizado en el laboratorio de cultivo celular fueron una centrífuga con refrigeración Beckman Alegra™ 21R (LabX; Midland, ON, Canadá), una centrífuga Eppendorf Microcentrifuge 5415R (Sigma-Aldrich Chemical Company), un baño de agua termostático P-Selecta Precistern (JP Selecta; Barcelona, España), un congelador de -80°C Thermo scientific formo -86C UTL Freezer y un fotómetro para microplacas Multiskan™ FC (ambos de Thermo Fisher Scientific). Las células se visualizaron en un microscopio invertido Axiovert 40 CFL provisto de una cámara AxioCam MR de la marca Carl Zeiss

(Thornwood, NY, USA). Todo el material no estéril ha sido autoclavado en un sistema autoclave Trade Steam Sterilizer de Raypa (Barcelona, España).

El software empleado para el control del equipo HPLC y la adquisición de los cromatogramas fue ChemStation B.03.02 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

Los datos de absorbancia (valores de D.O) obtenidos del espectrofotómetro de placas se analizaron mediante el programa GraphPad Prism 8 v.8.1.2 (332) (GraphPad Company, San Diego, CA, USA). Las microfotografías se procesaron con el software AxioVision.

3.3. Preparación y análisis del extracto

3.3.1. Proceso de extracción y preparación de la muestra

El extracto se preparó a partir de hojas de *P. decumanum* siguiendo el mismo procedimiento de extracción descrito en el **apartado 3.4.1** de la sección de *Materiales y métodos* del **capítulo I**, de acuerdo con la patente US 6228366 de Helsint (Yesares-Ferrer et al., 2001).

Para los ensayos biológicos con las células madre tumorales se partió de extracto sin liofilizar. Una vez formadas las esferas de segunda generación de las líneas tumorales en estudio, y previamente a su tratamiento, se preparó una disolución stock de 64 mg mL⁻¹ de concentración en PBS. A partir de ésta se hicieron disoluciones seriadas de concentración decreciente en el medio de cultivo adecuado para cada tipo celular que fueron utilizadas finalmente en el ensayo de citotoxicidad. Las fracciones fueron procesadas de la misma manera, pero en este caso, tras su previa liofilización.

3.3.2. Aislamiento de los compuestos mediante HPLC semi-preparativa.

Las fracciones ensayadas de *P. decumanum* se aislaron mediante HPLC semi-preparativa empleando un sistema Agilent 1100 equipado con un sistema de bombeo (331/332 Gilson), un detector DAD (modelo 171/172), un inyector manual y un colector de fracciones de la marca Gilson (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), el mismo utilizado para el establecimiento del perfil químico característico del extracto (capítulo I). Para la separación de los fitocompuestos se utilizó una columna semi-preparativa ZORBAX® ODS original 70Å C18 (de dimensiones 9.4 x 250 mm y tamaño de partícula 5 µm (Agilent Technologies)).

Las condiciones cromatográficas empleadas fueron las optimizadas en el capítulo I, con algunas ligeras modificaciones para su adaptación a la nueva columna de cromatografía semipreparativa. Asimismo, como fase móvil se utilizó agua (A) y metanol (B), y se siguió el mismo gradiente de elución alargando el tiempo de equilibración de la columna hasta 9.9 min en lugar de 4.9 min. La inyección se realizó manualmente a través de una válvula Reodyne y el volumen de inyección fue de 1 mL.

Los compuestos eluidos se detectaron simultáneamente a las longitudes de onda de 257.8 nm, 310.8 nm y 350.8 nm. Las fracciones eluidas se recogieron empleando un colector de fracciones que operó en modo de tiempo (i.e. colectando el eluyente en un tubo cada 10 min). Previamente se calculó el volumen o tiempo muerto entre el detector y el colector para solventar el desfase de tiempo existente ambos.

Finalmente, las fracciones obtenidas fueron unificadas y transferidas a un matraz de vidrio ámbar redondo y se concentraron en un rotavapor a temperatura ambiente (evitando temperaturas altas por la posible

degradación de los compuestos). Las fracciones concentradas se vertieron en vasos de precipitado y fueron congeladas a -20°C para su posterior liofilización, con el fin de eliminar los restos de disolvente. Las muestras liofilizadas se conservaron a 4°C hasta su análisis por HPLC-DAD y consiguientes ensayos de actividad biológica en las CMCs.

3.3.3. Análisis mediante HPLC-UV Vis (DAD)

El extracto de *P. Decumanum* y las fracciones colectadas obtenidas mediante cromatografía semi-preparativa fueron caracterizados mediante HPLC-DAD en el sistema Agilent 1100 provisto de detector DAD. El extracto se disolvió en la fase móvil inicial del método cromatográfico (agua desionizada/metanol (95:5, v/v)) a una concentración de 30 mg mL^{-1} . Las fracciones se disolvieron en el volumen adecuado de disolvente hasta alcanzar una concentración de 10 mg mL^{-1} . Finalmente, las disoluciones se centrifugaron antes del análisis durante 2.5 min a $16.300 \times g$ para eliminar posibles partículas insolubles no disueltas. Las muestras se analizaron fijando las condiciones óptimas del método analítico desarrollado en el Capítulo I (sección 3.4.3).

3.4. Cultivo celular

3.4.1. Líneas celulares

Se estudiaron las siguientes líneas celulares:

- **HCT-116:** Células de carcinoma de colon humano con mutación en HER3, Ras G13D y PIK3CA.

REFERENCIA Nº: ECCAC 91091005; ATCC® CCL-247™

MORFOLOGÍA: Similar a epitelial

CARIOTIPO: Modal no. 45

PERFIL DE ADN: STR-PCR Data: Amelogenin: X, Y; CSF1PO: 7,10; D13S317: 10,12; D16S539: 11,13; D5S818: 10,11; D7S820: 11,12; THO1: 8,9; TPOX: 8; vWA: 17,22

- **MDA-MB-231:** Células de adenocarcinoma de mama humano con mutación en BRAF, CDKN2A, KRAS, NF2 y TP53.

REFERENCIA Nº: ECCAC 92020424; ATCC® HTB-26™

MORFOLOGÍA: Epitelial

CARIOTIPO: Rango 52-68, Modal no 64, cerca triploide

PERFIL DE ADN: STR-PCR Data: Amelogenin: X; CSF1PO: 12,13; D13S317: 13; D16S539: 12; D5S818: 12; D7S820: 8,9; THO1: 7,9.3; TPOX: 8,9; vWA: 15,18

- **BxPC3:** Células de adenocarcinoma de páncreas humano con mutación en CDKN2A, MAP2K4, SMAD4 y TP53.

REFERENCIA Nº: ECCAC 93120816; ATCC® CRL-1687™

MORFOLOGÍA: Epitelial

CARIOTIPO: 2n = 59, cerca triploide

PERFIL DE ADN: STR-PCR Data: D5S818: 11; D13S317: 11; D7S820: 10,13; D16S539: 9,11; vWA: 14,18; THO1: 9; Amelogenin: X; TPOX: 8; CSF1PO: 13

- **NCI-H1650:** Células de adenocarcinoma bronquio alveolar de pulmón humano con mutación en EGFR, PIK3C2A, SMARCA4 and TP53

REFERENCIA Nº: ATCC® CRL-5883™

MORFOLOGÍA: Epitelial

PERFIL DE ADN: STR-PCR Data: Amelogenin: X; CSF1PO: 11; D13S317: 11; D16S539: 11,12; D5S818: 11; D7S820: 8,9; THO1: 9.3; TPOX: 11; vWA: 18

- **NCI-1975:** Células de adenocarcinoma pulmón humano con mutación en CDKN2A, EFGR, PIK3CA y TP53.

REFERENCIA Nº: ATCC® CRL-5908™

MORFOLOGÍA: Epitelial

PERFIL DE ADN: STR-PCR Data: Amelogenin: X; CSF1PO: 12; D13S317: 10,13; D16S539: 9,12; D5S818: 11,12; D7S820: 8,11; THO1: 7; TPOX: 8,11; vWA: 18

Todas las líneas fueron suministradas por el Banco del Células del CIC de la Universidad de Granada (CCLE, ATCC, ECACC).

3.4.2. Condiciones de cultivo

Los cultivos celulares se realizaron bajo condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar Micro-V (Telstar, España). Las células fueron mantenidas en un incubador de CO₂ en condiciones estándar, a 37°C en una atmósfera saturada de humedad (al 90%) y 5% de CO₂.

Para el mantenimiento y crecimiento de las líneas BxPC3, NCI-H1650 y NCI-H1975 se empleó el medio de cultivo RPMI 1640 y para las líneas HCT-116 y MDA-MB-231 el medio DMEM. Para la formación de esferas primarias y secundarias, las células se sembraron en *medio de esferas*, DMEM/F12 suplementado con 1x de B27, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de hidrocortisona, 4 ng mL^{-1} de heparina, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de insulina, 10 ng mL^{-1} de Egf y 20 ng mL^{-1} de FGF.

Todos los medios fueron suplementados con un 1% de una disolución de penicilina/estreptomicina (10.000 U mL^{-1} penicilina G y 10 mg mL^{-1} de estreptomicina), un 10% de suero bobino fetal (FBS) inactivado 56°C durante 30 min y 2 mM de glutamina, a excepción del medio DMEM/F12 al que únicamente se le añadió penicilina/estreptomicina.

El mantenimiento de todas las líneas adherentes se realizó en frascos de cultivo con un área de crecimiento de 75 cm^2 hasta alcanzar un 80-90% de confluencia. Llegado este punto, las células fueron despegadas de la superficie mediante tripsina-EDTA y posteriormente lavadas con el doble de volumen de medio de cultivo con FBS con el fin de inactivar la tripsina mediante centrifugación a $300 \times g$ durante 5 min. A continuación, fueron resembradas en nuevos frascos de cultivo o bien se procedió a su siembra para los ensayos de formación de esferas.

3.4.3. Método de congelación celular

Para el mantenimiento de las líneas celulares durante largos periodos de tiempo, las células se despegaron de los frascos de cultivo mediante tripsina-EDTA y centrifugaron a $300 \times g$ durante 5 min en medio de cultivo suplementado con FBS. Posteriormente, el pellet celular se resuspendió (con dos repipeteos rápidos) en medio de congelación a razón de 0.5×10^6

células, para luego ser introducidas inmediatamente en criotubos y ser conservadas en el congelador a -80°C^* . Nunca pasó más de año a esta temperatura. Tras este periodo se conservaron en nitrógeno líquido.

**Medio de congelación:* Suero bovino fetal (FBS) inactivado mediante calor húmedo a 56°C durante 30 min y dimetil sulfóxido (DMSO) al 10%.

3.4.4. Método de descongelación celular

Las líneas celulares conservadas a -80°C (almacenamiento a corto plazo) se descongelaron en calor húmedo a 37°C (<1 min) e inmediatamente fueron resuspendidas suavemente en medio de cultivo estéril precalentado. A continuación, fueron centrifugadas a $300 \times g$ durante 5 min para eliminar los restos de DMSO (dos lavados), y el pellet resultante se resuspendió en medio de cultivo. Finalmente, se realizó la siembra las células en frascos de cultivo de 75 o 25 cm^2 , a alta densidad para optimizar la recuperación.

3.4.5. Recuento celular

Para el recuento de células, tras despegar y centrifugar las células como se ha descrito previamente, el pellet fue resuspendido en medio de cultivo. Para conocer la densidad del cultivo se utilizó una cámara de Neubauer, las células que aparecían en cada cuadrante de la cámara fueron contadas, el número obtenido fue dividido entre cuatro, y multiplicado por 10.000 y finalmente se le aplicó el factor de dilución utilizado al tomar el volumen de muestra donde estaban resuspendidas las células.

3.5. Tratamiento de las líneas celulares con el extracto de *P. decumanum* y sus fracciones

3.5.1. Ensayo de formación de esferas secundarias

Todas las líneas tumorales estudiadas se cultivaron siguiendo un protocolo, para la obtención de esferas flotantes, optimizado previamente por el grupo de investigación en el que se ha realizado la presente investigación. Las células adherentes de cada tipo celular se recogieron utilizando tripsina como se ha descrito anteriormente. A continuación, se sometieron a tres lavados con PBS con el fin de eliminar el FBS. Posteriormente, se contaron y sembraron en medio DMEM/F12 a una densidad celular de 350.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos especiales de baja adherencia. Este medio de cultivo restrictivo junto con la baja adherencia de la placa favorece el crecimiento de las células en suspensión, la formación de las esferas y con ello el aislamiento de las CMCs. Tras 72 h de incubación a 37°C y 5% CO₂, se obtuvieron las células madre de las esferas de primera generación. Las esferas formadas fueron recogidas en eppendorfs y centrifugadas para eliminar el medio de cultivo. Seguidamente, fueron disgregadas mecánicamente mediante el uso de una jeringa, con el fin de obtener células individuales, y sembradas en medio de esferas a una concentración de 4.000 o 5.000 células por pocillo (en función de la línea celular) en placas de 96 pocillos de baja adherencia. Los cultivos se mantuvieron en incubación durante otras 72 h para obtener las esferas de segunda generación.

3.5.2. Citotoxicidad in vitro. Ensayo CCK-8

El ensayo de citotoxicidad se evaluó con el método del CCK-8 (*Cell counting Kit-8*). En comparación con otras sales de tetrazolio, como es el

MTT (*bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio*), el CCK-8 presenta la ventaja de que produce un colorante de formazán soluble en agua, tras su biorreducción en presencia de un portador de electrones. Además, no requiere pre-mezcla de componentes, se añade directamente a las células y su sensibilidad de detección es más alta que las otras sales.

Las células madre de las esferas de primera generación derivadas de las líneas celulares estudiadas se disgregaron y sembraron en placas de 96 pocillos de baja adherencia tal y como se ha descrito en la **sección 3.5.1**. A cada pocillo, se añadió 200 μL de la suspensión celular a la densidad deseada. Tras 72 h de incubación, las esferas secundarias formadas fueron tratadas con diferentes concentraciones del extracto de *P. decumanum* y de las fracciones aisladas previamente mediante la cromatografía semi-preparativa (**sección 3.3.4**).

El número mínimo de concentraciones a probar fue 7 (en el rango de 1.56 - 6.400 $\mu\text{g mL}^{-1}$). La preparación de las concentraciones se llevó a cabo con diluciones seriadas empezando desde 64 mg mL^{-1} del extracto o las fracciones disueltos en PBS. Para el tratamiento se añadió un volumen de 15 μL de extracto por pocillo y se mantuvo en condiciones estándar durante 72 h. Se realizaron tres réplicas por cada concentración en 4 experimentos independientes. Pasado ese tiempo, las células fueron incubadas con CCK-8 (15 $\mu\text{L/pocillo}$) a 37°C durante 3 h. Posteriormente, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm.

Dependiendo de los requerimientos, en cada experimento se incluyeron controles, blancos y controles positivos. La viabilidad celular relativa se calculó como ratio del grupo tratado con el grupo control sin

tratar y fue expresada como como porcentaje de inhibición de viabilidad celular.

3.5.3. Determinación de la IC₅₀

Los valores de absorbancia obtenidos en el espectrofotómetro se analizaron mediante el programa GraphPad Prism. Se representaron las gráficas de inhibición y se calculó la IC₅₀ (concentración requerida para inhibir el 50% de la viabilidad celular) de cada una de las líneas y condiciones estudiadas (a las 72 h de tratamiento). Para ello, se representó la relación entre el porcentaje de células que no sobrevivieron y el logaritmo de la concentración de extracto o fracciones, y se obtuvo la curva de inhibición de viabilidad. La IC₅₀ del extracto de *P. decumanum* y las fracciones aisladas, se calculó a partir de la curva construida dosis-respuesta.

3.5.4. Análisis estadísticos

Los valores se representan como medias \pm SEM de 4 determinaciones por triplicado. Los datos fueron sometidos a un análisis estadístico one-way ANOVA para comparar tratamientos y con el *test de Dunnett* para comparaciones de múltiples variables.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Separación y análisis de las fracciones recogidas del extracto de *P. decumanum*

Los compuestos presentes en el extracto se separaron en grupos en función de su polaridad mediante cromatografía de líquidos semi-preparativa. El objetivo fue estudiar la potencial actividad anticancerígena de cada una de estas fracciones. En la **Figura 5.3** se muestran los cromatogramas de HPLC registrados durante el fraccionamiento del extracto. La columna de fase inversa ZORBAX® ODS C18 permitió una separación satisfactoria del extracto crudo en distintas fracciones.

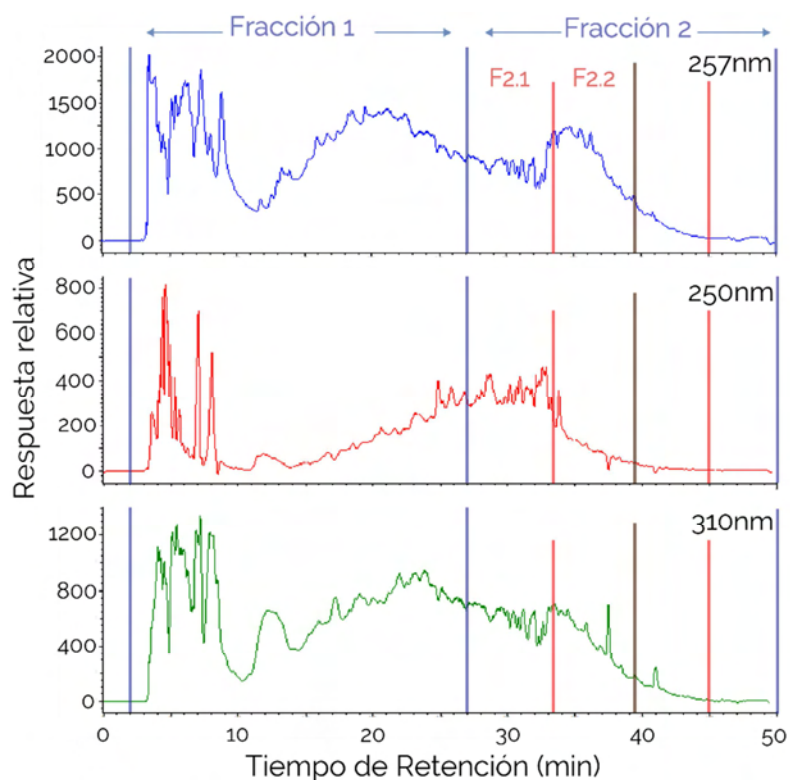


Figura 5.3. Perfil HPLC preparativo del extracto crudo de *P. decumanum* a distintas longitudes de onda (257, 250 y 310 nm). Las líneas verticales indican el rango de tiempo recogido para cada fracción y subfracciones.

Inicialmente, se recogieron dos fracciones (Fracción 1 y Fracción 2) con rangos de tiempo de retención 2.0-27.0 y 27.0-52 min, respectivamente, para evaluar su actividad. A continuación, en función de los resultados positivos observados en los ensayos de citotoxicidad celular y, teniendo en cuenta el cromatograma registrado en el sistema semi-preparativo, se realizó un segundo fraccionamiento de la Fracción 2. Ésta se dividió en 4 fracciones (6.25 min/tubo) de las cuales las dos primeras Fracción 2.1 y Fracción 2.2 fueron seleccionadas para evaluar su actividad, por contener la mayor parte de los compuestos entre ellos los bioactivos. La composición de estas fracciones fue analizada mediante HPLC-DAD en las condiciones optimizadas a lo largo de esta investigación. En la **Figura 5.4** se muestran los cromatogramas obtenidos.

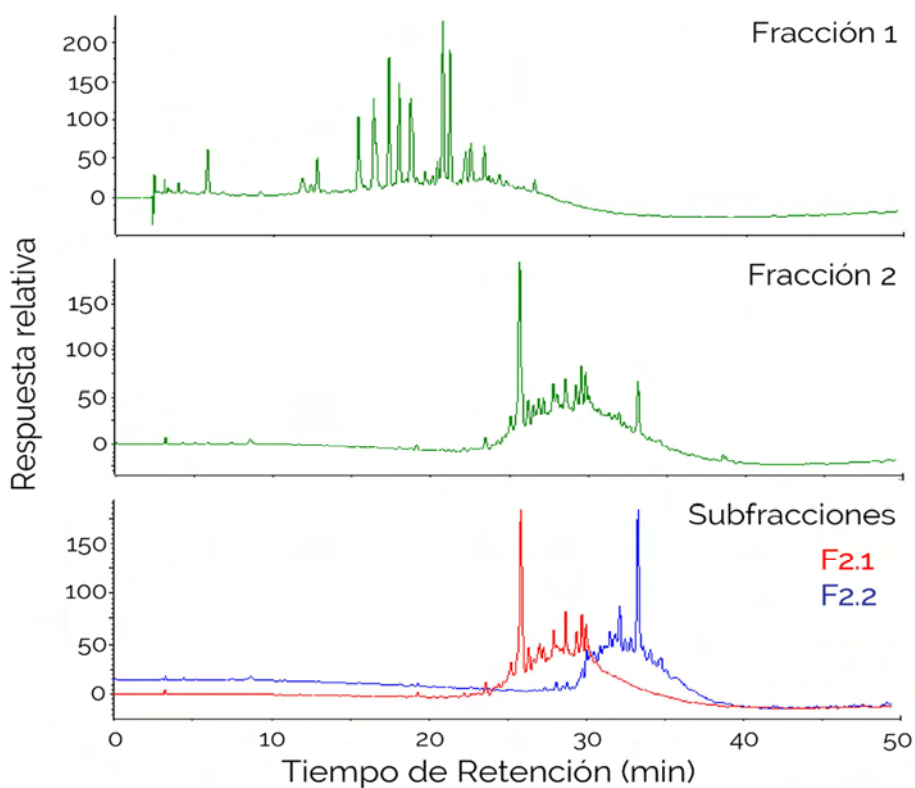


Figura 5.4. Perfil cromatográfico de las distintas fracciones de *P. decumanum* obtenidas mediante cromatografía semipreparativa (310 nm).

El análisis posterior de las fracciones permite realizar una estimación de la calidad y pureza de cada grupo de compuestos de cada fracción. Los cromatogramas obtenidos muestran que tanto la separación con la columna semi-preparativa como el proceso de fraccionamiento han sido adecuados. Además, el grado de pureza de las fracciones y subfracciones obtenidas es alto ya que apenas se observa solapamiento de picos cromatográficos.

4.2. Actividad anticancerígena de *P. decumanum*

La capacidad citotóxica del extracto completo y de las fracciones aisladas se evaluó sobre las células madre cancerígenas aisladas de distintas líneas celulares tumorales: cáncer de colon (HCT-116), páncreas (BxPC3), mama (MDA-MB-231) y pulmón (NCI-H1650 y NCI-1975). Los resultados obtenidos se detallan a continuación.

4.2.1. Estudio de la citotoxicidad del extracto EXPLY-37® sobre las esferas secundarias de CMCs

Con el fin de evaluar el posible efecto antiproliferativo de *P. decumanum*, las esferas de segunda generación enriquecidas con CMCs fueron tratadas durante 72 h con el extracto a un rango de concentraciones.

En primer lugar, los cultivos de esferas fueron examinados al microscopio inmediatamente después del tratamiento. En la **Figura 5.5** se muestran las tumoresferas secundarias de las líneas celulares que fueron sensibles al extracto. En general, *P. decumanum* redujo de forma significativa el número y el volumen de las tumoresferas. En la línea de cáncer de colon HCT-116 se aprecia una clara disgregación de las esferas formadas con $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de extracto (**Figura 5.5.B**), mientras que en el

cultivo de cáncer de pulmón NCI-1650, algo menos sensible, se observaron esferas con márgenes más irregulares y más células dispersas (**Figura 5.5.D**).

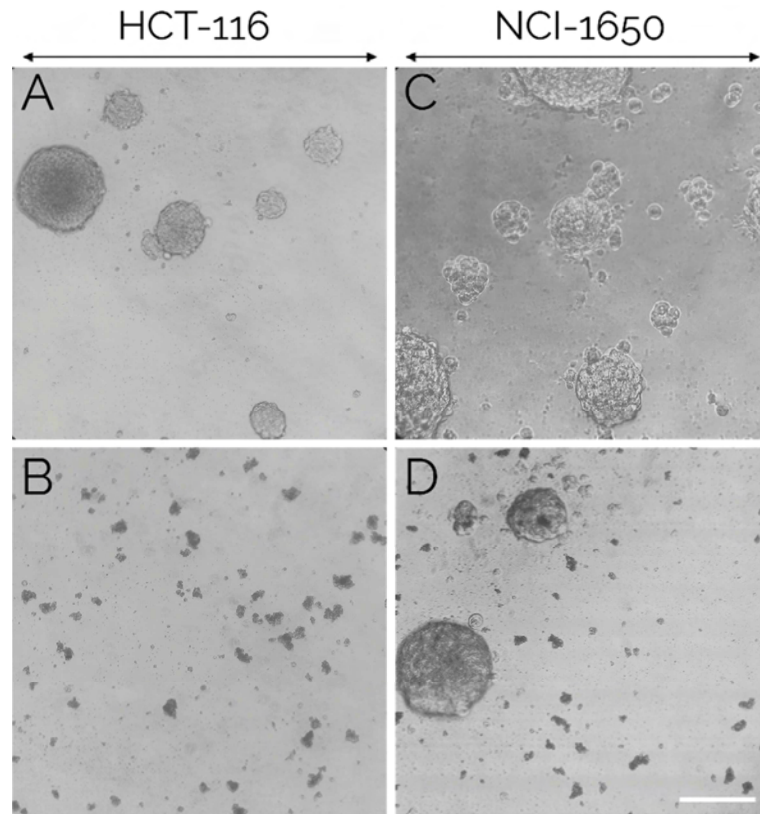


Figura 5.5. Efecto del *P. decumanum* en tumoresferas secundarias derivadas de HCT-116 y NCI-1650 a las 72 h de tratamiento. Esferas de segunda generación después de 72h de tratamiento: control (A, C) y tratadas con el extracto de *P. decumanum* a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Nótese la clara disgregación de las esferas, sobre todo en la línea HCT-116. Barra de escala, $100 \mu\text{m}$.

Se representaron las curvas de inhibición y se calcularon las IC₅₀ para cada una de las líneas celulares estudiadas. La comparación de los valores de IC₅₀ derivan de la **Figura 5.6** y se recogen en la gráfica de la **Figura 5.7**. La incubación de las células con el extracto resultó en un decrecimiento dosis-dependiente de la viabilidad celular para todas las líneas.

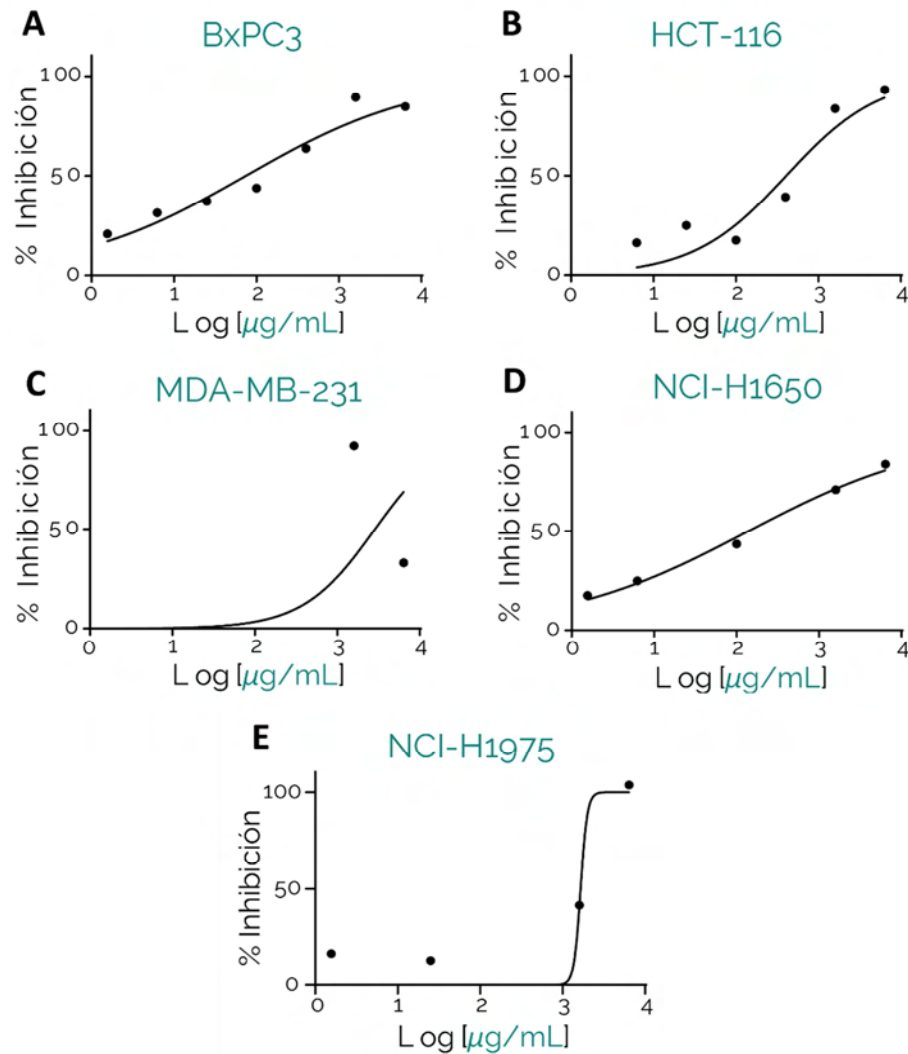


Figura 5.6. Curvas sigmoideas de dosis-respuesta. Se representan las gráficas de inhibición de la viabilidad celular para las CMCs de las siguientes líneas tumorales: BxPC3, HCT-116, MDA-MB-231, NCI-H1650 y NCI-1975 (A, B, C, D y E) en presencia de *P. decumanum*. Las esferas primarias fueron tratadas con diferentes concentraciones ($0 - 6.4 \text{ mg mL}^{-1}$) durante 72 h de tratamiento. Pasado ese tiempo, se obtuvieron las esferas de segunda generación y la viabilidad celular se midió mediante un ensayo de CCK-8. Los datos se expresan como la media de 3 determinaciones de 4 réplicas diferentes.

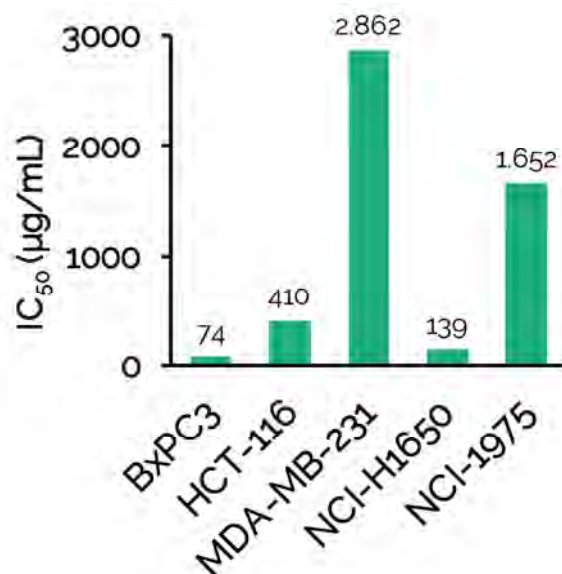


Figura 5.7. Valores IC_{50} derivados de las gráficas de inhibición de las líneas estudiadas en presencia de *P. decumanum* tras tratar las CMCs de las esferas de primera generación durante 72h.

De las experiencias realizadas, se concluye que *P. decumanum* posee un potente efecto citotóxico sobre las células madre de cáncer de páncreas BxPC3 y de cáncer de pulmón NCI-H1650. En la línea celular BxPC3 se observó el mayor efecto en inhibir la supervivencia celular con una IC_{50} de $74.04 \mu\text{g mL}^{-1}$ mientras que en NCI-H1650 la IC_{50} fue ligeramente mayor ($IC_{50} = 139.2 \mu\text{g mL}^{-1}$). El extracto de *P. decumanum* también mostró tener un efecto moderado de inhibición de la viabilidad sobre las células madre de la línea de cáncer de colón (HCT-116) con una IC_{50} de $409.6 \mu\text{g mL}^{-1}$. Como puede observarse en la **Figura 5.6.B**, la curva sigmoidea no se ajusta adecuadamente, por lo que es aconsejable repetir el experimento con un rango de concentraciones más amplio. Finalmente, en el caso de la línea de cáncer de mama (MDA-MB-231) y de pulmón a un estadio más avanzado (NCI-1975) no se observó un efecto citotóxico significativo, pues las IC_{50} calculadas son muy altas, $2.86 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $1.65 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Por

este motivo, se prescindir de estas líneas en los experimentos posteriores, y continuar con las líneas que mostraron mejor respuesta al tratamiento.

4.2.2. Evaluación de la citotoxicidad de las fracciones sobre las CMCs

La capacidad de reducir la proliferación de todas las fracciones se comparó con el extracto entero a las mismas concentraciones. Los valores IC₅₀ obtenidos mostraron notables diferencias de sensibilidad, tanto entre las fracciones como respecto al extracto completo. En la **Figura 5.3** se representa el porcentaje de viabilidad celular tras el tratamiento a tres concentraciones (6.25, 25 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). El tratamiento con el extracto exhibió resultados similares para las líneas ensayadas y mostró un nivel similar de inhibición que la fracción 1, sin diferencias significativas. La fracción 2 exhibió mayor capacidad para reducir la viabilidad celular que EXPLY37, mostrándose diferencias significativas a la concentración más alta (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Además, la actividad antiproliferativa/citotóxica de esta fracción fue más alta en HCT-116 en comparación con la línea NCI-H1650. Cabe destacar, que el efecto es claramente dependiente de la concentración (efecto dosis-respuesta) para ambas líneas celulares

No obstante, considerando las IC₅₀ calculadas para ambas líneas, las esferas HCT-116 y NCI-H1650 fueron mucho menos sensibles a la Fracción 1 aislada (IC₅₀=2.95 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 1.82 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) que al extracto de *P. decumanum* completo. En contraste, las CMCs HCT-116 y NCI-H1650 fueron considerablemente más sensibles que el extracto a las 72 h de tratamiento mostrando valores de IC₅₀ 11,8 y 1,92 veces inferiores (IC₅₀=34.64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 72.48 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Los resultados obtenidos, sugieren que la Fracción 2 es la fracción activa, rica en los compuestos bioactivos y la principal responsable del

efecto inhibitorio de la proliferación del extracto de *P. decumanum*. Además, puede decirse que este efecto es dependiente de la concentración, ya que se observa un evidente efecto dosis-respuesta de esta fracción en ambas líneas tumorales (Figura 5.8).

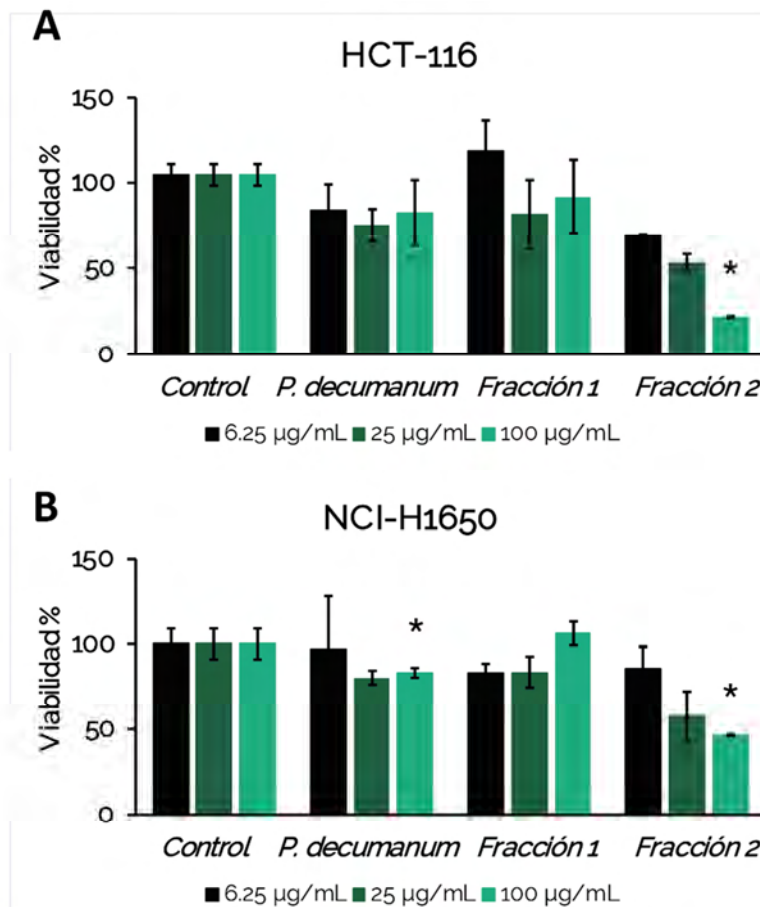


Figura 5.8. Efectos de *P. decumanum* y sus fracciones aisladas sobre la viabilidad celular de esferas de segunda generación de dos líneas cancerígenas de colon y de pulmón, HCT-116 y NCI-H1650, respectivamente. Se representan las células tratadas a las concentraciones de 6.25, 25 y 100 µg mL⁻¹ durante 72 h. Después del tratamiento, la viabilidad se midió mediante un ensayo CCK8. Los valores se representan como el porcentaje de células viables (el 100% de viabilidad corresponde a las células no tratadas del control). Los datos se expresan como la media de 4 replicados por triplicado ± SEM. * (p < 0.01) indica diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo control.

Resultados de citotoxicidad semejantes se obtuvieron en la evaluación del efecto de las subfracciones F2.1 y F2.2 en estas líneas celulares. Así, en la línea NCI-H1650 los valores de IC_{50} encontrados fueron de $689.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $499.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ para F2.1 y F2.2, muy similares a los obtenidos tras el tratamiento con el extracto de *P. decumanum* completo. Estos datos sugieren que podrían tener una actividad sinérgica ya que su acción conjunta (Fracción 2) genera un efecto superior al que se consigue con la suma de los efectos individuales de cada subfracción.

4.2.3. Fitocompuestos con actividad biológica presentes en *P. decumanum*

El estudio de la composición química del extracto desarrollado previamente en el **capítulo II de la tesis doctoral**, nos ha permitido identificar los posibles principios activos responsables de la inhibición de las CMCs manifestado por *P. decumanum*. La caracterización de los compuestos fue realizada mediante HPLC–ESI/MS (QTOF) en modo de ionización positivo y negativo. Los ensayos biológicos indican que estos fitoquímicos se encuentran en la fracción 2 y, por tanto, aparecen en el cromatograma de la “huella dactilar” del extracto a partir del minuto 27. Entre estos compuestos son de interés aquellos que han mostrado poseer una capacidad comprobada para inhibir el crecimiento de células cancerosas y formación de tumores en varios tipos de cáncer. Estos son: quercetina, rutina, ácido isoclorogénico A, kaempferol, luteolina y nicotiflorina. La mayoría de estos fitoquímicos actúan interfiriendo con las vías de señalización implicadas en la patogénesis del cáncer. Sin embargo, dado que la hipótesis de las células madre del cáncer se ha propuesto recientemente, existen pocos estudios sobre el efecto de éstos en las células madre del cáncer.

A. Quercetina. Uno de los candidatos es la quercetina (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one), un flavonol que se encuentra de forma frecuente en frutas y vegetales (como té, uvas, tomates, etc.) y que posee una potente actividad antioxidante debida a los grupos funcionales de su estructura. Ha sido identificada en *P. decumanum*, tanto como molécula aislada como fragmento de otras moléculas de mayor masa molecular, como es la rutina. Se trata de uno de los compuestos naturales más estudiados como agente contra las células madre en el cáncer, por lo que algo se conoce de su mecanismo de acción.

Los efectos de la quercetina (sola o en combinación con sulforafano, del grupo de isocianato dentro de los organosulfurados), han sido estudiados sobre CMCs pancreáticas tanto *in vivo* como *in vitro*. *In vitro* se ha visto que es capaz de disminuir la formación de colonias y la actividad ALDH1 (marcador celular de CMCs) (Zhou et al., 2010). Este efecto se debe a que la quercetina actúa inhibiendo la vía de señalización Wnt / β -Catenina de estas células, considerada una de las vías de señalización esenciales para la autorrenovación (Escarpa and Ninfali, 2015; Cianciosi et al., 2018). El estudio *in vivo* mostró que redujo el crecimiento de las CMCs en ratones con xenoinjertos al inducir la autofagia e inhibir la angiogénesis (Srivastava et al., 2011).

La quercetina también ha mostrado ejercer una acción inhibitoria sobre el cáncer de colon. Por ejemplo, se ha demostrado que tiene un fuerte efecto citotóxico, antioxidante y apoptótico sobre células de la línea de colon HCT-116 (Sezer et al., 2019). Por otro lado, Vadde y colaboradores, estudiaron los efectos de un extracto, *trifala churna*, muy rico en compuestos fenólicos (principalmente quercetina) sobre

células madre aisladas de esta misma línea tumoral. *Trifala churna* es una formulación de tres frutas conocidas como “ciruelas myrobalan” utilizada extensamente en el sistema de medicina indio, Ayurveda, para el tratamiento de desórdenes del sistema gastrointestinal, cardiovascular. Además, se ha demostrado que inhibe el crecimiento del cáncer de estómago, páncreas y timo en ratones. El extracto es capaz de inducir apoptosis en las CMCs, como lo demuestra el incremento del nivel de PARP y la ratio Bax/Bcl2. Además de la activación de la vía apoptótica también demostró un descenso en la expresión de genes clave de la vía Wnt (c-Myc y Ciclina D) (Vadde et al., 2015).

B. Rutina. Otro compuesto polifenólico con actividad anticancerígena publicada es la rutina (*3-ramnosil-glucosilquercetina*). Con ión precursor a m/z 609.1456, ha sido caracterizada en el extracto de *P. decumanum* y corresponde a los picos del cromatograma que aparecen a los tiempos de retención de 27.22 y 27.44 min (picos 104 y 108). La rutina, también llamada rutósido, quercetin-3-rutinósido y soforina, es un glucósido flavonoide encontrado en algunas plantas. Se forma por el enlace entre el disacárido rutinosa y el grupo hidroxilo de la quercetina.

Se ha visto que ejerce efectos tóxicos *in vitro* sobre líneas celulares cancerosas, incluidas las células de cáncer de colon humano (Kuntz et al., 1999; Nafees et al., 2018), así mismo *in vivo* ha mostrado tener también actividad antitumoral y antiangiogénica (Alonso-Castro et al., 2013). Además de exhibir efectos antiinflamatorios y antioxidantes, la rutina ejerce un efecto quimiopreventivo sobre las células cancerosas al detener el ciclo celular (en las fases G2/M y G0/G1) y promoviendo la apoptosis, a la vez que es capaz de inhibir la proliferación, la

angiogénesis y la metástasis (Asfour and Mohsen, 2018). Asimismo, es buen agente adjuvante, ya que es capaz de incrementar la citotoxicidad de los fármacos quimioterapéuticos convencionales, como se ha visto contra el cáncer de mama (Iriti et al., 2017).

Algunos extractos de plantas como *Nelumbo nucifera* Gaertn (Nymphaeaceae), *Croton lechleri* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) y *Phoradendron serotinum* (Raf.) M. C. Johnst. (Viscaceae), han mostrado efectos antitumorales *in vivo*, siendo la rutina es uno de sus mayores componentes. Por tanto, es probable que los efectos anticancerígenos de estas plantas puedan deberse a la acción de la rutina (Alonso-Castro et al., 2013).

C. Ácido isoclorogénico A. El ácido isoclorogénico (*ácido 3,5-di-O-cafeoilquinico*) es un diéster carboxílico derivado del ácido quínico y del ácido trans-cafeico. En el análisis MS/MS, dos picos (m/z 515.1190) fueron asignados en el extracto como isómeros de este ácido hidroxicinámico. Tiene un rol como metabolito, y ha demostrado ser un agente antioxidante, antiinflamatorio, hepatoprotector y antineoplásico (National Center for Biotechnology Information, 2019).

En un estudio *in vivo*, Abdel-Rahman y colaboradores investigaron el efecto de un extracto de *Eruca sativa*, muy rico en polifenoles y en ácido isoclorogénico A, durante la carcinogénesis inducida en las glándulas mamarias. El tratamiento con el extracto redujo la inflamación y la proliferación celular, a la vez que incrementó la apoptosis de las células cancerosas y disminuyó volumen del tumor (Abdel-Rahman et al., 2015). Estos efectos se relacionaron con los resultados bioquímicos ya que provocó una disminución en la expresión

de factor nuclear kappa B (NF-κB), un factor de transcripción que regula la expresión de genes involucrados en la proliferación, adhesión, angiogénesis, apoptosis, carcinogénesis y en la inflamación (Abdel-Rahman et al., 2015). Se sabe que el bloqueo de NF-κB causa la muerte de las células del tumor, previene de su proliferación e incrementa su respuesta al tratamiento (Escarcega et al., 2007; Xia et al., 2014).

D. Kaempferol y luteolina. El kaempferol (3,4', 5,7-tetrahidroxiflavona) y la luteolina (3',4',5,7-tetrahidroxiflavona) son dos de los flavonoides más comunes y abundantes en vegetales, hierbas medicinales y frutas. Son dos tetrahidoxiflavonas que se diferencian únicamente en la posición de uno de los grupos hidroxilo. Al igual que la quercetina, están presentes en el extracto de *P. decumanum*, bien de forma aislada o unidos a residuos de azúcar formando estructuras más complejas.

Estos compuestos han demostrado poseer actividad antineoplásica en modelos cancerígenos experimentales, en multitud de tipos de cáncer humano, incluyendo el cáncer de páncreas, pulmón y colon. De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo. Bloquean el desarrollo del cáncer *in vitro* e *in vivo* mediante la inhibición de la proliferación de las células tumorales, la inducción de la apoptosis a través de diferentes vías de señalización, el arresto del ciclo celular, el bloqueo de la angiogénesis y la metástasis, y protegiendo del estímulo carcinogénico. Además, pueden revertir la resistencia a múltiples fármacos en una variedad de células tumorales (Lin et al., 2008; Chen et al., 2013; Tuorkey, 2016; Budisan et al., 2019).

En relación a las células madre cancerígenas solo unos pocos trabajos han sido publicados hasta la fecha. Por ejemplo, se ha visto

que la luteolina es capaz de bloquear el fenotipo de célula madre cancerosa en el cáncer de mama (Cook et al., 2015) en el carcinoma oral de células madre escamosas (Tu et al., 2016) y en el cáncer de próstata (Tsai et al., 2016). A través de la inhibición de la vía de señalización IL-6/Stat3 en cáncer oral y la vía JNK en el cáncer de próstata, la luteolina fue capaz atenuar la habilidad de auto-renovación y reducir los marcadores característicos de ambas subpoblaciones de células madre (Tsai et al., 2016). Yi y colaboradores, evaluaron *in vitro* la actividad antitumoral de diversos polifenoles extraídos de las piñas de *Pinus Koraiensis*, entre los que se incluyen el kaempferol y la luteolina. Sus resultados mostraron que poseían un fuerte efecto antiproliferativo sobre la línea de células madre cancerosas de colon humano, LOVO, de una manera dependiente de concentración (Yi et al., 2015).

Todos estos hallazgos son evidencias de que compuestos bioactivos derivados de diferentes fuentes vegetales pueden actuar, directa o indirectamente, en las vías moleculares dirigidas exactamente a la pequeña subpoblación de células madre dentro del tumor, responsable de resistencia, recurrencia y metástasis.

4.2.4. *P. decumanum*: potencial terapéutico contra el cáncer

El presente trabajo constituye el primer estudio en el que se ha demostrado que determinados polifenoles que componen el extracto de *P. decumanum* son capaces de interferir con la autorrenovación y la proliferación de las células madre cancerígenas derivadas de tres tipos de cáncer humano.

La hipótesis de las células madre del cáncer explica el fracaso final de la quimioterapia. Los tumores destruidos por la quimioterapia pueden ser repoblados por células madre cancerosas, que son altamente resistentes a los medicamentos a través de una variedad de mecanismos. Como tal, la quimioterapia exitosa y la prevención del cáncer deben dirigirse no solo a las células tumorales diferenciadas que constituyen la mayor parte del tumor, sino también a las células madre cancerosas.

Por otro lado, los medicamentos anticancerosos sintéticos que se utilizan actualmente son a menudo altamente tóxicos para órganos sanos, debilitan el sistema inmunitario del paciente y/o no destruyen la totalidad de células madre cancerosas, por lo que el tumor termina reapareciendo.

En este contexto, *P. decumanum* representa, una fuente importante de moléculas con posibles aplicaciones terapéuticas, dada su potencial acción inhibitoria sobre células madre cancerosas. Estos fitoquímicos, o bien el extracto completo, podrían ser usados para el desarrollo de nutracéuticos o adyuvantes que, en combinación con otros tratamientos como la quimioterapia y la radioterapia, sean de gran ayuda en la mejora del pronóstico del cáncer y de la calidad de vida del paciente.

5. CONCLUSIONES

De los resultados del estudio realizado en el presente capítulo V de la Tesis Doctoral se han obtenido las siguientes conclusiones:

- I. El presente trabajo representa el primer estudio *in vitro* realizado sobre un extracto de frondes de *P. decumanum* y su potencial efecto inhibidor de células madre de varios tipos de cáncer.
- II. Se ha desarrollado un método cromatográfico semi-preparativo que ha permitido la separación y el aislamiento de los diferentes componentes del extracto en función de sus tiempos de retención, y con ello, de la polaridad. Las fracciones obtenidas fueron ensayadas, al igual que el extracto completo, sobre esferas de segunda generación de células madre aisladas de cáncer de páncreas, pulmón, mama y colon.
- III. En nuestro sistema modelo, el extracto de *P. decumanum* mostró un potente efecto anti-proliferativo en células madre de cáncer de páncreas (BxPC3) y pulmón (NCI-H1650), y un efecto moderado en el cáncer de colon (HCT-116). Sin embargo, no se observó inhibitorio de la supervivencia celular en las esferas de cáncer de mama (MDA-MB-231) y de cáncer de pulmón (NCI-1975). Los ensayos de viabilidad celular, las IC50 calculadas y las observaciones al microscopio de la morfología y tamaño de las esferas realizadas en este estudio evidencian estos resultados.
- IV. La potencial capacidad de *P. decumanum* para atacar las células madre cancerosas podría fundamentarse en el alto contenido de fitoquímicos, polifenoles y flavonas, que han demostrado tener efecto anticancerígeno, al interferir en las vías de señalización de células

tumorales y, recientemente contra las células madre del tumor. Determinados polifenoles que componen el extracto serían capaces de interferir con la autorrenovación y la proliferación de las células madre cancerígenas, de acuerdo con la información reportada por otros investigadores.

- V. Se ha demostrado, que los compuestos responsables de la actividad antitumoral de *P. decumanum* se encuentran en la fracción 2 aislada del extracto. El estudio de la caracterización de los componentes del extracto realizado previamente mediante HPLC–ESI/MS (QTOF) ha permitido la identificación tentativa de los posibles principios activos causantes de esta actividad dirigida sobre las células madre cancerosas.
- VI. Las potenciales propiedades antitumorales de *P. decumanum* y de los componentes de sus hojas observados en este estudio preliminar, destacan el interés de esta planta ya que, una vez comprobada la repetitividad de los experimentos, podría ser utilizado como estrategia terapéutica en la mejora del tratamiento del cáncer.
- VII. Finalmente, los hallazgos de este estudio incentivan una investigación futura más profunda con el fin de definir mejor el papel desempeñado por *P. decumanum* y sus moléculas bioactivas en la terapia del cáncer humano. Es necesario comparar los efectos anticancerígenos de los fitoquímicos naturales con los productos sintéticos y, además, comprender las vías de señalización que rigen la autorrenovación y la supervivencia de las CMCs, para poder conocer las dianas moleculares de estos compuestos en el proceso de cancerogénesis.

6. REFERENCIAS

- Abdel-Rahman, S., Shaban, N., Haggag, A., Awad, D., Bassiouny, A., Talaat, I. (2015). Inhibition of NF- κ B, Bcl-2 and COX-2 gene expression by an extract of *Eruca sativa* seeds during rat mammary gland carcinogenesis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 16(18), 8411-8418.
- Alonso-Castro, A.J., Domínguez, F., García-Carrancá, A. (2013). Rutin exerts antitumor effects on nude mice bearing SW480 tumor. *Archives of Medical Research* 44(5), 346-351.
- Araujo, J.R., Goncalves, P., Martel, F. (2011). Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutrition Research* 31(2), 77-87.
- Asfour, M.H., Mohsen, A.M. (2018). Formulation and evaluation of pH-sensitive rutin nanospheres against colon carcinoma using HCT-116 cell line. *Journal of Advanced Research* 9, 17-26.
- ATCC, American Type Culture Collection. Consulta: 16/11/19 <http://www.lgcstandards-atcc.org/>
- Budisan L., Gulei, D., Jurj, A., Braicu, C., Zanoaga, O., Cojocneanu, R., Pop, L., Raduly, L., Barbat, A., Moldovan, A., Moldovan, C., Tigu, A.B., Ionescu, C., Atanasov, A.G., Irimie, A., Berindan-Neagoe, I. (2019). Inhibitory effect of CAPE and kaempferol in colon cancer cell lines—possible implications in new therapeutic strategies. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 1199.
- CCL, Cancer Cell Line Encyclopedia, the Broad Institute of MIT and Harvard. Consulta: 16/11/19. <https://portals.broadinstitute.org/ccl>
- Chen, A.Y., Chen, C.C. (2013). A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chemistry* 138, 2099-2107.

- CiAnciosi, D., Varela-López, A., Forbes-Hernández, T.Y., Gasparriani, M., Afrin, A., Reboredo-Rodríguez, P., Giamperi, F. (2018). Targeting molecular pathways in cancer stem cells by natural bioactive compounds. *Pharmacological Research* 135, 150-165.
- Cook, M.T., Liang, Y., Besch-Williford, C., Goyette, S., Mafuvadze, B., y Hyder, S.M. (2015). Luteolin inhibits progestin-dependent angiogenesis, stem cell-like characteristics, and growth of human breast cancer xenografts. *SpringerPlus* 4, 444.
- ECACC, European Collection of Authenticated Cell Cultures, Operated by Public Health England. Consulta: 30/10/2019. <https://www.phe-culturecollections.org.uk/>
- Escarcega, R.O., Fuentes-Alexandro, S., García-Carrasco, M., Gatica, A., Zamora, A. (2007). The transcription factor nuclear factor-kappa B and cancer. *Clinical Oncology (R Coll Radiol)* 19, 154-161.
- Gridling, M., Stark, N., Madlener, S., Lackner, A., Popescu, R., Benedek, B., Krupitza, G. (2009). *In vitro* anti-cancer activity of two ethnopharmacological healing plants from Guatemala *Pluchea odorata* and *Phlebodium decumanum*. *International Journal of Oncology* 34, 1117-1128.
- Iriti, M., Kubina, R., Cochis, A., Sorrentino, R., Varoni, E.M., Kabala-Dzik, A., Wojtyczka, R.D. (2017). Rutin, a quercetin glycoside, restores chemosensitivity in human breast cancer cells. *Phytotherapy Research* 31, 1529-1538.
- Kuntz, S., Wenzel, U., Daniel, H. (1999). Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *European Journal of Nutrition* 38(3), 133-42.
- Lin, Y., Shi, R., Wang, X., Shen H.M. (2008). Luteolin, a flavonoid with potentials for cancer prevention and therapy. *Current Cancer Drug Targets* 8(7), 634-646.

- Nafees, S., Mehdi, S.H., Zafaryab, M., Zeya, B., Sarwar, T., Rizvi, M.A. (2018). Synergistic interaction of rutin and silibinin on human colon cancer cell line. *Archives of Medical Research* 49(4), 226-234.
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. 3,5-Dicaffeoylquinic acid, CID=6474310. Acceso: 30/10/2019 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3,5-Dicaffeoylquinic-acid>
- Scarpa, E.S., Ninfali, P. (2015). Phytochemicals as innovative therapeutic tools against cancer stem cells. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 15727-15742.
- Sezer, E.D., Oktay, L.M., Karadadas, E., Memmedov, H., Gunel, N.S., Sözmen, E. (2019). Assessing anticancer potential of blueberry flavonoids, quercetin, kaempferol, and gentisic acid, through oxidative stress and apoptosis parameters on HCT-116 Cells. *Journal of Medicinal Food* 22 (11).
- Srivastava, R.K. Tang, S.N.; Zhu, W. Meeker, D., Shankar, S. (2011). Sulforaphane synergizes with quercetin to inhibit self-renewal capacity of pancreatic cancer stem cells. *Frontiers in Bioscience* 3, 515-528.
- Tourkey, M.J. (2016). Molecular targets of luteolin in cancer. *European Journal of Cancer Prevention* 25 (1), 65-76.
- Tu, D.G., Lin, W.T., Yu, C.C., Lee, S.S., Peng, C.Y., Lin, T., Yu, C.H. (2016). Chemotherapeutic effects of luteolin on radio-sensitivity enhancement and interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 signaling repression of oral cancer stem cells. *Journal of the Formosan Medical Association* 115, 1032-1038.
- Tsai, P.H., Cheng, C.H., Lin, C.Y., Huang, Y.T., Lee, L.T., Kandaswami, C.C., Lee, M.T. (2016). Dietary flavonoids luteolin and quercetin suppressed cancer stem cell properties and metastatic potential of isolated prostate cancer cells. *Anticancer Research* 36, 6367-6380.

- Vadde, R., Radhakrishnan, S., Reddivari, L., y Vanamala, J.K. (2015). Triphala extract suppresses proliferation and induces apoptosis in human colon cancer stem cells via suppressing c-Myc/Cyclin D1 and elevation of Bax/Bcl-2 ratio. *Biomed Research International* 2015, Article ID 649263, 12 pages.
- Xia, Y., Shen, S., Verma, I.M. (2014). NF- κ B, an active player in human cancers. *Cancer Immunology Research* 2(9), 823-830.
- Yi, J., Wang, Z., Nai, H., Yu, X., Jing, J., Zuo, L. (2015) Optimization of purification, identification and evaluation of the *in vitro* antitumor activity of polyphenols from *Pinus koraiensis* pinecones. *Molecules* 20, 10450-10467.
- Zhou, W., Kallifatidis, G., Baumann, B., Rausch, V., Mattern, J., Gladkich, J., Herr, I. (2010). Dietary polyphenol quercetin targets pancreatic cancer stem cells. *International Journal of Oncology* 37, 551-561.

CONCLUSIONES

Estudios de caracterización y actividad
biológica de extractos de *Phlebodium*
decumanum

- I. Se ha desarrollado y optimizado un método cromatográfico reproducible para el análisis del extracto de *Phebodium decumanum* mediante HPLC-UV-Vis (DAD) y UHPLC-PDA (DAD). Todos los parámetros que influyen en la separación cromatográfica, incluyendo la composición de la fase móvil, el gradiente de elución, la fase estacionaria y el flujo, fueron estudiados y optimizados. Esto ha permitido establecer un perfil cromatográfico “huella dactilar” representativo y característico de esta especie que puede ser utilizada como herramienta de identificación y evaluación de calidad.
- II. Además, el estudio de estabilidad señala que algunos de los fitoquímicos son termolábiles, por lo que es preferible que las disoluciones preparadas a partir del extracto se conserven congeladas (a -20°C) durante largos periodos de tiempo para asegurar su calidad y la reproducibilidad del perfil cromatográfico.
- III. Se ha determinado la composición de los componentes presentes en un extracto obtenido de hojas *Phlebodium decumanum*, mediante HPLC-ESI/M (QTOF). Se han caracterizado un total de 122 metabolitos a partir de la información de MS disponible y la información previamente reportada en la literatura científica. Entre los compuestos identificados se incluyen flavonoides, ácidos fenólicos, amino derivados, ácidos orgánicos y derivados, lignano derivados, y otros fitoquímicos que no pudieron ser asignados en ninguno de estos grupos. Dadas las propiedades terapéuticas atribuidas a *P. decumanum*, el estudio de la caracterización química podría constituir el primer paso para el descubrimiento de fitonutrientes y compuestos promotores de la salud.

- IV. Se ha desarrollado un método analítico para la determinación y cuantificación de dos esteroides, 4-androsteno-3,17-diona y 1,4-androstadieno-3,17-diona mediante GC-MS/MS en suplementos nutricionales de *P. decumanum* y alimentos de origen animal.
- V. El método implica un tratamiento previo de las muestras basado en la extracción asistida con ultrasonidos de los esteroides con acetato de etilo. El método fue satisfactoriamente validado y demostró ser veraz, preciso, selectivo y sensible.
- VI. Los esteroides estudiados fueron detectados y cuantificados tanto en las muestras de *P. decumanum* como en las muestras de alimentos a bajas concentraciones (niveles ng g^{-1}).
- VII. La administración exógena de la androstenediona y la androstadienediona está prohibida en el mundo del deporte por estar considerados como dopaje según la World Anti-Doping Agency (WADA). Sin embargo, no hay unos límites establecidos para el consumo de estos esteroides. Dado que a lo largo de este trabajo de investigación se ha demostrado que están presentes en varios alimentos de consumo habitual, deberían establecerse unos límites mínimos a partir de los cuales la detección de estos esteroides en un deportista sea considerado dopaje.
- VIII. Experimentos realizados *in vitro* han demostrado que *Phlebodium decumanum* posee una potencial capacidad moduladora de las células del sistema inmune. Se ha observado que el extracto modula la diferenciación de los linfocitos T CD4+ a linfocitos tipo Th1, al disminuir la producción de citoquinas pro-inflamatorias, como el IFN- γ . Además, atenúa la proliferación de células T activadas con el anticuerpo

anti-CD3 o mediante presentación específica de antígeno por células dendríticas. Finalmente, diversos experimentos han mostrado que el extracto modula la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en cultivos primarios de monocitos M1. por lo que los resultados obtenidos sugieren un efecto anti-inflamatorio también en monocitos. *P. decumanum* representa un prometedor agente terapéutico que ayude en desórdenes relacionados con la inflamación.

- IX. The extract of *P. decumanum* represents a promising therapeutic agent for inflammatory and related diseases. Therefore, it is of great interest to carry out a more research to identify those compounds capable of acting beneficially on the immune system.
- X. Se ha desarrollado un método de cromatografía de semi-preparativa que ha permitido la separación y el aislamiento de los diferentes componentes del extracto de *Phlebodium decumanum* en función de sus tiempos de retención, y con ello, de la polaridad. Las fracciones obtenidas fueron ensayadas, al igual que el extracto completo, sobre esferas de segunda generación de células madre aisladas de diversas líneas tumorales humanas.
- XI. En este sistema modelo in vitro, se han demostrado las propiedades anticancerígenas potenciales del extracto. Mostró tener un potente efecto antiproliferativo sobre células madre de cáncer de páncreas (BxPC3) y pulmón (NCI-H1650), y un efecto moderado en el cáncer de colon (HCT-116). Además, se ha demostrado con algunos ensayos, que los compuestos responsables de la actividad antitumoral se encuentran en la fracción 2 aislada del extracto.

XII. El estudio de la caracterización de los componentes del extracto realizado previamente mediante HPLC–ESI/MS (QTOF) ha permitido la identificación tentativa de los posibles principios activos causantes de esta actividad dirigida sobre las células madre cancerosas. Una vez comprobada la repetitividad de los experimentos, *P. decumanum* podría ser utilizado como estrategia terapéutica en la mejora del tratamiento del cáncer.

ANEXO I

Publicación



Analysis of *Phlebodium decumanum* Fronds by High-Performance Liquid Chromatography by Ultraviolet-Visible and Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry (HPLC–UV–VIS–QTOF–MS/MS)

Laura Martín-Pozo^a, Alberto Zafra-Gómez^a, Samuel Cantarero-Malagón^b, and José Luis Vilchez^a

^aResearch Group of Analytical Chemistry and Life Sciences, Department of Analytical Chemistry, University of Granada, Granada, Spain; ^bCentre for Scientific Instrumentation, University of Granada, Granada, Spain

ABSTRACT

Phlebodium decumanum (*P. decumanum*), together with other tropical ferns commonly known as Calaguala, have been empirically applied since ancient times to ameliorate inflammatory disorders, skins diseases and even cancer. There are evidences of antineoplastic potential and anti-inflammatory, immunomodulatory and antioxidant properties of the extract. Preliminary studies have also shown direct antitumor activity of the extracts. In the present article, the phytochemical composition of a hydro-ethanolic extract of *P. decumanum* is investigated using high-performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet–visible (UV–vis) diode array detection (DAD) and electrospray ionization (ESI) quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (QTOF–MS/MS) detection. First, the chromatographic profile is established as a representative fingerprint of the compounds extracted from the fern. Then, a total of 122 chemicals, including 23 flavonoids, 47 phenolic acids (34 hydroxycinnamic acids and 13 hydroxybenzoic acids), 9 amino and amino-sugar derivatives, 24 organic acids and their derivatives, and other metabolites, have been characterized. Moreover, 12 unknown compounds were also detected, providing the first comprehensive characterization available on the phytochemical composition of the leaves of *P. decumanum*.

ARTICLE HISTORY

Received 14 December 2018
Accepted 11 March 2019

KEYWORDS

Active compounds; electrospray ionization; diode array detection; high performance liquid chromatography; *Phlebodium decumanum*; phytochemical profile; ultraviolet-visible spectroscopy; quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry

Introduction

Phlebodium decumanum (*P. decumanum*) and related tropical ferns, species of the *Polypodium* genus (also known as *Calaguala* in some Spanish-speaking countries) have a long history of empirical use in parts of Central and South America as an herbal medicine for a variety of conditions related to inflammatory processes, dermatological disorders and even cancer (Ruiz 1805; Liu et al. 1998; Yesares Ferrer et al. 2001; Gattuso, Amalia, and Gattuso 2008; González-Jurado et al. 2008).

CONTACT Alberto Zafra-Gómez  aazafra@ugr.es  Department of Analytical Chemistry, University of Granada, Granada E-18071, Spain.

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/lanl.

- Wen, J., L. Kang, L. Huan, Y. Xiao, X. Zhang, and Y. Chen. 2012. A validated UV–HPLC method for determination of chlorogenic acid in *Lepidogrammitis drymoglossoides* (Baker) Ching, Polypodiaceae. *Pharmacognosy Research* 4 :148–53. doi:10.4103/0974-8490.99076.
- WHO. 1991. Guidelines for the Assessment of Herbal Medicine, World Health Organization, Munich, Germany, p. 2, https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/58865/WHO_TRM_91.4.pdf (accessed March 05, 2019).
- Yesares Ferrer, M., J. A. Mendoza Medina, G. M. Ruiz Cáceres, A. Alcaide García, and E. Yesares Morillas. 2001. Water-soluble fractions of *Phlebodium decumanum* and its use as nutritional supplement in aids and cancer patients. United States Invention Patent, US 6,228,366. Helsint, S.A.L.

Manuscript Number: HERMED-D-19-00835

Title: Anti-neuroinflammatory effect of an extract of *Phlebodium decumanum* on lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells

Article Type: Case report

Keywords: Herbal medicine; Active compounds; Anti-neuroinflammation; Microglial cells; Nitric oxide

Corresponding Author: Dr. Alberto Zafra-Gómez, PhD

Corresponding Author's Institution: University of Granada

First Author: Laura Martín-Pozo, Ph.D. Student

Order of Authors: Laura Martín-Pozo, Ph.D. Student; Miguel Angel Cuadros, Ph.D.; José Luís Vilchez, Ph.D.; Alberto Zafra-Gómez, PhD

Abstract: *Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm. (*P. decumanum*) and other tropical ferns commonly known as Calaguala have been traditionally used as an herbal medicine by the indigenous people of Honduras. The present communication investigates the effect of *P. decumanum* extract on BV2 microglial cells activated with lipopolysaccharide (LPS). The activation level of BV2 cells was determined by quantifying the presence of nitric oxide (NO) in the culture supernatant by the Griess reaction. The expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) was visualized by immunofluorescence. The extract significantly attenuated, in a dose-dependent manner, NO production and iNOS expression induced by LPS. Our results provide the first comprehensive in vitro evidence of its anti-neuroinflammatory properties. Thus, *P. decumanum* extract represents a promising therapeutic agent for neurodegenerative and related inflammatory diseases.

Suggested Reviewers: Yuva Bellik Ph.D.

Professor, Laboratory of Research on Local Animal Products, Ibn-Khaldoun University of Tiaret, Algeria

bellik_youva@yahoo.fr

Expert in the field of the paper. Cited in the references.

Sigal Fleisher-Berkovich Ph.D.

Professor, Department of Clinical Biochemistry and Pharmacology, Ben-Gurion University of the Negev, Beersheba, Israel

fleisher@bgu.ac.il

Expert in the field of the paper. Cited in the references.

David Arraez Ph.D.

Researcher, Functional Food Research and Development Center (CIDAF), Health Science Technological Park, PTS Granada, Spain

darraez@cidaf.es

Prof. Arraez is expert in the determination of biological activities in natural extracts from plants. He has published similar studies to the one presented in this investigation.

ANEXO II

Otras Publicaciones

En este Anexo se recogen otros trabajos de investigación desarrollados y publicados a lo largo de estos años, que aunque no son parte de la línea de investigación de la presente tesis, si han ayudado a mi formación como investigadora.



Analytical methods for the determination of emerging contaminants in sewage sludge samples. A review



Laura Martín-Pozo^{a,1}, Blanca de Alarcón-Gómez^{a,1}, Rocío Rodríguez-Gómez^a,
María Teresa García-Córcoles^a, Morsina Çipa^b, Alberto Zafra-Gómez^{a,*}

^a Research Group of Analytical Chemistry and Life Sciences, Department of Analytical Chemistry, University of Granada, Campus of Fuentenueva, E-18071 Granada, Spain

^b Department of Chemistry, University of Tirana, St. Bulevardi "Zogu I", 1001 Tirana, Albania

ARTICLE INFO

Keywords:

Emerging contaminants
Sewage sludge
Sample treatment
Chromatography
Mass spectrometry

ABSTRACT

Emerging contaminants are a heterogeneous group of chemicals that includes daily personal care products and pharmaceuticals (PPCPs), flame retardants, endocrine disrupting chemicals (EDCs) and nanoparticles (NPs). The present work is an overview focused in the research published in the scientific literature for the determination of this type of pollutants in sewage sludge samples in the last 5 years. Instrumental and sample preparation methods for the detection and quantification of the analytes of interest are reviewed, with an emphasis on the sample treatment techniques. Liquid chromatography (LC) and gas chromatography (GC) coupled to mass spectrometry are generally employed as the analytical technique of preference. Sample preparation techniques include conventional methods such as Soxhlet, solid-phase extraction (SPE), pressurized liquid extraction (PLE) or ultrasound-assisted extraction (UAE), but also other recent techniques, including novel microextraction techniques such as microextraction by packed sorbent (MEPS) or solid-phase microextraction (SPME).

1. Introduction

In recent years, continuous industrial development has propitiated the generation of a wide variety of new chemicals applied in daily anthropogenic practices. These substances, which range from organic and inorganic compounds to nanoparticles, are considered to be pollutants and represent a cause of concern for society [101]. A number of

families of compounds, such as pharmaceuticals and personal care products (PPCPs), flame retardants, nanoparticles or endocrine disrupting chemicals (EDCs) among many substances, form this heterogeneous group, often referred as "emerging contaminants". These substances are ubiquitous and present potential risks to human health and the environment, although their toxicological effects are not yet fully known in many cases [134]. Research, however, has determined that

Abbreviations: ACN, acetonitrile; AOX, halogenated organic compounds; APs, alkylphenols; BFRs, brominated flame retardants; BPA, bisphenol A; BSTFA, N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide; CID, collision-induced dissociation; DAD, diode array detector; DCM, dichloromethane; DDT, dichlorodiphenyltrichloroethane; decaBDE, decabromodiphenylether; DEHP, bis(2-ethylhexyl) phthalate; ECNI, electron capture negative ion mass spectrometry; EDCs, endocrine disrupting chemicals; EI, electron ionization; ESI, electrospray ionization; EtAc, ethyl acetate; FLD, fluorescence detector; GC-HRMS, gas chromatography–high-resolution mass spectrometry; GC-LRMS, gas chromatography–low-resolution mass spectrometry; GC-MSⁿ, gas chromatography-mass spectrometry; HBCDs, hexabromocyclododecanes; HESI-II, electrospray interface heated electrospray ionization; HS-SPME, headspace solid-phase microextraction; ICP-MS, inductively coupled plasma mass spectrometry; LAS, linear alkylbenzene sulfonates; LC-MSⁿ, Liquid chromatography-mass spectrometry; LOD, limit of detection; MAE, microwave-assisted extraction; MeOH, methanol; MEPS, microextraction by packed sorbent; MRM, multiple reactions monitoring; MS, single mass spectrometry; MS/MS, tandem mass spectrometry; MSTFA, N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide; MTBSTFA, N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide; NCI, Negative chemical ionization; NPs, nanoparticles; NPEs, nonylphenol ethoxylates; NSAIDs, non-steroidal anti-inflammatory drugs; octaBDE, octabromodiphenylether; OPES, octylphenol ethoxylates; OPFRs, organophosphorus flame retardants; PBs, parabens; PBBs, polybrominated biphenyls; PBDEs, polybrominated diphenyl ethers; PCBs, polychlorinated biphenyls; PCPs, personal care products; PHWE, pressurized hot water extraction; PLE, pressurized liquid extraction; POPs, persistent organic pollutants; PPCPs, personal care products and pharmaceuticals; QuEChERS, Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged & Safe; QqLIT, hybrid triple quadrupole/linear ion trap; QqQ, triple quadrupole; ROS, Reactive oxygen species; SPE, solid-phase extraction; SPME, solid-phase microextraction; STPs, sewage treatment plants; TCC, triclocarban; TCS, triclosan; TMCS, trimethylchlorosilane; TMS, methoximated trimethylsilyl; UAE, ultrasound-assisted extraction; WWTPs, Wastewater treatment plants

* Corresponding author.

E-mail address: azafra@ugr.es (A. Zafra-Gómez).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.09.056>

Received 18 June 2018; Received in revised form 12 September 2018; Accepted 17 September 2018


Available online 19 September 2018

0039-9140/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

- [164] Y. Yu, L. Wu, Analysis of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products in sewage sludge by gas chromatography–mass spectrometry, *Talanta* 89 (2012) 258–263, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.12.023>.
- [165] X. Yu, J. Xue, H. Yao, Q. Wu, A.K. Venkatesanc, R.U. Haldenc, K. Kannan, Occurrence and estrogenic potency of eight bisphenol analogs in sewage sludge from the U.S. EPA targeted national sewage sludge survey, *J. Hazard. Mater.* 299 (2015) 733–739, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.07.012>.
- [166] X. Yuan, Z. Qiang, W. Ben, B. Zhu, J. Liu, Rapid detection of multiple class pharmaceuticals in both municipal wastewater and sludge with ultrahigh performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Environ. Sci.* 26 (2014) 1949–1959, <https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.06.022>.
- [167] L. Zeng, R. Yang, Q. Zhang, H. Zhang, K. Xiao, H. Zhang, Y. Wang, P.K.S. Lam, G. Jiang, Current levels and composition profiles of emerging halogenated flame retardants and dehalogenated products in sewage sludge from municipal wastewater treatment plants in China, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 12586–12594, <https://doi.org/10.1021/es503510q>.
- [168] K. Zhang, X. Liu, Mixed-mode chromatography in pharmaceutical and biopharmaceutical applications, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 128 (2016) 73–88, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.05.007>.
- [169] X. Zhao, Z.F. Zhang, L. Xu, L.Y. Liu, W.W. Song, F.J. Zhu, Y.F. Li, W.L. Ma, Occurrence and fate of benzotriazoles UV filters in a typical residential wastewater treatment plant in Harbin, China, *Environ. Pollut.* 227 (2017) 215–222, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.072>.
- [170] L.J. Zhou, G.G. Ying, S. Liu, J.L. Zhao, B. Yang, Z.F. Chen, H.J. Lai, Occurrence and fate of eleven classes of antibiotics in two typical wastewater treatment plants in South China, *Sci. Total Environ.* 452–453 (2013) 365–376, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.03.010>.
- [171] O. Zuloaga, P. Navarro, E. Bizkarguenaga, A. Iparraguirre, A. Vallejo, M. Olivares, A. Prieto, Overview of extraction, clean-up and detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge: a review, *Anal. Chim. Acta* 736 (2012) 7–29, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.01>.



Chromatographic Methods for the Determination of Emerging Contaminants in Natural Water and Wastewater Samples: A Review

M. T. García-Córcoles^a, R. Rodríguez-Gómez^{a,b}, B. de Alarcón-Gómez^a, M. Çipa^c, L. Martín-Pozo, J.-M. Kauffmann^b, and A. Zafra-Gómez^a 

^aDepartment of Analytical Chemistry, Research Group of Analytical Chemistry and Life Sciences, University of Granada, Granada, Spain;

^bLaboratory of Instrumental Analysis and Bioelectrochemistry, Faculty of Pharmacy, Université libre de Bruxelles, Brussels, Belgium;

^cDepartment of Chemistry, University of Tirana, Tirana, Albania

ABSTRACT

This review is devoted to analytical methods published in the scientific literature in the last 10 years for the determination of emerging contaminants in aquatic media. The article is mainly focused on sample preparation and on instrumental techniques most used for the detection and quantification of the analytes of interest. The sample preparation techniques include classical liquid–liquid extraction and solid-phase extraction, but also recent microextraction techniques such as solid-phase microextraction, stir-bar sorptive extraction, dispersive liquid–liquid microextraction, ultrasound-assisted emulsification microextraction, or microextraction by packed sorbent. Most studies focus on minimizing the number of analysis steps and on the use of the lowest amount of solvents in the sample treatment step. Liquid chromatography and gas chromatography mainly coupled to tandem mass spectrometry are usually the employed analytical techniques. A large number of multiresidue methods are being developed for the determination of several families of these compounds with only one extraction step to minimize sample handling and treatment.

KEYWORDS

Chromatography; emerging contaminants; mass spectrometry; natural water sources; sample treatment; wastewater

Introduction

Water resources are continuously degraded because of human impact in agricultural, industrial, urban, and touristic activities.^[1] High population density, urban expansion, and industrial development involve an increase in water demand. Additionally, this development involves the simultaneous risks of contamination and reduction of the available freshwater storage volume.^[2] A wide variety of substances have been identified as contaminants in water sources, such as organic and inorganic compounds, pathogens, nanoparticles (NPs), and so on.

The industrial development has generated an increase in the number of new chemicals produced and applied in daily activity representing a cause of concern for citizens, research community, and authorities. Pollution of water bodies by emerging contaminants is an ubiquitous phenomenon around the world. The main problems regarding contamination of water sources has been linked with the occurrence of specific pollutants by identifying major chemical stressors, determining emission and transport pathways, and defining solutions for the abatement of pollution-related risks and impacts.^[3] The Water Framework Directive (WFD) of the European Union (EU) requires the determination of several groups of compounds in European freshwater bodies.^[4] The assessment of such chemicals is based on the environmental risks for the health of freshwater ecosystems.^[5,6] Several

studies have been reported in the literature about the presence of anthropogenic substances in environmental water samples. However, a minority of these compounds are currently legislated or regulated from the point of view of environmental pollution.^[7–9]

Emerging contaminants cover a significant range of compounds belonging to different families of chemical species such as pharmaceuticals, personal care products, plasticizers, flame retardants, endocrine-disrupting chemicals (EDCs), and so on; their toxicological effects being relatively unknown.^[10] Pharmaceuticals are a class of emerging environmental contaminants widely used in human and veterinary medicine and essential to modern healthcare. Their potential risk to human health has prompted interest about negative impacts that may result from continuous contamination of the environment with these compounds.^[11] Polybrominated diphenylethers (PBDEs) are additive flame retardants used in a wide range of polymeric materials, such as foams, resins, and adhesives. These compounds are persistent and bioaccumulate in the environment, thus causing adverse effects in the ecosystem.^[12,13] Furthermore, PDBEs have been reported to have potential risks on human health, causing neurotoxicity and disruption of the endocrine system.^[14,15] Endocrine-disrupting chemicals are a group of synthetic and natural substances capable of altering the normal hormone function of wildlife and humans.^[9] These compounds mimic and antagonize the

- [220] Hensley, R. N.; Kerrigan, J. F.; Pang, H.; Erickson, P. R.; Grandbois, M.; McNeill, K.; Arnold, W. A. Triclosan, chlorinated triclosan derivatives, and hydroxylated polybrominated diphenyl ethers (OH-BDEs) in wastewater effluents. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* **2015**, *1*, 316–325.
- [221] Vulliet, E.; Cren-Olivé, C.; Grenier-Loustalot, M. F. Occurrence of pharmaceuticals and hormones in drinking water treated from surface waters. *Environ. Chem. Lett.* **2011**, *9*, 103–114.
- [222] Ningsun Zhou, S.; Reiner, E. J.; Marvin, C.; Helm, P.; Riddell, N.; Dorman, F.; Misselwitz, M.; Shen, L.; Crozier, P.; MacPherson, K.; et al. Development of liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry for analysis of halogenated flame retardants in wastewater. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *396*, 1311–1320.
- [223] Woudneh, M. B.; Benskin, J. P.; Wang, G.; Grace, R.; Coreen Hamilton, M.; Cosgrove, J. R. Quantitative determination of 13 organophosphorous flame retardants and plasticizers in a wastewater treatment system by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1400*, 149–155.
- [224] Papageorgiou, M.; Kosma, C.; Lambropoulou, D. Seasonal occurrence, removal, mass loading and environmental risk assessment of 55 pharmaceuticals and personal care products in a municipal wastewater treatment plant in Central Greece. *Sci. Total Environ.* **2016**, *543*, 547–569.
- [225] Langford, K. H.; Thomas, K. V. Determination of pharmaceutical compounds in hospital effluents and their contribution to wastewater treatment works. *Environ. Int.* **2009**, *35*, 766–770.
- [226] Ort, C.; Lawrence, M. G.; Reungoat, J.; Eaglesham, G.; Carter, S.; Keller, J. Determining the fraction of pharmaceutical residues in wastewater originating from a hospital. *Water Res.* **2010**, *44*, 605–615.
- [227] Silva, A. R. M.; Nogueira, J. M. F. New approach on trace analysis of triclosan in personal care products, biological and environmental matrices. *Talanta* **2008**, *74*, 1498–1504.
- [228] Schreder, E. D.; La Guardia, M. J. Flame retardant transfers from U.S. households (dust and laundry wastewater) to the aquatic environment. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 11575–11583.
- [229] Chaves, A. R.; Leandro, F. Z.; Carris, J. A.; Queiroz, M. E. C. Microextraction in packed sorbent for analysis of antidepressants in human plasma by liquid chromatography and spectrophotometric detection. *J. Chromatogr. B* **2010**, *878*, 2123–2129.
- [230] Rocha-Gutierrez, B.; Lee, W. Y. Investigation of polybrominated diphenyl ethers in wastewater treatment plants along the U.S. and Mexico border: A trans-boundary study. *Water. Air. Soil Pollut.* **2013**, *224*, 1398–1411.
- [231] Su, S.; Chen, B.; He, M.; Xiao, Z.; Hu, B. A novel strategy for sequential analysis of gold nanoparticles and gold ions in water samples by combining magnetic solid phase extraction with inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. Atom. Spectrom.* **2014**, *29*, 444–453.
- [232] Popp, M.; Hann, S.; Koellensperger, G. Environmental application of elemental speciation analysis based on liquid or gas chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry – A review. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *668*, 114–129.
- [233] Proulx, K.; Wilkinson, K. J. Separation, detection and characterization of engineered nanoparticles in natural waters using hydrodynamic chromatography and multi-method detection (light scattering, analytical ultracentrifugation and single particle ICP-MS). *Environ. Chem.* **2014**, *11*, 392–401.



Determination of endocrine disrupting chemicals in human nails using an alkaline digestion prior to ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry



Laura Martín-Pozo^a, Samuel Cantarero-Malagón^{a,b}, Felix Hidalgo^c, Alberto Navalón^a, Alberto Zafra-Gómez^{a,*}

^a Research Group of Analytical Chemistry and Life Sciences, Department of Analytical Chemistry, Campus of Fuentenueva, University of Granada, E-18071 Granada, Spain

^b Center for Scientific Instrumentation, Campus of Fuentenueva, University of Granada, E-18071 Granada, Spain

^c Department of Zoology, University of Granada, Campus of Fuentenueva, E-18071 Granada, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Endocrine disrupting chemicals
Biomonitoring
Human nails
Alkaline digestion
Ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry

ABSTRACT

Rapid industrialization has resulted in a progressive increase in human exposure to hazardous chemicals. The present work develops and validates a new method to determinate 18 endocrine disrupting chemicals (EDCs) in human nail samples. In contrast to other common biological samples, nail sampling is non-invasive and since they take several months to grow out, they are well suited for measuring and reflecting the cumulative exposure to harmful substances in the long term. A digestion of samples with a 0.04 M solution of sodium hydroxide is carried out followed by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS), working in multiple-reaction-monitoring (MRM) mode. The compounds were separated in 8 min. Multivariate optimization strategies were used for the optimization of the parameters that affects the digestion procedure. The validation was developed using a matrix-matched calibration and a recovery assay with spiked samples. The limits of detection and quantification ranged from 0.3 to 1.2 ng g⁻¹ and from 1 to 5 ng g⁻¹, respectively. Recovery rates for spiked samples were between 88% and 113% and the relative standard deviation (% RSD) was lower than 12.7% for all studied EDCs. The method was applied for the analysis of these compounds in human nail samples from volunteers. All samples tested positive for several of the analyzed EDCs.

1. Introduction

Endocrine disrupting chemicals (EDCs) have become a matter of concern over the last years. EDCs can alter the endocrine system of humans and wildlife [1]. According to the WHO, an EDC is “an exogenous substance or mixture that alters function(s) of the endocrine system and consequently causes adverse health effects in an intact organism, or its progeny, or (sub) populations” [2]. The effects on health and the mechanisms of action of these chemicals on the endocrine system have been extensively studied, with a large amount of scientific literature currently available [3–6]. Exposure to EDCs is particularly related to corticoid and/or thyroid dysfunction, alterations in the reproductive and neurological development and cancer. Reproductive alterations that might be associated with EDCs include ovarian and breast cancer, premature ovarian failure, polycystic ovary, endometriosis in women, and testicular and prostate cancer, sexual organ malfunction, and decreased fertility in men [7]. Recent findings have demonstrated a

relation between some EDCs and obesity [8].

Bisphenol A (BP-A) and analogues, parabens (PBs), perfluoroalkyl compounds (PFCs) and triclocarban (antimicrobial agent, TCC) have been selected as target compounds for this work. These chemicals are ubiquitous in products such as food and beverages, personal care products (shampoos, detergents, toothpastes, and others) and therefore in the environment [9]. BP-A is a high-production-volume chemical used in the production of polycarbonate plastic and epoxy resins [10]. Due to growing concern about the widespread use of BP-A in industrial applications, several bisphenol analogues such as BP-S, BP-F, BP-E, BP-B, BP-P, and BP-AF are being used as replacements for BP-A. These compounds are chemically similar to BP-A and also have endocrine disrupting activity [11]. Indeed, Rosenmai et al. [12] reported that BP-S and BP-F exhibited higher steroidogenic activity than BP-A. Population is constantly exposed to BPs through the consumption of beverages and food as these chemicals can migrate from polycarbonate packaging [7,10,13]. PBs are derived from *p*-hydroxybenzoic acid and are mainly

* Corresponding author.

E-mail address: azafra@ugr.es (A. Zafra-Gómez).

- compounds and a brominated flame retardant) in human hair by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 945 (2016) 95–101.
- [18] R. Rodríguez-Gómez, J. Martín, A. Zafra-Gómez, E. Alonso, J.L. Vílchez, A. Navalón, Biomonitoring of 21 endocrine disrupting chemicals in human hair samples using ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Chemosphere* 168 (2017) 676–684.
- [19] W. Liu, L. Xu, X. Li, Y.H. Jin, K. Sasaki, N. Saito, I. Sato, S. Tsuda, Human nails analysis as biomarker of exposure to perfluoroalkyl compounds, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 8144–8150.
- [20] R.J. Witorsch, Critical analysis of endocrine disruptive activity of triclosan and its relevance to human exposure through the use of personal care products, *Crit. Rev. Toxicol.* 44 (2014) 535–555.
- [21] Y. Shi, X. Liu, J. Zhang, B. Shao, Analysis of triclosan and triclocarban in human nails using isotopic dilution liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 934 (2013) 97–101.
- [22] J. Yin, L. Wei, Y. Shi, J. Zhang, Q. Wu, B. Shao, Chinese population exposure to triclosan and triclocarban as measured via human urine and nails, *Environ. Geochem. Health* 38 (2016) 1125–1135.
- [23] L.W.B. Olaniyan, N. Mkwetshana, A.I. Okoh, Triclosan in water, implications for human and environmental health, *Springerplus* 5 (2016) 1639.
- [24] A. Sukumar, Human nails as a biomarker of element exposure, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 185 (2005) 141–177.
- [25] D. Cappelle, M. Yegles, H. Neels, A.L.N. Van Nuijs, M. de Doncker, K. Maudens, A. Covaci, C.L. Crunelle, Nail analysis for the detection of drugs of abuse and pharmaceuticals: a review, *Forensic Toxicol.* 33 (2015) 12–36.
- [26] A. Alves, A. Kucharska, C. Erratico, F. Xu, E.D. Hond, G. Koppen, G. Vanermen, A. Covaci, S. Voorspoels, Human biomonitoring of emerging pollutants through non-invasive matrices: state of the art and future potential, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 4063–4088.
- [27] K. He, Trace elements in nails as biomarkers in clinical research, *Eur. J. Clin. Investig.* 41 (2011) 98–102.
- [28] C.R. Daniel, B.M. Piraccini, A. Tosti, The nail and hair in forensic science, *J. Am. Acad. Dermatol.* 50 (2004) 258–261.
- [29] A. Alves, A. Covaci, S. Voorspoels, Method development for assessing the human exposure to organophosphate flame retardants in hair and nails, *Chemosphere* 168 (2017) 692–698.
- [30] Y. Wang, Y. Zhong, J. Li, J. Zhang, B. Lyu, Y. Zhao, Y. Wu, Occurrence of perfluoroalkyl substances in matched human serum, urine, hair and nail, *J. Environ. Sci.* 67 (2018) 191–197.
- [31] J. Li, F. Guo, Y. Wang, J. Liu, Z. Cai, J. Zhang, Y. Zhao, Y. Wu, Development of extraction methods for the analysis of perfluorinated compounds in human hair and nail by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1219 (2012) 54–60.
- [32] A. Alves, G. Vanermen, A. Covaci, S. Voorspoels, Ultrasound assisted extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction (US-DLLME) - a fast new approach to measure phthalate metabolites in nails, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 6169–6180.
- [33] N. Hatambeygi, G. Abedi, M. Talebi, Method development and validation for optimised separation of salicylic, acetyl salicylic and ascorbic acid in pharmaceutical formulations by hydrophilic interaction chromatography and response surface methodology, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5995–6003.
- [34] I. Jiménez-Díaz, A. Zafra-Gómez, O. Ballesteros, N. Navea, A. Navalón, M.F. Fernández, N. Olea, J.L. Vílchez, Determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in placental tissue samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 3363–3369.
- [35] I. Jiménez-Díaz, F. Vela-Soria, A. Zafra-Gómez, A. Navalón, O. Ballesteros, N. Navea, M.F. Fernández, N. Olea, J.L. Vílchez, A new liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of parabens in human placental tissue samples, *Talanta* 84 (2011) 702–709.
- [36] Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), 2018.
- [37] Analytical Methods Committee, Is my calibration linear? *Analyst* 119 (1994) 2363–2366.

Manuscript Number: JCA-19-1718

Title: Improved method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in complex dry extracts using QuEChERS and MIP-SPE followed by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry

Article Type: VSI: IMSS&MS 2019

Keywords: Polycyclic aromatic hydrocarbons; Dry extracts; Dispersive solid phase extraction (QuEChERS); Molecularly imprinted polymer (MIP); GC-MS/MS

Corresponding Author: Dr. Alberto Zafra-Gómez, PhD

Corresponding Author's Institution: University of Granada

First Author: Antonio Garbalo-Rubio, Ph.D. Student

Order of Authors: Antonio Garbalo-Rubio, Ph.D. Student; Jorge Soto-Chinchilla, Ph.D.; Laura Martín-Pozo, Ph.D. Student; Alberto Zafra-Gómez, PhD

Abstract: A sensitive and selective method based in MIP technology has been developed for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in complex dry extracts of *Eleutherococcus senticosus*, *Salvia officinalis*, *Camellia sinensis*, *Zingiber officinale*, *Uncaria tomentosa*, *Humulus lupulus*, *Pinus sylvestris* L, *Spirulina maxima*, propolis and royal jelly. The method has been optimized and then validated using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. An additional sample treatment of the dry extracts is required because of the strong matrix effect observed in the analysis in these particular cases. This sample treatment is based on the use of MIP-SPE in addition to QuEChERS in order to eliminate interference substances that affect the adequate quantification of analytes. The method was accurately validated and the detection and quantification limits were established according to current EU Regulation. The quantification limits range from 0.2 ng g⁻¹ for benzo[a]anthracene to 0.4 ng g⁻¹ for benz[b]fluorantene and chrysene, with recoveries close to 100 % and % RSD lower than 14%. The method was satisfactorily applied to a large number of dry extracts from EU and non-EU manufacturers.

Suggested Reviewers: Morsina Cipa Ph.D.
Professor, Chemistry Department, Faculty of Natural Sciences, Tirana University
morsina.cipa@fshn.edu.al
Expert in PAHs analysis and food control.

Jose Manuel Herrero-Martínez Ph.D.
Professor, Analytical Chemistry, University of Valencia, Spain.
Jose.M.Herrero@uv.es
Expert in chromatography and food control.

Nikolaos S. Thomaidis Ph.D.

Professor, Laboratory of Analytical Chemistry, University of Athens,
Greece
ntho@chem.uoa.gr
Expert in analytical chemistry applied to food and environmental
sciences.

Opposed Reviewers:

Manuscript Number: ECOLIND-15088

Title: Common Sea Urchin (*Paracentrotus lividus*) and Sea Cucumber of the Genus *Holothuria* as Bioindicators of Pollution in the Study of Chemical Contaminants in Aquatic Media. A revision

Article Type: Review article

Keywords: Marine pollutants; Echinoderms; *Holothuria* spp.; *Paracentrotus lividus*

Corresponding Author: Dr. Alberto Zafra-Gómez, PhD

Corresponding Author's Institution: University of Granada

First Author: Martin Parra-Luna, Ph.D. Student

Order of Authors: Martin Parra-Luna, Ph.D. Student; Laura Martin-Pozo, Ph.D. Student; Felix Hidalgo, Ph.D.; Alberto Zafra-Gómez, PhD

Abstract: Currently many pollutants enter the seas and oceans as a result of anthropogenic activities such as agriculture, fishing, shipping, etc. Many of these chemical compounds cause serious damage to marine and terrestrial ecosystems because they tend to accumulate and begin their activity as pollutants once their useful cycle has ended. Therefore, there is growing concern about how to act to stop the increase in environmental pollution. Some of these compounds that began to accumulate in the environment since the last century are well known by the scientific community and are widely called persistent pollutants. This group includes polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), and heavy metals, among others. However, other compounds that have not been considered as contaminants have appeared recently. These are the so-called emerging pollutants, which involve a long list of compounds including drugs, hormones, antimicrobials, plasticizers, UV filters, etc. Through the study of different organisms, the presence of these pollutants in natural environments as well as the harmful effects they cause to the biota present in said media are being deeply investigated. Two of the aquatic model organisms used as bioindicators in the different studies for this purpose are reviewed here: the sea cucumber of the genus *Holothuria* and the common sea urchin *Paracentrotus lividus* that share the fact of being, both, edible echinoderms. This review could be used to make people aware of the damage it is causing through the irresponsible management of natural resources, so that they serve to launch a series of measures that allow recovering the original conditions of the different ecosystems.