UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y PERFIL FITOQUÍMICO DE LA SUMIDAD DE ESPINO ALBAR (*CRATAEGUS MONOGYNA* JACQ.)

ALEJANDRO JOSÉ CARRERO FERNÁNDEZ

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN FARMACIA

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y PERFIL FITOQUÍMICO DE LA SUMIDAD DE ESPINO ALBAR (*CRATAEGUS MONOGYNA* JACQ.)

Alejandro José Carrero Fernández

Diciembre de 2020

Facultad de Farmacia

TUTORES:

Mª Dolores García Giménez, Catedrática de la Universidad de Sevilla.

Rocío de la Puerta Vázquez, Profesora Titular de la Universidad de Sevilla.

TRABAJO EXPERIMENTAL

TABLA DE ABREVIATURAS

AG: ácido gálico.

CCF: cromatografía en capa fina.

CF: ácido cafeico.

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo.

ESI: ionización por electropulverización.

ET: extracto etanólico total.

FAC: fracción acuosa.

FAcOEt: fracción de acetato de etilo.

FDCM: fracción de diclorometano.

FHEX: fracción de hexano.

HDL: lipoproteína de alta densidad.

HPLC-EM: cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masa.

HRMS-MS: espectrometría de masas en tándem de alta resolución.

IT: tiempo máximo de inyección.

LDL: lipoproteína de baja densidad.

MPO: mieloperoxidasa.

NO: óxido nítrico.

RT: tiempo de retención.

RU: rutina.

TIC: corriente iónica total.

UHPLC: cromatografía líquida de ultra alta resolución.

UV: ultravioleta.

VLDL: lipoproteína de muy baja densidad.

RESUMEN

La especie *Crataegus monogyna* Jacq. o como comúnmente conocido como majuelo, espino albar o espino blanco, es una de las plantas más utilizadas en la medicina tradicional de la familia Rosaceae en las afecciones cardiovasculares. En este trabajo se analizó esta interesante especie desde un punto de vista fitoquímico.

Se obtuvo un extracto etanólico (ET) por maceración de la Sumidad con etanol de 80º y se fraccionó mediante extracción líquido-líquido con disolventes de distinta polaridad: n-hexano, diclorometano y acetato de etilo.

Se determinó la actividad antioxidante de todas las fracciones mediante la técnica de captación de radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) obteniéndose para la fracción de acetato de etilo (FAcOEt) una IC_{50} de 56,87 ± 0,05 µg/mL.

Se cuantificó el contenido total en fenoles y flavonoides para relacionar la composición química con la actividad antioxidante, siendo la FAcOEt la de mayor contenido: 338,06 ± 7,22 mg de ácido gálico (AG)/g de extracto seco y 190,07 ± 4,06 mg de rutina (RU)/g de extracto seco, respectivamente.

Por estos motivos se seleccionó la FAcOEt para su análisis fitoquímico, por cromatografía en capa fina (CCF) y posteriormente por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masa (HPLC-EM). Se lograron identificar 33 compuestos, destacando la presencia de ácidos fenoles y flavonoides. La cantidad de hiperósido, uno de los flavonoides mayoritarios, fue 1,5%.

Para la FAcOEt y la fracción de diclorometano (FDCM) se estudió la actividad antiinflamatoria en la línea celular HL60. La FAcOEt presentó mayor inhibición de la enzima mieloperoxidasa (MPO) (IC_{50}: 73,69 ± 4,09 µg/mL) con respecto a la FDCM y menor toxicidad.

Se concluye que el ET de *Crataegus monogyna* Jacq. y la FAcOEt, por su potente acción antioxidante e inhibición de la MPO, sería una fuente de moléculas bioactivas frente a la inflamación suscitada por estrés oxidativo.

Palabras claves: *Crataegus monogyna*, hiperósido, acetato de etilo, actividad antioxidante, actividad antiinflamatoria.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN 1

1.1. Perfil botánico de *Crataegus monogyna* Jacq 1

1.2. Composición química 2

1.3. Uso tradicional 4

1.4. Actividad farmacológica y usos terapéuticos 5

2. OBJETIVOS 9

3. METODOLOGÍA 10

3.1. Obtención y fraccionamiento del extracto etanólico 10

3.1.1. Recolección de la droga 10

3.1.2. Obtención y fraccionamiento del extracto etanólico 10

3.2. Estudio de la actividad antioxidante del extracto y de las fracciones obtenidas 10

3.3. Estudio fitoquímico 12

3.3.1. Estudio del extracto y de cada fracción por cromatografía en capa fina 12

3.3.2. Análisis cuantitativo de fenoles totales 14

3.3.3. Análisis cuantitativo de flavonoides totales 15

3.3.4. Perfil fitoquímico de la fracción más antioxidante mediante HPLC/EM 17

3.4. Estudio de la actividad antiinflamatoria en cultivos celulares HL60 de las fracciones más activas 18

3.4.1. Obtención de la suspensión celular y medida de la viabilidad celular 18

3.4.2. Estudio de la actividad enzimática de la enzima MPO 20

3.5. Análisis estadístico 21

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 22

4.1. Rendimiento del extracto y de las fracciones obtenidas 22

4.2. Estudio de la actividad antioxidante del extracto y de las fracciones obtenidas 22

4.3. Estudio fitoquímico 23

4.3.1. Estudio del extracto y de cada fracción por cromatografía en capa fina 23

4.3.2. Análisis cuantitativo de fenoles totales 25

4.3.3. Análisis cuantitativo de flavonoides totales.....27

4.3.4. Perfil fitoquímico de la fracción más antioxidante mediante HPLC-EM 30

4.4. Estudio de la actividad antiinflamatoria en cultivos celulares HL60 de las fracciones más activas 32

4.4.1. Estudio de la viabilidad celular 32

4.4.2. Estudio de actividad enzimática de la MPO 34

4.5. Discusión general de resultados 36

5. CONCLUSIONES 37

6. BIBLIOGRAFÍA.....38

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Perfil botánico de *Crataegus monogyna* Jacq.

Crataegus monogyna Jacq., comúnmente conocida como espino albar, espino blanco o majuelo, es una planta fanerógama perteneciente a la familia Rosaceae. Esta es una familia muy diversa que se extiende particularmente por el hemisferio norte y que incluye desde 95 a más de 100 géneros diferentes (Hummer and Janick, 2009). El espino albar es un arbusto o árbol de hasta 4 metros de altura (exceptuando algunos ejemplares de unos 8 metros), espinoso, de hoja caduca y con ramificaciones, ya sean glabras o vilosas (Cueto and Giménez, 2009).

Características botánicas de *Crataegus monogyna* Jacq.:

- Hojas caducas, rómbico-aovadas, cuneadas, con peciolo de 1-3 cm y limbo de 2-5 cm de largo, recortadas por 3-7 lóbulos profundos algo dentados (Rapoport, 2014). Son heteromorfas, simples, subcoriáceas, algo vilosas y con 1-2 dientes glandulíferos en lóbulos basales de hojas apicales de las ramillas floridas (Cueto and Giménez, 2009).
- Flores actinomorfas y hermafroditas de 5 pétalos blancos, de c. 1.5 cm de diámetro, estambres rojizos, dispuestas en corimbos de 4-11 flores terminales. Normalmente presenta 1 estilo, pero algunas flores presentan hasta 3 (Figura 1).
- Fruto rojo en pomo, elipsoideo, de 1 cm, con una semilla, aunque a veces presenta más (Rapoport, 2014) (Figura 2).

Figura 1. ***Flores de Crataegus monogyna Jacq.*** ***Figura 2.*** ***Frutos de Crataegus monogyna Jacq.***

La planta se encuentra desde el Mediterráneo y Oriente Asiático hasta Afghanistán. Es una planta ornamental típica del paisaje de Europa Central, Gran Bretaña, EE. UU., Nueva Zelanda y Argentina (no patagónica) (Rapoport, 2014).

1.2. Composición química.

El espino albar es una planta medicinal usada desde tiempos inmemoriales, razón por la cual se han realizado algunos estudios sobre su composición química.

Las flores son ricas en flavonoles y flavonas, tocoferoles, ácidos fenoles (como los ácidos clorogénico y cafeico), vitamina C y presenta una buena ratio de ácidos grasos n-6/n-3. Los frutos inmaduros contienen procianidinas y ácidos grasos poliinsaturados. En las hojas destaca la presencia de rutina, vitexina, vitexin-2''-O-α-L-ramnósido e hiperósido (1,5%-2%) (Nabavi et al., 2015) (Murray, 2013). El isómero más abundante en la planta es la (-)-epicatequina (Nabavi et al., 2015).

En cuanto a la Sumidad, los estudios realizados revelan que son las catequinas, los flavonoides y los triterpenos los compuestos mayoritarios (Nabavi et al., 2015).

Entre las primeras, los flavan-3-oles como catequina, epicatequina y sus isómeros son los mayoritarios (Figura 3).

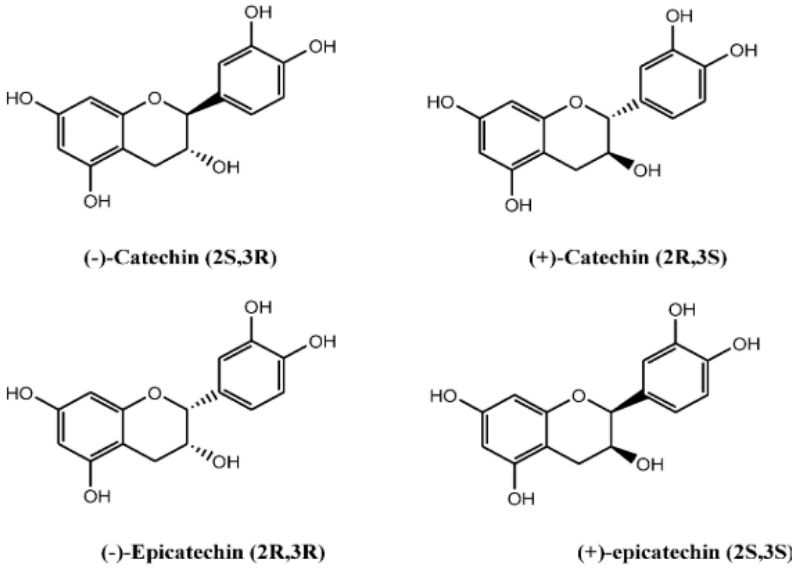


Figura 3. ***Flavan-3-oles aislados de Crataegus monogyna Jacq.*** (Nabavi et al., 2015)**.**

Las procianidinas son oligómeros de catequina/epicatequina y en el espino albar se consiguieron aislar procianidina B2 (Figura 4), B4 y B5. Además de estos dímeros, se puso de manifiesto la presencia de trímeros y tetrámeros de (-)-epicatequina (procianidina C1 y D1, respectivamente) (Nabavi et al., 2015).

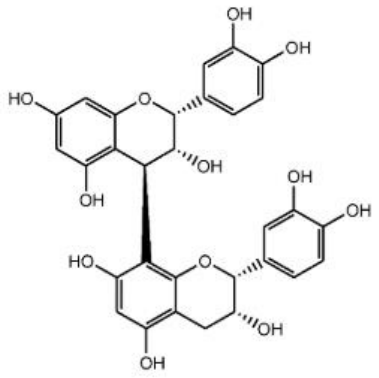


Figura 4. ***Procianidina B2 aislada de Crataegus monogyna Jacq.*** (Navabi et al. 2015)**.**

Los flavonoides también son compuestos muy abundantes en la Sumidad de Crataegus, especialmente en forma de heterósidos, destacando el hiperósido (quercetin-3-O-glucósido). Otros flavonoides puestos de manifiesto fueron ramnósidos de rutina y vitexina (raro derivado de flavona C-glicosilada) y 6 análogos de di-C-glicosilapigenina en sus hojas.

En esta misma revisión de Nabavi y colaboradores se describe un estudio acerca del polen de abeja de esta especie donde se lograron identificar los derivados 8-metoxikaempferol y 3-neohesperidósido, entre otros flavonoides (Figura 5) (Nabavi et al., 2015).

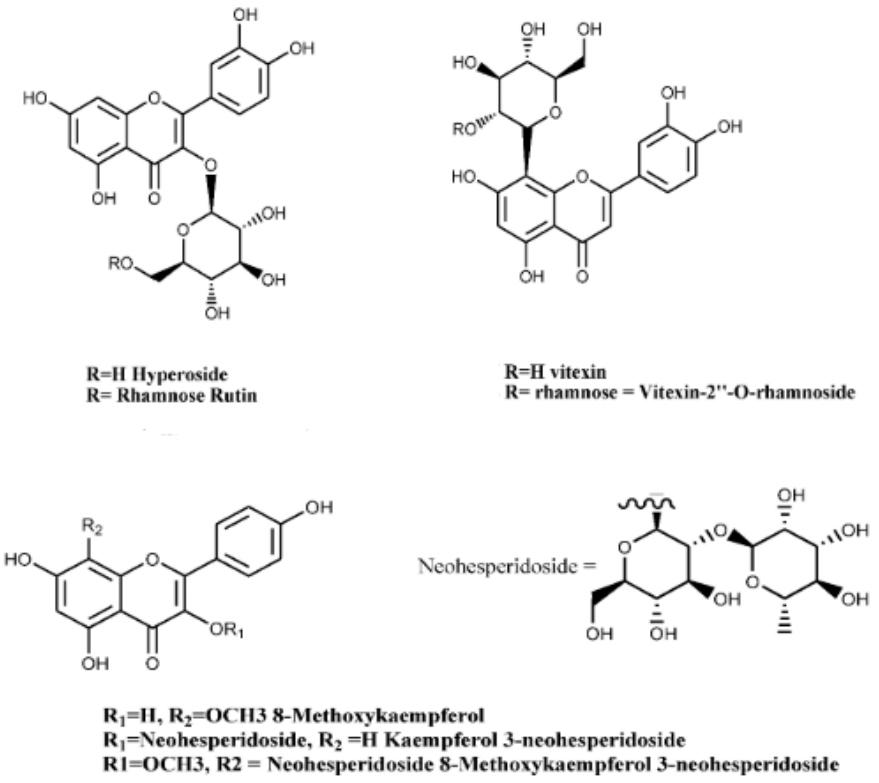
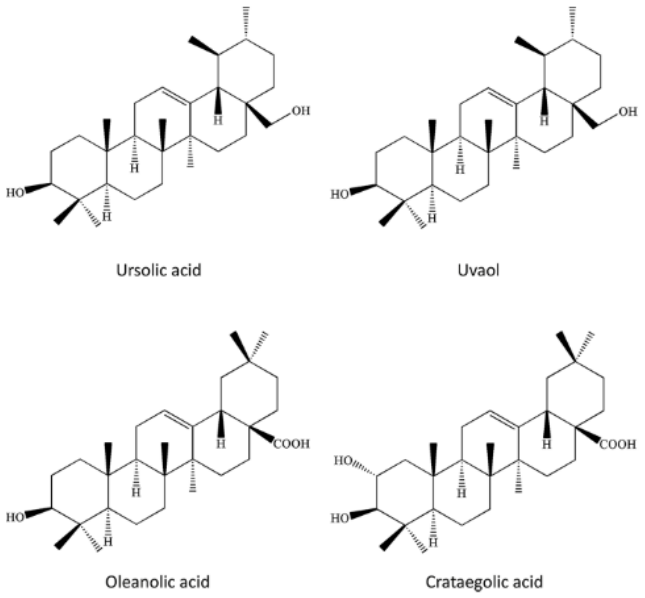


Figura 5. ***Flavonoides aislados de Crataegus monogyna Jacq.*** (Nabavi et al., 2015).

En la Sumidad aérea se aislaron ácidos triterpénicos (0,6%) tales como betulínico, oleanólico, ursólico y crataególico (Figura 6), butirospermol, 24-metilen-24-dihidrolanosterol y cicloartenol, junto con alcoholes alifáticos simples (Nabavi et al., 2015) (García et al., 1997).



***<u>Figura 6.</u> Principales ácidos triterpénicos de Crataegus monogyna* Jacq.** (Wu et al., 2020)**.**

Además, la sumidad de espino blanco presenta feniletilaminas cardioactivas, sales potásicas y trazas de aceites esenciales (Vanaclocha, en https://www.fitoterapia.net., 2020).

1.3. Uso tradicional.

En el siglo I, Dioscórides recogió la actividad cardiovascular de *Crataegus monogyna* Jacq. En China, se describió la actividad antidisentérica de *Crataegus pinnatifida* en *Tang Materia Medica* (primera farmacopea oficial conocida en el mundo) (Wu et al., 2020).

Desde antaño, las personas han utilizado el espino albar para elaborar diversas recetas: mermelada con sus frutos, reemplazar el café por sus frutos desecados, ensalada con hojas y flores tiernas, té con hojas y flores secas… (Rapoport, 2014).

Unas 1.000 especies de Crataegus tienen un uso ornamental (Hummer and Janick, 2009).

Los preparados de espino van desde infusiones o tinturas hasta extractos estandarizados. Puede encontrarse como medicamento autorizado (con receta), medicamento de venta libre (OTC), producto fitoterápico autorizado, suplemento dietético o remedio herbal no regulado (Koch and Malek, 2011).

Tradicionalmente, se ha utilizado esta planta para tratar afecciones cardiovasculares, nerviosas y digestivas tales como ansiedad, asma, hipertensión e hipotensión, dislipemia, angina, arritmia, insuficiencia cardiaca e indigestión (Dahmer and Scott, 2010).

1.4. Actividad farmacológica y usos terapéuticos.

Crataegus monogyna Jacq. es una planta medicinal que ha sido empleada para el tratamiento de cálculos renales, dolencias digestivas, disnea y patologías cardiovasculares. El uso del espino albar fue documentado en Europa por primera vez a finales del siglo XIX y en la actualidad, su principal utilidad es para tratar afecciones cardiovasculares, ya que reduce factores de riesgo tales como la inflamación, la hipertensión y la trombosis (Rigelsky and Sweet, 2002).

Los compuestos polifenólicos presentes en la planta parecen responables, en parte, de su actividad farmacológica. Según estudios, el uso del espino albar como coadyuvante del tratamiento mejora los síntomas de la insuficiencia cardiaca (Dahmer and Scott, 2010), la capacidad funcional y la calidad de vida de pacientes con insuficiencia cardiaca de clase II y III (Holubarsch et al., 2018). Aumenta la tolerancia al estrés físico y la mortalidad disminuyó significativamente tras 6 y 18 meses. Además, también podría utilizarse para tratar otras afecciones cardiovasculares (Koch and Malek, 2011).

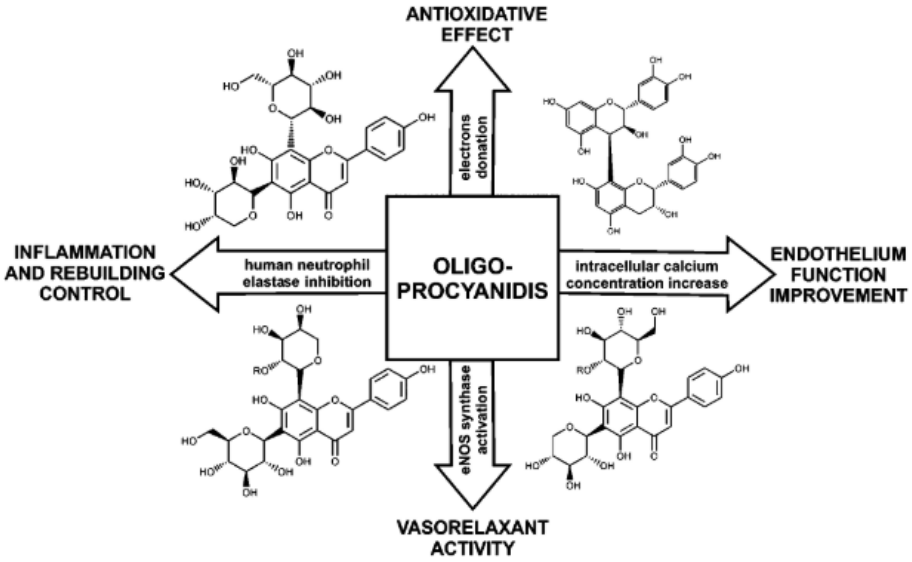
Numerosos estudios nos muestran que el extracto de espino presenta un marcado efecto antiarrítmico debido a las procianidinas: efecto inotropo positivo y mejora la ratio fuerza-frecuencia del corazón (Dahmer and Scott, 2010), aumenta la contractibilidad miocárdica dependiente de concentración y prolonga el potencial de acción y periodo refractario (Holubarsch et al., 2018). El efecto inotropo positivo se debe a un aumento de la sensibilidad intracelular al calcio. También puede inducir ritmicidad en cardiomiocitos inactivos y disminuye la fuerza de contracción por la vía muscarínica a través de los receptores M2 (Koch and Malek, 2011). Además, presenta un efecto cronotropo negativo y mejora el ritmo cardiaco (Nabavi et al., 2015).

Otros estudios han demostrado el poder antioxidante de los flavonoides y se ha visto que inhiben la agregación y adhesión plaquetaria y previenen la oxidación de LDL, dotando a la planta con actividad antiaterogénica (Dahmer and Scott, 2010). Reducen el colesterol total, LDL, VLDL y HDL por aumento de su absorción hepática, degradación e inhibición de su biosíntesis. Reducen el colesterol y los triglicéridos debido a la sobreexpresión hepática de colesterol-7-α-hirdoxilasa y la disminución intestinal de acil-Coenzima A. Previenen la hiperlipidemia regulando los receptores hepáticos de LDL, previniendo acúmulo de colesterol en el hígado y favoreciendo su degradación (Murray, 2013). Además, disminuyen la adipogénesis por expresión génica (Wu

et al., 2020). De esta forma, disminuyen también el riesgo de aterosclerosis (Koch and Malek, 2011).

Se ha demostrado que los flavonoides y procianidinas ejercen un efecto vasodilatador debido a la activación de diversos factores de relajación endotelial y por inhibición de las fosfodiesterasas (Dahmer and Scott, 2010). También aumentan la liberación de óxido nítrico (NO) endotelial e inhiben su degradación. El aumento de NO retrasa la activación del sistema angiotensina y previene el envejecimiento endotelial (Holubarsch et al., 2018). La vasodilatación aumenta el flujo coronario, previniendo arteriosclerosis y estenosis por angioplastia (Koch and Malek, 2011) y mejora el flujo de oxígeno y su uso por parte del corazón, además de estabilizar los capilares sanguíneos gracias a la acción vitamínica P de los flavonoides (Murray, 2013). El aumento de NO y la disminución de endotelina disminuyen la permeabilidad vascular, protegiendo el endotelio. Esto es de especial interés en otras situaciones en las que se genere daño endotelial, como envejecimiento, diabetes o hipertensión (Wu et al., 2020). La vasodilatación y prevención de la inflamación impiden la hiperpermeabilidad del endotelio, crucial en la formación del edema e inflamación característica de la insuficiencia cardiaca (Zorniak et al., 2017).

Las procianidinas (Figura 7) inhiben la elastasa producida por neutrófilos y protegen al miocardio frente a los radicales libres generados en una isquemia (Dahmer and Scott, 2010).



<u>Figura 7.</u> Mecanismos de acción de oligoprocianidinas (Zorniak et al., 2017).

El extracto estandarizado de espino reduce el estrés oxidativo vascular, protegiendo frente a problemas cardiacos, vasculares y renales debido a su potente poder antioxidante (Holubarsch

et al., 2018). Algunos extractos estudiados, como el extracto WS 1442 (extracto seco de hojas y flores de Crataegus cuyo disolvente es etanol al 45% y la concentración de procianidinas se ajusta al 17,3%-20,1% (Holubarsch et al., 2018)) y extracto LI 132, ejercen un efecto cardioprotector frente a lesiones por perfusión isquémica e inhiben la actividad fosfatasa de la calcineurina, disminuyendo la hipertrofia cardiaca en hipertensión. Además, el extracto WS 1442 protege frente al gasto cardiaco disminuido y aumento de resistencia periférica sin afectar la frecuencia o la presión arterial (Koch and Malek, 2011), reduce el estrés oxidativo en el miocardio y previene la apoptosis, siendo cardioprotector (Murray, 2013). Los flavonoides disminuyen las especies reactivas de oxígeno, citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF-α) y la formación de peroxinitratos, protegiendo frente a isquemias (Nabavi et al., 2015). La vitexina inhibe la doxorrubicina inducida por estrés oxidativo, inflamación, apoptosis y daño miocárdico (Wu et al., 2020).

Por tanto, el efecto cardioprotector se debe a la disminución de la disfunción endotelial, inhibición de la oxidación lipídica, a sus propiedades antiinflamatorias (Holubarsch et al., 2018) y a la disminución de lípidos en sangre, ya que permite bajar el número de células espumosas que generan inflamación y daño endotelial (Wu et al., 2020) (Figura 8).

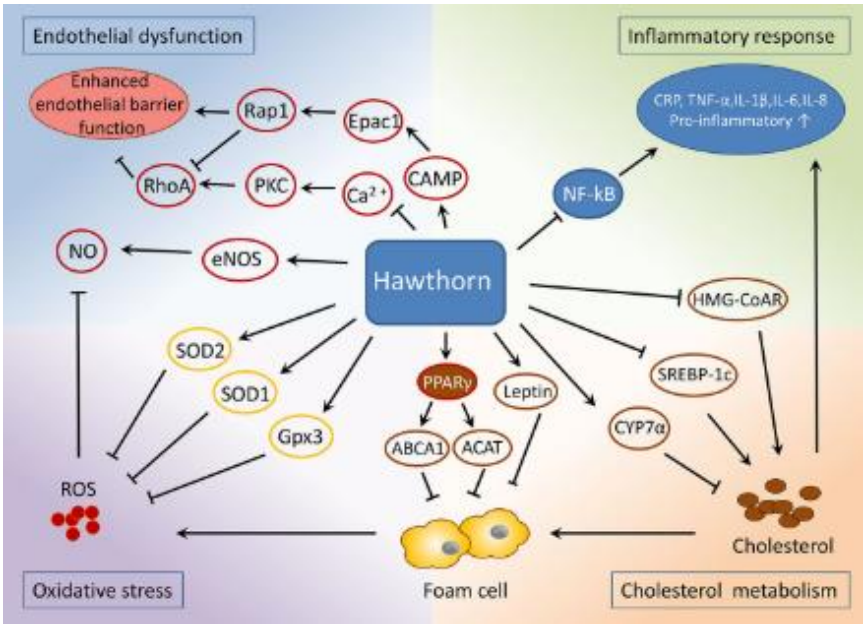


Figura 8. ***Mecanismo protector del espino albar*** (Wu et al., 2020)**.**

Los efectos adversos son raros y no graves, como cefalea, insomnio, agitación, náuseas, vómitos… (Nabavi et al., 2015). Se ha demostrado su seguridad en pacientes con insuficiencia cardiaca (Koch and Malek, 2011) y se recomienda en pacientes con enfermedades coronaria,

aterosclerosis, hipertensión e hipercolesterolemia (Murray, 2013). Por falta de estudios no se recomienda su uso en niños, embarazo o lactancia y está especialmente contraindicado en personas con hipersensibilidad a Crataegus. La dosis recomendada es de 600-1.800 mg/día dividido en dos o tres tomas (Dahmer and Scott, 2010). Existen interacciones teóricas con digitálicos, antiarrítmicos, antihipertensivos e hipolipemiantes pero los estudios no reportan interacciones (Koch and Malek, 2011).

Otras actividades observadas fueron: inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) debido al ácido oleanólico, antiinflamatoria por los ácidos triterpénicos, depresión central y analgesia (por receptores opioides) debido a los flavonoides, gastroprotector y antimicrobiano (Nabavi et al., 2015).

En un estudio se observó que, junto con metformina, se redujo el índice de masa corporal (IMC) y la hemoglobina glicosilada (HbA1c) en pacientes con prediabetes complicada por hígado graso no alcohólico (Wu et al., 2020).

Los ácidos triterpénicos presentan una amplia gama de acciones: hipolipemiante, hipoglucemiante, antiinflamatoria, antiarrítmica, antitumoral, anticancerosa y citotóxica, espermicida, antiulcerosa, antihepatotóxica, arteriosclerótica, anticonvulsiva, antivirásica y antialérgica (Ahumada et al., 1995).

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del trabajo es realizar un estudio fitoquímico y valorar la actividad antioxidante de un extracto etanólico total (ET) procedente de la Sumidad de *Crataegus monogyna* Jacq., y las diferentes fracciones obtenidas mediante extracción líquido-líquido a partir de dicho extracto con disolventes de diferente polaridad. Seleccionaremos los extractos con mayor potencial farmacológico para su análisis.

Los objetivos específicos son:

1. Obtención y fraccionamiento del extracto etanólico.
2. Estudio de la actividad antioxidante del extracto y de las fracciones obtenidas.
3. Estudio fitoquímico:
    - 3.1. Estudio del extracto y de cada fracción por cromatografía en capa fina.
    - 3.2. Análisis cuantitativo de fenoles totales.
    - 3.3. Análisis cuantitativo de flavonoides totales.
    - 3.4. Perfil fitoquímico de la fracción más antioxidante mediante HPLC-EM.
4. Estudio de la actividad antiinflamatoria en cultivos celulares HL60 de las fracciones más activas:
    - 4.1. Estudio de la viabilidad celular.
    - 4.2. Estudio de la actividad enzimática de la MPO.

3. METODOLOGÍA

3.1. Obtención y fraccionamiento del extracto etanólico.

3.1.1. Recolección de la droga.

La Sumidad de *Crataegus monogyna* Jacq. fue recolectada en la primera quincena de febrero de 2019 en el Puerto de los Vientos (Serranía de Ronda, Málaga). Se desecó en el laboratorio a temperatura ambiente y al abrigo de la luz.

3.1.2. Obtención y fraccionamiento del extracto etanólico.

Se pesaron 50 gramos de Sumidad de *Crataegus monogyna* Jacq. y se trocearon posteriormente para favorecer la extracción de los compuestos. A continuación, el material vegetal se dejó en maceración con el disolvente para obtener el ET. La maceración se llevó a cabo a temperatura ambiente y en oscuridad durante 24 horas con 300 ml de etanol 80º. Una vez transcurrido ese tiempo, se filtró a vacío y se repitió la maceración con otros 300 ml del disolvente para extraer la mayor cantidad de compuestos posible. Recogido el filtrado, se llevó a sequedad en rotavapor para obtener el residuo seco total, a una temperatura máxima de 40ºC. Por último, se calculó el rendimiento del extracto referido a planta seca.

Con respecto al fraccionamiento, el residuo seco total se redisolvió en 50 ml de acetona/agua (1:1) y se procedió al fraccionamiento mediante extracción líquido-líquido utilizando para ello disolventes con diferentes polaridades. Esta extracción se realizó en campana extractora con embudo de decantación hasta agotamiento usando para ello los disolventes n-hexano, diclorometano y acetato de etilo, en este orden de polaridad creciente de disolventes. Para finalizar, cada una de las fracciones se llevaron a sequedad en rotavapor, obteniendo así los residuos secos de las distintas fracciones: fracción de hexano (FHEX), fracción de diclorometano (FDCM), fracción de acetato de etilo (FAcOEt) y fracción acuosa (FAC). Por último, se calculó el rendimiento para cada fracción, referido a ET inicial.

3.2. Estudio de la actividad antioxidante del extracto y de las fracciones obtenidas.

Para determinar la actividad antioxidante se utilizó un método colorimétrico sencillo (Sánchez-Moreno et al., 1998) basado en la reacción directa de radicales libres con un compuesto antioxidante.

Para esta experiencia se empleó el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) a una concentración de 0,04% p/v en etanol absoluto. Este radical libre es estable, de color violeta intenso disuelto en etanol y presenta una fuerte absorción a 515 nm (Cheng et al., 2006). El DPPH es reducido por compuestos antioxidantes generando la decoloración de la solución y

disminuyendo la absorbancia a la longitud de onda mencionada anteriormente, siendo este efecto proporcional al número de electrones que capture (Cuendet et al., 1997):

$$DPPH^* + AH \rightarrow DPPH\text{-}H + A^*$$

Los materiales, aparatos, reactivos, y muestras empleados fueron los siguientes:

Materiales:

- Microplaca con 96 pocillos de 300 µL de capacidad.
- Micropipetas de intervalos de volumen 100-1000 µL (Labnet®) y puntas de plástico.

Aparatos:

- Lector de microplacas Biochrom AsysHihtech Expert 96.

Reactivos:

- Reactivos: DPPH (Sigma Aldrich®) y etanol absoluto (VWR Chemicals®).

Muestras a ensayar:

- Patrón de referencia: ácido cafeico (Sigma Aldrich®).
- ET y fracciones: FHEX, FDCM, FAcOEt y FAC.

En la microplaca de 96 pocillos se añadieron, por duplicado, 100 µL de las distintas concentraciones del patrón ácido cafeico (CF) o de las muestras (6,25 a 200 µg/mL), 100 µL de etanol y 50 µL de solución de DPPH 0,04% previamente preparada. Se compararon frente a un blanco, por duplicado, constituido por 100 µL de cada una de las distintas fracciones y 150 µL de etanol. Por último, se prepararon varios pocillos con 50 µL de la solución de DPPH y 200 µL de etanol absoluto que actuaron como control de absorbancia máxima.

La microplaca se dejó a temperatura ambiente y al abrigo de la luz durante 15 minutos y después se procedió a la lectura de absorbancia a 515 nm en el lector de placas multipocillos (Figura 9). Una mayor actividad antioxidante se manifestó por un marcado viraje de color violeta a amarillo en el pocillo y una disminución de la absorbancia determinada.

Figura 9. ***Microplaca utilizada en el estudio de la actividad antioxidante.***

El porcentaje de DPPH captado por el antioxidante se obtiene de la siguiente ecuación (Cheng et al., 2006):

$$\text{Actividad antioxidante (\%)} = (1 - A_{Muestra}/A_{Control}) \times 100$$

Para calcular la actividad antioxidante o actividad antirradicalaria se sustituyeron los valores de absorbancia obtenidos en la ecuación anterior a los que se les restó los valores del control blanco. La actividad antioxidante del extracto y sus fracciones fueron expresadas como valor IC_{50} (concentración µg/mL que reduce la cantidad del radical en un 50%), calculadas por curvas de regresión lineal.

3.3. Estudio fitoquímico.

3.3.1. Estudio del extracto y de cada fracción por cromatografía en capa fina.

La cromatografía en capa fina (CCF) es una técnica sencilla y preliminar utilizada para la separación e identificación de diferentes compuestos presentes en una muestra. Las muestras se depositan sobre la fase estacionaria (cromatofolio de silicagel) y la fase móvil, preparada con distintos disolventes para obtener la polaridad deseada, separará los compuestos a medida que recorre la fase estacionaria en función de su afinidad por la fase móvil. La identificación de compuestos mediante esta técnica se basa en el Rf de los compuestos.

Gran variedad de compuestos fenólicos han sido identificados mediante CCF atendiendo a los valores de Rf y a la utilización de patrones. Otras formas de identificar los compuestos polifenólicos son por sus propiedades de fluorescencia al irradiarlos con luz UV para detectar compuestos con dobles enlaces conjugados, por reacciones con agentes específicos y por sus características espectrales (Rico, 2019).

Los materiales, aparatos, reactivos y muestras empleados fueron los siguientes:

Materiales:

- Cubeta de vidrio con tapa.
- Cromatofolios de silicagel (Merck®).
- Pipeta de vidrio.
- Capilares de vidrio.

Aparatos:

- Cámara oscura con lámpara de luz UV (Spectroline Model CM-10 Spectronics Corporation®).

Reactivos:

- Reactivos de fases móviles: n-hexano, acetato de etilo, ácido fórmico y agua.
- Reactivo de revelado: Óleum (ácido sulfúrico, ácido acético glacial, agua (8:32:160)).

Muestras a ensayar:

- Patrones de referencia: ácido oleanólico, ácido ursólico, hiperósido, procianidina B_2, rutina, vitexina, luteolina, ácido clorogénico y ácido cafeico.
- ET y fracciones: FHEX, FDCM, FAcOEt y FAC.

Para caracterizar los compuestos que contienen los extractos, se dispusieron las soluciones de los patrones y extractos en la parte inferior de la placa de silicagel (fase estacionaria) utilizando capilares de vidrio. Después, se introdujo en una cubeta de vidrio que contenía la fase móvil. En función de sus características fisicoquímicas, concretamente su polaridad, los compuestos patrones y los del extracto ascienden por la placa y se separan. Se dejó subir la fase móvil por la placa hasta que el frente estuvo a 1 cm del borde superior. A continuación, se sacó la placa de la cubeta y se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seca, se observó a la luz UV (254 nm), se reveló con óleum y calor (120ºC) durante 5 minutos y se midieron los Rf de las manchas reveladas. La identificación de los compuestos contenidos en el extracto se hace por comparación con los patrones disueltos en etanol.

Los patrones y fases móviles empleados en las cromatografías para el estudio del extracto y sus fracciones se recogen a continuación (Tabla 1):

Extracto y fracciones	*Patrones*	*Fases Móviles*
ET, FHEX Y FDCM	**Ácidos triterpénicos:** ácido ursólico y ácido oleanólico.	Hexano/Acetato de etilo (7:3). Recorrido y medio.
FAcOEt, FAC	**Flavonoides:** rutina, hiperósido, vitexina y luteolina.	Hexano/Acetato de etilo/Ácido fórmico/Agua (4:11:2:3)
	Antociano: procianidina B_2 **Ácidos fenoles:** ácido clorogénico y ácido cafeico.	Hexano/Acetato de etilo/Ácido fórmico/Agua (4:11:2:3)

Tabla 1. ***Patrones y fases móviles empleadas en cromatografía en capa fina para el estudio del extracto y las fracciones.***

3.3.2. Análisis cuantitativo de fenoles totales.

Para determinar la cantidad total de fenoles presentes en el ET y las fracciones de la Sumidad de *Crataegus monogyna* Jacq., se utilizó el método espetrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965) modificado por Medina (Medina, 2011) para reducir los volúmenes empleados de reactivos y muestra. Esta identificación se basa en un proceso redox, ya que el ión fenolato capta oxígeno rápidamente alcanzando un pH = 10. Debido a esto, se añade Na_2CO_3 que permite la aparición de un compuesto reductor de color azul. El ácido gálico (AG) es el patrón de referencia utilizado para la recta de calibrado.

Los materiales, aparatos, reactivos, y muestras empleados fueron los siguientes:

Materiales:

- Microplaca de 96 pocillos de 300 µL de capacidad.
- Tubos de ensayo de 10 mL.
- Micropipetas de intervalos de volumen 10-100 µL y 100-1000 µL (Labnet®) y puntas de plástico.

Aparatos:

- Lector de microplacas Biochrom AsysHihtech Expert 96.

Reactivos:

- Reactivos: reactivo de Folin-Ciocalteu (Panreac®) y carbonato sódico (Na_2CO_3) al 7% (Panreac®).

Muestras a ensayar:

- Patrón de referencia: ácido gálico (Sigma Aldrich®).
- ET y fracciones: FHEX, FDCM, FAcOEt y FAC.

Se prepararon 2 mL de concentraciones seriadas (0, 10, 25, 50, 100, 200, 250 y 500 µg/mL) del patrón de AG disuelto en etanol al 50% para elaborar la curva de calibrado. Las muestras se prepararon a una concentración de 200 µg/mL disueltas en etanol al 50%. A continuación, se tomaron 50 µL de las distintas concentraciones del patrón AG y de las muestras (ET y fracciones) y se dispusieron en tubos de ensayo. Se añadieron a cada uno de ellos 430 µL de agua destilada y 20 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu y se mezcló bien. Al cabo de 5 minutos (ya debería haberse producido la reacción), se adicionaron 50 µL de solución saturada de Na_2CO_3 al 7% previamente preparada (mezclar bien) y otros 450 µL de agua destilada. Después, se dejó 30 minutos a temperatura ambiente y al abrigo de la luz. Por último, se tomaron 200 µL de cada tubo y se llevaron a una microplaca para leer las absorbancias en el lector de microplacas a una longitud de onda de 750 nm (Figura 10).

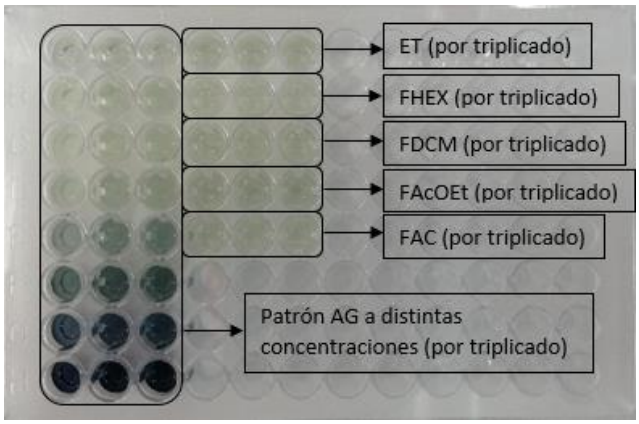


Figura 10. ***Microplaca utilizada en la cuantificación de fenoles totales.***

La ecuación de la recta patrón de AG se utilizó para el cálculo de las concentraciones de fenoles totales, tanto en el ET como en las fracciones, sustituyendo los correspondientes valores de absorbancia en dicha ecuación. Los resultados se expresaron en mg de fenoles (equivalentes de AG/g de extracto seco).

3.3.3. Análisis cuantitativo de flavonoides totales.

Para determinar la cantidad total de flavonoides presentes en el ET y las fracciones de la Sumidad de *Crataegus monogyna* Jacq., se utilizó la técnica de Lamaison y Carnat (Lamaison and Carnat, 1990) modificada por Bedreag (Bedreag et al., 2014).

Los materiales, aparatos, reactivos y muestras empleados fueron los siguientes:

Materiales:

- Tubos de ensayo de 10 mL.
- Microplaca de 96 pocillos de 300 µL de capacidad.
- Micropipetas de intervalos de volumen 10-100 µL y 100-1000 µL (Labnet®) y puntas de plástico.

Aparatos:

- Lector de placas multipocillos Biochrom Asys Hihtech Expert 96.

Reactivos:

- Reactivos: cloruro de aluminio ($AlCl_3$) al 10% en etanol absoluto y etanol absoluto (VWR Chemicals®).

Muestras a ensayar:

- Patrón de referencia: rutina (Sigma Aldrich®).
- ET y fracciones: FHEX, FDCM, FAcOEt y FAC.

Se prepararon 2 mL de concentraciones seriadas (0, 10, 25, 50, 100, 200, 250 y 500 µg/mL) del patrón rutina (RU) disuelto en etanol al 50% para elaborar la curva de calibrado. Las muestras se prepararon a una concentración de 200 µg/mL disueltas en etanol al 50%. A continuación, en una microplaca, se colocaron por pocillo 100 µL de las distintas concentraciones del patrón RU o de las muestras y 100 µL de $AlCl_3$ al 10% en etanol. Se dejó reposar 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se procedió a la lectura de las absorbancias en el lector de placas a una longitud de onda de 405 nm (Figura 11).

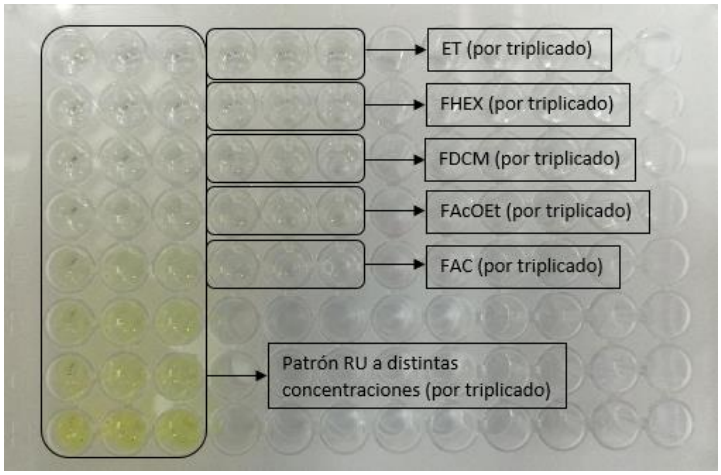


Figura 11. ***Microplaca utilizada en la cuantificación de flavonoides totales.***

Las medidas se hicieron frente al blanco, reafirmando la presencia de flavonoides en la muestra al producir un viraje de color del reactivo a amarillo.

Las concentraciones seriadas de RU se utilizaron para elaborar la recta de calibrado, cuya ecuación nos permitió calcular las concentraciones de flavonoides en las muestras al sustituir sus valores de absorbancia. Los resultados se expresaron en mg de flavonoides (equivalentes de RU/g de extracto seco).

3.3.4. Perfil fitoquímico de la fracción más antioxidante mediante HPLC/EM.

Se seleccionó la fracción de mayor actividad antioxidante para su estudio fitoquímico por HPLC/EM. La FAcOEt fue analizada empleando un espectrómetro de masa acoplado por UHPLC Orbitrap Quadropole Q Extractive (ThermoScientific). La muestra se preparó disolviendo 2 mg de la FAcOEt en 1 mL de metanol al 50% que contenía ácido fórmico al 0,1% v/v. A continuación, la muestra se pasó por un filtro de 0,2 µm de luz de malla.

Las condiciones UHPLC (Dionex Ultimate RS) en condiciones de gradiente fueron:

- Disolvente A: agua que contiene ácido fórmico al 0,1% v/v.
- Disolvente B: metanol que contiene ácido fórmico al 0,1% v/v.

El sistema de elución en gradiente funcionó de esta forma:

- 0-5% B (0-1 minutos).
- 5-100% B (1-12 minutos).
- 100-5% B (12,1-15 minutos).

Para la separación de los compuestos se utilizó una columna ACQUITY UPLC BEH C18 (130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm X 100 mm). Se inyectaron 5 µL de la muestra a un volumen de flujo de 0,5 mL/min. La columna se mantuvo a 40ºC y el tiempo de ejecución total fue de 15 minutos.

Los datos de HRMS/MS se adquirieron en modo negativo en un rango de exploración de 50-750 m/z. El cromatograma en modo de TIC, cuyas condiciones de equipo fueron tiempo de exploración = 1 microexploraciones e IT 500 ms, con una resolución de 70.000.

Las condiciones ESI fueron:

- Temperatura capilar: 320ºC.
- Voltaje de pulverización: 3,0 kV.
- Gas principal: nitrógeno 60 Au.
- Gas auxiliar 25 Au.

Los datos obtenidos se procesaron con el software Xcalibur 4.0 de ThermoScientific. Los picos se identificaron por comparación con sus tiempos de retención, masa exacta e iones fragmentados con los estándares correspondientes.

3.4. Estudio de la actividad antiinflamatoria en cultivos celulares HL60 de las fracciones más activas.

3.4.1. Obtención de la suspensión celular y medida de la viabilidad celular.

La línea celular utilizada para los ensayos fue la HL60 (leucemia promielocítica aguda). Estas células son promielocitos, es decir, precursoras de los granulocitos (eosinófilos, basófilos y neutrófilos) y, por tanto, presentan muchas de las propiedades de estas células como la expresión de numerosos factores implicados en la inflamación: ciclooxigenasa-2 (COX-2) y mieloperoxidasa (MPO) entre otros.

La suspensión celular se preparó en un tubo falcon estéril. Para el contaje celular se tomaron 50 µL de la suspensión para llevarlos a un tubo eppendorf con 50 µL de colorante azul de tripán, mezclando suavemente (solo se tiñen las células muertas). El número total de células en la suspensión se calculó utilizando un hemocitómetro para el conteo celular y su observación al microscopio según la siguiente fórmula:

(media de nº células vivas contadas/nº de recuadros grandes contados) x 2 x 10.000 células/mL

La suspensión celular se ajustó a 1.500.000 células/mL añadiendo la cantidad de medio de cultivo necesario.

La viabilidad celular se realiza para comprobar la ausencia de toxicidad de las concentraciones de las muestras a ensayar. Para este ensayo se utilizó la técnica de la resazurina (Silva et al., 2016). Este ensayo colorimétrico se basa en la reducción de la resazurina (compuesto de color azul) a resorufina (compuesto de color rosa). La reducción y el cambio de color son proporcionales al número de células vivas. La medición de la absorbancia se hace a 2 longitudes de ondas, 540 nm para detectar resorufina y 630 nm para detectar resazurina.

Los materiales, aparatos, reactivos y muestras utilizados fueron:

<u>Materiales:</u>

- Tubo falcon estéril.
- Microplaca de 96 pocillos de 300 µL de capacidad.
- Tubos eppendorf de volumen 1,5 mL.

- Micropipetas de intervalos de volumen 10-100 µL y 100-1000 µL (Labnet®) y puntas de plástico.

Aparatos:

- Hemocitómetro (Marienfeld®)
- Incubadora de CO_2 (RS Biotech®)
- Centrífuga (Kubota®)
- Lector de microplacas Biochrom AsysHihtech Expert 96.

Reactivos:

- Reactivos: medio de cultivo RPMI-1640 completado con 10% FBS y 1% Penicilina/Estreptomicina.
- Azul de tripán
- Resazurina 1M en medio de cultivo.
- Suspensión celular HL60 (1.500.000 células/mL) en medio de cultivo.

Muestras a ensayar:

- Patrón de referencia: indometacina.
- Fracciones: FAcOEt y FDCM.

En una microplaca con 96 pocillos se incubó la suspensión celular con las diferentes concentraciones finales de FAcOEt y FDCM (10, 50, 100 µg/mL). También se preparó un blanco utilizando medio de cultivo y un control con la suspensión de células sin tratar. Después, se incubó la placa durante 24h en una incubadora de CO_2.

Tras incubar, se recogió el contenido de los pocillos en tubos eppendorf y se guardaron las muestras a -20ºC durante 1 hora. Posteriormente, se sacaron las muestras del congelador, se dejaron atemperar, se centrifugaron durante 5 minutos a 300 G y se resuspendió el pellet de células para homogeneizar.

Se determinó la viabilidad celular de las fracciones en estudio. Para ello, se añadió en cada pocillo 200 µL de medio de cultivo (blanco), suspensión celular sin tratamiento (control) o la suspensión celular con las fracciones a ensayar a las diferentes concentraciones (muestras) y 20 µL de la solución de resazurina (1M). A continuación, se dejó incubar durante 1 hora y se procedió a medir las absorbancias en un lector automático de microplacas a 540 nm y 630 nm.

Los resultados se expresaron como viabilidad celular (%) y se calcularon sabiendo que la absorbancia del control presentó un 100% de viabilidad. Se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$A\ final_{muestra} = A\ 540nm_{muestra} - (A\ 630nm_{muestra} \times CC)$$

A todos los valores de absorbancia se les restó el valor del blanco (medio de cultivo).

El coeficiente de correlación se calculó de la siguiente forma:

$$CC = (A\ 540nm_{resazurina} - A\ 540nm_{medio}) / (A\ 630nm_{resazurina} - A\ 630nm_{medio})$$

3.4.2. Estudio de la actividad enzimática de la enzima MPO.

La MPO es una enzima constitutiva de neutrófilos y monocitos y uno de los muchos mediadores proinflamatorios que estos liberan en las áreas inflamadas para erradicar patógenos. El mecanismo de la MPO utiliza peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para oxidar anión cloruro (Cl^-) y formar ácido hipocloroso (HClO), potente oxidante y antimicrobiano que causa daño en el tejido, asociándose a procesos de inflamación crónica.

En el laboratorio, se midió la inhibición de esta enzima por la FAcOEt y la FDCM de la Sumidad de *C. monogyna* Jacq. siguiendo el modelo de Bradley (Bradley et al., 1982), que consiste en la oxidación dependiente de H_2O_2 de un donador artificial de electrones (orto-dianisidina) produciendo un cromógeno amarillo cuya absorbancia se mide por espectrofotometría a 450 nm. Este ensayo in vitro se realizó tras la incubación durante 24 horas de las distintas concentraciones de las fracciones en estudio con las células HL60 (leucemia promielocítica aguda humana) ya que sus niveles basales de MPO están aumentados.

Los materiales, aparatos y muestras utilizados fueron los mismos que en el ensayo anterior y los reactivos específicos fueron:

<u>Reactivos:</u>

- O-dianisidina 0,067% p/v en agua destilada.
- HETAB 0,5% p/v en tampón fosfato pH=6,5.
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 0,003% v/v en agua destilada.

<u>Muestras a ensayar:</u>

- Patrón de referencia: indometacina.
- Suspensión de células tratadas con las fracciones en estudio a distintas concentraciones.

En una microplaca con 96 pocillos se incubó 200 µL de suspensión celular (1.500.000 células/mL) con las diferentes concentraciones finales de la FAcOEt y la FDCM (10, 50, 100 µg/mL). También se preparó un blanco (medio de cultivo) y un control con la suspensión de células sin tratar. Después, se incubó la placa durante 24 horas en una incubadora de CO_2.

Tras incubar, se recogió el contenido de los pocillos de las células tratadas y sin tratar en tubos eppendorf y se guardaron las muestras a -20ºC durante 1 hora. Posteriormente, se sacaron las muestras del congelador, se dejaron atemperar, se centrifugaron durante 5 minutos a 300G y se resuspendieron los pellets con una micropipeta para homogeneizar el contenido de cada eppendorf y realizar la medida de la actividad de la MPO.

Para la medida de la actividad de la MPO se añadieron en cada pocillo 70 µL de blanco (medio de cultivo), control (suspensión celular sin tratamiento) o muestras de las células tratadas a las diferentes concentraciones, 70 µL de la solución de o-dianisidina, 70 µL del tampón HETAB pH=6,5 y por último 70 µL de la solución de peróxido de hidrógeno 0,003% v/v, sustrato de la reacción. Finalmente, se dejó incubar la placa durante 5 minutos a temperatura ambiente y se procedió a la lectura de las absorbancias en un lector automático de placas multipocillos a 450 nm.

Los resultados fueron expresados como actividad de MPO (%) y se calcularon a partir del control, sabiendo que este presentaba un 100% de la actividad de la enzima ya que las células no fueron tratadas. A todos los valores de absorbancia se les restó el valor del blanco (medio de cultivo). Los resultados se muestran en una gráfica que representa concentración frente a porcentaje de actividad de MPO. Además, se calcularon los valores de IC_{50} (concentración µg/mL que reduce la activdad de la MPO al 50%) de las fracciones ensayadas y del patrón de referencia indometacina.

3.5. Análisis estadístico.

Los ensayos se hicieron por duplicado, triplicado o cuadruplicado y se expresan como la media ± el error estándar. Se utilizó el test ANOVA seguido del test de comparación múltiple de Tukey para poner de manifiesto las diferencias existentes entre los resultados de los grupos experimentales. Se consideró valor significativo $p < 0,05$. Para la realización del análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism 5.0.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Rendimiento del extracto y de las fracciones obtenidas.

El rendimiento del ET y de las fracciones se recoge en la tabla a continuación (Tabla 2):

Extracto y fracciones	*Rendimiento (%p/p)*
ET	21,67 ± 2,30 % g r.s. ET/100 g planta
FHEX	5,98 ± 0,47 % g r.s. FHEX/100 g ET
FDCM	9,47 ± 0,73 % g r.s. FDCM/100 g ET
FAcOEt	12,24 ± 0,29 % g r.s. FAcOEt/100 g ET
FAC	9,01 ± 0,27 % g r.s. FAC/100 g ET

Tabla 2. ***Rendimiento en %p/p del extracto etanólico (referido a planta seca) y de las fracciones (referido a extracto etanólico inicial). Resultados expresados como media ± error (n=2).***

4.2. Estudio de la actividad antioxidante del extracto y de las fracciones obtenidas.

El DPPH actúa como control en el ensayo, de modo que la actividad antirradicalaria se expresó como porcentaje de DPPH captado. La IC_{50} se calculó a partir de una recta de regresión en la que se representó la concentración de las muestras frente al porcentaje de inhibición. Los valores obtenidos para el ET, las fracciones y el patrón se muestran en un gráfico de barras (Figura 12):

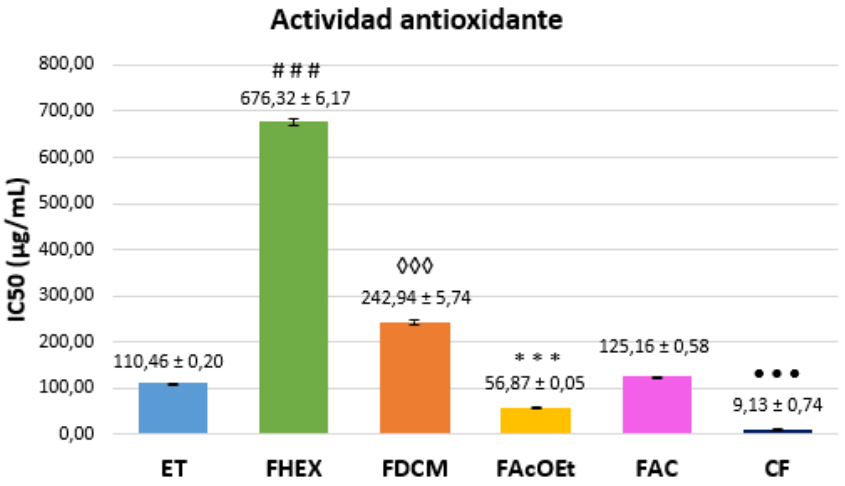


Figura 12. ***Actividad antioxidante expresada en IC_{50} (µg/mL). Resultados expresados como media ± error (n=2). Test ANOVA + Tukey.***

FAcOEt vs. ET, FHEX, FDCM, FAC y CF: *** (p < 0,001).

CF vs. ET, FHEX, FDCM y FAC: ••• (p < 0,001).

FHEX vs. ET, FDCM, FAC: # # # (p < 0,001).

FDCM vs. ET y FAC: ◊◊◊ (p < 0,001).

Cuanto menor IC_{50} presenta la muestra, menor cantidad de muestra es necesaria para reducir el DPPH al 50% y, por tanto, mayor actividad antioxidante presenta la muestra. A partir de estos resultados se deduce que la FHEX es la que menor actividad antioxidante presenta con una diferencia significativa (IC_{50} = 676,32 ± 6,17 µg/mL), mientras que la FAcOEt presenta mayor actividad antioxidante que el extracto y el resto de las fracciones con diferencia significativa (IC_{50} = 56,87 ± 0,05 µg/mL). Para el patrón de CF la IC_{50} fue de 9,13 ± 0,74 µg/mL.

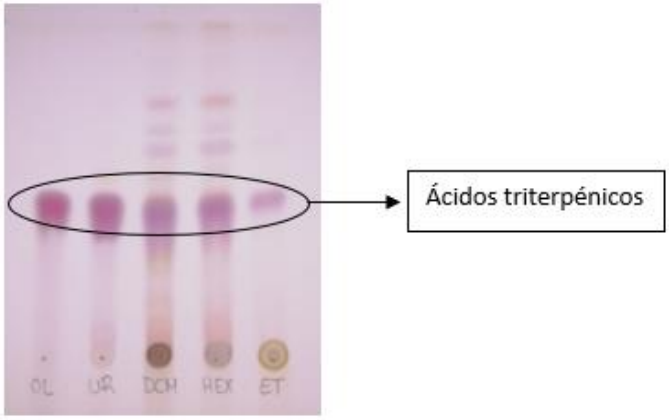
El alto poder antioxidante de la FAcOEt también se pone de manifiesto en diversos estudios (Quettier-Deleu et al., 2003) (Wang et al., 2018). Además, se confirma el potente poder antioxidante de la Sumidad de *Crataegus monogyna* Jacq. y se plantea el interés de su uso en prevención y/o tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo celular y tisular (Ganie et al., 2016).

Debido al alto poder antioxidante que presenta la FAcOEt, se decidió estudiar su perfil fitoquímico. Comenzamos con un estudio por CCF para continuar con un análisis por HPLC-EM.

4.3. Estudio fitoquímico.

4.3.1. Estudio del extracto y de cada fracción por cromatografía en capa fina.

Para el estudio del ET y de las fracciones FHEX y FDCM, se realizó una CCF utilizando como fase móvil n-hexano/acetato de etilo (7:3) y como patrones los ácidos triterpénicos ursólico y oleanólico disueltos en etanol. Se dejó recorrido y medio y posteriormente se reveló con óleum y calor (Figura 13).



<u>Figura 13.</u> CCF del ET, la FHEX (HEX) y la FDCM (DCM). Fase móvil: n-hexano/acetato de etilo (7:3). Patrones: ácido oleanólico (OL) y ácido ursólico (UR). Revelado con óleum y calor.

El compuesto presente en las fracciones y en el extracto total presenta un Rf = 0,45, coincidiendo con el valor de Rf de los patrones utilizados. Según la intensidad del color que presentan se puede decir que la cantidad de ácidos triterpénicos es mayor en la FDCM que en

la FHEX, y es mucho menor en el ET (esto es debido a la naturaleza apolar de los ácidos triterpénicos). Observando la placa al UV se comprobaron los resultados.

Para el estudio de las FAcOEt y FAC se realizaron dos CCF utilizando como fase móvil n-hexano/acetato de etilo/ácido fórmico/agua (4:11:2:3). Por una parte, se estudiaron los flavonoides utilizando como patrones: rutina, hiperósido, vitexina y luteolina (Figura 14). Por otra parte, se estudiaron ácidos fenoles y antocianos utilizando como patrones: ácido clorogénico, ácido cafeico y procianidina B_2 (Figura 15). Posteriormente se reveló con óleum y calor.

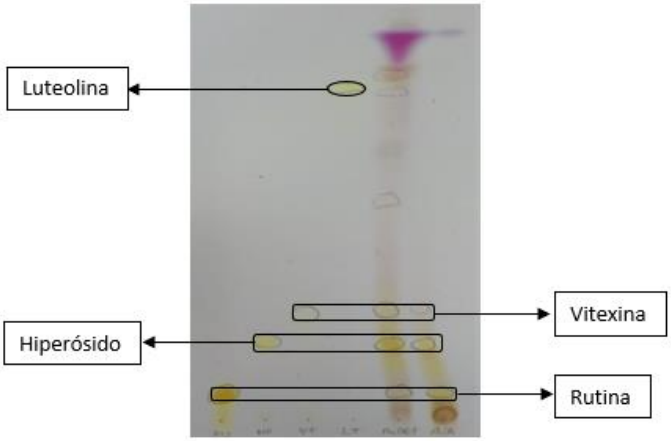


Figura 14. ***CCF de las FAcOEt (AcOEt) y FAC (A/A). Fase móvil: n-hexano/acetato de etilo/ácido fórmico/agua (4:11:2:3). Patrones: rutina (RU), hiperósido (HP), vitexina (VT) y luteolina (LT). Revelado con óleum y calor.***

En ambas fracciones aparecen compuestos con valores de Rf = 0,078, 0,21 y 0,26, coincidiendo en este orden con los Rf de los patrones rutina, hiperósido y vitexina. Se observa la presencia de otros compuestos cercanos al Rf del patrón luteolina pero ninguno de ellos coincidentes. Se puede observar, por su coloración característica violeta, que ambas fracciones presentan triterpenos. Por la intensidad del color que se observa se puede decir que la cantidad hiperósido y vitexina es mayor en la FAcOEt, mientras que la cantidad de rutina es mayor en la FAC. Estos resultados se comprobaron observando la placa al UV.

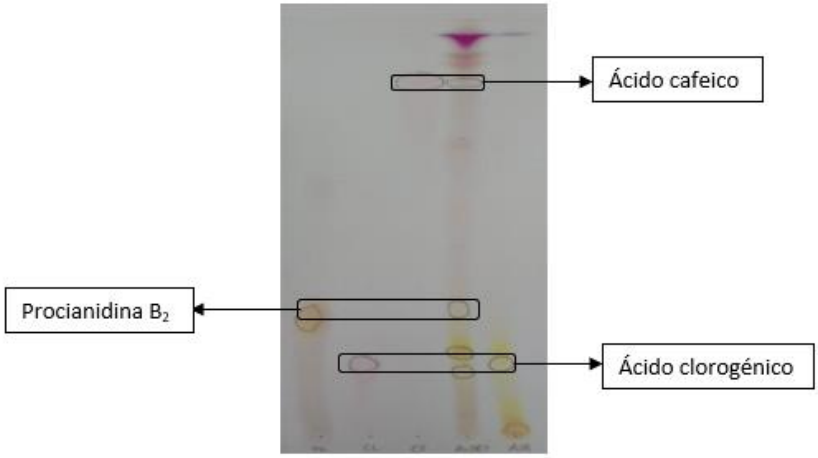


Figura 15. ***CCF de las FAcOEt (AcOEt) y FAC (A/A). Fase móvil: n-hexano/acetato de etilo/ácido fórmico/agua (4:11:2:3). Patrones: procianidina B_2 (PR), ácido clorogénico (CL) y ácido cafeico (CF). Revelado con óleum y calor.***

Tanto en la FAcOEt como en la FAC aparece un compuesto con valor de Rf = 0,19 (Rf = 0,18 en la FAcOEt), que coincide con el Rf del patrón ácido clorogénico. La pequeña variación del Rf en la FAcOEt pudo deberse a la gran cantidad de compuestos que esta contiene y que no permitían el ascenso correcto del compuesto. También aparecen otros dos compuestos en la FAcOEt con valores de Rf = 0,32 y 0,84, coincidiendo con los patrones de procianidina y ácido cafeico respectivamente. Por la intensidad del color, parece que ambas fracciones contienen cantidades parecidas de ácido clorogénico. Los resultados se comprobaron observando la placa al UV.

El hecho de que el ET y algunas de sus fracciones mostrasen una importante actividad antioxidante y se detectara la presencia de compuestos fenólicos por CCF nos llevó a determinar el contenido en fenoles y flavonoides totales.

4.3.2. Análisis cuantitativo de fenoles totales.

El contenido de fenoles totales se cuantificó utilizando el AG como patrón de referencia, realizándose soluciones seriadas para obtener una recta de calibrado en la que la concentración se representó en el eje de abscisas frente a la absorbancia en el eje de ordenadas (Figura 16). La ecuación de la recta se obtuvo por el método de mínimos cuadrados, asegurando la linealidad del rango de concentraciones utilizado (R^2 = 0,985) y así poder calcular los fenoles totales que las muestras contenían.

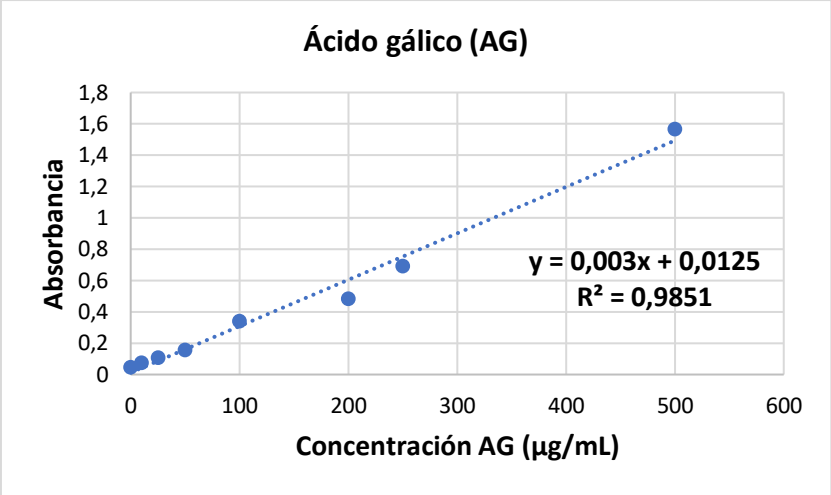


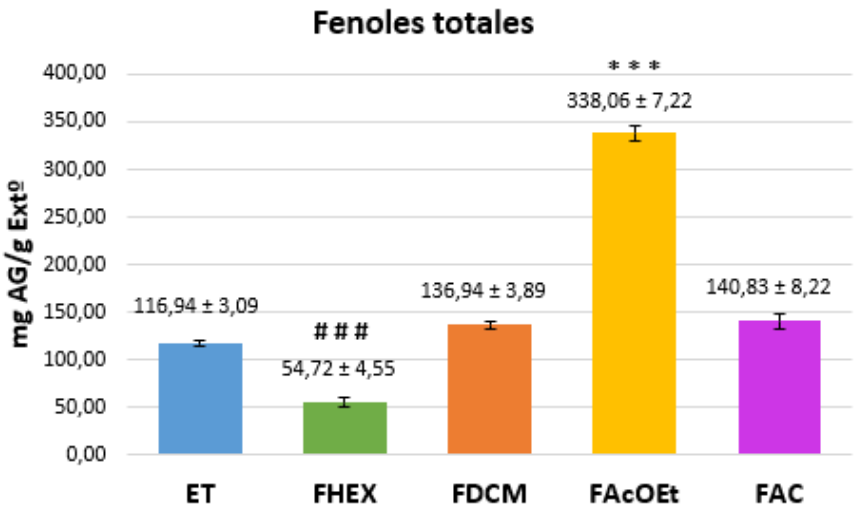
Figura 16. ***Recta de calibrado del ácido gálico.***

Las absorbancias obtenidas para las distintas muestras se sustituyeron en la ecuación de la recta de calibrado para extrapolar los valores de concentración, obteniéndose los siguientes resultados (Tabla 3):

Muestras	*Concentración de fenoles (µg AG/mL)*
ET	23,39 ± 0,62
FHEX	10,94 ± 0,91
FDCM	27,39 ± 0,78
FAcOEt	67,61 ± 1,44
FAC	28,17 ± 1,64

Tabla 3. ***Concentración de fenoles de las muestras tras extrapolación en la recta. Resultados expresados como media ± error (n=3).***

Por último, se calculó la cantidad de fenoles totales presentes en las muestras expresándose el resultado en mg de AG por cada gramo de extracto seco (Figura 17).



<u>Figura 17.</u> Contenido en fenoles totales expresados en mg AG/g extracto seco. Resultados expresados como media ± error (n=3). Test ANOVA + Tukey.

FAcOEt vs. ET, FHEX, FDCM y FAC: *** (p < 0,001).

FHEX vs ET, FDCM y FAC: # # # (p < 0,001).

Analizando los resultados obtenidos del ensayo, se observa que la FAcOEt es la que mayor cantidad de fenoles presenta con diferencia significativa, siendo de 338,06 ± 7,22 mg de fenoles expresados como AG por cada gramo de extracto seco. Este resultado queda corroborado por los ensayos realizado por Benabderrahmane (Benabderrahmane et al., 2019) y Abuashwashi (Abuashwashi et al., 2016). La ligera diferencia con estos resultados pudo deberse a la diferencia en el solvente utilizado para la extracción. La FAC es la siguiente fracción con mayor cantidad de fenoles, siendo esta de 140,83 ± 8,22 mg de fenoles por cada gramo de extracto seco. La FHEX presenta menor cantidad de fenoles con diferencia significativa, con un total de 54,72 ± 4,55 mg de fenoles por cada gramo de extracto seco.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el ensayo de actividad antioxidante, ya que la fracción con mayor contenido en fenoles (FAcOEt) es la que presenta mayor actividad antioxidante. De igual manera, la fracción con menor contenido en fenoles (FHEX) presenta menor actividad antioxidante.

4.3.3. Análisis cuantitativo de flavonoides totales.

El contenido de flavonoides totales se cuantificó utilizando la RU como patrón de referencia, realizándose soluciones seriadas para obtener una recta de calibrado en la que la concentración se representó en el eje de abscisas frente a la absorbancia en el eje de ordenadas (Figura 18). La ecuación de la recta se obtuvo por el método de mínimos cuadrados, asegurando la linealidad

del rango de concentraciones utilizado (R^2 = 0,994) y así poder cuantificar los flavonoides presentes en las muestras.

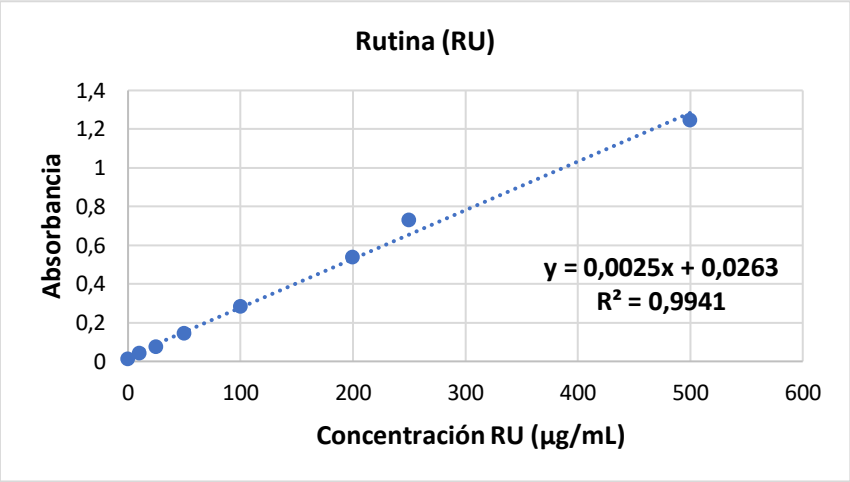


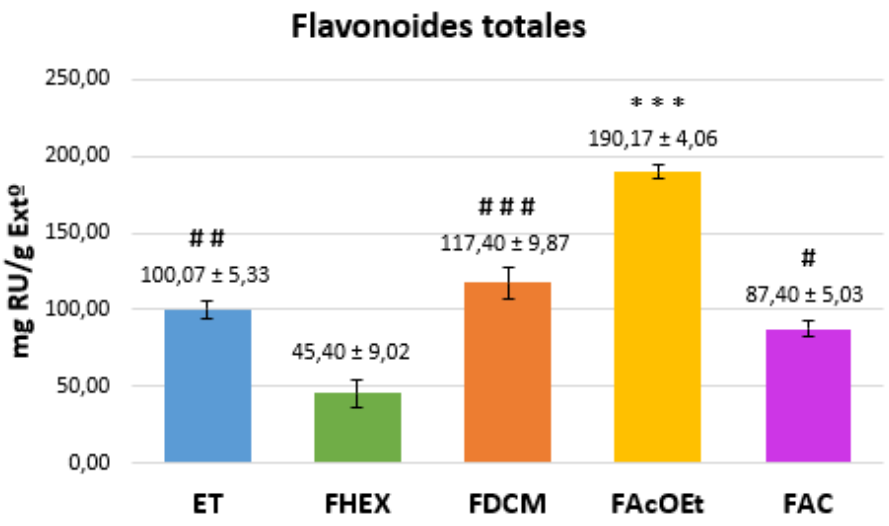
Figura 18. ***Recta de calibrado de la rutina.***

Los valores obtenidos tras la extrapolación en la recta se muestran en la Tabla 4:

Muestras	*Concentración de flavonoides (µg RU/mL)*
ET	20,01 ± 1,07
HEX	9,08 ± 1,80
DCM	23,48 ± 1,97
AcOEt	38,01 ± 0,81
FAC	17,48 ± 1,01

Tabla 4. ***Concentración de flavonoides de muestras tras extrapolación en la recta. Resultados expresados como media ± error (n=3).***

Por último, se calculó la cantidad de flavonoides totales presentes en las muestras expresándose el resultado en mg de RU por cada gramo de extracto seco (Figura 19).



<u>Figura 19.</u> Contenido en flavonoides totales expresados en mg RT/g extracto seco. Resultados expresados como media ± error (n=3). Test ANOVA + Tukey.

FAcOEt vs. ET, FHEX, FDCM y FAC: *** (p < 0,001).

FHEX vs. FDCM: # # # (p < 0,001).

FHEX vs. ET: # # (p < 0,01).

FHEX vs. FAC: # (p < 0,05).

Analizando los resultados obtenidos, se observa que la FAcOEt es la que contiene mayor cantidad de flavonoides con diferencia significativa, siendo de 190,07 ± 4,06 mg de flavonoides expresados como RU por cada gramo de extracto seco. La siguiente fracción con mayor cantidad de flavonoides es la FDCM, con 117,40 ± 9,87 mg de flavonoides por gramo de extracto seco. Por último, la fracción con menor contenido en flavonoides, con diferencia significativa, es la FHEX con un total de 45,50 ± 9,02 mg de flavonoides por gramo de extracto seco. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el ensayo de fenoles totales y demuestra su alto contenido en flavonoides, como se describe en estudios de otros autores (Alirezalu et al., 2019).

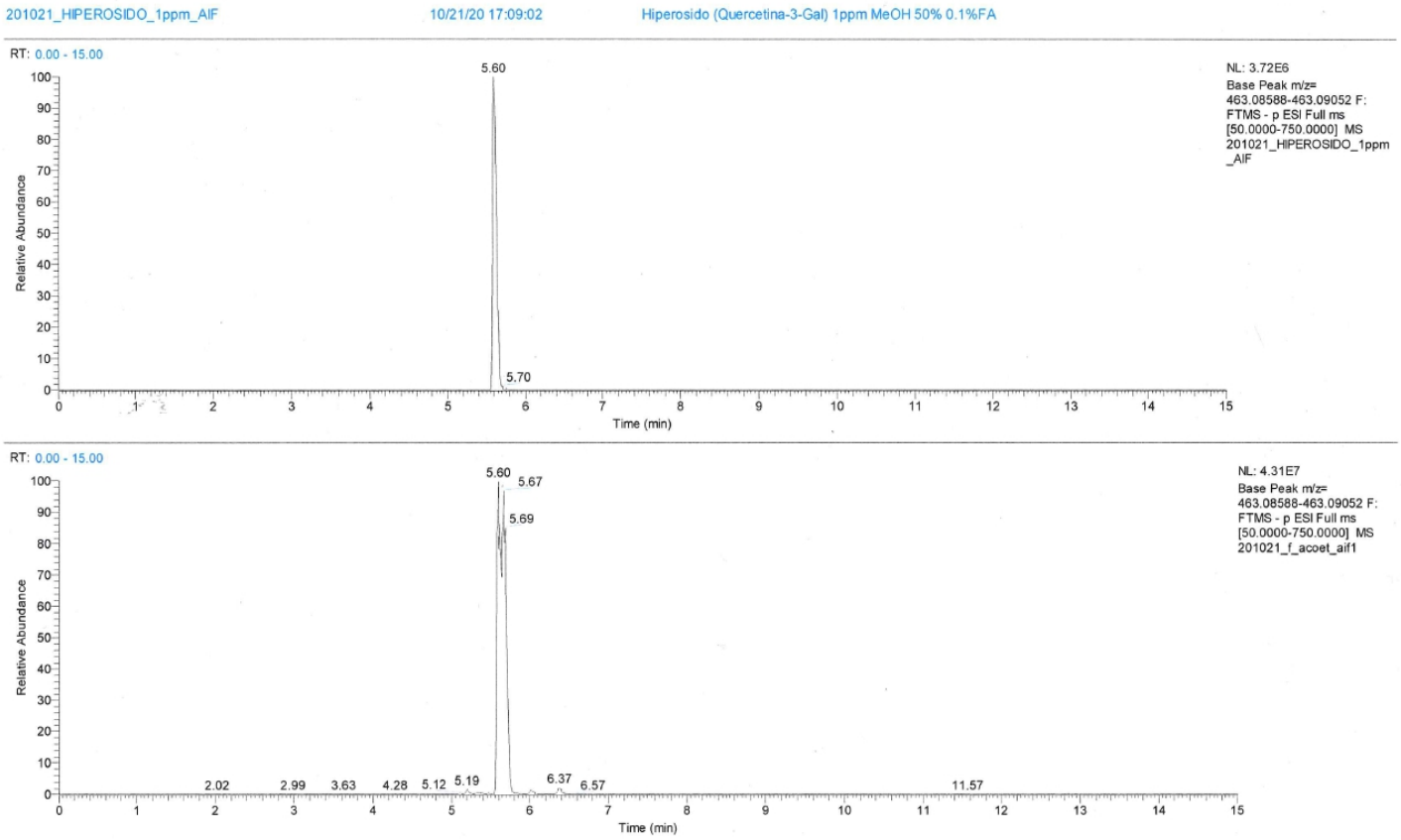
Los resultados obtenidos coinciden con los ensayos realizados de actividad antioxidante y fenoles totales, puesto que la fracción que presentaba mayor actividad antioxidante y contenido en fenoles (FAcOEt) es la que presenta mayor contenido en flavonoides.

Por tanto, queda demostrado que el acetato de etilo es un disolvente adecuado para la extracción de compuestos fenólicos, entre ellos, flavonoides.

4.3.4. Perfil fitoquímico de la fracción más antioxidante mediante HPLC-EM.

Para analizar el perfil fitoquímico de la FAcOET se preparó una solución de 3 mg/mL utilizando metanol al 50% con 0,1% de ácido fórmico. Tras realizar la HPLC-EM se identificaron de forma cualitativa los compuestos que se disponen en la Tabla 5 con un alto porcentaje de fiabilidad (Tabla 5). Para la determinación cuantitativa se procedió a inyectar 1 ppm de los patrones correspondientes y disponibles.

En la Figura 20 mostramos el cromatograma del hiperósido patrón y el de la muestra (Figura 20). Los resultados serán analizados posteriormente.



<u>Figura 20.</u> Cromatogramas obtenidos mediante HPLC-EM del patrón de hiperósido 1ppm (arriba) y de la FAcOET (abajo).

Compuestos	*+/-*	*Área*	*RT*	*Fórmula*	*m/z*
Ácido quínico	-	1,53E+08	0,53	C7H12O6	191,05589
Ácido L(-)-málico	-	2,78E+08	0,55	C4H6O5	133,01408
Ácido succínico	-	3,28E+08	0,93	C4H6O4	117,01912
Ácido gálico	-	3,59E+07	1,12	C7H6O5	169,01401
Ácido protocatequico	-	7,00E+08	2,26	C7H6O4	153,01912
Ácido gentísico	-	2,16E+07	3,29	C7H6O4	153,01912
Ácido 4-hidroxibenzoico	-	7,13E+08	3,38	C7H6O3	137,02415
Ácido clorogénico	-	2,25E+08	3,88	C16H18O9	353,08728
Ácido dihidrocafeico	-	5,21E+06	3,90	C9H10O4	181,05043
Procianidina B2	-	8,45E+06	3,90	C30H26O12	577,13434
Ácido 4-O-cafeoilquinico	-	3,76E+07	4,07	C16H18O9	353,08722
Ácido cafeico	-	2,88E+08	4,07	C9H8O4	179,03477
Epicatequina	-	7,34E+07	4,38	C15H14O6	289,0715
Ácido p-cumarico	-	3,29E+08	4,85	C9H8O3	163,03989
Taxifolina	-	5,94E+06	5,05	C15H12O7	303,05051
Ácido ferúlico	-	3,59E+07	5,16	C10H10O4	193,05031
Ácido sinápico	-	2,59E+07	5,22	C11H12O5	223,06081
Ácido giberélico (GA3)	-	1,61E+07	5,30	C19H22O6	345,13361
Genistina	-	6,80E+07	5,35	C21H20O10	431,09781
Vitexina	-	6,80E+07	5,35	C21H20O10	431,09781
Isovitexina	-	1,69E+07	5,56	C21H20O10	431,09756
Hiperósido	-	3,14E+08	5,60	C21H20O12	463,08804
Rutina	-	1,07E+07	5,64	C27H30O16	609,14502
Ácido salicílico	-	1,80E+08	5,83	C7H6O3	137,02415
Kaempferol-3-O-Glc	-	7,96E+07	6,10	C21H20O11	447,09274
Luteolin-4'-O-Glc	-	7,96E+07	6,10	C21H20O11	447,09274
Quercitrina	-	7,96E+07	6,10	C21H20O11	447,09274
Eriodictiol	-	1,34E+07	6,30	C15H12O6	287,05569
Ácido abscísico	-	8,27E+07	6,59	C15H20O4	263,12851
Quercetina	-	1,33E+07	6,68	C15H10O7	301,03485
Naringenina	-	5,71E+07	6,83	C15H12O5	271,06088
Ácido jasmónico	-	4,83E+07	7,17	C12H18O3	209,11803
Kaempferol	-	1,10E+08	7,24	C15H10O6	285,04016

Tabla 5. ***33 compuestos confirmados mediante HPLC-EM en la FAcOEt, ordenados por RT creciente.***

Se identificaron 33 compuestos en el estudio de la FAcOEt, siendo la mayoría de ellos compuestos fenólicos. A continuación, se clasifican por su grupo fitoquímico:

- Ácidos alifáticos: quínico, L (-)-málico, succínico y jasmónico (hormona vegetal).
- Ácidos fenoles:
  - Serie bencénica: gálico, protocatéquico, gentísico, 4-hidroxibenzoico y salicílico.
  - Serie cinámica: clorogénico, dihidrocafeico, 4-O-cafeoilquínico, cafeico, p-cumárico, ferúlico y sinápico.
- Catequinas: procianidina B_2 y epicatequina.
- Flavonoides: en forma de genina o heterósido.
  - Flavonas: vitexina, isovitexina y luteolina 4-O-glucósido.
  - Flavanonas: taxifolina, eriodictiaol y naringenina.
  - Isoflavonas: genistina.
  - Flavonoles: kaempferol y su heterósido kaempferol 3-O-glucósido, quercetina y sus heterósidos hiperósido (3-O-galactósido), quercitrina (3-ramnósido) y rutina (3-rutinósido).
- Terpenos: ácido abscísico (sesquiterpeno) y ácido giberélico (diterpeno).

Se calculó la cantidad de hiperósido contenido en la FAcOEt a partir de las áreas del patrón y de nuestra muestra en el cromatograma, siendo su proporción en la fracción de 1,5% al igual que indican otros estudios (Nabavi et al., 2015) (Murray, 2013).

4.4. Estudio de la actividad antiinflamatoria en cultivos celulares HL60 de las fracciones más activas.

Se seleccionaron la FAcOEt y la FDCM por ser las que presentaban una mayor actividad antioxidante. Por otro lado, debido a la mayor cantidad de ácidos triterpénicos que presenta la FDCM y de que estos son compuestos con marcada actividad antiinflamatoria, se decidió estudiar dicha actividad en líneas celulares HL60.

4.4.1. Estudio de la viabilidad celular.

Para el estudio de la viabilidad celular de las FAcOEt y FDCM, se calculó el coeficiente de relación para cada una de las fracciones: CC = 0,934 para la FAcOEt y CC = 0,944 para la FDCM. Las células sin tratar fueron el control del ensayo, expresándose la viabilidad celular en porcentaje. Posteriormente se calculó el porcentaje de viabilidad celular a partir del control, obteniendo los resultados dispuestos en la siguiente tabla (Tabla 6).

Muestras	*Concentración (µg/mL)*	*Viabilidad celular (%)*
FAcOEt	0	100,00 ± 2,29
	10	111,14 ± 0,19
	50	106,77 ± 2,16
	100	98,17 ± 2,28
FDCM	0	100,00 ± 4,55
	10	116,87 ± 0,13
	50	93,86 ± 6,31
	100	69,28 ± 6,60

Tabla 6. ***Viabilidad celular de las muestras expresadas en porcentaje. Resultado expresado como media ± error (n=2).***

Estos resultados se representan en una gráfica que enfrenta las concentraciones en el eje de abscisas frente al porcentaje de viabilidad celular en el eje de ordenadas (Figura 21).

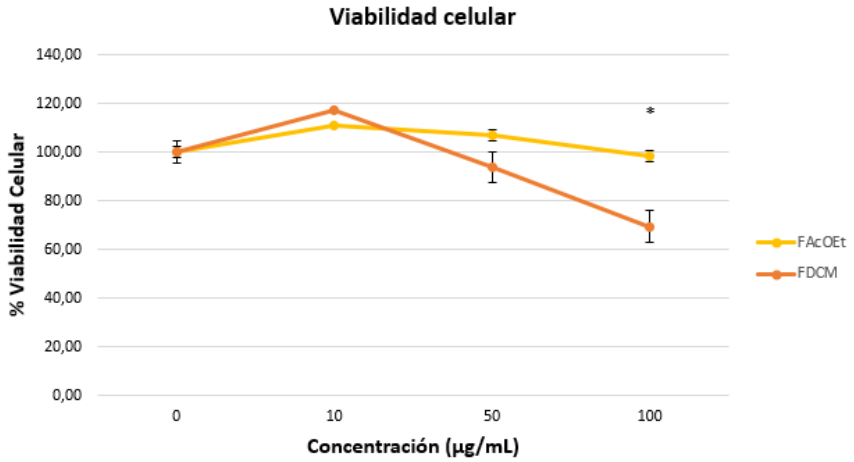


Figura 21. ***Viabilidad celular expresada en porcentaje. Resultados expresados como media ± error (n=2). Test ANOVA + Tukey. FAcOEt 100 µg/mL vs FDCM 100 µg/mL: * (p < 0,05).***

Analizando los resultados obtenidos, se observa que la FAcOEt no afecta a la viabilidad celular en el rango de concentraciones estudiadas, mientras que la FDCM produce una disminución de la viabilidad celular a la dosis de 100 µg/mL.

Para la concentración de 50 µg/mL no se aprecia una diferencia significativa en los valores de viabilidad celular. Para la concentración de 100 µg/mL, FAcOEt presenta un 98,17 ± 2,28 %, resultado significativamente mayor que el de la FDCM que presenta un 69,28 ± 6,60 %.

Atendiendo a estos valores podemos afirmar que la FDCM a esa dosis presenta cierta toxicidad ya que no alcanza el 80% de viabilidad celular, mientras que la FAcOEt no presenta toxicidad para las células.

4.4.2. Estudio de actividad enzimática de la MPO.

Las células sin tratar fueron el control del ensayo, expresando la actividad máxima de MPO en porcentaje. La actividad para cada fracción se calculó a partir del control, obteniendo los resultados dispuestos en la tabla siguiente (Tabla 7). Estos resultados se representan en una gráfica que enfrenta las concentraciones en el eje de abscisas frente al porcentaje de actividad MPO en el eje de ordenadas (Figura 22).

Muestras	Concentración (µg/mL)	Actividad MPO (%)
FAcOEt	0	100,00 ± 4,20
	10	100,60 ± 6,04
	50	50,93 ± 5,82
	100	39,12 ± 1,96
FDCM	0	100,00 ± 3,56
	10	81,57 ± 10,00
	50	57,65 ± 2,77
	100	54,23 ± 3,76

Tabla 7. ***Actividad de MPO en las muestras expresada en porcentaje. Resultado expresado como media ± error (n=4).***

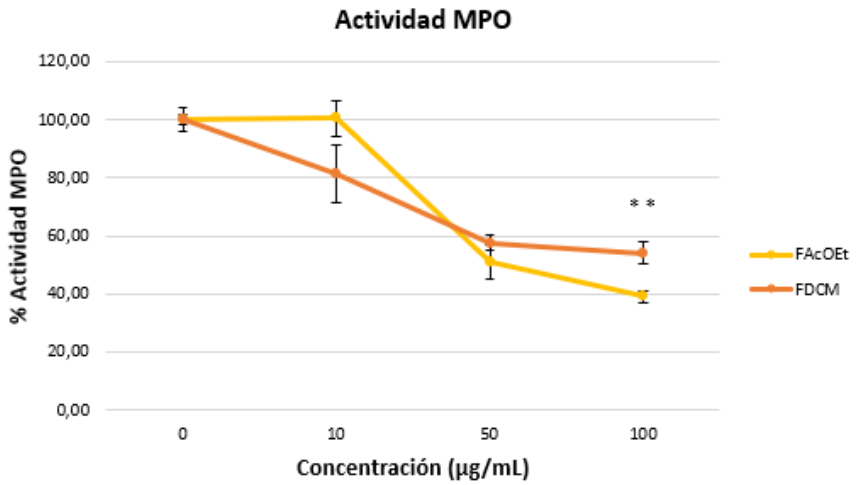


Figura 22. ***Actividad MPO expresada en porcentaje. Resultados expresados como media ± error (n=4). Test ANOVA + Tukey. FAcOEt 100 µg/mL vs. FDCM 100 µg/mL: ** (p < 0,01).***

La IC_{50} se calculó a partir de una recta de regresión en la que se representó las concentraciones de las muestras frente al porcentaje de inhibición de actividad en el eje de ordenadas. Los valores obtenidos para ambas fracciones se comparan con indometacina y se representan en un gráfico de barras (Figura 23).

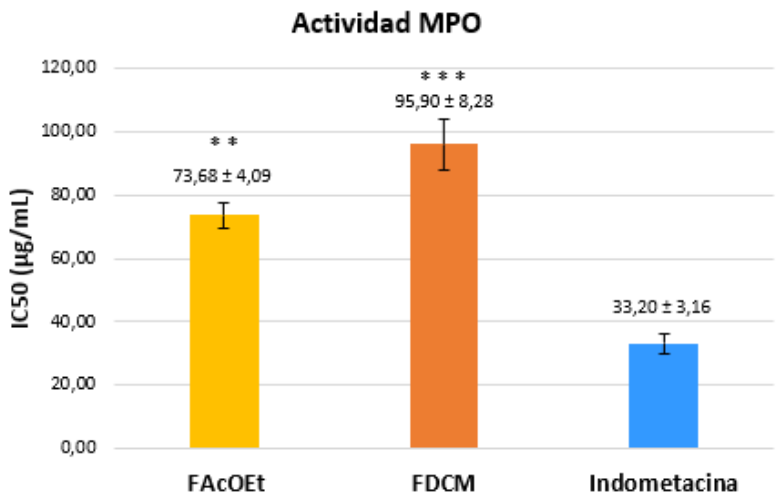


Figura 23. ***Actividad de MPO expresada como IC_{50}. Resultados expresados como media ± error (n=4). Test ANOVA + Tukey.***

Indometacina vs FAcOEt: ** ($p < 0.01$).

Indometacina vs FDCM: *** ($p < 0.001$).

A partir de 50 µg/mL, la FAcOEt inhibe con mayor potencia a la enzima que la FDCM, siendo la diferencia significativa para la dosis de 100 µg/mL. Para esta concentración, la enzima presenta una actividad de 39,12 ± 1,96 % en la FAcOEt y una actividad de 54,23 ± 3,76 % en la FDCM. Cuanto menor es la actividad enzimática, mayor es su inhibición y, por tanto, mayor es su actividad antiinflamatoria.

Analizando los valores de IC_{50} se observa que no existen diferencias significativas entre los valores de las fracciones, aunque es menor en el caso de la FAcOEt (73,69 ± 4,09 µg/mL) que en la FDCM (95,90 ± 8,28 µg/mL). Por tanto, se requiere menor cantidad de FAcOEt que de FDCM para inhibir la enzima al 50 %, es decir, la FAcOEt inhibe con mayor potencia a la enzima.

Comparando los valores de IC_{50} de las fracciones con el valor para la indometacina se observa que la indometacina (IC_{50} = 33,20 ± 3,16 µg/mL) es dos veces más potente que la FAcOEty tres veces más potente que la FDCM.

Teniendo en cuenta el ensayo de viabilidad celular, la FAcOEt es más adecuada para su uso que la FDCM, ya que presenta mayor actividad antiinflamatoria y menor toxicidad celular.

4.5. Discusión general de resultados.

Crataegus monogyna Jacq. es una especie utilizada tradicionalmente en medicina popular para tratar problemas cardiovasculares (Dahmer and Scott, 2010). Algunos autores han aislado compuestos de diferente naturaleza química, predominando los compuestos fenólicos (Nabavi et al., 2015).

El hecho de que la FAcOEt mostrase la mayor actividad antioxidante (ensayo de DPPH) y un mayor contenido en fenoles nos hizo seleccionar esta fracción para identificar sus componentes por análisis de HPLC-EM utilizando tanto el RT como la masa de los iones.

En nuestro trabajo hemos confirmado la presencia de estos compuestos polifenólicos, pudiendo identificar con la ayuda de patrones 27 compuestos. Algunos de ellos ya han sido descritos previamente como el hiperósido, la vitexina y varias catequinas. Sin embargo, muchos de ellos se describen por primera vez en esta especie como son: ácidos fenoles de la serie bencénica (gálico, protocatéquico, gentísico, 4-hidroxibenzoico y salicílico) y de la serie cinámica (clorogénico, dihidroxicafeico, 4-O-cafeoilquínico, cafeico y p-cumárico). Destacamos la detección de algunas flavanonas como: taxifolina, eriodictiol y naringenina, ya que son los flavonoles y las flavonas los más descritos para esta especie (Murray, 2013). También se describe por primera vez el ácido abscísico (sesquiterpeno) y el ácido giberélico (diterpeno).

Posteriormente, procedimos a realizar el estudio de la actividad antiinflamatoria en cultivo celular HL60 mediante la medida de la actividad de la enzima MPO, enzima abundante en neutrófilos y monocitos y que se excretan en las zonas inflamadas. El alto poder inhibitorio que presenta la FAcOEt ya fue reflejado en otros trabajos (Ranjbar et al., 2018) (Fu et al., 2013) y queda perfectamente justificada por la composición fitoquímica que presenta.

La baja toxicidad mostrada, así como la riqueza en componentes fenólicos del espino albar (*Crataegus monogyna* Jacq.), convierte esta especie vegetal en una importante fuente de moléculas con actividad farmacológica. Estudios posteriores estarán encaminados a la cuantificación de otros compuestos como los triterpénicos también existentes en esta planta y la realización de más ensayos para profundizar en su actividad antiinflamatoria.

5. CONCLUSIONES

El presente trabajo ha dado lugar a las siguientes conclusiones:

1) De todas las fracciones obtenidas a partir del extracto etanólico de *Crataegus monogyna* Jacq. es la fracción de acetato de etilo (FAcOEt) la que presenta mayor actividad antioxidante, hecho que queda justificado por el alto contenido en compuestos de naturaleza fenólica existentes en dicha fracción.

2) El análisis fitoquímico realizado a la FAcOEt por HPLC-EM determinó la presencia de 33 compuestos, 27 de ellos fenólicos: 5 ácidos fenoles de la serie bencénica y 7 de la cinámica, 2 catequinas y 13 flavonoides tanto libres como heterosídicos. Además, también se identificaron 4 ácidos alifáticos y 2 terpenos.

3) Uno de los componentes mayoritarios de la fracción de FAcOEt es el flavonoide 3-O-galactósido de la quercetina, denominado hiperósido. Dicho compuesto se encuentra en una proporción del 1,5%. Este dato coincide con lo descrito en la literatura por otros autores.

4) En el ensayo de la actividad inhibitoria de la enzima MPO realizado en cultivo celular HL60, la FAcOEt presentó una IC_{50} de 73,69 ± 4,09 µg/mL. No se observó toxicidad celular a ninguna de las dosis ensayadas.

5) El extracto etanólico y la FAcOEt obtenida del mismo, por su alto poder antioxidante y su riqueza en compuestos potencialmente activos, presentan interés como fuente de moléculas para futuras investigaciones farmacológicas, especialmente aquellas mediadas por procesos de estrés oxidativo.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abuashwashi M. A, Palomino O. M, Gómez-Serranillos M. P. Geographic origin influences the phenolic composition and antioxidant potential of wild *Crataegus monogyna* from Spain. Biol. 2016; 54(11): 2708-2713.
- Ahumada M. C, García M. D, Sáenz M. T, Aznar J. Antimitotic and cytostatic activity of Viscum cruciatum Sieber parasitic on *Crataegus monogyna* Jacq. Pharm. Acta Helv. 1995; 70(3): 233-236.
- Alirezalu A, Salehi P, Ahmadi N, Sonboli A, Aceto S, Maleki H. H. et al. Flavonoids profile and antioxidant activity in flowers and leaves of hawthorn species (*Crataegus* spp.) from different regions of Iran. Int. J. Food Prop. 2018; 21(1): 452-470.
- Bedreag C. F, Trifan A, Vasincu A, Miron S. D, Aprotosoaie A. C, Miron A. In vitro screening of *Crataegus suculenta* extracts for free radical scavenging and 15-lipoxygenase inhibitory activities. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi. 2014; 118(2): 544-550.
- Benabderrahmane W, Lores M, Benaissa O, Lamas J. P, de Miguel T, Amrani A et al. Polyphenolic content and bioactivities of *Crataegus oxycantha* L. (Rosaceae). Nat Prod Res. 2019; 5: 1-6.
- Bradley P. P, Priebat D. A, Christensen R. D, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimulation of neutrophil content with an enzyme marker. J Invest Dermatol. 1982; 78: 206-209.
- Cheng Z, Moore J, Yu L. High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. J. Agric Food Chem. 2006; 54(20): 7429-7436.
- Cuendet M, Hostettman K, Potterat O. Iridoid glycosides with free radical scavenging properties from *Fagraeae blumei*. Helv Chim Acta. 1997; 80: 1144-1152.
- Cueto M, Giménez E. Crataegus L. En: Blanca G, Cabezudo B, Cueto M, Fernández López C, Morales Torres C, eds. Flora Vascular de Andalucía Oriental 3. Sevilla: Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía; 2009. p. 33-34.
- Dahmer S, Scott E. Health effects of hawthorn. Am Fam Physician. 2010; 81(4): 465-468.
- Fu J. H, Zheng Y. Q, Li P, Li X. Z, Shang X. H, Liu J. X. Hawthorn leaves flavonoids decreases inflammation related to acute myocardial ischemia/reperfusión in anesthetized dogs. Chin J Integr Med. 2013; 19(8): 582-588.
- Ganie S. A, Ali Dar T, Zargar S, Bhat A. H, Dar K. B, Masood A. et al. *Crataegus songarica* methanolic extract accelerates enzymatic status in kidney and heart tissue damage in albino rats and its in vitro cytotoxic activity. Pharm. Biol. 2016; 54(7), 1246-1254.

- García M. D, Sáenz M. T, Ahumada M. C, Cert A. Isolation of three triterpenes and several aliphatic alcohols from *Crataegus monogyna* Jacq. J. Chromatogr. A. 1997; 767(1-2): 340-342.
- Holubarsch C. J. F, Colucci W. S, Eha J. Benefit-Risk Assessment of Crataegus Extract WS 1442: An Evidence-Based Review. Am J Cardiovasc Drugs. 2018; 18(1): 25-36.
- Hummer K. E, Janick J. Rosaceae: Taxonomy, Economic Importance, Genomics. En: Folta K. M, Gardiner S. E, eds. Genetics and Genomics of Rosaceae. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models 6. Nueva York: Springer; 2009. p. 1-18.
- Koch E, Malek F. A. Standardized extracts from hawthorn leaves and flowers in the tratment of cardiovascular disorders--preclinical and clinical studies. Planta Med. 2011; 77(11): 1123-1128.
- Lamaison J, Carnat A. Teneurs en principaux flavonoïdes des fleurs et des feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq. et de *Crataegus laevigata* (Poiret).D.C.(Rosaceae). Pharm. Acta Helv. 1990; 65: 315–320.
- Medina M. B. Simple and rapid method for the analysis of phenolic compounds in beverages and grains. J Agric Food Chem. 2011; 59: 1565-1571.
- Murray M. T. *Crataegus oxycantha* (Hawthorn). En: Pizzorno J. E, Murray M. T, eds. Textbook of Natural Medicine. 4ª ed. St. Louis: Elsevier; 2013. p. 694-697.
- Nabavi S. F, Habtemariam S, Ahmed T, Sureda A, Daglia M, Sobarzo-Sánchez E, Nabavi S. M. Polyphenolic Composition of *Crataegus monogyna* Jacq.: From Chemistry to Medical Applications. Nutrients. 2015; 7(9): 7708-7728.
- Quettier-Deleu C, Voiselle G, Fruchart J. C, Duriez P, Teissier E,Bailleul F. et al. Hawthorn extracts inhibit LDL oxidation. Pharmazie. 2003; 58(8): 577-581.
- Ranjbar K, Zarrinkalam E, Salehi I, Komaki A, Fayazi B.Cardioprotective effect of resistance training and *Crataegus oxycantha* extract on ischemia reperfusión-induced oxidative stress in diabetic rats. Biomed Pharmacother. 2018; 100: 455-460.
- Rapoport E. H. Plantas comestibles no convencionales. 1ª ed. Córdoba: El Cid editor; 2014.
- Rico M. G. Perfil fitoquímico y actividad antioxidante de flores de Helicriso (*Helichrysum Picardii* Boiss. & Reuter). 2019 [en línea]. [Consultado en Abril 2020]. Disponible en: https://idus.us.es/handle/11441/91521.
- Rigelsky J. M, Sweet B. V. Hawthorn: pharmacology and therapeutic uses. Am J Health Syst Pharm. 2002; 59(5): 417-422.
- Sánches-Moreno C, Larrauri J. A, Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. J. Sci. Food Agric. 1998; 76: 270-276.

- Silva F. S. G, Startina I. G, Ivanova V. V, Rizvanov A. A, Oliveira P. J, Pereira S. P. Determination of metabolic viability and cell mass using a tándem resazurin/sulforhodamine B assay. Curr Protoc toxicol. 2016; 68: 2.24.1-2.24.15.
- Singleton V. L, Rossi J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-Phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic. 1965; 16: 144-158.
- Vanaclocha B. Espino albar [en línea]. Fitoterapia.net. [Consultado en Febrero 2020]. Disponible en:

https://www--fitoterapia--net.us.debiblio.com/vademecum/plantas/index.html?planta=50.

- Wang X, Zhang C, Peng Y, Zhang H, Wang Z, Gao Y. et al. Chemical constituents, antioxidant and gastrointestinal transit accelerating activities of dried fruit of *Crataegus dahurica*. Food Chem. 2018; 246: 41-47.
- Wu M, Liu L, Xing Y, Yang S, Li H, Cao Y. Roles and Mechanisms of Hawthorn and Its Extracts on Atherosclerosis: A Review. Front. Pharmacol. 2020; 11: 118.
- Zorniak M, Szydlo B, Krzeminski T. F. Crataegus special extract WS 1442: up-to-date review of experimental and clinical experiences. J Physiol Pharmacol. 2017; 68(4): 521-526.