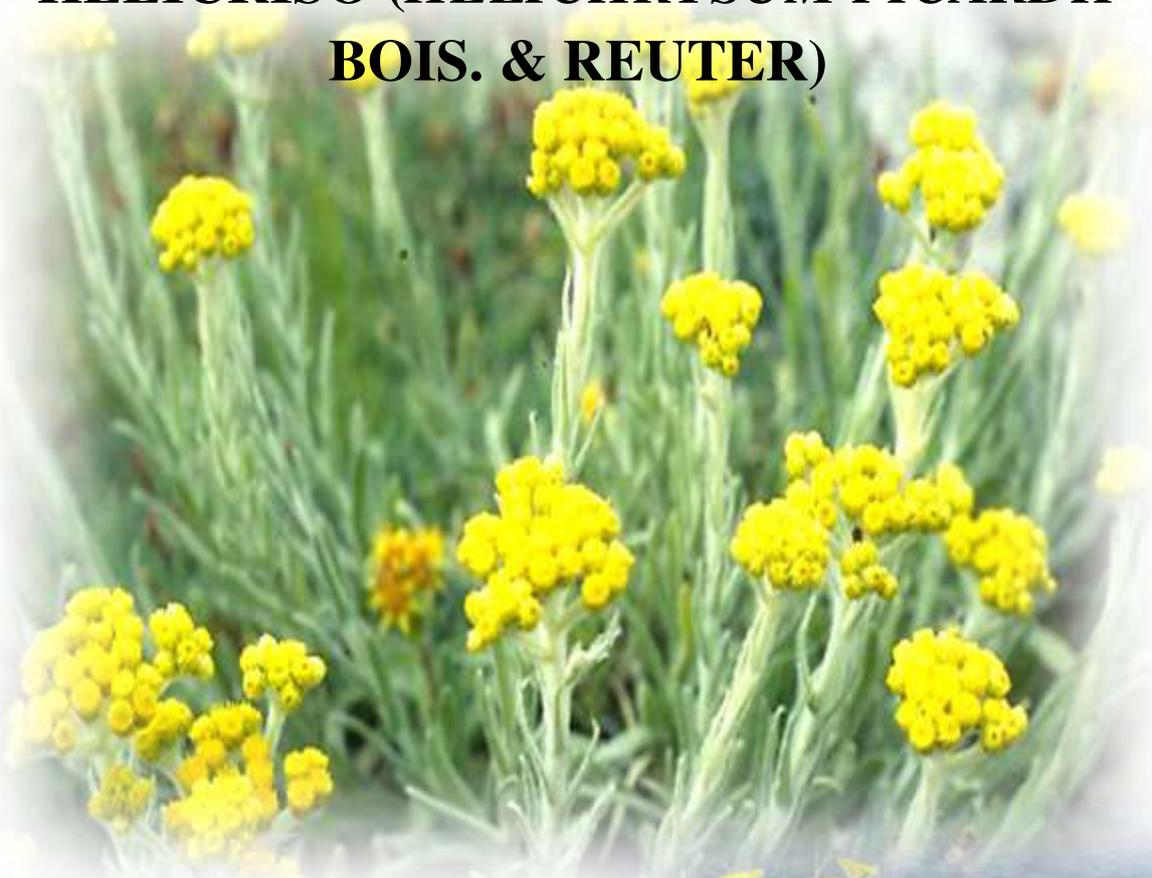




UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE  
FARMACOLOGÍA



**PERFIL FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD  
ANTIOXIDANTE DE FLORES DE  
HELICRISO (*HELICHRYSUM PICARDII*  
BOIS. & REUTER)**



M<sup>a</sup> Guadalupe Rico Suárez



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**DEPARTAMENTO DE**  
**FARMACOLOGÍA**



**TRABAJO FIN DE GRADO**  
**GRADO EN FARMACIA**

**PERFIL FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**  
**DE FLORES DE HELICRISO ( *HELICHRYSUM PICARDII***  
**BOISS. & REUTER)**

M<sup>a</sup> Guadalupe Rico Suárez

*Julio de 2019*

*Facultad de farmacia*

**TUTORES:**

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

M<sup>a</sup> Dolores García Giménez, Catedrática de la Universidad de Sevilla.

**TRABAJO EXPERIMENTAL**

## **RESUMEN**

En el presente estudio se realizó la caracterización fitoquímica del extracto etanólico de los capítulos florales de *Helichrysum picardii*. El extracto obtenido por maceración con etanol de 80° fue fraccionado mediante extracción líquido-líquido con disolventes de diferentes polaridades: n-hexano, diclorometano y acetato de etilo.

Se realizó un estudio fitoquímico mediante cromatografía en capa fina donde se pudo identificar el flavonoide metoxilado gnaphalina y el triterpeno ácido ursólico en la fracción de diclorometano y gnaphalina, kaempferol y quercitrina en el extracto etanólico y en la fracción de acetato de etilo. Tras revelar con una solución de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo), todas las fracciones mostraron un alto número de compuestos antioxidante.

Para poder relacionar la composición química con la capacidad antioxidante se calculó la cantidad de fenoles totales utilizando como patrón el ácido gálico. Por otro lado, se determinó la cantidad total de flavonoides utilizando como patrón el heterósido flavónico rutina. La fracción en acetato de etilo fue la que presentó mayor cantidad de fenoles y flavonoides, expresados en  $238,54 \pm 14,43$  mg de ácido gálico/g de extracto seco y de  $84,25 \pm 1,91$  mg de rutina/g de extracto seco, respectivamente.

Posteriormente, se realizó la determinación cuantitativa de la actividad antioxidante por el ensayo de captación del radical DPPH. La fracción de acetato de etilo presentó una actividad significativa con una  $IC_{50}$  de  $11,5 \pm 0,34$   $\mu$ g/ml, coincidiendo con el mayor contenido en fenoles totales. Por tanto, seleccionamos dicha fracción para realizar su caracterización fitoquímica mediante HPLC-EM, donde pudimos identificar hasta 34 compuestos entre ácidos fenoles y otros ácidos orgánicos, y flavonoides.

Podemos concluir que el extracto etanólico de esta especie y en particular la fracción obtenida con acetato de etilo, por su potente actividad antioxidante, serían de interés en la elaboración de preparaciones farmacéuticas efectivas frente al daño producido por el estrés oxidativo.

**Palabras claves:** *Helichrysum*, capítulos florales, compuestos fenólicos, flavonoides, actividad antioxidante.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Botánica, <i>Helichrysum picardii</i> Boiss. & Reuter ( <i>Helichrysum serotinum</i> subsp. <i>picardii</i> (Boiss & Reut.) “Galbany, L. Sáez & Benedí).....	3
1.2. Composición química.....	4
1.3. Uso tradicional.....	7
1.4. Actividades farmacológicas y usos terapéuticos.....	7
2. OBJETIVOS.....	10
3. METODOLOGÍA.....	11
3.1. Recolección del material vegetal.....	11
3.2. Obtención y fraccionamiento del extracto etanólico.....	11
3.3. Estudio de las fracciones por cromatografía en capa fina.....	11
3.4. Análisis cuantitativo de fenoles totales.....	14
3.5. Análisis cuantitativo de flavonoides totales.....	15
3.6. Estudio de la actividad antioxidante de las fracciones.....	16
3.7. Análisis fitoquímico de la fracción de acetato de etilo mediante HPLC-EM.....	17
3.8. Análisis estadístico.....	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
4.1. Rendimiento de los extractos y las fracciones.....	19
4.2. Análisis del extracto y las fracciones por cromatografía en capa fina	19
4.3. Análisis cuantitativo de fenoles totales.....	23
4.4. Análisis cuantitativo de flavonoides totales.....	26
4.5. Estudio de la actividad antioxidante de los extractos y fracciones....	28
4.6. Perfil fitoquímico de la fracción de acetato de etilo mediante HPLC/EM.....	30
5. CONCLUSIONES.....	35
6. BIBLIOGRAFÍA.....	36

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1. Botánica, *Helichrysum picardii* Boiss. & Reuter (*Helichrysum serotinum* subsp. *picardii* (Boiss & Reuter) “Galbany, L. Sáez & Benedí).**

Comúnmente llamada Helicriso o Sol del oro, su nombre científico es *Helichrysum picardii* Boiss. & Reuter, es una planta halófila facultativa que pertenece al género *Helichrysum* y a la familia Asteraceae o Compositae, la cual está formada por aproximadamente 600 especies en todo el mundo, especialmente en el hemisferio sur. Los miembros de este género son generalmente hierbas aromáticas, arbustos anuales o perennes con un alto nivel de polimorfismo. En el área mediterránea se encuentran casi 25 especies nativas (Leonardi et al., 2018).

En España, comparte nombres comunes con otras especies del mismo género como siempreviva amarilla, siempreviva del monte, sol de oro, perpetua o tomillo yesquero. En inglés también se conoce como flor eterna, inmortelle o arena eterna (Les et al., 2017).

El nombre científico de la planta viene del griego: helios (sol) y chrysus (oro) (Maksimovic et al., 2017). Desde hace siglos es apreciada por sus propiedades medicinales y se usa desde la antigüedad en la preparación de recetas culinarias y en la medicina tradicional.

Las características morfológicas de las flores de *Helichrysum picardii* son las siguientes (figura 1):

- Capítulo 4–6.5 mm × 2–3.5 (4.5) mm, con 7–22 (26) flósculos
- Floretes pistilados (0) 1–7 (9)
- Flósculos hermafroditas 5–17 (18).
- Corola de los flósculos pistilados de 2.5–4 mm de largo.
- Corola de los flósculos hermafroditas de 3–4.5 mm de largo.(Galbany-Casals et al., 2006).



**Figura 1.** Dibujo de los capítulos florales de *Helichrysum picardii* Boiss. & Reuter (Valdés et al., 1987).

Florece en marzo, y puede llegar hasta agosto en flor. En invierno, aún conservan las inflorescencias secas y estivales, ya que sufren una floración invernal muy débil (Galbany-Casals et al., 2006).

Las hojas de la planta son de pequeño tamaño, estrechas y de color plata lo que confiere a la planta una mejor conservación del agua. Desprende un aroma que recuerda a una mezcla entre regaliz, curry y romero (Porru, 2019).

Dicha planta se puede encontrar en algunas zonas del Sur de Europa, incluido Portugal. Concretamente se encuentran en la costa occidental de la península ibérica y en el norte de Marruecos (Valdés et al., 1987). Crece con la luz del sol, en zonas áridas, pedregosas (Leonardi et al., 2018), en suelos marinos arenosos, con un rango latitudinal de 0 a 30 m (Galbany-Casals et al., 2006).

### **1.1. Composición química.**

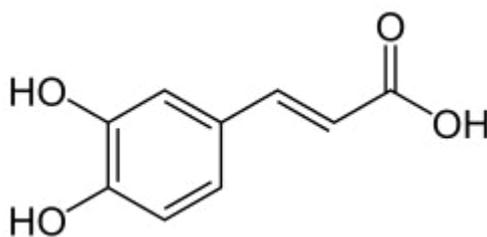
Las especies de *Helichrysum* se caracterizan por su contenido en metabolitos secundarios como floroglucinoles, destacando el arzanol, monoterpenos, sesquiterpenos,

triterpenos, fenoles y flavonoides, todos ellos responsables de la actividad antiinflamatoria, antiviral, antifúngica y antimicrobianas que presentan sus extractos, motivo por el cual se utilizan en muchas preparaciones cosméticas y farmacéuticas (Leonardi et al., 2018).

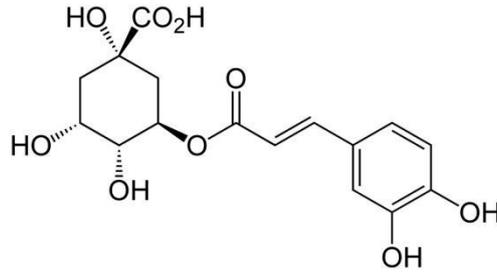
En estudios previos de nuestro grupo de investigación se han obtenido e identificado distintos principios activos de los capítulos florales de la especie *H. picardii* Boiss. & Reuter, como triterpenos, flavonoides y cumarinas (De la Puerta et al., 1993). Igualmente se llevó cabo el análisis del aceite esencial (De la Puerta et al., 1990).

Recientemente, Pereira y colaboradores han realizado un estudio centrado en los extractos orgánicos acuosos de esta especie, de forma que se ha determinado una amplia variedad de moléculas bioactivas destacando los compuestos fenólicos y terpénicos. Además, estos autores han realizado estudios in vitro que demuestran sus propiedades antimicrobianas y antiinflamatorias, y comprobaron la ausencia de toxicidad de los extractos en cultivos celulares (Pereira et al., 2017).

En este mismo estudio, fueron analizados las infusiones y decocciones de distintas partes de la planta: raíces, hojas y tallos, y flores. Se describen que las tisanas de sumidades floridas de *Helichrysum picardii* tienen un alto contenido en polifenoles. Se identificaron como principales compuestos fenólicos el ácido cafeico (figura 2), el ácido quínico, el ácido clorogénico (figura 3) y los flavonoides, gnaphalina, astragalina (kaempferol 3-O-glucósido), hiperina, isoquercitrina (isómeros), naringenina-7-O-glucósido y quercitrina (Pereira et al., 2017).



**Figura 2. Estructura ácido cafeico.**

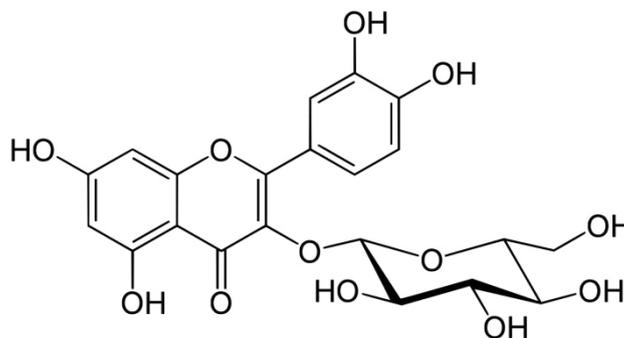


**Figura 3. Estructura ácido clorogénico.**

Sin embargo, algunos estudios se centran en la composición del aceite esencial de especies de *Helichrysum*, destacando una gran cantidad de monoterpenoides como el acetato de nerilo, propanoato de nerilo y  $\alpha$ -pinemo (Leonardi et al., 2013) (Mastelic et al., 2005).

Otros estudios han determinado en el extracto metanólico de especies de *Helichrysum* principalmente el ácido clorogénico, la apigenina 7-O-glucósido y su aglicona (Albayrak et al., 2010).

En otras investigaciones analizaron el extracto metanólico de las flores de *H. italicum* mediante cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a la espectrometría de masas obteniendo 14 compuestos entre distintos tipos de flavonoides, fenilpropanoides y acilbenzofurano como ácido cafeico, ácido clorogénico, quercetina 3-O-glucósido (figura 4), (Mari et al., 2014), kaempferol 3-O-glucósido (Facino et al., 1990). También se ha aislado el flavonoide Gnaphalina de *H. italicum* y se ha estudiado su capacidad para inhibir la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Schinella et al., 2007).



**Figura 4. Estructura de la quercetina 3-O-glucósido.**

En otras especies como *H. arenarium* se han identificado como principales compuestos los flavonoides destacando kaempferol, quercetina, luteolina, apigenina y sus heteróxidos. También se han determinado ácidos fenólicos como el ácido cafeico, el ácido p-cumárico y el ácido ferúlico (Pljevljakušić et al., 2018).

El ácido cafeico, presente en la mayoría de las especies de *Helichrysum*, ha demostrado tener efectos beneficiosos para la salud: antioxidante, anti-inflamatorio, antibacteriano e inmunomodulador (Armutcu et al., 2015).

## **1.2. Uso tradicional.**

Debido a su aroma y a su característico olor a curry, en algunas zonas mediterráneas se utiliza en la cocina, como especia. En Italia se usa para la preparación de licores digestivos (Viegas et al., 2014).

El uso de esta planta se ha redescubierto hace unas décadas aunque desde hace siglos los griegos ya conocían las propiedades medicinales de *Helichrysum*. Se ha utilizado como planta curativa en varios países a lo largo de la historia. Dioscórides lo aconsejaba para las mordeduras de las serpientes, los turcos la tomaban para paliar las digestiones pesadas y la distensión abdominal (Porru, 2019). Según la medicina popular, su uso puede ser beneficioso para el cuidado y tratamiento de afecciones de la piel y mucosas como micosis dérmicas, eczemas, etc. También para afecciones de las vías respiratorias como sinusitis, rinitis, gripe, tos, y resfriado; alergias respiratorias y alteraciones digestivas como gastritis y hepatitis (Mari et al., 2014).

Tradicionalmente se le han atribuido propiedades medicinales, actualmente avaladas por pruebas científicas (Porru, 2019).

Entre sus aplicaciones las flores se pueden utilizar mediante infusiones y decocciones para tomar o para aplicar por vía tópica con el fin de tratar infecciones e irritaciones de la piel, encías y ojos; trastornos o enfermedades como gripe, resfriado, fiebre o nerviosismo. También se ha descrito el uso como diurético, en afecciones de la vejiga urinaria, y en problemas digestivos y de páncreas (Porru, 2019).

## **1.3. Actividades farmacológicas y usos terapéuticos.**

Los compuestos fenólicos son producidos por la planta como metabolitos secundarios responsables de la reacción a presiones externas como por ejemplo la depredación, las

infecciones por patógenos, los parásitos y/o las heridas. El contenido de fenoles puede aumentar en condiciones de estrés abiótico, ya que las plantas halófilas, como las del género *Helichrysum*, tienen que combatir condiciones extremas de temperatura, radiación UV, salinidad o sequía para poder crecer y reproducirse. Por ello, el estrés abiótico aumenta la producción y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) lo cual requiere un poderoso sistema antioxidante como los polifenoles, para contrarrestar las ROS y proteger las estructuras celulares y metabólicas del daño producido por el estrés oxidativo (Pereira et al., 2017).

Investigaciones in vivo han demostrado las actividades antiinflamatorias y antioxidantes del extracto metanólico de *H. italicum* ya que tiene capacidad de inhibir a las enzimas inflamatorias, de inhibir la peroxidación lipídica y de eliminar los radicales libres (Sala et al., 2002).

Una especie próxima, *H. stoechas*, ha demostrado propiedades antiproliferativas, antioxidantes, antidiabéticas y neuroprotectoras (Les et al., 2017).

Otra especie estudiada por sus propiedades antiespasmódicas fue *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. *italicum* (Rigano et al., 2013).

Para plantas de la misma especie, estudios biológicos han evidenciado propiedades antimicrobianas, anti-inflamatorias y antioxidantes (Albayrak et al., 2010).

En el caso del uso para tratar problemas digestivos leves ha sido aprobado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) solo para la especie *Helichrysum arenarium*, mediante la infusión o decocción de sus flores (Les et al., 2017).

Para esta *H. italicum*, la posología indicada por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) es de 3 g de droga por taza de agua caliente y dejar en infusión durante 10 min antes de filtrar. Aunque su uso está contraindicado en personas que padecen obstrucción biliar y otras afecciones relacionadas y/o con alergia a la familia de las compuestas. Debido a la falta de estudios durante el embarazo y la lactancia tampoco es recomendable su uso en dichas situaciones (Porru, 2019).

En el mercado se pueden encontrar diferentes formulaciones que contienen el extracto de *Helichrysum italicum*:

- Cremas y aceites para reumatismos.
- Aceites y pomadas calmantes para infecciones tópicas.
- Infusiones digestivas y diuréticas.
- Aceite esencial de *Helichrysum* de uso tópico para reducir hematomas.
- Cremas hidratantes y jabones a base de *Helichrysum* para la higiene y cuidado de la piel (Porru, 2019).

Algunos autores concluyen que las sumidades floridas de *Helichrysum picardi* (sinónimo de *Helichrysum italicum* subsp *picardii* Franco) pueden ser de utilidad para el control de los niveles de glucosa en combinación con otras estrategias antidiabéticas, al inhibir las enzimas digestivas de carbohidratos de la dieta e hiperglucemia post-pandrial (Pereira et al., 2017).

## **2. OBJETIVOS.**

El objetivo general de este trabajo es realizar un estudio encaminado a investigar la composición fitoquímica y valorar la actividad antioxidante y captadora de radicales libres del extracto etanólico obtenido a partir de los capítulos florales de la especie *Helichrysum picardii* Boiss. & Reuter, así como de las fracciones obtenidas a partir de dicho extracto con disolventes de distinta polaridad. Los objetivos específicos del trabajo son los siguientes:

- ✓ Obtención y fraccionamiento del extracto etanólico.
- ✓ Análisis cualitativo de los compuestos fenólicos.
- ✓ Análisis cuantitativo de los fenoles totales.
- ✓ Análisis cuantitativo de flavonoides totales.
- ✓ Estudio de la actividad antioxidante.
- ✓ Perfil fitoquímico de la fracción de acetato de etilo por HPLC-EM.

### **3. METODOLOGÍA**

#### **3.1. Recolección del material vegetal.**

El material vegetal fue recolectado en terrenos arenosos de los pinares del Puerto de Santa María (Cádiz) situados en la margen derecha del río Guadalete en el sector de las dunas de San Antón, en el mes de Julio de 2018 durante la época de floración.

Las muestras fueron desecadas en el laboratorio a temperatura media entre 25-30 °C.

El material vegetal ha sido determinado en el Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Farmacia, quedando depositado un ejemplar testigo del mismo en el herbario de dicha Facultad (SEV-F).

#### **3.2. Obtención y fraccionamiento del extracto etanólico.**

Se pesaron 50 gramos de los capítulos florales y se trocearon con el fin de obtener fragmentos más pequeños y conseguir una extracción más eficaz. Para obtener el extracto etanólico (EHE) se hizo una maceración del material vegetal a temperatura ambiente y en oscuridad durante 24 horas con 500 ml de etanol 80°. Una vez filtrado se repitió la maceración con un nuevo volumen de etanol de 80°. El conjunto de los filtrados, se llevó a sequedad en rotavapor, a vacío y presión reducida para evaporar el solvente, a una temperatura de 40°C aproximadamente. Posteriormente, se calculó el rendimiento del extracto referido a planta seca.

Para el fraccionamiento, el residuo seco se redisolvió en 50 ml de una mezcla de acetona/agua (1:1) y posteriormente se realizó una extracción líquido-líquido utilizando disolventes con diferentes polaridades. La extracción se realizó en embudo de decantación hasta agotamiento utilizando sucesivamente n-hexano, diclorometano y acetato de etilo. Finalmente, las fracciones obtenidas se llevaron a sequedad y a presión reducida en rotavapor, calculándose posteriormente los rendimientos obtenidos.

#### **3.3. Estudio de las fracciones por cromatografía en capa fina.**

La cromatografía en capa fina es una técnica que tiene como finalidad la separación e identificación de los diferentes compuestos que forman parte de una muestra

determinada, utilizando una fase estacionaria (cromatofolio de silicagel) y distintas fases móviles preparadas con diferentes disolventes.

Bajo unas condiciones experimentales establecidas, un compuesto dado puede recorrer una determinada distancia a lo largo de la placa. Se denomina  $R_f$  a la relación existente entre la distancia recorrida por el compuesto y la recorrida por el disolvente en el mismo tiempo. Los valores de  $R_f$  para un determinado compuesto varían ampliamente con los cambios de disolvente.

$$R_f = \text{frente del soluto} / \text{frente del disolvente}$$

Los compuestos polifenólicos, se pueden identificar debido a sus propiedades de fluorescencia en la luz ultravioleta, por reacciones coloreadas con agentes específicos, por los valores de  $R_f$  derivados de la cromatografía en capa fina y por sus características espectrales. Una gran variedad de compuestos fenólicos han sido identificados por cromatografía en capa fina. (Lederer y Lederer, 1957).

❖ Materiales y reactivos:

- ✓ Cubeta de vidrio con tapa.
- ✓ Fase estacionaria: Cromatofolios de silicagel (Merck®).
- ✓ Disolventes: diclorometano/metanol (4,5:0,5), acetato de etilo/ác. fórmico/ác. acético/agua (100:11:11:26), hexano/acetato de etilo/metanol (5:80:15).
- ✓ Pipetas de vidrio.
- ✓ Capilares de vidrio.
- ✓ Reactivo de revelado: Oleum (ácido sulfúrico, ácido acético glacial, agua (8:32:160)).
- ✓ Reactivo de revelado: 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) 0,2% p/v EtOH (Sigma Aldrich®).
- ✓ Cámara oscura para lámpara de luz UV (Spectroline Model CM-10 Spectronics Corporation®).
- ✓ Patrones de referencia: Gnaphalina, ácido ursólico, kaempferol, quercitrina, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido vainílico.
- ✓ Extracto completo (EHE) y fracciones: n-hexano (FHEX), diclorometano (FDCM), acetato de etilo (FACET), acuosa (FAC).

Se procede a la caracterización de los compuestos presentes en los extractos mediante la separación de los mismos por cromatografía en capa fina (CCF) en soporte de sílicagel e identificación por comparación con los siguientes patrones disueltos en etanol, en las diferentes fases móviles (tabla 1):

Extracto y fracciones	Patrones	Fases Móviles
FHEX y FDCM	Flavonoides: gnaphalina y ácido ursólico	Diclorometano/metanol (4,5:0,5)
EHE y FACET	Flavonoides: gnaphalina, quercitrina, kaempferol	Acetato de etilo/ác. fórmico/ác. acético/agua (100:11:11:26)
EHE y FACET	Ácidos fenoles: Ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido vainílico	Hexano/acetato de etilo/metanol (5:80:15)

**Tabla 1.** Patrones y fases móviles utilizadas para el estudio en cromatografía en capa fina (CCF) para el extracto etanólico y las fracciones.

Se dispusieron en la parte inferior de la placa (cromatofolio de silicagel que forma la parte estacionaria) las soluciones de los patrones y de los extractos con la ayuda de capilares de vidrio. La placa se introdujo en la cubeta que contenía la fase móvil. Los componentes del extracto, así como de los patrones, experimentan un proceso de adsorción-desorción por el cual van ascendiendo por la placa y se van separando en función de su polaridad. Se dejó subir el eluyente por la placa hasta que aproximadamente el frente del mismo estuvo a un 1 cm del borde superior. Después, se dejó secar a temperatura ambiente y se evaporó el disolvente en la oscuridad. Se observó la placa a la luz ultravioleta (UV, 254 nm) y se midieron los Rf de las manchas tras haberlas revelado con óleum(ácido sulfúrico/ácido acético glacial/agua (2:40:8)) y calor (120 °C) durante 5 min.

La luz UV detecta compuestos con dobles enlaces conjugados (Houghton y Roman 1998).El óleum es un reactivo que sirve para detectar compuestos orgánicos, en general.

Para el caso específico de los ácidos fenoles se utilizó para el revelado para-nitroanilina + NaNO<sub>2</sub> 5% en agua (0,2 ml por cada 10 ml de p-nitroanilina), y posteriormente se aplicó Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10% en agua (20 ml) (Stahl, 1975).

Para la identificación cualitativa de compuestos con actividad antioxidante se realizó el mismo procedimiento utilizando como reactivo de revelado con una solución de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) al 0,2 % en EtOH. Las placas se observaron después de 30 min del revelado. Los compuestos con actividad antirradicalaria, se detectaron como manchas amarillas frente a un fondo violeta (Cavin et al., 1998).

### 3.4. Análisis cuantitativo de fenoles totales.

El total de fenoles contenido en el extracto etanólico y las fracciones de las flores de *Helichrysum* fue determinado espectrofotométricamente siguiendo el método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965) modificado por Medina (Medina, 2011) con el fin de minimizar volúmenes de reactivos y de muestras. La identificación de los compuestos fenólicos se debe a un proceso de óxido-reducción de los fenoles, debido a que el iónfenolato capta oxígeno rápidamente alcanzando un pH = 10. Motivo por el cual se le añade Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dando lugar a un compuesto reductor de color azul. Como patrón para la recta de calibrado se utiliza el ácido gálico.

#### ❖ Materiales y reactivos:

- ✓ Lector de microplacas BIO-RAD iMARK™ Microplate Reader.
- ✓ Placa de plástico con 96 pocillos de 300 µl de capacidad.
- ✓ Tubos de ensayos de 10 ml.
- ✓ Patrón de referencia: ácido gálico (Sigma Aldrich®).
- ✓ Reactivo de Folin-Ciocalteu (Panreac®).
- ✓ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7% (Panreac®).
- ✓ Extracto etanólico (EHE), y fracciones: n-hexano (FHEX), diclorometano (FDCM), acetato de etilo (FACET) y acuosa (FAC).

Se prepararon 2 ml de concentraciones seriadas (0, 10, 25, 50, 100, 200, 250, 500 y 750 µg/ml) de ácido gálico disuelto en agua destilada (H<sub>2</sub>O) para realizar la curva de calibrado. Después, se toman 50 µl de las distintas concentraciones del patrón, o de las muestras a ensayar (extracto etanólico y fracciones) y se añade cada una de ellas a un tubo de vidrio junto a 430 µl de H<sub>2</sub>O destilada y 20 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu,

por triplicado. Se deja durante 5 minutos, tiempo estimado para que se dé la reacción. A continuación se adicionan 50 µl de una solución saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7% previamente preparada (se mezcla bien), además de otros 450 µl de H<sub>2</sub>O destilada. Se deja durante 60 minutos a temperatura ambiente y al abrigo de la luz. Por último, se toman 200 µl de cada tubo de vidrio y se lleva una microplaca para leer las absorbancias en Lector de microplacas a una longitud de onda de 765 nm.

La ecuación de la recta del ácido gálico se empleó para calcular las concentraciones de fenoles totales que contienen el extracto etanólico y las fracciones, sustituyendo los correspondientes valores de absorbancia en la ecuación. Los resultados expresados en µg de fenoles, se expresaron en mg fenoles (eq. en ácido gálico/g de extracto seco).

### **3.5. Análisis cuantitativo de flavonoides totales.**

Para ello hemos seguido la técnica de Lamaison y Carnat (Lamaison & Carnat, 1990) modificada por Gouveia y Castilla (Gouveia y Castilho, 2011).

#### ❖ Materiales y reactivos:

- ✓ Reactivo cloruro de aluminio (AlCl<sub>3</sub>) (10%).
- ✓ Reactivo acetato de sodio (CH<sub>3</sub>COO. Na) (1M).
- ✓ Lector de placas multipocillos Biochrom AsysHihtech Expert 96.
- ✓ Placa de plástico con 96 pocillos de 300 µl de capacidad.
- ✓ Etanol absoluto (VWR Chemicals®).
- ✓ Patrón de referencia: rutina (Sigma Aldrich®)
- ✓ Extracto etanólico y fracciones: n-hexano (FHEX), diclorometano (FDCM), acetato de etilo (FACET) y acuosa (FAC).

En un tubo de ensayo de 10 ml, se mezclaron 0,5 ml de solución de la muestra de extracto, 1,5 ml de metanol absoluto, 2,8 ml de agua destilada, 0,1 ml de acetato de sodio (1M), 0,1 ml de cloruro de aluminio (10% en etanol). Se hicieron 2 tubos de vidrio de cada muestra. Después de agitación en Vortex Mixer S0100-230V y esperar durante 30 minutos a temperatura ambiente, se tomaron 200 µl de cada tubo de vidrio y se depositaron en los correspondientes pocillos de la placa. Por último, se leyó la absorbancia en el lector automático de placas a 405 nm (Gouveia y Castilho, 2011b).

Todas las medidas se hicieron frente al blanco (0,5 ml de la solución de la muestra), 1,5 ml de etanol absoluto, 3 ml de agua destilada). La presencia de flavonoides produce un viraje de color del reactivo a amarillo.

El patrón utilizado fue la rutina a diferentes concentraciones (0, 0.015625, 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 mg/ml) por triplicado para obtener la correspondiente recta de calibrado. La ecuación de la recta se utilizó para realizar el cálculo de las concentraciones de flavonoides en los extractos, sustituyendo los correspondientes valores de absorbancia de las muestras. Los resultados expresados se expresaron en mg de flavonoides (eq. en rutina/g de extracto seco).

### **3.6. Estudio de la actividad antioxidante de las fracciones.**

El método de determinación de la actividad antioxidante se basa en detectar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable mediante la producción de radicales libre, daño que es inhibido o reducido en presencia de una sustancia antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o la muestra. En este caso, se utilizó como agente radicalario el 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), preparado a una concentración de 0.04% en etanol absoluto (Cuendet y cols., 1997). El DPPH es un radical libre estable, que en disolución etanólica presenta un color violeta intenso, y tiene una fuerte absorción a 517 nm. Los compuestos antioxidantes pueden reaccionar con el radical, reduciéndolo, y por tanto, la absorción a esta  $\lambda$  desaparece. La absorción, y el grado de la decoloración resultante, es estequiométrico con respecto al número de electrones que capture:  $DPPH^* + AH \rightarrow DPPH-H + A^*$ .

#### ❖ Materiales y reactivos:

- ✓ Lector de placas multipocillo Biochrom AsysHihtech Expert 96.
- ✓ Placa de plástico con 96 pocillos de 300  $\mu$ L de capacidad.
- ✓ Micropipetas de intervalos de volumen 100-1000  $\mu$ L (Labnet<sup>®</sup>) y puntas de plástico.
- ✓ Etanol absoluto (VWR Chemicals<sup>®</sup>).
- ✓ 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) (Sigma Aldrich<sup>®</sup>).
- ✓ Patrones de referencia: ácido cafeico (Sigma Aldrich<sup>®</sup>).
- ✓ Extracto etanólico (EHE) y fracciones: n-hexano (FHEX), diclorometano (FDCM), acetato de etilo (FACET) y acuosa (FAC).

Se añadieron por duplicado en una placa de 96 pocillos 100 µl de las diferentes soluciones del patrón utilizado ácido cafeico o de las muestras a 100 µl de etanol absoluto y 50 µl de la solución de DPPH al 0,04%. Se estableció un blanco formado por 100 µl de cada una de las soluciones de las distintas fracciones de la muestra y 150 µl de etanol, por duplicado. Además, se prepararon una serie de pocillos con 50 µl de la solución de DPPH al 0,04% y 200 µl de etanol, que actúan como control de máxima absorbancia.

La placa se dejó en agitación en la tapada de la luz durante 30 minutos para después leer la absorbancia a 550 nm en el lector automático de placas multipocillo AsysHitech Expert 96.

La actividad antioxidante del compuesto queda evidenciada por el cambio de color en el pocillo, de púrpura a amarillo. A mayor actividad antioxidante, menor será el valor de absorbancia medido. El porcentaje de DPPH captado se obtiene de la ecuación:

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

El cálculo se realizó mediante los valores de descenso de absorción inducidos por los compuestos a los cuáles se les restó el control. La actividad antirradicalaria de cada muestra fue expresada como valor IC<sub>50</sub> (concentración en µg/ml que reducen al radical en un 50%). Fue calculada por curvas de regresión lineal.

### **3.7. Estudio de la composición de la fracción de acetato de etilo mediante HPLC/EM.**

La composición de la fracción de acetato de etilo se analizó utilizando un espectrómetro de masas acoplado por cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC) Orbitrap Quadropole Q Exactive (ThermoScientific).

Para inyectar las muestras, se prepararon tomando 3 mg de la fracción de acetato de etilo diluyéndolo en 1 ml de metanol al 50%, que contenía ácido fórmico al 0,1% (v/v). Posteriormente se filtro con un filtro de 0,2 µm.

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

- 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 la siguiente forma:

- 0-5% B (0-1 minutos).
- 5- 100% B (1-12 minutos)
- 100-5% B (12.1-15 minutos).

La separación se llevó a cabo en una columna ACQUITY UPLC BEH C18 (130Å, 1,7 µm, 2,1 mm X 100 mm) con un volumen de inyección de 5 µl, volumen de flujo de 0,5 ml.min<sup>-1</sup>, temperatura de la columna a 40°C, tiempo de ejecución total 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 (total ionic current), cuyas condiciones de equipo fueron tiempo de exploración = 1 micro exploraciones y tiempo máximo de inyección (IT) 500 ms, con una resolución de 70000.

Las condiciones de ESI fueron las siguientes:

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

Los datos adquiridos 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.

### **3.8. Análisis estadístico.**

Todos los experimentos se realizaron por duplicado o triplicado y se expresan como la media ± el error estándar. Las diferencias de los resultados entre los grupos experimentales se llevaron a cabo mediante el test de ANOVA seguido de el test de comparación múltiple de Tukeys. Se consideraron valor significativo  $p < 0,05$ . El programa utilizado para realizar el análisis estadístico es el Graph Pad Prisma version 5.

## **4. Resultados y discusión**

### **4.1. Rendimientos de los extractos y fracciones.**

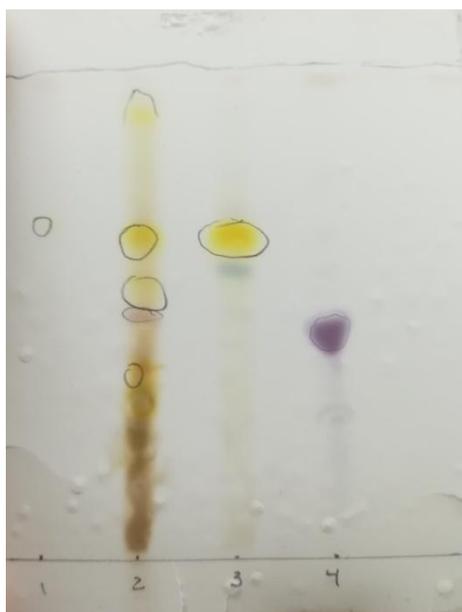
Los rendimientos obtenidos del extracto etanólico y de las fracciones se muestra en la siguiente tabla (tabla 2):

<b>MUESTRA VEGETAL</b>	<b>RENDIMIENTO (%) (g/100 g planta)</b>
EHE	12,56% ± 1,32
FHEX	2,25% ± 0,98
FDCM	1,43% ± 0,52
FACET	1,59% ± 0,64
FAC	6,02% ± 1,05

**Tabla 2. Rendimientos calculados (%) del extracto etanólico y de las fracciones.**

### **4.2. Análisis del extracto y de las fracciones por cromatografía en capa fina.**

Las fracciones de hexano y de diclorometano fueron estudiados por cromatografía en capa fina (CCF) con soporte de sílica gel de aluminio utilizando como fase móvil diclorometano/metanol (4,5:0,5) y como patrones el flavonoide gnaphalina y el triterpeno ácido ursólico disueltos en etanol. Para el revelado se utilizó óleum y se aplicó calor (Figura 6).



**Figura 6:** CCF de las fracciones en hexano (1) y diclorometano (2). Fase móvil: diclorometano/metanol (4,5:0,5). Patrones: gnaphalina (3) y ácido ursólico (4). Revelado con óleum y calor.

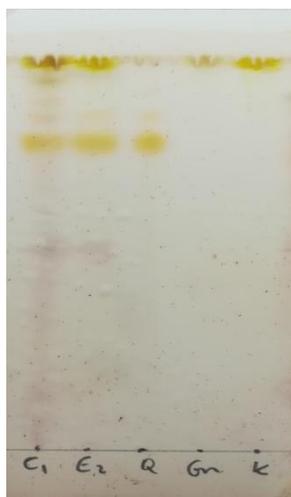
El estudio realizado mediante CCF proporcionó los siguientes valores de Rf (tabla 3):

Fase móvil: diclorometano/metanol(4,5:0,5)	Rf	
	Compuesto 1	Compuesto 2
FHEX	0,69	
FDCM	0,69	0,56
Gnaphalina	0,69	
Ác. ursólico	0,56	

**Tabla 3.** Relación de las medidas de los Rf de las fracciones y los patrones estudiados tras el revelado con Oleum y calor.

La fracción de diclorometano presenta dos compuestos a Rf, 0,69 y 0,56 que se corresponden con la gnaphalina y el ácido ursólico, respectivamente. El resto de los compuestos de la fracción de diclorometano no se han identificado con ningún patrón. La fracción hexanoica muestra un solo compuesto a Rf: 0,69 que corresponde con la gnaphalina. Debido a la intensidad del color también se puede decir que la gnaphalina se encuentra en mayor cantidad en la fracción de diclorometano. A través de la lámpara UV se comprobaron estos resultados.

Posteriormente se estudió el extracto etanólico y la fracción de acetato de etilo en CCF en sílica en gel para determinar la composición en flavonoides utilizando para ello como fase móvil acetato de etilo/ácido fórmico/ácido acético/agua (100:11:11:26) y como patrones: quercitrina, gnaphalina y kaempferol disueltos en etanol. Para el revelado se aplicó óleo y calor (Figura 7).



**Figura 7.** CCF del extracto completo y la fracción de acetato de etilo. Fase móvil: acetato de etilo/ácido fórmico/ácido acético/agua (100:11:11:26). Patrones: gnaphalina, quercitrina y kaempferol. Revelado con óleo y calor.

Dicho estudio dio lugar a los siguientes valores de Rf (tabla 4):

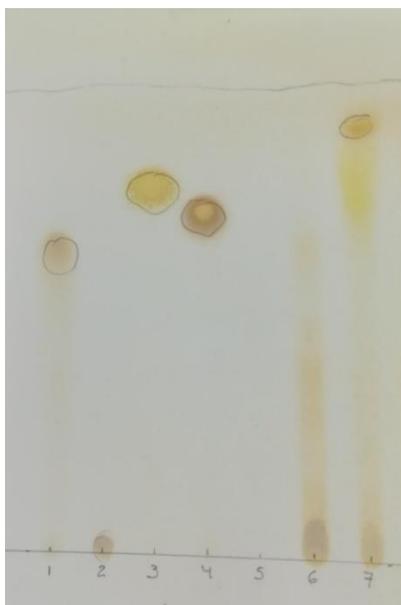
Fase móvil: acetato de etilo/ác. Fórmico/ác. Acético/ agua (100:11:11:26)	Rf		
	Comp. 1	Comp. 2	Comp. 3
<b>FACET</b>	0,78	0,96	0,98
<b>EHE</b>	0,78	0,96	0,98
<b>Quercitrina</b>	0,78		
<b>Gnaphalina</b>		0,96	
<b>Kaempferol</b>			0,98

**Tabla 4.** Relación de las medidas de los Rf del EHE y FACET, y los patrones estudiados tras el revelado con óleo y calor.

Como resultado se puede decir que en la composición del extracto y la fracción se encuentran los flavonoides gnaphalina, quercitrina y kaempferol, debido a que las

medidas de los Rf de los patrones coinciden con las medidas de los Rf de sus principales componentes. Mediante la luz UV se certificaron dichos resultados.

Por último, se realizó una cromatografía del extracto completo y la fracción de acetato de etilo para determinar la composición en ácidos fenoles. Para ello se utilizó como fase móvil hexano/acetato de etilo/ metanol (20:60:20) y como patrones ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido p-hidroxibenzoico y ácido vainílico disueltos en etanol. El revelado se hizo mediante p-nitroanilina junto a  $\text{NaNO}_2$  5% en agua, se dejó secar y se aplicó  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10% en agua (figura 8).



**Figura 8.** CCF de los extracto etanólico (7) y la fracción de acetato de etilo (6). Fase móvil: hexano/acetato de etilo/metanol (20:60:20). Patrones: ácido caféico (1), ácido clorogénico (2), ácido p-hidroxibenzoico (3), ácido vainílico(4). Revelado con p-nitroanilina +  $\text{NaNO}_2$  5% y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10%.

Se obtuvieron los siguientes valores de Rf (tabla 5):

Fase móvil: hexano/acetato de etilo/ metanol (20:60:20)	Rf	
	Comp. 1	Comp. 2
FACET	0,67	
EHE		0,78
Ác. cafeico	0,67	
p-hidroxibenzoico		0,78

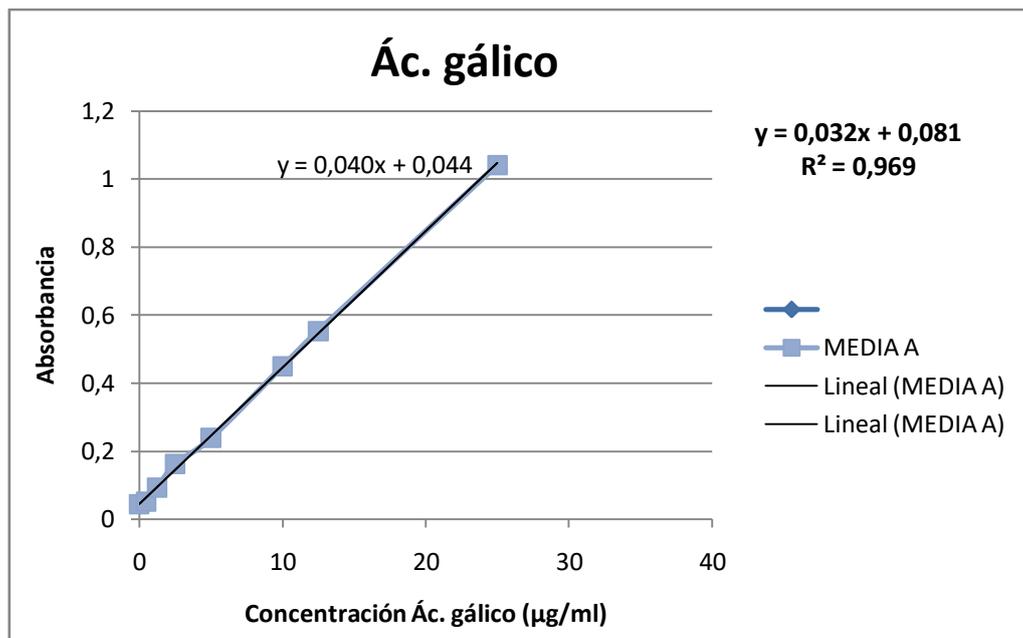
**Tabla 5:** relación de las medidas de Rf de EHE, FACET y los patrones utilizados estudiados tras el revelado con p-nitroanilina y carbonato sódico.

Según la comparación de los valores de los Rf el ácido cafeico se encuentra en la composición de la fracción de acetato de etilo, mientras que el ácido p-hidroxibenzoico forma parte de la composición del extracto etanólico.

Se realizó otra placa idéntica para el revelado con DPPH, en la cual tanto los patrones como el extracto y las fracciones adquirieron coloración amarilla, por lo que sugiere que tienen actividad antioxidante.

#### **4.3. Análisis cuantitativo de fenoles totales.**

El contenido en fenoles totales se cuantificó utilizando como patrón de referencia el ácido gálico. Para ello, se realizaron disoluciones seriadas con el objetivo de obtener una recta de calibrado en la cual se representaron los valores de absorbancia en el eje de las ordenadas frente a las concentraciones (Figura 9). Posteriormente, se obtuvo la ecuación por el método de los mínimos cuadrados, comprobando que el rango de concentraciones cumple la linealidad ( $R^2 = 0.969$ ). La ecuación resultante se utilizó para el cálculo de los fenoles totales presentes en las muestras.



**Figura 9.** Recta de calibrado del ácido gálico.

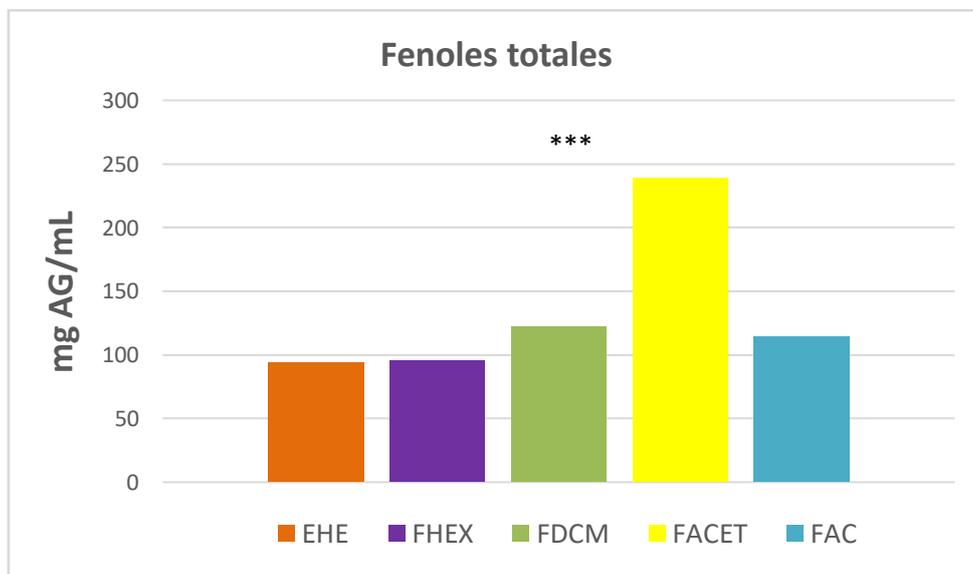
A partir de las absorbancias obtenidas de las distintas fracciones de la muestra vegetal, se extrapolaron los datos con respecto a la anterior recta de calibrado, dando lugar a siguientes resultados (tabla 6):

MUESTRA VEGETAL	CONCENTRACIÓN FENOLES (µg ác. gálico/ml)
EHE	9,34 ± 0.84
FHEX	9,51 ± 1,73
FDCM	12,18 ± 0.09
FACET	23,85 ± 1,44
FAC	11,39 ± 0,62

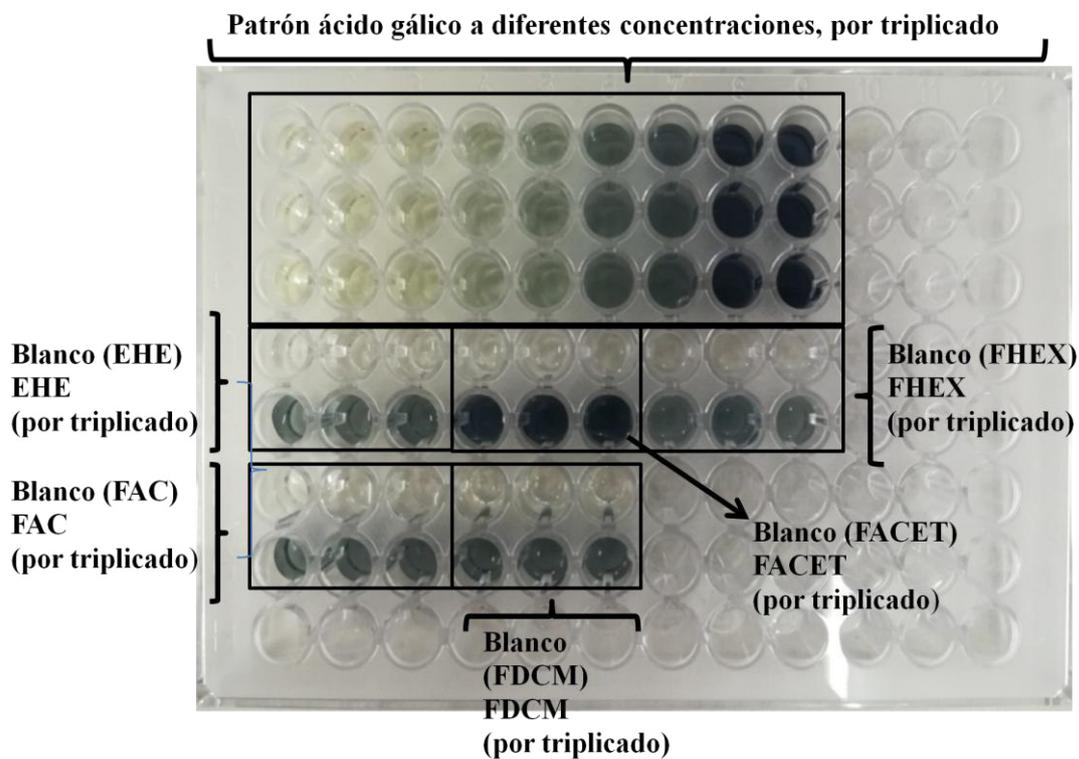
**Tabla 6.** Concentración fenólica del extracto etanólico y las fracciones tras la extrapolación en recta de calibrado (n=3).

Finalmente, procediendo a los cálculos necesarios, se halló la cantidad de fenoles totales contenidos en las fracciones del extracto vegetal como se muestra a continuación (figura

10), con el fin de expresar el resultado final en mg de ácido gálico por gramos de extracto seco.



**Figura 10.** Contenidos en fenoles totales expresados en mg de ácido gálico por gramo de Ext<sup>o</sup> seco. Resultados expresados como media  $\pm$  error de n= 3. ANOVA + Tukey. FACET vs EHE, FDCM, FHEX, FAC: \*\*\* ( $p < 0,001$ ).

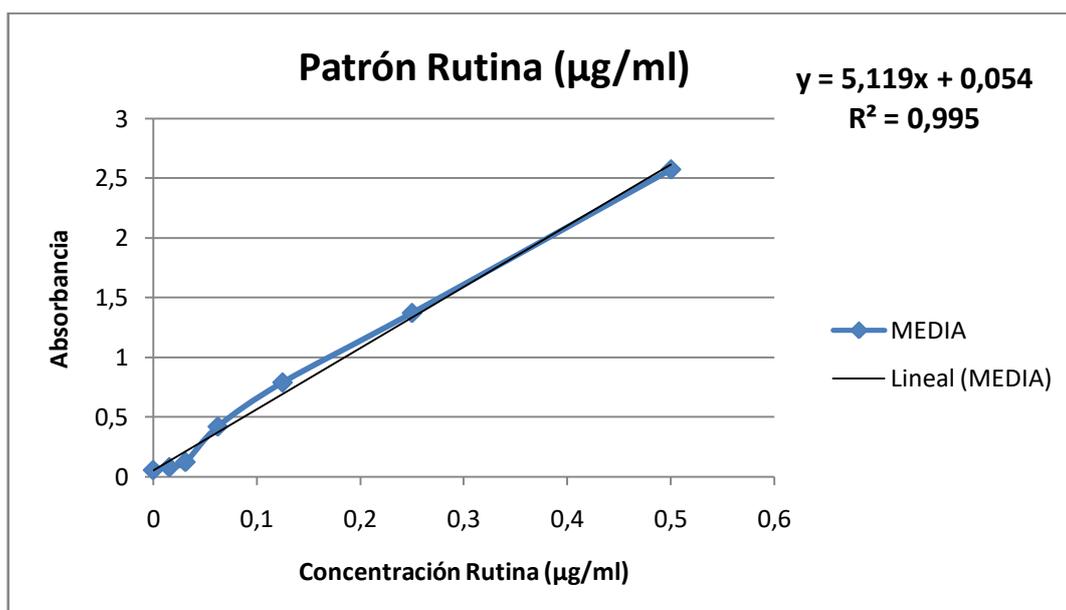


**Figura 11.** Microplaca obtenida para el ensayo cuantitativo de fenoles.

A partir de los resultados obtenidos se puede observar que la fracción de acetato de etilo contiene una mayor concentración de fenoles totales, aproximadamente el doble de concentración que el resto de fracciones y el extracto etanólico, concretamente la fracción en acetato de etilo contiene  $23,85 \pm 1,44 \mu\text{g}$  de ácido gálico/ml/100  $\mu\text{g}$  de extracto seco, lo cual corresponde a un contenido en ácidos fenoles de  $238,54 \pm 14,43$  mg ácido gálico por gramo de extracto seco. El contenido en ácidos fenoles de la fracción acuosa fue  $113,86 \pm 6,21$  mg de ácido gálico por gramo de extracto seco. Resultado que coincide con el obtenido por otros autores (Pereira et al., 2017), cuyo contenido fue de  $76,5 \pm 2,62$  mg/g, ya que aunque hay una ligera variación quizás debido al diferente tipo de preparación de los extractos para realizar la técnica.

#### 4.4. Análisis cuantitativo de flavonoides totales.

El contenido total de flavonoides también se analizó mediante la técnica descrita por Sandra Gouveia y colaboradores (Gouveia et al., 2011), utilizando como patrón de referencia la rutina (heterósido de la quercetina) a distintas concentraciones. Los valores de absorbancia resultantes fueron representados frente a las concentraciones finales ensayadas, de forma que se obtuvo la ecuación de la recta por el método de los mínimos cuadrados, comprobando que el rango de concentraciones cumplía la linealidad ( $R^2=0,995$ ). La ecuación de la recta obtenida fue utilizada para el posterior cálculo de las concentraciones de flavonoides en las muestras.



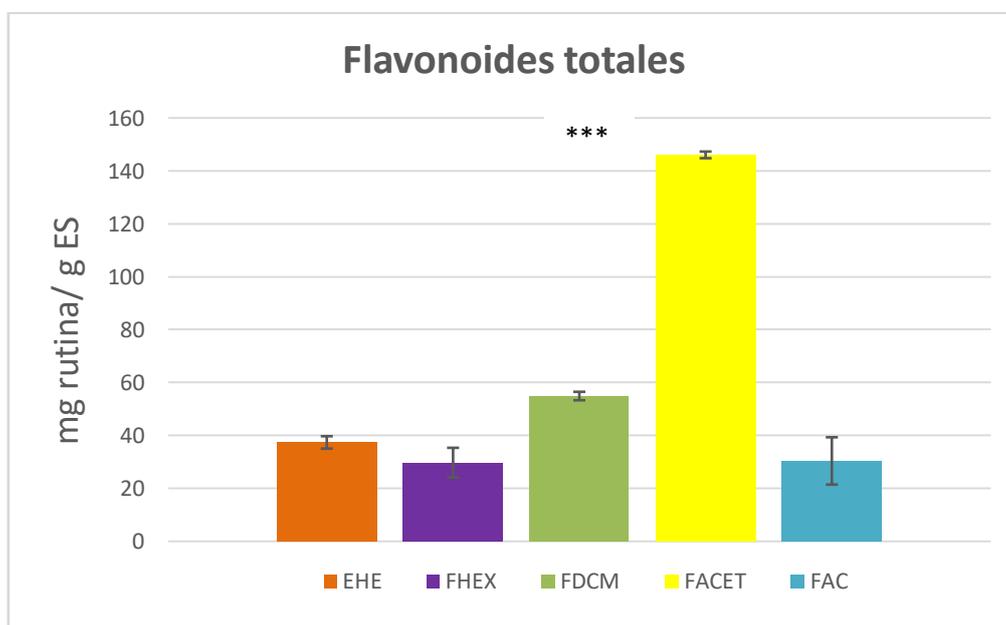
**Figura 12.** Recta de calibrado del patrón de referencia rutina.

Los resultados se muestran en la tabla 7:

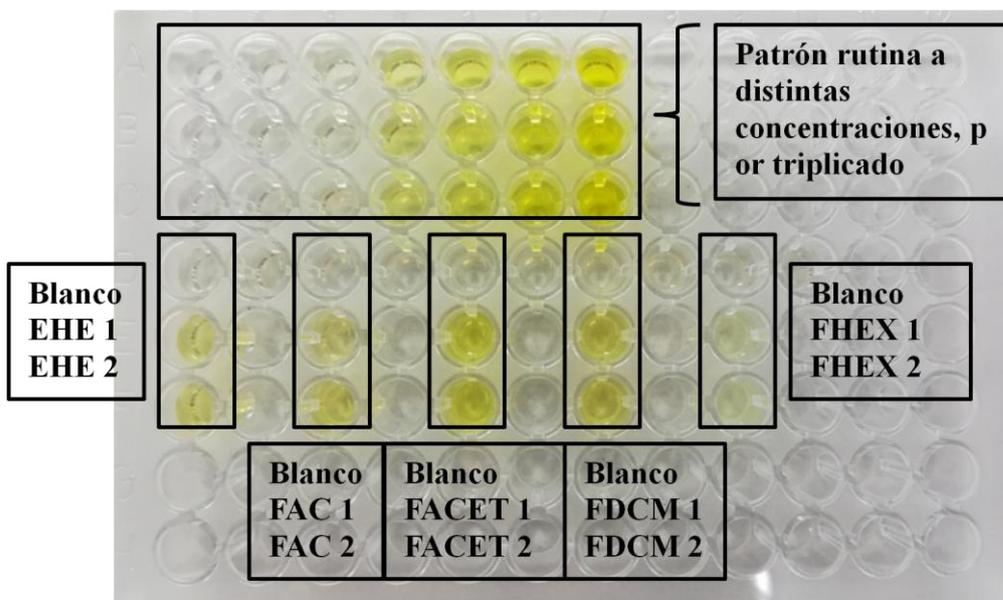
MUESTRA VEGETAL	CONCENTRACIÓN FLAVONOIDES ( $\mu\text{g}$ Rutina/ml/2,5 mg extracto)
EHE	93,38 $\pm$ 5,86
FHEX	74,23 $\pm$ 14,06
FDCM	137,23 $\pm$ 4
FACET	365,11 $\pm$ 3,13
FAC	75,89 $\pm$ 22,37

**Tabla 7.** Concentración de flavonoides totales en la muestra.

Usando los datos anteriormente registrados, se calcularon las concentración en mg flavonoides (eq. en rutina/g extracto seco) (figura 13):



**Figura 13.** Contenido en flavonoides expresado en mequivalentes de rutina por gramo de Ext<sup>o</sup> seco. Resultados expresados como media  $\pm$  error de n= 2. ANOVA + Tukey FACET vs EHE, FDCM, FHEX, FAC: \*\*\* (p < 0,001).



**Figura 14. Microplaca obtenida para el ensayo cuantitativo de flavonoides.**

Mediante dicho método se determinó para la fracción de acetato de etilo  $364,11 \pm 3,13$   $\mu\text{g}$  de rutina/ml/2,5 mg de extracto seco, lo cual corresponde a un contenido en flavonoides de  $146,04 \pm 1,25$  mg rutina por gramo de extracto seco.

Se comprueba que la fracción de acetato de etilo tiene una composición más rica en ácidos fenoles y flavonoides que el resto de las fracciones, por lo que es un disolvente más apropiado para extraer estos compuestos.

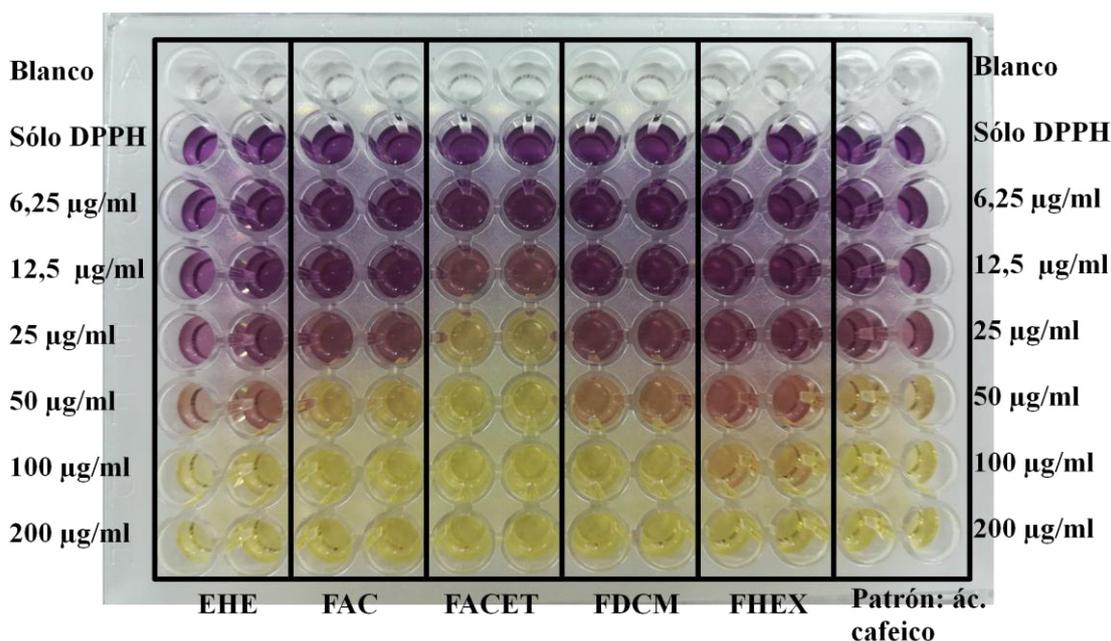
#### **4.5. Estudio de la actividad antioxidante de los extractos y fracciones.**

Los resultados de actividad antirradicalaria se expresan en porcentaje de DPPH captado, ya que el propio DPPH actúa como control. Las muestras con mayor coloración amarilla se corresponden con las de mayor actividad antioxidante.

La  $IC_{50}$  se calculó a partir del porcentaje de inhibición frente a la concentración de las muestras. Los valores de  $IC_{50}$  para el extracto etanólico, las fracciones y el patrón de referencia se muestran en la tabla 8:

MUESTRA VEGETAL Y PATRÓN	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
EHE	36,76 ± 2,79
FHEX	46,79 ± 0,49 ##
FDCM	29,51 ± 0,49
FACET	11,46 ± 0,34***
FAC	27,67 ± 0,66
Ácido cafeico.	27,56 ± 0,45

**Tabla 8.** Resultados expresados en IC<sub>50</sub> del extracto, fracciones y patrón. Resultados expresados como media ± error de n= 2. ANOVA + Tukey FACET vs EHE, FDCM, FHEX, FAC, Ácido cafeico: \*\*\* (p < 0,001). FHEX vs FACET, FDCM, FAC, Ácido cafeico: ## (p<0,01).



**Figura 14.** Microplaca obtenida para el ensayo de captación del radical de DPPH.

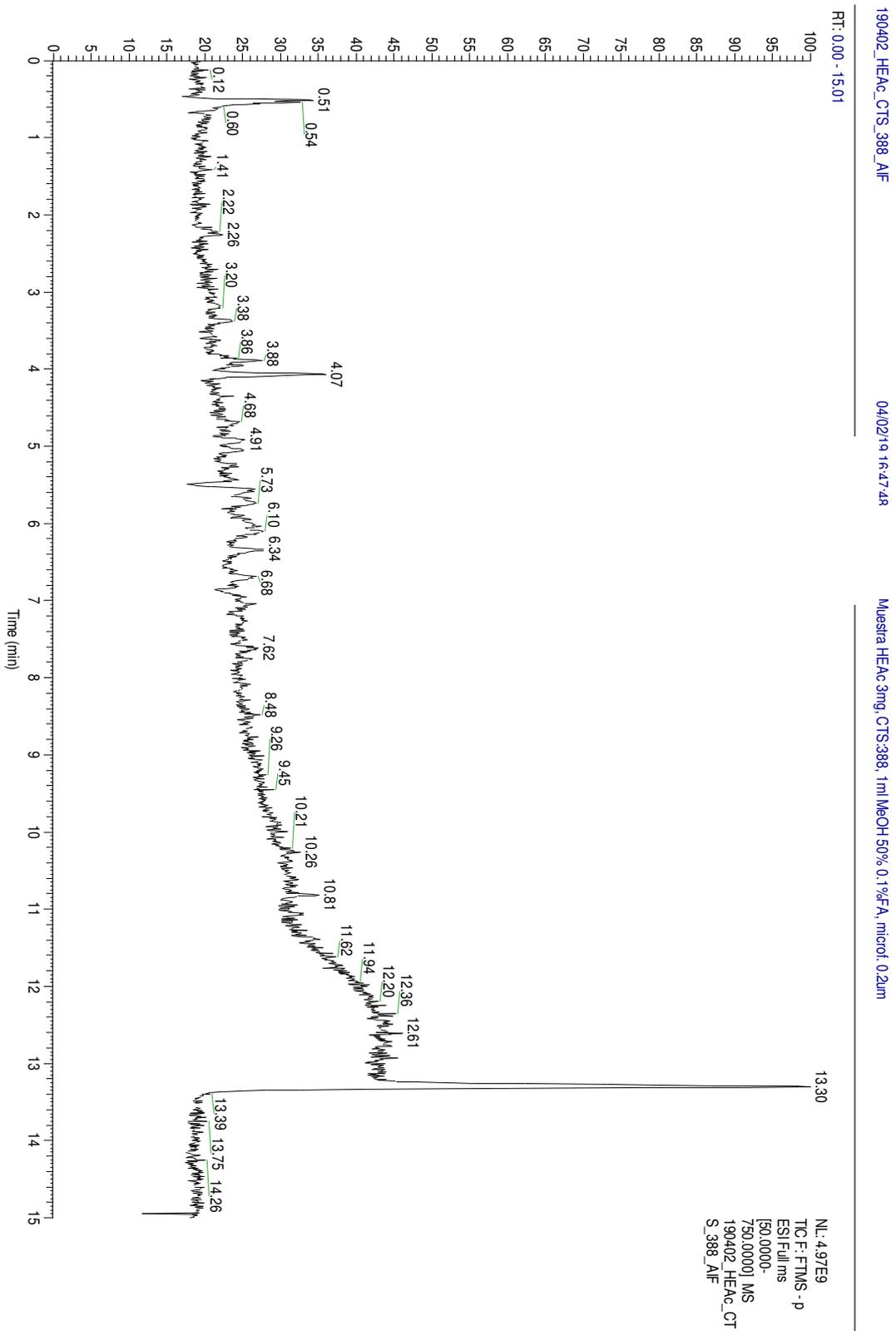
Se puede deducir que la fracción de acetato de etilo presenta una mayor actividad antioxidante con una IC<sub>50</sub> de 11,46µg/ml, lo cual se debe a la alta concentración en compuestos fenoles y flavonoides. El valor de IC<sub>50</sub> fue incluso menor que el obtenido

para el patrón de referencia ácido cafeico ( $IC_{50}$ : 27,56 $\mu$ g/ml). La alta actividad antioxidante de *Helichrysum picardii* fue demostrada en otros estudios (Pereira et al., 2017), cuyos resultados confirman la fuerte capacidad antioxidante in vitro de las sumidades floridas de helicriso, de forma que su uso podría ser de interés en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

Por todo ello, decidimos analizar el perfil fitoquímico de esta fracción por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC/EM) para determinar su perfil fitoquímico ya que es el extracto que presenta mayor riqueza en su composición, y por tanto, mayor actividad.

#### **4.6. Perfil fitoquímico de la fracción de Acetato de etilo mediante HPLC/EM.**

Para el análisis se preparó la muestra en una solución de 3 mg/ml de metanol 50%. Se obtuvo un cromatograma (figura 15) del que se determinaron con un alto porcentaje de fiabilidad los compuestos que se exponen en la tabla 9.



**Figura 15.** Cromatograma obtenido mediante HPLC/EM de la fracción de acetato de etilo.

COMPUESTO	±	ÁREA	RT	FÓRMULA	MASA m/z
Acido Cafeico	-	1,50E+09	4,06	C9H8O4	179,03474
Acido L(-)-malico	-	1,12E+09	0,54	C4H6O5	133,01405
Kaempferol-3-O-Glc	-	9,80E+08	6,11	C21H20O11	447,0929
Luteolin-4'-O-Glc	-	9,80E+08	6,11	C21H20O11	447,0929
Acido Protocatequico	-	6,57E+08	2,23	C7H6O4	153,01913
Acido Clorogenico	-	5,81E+08	3,88	C16H18O9	353,08749
Acido 4-hidroxibenzoico	-	3,52E+08	3,38	C7H6O3	137,02417
Quercetina	-	3,33E+08	6,70	C15H10O7	301,03519
Morina	-	2,05E+08	6,34	C15H10O7	301,03522
Acido succinico	-	1,72E+08	0,90	C4H6O4	117,0191
Taxifolina	-	1,25E+08	5,04	C15H12O7	303,05093
Apigenina-7-O-Glc	-	1,06E+08	6,02	C21H20O10	431,09784
Acido Quinico	-	1,03E+08	0,53	C7H12O6	191,05598
Acido Salicilico	-	6,69E+07	5,82	C7H6O3	137,02417
Kaempferol	-	6,49E+07	7,26	C15H10O6	285,04025
Acido p-Cumarico	-	5,62E+07	4,84	C9H8O3	163,03987
Acido gentisico	-	4,11E+07	3,30	C7H6O4	153,01912
Acido 4-O-cafeoilquinico	-	2,85E+07	4,08	C16H18O9	353,08728
Sulfuretina	-	2,26E+07	6,55	C15H10O5	269,04526
Luteolina	-	1,76E+07	6,88	C15H10O6	285,04016
Pinocebrina	-	1,39E+07	8,11	C15H12O4	255,06598
Luteolin-7-O-Glc	-	1,26E+07	5,61	C21H20O11	447,09271
Eriodictiol	-	7,26E+06	6,31	C15H12O6	287,05591
Acido Dihidrocafeico	-	7,24E+06	3,92	C9H10O4	181,05049
Isorhamnetina	-	6,86E+06	7,39	C16H12O7	315,05075
Fisetina	-	5,16E+06	6,18	C15H10O6	285,04028
Quercetina-4'-O-Glc	-	4,41E+06	6,00	C21H20O12	463,08762
Acido Piruvico	-	4,36E+06	0,54	C3H4O3	87,00865
Aromadendrina	-	3,41E+06	5,65	C15H12O6	287,05594

Acido 2,4-Dihidroxibenzoico	-	3,06E+06	3,82	C7H6O4	153,0191
Acido Ferulico	-	2,05E+06	5,17	C10H10O4	193,05026
Acido L-glutamico	-	1,53E+06	0,50	C5H9NO4	146,04562
Naringenina	-	1,02E+06	6,84	C15H12O5	271,06085

**Tabla 9. 34 compuestos confirmados en la fracción de acetato de etilo, ordenados según el área, de mayor a menor. Técnica HPLC/EM.**

En este estudio se identificaron 34 compuestos, la mayoría de ellos de carácter fenólico entre los que caben destacar los ácidos fenoles: cafeico, protocatequico, clorogénico, 4-hidroxibenzoico, salicílico, p-cumárico, gentisico, 4-O-cafeoilquinico, dihidrocafeico y ferúlico. En el caso del ácido salicílico fue identificado por primera vez en un estudio reciente llevado a cabo en la misma especie y con diversas partes de la planta (Pereira et al., 2017).

Encontramos diferentes tipos de flavonoides y además algunos como agliconas y otros como heterósidos, pero los más abundantes son los flavonoles destacando el Kaempferol y sus heterósidos, y la quercetina y sus heterósidos. Cabe también destacar algunas flavonas como luteolina, y sus heterósidos, flavononas como pinocembrina y eriodictiol. La presencia más rara en la naturaleza de la aurona, sulfuretina y del flavonolol, aromadendrina.

Algunos de estos compuestos como el ácido cafeico, el ácido clorogénico y el ácido p-hidroxibenzoico ya han sido identificados por otros autores (Pereira et al., 2017), pero sin embargo la morina y la sulfuretina es la primera vez que se describen en la especie *H. picardii* Boiss. & Reuter.

Existen también en el estudio otros compuestos no fenólicos como el ácido pirúvico, el ácido quínico, el málico y el L-glutámico.

El hecho de existir esta gran cantidad de compuestos fenólicos en la fracción de acetato de etilo justifica la actividad antioxidante mostrada en el ensayo de captación del radical DPPH.

El oxígeno puede ser como sabemos fuente de diferentes patologías a través de la producción incontrolada de radicales libres que son capaces de dañar macromoléculas (lípidos, proteínas, hidratos de carbonos, ácidos nucleicos...) y alterar procesos

celulares. Por ello, terapias antioxidantes y más si son de origen natural pueden prevenir o al menos disminuir el deterioro funcional orgánico producido por el estrés oxidativo. De esto se deduce el interés de esta fracción obtenida a partir de los capítulos florales de la especie *Helichrysum picardii* Boiss. & Reuter.

## 6. CONCLUSIÓN

A partir del estudio de los capítulos florales de la especie *Helichrysum picardii* Boiss. & Reuter se puede concluir que:

1. El contenido en fenoles totales y flavonoides fue bastante mayor en la fracción de acetato de etilo con respecto a las fracciones de diclorometano, n-hexano y acuosa.
2. El efecto antioxidante que presenta la fracción en acetato de etilo se puede justificar por su alto contenido en fenoles totales.
3. El análisis fitoquímico por HPLC/EM de la fracción de acetato de etilo permitió identificar hasta 34 compuestos entre los que se encontraban ácidos fenoles, flavonoides y otros ácidos orgánicos, destacando por su mayor proporción el ácido fenol cafeico y su derivado ácido clorogénico, y los flavonoides en forma de heterósidos, principalmente flavonoles y flavonas heterósidas.
4. Podemos concluir que el extracto etanólico de la especie *Helichrysum picardii* Boiss. & Reuter y en particular la fracción de acetato de etilo, por su potente actividad antioxidante, son de interés en la elaboración de preparaciones farmacéuticas efectivas frente al daño producido por el estrés oxidativo.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Albayrak S, Aksoy A, Sagdic O, Hamzaoglu E. Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey. Food Chem. 2010;119:114-22. doi:10.1016/j.foodchem.2009.06.003.
- Akkol, EK , Göger, F , Kosar, M , Baser, KHC . Composición fenólica y actividades biológicas de *Salvia halophila* y *Salvia virgata* de Turquía . Food Chem. 2008;108: 942 - 949.
- Armutcu F, Akyol S, Ustunsoy S, Turan F. Therapeutic potential of caffeic acid phenethyl ester and its anti-inflammatory and immunomodulatory effects (Review). Exp Ther Med. 2015;9:1582-1588.
- Cavin A, Hostettman K, Dyatmyko W, Potterat O. Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinosporas crispus*. Planta Med. 1998;64:393-396.
- Comunidad Botánica. The plantlist [en línea]. [Consultado en abril 2019]. Disponible en: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/gcc-120296>
- Cuendet M, Hostettman K, Potterat O. Iridoid glycosides with free radical scavenging properties from *Fagraeae blumei*. Helv Chim Acta. 1997;80:1144–1152.
- De la Puerta, R.; García , M.D., Sáenz, M.T. Gil, A.M. Analysis of the essential oil from *Helichrysum picardii*. Planta Medica. 1993, 59, 94-95.
- De la Puerta, R., Garcia, M.D., Saenz, M<sup>a</sup> T., Gil, A.M.. Sur la phytochimie de *Helichrysum picardii* Boiss. & Reuter. Plantes Medicinales et Phytotherapie 1990, 24, 258-263.94-95.
- Facino R. M, Carini M, Franzoi L, Pirola O, Bosisio E. Phytochemical characterization and radical scavenger activity of flavonoids from *Helichrysum italicum* G. Don (Compositae). Pharmacol. 1990;22:709-721.
- Galbany-Casals M, Sáez L, Benedí C. A taxonomic revision of *Helichrysum sect. Stoechadina* (Asteraceae, Gnaphalieae) . Can J Bot. 2006;84:1203-32. doi:10.1139/b06-082.
- Gouveia S, Castilho PC. Antioxidant potential of *Artemisia argentea* L'Hér alcoholic extract and its relation with the phenolic composition. Food Res Int. 2011;44:1620-31. doi:10.1016/j.foodres.2011.04.040.

- Gouveia S, Castilho PC. Characterisation of phenolic acid derivatives and flavonoids from different morphological parts of *Helichrysum obconicum* by a RP-HPLC-DAD-(-)-ESI-MS method. *Food Chem.* 2011;129:333-44. doi:10.1016/j.foodchem.2011.04.078.
- Houghton P. J, Raman A. Laboratory handbook for the fractionation of natural extracts. Londres, Chapman & Hall. 1998;103-106.
- 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.
- Lederer E, Lederer M. Chromatography: a review of principles and applications. 2<sup>a</sup> ed. Amsterdam Elsevier Publishing company;1957.
- Leonardi M, Ambryszewska KE, Melai B, Flamini G, Cioni PL, Parri F, et al. Essential-oil composition of *helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from Elba Island (Tuscany, Italy). *Chem Biodivers.* 2013;10:343-55. doi:10.1002/cbdv.201200222.
- Leonardi M, Giovanelli S, Ambryszewska KE, Ruffoni B, Cervelli C, Pistelli Laura, et al. Essential oil composition of six *Helichrysum* species grown in Italy. *Biochem Syst Ecol.* 2018;79:15-20. doi:10.1016/j.bse.2018.04.014.
- Les F, Venditti A, Cásedas G, Frezza C, Guiso M, Sciubba F, et al. Everlasting flower (*Helichrysum stoechas* Moench) as a potential source of bioactive molecules with antiproliferative, antioxidant, antidiabetic and neuroprotective properties. *Ind Crops Prod.* 2017;108:295-302. doi:10.1016/j.indcrop.2017.06.043.
- Maksimovic S, Tadic V, Skala D, Zizovic I. Separation of phytochemicals from *Helichrysum italicum*: An analysis of different isolation techniques and biological activity of prepared extracts. *Phytochemistry.* 2017;138:9-28. doi:10.1016/j.phytochem.2017.01.001.
- Mari A, Napolitano A, Masullo M, Pizza C, Piacente S. Identification and quantitative determination of the polar constituents in *Helichrysum italicum* flowers and derived food supplements. *J Pharm Biomed Anal.* 2014;96:249-55. doi:10.1016/j.jpba.2014.04.005.

- Mastelic J, Politeo O, Jerkovic I, Radosevic N. Composition and antimicrobial activity of *Helichrysum italicum* essential oil and its terpene and terpenoid fractions. *Ched Nat Compd.* 2005;41:35-40.
- Medina MB. Simple and rapid method for the analysis of phenolic compounds in beverages and grains. *J Agric Food Chem.* 2011;59:1565-71. doi:10.1021/jf103711c.
- Moreno C. S, Larrauri J. A, Calixto F. S. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agric.* 1998;76:270-6
- Peralta M.G. Estudio de los componenetes químicos de *Plantago spp.* como posibles agentes antitumorales. tesis doctoral, Facultad de Farmacia, Sevilla 2004.
- Pereira CG, Barreira L, Bijttebier S, Pieters L, Neves V, Rodrigues MJ, et al. Chemical profiling of infusions and decoctions of *Helichrysum italicum* subsp. *picardii* by UHPLC-PDA-MS and in vitro biological activities comparatively with green tea (*Camellia sinensis*) and rooibos tisane (*Aspalathus linearis*). *J Pharm Biomed Anal.* 2017;145:593-603. doi:10.1016/j.jpba.2017.07.007.
- Pljevljakušić D, Bigović D, Janković T, Jelačić S, Šavikin K. Sandy Everlasting (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench): Botanical, Chemical and Biological Properties. *Front Plant Sci.* 2018;9:1-12. doi:10.3389/fpls.2018.01123.
- Porru A. Notas Naturales [en línea]. 28 marzo 2019. [Consultado en Mayo 2019]. Disponible en: <https://www.notasnaturales.com/propiedades-usos-la-siempreviva-monte-la-planta-del-sol-oro/>
- Rigano D, Formisano C, Senatore F, Piacente S, Pagano E, Capasso R, et al. Intestinal antispasmodic effects of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. *italicum* and chemical identification of the active ingredients. *J Ethnopharmacol.* 2013;150:901-6. doi:10.1016/j.jep.2013.09.034.
- Sala A, Recio M del C, Giner RM, Máñez S, Tournier H, Schinella G, et al. Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Helichrysum italicum* . *J Pharm Pharmacol.* 2002;54:365-71. doi:10.1211/0022357021778600.
- Schinella G. R, Tournier H. A, Máñez A, De Buschiazzo P. M, Recio M. C, Ríos J. L. Tiliroside and gnaphaliin inhibit human low density lipoprotein oxidation. *Fitoterapia.* 2007;78:1-6.

- Singleton V. L, Rossi J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-Phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic. 1965;16:144-58.
- Stahl E. Analyse chromatographique et microscopique des drogues. Ed. Entreprise moderne d'edition technique et documentatation. Paris; 1975.
- Valdés B, Talavera S, Galiano E. F. Flora Vascular de Andalucía Occidental 3. Ketres;1987.
- Viegas D. A, De Oliveira A. P, Salgueiro L, De Oliveira J. M, De Oliveira R.P. *Helichrysum italicum*: From traditional use to scientific data. J Ethnopharmacol. 2014;151:54-56. Doi: 10.1016/j.jep.2013.11.005