

Trabajo Fin de Grado

Estudio de la actividad antioxidante y compuestos responsables en *Helichrysum stoechas*

Study of the antioxidant activity and responsible compounds in *Helichrysum stoechas*

Autor/es

Eva Soriano Pérez

Director/es

José Francisco Martínez López
Raquel Zufiaurre Galarza

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR
2017

Agradecimientos

En primer lugar agradecer a mis directores José Francisco Martínez y Raquel Zufiaurre por su tiempo, ayuda y dedicación a lo largo de este proyecto.

A la colaboración del Servicio General de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Facultad de Ciencias y en especial a María, por su paciencia y tiempo dedicado, así como los conocimientos aportados.

A José Antonio Manso y José María Garcés Tebar por su ayuda en el laboratorio.

A mis padres, quienes me han brindado todo lo necesario para alcanzar las metas propuestas y por depositar su confianza en mí.

A mis amigas, por todo su apoyo y ánimo durante el período de realización de este proyecto.

Gracias.

Índice

| | |
|---|----|
| Resumen/Abstract | 1 |
| Objetivos | 3 |
| 1. Introducción | 4 |
| 1.1 Propiedades de <i>Helichrysum stoechas</i> | 4 |
| 1.2 Aplicaciones de las especies <i>Helichrysum</i> | 6 |
| 1.3 Especies antioxidantes..... | 7 |
| 1.3.1 Compuestos fenólicos | 8 |
| 1.4 Antecedentes..... | 13 |
| 1.5 Procesos y técnicas analíticas utilizadas en la determinación de la actividad antioxidante de extractos naturales y en la identificación de los compuestos responsables de la misma. | 14 |
| 1.5.1 Procesos de extracción de principios activos en material vegetal..... | 14 |
| 1.5.2 Métodos y técnicas de análisis. | 23 |
| 1.5.2.1 Métodos para la determinación de la capacidad antioxidante | 23 |
| 1.5.2.2 Métodos para la determinación del contenido de fenoles totales..... | 27 |
| 1.5.2.3 Métodos para la determinación del contenido de flavonoides totales..... | 28 |
| 1.5.2.4 Técnicas instrumentales para la determinación de compuestos fenólicos | 28 |
| 2. Equipos, reactivos, materiales y métodos | 32 |
| 2.1 Equipos..... | 32 |
| 2.2 Reactivos y materiales | 32 |
| 2.2.1 Reactivos..... | 32 |
| 2.2.2 Material vegetal..... | 33 |
| 2.3 Métodos experimentales | 33 |
| 2.3.1 Molienda y tamizado | 34 |
| 2.3.2 Procedimientos de extracción | 35 |
| 2.3.3 Fraccionamiento supercrítico antidisolvente del extracto etanólico..... | 36 |
| 2.3.4 Determinación de la actividad antioxidante mediante el método DPPH..... | 39 |
| 2.3.5 Determinación de fenoles totales | 44 |
| 2.3.6 Determinación de flavonoides totales | 45 |

| | |
|--|----|
| 2.3.7 Separación e identificación de compuestos fenólicos mediante HPLC-UV/Vis | 46 |
| 2.3.8 Separación e identificación de compuestos fenólicos mediante GC-MS | 48 |
| 2.3.9 Separación e identificación de compuestos fenólicos mediante HPLC-MS | 50 |
| 3. Resultados y discusión | 52 |
| 3.1 Tamizado | 52 |
| 3.2 Rendimiento de las extracciones | 55 |
| 3.3 Resultados de la actividad antioxidante en los extractos de <i>H.stoechas</i> | 56 |
| 3.3.1 Obtención de las rectas de calibrado de DPPH | 56 |
| 3.3.2 Validación del método mediante el Trolox | 58 |
| 3.3.3 Actividad antioxidante de los extractos | 59 |
| 3.4 Contenido de fenoles totales en extractos y en flor de <i>H.stoechas</i> | 61 |
| 3.5 Contenido de flavonoides totales en extractos y en flor de <i>H.stoechas</i> | 63 |
| 3.6 Compuestos fenólicos separados e identificados en los extractos de <i>H.stoechas</i> | 65 |
| 3.6.1. Análisis mediante HPLC-UV/Vis | 66 |
| 3.6.2. Análisis mediante CG-MS | 72 |
| 3.6.3. Análisis mediante HPLC-MS | 77 |
| 3.7 Relación entre los parámetros estudiados | 82 |
| 4. Conclusiones | 85 |
| 5. Bibliografía | 87 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. <i>Helichrysum stoechas</i> . A. Detalle inflorescencia B. Detalle flor..... | 4 |
| Figura 2. Distribución geográfica de <i>Helichrysum stoechas</i> | 5 |
| Figura 3. Estructura del ácido benzoico | 9 |
| Figura 4. Estructura del ácido cinámico | 9 |
| Figura 5. Ácidos fenólicos: ácidos benzoicos y ácidos cinámicos..... | 9 |
| Figura 6. Estructura básica de los flavonoides. | 10 |
| Figura 7. Estructura de las principales amidas polifenólicas..... | 12 |
| Figura 8. Estructuras de otros polifenoles importantes..... | 12 |
| Figura 9. Soxhlet tradicional..... | 15 |
| Figura 10. A la izquierda: extracción a vacío asistida por microondas. A la derecha: hidrodestilación asistida por microondas. | 16 |
| Figura 11. Extractor acelerado de disolvente Dionex™..... | 17 |
| Figura 12. Diagrama de fases del CO ₂ | 18 |
| Figura 13. Diagrama de flujos del proceso de extracción supercrítica con CO ₂ | 20 |
| Figura 14. Diagrama de flujo del proceso SAF..... | 21 |
| Figura 15. Densidad y polaridad (expresada a través del parámetro de Hildebrand) del CO ₂ en condiciones supercríticas, como función de la presión y la temperatura. | 22 |
| Figura 16. Reacción radicalaria entre el radical libre DPPH· y el antioxidante AH..... | 26 |
| Figura 17. Absorbancias frente a la longitud de onda barrida (290-1090 nm) por espectrofotetría visible para el radical libre DPPH· y su forma reducida DPPH..... | 26 |
| Figura 18. Decoloración progresiva del radical libre DPPH· por acción de antioxidantes naturales. | 27 |
| Figura 19. Principales componentes de un equipo de HPLC | 29 |
| Figura 20. Principales componentes de un cromatógrafo de gases. | 30 |
| Figura 21. Esquema de procedimientos experimentales aplicados a flor seca de <i>Helichrysum stoechas</i> | 34 |
| Figura 22. Tamizadora CISA modelo BA-300N. | 35 |
| Figura 23. Fiola de filtrado de extractos..... | 35 |
| Figura 24. Maceración etanólica de la fracción sólida resultante de la maceración inicial en hexano..... | 36 |
| Figura 25. Planta de fraccionamiento utilizada..... | 37 |
| Figura 26. . Fracción del extracto etanólico obtenida en cámara. | 38 |

| | |
|---|----|
| Figura 27. Detalle del filtro situado en el interior de la cámara de precipitación y fracción líquida recogida en el colector de espurgo. | 39 |
| Figura 28. Espectrofotómetro Evolution 300. | 39 |
| Figura 29. Set de filtros para el calibrado del equipo. | 40 |
| Figura 30. Estructura del Trolox. | 41 |
| Figura 31. Representación de la evolución de la absorbancia con el tiempo por acción del antioxidante Trolox TM sobre el radical DPPH [·] | 42 |
| Figura 32. Disoluciones seriadas de ácido gálico para elaboración de la recta de calibrado. | 45 |
| Figura 33. Disoluciones seriadas de quercitina para elaboración de la recta de calibrado. | 46 |
| Figura 34. Representación de la masa obtenida en cada uno de los tamices. | 53 |
| Figura 35. Representación de la masa de material vegetal tomada de cada uno de los tamices. | 54 |
| Figura 36. Recta de calibrado DPPH. | 57 |
| Figura 37. Gráfico del contenido de fenoles totales (mg AG/g) en los extractos de <i>H.stoechas</i> | 62 |
| Figura 38. Gráfico del contenido de flavonoides totales (mg AG/g) en los extractos de <i>H.stoechas</i> | 65 |
| Figura 39. Cromatograma HPLC-UV extracto etanólico (1,55 g/L) a 280 nm y 330 nm. | 66 |
| Figura 40. Espectros de absorción de los compuestos mayoritarios. | 67 |
| Figura 41. Cromatograma HPLC-UV de extracto de cámara SAF 1 (0,514 g/L) a 280 nm y a 330 nm. | 67 |
| Figura 42. Cromatograma HPLC-UV de extracto de espurgo SAF 1 (0,4994 g/L) a 280 nm y 330 nm. | 68 |
| Figura 43. Cromatogramas multipatrón de ácido cinámico, tirosol, ácido gentísico, ácido 3,4-dihidroxifenilglicol, ácido p-cumárico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido caféico, kaempferol y quercetina registrado a 3 longitudes de onda: 210 nm, 228 nm y 330 nm. | 69 |
| Figura 44. Perfil de HPLC-UV-DAD de extractos de <i>H.stoechas</i> | 71 |
| Figura 45. Cromatograma GC-MS de extracto etanólico, cámara y espurgo. | 73 |
| Figura 46. Cromatograma GC-MS Tr 10-20 min: extracto etanólico, cámara y espurgo. | 74 |
| Figura 47. Cromatograma GC-MS Tr 20-40 min: extracto etanólico, cámara y espurgo. | 74 |
| Figura 48. Espectro de masas del ácido clorogénico. | 76 |
| Figura 49. Espectro de masas del ácido cafeico derivatizado. | 76 |
| Figura 50. Cromatogramas HPLC-MS (ESI ⁻): fracción cámara, extracto etanólico y fracción espurgo. | 77 |

| | |
|--|----|
| Figura 51. Cromatogramas HPLC-MS (ESI-) Tr 20-60 min: fracción cámara, extracto etanólico y fracción espurgo | 78 |
| Figura 52. Estructura del ácido clorogénico..... | 82 |
| Figura 53. Estructura del ácido dicafeoilquínico. | 82 |
| Figura 54. Estructura del Myricetin 3-O-glucoside..... | 82 |
| Figura 55. Estructura de los flavonoles identificados. | 82 |
| Figura 56. Gráfico de la relación entre los parámetros estudiados: actividad antioxidante (AAI), fenoles totales y flavonoides totales entre extracto etanólico y SAF 1..... | 83 |

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Clasificación de los flavonoides. | 10 |
| Tabla 2. Valores típicos de densidad (ρ), viscosidad (η) y coeficientes de difusividad para gases (D), fluidos supercríticos y líquidos. | 19 |
| Tabla 3. Disolventes y reactivos empleados en los análisis y extracciones. | 32 |
| Tabla 4. Condiciones de operación para el fraccionamiento supercrítico antidisolvente. | 37 |
| Tabla 5. Longitudes de onda para el filtro de Holmio y medidas experimentales. | 40 |
| Tabla 6. Longitudes de onda para el filtro de Didimio y medidas experimentales. | 41 |
| Tabla 7. Clasificación del poder antioxidante según el valor del índice AAI | 44 |
| Tabla 8. Disoluciones de la fase móvil y gradiente empleado en HPLC-UV/Vis. | 46 |
| Tabla 9. Condiciones cromatográficas HPLC-UV/Vis. | 47 |
| Tabla 10. Rangos de absorción para las diferentes clases de flavonoides. | 48 |
| Tabla 11. Condiciones cromatográficas HPLC-MS. | 50 |
| Tabla 12. Gradiente de fase móvil para la separación de compuestos fenólicos mediante HPLC-MS. | 51 |
| Tabla 13. Masa obtenida en cada uno de los tamices utilizando como material de partida 100 g de flores secas de <i>Helichrysum stoechas</i> trituradas. | 52 |
| Tabla 14. Masa de material vegetal tomada de cada uno de los tamices para la preparación de muestra compuesta para el análisis. | 53 |
| Tabla 15. Rendimiento de las extracciones con hexano y con etanol. | 55 |
| Tabla 16. Resultados del fraccionamiento supercrítico antidisolvente. | 56 |
| Tabla 17. Datos calibración de DPPH. | 56 |
| Tabla 18. Concentraciones de Trolox de las disoluciones de partida, ratio Trolox/DPPH, absorbancia final y concentración remanente de DPPH. | 58 |
| Tabla 19. Resultados EC ₅₀ para el Trolox. | 59 |
| Tabla 20. Actividad antioxidante de los extractos de <i>H.stoechas</i> | 59 |
| Tabla 21. Concentración media de fenoles totales (FT) en los extractos y en y flor de <i>H.stoechas</i> | 61 |
| Tabla 22. Concentración media de flavonoides totales en los extractos y en flor de <i>H.stoechas</i> | 63 |
| Tabla 23. Longitudes de onda de máxima absorción de los compuestos identificados en Barroso et al.,2014. | 69 |
| Tabla 24. Áreas de los picos mayoritarios 1 y 2 en los extractos de <i>H.stoechas</i> | 72 |

| | |
|---|----|
| Tabla 25. Compuestos mayoritarios con tiempo de retención, masas y extractos en los que aparecen..... | 75 |
| Tabla 26. Compuestos identificados mediante HPLC-MS (ESI-) en extractos de <i>H.stoechas</i> | 78 |
| Tabla 27. Compuestos no identificados mediante HPLC-MS (ESI-) en extractos de <i>H.stoechas</i> . | 80 |
| Tabla 28. Resultados medios de actividad antioxidante, fenoles totales y flavonoides totales en extracto de <i>H.stoechas</i> | 82 |

Resumen

Helichrysum stoechas, planta aromática distribuida en algunos países del área mediterránea, ha sido utilizada en medicina popular por sus numerosos beneficios para la salud. El objetivo de este estudio fue determinar la actividad antioxidante de los distintos extractos y fracciones de esta planta e identificar los compuestos responsables de ella. El extracto etanólico (maceración) fue sometido a un proceso de fraccionamiento supercrítico antidisolvente (SAF) utilizando CO₂ para concentrar y separar sus componentes bioactivos. Para la determinación de la actividad antioxidante de los distintos extractos se siguió el método del radical libre DPPH·, habiéndose encontrado una fuerte capacidad antioxidante para los distintos extractos. Además para completar el estudio de la actividad antioxidante, se determinó cuantitativamente el contenido de fenoles y flavonoides totales. Finalmente mediante diversas técnicas analíticas (cromatografía líquida: HPLC-UV/Vis y HPLC-MS y cromatografía de gases con espectrometría de masas, se han identificado algunos compuestos fenólicos como flavonoides y ácidos fenólicos de los distintos extractos resultantes (extracto etanólico, fracción cámara y fracción filtrada o espurgo). El compuesto mayoritario es un ácido fenólico, el ácido dicafeoilquínico; entre los compuestos minoritarios han sido identificados flavonoides glicosilados como Quercetin-3-*O*-glucoside o Kaempferol-3-*O*-glucoside, todos ellos se han separado y concentrado en la fracción de cámara tras el fraccionamiento supercrítico antidisolvente.

Palabras clave

Helichrysum stoechas, capacidad antioxidante, compuestos fenólicos, flavonoides.

Abstract

Helichrysum stoechas, aromatic plant distributed in some mediterranean countries, has been used in traditional medicine because of its many health benefits. The aim of this study was to determine the antioxidant capacity of the different extracts and fractions of this plant and to identify the compounds responsible for it. The ethanolic extract (soaking) was submitted to a supercritical antisolvent fractionation process (SAF) using CO₂ to concentrate and to separate its bioactive components. In order to determine the antioxidant activity for all extracts the free radical DPPH method was followed and a very high antioxidant activity was found for all extracts. Moreover in order to complete the antioxidant activity study the total phenolics and flavonoids content were quantitatively determined. Finally, by means of different analytic techniques (liquid chromatography; HPLC-UV/Vis y HPLC-MS) and gas chromatography with mass spectrometry, it have been identified some phenolic components as flavonoids and phenolic acids in the differents obtained extracts (ethanolic extract, chamber fraction and filtered fraction or spurgate). The majority component is a phenolic acid, the dicaffeoylquinic acid; among minority components it has been identified glucosyde flavonoids as Quercetin-3-O-glucoside or Kaempferol-3-O-glucoside, all of them have been separated and concentrated in chamber fraction after supercritical antisolvent fractionation.

Keywords

Helichrysum stoechas, antioxidant capacity, phenolics compounds, flavonoids.

Objetivos

El objetivo general del presente Trabajo de Fin de Grado es realizar un estudio de la actividad antioxidante de los extractos y fracciones obtenidas a partir de la planta *Helichrysum stoechas*.

Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Concentrar y separar los productos bioactivos de *H. stoechas* mediante técnicas avanzadas de fraccionamiento antidisolvente con CO₂ supercrítico a partir de extractos etanólicos de *Helichrysum stoechas*.
- Determinar la capacidad antioxidante de los extractos de *H. stoechas*.
- Determinar el contenido de fenoles totales en los extractos de *H. stoechas* y en el material vegetal de partida.
- Determinar el contenido en flavonoides totales en los extractos de *H. stoechas* y en el material vegetal de partida.
- Identificar los compuestos fenólicos presentes en el material vegetal mediante técnicas cromatográficas.
- Evaluar las diferencias entre los distintos extractos de *H. stoechas* considerando los parámetros medidos.

1. Introducción

1.1 Propiedades de *Helichrysum stoechas*

La siempreviva amarilla (*Helichrysum stoechas* (L.) Moench) (Figura 1) es una planta aromática perteneciente a la familia de las compuestas (Compositae, Asteraceae), con tallos florales erguidos, cubiertos de borra grisácea, que pueden alcanzar los 50 cm de altura (Martín y Puech, 2001). Sus hojas, de 15-35 x 0,7-2 mm son alternas, simples y enteras, con formas desde estrechamente linear a linear espatuladas, con un tomento blanquecino ligeramente lanoso, a veces glabras en el haz y más raramente en el envés. Las flores, tubulares y de color amarillo se presentan en inflorescencias de 1,5 – 3 (6) cm de diámetro, formadas por capítulos solitarios o agregados en corimbos compuestos de 5 o más. El involucre tiene de 4 a 6 mm de diámetro y es globoso o anchamente ovoide, presentando un color amarillento, con las brácteas laxamente imbricadas. Las brácteas externas, ovaladas, son más cortas que las internas y son anchas, escariosas y glabras o algo lanosas en la base. Las brácteas medias son más estrechas y coriáceas en la mitad inferior, mientras que en la superior son más anchas y escariosas; las internas son más estrechas que el resto. Las flores externas normalmente son femeninas y las internas hermafroditas, aunque rara vez son todas hermafroditas. El fruto es un aquenio de color pardo oscuro con numerosas glándulas blanquecinas y provistos de un vilano con pelos escábridos. La floración se produce entre mediados de primavera y el verano, aunque permanece seca todo el año, de ahí su nombre común, siempreviva o perpetua.



Figura 1. *Helichrysum stoechas*. A. Detalle inflorescencia (SIVIM, 2004) B. Detalle flor (Acorral, 2016).

La siempreviva es una planta de distribución mediterránea que puede encontrarse desde cotas muy bajas hasta los 1500 metros de altitud, sobre suelos secos y soleados, arenales, terrenos áridos y pedregosos y matorrales, sobre todo en cunetas y terraplenes. Muy frecuentemente se encuentra en combinación con tomillos y está muy bien adaptada a la falta de agua, de hecho su presencia en determinadas áreas es indicativa de pluviometrías escasas, también soporta muy bien las altas temperaturas. No es exclusiva de zonas costeras, aunque es frecuente verla en dunas litorales. La mayor cantidad de poblaciones de esta planta se encuentra en la Península Ibérica y está presente también en la costa mediterránea de Francia y en menor medida en Italia (Figura 2).

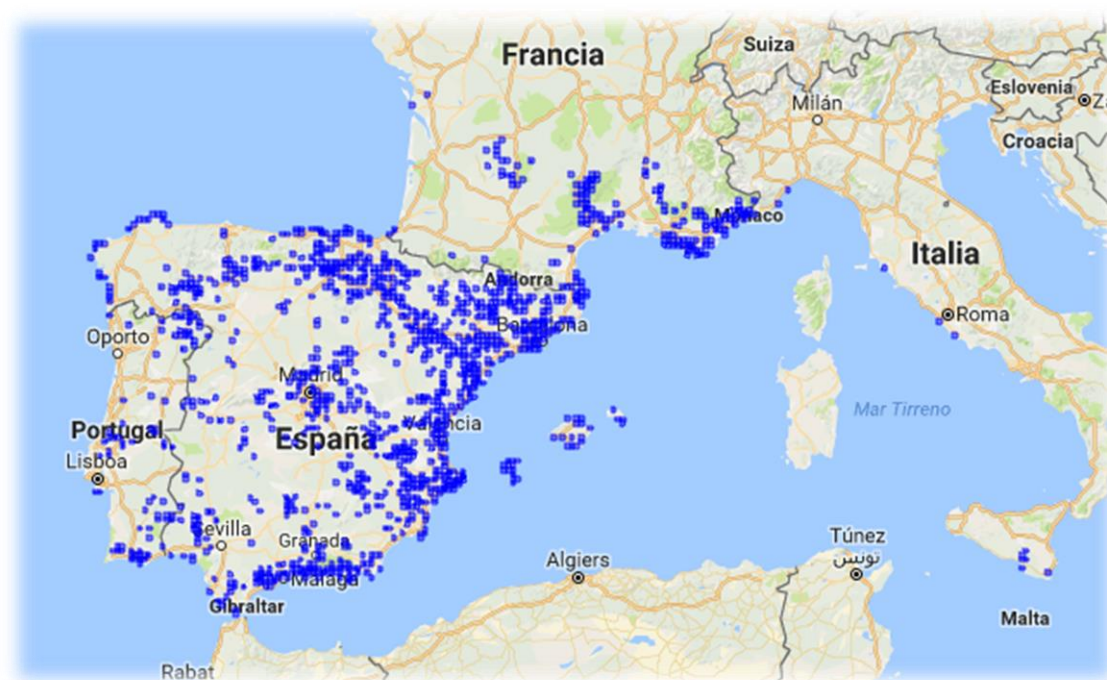


Figura 2. Distribución geográfica de *Helichrysum stoechas* (SIVIM, 2004).

Las plantas aromáticas, como la siempreviva y sus principios activos, proporcionan importantes beneficios medioambientales, económicos y sociales, además de constituir un amplio campo de aplicación de las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética.

En cuanto a sus beneficios ambientales, contribuyen a la formación y recuperación de suelos y protegen contra la erosión. Sus variados sistemas radicales sujetan el suelo y frenan o impiden la erosión, por lo que son adecuadas para la sujeción de suelos desnudos. En tierras no cultivadas por su escaso o nulo interés agrícola, se desarrollan bien la mayoría de estas plantas, las cuales evitan la degradación y erosión del suelo. Además en los suelos que, debido

a una agricultura intensiva, son o se han vuelto inútiles para otros cultivos, pueden cultivarse algunas de estas especies, ya que una cantidad equivalente a un gramo de su raíz puede fijar en ella hasta 10 mg de sales de sodio. Aparte de ello, existe una relación simbiótica entre el cultivo de plantas aromáticas y la apicultura, ya que producen una miel y polen de calidad, además de los beneficios ecológicos de la polinización de las abejas.

Otro de los beneficios ambientales de las plantas aromáticas es su acción fitosanitaria, debido a que los principios activos de muchas de ellas tienen propiedades bacteriostáticas, bactericidas, germicidas, fungicidas, nematocidas, insectífugas e incluso herbicidas. Estos compuestos extraídos de la planta, al tratarse de productos no tóxicos ni residuales, podrían utilizarse para combatir plagas y enfermedades de los cultivos, en sustitución de pesticidas sintéticos, por lo que se lograría una protección vegetal natural en la agricultura (Palacio, 2000).

Por todo ello existe la necesidad de desarrollar programas de manejo sostenible y conservación de las plantas aromáticas, basados en métodos que cuantifiquen su importancia cultural y económica, importancia ecológica, situación actual de sus poblaciones, distribución geográfica, estrategias de recolecta sostenible, propagación y cultivo (López-Gutiérrez, Pérez-Escandón y Villavicencio, 2014).

1.2 Aplicaciones de las especies *Helichrysum*

Las especies de *Helichrysum* son bien conocidas por su contenido de metabolitos secundarios, entre ellos destacan los flavonoides. Extractos de *Helichrysum* se utilizan en la industria cosmética y tienen aplicaciones farmacológicas por su capacidad antioxidante, antialérgica, antimicrobiana y antiinflamatoria (Giuliani *et al.*, 2016). Sin embargo, la información científica sobre las propiedades antioxidantes de estas es bastante escasa (Haddouchi *et al.*, 2016).

Por su parte, la siempreviva se ha utilizado en medicina popular como antiinflamatoria, antitusiva, antibacteriana, antifúngica, en el tratamiento de afecciones respiratoria (alergias, gripe, bronquitis, sinusitis y amigdalitis), digestivas y hepatobiliares como gastritis, hepatitis, colecistitis; renales (cistitis y uretritis) y dermomucosas como eczemas o dermatomicosis (Acorral, 2016).

1.3 Especies antioxidantes

El organismo en sus funciones habituales, como la respiración o la digestión, genera radicales libres, pero además estamos expuestos a agentes externos que también los producen, como la contaminación o algunos productos químicos del agua o alimentos. Se produce estrés oxidativo cuando la exposición a los radicales libres es mayor de la que los antioxidantes pueden neutralizar, lo cual provoca envejecimiento y diversas enfermedades (Rodríguez, 2008).

Los antioxidantes se tratan de compuestos capaces de inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas impidiendo la iniciación y propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres.

Existen antioxidantes como las hormonas melatonina y BHA (hidroxianisol butilado), así como algunas enzimas que fabrica el cuerpo; sin embargo, la mayoría de los antioxidantes son nutrientes que se encuentran en los alimentos (Fernández, 2004). El creciente interés en la sustitución de antioxidantes sintéticos en los alimentos por antioxidantes naturales ha fomentado la investigación de fuentes vegetales y el estudio de las materias primas para la identificación de nuevos compuestos (Moure *et al.*, 2001). Si bien, este interés no solo se centra en la industria alimentaria sino también en el uso de estos antioxidantes en otros productos como cosméticos, farmacéuticos y plásticos. Los antioxidantes nos protegen en cuatro niveles: En primer lugar, impiden que los radicales libres se lleguen a formar, así como también impiden que ciertos metales como cobre, cadmio, mercurio y plomo inicien procesos de oxidación. En segundo lugar, los mecanismos antioxidativos interceptan los compuestos de oxígeno reactivo que se hayan formado y frenan la cadena de reacciones que darían lugar a la creación de muchos otros oxidantes. En tercer lugar, detienen las lesiones causadas por los oxidantes, ayudan a que la segunda y tercera línea de defensa del organismo funcionen con eficacia. En cuarto lugar, los antioxidantes eliminan y reemplazan las moléculas dañadas de forma irreversible, a la vez que limpian y eliminan todas las sustancias indeseables generadas durante el proceso (Fernández, 2004).

Debido a su importancia, diferentes fuentes naturales han sido investigadas por su capacidad antioxidante, algunas frutas como la uva o la granada; verduras como el brócoli o la calabaza y sobre todo diversas especias: orégano, tomillo, jengibre, romero o canela, entre otras (Shah, Bosco y Mir, 2014).

Conocidos compuestos antioxidantes son el ácido ascórbico (vitamina C), el glutatión, la melatonina, los tocoferoles, los carotenoides y los compuestos fenólicos, siendo estos últimos los más encontrados en plantas.

1.3.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son los principales compuestos antioxidantes encontrados en plantas. Estos constituyen uno de los principales tipos de metabolitos secundarios de las plantas, en las cuales desempeñan diversas funciones fisiológicas. Dependiendo de su estructura, se ha descrito que tienen el papel de proporcionar color a la planta para contribuir de esta forma a la polinización (López Corona, 2013). Además, estos compuestos intervienen en el crecimiento, así como en procesos de defensa contra patógenos, depredadores o radiación ultravioleta. Actualmente existe gran interés sobre estos compuestos, considerándose uno de los compuestos fitoquímicos alimentarios más importantes por su contribución al mantenimiento de la salud humana, debido a la gran variedad de actividades biológicas que presentan. Esta actividad biológica está relacionada con su carácter antioxidante, debido a su capacidad para quelar metales, inhibir la actividad de la enzima lipooxigenasa y actuar reteniendo radicales libres (García, Fernández, y Fuentes, 2015).

La cantidad de compuestos fenólicos y tipos presentes en un vegetal puede variar en función de la especie, variedad y parte del vegetal considerada, horas de exposición al sol, condiciones de cultivo, almacenamiento, etc.

Los compuesto fenólicos presentan una estructura química con uno o más anillos bencénicos y uno o más grupos hidroxilados, con algún elemento común, como los grupos funcionales de ésteres, glicósidos, etc. Son moléculas muy reactivas que suelen combinarse con azúcares como la glucosa, galactosa o los ácidos glucorónicos y galacturónicos. También pueden unirse con ácidos carboxílicos, aminoácidos, ácidos orgánicos y lípidos (García *et al.*, 2015).

Según Tsao, R. (2010) los compuestos fenólicos pueden clasificarse de acuerdo a su estructura química en ácidos fenólicos, flavonoides, amidas polifenólicas y otros polifenoles.

Ácidos fenólicos: Son componentes polifenólicos derivados del ácido benzoico $C_7H_6O_2$ (Figura 3) (ácido gálico, ácido vanílico, etc.) y del ácido cinámico $C_9H_8O_2$ (Figura 4) (ácido cafeico, ácido cumárico, ácido clorogénico, etc.)(Figura 5).

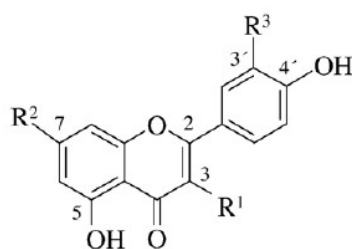


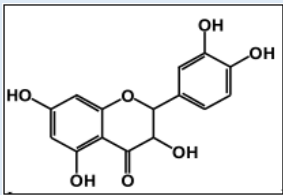
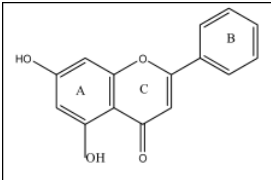
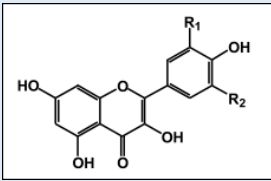
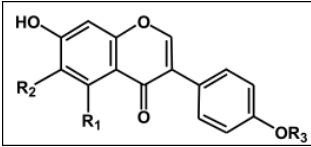
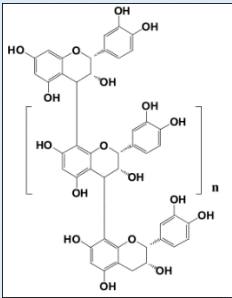
Figura 6. Estructura básica de los flavonoides.

Los flavonoides tienen diversas funciones biológicas, como son la protección contra la radiación ultravioleta y los fitopatógenos, la fertilidad masculina, así como la coloración de las flores, lo cual atrae a los polinizadores (Falcone, Rius y Casati, 2012).

En la Tabla 1 pueden observarse los diferentes subgrupos de flavonoides:

Tabla 1. Clasificación de los flavonoides.

| Flavonoides | Estructura | Ejemplos |
|---|------------|---|
| Antocianidinas | | cianidina, pelargonidina, peonidina, malvidina. |
| Chalconas | | floretina, floridzina. |
| Flavanoles flavan-3-ols (catequinas) | | catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina. |
| Flavanonas | | naringenina, hesperetina. |

| | | |
|--------------------------|---|--|
| Flavanonoles |  | taxifolin (dihidroquercetina). |
| Flavonas |  | apigenina, luteolina, tangeretin, nobiletina. |
| Flavonoles |  | kaempferol, quercetina, miricetina. |
| Isoflavonas |  | genisteína, daidzeína. |
| Proantocianidinas |  | procianidinas |

Amidas polifenólicas: Son polifenoles que contienen como sustituyente funcional nitrógeno. A este grupo pertenecen la capsaicina (responsable del picante de los chiles) y avenantramidas (contenido en la avena) (Figura 7). Se ha demostrado que tienen fuerte capacidad antioxidante y antiinflamatoria, y modulan el sistema de defensa oxidativa en las células. (Tsao, 2010).

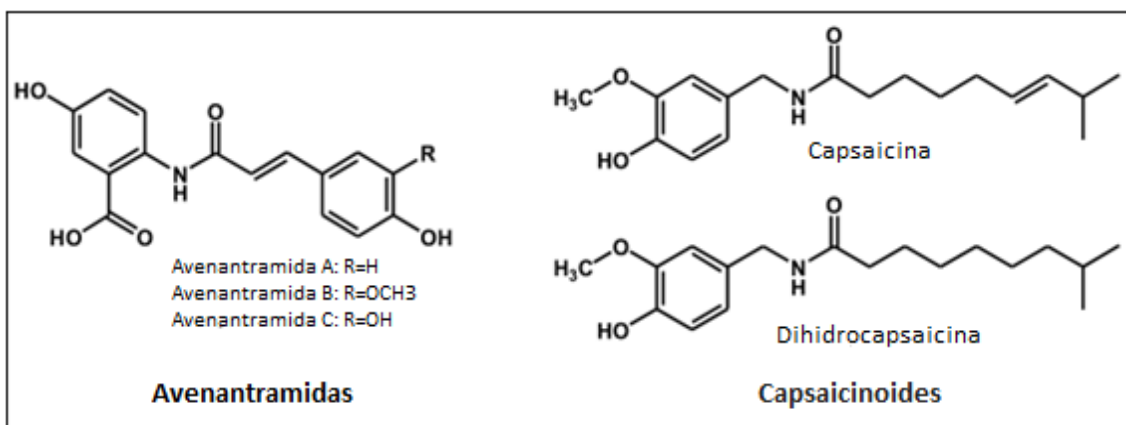


Figura 7. Estructura de las principales amidas polifenólicas.

Otros fenoles: además de los compuestos citados existen un conjunto de importantes fenoles como resveratrol o ácido rosmarínico, cuyas estructuras se exponen en la Figura 8.

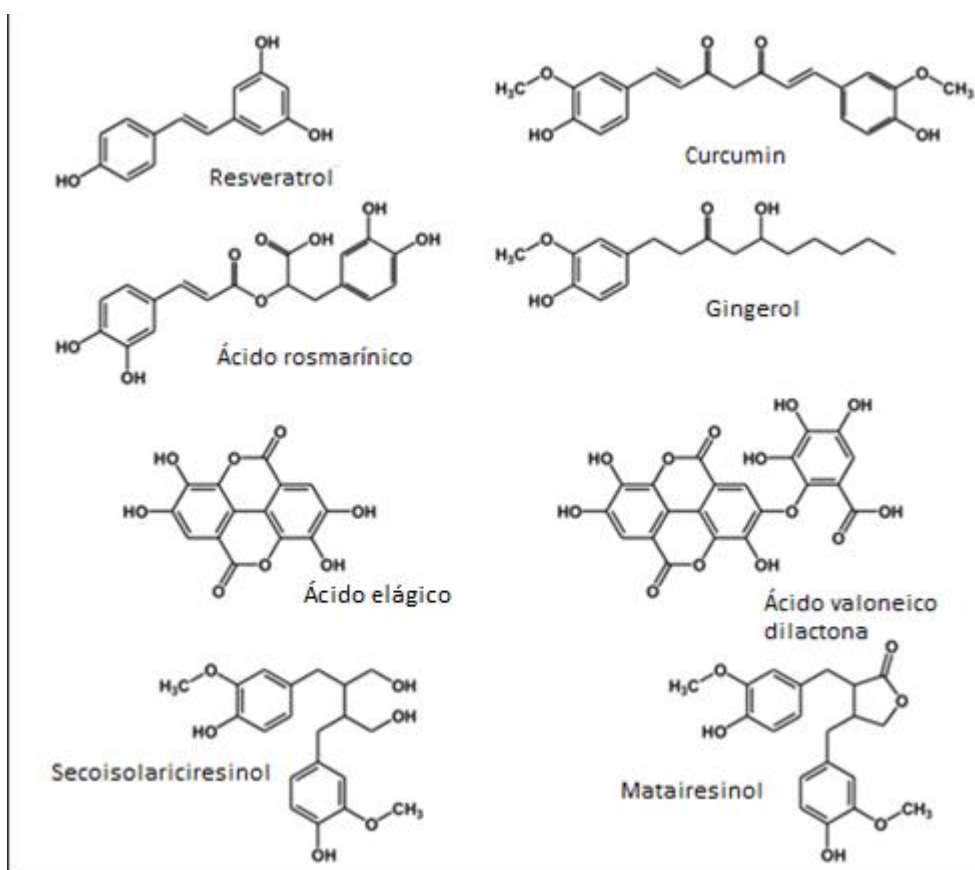


Figura 8. Estructuras de otros polifenoles importantes.

1.4 Antecedentes

Para poder desarrollar el presente estudio, se ha realizado una revisión bibliográfica con el fin de recabar información acerca de los compuestos fenólicos presentes en especies del género *Helichrysum* y su posible relación con la capacidad antioxidante. En el trabajo de Sobhy y El-Feky (2007) se exponen los compuestos químicos presentes en extractos etanólicos de *Helichrysum stoechas* siendo los componentes mayoritarios ácidos fenólicos (isómeros de ácido cafeoilquínico y del ácido dicafeoilquínico) y flavonoides (isómeros de glucósidos de naringenin y glucósidos de tetrahidroxichalcona). Por su parte, Barroso *et al.* (2014), identifican 9 derivados de ácidos fenólicos en muestras de *Helichrysum stoechas*, 6 de ellos isómeros derivados del ácido cafeoilquínico y 3 del dicafeoilquínico, siendo el resto de los compuestos identificados flavonoides, en particular derivados de flavonoles, tales como glucósidos de miricetin y de la quercetina.

Albayrak, Aksoy, Sagdic y Hamzaoglu (2010), realizan una comparación entre 16 especies de *Helichrysum*, siendo los componentes mayoritarios identificados el ácido fenólico, el ácido clorogénico o cafeoilquínico, y las flavonas, apigenin-7-glucósido y apigenin. En este trabajo también realizan un estudio de la actividad antioxidante mediante el método del radical DPPH, siendo la *Helichrysum stoechas* subsp. *barellieri* la que presentó una mayor actividad con una concentración inhibitoria máxima (IC₅₀) de 7,95 µg/ml, concentración necesaria de extracto para reducir en un 50% la DPPH. Punto interesante de este estudio es que concluyen que no existe correlación entre el contenido de compuestos fenólicos totales, medido mediante el método Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante en ninguna de las 16 especies analizadas. Esto difiere con lo expuesto en el trabajo de Haddouchi *et al.* (2014), en el cual se observó una gran correlación entre el contenido de polifenoles, flavonoides y la capacidad antioxidante total medida mediante el método DPPH en muestra de *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre*, la cual presentó un valor de IC₅₀ de 6,57 µg/ml. El contenido de flavonoides totales en dicho estudio fue realizado mediante el método colorimétrico de cloruro de aluminio utilizando como patrón catequina (CE) y obteniendo un valor en flores de *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre* de 10,48 mg CE/g.

En base a estos resultados se ha llevado a cabo este trabajo fin de grado con el fin de cuantificar la actividad antioxidante de muestras de *Helichrysum stoechas* cultivada en Zaragoza, ya que no existen en España investigaciones sobre la actividad antioxidante de esta planta. También se han cuantificado los fenoles totales mediante el método Folin-Ciocalteu y flavonoides totales mediante el método colorimétrico de cloruro de aluminio para el posterior

estudio de la correlación con la capacidad antioxidante. Además de ello se ha llevado a cabo la identificación de los compuestos fenólicos presentes en dichas muestras.

1.5 Procesos y técnicas analíticas utilizadas en la determinación de la actividad antioxidante de extractos naturales y en la identificación de los compuestos responsables de la misma.

1.5.1 Procesos de extracción de principios activos en material vegetal

Cualquier método de análisis de material vegetal precisa de un proceso previo de extracción de los principios activos del material. En base al tipo de material a analizar y a los análisis a llevar a cabo se habrá de seleccionar el método de extracción más adecuado a cada caso. Hay dos factores que pueden influir en el proceso de extracción, el tiempo de extracción y la temperatura. El calor favorece y acelera la extracción pero puede descomponer alguno de los principios activos del material, así como provocar pérdidas por volatilización. A continuación se describen brevemente los métodos de extracción:

- Extracción por arrastre con vapor: Para esta técnica se utiliza vapor saturado o sobrecalentado, el cual se pone en contacto con el material vegetal haciendo que desprenda el aceite esencial que contenga y que este debido a su volatilidad se vaya evaporando y es arrastrado corriente arriba hasta que llega al hidrodestilador donde se enfría. Al enfriarse el aceite que es inmiscible en agua es separado y acumulado.
- Extracción mecánica: Para este tipo de extracción se emplean prensas para ejercer presión sobre el material vegetal y extraer su aceite.
- Extracción mediante tratamiento enzimático: Las enzimas aceleran el proceso ya que actúan como catalizadores de la reacción. Con las enzimas apropiadas se consigue romper la estructura de la membrana celular para la liberación del compuesto de interés.
- Extracción con disolventes: Se basa en la transferencia selectiva de los compuestos de interés desde el material vegetal hacia una fase líquida (normalmente un disolvente orgánico o mezclas de disolventes en función de la polaridad de los compuestos a

extraer). Son los métodos más utilizados y se pueden llevar a cabo de diferentes maneras:

- Maceración: contacto directo del material vegetal con el disolvente durante un periodo de 24 horas a temperatura ambiente y generalmente con agitación.
- Extracción con soxhlet: el material vegetal se coloca en un cartucho de celulosa que se introduce en el cuerpo del Soxhlet situado encima del matraz que contiene el disolvente de extracción y por debajo de un condensador (Figura 9). Aplicándole calor el disolvente entra en ebullición y los vapores condensados llenan la cámara mojando el cartucho que contiene el material vegetal. Una vez que la cámara se llena completamente del disolvente se produce un efecto sifón que hace pasar el disolvente y el soluto extraído hacia el matraz.

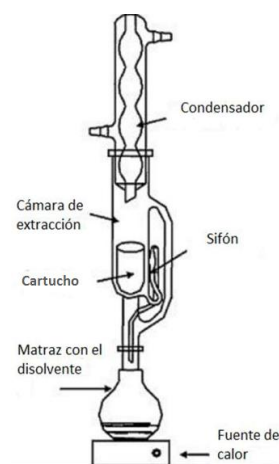


Figura 9. Soxhlet tradicional.

- Extracción asistida por ultrasonidos: Los ultrasonidos se tratan de vibraciones mecánicas en un sólido, líquido o gas con una frecuencia superior a la audible por el oído humano. Cuando se aplican ultrasonidos lo suficientemente intensos, los ciclos de expansión pueden crear burbujas en el líquido, y cuando estas explotan, ya que no pueden absorber más energía, se producen temperaturas y presiones muy elevadas que favorecen la liberación de compuestos.

- Extracción asistida por microondas: Las microondas consiguen mejorar el rendimiento de extracción al aplicar un tratamiento térmico con radiaciones electromagnéticas en el rango de 0.3 a 300 GHz para generar calor dentro del material y que se caliente en periodos de tiempo más cortos. Con ello se evita la degradación de los compuestos de interés al aplicar tratamientos de larga duración. Existen diferentes modos de extraer con asistencia de microondas: hidrodestilación asistida, soxhlet asistida, extracción a vacío asistida, entre otras. A modo de ejemplo en la Figura 11 se muestra un detalle de algunas de ellas.

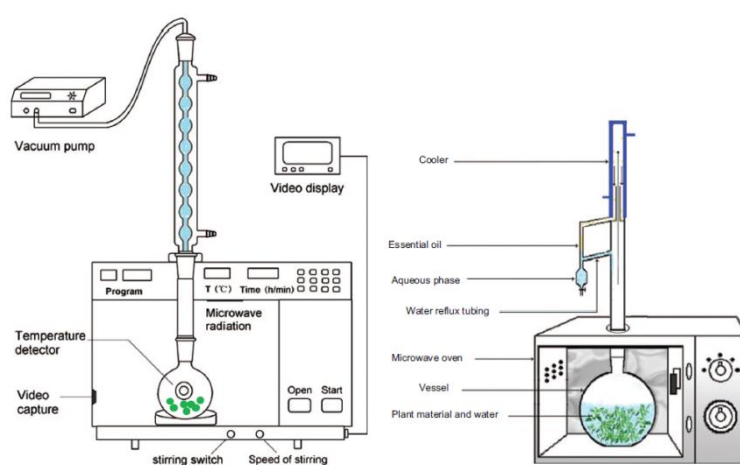


Figura 10. A la izquierda: extracción a vacío asistida por microondas. A la derecha: hidrodestilación asistida por microondas.

- Extracción acelerada con disolventes: En este caso el proceso se lleva a cabo a altas presiones para trabajar con disolventes en fase líquida por encima de su punto de ebullición. En la Figura 11 se muestra un extractor acelerador de disolvente utilizado para este tipo de extracción.



Figura 11. Extractor acelerado de disolvente Dionex™.

A continuación se comentan los procedimientos de extracción con disolventes llevados a cabo en material vegetal *Helichrysum*. En todos ellos, dada la naturaleza de los componentes activos a estudiar, compuestos fenólicos que presentan cierta polaridad, se emplean alcoholes (metanol, etanol) o mezclas acuosas de los mismos. Carini, Aldini, Furlanetto, Stefanni y Facino (2001) para la extracción de compuestos fenólicos de *Helichrysum stoechas* para su posterior identificación mediante cromatografía líquida y determinación de su capacidad antioxidante, utilizan etanol al 70% con 0,1% de ácido ascórbico para prevenir la oxidación y lo someten a agitación durante 3 horas, siendo el residuo insoluble extraído dos veces más con el mismo disolvente. El etanol se elimina bajo presión reducida a 35 °C y el residuo acuoso se lava con cloruro de metileno para la eliminación de agliconas y otros compuestos no fenólicos. El extracto bruto de *Helichrysum* se disuelve en agua y tras filtrado se somete a análisis.

Barroso *et al.* (2014), para la determinación del potencial antioxidante de *H.stoechas* utilizan dos tipos de extracción a partir de material liofilizado. Por una parte realizan una extracción hidroalcoholica con una mezcla de metanol y agua (80:20) sometida a agitación y 25 °C durante 1 hora y posteriormente filtrado. El residuo resultante es de nuevo extraído con la misma mezcla y tras rotovaporización del extracto es de nuevo liofilizado. Por otra parte realizan una decocción con agua destilada hirviendo durante 5 minutos. La mezcla se reposa 5 minutos y posteriormente se filtra, se congela y liofiliza. Tanto el extracto hidroalcoholico liofilizado como la decocción son de nuevo disueltas en metanol y agua (80:20) para la determinación de componentes fenólicos y la actividad antioxidante.

Tepe, Sokmen, Askin Akpulat y Sokmen (2005), para la determinación de la actividad antioxidante de 4 especies de *Helichrysum* de Turquía utilizan una extracción Soxhlet con metanol a 60 °C durante 6 horas. Estos extractos son filtrados, concentrados a vacío y posteriormente liofilizados. Este mismo método fue utilizado por Albayrak *et al.* (2010) para la determinación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de *H.stoechas*.

Sobhy y El-Feky (2007), para la determinación de componentes y actividad antimicrobiana de *H.stoechas* realizan una extracción con etanol al 95% durante 48 horas y posteriormente filtrado y concentrado por medio de vacío.

Haddouchi *et al.* (2014), realizaron una extracción mediante una mezcla de metanol y agua (80:20) en agitación durante 24 horas. Los extractos se evaporan a 45 °C bajo presión reducida.

Actualmente se encuentran en desarrollo nuevas tecnologías de extracción como es la extracción con flúidos supercríticos. Esta es una técnica avanzada de separación que cumple con los principios de la Química Verde, representa una alternativa válida a los métodos tradicionales de extracción. Puede generar productos de alto valor añadido sin degradación termal que presentan las técnicas extractivas tipo Soxhlet o sin el uso masivo de disolventes (generalmente tóxicos), como sucede en las extracciones clásicas (maceraciones) con disolventes orgánicos (Martín Navarro, 2012).

Un fluido es considerado como supercrítico (FSC) o bien se dice que está en condiciones supercríticas cuando se encuentra sometido a unas condiciones de presión y de temperatura mayores que su presión y temperatura críticas (Kalani y Yunus, 2011). En un diagrama de fases Presión-Temperatura de una sustancia pura, como por ejemplo el dióxido de carbono, el estado supercrítico quedaría ubicado en la región del diagrama por encima del punto crítico (región coloreada en verde en la parte superior derecha del diagrama de fases representado en la Figura 12).

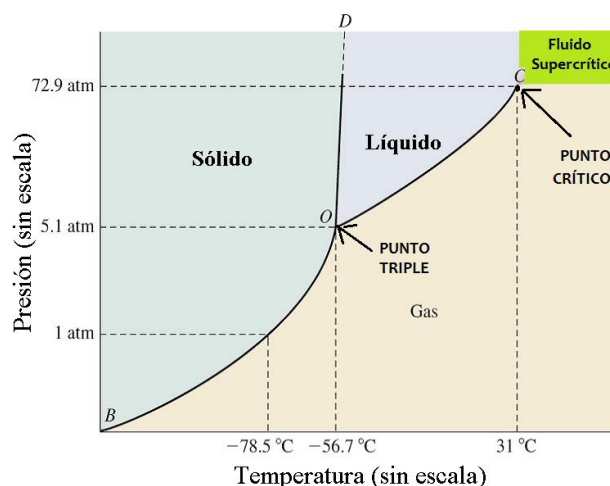


Figura 12. Diagrama de fases del CO₂.

En el diagrama de fases *P-T*, se distinguen tres regiones principales (sólida, líquida y gaseosa) separadas por sus correspondientes líneas de coexistencia bifásica o de equilibrio: sólido-

líquido, líquido-gas y sólido-gas que convergen en un punto triple o de coexistencia entre las 3 fases.

Un fluido supercrítico tiene propiedades intermedias entre un líquido y un gas (Kalani *et al.*, 2011). Como puede apreciarse en la Tabla 2, las densidades de los FSC son próximas a las de los líquidos, lo que influye en la solubilidad; por el contrario, las viscosidades son muy próximas a las de los gases, lo que facilita su movilidad.

Tabla 2. Valores típicos de densidad (ρ), viscosidad (η) y coeficientes de difusividad para gases (D), fluidos supercríticos y líquidos.

| | $\rho(\text{g/ml})$ | $\eta(\text{Pa}\cdot\text{s})$ | $D(\text{cm}^2/\text{s})$ |
|-----------------------|---------------------|--------------------------------|---------------------------|
| Gases | 10^{-3} | 10^{-5} | 10^{-1} |
| Fluidos Supercríticos | 0,2-0,9 | 10^{-4} | 10^{-4} |
| Líquidos | 0,6-1,6 | 10^{-3} | 10^{-5} |

Estas características de los fluidos supercríticos pueden aprovecharse y aplicarse en procesos de extracción y fraccionamiento, ya que desde el punto de vista de la solvatación, el proceso es tan completo como un proceso tradicional, pero resulta mucho más rápido y eficiente ya que la menor viscosidad de estos fluidos favorece la transferencia de materia y las altas presiones aplicadas junto con la difusividad permiten una mejor penetrabilidad en la matriz sólida a extraer. La principal desventaja de estos procesos radica en la elevada inversión económica inicial característica de las instalaciones a presión. De forma que estas tecnologías se recomiendan para el procesamiento de materiales altamente rentables y en aquellos sectores, como el farmacéutico, alimentario y cosmético en las que los requisitos de producción están fuertemente regulados.

En particular, el CO_2 es considerado el disolvente supercrítico ideal, ya que además de ser inocuo y químicamente inerte, permite que las condiciones de extracción sean suaves, con una temperatura crítica baja y una presión crítica moderada, lo cual evita la degradación termal de los compuestos extraídos (Martín Navarro, 2012). Utilizar un fluido supercrítico para la extracción de un material determinado a partir de una materia prima supone el reparto del material en el fluido supercrítico, seguido de un cambio de temperatura y presión que tiene como resultado el aislamiento del soluto puro por vaporización del CO_2 .

La utilización de la extracción supercrítica se puede emplear directamente como técnica extractiva sobre un material sólido o bien como técnica de fraccionamiento aplicado a un

extracto con el fin de separar compuestos en dos fracciones según la mayor o menor afinidad por el disolvente supercrítico. En el caso de querer extraer compuestos muy polares es preciso aumentar la polaridad del SC-CO₂ añadiendo un modificador de la polaridad, también denominado cosolvente, de mayor polaridad. Los cosolventes o modificadores suelen ser alcoholes de cadena corta y se añaden en proporciones entorno al 10% de manera que las condiciones supercríticas de la mezcla CO₂-modificador no se alejen mucho de las del dióxido de carbono. En la Figura 13 se muestra un diagrama de flujos para el proceso de extracción supercrítica con CO₂ como fluido supercrítico.

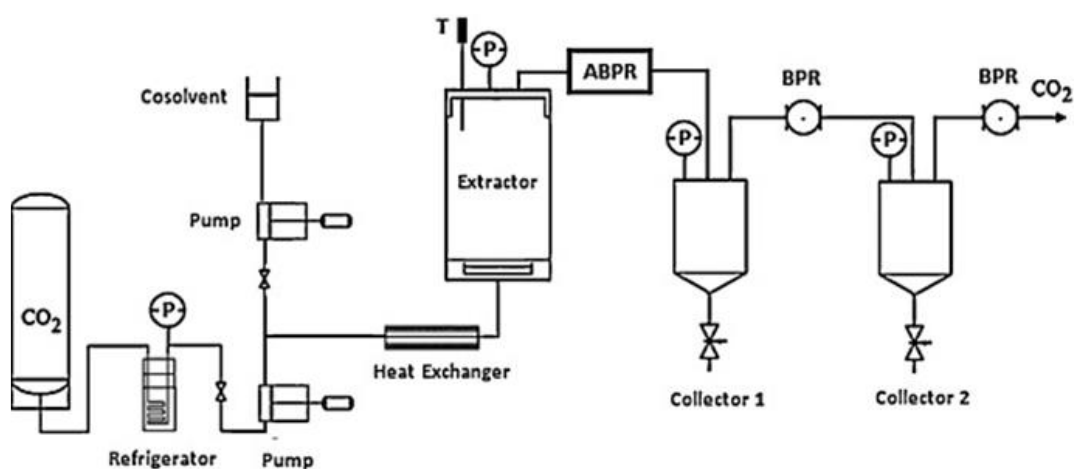


Figura 13. Diagrama de flujos del proceso de extracción supercrítica con CO₂.

Los fluidos supercríticos se pueden utilizar además como técnica de fraccionamiento (separación) de los compuestos presentes en un extracto en dos fracciones. Este es el caso que nos ocupa en el presente trabajo. En concreto se realizará un fraccionamiento antidisolvente con SC-CO₂ (SAF, de sus siglas en inglés, Supercritical Antisolvent Fractionation). Este proceso considerado como un proceso post-extractivo y cuyo esquema aparece en la Figura 14, consiste en poner en contacto, en una cámara de precipitación a presión (precipitador en el esquema), al SC-CO₂ con la disolución etanólica que contiene el extracto a fraccionar. La disolución etanólica se introduce en la cámara en forma de aerosol líquido para facilitar la mezcla de las dos corrientes. El SC-CO₂ entra en la cámara y forma con el etanol una mezcla supercrítica. Debido a la insolubilidad de muchos de los compuestos del extracto en la nueva mezcla de disolventes formada, se producirá su precipitación en la cámara. Aquellos compuestos que sigan siendo solubles en la nueva mezcla supercrítica CO₂-etanol atravesarán el filtro situado en el fondo de la cámara y se recogerán en un separador a una presión menor (fracción de espurgo).

Esta técnica permite el fraccionamiento de mezclas con compuestos no solubles en SC-CO₂, ampliando la versatilidad de las técnicas de extracción supercríticas y permitiendo la obtención de sólidos homogéneos de tamaños de partícula micro y nanométricos. La tecnología SAF o SAS, como a menudo se la conoce, se ha utilizado en diversos ámbitos tales como el refinado de lecitina en bruto, la purificación de fosfolípidos y el fraccionamiento de propóleos, entre otros.

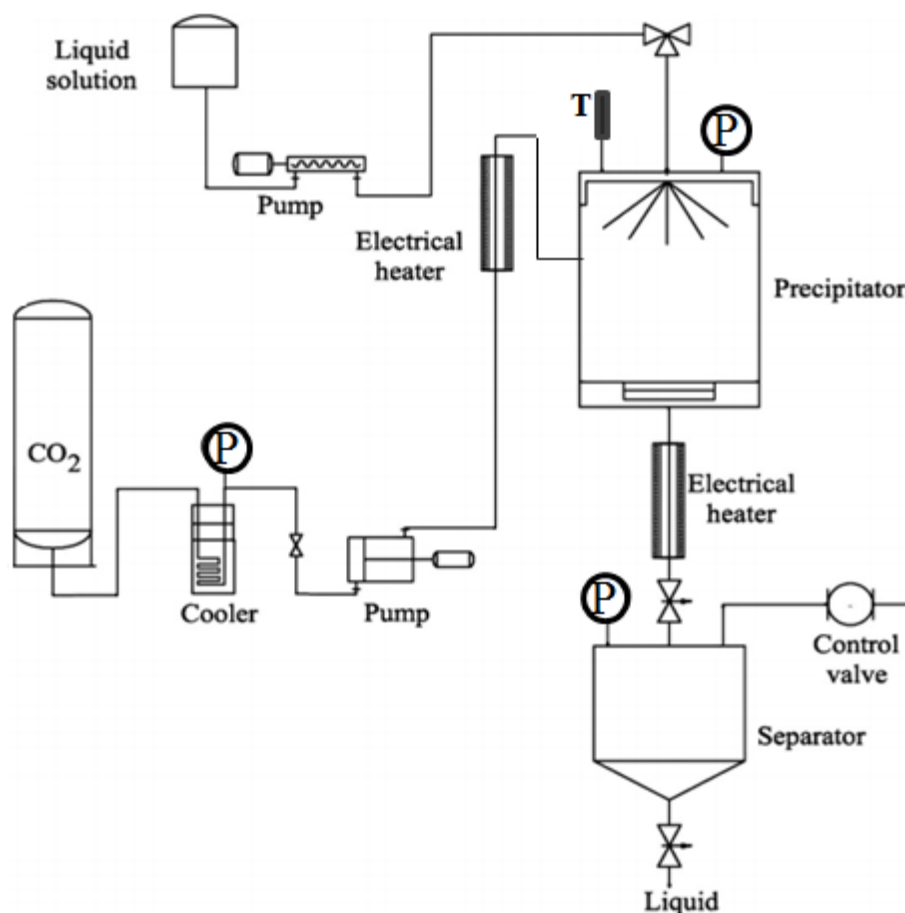


Figura 14. Diagrama de flujo del proceso SAF.

De forma general para lograr una separación óptima mediante la técnica SAF es preciso realizar un estudio previo sobre las condiciones operacionales más convenientes para lograrlo (Presión, temperatura y caudal de bombeo para el CO₂) ya que estas variables influyen sobre el valor que presenta la polaridad final de la mezcla CO₂-SC + cosolvente (etanol) y por tanto de su selectividad entre los compuestos de distinta polaridad presentes en el extracto natural. Así los compuestos que sean insolubles en la mezcla precipitarán en cámara y los solubles pasarán a través del filtro hacia el colector de espurgo.

$$\delta = 1.25 P_c^{1/2} \left[\rho / \rho_{liq} \right] \quad ,$$

$$\delta = 1.25 P_c^{1/2} [\rho/\rho_{liq}] \quad ,$$

donde P_c es la presión crítica, ρ la densidad del gas y ρ_{liq} la densidad del líquido (CO₂ en nuestro caso). A bajas presiones, la densidad de un gas es baja por lo que el poder de solvatación es bajo; cerca de las condiciones críticas, la densidad aumenta rápidamente aproximándose a la del líquido haciendo que el parámetro de solubilidad aumente conforme aumenta la presión según se aprecia en la Figura 15.

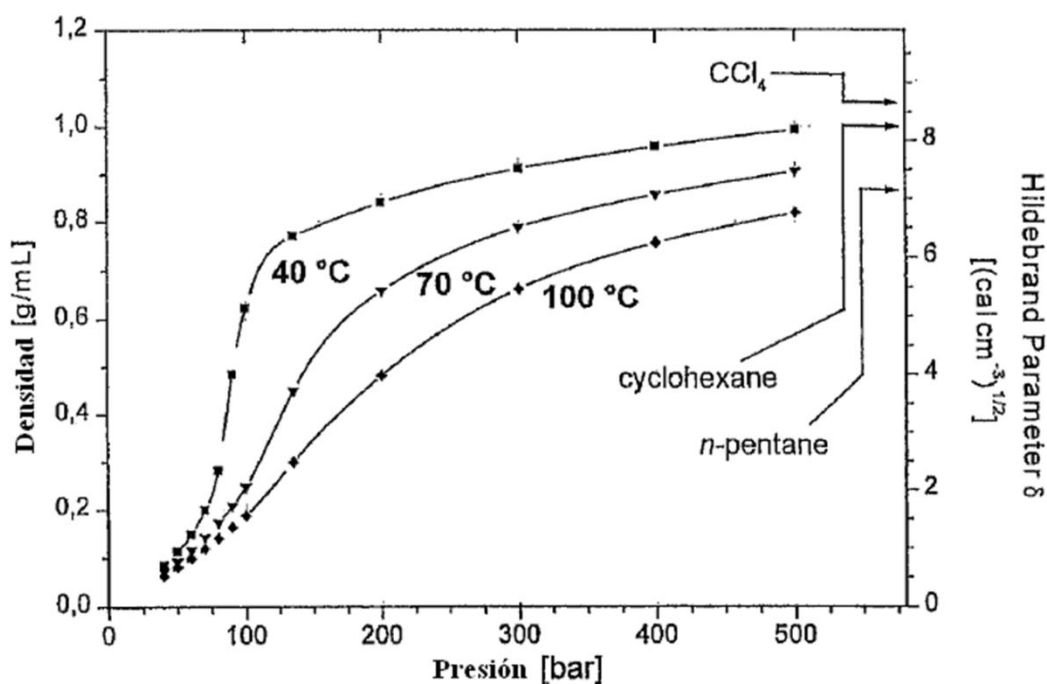


Figura 15. Densidad y polaridad (expresada a través del parámetro de Hildebrand) del CO₂ en condiciones supercríticas, como función de la presión y la temperatura.

Como puede apreciarse, en la zona supercrítica próxima al punto crítico pequeños incrementos de presión producen grandes cambios en la densidad y en la solubilidad lo cual producirá distintos rendimientos en cámara, según la naturaleza polar que tengan los

compuestos integrantes del extracto, pudiéndose lograr una separación óptima en unas condiciones adecuadas de *P* y *T*.

1.5.2 Métodos y técnicas de análisis.

Teniendo en cuenta la bibliografía consultada, a continuación se exponen los métodos de análisis utilizados para la determinación de los parámetros a estudio (capacidad antioxidante, fenoles totales, flavonoides totales) y las técnicas analíticas empleadas.

1.5.2.1 Métodos para la determinación de la capacidad antioxidante

Pese al auge cada vez más creciente en el tema de los antioxidantes no existen métodos unificados para la determinación de la capacidad antioxidante, debido a la disparidad de condiciones en las que se desarrollan las metodologías, además de la complejidad de los sistemas y matrices que deben ser evaluadas.

Los métodos para la determinación de la capacidad antioxidante se pueden clasificar en métodos directos y métodos indirectos. Con los métodos indirectos se mide la habilidad del antioxidante de estabilizar algún radical libre, para ello se emplean radicales libres metaestables coloreados, con fuerte absorción en el visible y con la adición del antioxidante se produce una disminución en la absorbancia, pudiendo así determinar actividad estabilizadora de radicales libres. Por su parte, los métodos directos se basan en el estudio del efecto del antioxidante sobre la degradación oxidativa de un sistema, de los cuales los más usados son: proteínas, ácidos nucleicos, grasas y plasma sanguíneo.

A continuación se exponen los métodos más utilizados para la determinación de la capacidad antioxidante:

Método de blanqueo de β -caroteno (BCB)

Este método se basa en la pérdida de la coloración amarilla del β -caroteno debido a su reacción con radicales que se forman por oxidación del ácido linoleico en una emulsión. La velocidad de blanqueo con β -caroteno puede ser retardada en presencia de antioxidantes, ya que neutralizan el radical libre linoleato y otros radicales libres formados (Kulisic, Radonic, Katalinic y Milos, 2004). De acuerdo a esto, la absorbancia en muestras sin antioxidantes decrece

rápidamente, mientras que en presencia de antioxidantes la solución retiene el color y así la absorbancia es mayor.

Método ABTS

Este método es ampliamente usado para materiales biológicos, compuestos puros o extractos de plantas de naturaleza hidrófila o lipofílica. Se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical catiónico ABTS^{•+}. El radical ABTS^{•+} puede ser generado por medio de enzimas (peroxidasa o mioglobina) o químicamente (dióxido de manganeso, persulfato potásico o ABAP (2,2'-Azobis-(2-amidinopropano) dihidrocloruro). El ensayo original ABTS^{•+} se basaba en la activación de metamioglobina con peróxido de hidrógeno en presencia de ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio)) para la producción del catión radical en presencia o ausencia de antioxidantes. La adicción de antioxidantes al catión radical preformado lo reduce a ABTS, dependiendo de la actividad antioxidante, la concentración del antioxidante y la duración de la reacción. Por ello el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del ABTS^{•+} se determina en función de la concentración y el tiempo y se calcula usando el Trolox (ácido \pm -6-hidroxy-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) como estándar (Re *et al.*, 1999). Este radical es más indicado para ensayos de compuestos coloreados, como por ejemplo para los antocianos, por tener un máximo de absorción a 734 nm, reduciendo la posibilidad de interferencias de compuestos coloreados que absorben en la región del visible o compuestos resultantes de una reacción secundaria (Kuskoski, Asuero, García-Parrilla, Troncoso y Fett, 2004).

Método FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power)

Esta metodología se basa en el poder que tiene una sustancia antioxidante para reducir el Fe³⁺ a Fe²⁺. Consiste en medir el incremento en la absorbancia a 593 nm (azul) que se desarrolla cuando el complejo TPTZ-Fe³⁺ se reduce a TPTZ-Fe²⁺. El complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) incoloro es reducido al complejo ferroso coloreado por productos con potenciales redox menores a 0,7 V. (Benzie y Strain, 1996). Así, cuanto más antioxidante es la sustancia objeto de estudio, mayor reducción y concentración de Fe²⁺ y por ello, más alta la señal de absorbancia. Este método se basa en la transferencia de electrones y en combinación con otros métodos puede ser útil para distinguir el mecanismo dominante de diferentes antioxidantes. Fue aplicado originalmente por Benzie y Strain para medir el poder reductor en

plasma pero se ha extendido a otros fluidos biológicos, alimentos, extractos de plantas, etc. (Antolovich, Prenzler, Patsalides, McDonald y Robards, 2002).

Método TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances)

Este procedimiento mide el malondialdehído (MDA) formado como producto principal de la degradación de hidroperóxidos generados por la oxidación de lípidos. El MDA se hace reaccionar con ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar un compuesto rosado (TBARS) que se mide espectrofotométricamente a su máximo de absorción a 532-535 nm. La evaluación de la absorbancia a 532 nm da una medida de la extensión de la degradación lipídica. El procedimiento implica dos etapas: el sustrato se oxida con la adición de un ion de metal de transición como cobre o hierro o una fuente de radicales libres tal como ABAP y posteriormente se determina la magnitud de la oxidación por adición de TBA y medición espectrofotométrica del producto. La oxidación se inhibe por la adición de un antioxidante por lo que se produce una disminución de la absorbancia cuantificable. Los resultados pueden describirse en términos de porcentaje de inhibición de la oxidación (Antolovich *et al.*, 2002).

Método del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)

De los numerosos métodos de análisis existentes para la medición de la actividad antioxidante, se optó por el del radical DPPH· por su rapidez, sencillez, economía y aceptación mundial con fines comparativos.

La molécula 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH·), se caracteriza por ser un radical libre debido a la deslocalización de su electrón desapareado por toda la molécula, lo que le permite mantenerse como monómero en lugar de dimerizar. Esta deslocalización le proporciona en disolución un color morado con banda de absorción característica en torno a 520 nm, cuantificable mediante espectroscopía visible. Cuando una solución de DPPH se mezcla con una sustancia capaz de donar un átomo de hidrógeno se produce la reducción del DPPH·, con la pérdida del color morado y resultando un color amarillo debido al grupo picril (2,4,6 – trinitrofeni) (Molyneux, 2004). El proceso puede representarse mediante el esquema mostrado en las Figuras 16 y 17.

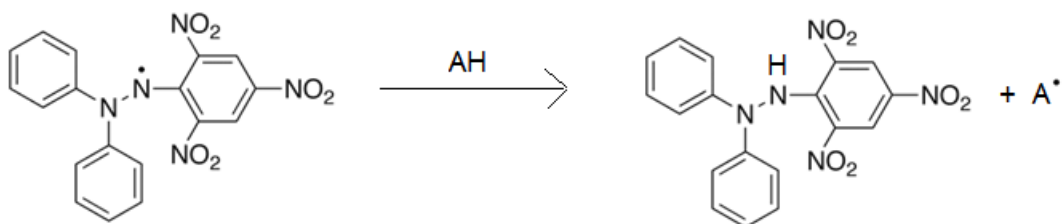


Figura 16. Reacción radicalaria entre el radical libre DPPH• y el antioxidante AH.

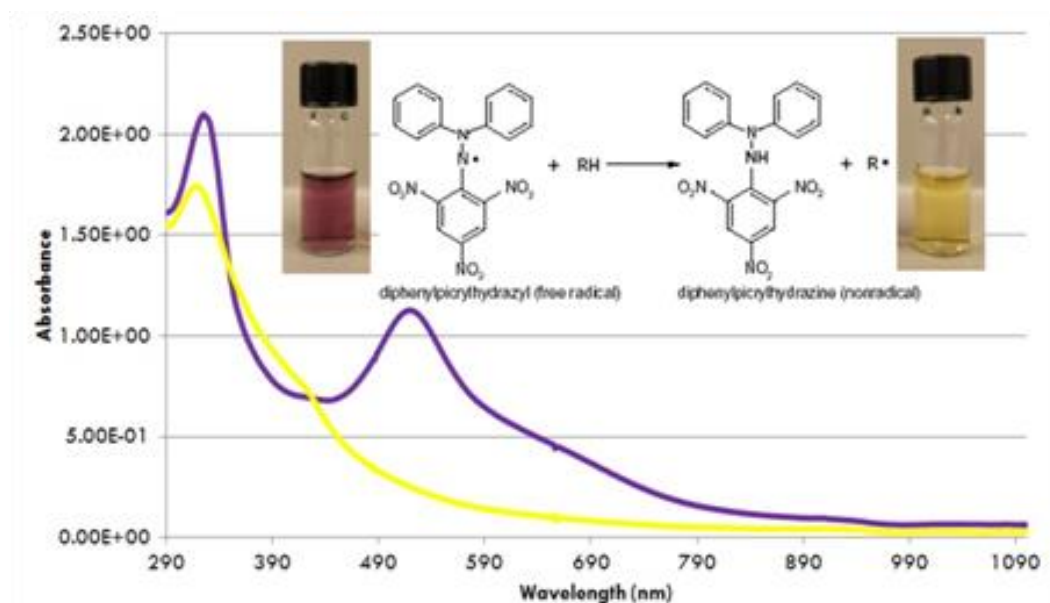


Figura 17. Absorbancias frente a la longitud de onda barrida (290-1090 nm) por espectrofotetría visible para el radical libre DPPH• (morado) y su forma reducida DPPH (amarillo).

La evolución de la reacción se puede seguir mediante espectrofotetría a longitud de onda fija de 515 nm, longitud de onda a la que presenta el máximo de absorbancia en el visible la disolución del radical, observándose una caída de la absorbancia directamente relacionada con la cantidad de radical libre presente en cada momento. Además se da la circunstancia de que la forma reducida del radical DPPH•, apenas presenta absorbancia (despreciable) a la longitud de onda de 515 nm por lo que no interfiere en el seguimiento espectrofotométrico de la evolución temporal de la concentración de radical libre.

En la Figura 18, se muestra un detalle del cambio de color que experimenta el radical libre disuelto en etanol (inicialmente de color morado) al añadir una disolución etanólica de un extracto natural conteniendo antioxidantes (decoloración progresiva de verde a verde pálido).



Figura 18. Decoloración progresiva del radical libre DPPH· (morado a la izqda.) por acción de antioxidantes naturales.

1.5.2.2 Métodos para la determinación del contenido de fenoles totales

Existen diversos métodos de análisis para la determinación de estos compuestos en material vegetal, dependiendo principalmente del tipo de matriz a analizar (flores, semillas, corteza, etc.), así como de las propiedades químicas de los compuestos fenólicos a analizar, las cuales varían significativamente debido a su diversidad estructural.

En primer lugar, se necesita realizar la extracción de los compuestos fenólicos presentes en la muestra a analizar. Parámetros como la temperatura, tiempo de extracción o tipo de disolvente pueden influir en la extracción de los compuestos fenólicos. Suelen extraerse utilizando agua, disolventes orgánicos polares como metanol, etanol, acetonitrilo o acetona, o su mezcla en agua (Tsao, 2010), siendo según la bibliografía consultada, metanol y etanol los disolventes más utilizados para la extracción en muestras de *Helichrysum*.

El método analítico más utilizado para la determinación de fenoles totales en material vegetal es el método colorimétrico Folin-Ciocalteu. Este reactivo, mezcla de ácido fosfomolibdico y ácido fosfotungstico, presenta una coloración amarilla que en presencia de compuestos fenólicos se oxidan y dan lugar a una coloración azul susceptible de ser cuantificada mediante Espectrofotometría de absorción molecular en el UV/Visible con un máximo a 765 nm (Rover y Brown, 2013). Para la cuantificación de fenoles totales mediante este procedimiento analítico se realiza una comparación con una recta patrón basada en algún compuesto fenólico como es el caso del ácido gálico. Este ha sido el método utilizado para la determinación de fenoles totales en *Helichrysum stoechas*.

1.5.2.3 Métodos para la determinación del contenido de flavonoides totales

Los flavonoides, que poseen un gran número de grupos hidroxilo insustituídos o azúcares, se consideran compuestos de polaridad alta, por lo que son extraíbles con disolventes polares como el metanol, etanol, acetona o agua.

El método más utilizado, con múltiples variantes, para la determinación de flavonoides totales es el método colorimétrico de cloruro de aluminio. Este método se basa en la formación de un complejo entre el ion aluminio $\text{Al}(\text{III})$ y los grupos carboxilo e hidroxilo de algunos flavonoides (flavonas y flavonoles) que producen un color amarillo que se puede medir mediante espectrofotometría a 415 nm (Pontis, da Costa, da Silva y Flach, 2014). En concreto el AlCl_3 forma complejos estables en solución ácida con el grupo C-4 y el grupo hidroxilo C-3 o C-5 de flavonas y flavonoles. Además, forma complejos lábiles ácidos con los grupos ortodihidroxilo en el anillo A o B de los flavonoides (Chang, Yang, Wen y Chern, 2002).

Otro método destacable para ello es el método colorimétrico con DNP (2,4-dinitrofenilhidrazina) en el que dicho compuesto reacciona con cetonas y aldehídos para formar 2,4-dinitrofenilhidrizona, resultando un color rojo medible a 495 nm (Pontis *et al.*, 2014).

Los métodos colorimétricos son los métodos empleados para esta determinación, sin embargo, ninguno de ellos puede determinar todo tipo de flavonoides. Por ejemplo, Pontis *et al.*, 2014 en su trabajo para la determinación de flavonoides en propóleo utiliza los dos métodos concluyó que el método colorimétrico de cloruro de aluminio era específico para flavonas y flavonoles, mientras que el método DNP lo era para las flavanonas. En el presente estudio se ha seleccionado el método de cloruro de aluminio.

1.5.2.4 Técnicas instrumentales para la determinación de compuestos fenólicos

Para la separación, identificación y posible cuantificación de compuestos fenólicos la técnica analítica más empleada es la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), debido a su versatilidad, alta sensibilidad, precisión y posibilidad de utilizar especies no volátiles o inestables térmicamente (Faraldos y Goberna, 2002). No obstante es la técnica instrumental más utilizada para el análisis de fenoles individuales en muestras vegetales, ya que permite una buena identificación y cuantificación de ellos. Esta técnica se basa en la distribución de los componentes presentes en una muestra, entre la fase móvil (disolvente o mezcla de disolventes) y la fase estacionaria que se encuentra fija en el interior de una columna. La separación cromatográfica es el resultado de las interacciones entre las moléculas de la muestra en ambas

fases, móvil y estacionaria. Al introducir una mezcla de varios componentes en la columna cromatográfica, la fase móvil los transporta a través de la misma y cada componente avanza a lo largo del sistema con diferente velocidad, en función de su afinidad con las fases. Ello supone que una vez terminado el recorrido de la muestra a través de la columna, cada uno de los componentes eluye con un tiempo diferente, por lo que aparecen separados. El detector colocado al final de la columna proporciona una señal y finalmente se obtiene un cromatograma. En la Figura 19 se muestra un ejemplo de un equipo de HPLC.

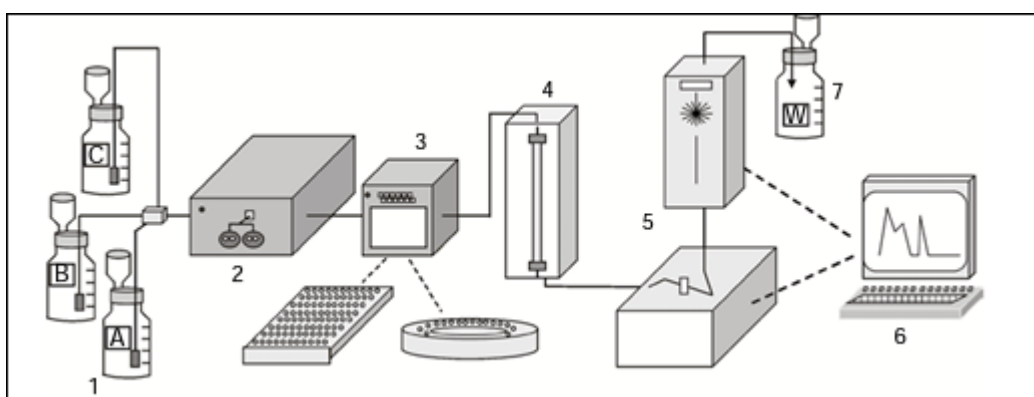


Figura 19. Principales componentes de un equipo de HPLC: (1) reservorios, (2) bomba, (3) inyector, (4) columna, (5) detectores, (6) sistema de tratamiento de datos, (7) botella de residuos. (Faraldos y Goberna, 2002).

Normalmente se trabaja en fase reversa. Se emplean columnas con fase estacionaria apolar (por ejemplo, cadenas hidrogenocarbonadas, C18) y fase móvil polar. Los disolventes más comúnmente utilizados en HPLC son: agua, metanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano.

Los detectores más utilizados para la detección y posterior cuantificación de los compuestos fenólicos separados mediante HPLC son: espectrofotómetro UV/Vis (Diode Array) por la capacidad de estos compuestos para absorber radiación electromagnética y poder obtener el espectro de absorción del compuesto, y el espectrómetro de masas, con los cuales se obtiene un espectro con las masas del compuesto para posteriormente poder realizar su identificación. Estos dos detectores han sido utilizados en el presente estudio con el objetivo de poder identificar los compuestos fenólicos presentes en las muestras.

Otra técnica muy empleada para la determinación de compuestos fenólicos es la cromatografía de gases (GC). En este caso, la muestra se volatiliza y es transportada por un gas inerte (He, N) a través de una columna ubicada en el interior de un horno cromatográfico, donde se produce la separación de los compuestos en función de su volatilidad y afinidad por la fase estacionaria de la columna. En la Figura 20 se muestran los componentes de un cromatógrafo de gases.

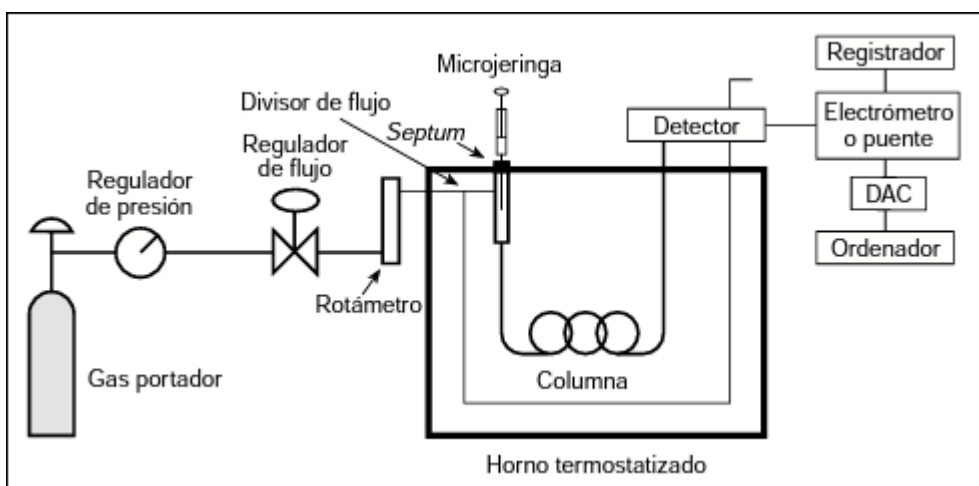


Figura 20. Principales componentes de un cromatógrafo de gases.

El fundamento de la técnica es el siguiente: el primer paso es la inyección del gas portador al equipo, este entra por el inyector y atraviesa la columna hacia el detector. A continuación se introduce la muestra en el inyector el cual se encuentra a una elevada temperatura (entre 150-250 °C), lo cual provoca la vaporización de los solutos volátiles de la muestra. Estos solutos que se han vaporizado se transportan por la columna por medio del gas portador, todo esto a una temperatura en el interior del horno siempre controlada. La velocidad de los solutos por la columna viene determinada principalmente por sus propiedades físicas, así como por la temperatura y la composición de la columna. El soluto menos retenido por la fase estacionaria es el que eluye en primer lugar, seguido del resto de solutos en el orden correspondiente. Conforme cada soluto eluye, entra en el detector donde se genera una señal electrónica en función de la interacción del soluto con el detector. Un sistema de datos almacena la señal y la representa en función del tiempo produciendo un cromatograma.

Entre los diferentes sistemas de detección que se pueden emplear en cromatografía de gases, el espectrómetro de masas es el que ofrece una gran selectividad y sensibilidad para la mayoría de los compuestos orgánicos volátiles, además de poder identificarlos en función del espectro de masas, característico para cada compuesto.

La espectrometría de masas, por lo tanto, se puede utilizar como sistema de detección en ambas técnicas cromatográficas.

Un espectrómetro de masas consta de tres partes básicas: fuente de ionización, analizador y detector. La fuente de ionización es la zona donde se introducen las moléculas, se ionizan y se aceleran. Los iones acelerados pasan al analizador de masas, el cual separa los iones

en función de su relación masa/carga (m/z). Esta corriente de iones se amplifica mediante un multiplicador de electrones situado en el detector, donde la corriente se amplifica más mediante sus componentes electrónicos asociados, que producen la señal de salida. La señal de salida de la corriente iónica frente al tiempo es impresa como corriente iónica frente a la masa, dando lugar a un espectro de masas.

Los espectros de masas permiten realizar el análisis cualitativo de los compuestos resultantes tras la separación cromatográfica. En primer lugar se selecciona el tiempo del cromatograma donde sale el compuesto a determinar y se obtiene el espectro de masas de esa región. Se elimina la contribución del ruido de fondo del espectro de masas y se identifica el compuesto por análisis deductivo o realizando su búsqueda en la base de datos del equipo, en bases de datos externas o con ayuda de datos recopilados en trabajos publicados (Faraldos y Goberna, 2002).

2. Equipos, reactivos, materiales y métodos

2.1 Equipos

Para el desarrollo del presente trabajo se han empleado los siguientes equipos:

- Tamizadora CISA modelo BA 300 N y un total de 8 tamices con pasos comprendidos entre 74 y 900 μm .
- Rotavapor Büchi R-200 con baño calefactor B-490 y controlador de vacío V-800.
- Planta de fraccionamiento supercrítico
- Espectrofotómetro UV-Visible Thermo Scientific EVOLUTION 300 de doble haz.
- Espectrofotómetro UV/VIS UNICAM UV2 de doble haz.
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Waters 600 equipado con espectrofotómetro UV/VIS "Diode Array" Waters 996
- Cromatógrafo de gases VARIAN CP-3800 equipado con detector de espectrometría de masas VARIAN Saturn 2200 y muestreador automático.
- Cromatógrafo de líquidos equipado con detector de espectrometría de masas MicrOTOF-Q equipado con una fuente de Electrospray (MicrOTOF-Q, Bruker Daltonics, Bremen, Germany)

2.2 Reactivos y materiales

2.2.1 Reactivos

Para el desarrollo del proceso experimental del presente trabajo han sido necesarios los siguientes reactivos:

Tabla 3. Disolventes y reactivos empleados en los análisis y extracciones.

| Compuesto | Proveedor | Pureza (% en masa) |
|--------------------|-----------------------|--------------------|
| n-Hexano | Panreac | 99,0 |
| Etanol | VWR Prolabo Chemicals | 99,94 |
| Dióxido de carbono | Contse | 99,99 |

| | | |
|---------------------------------|-------------------|-------|
| Metanol | Scharlau | 99.9 |
| Trolox™ | Sigma-Aldrich | 97 |
| DPPH• | Sigma-Aldrich | - |
| Reactivo Folin-Ciocalteu | Sigma-Aldrich | - |
| Ácido gálico | Sigma-Aldrich | ≥97,5 |
| Carbonato sódico | Sigma-Aldrich | ≥99,0 |
| Quercetina | Sigma-Aldrich | ≥95 |
| Nitrito de sodio | Probys | 97.5 |
| Tricloruro de aluminio | Acros Organics | 99 |
| Hidróxido sódico | T3Q | >99.0 |
| Acetonitrilo | Scharlau | 99.9 |
| Ácido fórmico | Applichem Panreac | 98.0 |
| Reactivo BSTFA-TMCS | Panreac | - |
| Acetato de etilo | Panreac | 99.5 |

2.2.2 Material vegetal

El material vegetal de partida fue flores secas de *Helichrysum stoechas*. Las flores se recolectaron en 2005 por personal especializado del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) dentro del término municipal de Léclera, localidad perteneciente a la Comarca de Belchite a 61 kilómetros de Zaragoza y a 508 metros de altitud. Posteriormente se secaron a temperatura ambiente en el CITA, se seleccionaron las flores secas para la realización del presente estudio y se guardaron en bolsas de plástico preservadas de la luz y de la humedad hasta su manipulación.

2.3 Métodos experimentales

En la Figura 21 se muestra de forma esquemática todo el proceso llevado a cabo para el tratamiento y análisis de las muestras de flor de *Helichrysum stoechas*. El material de partida

(flores secas) se somete a un tratamiento previo de trituración y molienda, seguido de un proceso de extracción de los principios activos con etanol. Parte de estos extractos etanólicos se someten a fraccionamiento supercrítico antidisolvente con CO₂, dando como resultado dos fracciones: fracción cámara y fracción espurgo. Tras ello, los tres extractos: etanólico, cámara y espurgo se someten a los diferentes análisis.

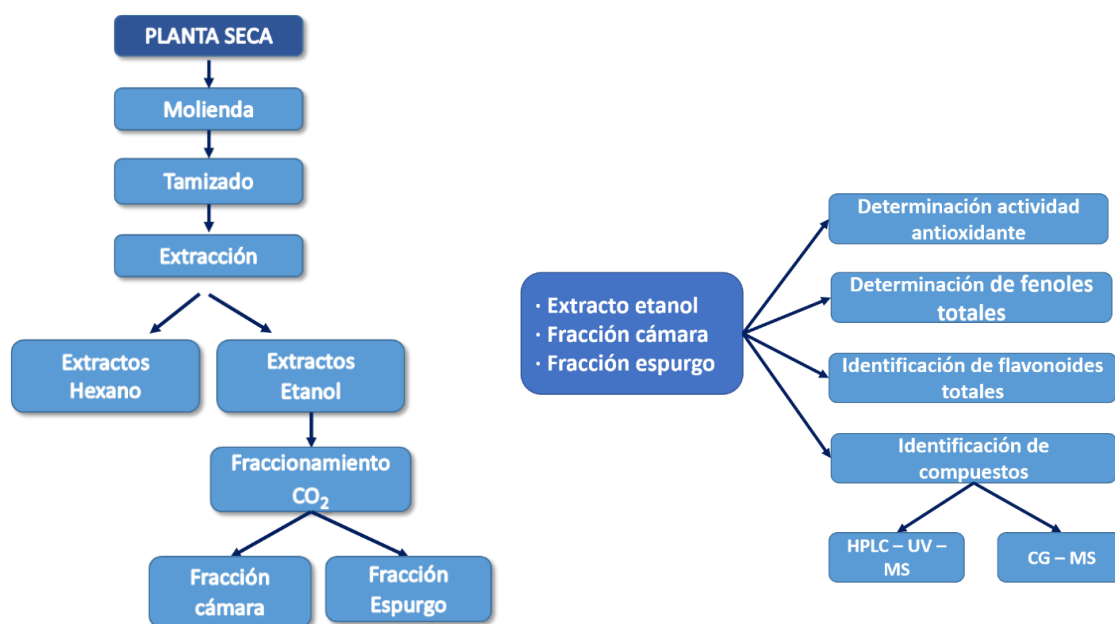


Figura 21. Esquema de procedimientos experimentales aplicados a flor seca de *Helichrysum stoechas*.

2.3.1 Molienda y tamizado

Con el objetivo de obtener un tamaño de partícula uniforme se procedió a realizar un tamizado de las muestras de *Helichrysum stoechas* la siguiente manera:

Se toma una cantidad de 100 g de flores de *Helichrysum stoechas*, las cuales se trituran convenientemente, sin triturar demasiado ya que pueden perderse componentes volátiles interesantes y tampoco sin triturar poco ya que ello podría dificultar la extracción. Tras su triturado se realiza el tamizado de este material con el fin de obtener el diámetro de partícula medio más adecuado para este tipo de material vegetal que en este caso se situó en torno a los 0,3 mm. Se escogió este tamaño de partícula en base a estudios previos (Burillo, Vila, Cañigual, Urieta, Langa y Sanz, 2010; García-Abarrio, Martín, Burillo, Porta y Mainar, 2014). El tamizado se realizó con una tamizadora electromagnética (Figura 22) en dos fases de 15 minutos cada una colocando los tamices de abajo a arriba, de menor a mayor luz de malla; en la primera fase



Figura 22. Tamizadora CISA modelo BA-300N.

se han utilizado los 4 tamices con mayor luz de paso (900, 710, 589 y 495 μm) y en la segunda los 4 de menor diámetro (400, 246, 150 y 74 μm). De cada uno de estos tamices se obtiene una cantidad de material vegetal y de ahí se selecciona una determinada cantidad de cada tamiz para formar una muestra compuesta y conseguir un tamaño de partícula de 0,3 mm.

2.3.2 Procedimientos de extracción

La obtención de los extractos del material vegetal se ha realizado mediante un proceso de maceración, técnica tradicional de extracción sólido-líquido. El material vegetal se mantiene en agitación constante y en contacto directo con una fase orgánica extractiva durante un tiempo determinado para conseguir la extracción de los compuestos solubles en ella.

El proceso de maceración se ha realizado sobre el mismo material en dos etapas consecutivas, en la primera de ella se utiliza hexano para eliminar lípidos y ceras del material vegetal, que al ser sustancias apolares se disuelven en hexano. En la segunda etapa sobre el residuo seco se añade etanol como agente extractante. El procedimiento se ha realizado por

triplicado. Para ello se han utilizado 3 botellas ámbar y en cada

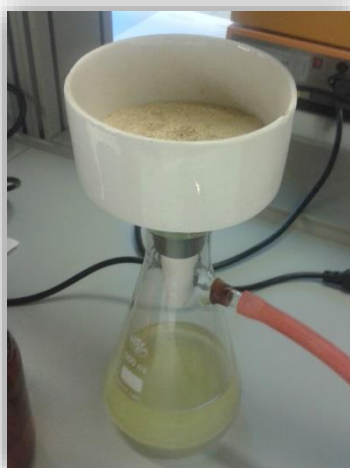


Figura 23. Fiola de filtrado de extractos

una de ellas se colocan 20 g de muestra con 200 ml de hexano y se somete a agitación durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se filtra con fiola (Figura 23) y las “tortas” de material sólido se secan a temperatura ambiente durante aproximadamente 72 horas. A continuación se realiza la segunda etapa: las tortas se colocan en 3 botellas y se añaden 200 ml de etanol y se vuelven a someter a agitación durante 48 horas (Figura 24). Tras ello la disolución se filtra con fiola obteniendo las tortas que finalmente se desechan y el

extracto que se somete a un segundo filtrado por gravedad con papel de filtro para la eliminación de posos.



Figura 24. Maceración etanólica (por triplicado) de la fracción sólida resultante de la maceración inicial en hexano.

Todos los extractos orgánicos obtenidos (hexano y etanol) se someten a un proceso de rotavaporización para eliminar el disolvente y obtener los extractos sólidos.

La temperatura del baño se fija a 42 °C y para cada disolvente se reduce la presión desde la atmosférica hasta su punto de ebullición (hexano 178 mbar, etanol 63 mbar). Una vez alcanzada dicha presión se deja destilar hasta la completa eliminación del disolvente.

Para poder cuantificar la masa final de extracto se pesa, previamente a la rotovaporización, el matraz utilizado para ello y tras rotavaporizar se realiza otra pesada.

2.3.3 Fraccionamiento supercrítico antidisolvente del extracto etanólico

Los extractos etanólicos secos obtenidos en la etapa anterior se someten a un proceso de fraccionamiento mediante el uso de CO₂, disolvente supercrítico. En concreto a este proceso se le denomina fraccionamiento supercrítico antidisolvente (SAF) y se lleva a cabo en una planta piloto construida y puesta a punto por el grupo GATHERS situada en el edificio I3A del Campus Río Ebro en Zaragoza (Figura 25).

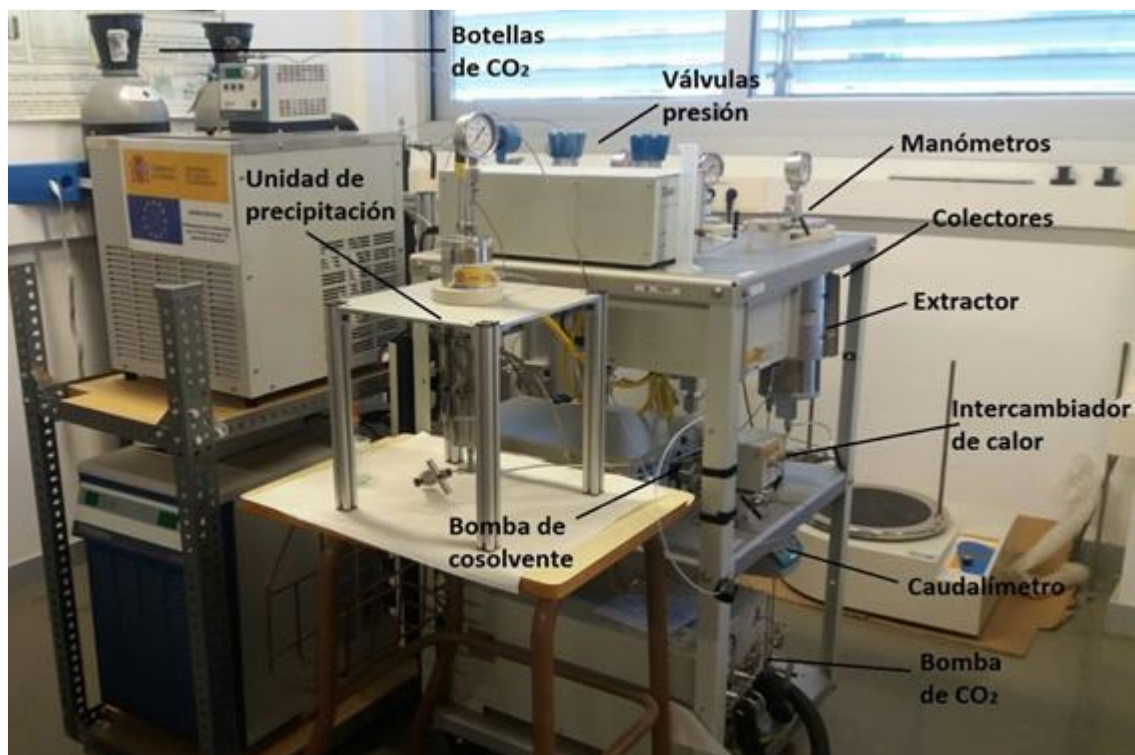


Figura 25. Planta de fraccionamiento utilizada.

A la hora de operar se debe tener en cuenta las siguientes variables: temperatura, presión y caudal de CO₂. En nuestro estudio se han realizado dos experimentos (SAF 1 y SAF 2) variando únicamente la presión (140 y 115 bar), manteniendo los caudales y temperatura en ambos casos (Tabla 4). Han sido tomadas estas condiciones del trabajo de Pinilla Paricio (2015), en el que se optimizó el proceso de fraccionamiento supercrítico antidisolvente y estas resultaron ser las condiciones con mayores rendimientos en plantas aromáticas similares a *H.stoechas*.

Tabla 4. Condiciones de operación para el fraccionamiento supercrítico antidisolvente.

| Experimento | P(bar) | T(°C) | Q _{CO2} (g/min) | Q _{cosolvente} (ml/min) |
|-------------|--------|-------|--------------------------|----------------------------------|
| SAF 1 | 140 | 40 | 30 | 0,5 |
| SAF 2 | 115 | 40 | 30 | 0,5 |

El modo de operar para el fraccionamiento ha sido el siguiente:

En primer lugar el extracto etanólico seco, aproximadamente 1,5 g, se disuelve en 60 ml de etanol y se filtra sobre una jeringuilla acoplada a un filtro de 0,45 μm . La disolución resultante es bombeada hacia la cámara donde entra en contacto con el CO_2 que llega en condiciones de temperatura y presión supercríticas. El CO_2 es bombeado con un caudal constante (30 g/min), mezclándose en la cámara de precipitación con la disolución de extracto, suministrada por la bomba de cosolvente con un caudal de 0.5 ml/minuto. En la cámara se produce la separación donde quedan los compuestos no solubles en la mezcla CO_2 + etanol. En el interior de esta cámara hay un filtro que retiene las partículas sólidas generadas. En la Figura 26 se muestra un detalle de la fracción de extracto obtenida en cámara y parte superior del inyector, una vez finalizado el proceso SAF.

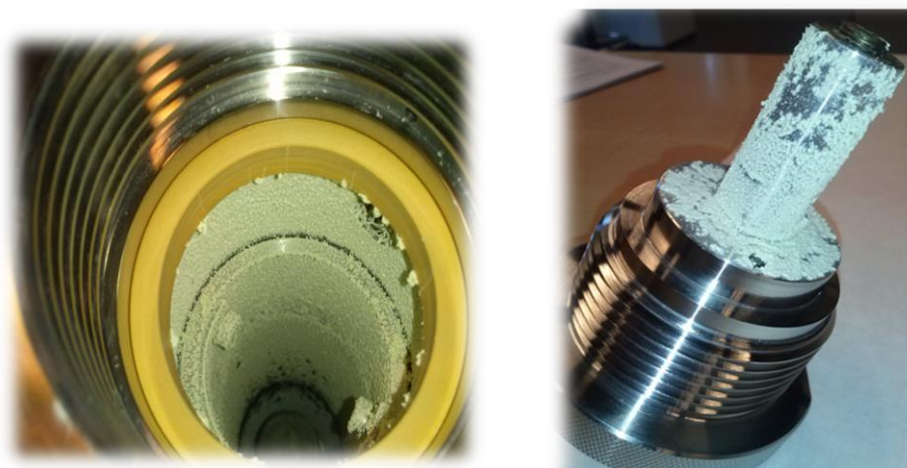


Figura 26. . Fracción del extracto etanólico obtenida en cámara. A la izquierda, el interior de la cámara. A la derecha, parte superior (tapa-inyector) de la cámara.

Todo el proceso es controlado y se mantiene a una temperatura constante de 40 °C. La fracción de compuestos solubles en la mezcla CO_2 + etanol es conducida a un colector donde se separa el CO_2 gaseoso por la parte superior y por el fondo se recoge la disolución de etanol y los componentes solubles que no fueron retenidos en cámara, a esta fracción así obtenida se le denomina espurgo. En la Figura 27 se muestra un detalle del filtro y la fracción de espurgo líquida recogida por el fondo del colector de espurgo.

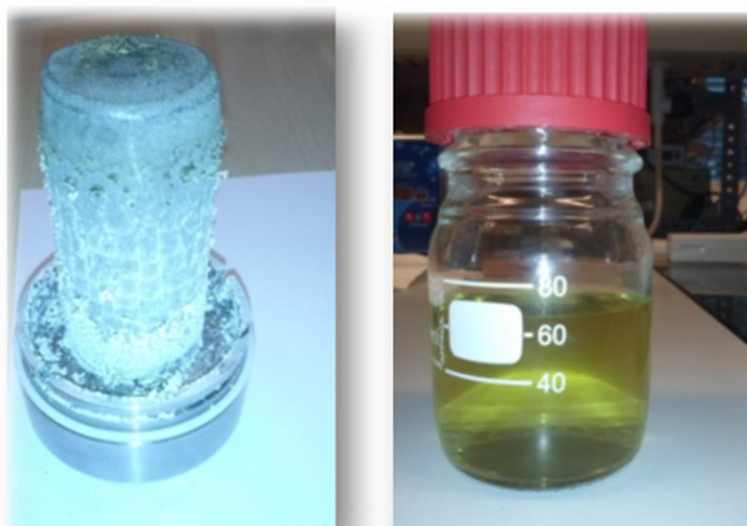


Figura 27. Detalle del filtro situado en el interior de la cámara de precipitación (izquierda) y fracción líquida recogida en el colector de espurgo (derecha).

Finalmente, las fracciones obtenidas tanto en cámara como en espurgo se rotavaporizan para cuantificación (obtención de rendimientos), su conservación conveniente y su posterior análisis.

2.3.4 Determinación de la actividad antioxidante mediante el método DPPH

Para la medida de la actividad antioxidante se ha utilizado el espectrofotómetro tipo Evolution 300 (Figura 28), capaz de trabajar en condiciones isotermas.



Figura 28. Espectrofotómetro Evolution 300.

Para esta medición es necesario termostatar la cubeta de medida y utilizar agitación para la mezcla de los reactivos (radical DPPH \cdot y antioxidante) durante la medida, por lo que se activa el método de control de temperatura, que mantendrá a una temperatura constante de 25 °C (± 1 °C) y un método de control de agitación.

Para asegurar el buen funcionamiento del espectrofotómetro se verificó su exactitud en diferentes longitudes de onda y absorbancias. Se utilizó un set de filtros fabricados por Pye

Figure 1. The effect of the number of nodes on the number of nodes in the network.

| λ filtro | λ experimental | Diferencia |
|------------------|------------------------|------------|
| 241.5 | 240,6 | 0.9 |
| 279.4 | 279.4 | 0 |
| 287.5 | 287.8 | -0.3 |
| 333.7 | 333.6 | 0,1 |
| 360.9 | 360.8 | 0.1 |
| 385.9 | 385.8 | 0.1 |
| 418.7 | 418.8 | -0.1 |
| 453.2 | 453.6 | -0.4 |
| 460 | 460.2 | -0.2 |
| 484.5 | 485.4 | -0.9 |
| 536.2 | 536.6 | -0.4 |

| | | |
|-------|-------------|------|
| 637.5 | 637.8 | -0.3 |
| | Valor medio | 0.38 |

Tabla 6. Longitudes de onda para el filtro de Didimio y medidas experimentales.

| λ_{filtro} | $\lambda_{\text{experimental}}$ | Diferencia |
|---------------------------|---------------------------------|------------|
| 573 | 572.8 | 0.2 |
| 586 | 585.4 | 0.6 |
| 685 | 685 | 0 |
| | Valor medio | 0.26 |

A la vista de los resultados obtenidos y teniendo en cuenta las especificaciones técnicas del espectrofotómetro se asume el correcto funcionamiento del equipo.

Para la aplicación del método del radical libre DPPH \cdot , en primer lugar, es necesario obtener la recta de calibrado para poder cuantificar la concentración de radical libre correspondiente a un valor dado de absorbancia. Para ello, se prepara una disolución madre de 0,05 g/L de DPPH en etanol, a partir de la cual se han realizado 5 patrones con concentraciones 0,01 g/L, 0,02 g/L, 0,03 g/L, 0,04 g/L y 0,05 g/L. Estas se someten a agitación y ultrasonidos para la disolución y a oscuridad para evitar la degradación del DPPH y finalmente se procede a su medición a 516 nm. Tras ello se determinan las absorbancias de cada uno de las disoluciones seriadas, añadiendo a la cubeta un volumen fijo de 3 ml de disolución.

Para una máxima seguridad en el manejo del método DPPH se ha utilizado como estándar el Trolox (ácido \pm -6-hidroxy-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) (Figura 30), un antioxidante, análogo sintético de la vitamina E, utilizado habitualmente como referencia, determinando su capacidad antioxidante.

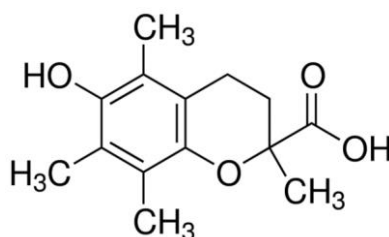


Figura 30. Estructura del Trolox.

Para ello se prepara una disolución madre de Trolox de aproximadamente 1 g/L y a partir de ella se preparan 4 disoluciones de concentraciones aproximadas 0,1 g/L, 0,2 g/L, 0,3 g/L y 0,4 g/L. Además de esto se prepara una disolución de DPPH· de aproximadamente 0,03 g/L en etanol. Se introducen 2,5 ml de esta disolución en la cubeta, se coloca en la celda termostatzada del espectrofotómetro y se mide la absorbancia a una longitud de onda de 516 nm. A los dos minutos de estar midiendo se introducen en la celda 50 µL de cada una de las disoluciones de Trolox preparadas. La medida consiste en observar la disminución de la absorbancia a lo largo del tiempo durante 15 minutos, tiempo para el cual la absorbancia se mantiene constante. Las gráficas correspondientes pueden observarse en la Figura 31. Se anota la absorbancia final a partir de la cual se determina la EC_{50} , que nos informa sobre la capacidad antioxidante de los extractos ensayados.

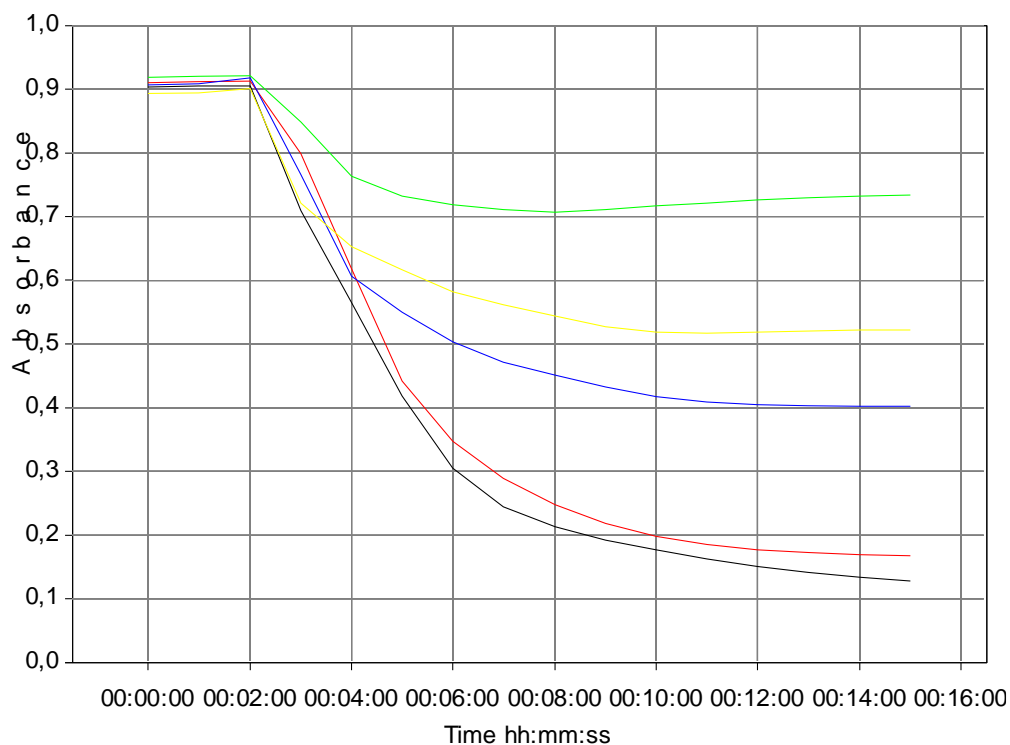


Figura 31. Representación de la evolución de la absorbancia con el tiempo por acción del antioxidante TroloxTM sobre el radical DPPH·.

En el caso de las muestras de extracto y fracciones de extracto, se preparan diferentes diluciones de cada uno de los extractos en etanol y se prepara una disolución de DPPH de aproximadamente 0,03 g/L en etanol. Se introducen 2,5 ml de esta disolución en la cubeta, se coloca en la celda termostatzada del espectrofotómetro y se mide la absorbancia a una longitud de onda de 516 nm. A los dos minutos de estar midiendo se introducen en la celda 50 µL de la

disolución antioxidante y se mide su absorbancia a los 60 minutos, tiempo al cual puede observarse una constancia de su valor.

La actividad antioxidante de los extractos fue expresada mediante tres índices: IC₅₀ (Half Maximal Inhibitory Concentration), definido como la cantidad de antioxidante necesaria para reducir un 50 % la concentración de DPPH inicial, EC₅₀ (Half Maximal Effective Concentration), concentración de un compuesto donde se observa el 50% de su efecto máximo y AAI, índice de actividad antioxidante.

El cálculo del IC₅₀ se realiza con el gráfico representando el porcentaje de inhibición (I%) frente a la concentración de cada uno de los extractos.

$$I\% = \left[\frac{Abs_i - Abs_f}{Abs_i} \right] * 100$$

Abs_i absorbancia inicial y Abs_f absorbancia final

Por su parte, el EC₅₀ se obtuvo con la recta resultante de la representación de g muestra/g DPPH frente al porcentaje de cantidad de DPPH remanente (%C remanente)

$$\%C_{remanente} = \frac{C_f \text{ DPPH}}{C_i \text{ DPPH}} * 100$$

C_f DPPH y C_i DPPH son la concentración final de DPPH una vez transcurrida la hora de reacción y la concentración inicial antes de la reacción, calculadas a partir de la recta de calibrado con absorbancia final y absorbancia inicial respectivamente.

El último de los índices, el AAI fue calculado según la siguiente ecuación:

$$AAI = \frac{C_c \text{ de DPPH } (\mu\text{g/ml})}{IC_{50} (\mu\text{g/ml})}$$

C_c de DPPH se refiere a la concentración inicial de DPPH.

El grado de actividad antioxidante basado en el índice AAI queda establecido según la escala presentada en la Tabla 7.

Tabla 7. Clasificación del poder antioxidante según el valor del índice AAI

| Rango AAI | Poder antioxidante |
|---------------|--------------------|
| AAI < 0,5 | Bajo |
| 0,5 < AAI < 1 | Moderado |
| 1 < AAI < 2 | Alto |
| AAI > 2 | Muy alto |

2.3.5 Determinación de fenoles totales

Para la cuantificación de fenoles totales se ha utilizado el espectrofotómetro UV/VIS UNICAM V2. El procedimiento llevado a cabo para la determinación es una modificación del método Folin-Ciocalteu propuesto por Yu y Dahlgren (2000). El procedimiento consiste en: se toman 0,5 ml de un extracto (etanólico, cámara o espurgo) de concentración aproximada 0,5 g/L, obtenido a partir de dilución del extracto original, y se deposita en un tubo de vidrio ámbar de 10 ml de capacidad, al que se adicionan 0,5 ml de reactivo Folin-Ciocalteu y 8 ml de agua destilada. Esta mezcla se agita manualmente durante 30 s y se introduce en ultrasonidos durante 5 minutos. Pasado este tiempo se adiciona 1 ml de disolución de carbonato sódico (Na_2CO_3) al 20% y se somete a oscuridad durante 30 min para asegurar la reacción. Finalmente, se mide la absorbancia de esta disolución en el espectrofotómetro a 760 nm, frente a una disolución blanco preparada con 0,5 ml de etanol y el resto de reactivos.

Para la realización del calibrado se ha utilizado como patrón de referencia ácido gálico. Para la obtención de la curva de calibrado de ácido gálico se prepara una disolución madre de ácido gálico de 1000 $\mu\text{g/g}$ en etanol controlada gravimétricamente, y a partir de ella se preparan disoluciones de esta en etanol de las siguientes concentraciones: 40, 100, 160, 220, 280 y 340 $\mu\text{g/g}$ (Figura 32).

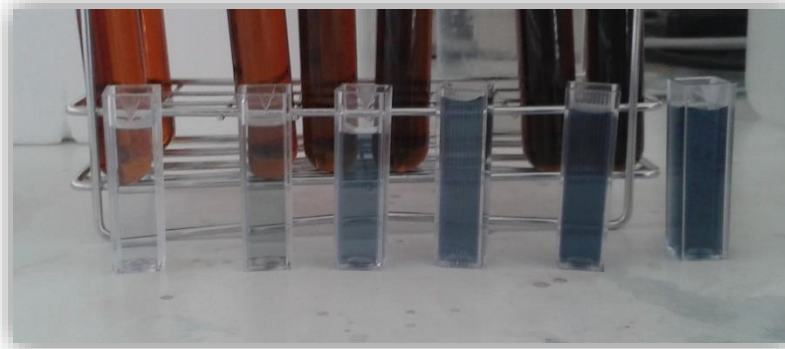


Figura 32. Disoluciones seriadas de ácido gálico para elaboración de la recta de calibrado.

En base a la recta obtenida se calcula la concentración de fenoles totales, por lo que los resultados se han expresado como mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por gramo de peso seco de muestra (mg EAG/g muestra) o por gramo de extracto (mg EAG/g extracto).

2.3.6 Determinación de flavonoides totales

Para la determinación de flavonoides totales se ha utilizado el método colorimétrico del cloruro de aluminio desarrollado en el trabajo de Kamtekar, Keer y Patil (2014), con una única modificación: las medidas se realizaron a 415 nm en lugar de 510 nm. Las medidas se han realizado en el espectrofotómetro UV/VIS UNICAM V2.

El procedimiento llevado a cabo es el siguiente: en un tubo de vidrio de 10 ml se adiciona 1 ml de extracto de planta (extracto etanólico, cámara o espurgo), al que se añaden 4 ml de agua destilada y 0,3 ml de solución de nitrito sódico (NaNO_2) al 5%. Transcurridos 5 min se adicionan 0,3 ml de tricloruro de aluminio (AlCl_3) al 10% y al cabo de 6 minutos se añaden 2 ml de hidróxido sódico 1 M (NaOH) y se lleva a un volumen total de 10 ml con agua destilada (2,4 ml). Finalmente, tras mezclar bien, se mide la absorbancia en el espectrofotómetro a 415 nm, empleando como blanco agua destilada.

Para la realización del calibrado se ha utilizado como patrón de referencia el flavonoide quercetina. Se prepara una disolución madre de quercetina de 1000 $\mu\text{g/ml}$ en metanol, y a partir de ella se preparan disoluciones patrón de concentración: 4, 8, 10, 20 y 30 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 33).



Figura 33. Disoluciones seriadas de quercetina para elaboración de la recta de calibrado.

En base a la recta de calibrado obtenida se calcula la concentración de flavonoides totales, por lo que los resultados se han expresado como mg equivalentes de quercetina (EQ) por gramo de peso seco de muestra (mg EQ/g muestra) o por gramo de extracto (mg EQ/g extracto).

2.3.7 Separación e identificación de compuestos fenólicos mediante HPLC-UV/Vis

Estos análisis se han realizado en el cromatógrafo de líquidos del laboratorio de Química Analítica de la Escuela Politécnica Superior de Huesca.

Para la separación de compuestos fenólicos mediante HPLC-UV/Vis se ha trabajado en fase reversa, con columna apolar y fase móvil polar mezcla de acetonitrilo y agua con 0,1 % de ácido fórmico en gradiente. En la Tabla 9 se muestran las condiciones cromatográficas empleadas y en la Tabla 8 se muestran las distintas disoluciones de la fase móvil utilizadas con sus proporciones en acetonitrilo y ácido fórmico, así como el gradiente empleado para la separación de compuestos fenólicos.

Tabla 8. Disoluciones de la fase móvil y gradiente empleado en HPLC-UV/Vis

| Fases móviles | Acetonitrilo | Ácido fórmico 0,1 % |
|---------------|--------------|---------------------|
| A | 15 | 85 |
| B | 25 | 75 |
| C | 35 | 65 |

| D | 50 | | 50 | |
|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Tiempo (min) | %A | %B | %C | %D |
| 0 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| 12 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| 15 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 20 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 22 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| 40 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| 42 | 100 | 0 | 0 | 0 |

Tabla 9. Condiciones cromatográficas HPLC-UV/Vis.

| | |
|---|---|
| Columna | XTerra RP ₁₈ 3,5 µm (4,6 x 100 mm) |
| Temperatura columna cromatográfica | 35 °C |
| Fase móvil | Acetonitrilo/agua (0,1% ácido fórmico) |
| Flujo fase móvil | 0,8 ml/min |
| Volumen inyectado | 20 µL |
| Longitud de onda | 210 a 400 nm |
| Tiempo cromatográfico | 47 min |

Para la identificación de compuestos fenólicos mediante HPLC se han inyectado todos los extractos diluidos con concentración aproximada de 0,5 g/L en etanol. Tras registrar los cromatogramas a las longitudes de onda seleccionadas previamente, se obtienen los espectros de absorción molecular de los distintos picos señalados en el cromatograma. Se ha realizado una revisión bibliográfica para tratar de identificar a través de los mismos los compuestos

presentes. Para ello se han consultado los espectros de absorción de compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides principalmente) tanto en artículos sobre *Helichrysum stoechas* como en artículos sobre otras plantas y otros artículos científicos de interés (Mabry, Markham y Thomas, 1970; Andersen y Markham, 2006; Sampietro, Catalan y Vattuone, 2009; Guimarães et al., 2013; Ruiz et al., 2013; López-Corona, 2013; Likhanov, 2014; Brito, Ramirez, Areche, Sepúlveda y Simirgiotis, 2014; Plazonić, Bucar, Maleš, Mornar, Nigović y Kujundžić, 2009; Sakakibara, Honda, Nakagawa, Ashida y Kanazawa, 2003; Anouar, Gierschner, Duroux y Trouillas, 2012; Xu, Shen, Cheng y Qu, 2008). De los flavonoides se ha recopilado información sobre bandas de absorción y longitudes de onda de máxima absorción, debido a que muchos de los espectros de absorción de estos compuestos son similares, por lo que se hace difícil su identificación. En la Tabla 10 se muestran los rangos de absorción en el espectro UV-Vis para diferentes clases de flavonoides.

Tabla 10. Rangos de absorción para las diferentes clases de flavonoides (Sampietro et al., 2009; Andersen et al., 2006).

| Tipo de flavonoide | Banda I (nm) | Banda II (nm) |
|----------------------------------|--------------|---------------|
| Flavonas y flavonoles | 320-370 | 240-290 |
| Flavononas y flavononoles | 270-295 | 236 |
| Isoflavonas | 300-330 | 240-270 |
| Cumarinas | 311 | 274 |

2.3.8 Separación e identificación de compuestos fenólicos mediante GC-MS

Tras la realización de cromatografía de líquidos se ha realizado cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas, técnica más resolutive y eficaz en la separación de compuestos, la cual nos permite obtener más información (espectros de masas) sobre los compuestos presentes en las muestras. Estos análisis se han llevado a cabo en el laboratorio del departamento de Química Analítica de la EPS de Huesca.

Para la separación de compuestos fenólicos mediante cromatografía de gases se ha realizado una derivatización a los extractos, necesaria ya que los compuestos fenólicos presentan baja volatilidad y se descomponen al calentarse por encima de su punto de ebullición. La derivatización es un procedimiento que se basa en la modificación química del analito a determinar para detectarlo o separarlo con más facilidad. Las reacciones que se utilizan para la transformación a compuestos más volátiles son la metilación y la derivatización con reactivos

de la familia trimetilsilil, llamada sililación, donde se utiliza trifluoroacetamida, N-(tert-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamina y derivados de trimetilsilil. La sililación es el método de derivatización más utilizado para analizar compuestos fenólicos mediante GC-MS. Consiste en el intercambio de un hidrógeno activo (presente en un grupo –OH, –COOH, =NH, –NH₂ o –SH) por un grupo trimetilsilil. Los reactivos más comunes para la derivatización de compuestos fenólicos son el N,O-bis-(trimetilsilil)acetamida (BSA), el N,O-bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), el N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA) y la mezcla BSTFA-TMCS (trimetilclorosilano) y como disolventes se suele utilizar acetona o acetato de etilo (Li, Liu, Cai y Shao, 2009). En el presente trabajo se ha utilizado como reactivo BSTFA-TMCS y acetato de etilo como disolvente y se ha aplicado el método optimizado por Cervera en el Trabajo Fin de Grado (Cervera, 2013).

El procedimiento de derivatización consiste en: se toman 0,5 ml de extracto (extracto etanólico, cámara o espurgo) de una concentración aproximada 0,5 g/L, se trasvasan a un vial de análisis y se evapora el disolvente hasta sequedad mediante corriente de nitrógeno. Al extracto evaporado se añaden 0,5 ml de acetato de etilo como catalizador y 0,75 ml de reactivo derivatizante BSTFA-TMCS (N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida). La reacción de derivatización se ha llevado a cabo mediante calentamiento en microondas en 3 etapas de 2 minutos cada una a potencia 600 W. La disolución resultante se deja reposar durante 15 minutos para finalmente ser inyectada en el cromatógrafo.

Las condiciones en las que se ha trabajado son las que se describen a continuación:

- Cromatógrafo de gases (GC): columna capilar HP5 (marca) (5% fenilpolisiloxano) de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. Inyección modo split (1:20), volumen de inyección 1 µL. Flujo gas portador (He) de 1 mL/min a una presión de 10,5 psi. Temperatura del inyector 270 °C y gradiente de temperatura en el horno: Tinicial: 100 °C (durante 3 min); gradiente de 10 °C/min hasta 300 °C y Tfinal: 300 °C (durante 20 min).
- Espectrómetro de masas (MS): modo ionización de Impacto Electrónico (IE). Energía de ionización -11,8 V (filamento). Temperatura trampa: 150 °C y Temperatura línea transferencia: 280 °C. Detección modo SCAN con un rango de medida: 100 – 650 m/z.

Una vez obtenidos los resultados, se ha procedido a la identificación de los compuestos presentes en las muestras por comparación de los espectros de masas obtenidos con los espectros proporcionados por la librería disponible en el software del equipo detector y mediante la comparación con espectros de masas proporcionados en artículos científicos de

interés como son los trabajos de Barroso *et al.*,2014; Carini *et al.*,2001; Guimarães *et al.*,2013; Brito *et al.*,2014; Moldoveanu,2014, además del uso de bases de datos como NIST (NIST Chemistry WebBook) o Massbank.

2.3.9 Separación e identificación de compuestos fenólicos mediante HPLC-MS

Con el objeto de confirmar los compuestos identificados mediante las otras técnicas cromatográficas (HPLC-UV/Vis y CG-MS) y de tratar identificar más compuestos se ha empleado la cromatografía de líquidos con detector de espectrometría de masas (HPLC-MS). La diferencia de esta técnica con el HPLC-UV/Vis es que la espectrometría MS es mucho más sensible y selectiva que la espectrofotometría UV.

La separación e identificación de compuestos fenólicos presentes en la muestra mediante HPLC-MS se ha realizado con el equipo instrumental del Servicio General de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza. Se ha trabajado en fase reversa y con fase móvil acetonitrilo/agua (0,1% ácido fórmico) en gradiente. En la Tabla 11 se muestran las condiciones cromatográficas y en la Tabla 12 las condiciones del gradiente de fase móvil.

Tabla 11. Condiciones cromatográficas HPLC-MS.

| | |
|------------------------------|--|
| Columna | C18 Tecknocroma 3 μ m (10 x 0,21 mm) |
| Temperatura columna | T ambiente |
| Fase móvil | Acetonitrilo/agua (0,1% ácido fórmico) |
| Flujo inyectado | 0,2 ml/min |
| Volumen inyectado | 5 μ L |
| Tiempo cromatográfico | 60 min |

Las condiciones de ionización fueron las siguientes:

- El espectro fue adquirido en un rango de masas m/z de 50 a 1200.
- En modo negativo (ESI-) el Voltaje del capilar y del endplate offset fueron de 4500V y de -500V respectivamente.

Tabla 12. Gradiente de fase móvil para la separación de compuestos fenólicos mediante HPLC-MS.

| Tiempo (min) | Ácido fórmico 0,1% (Fase A) | Acetonitrilo (Fase móvil B) |
|--------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 5 | 85 | 15 |
| 10 | 80 | 20 |
| 20 | 75 | 25 |
| 30 | 65 | 35 |
| 50 | 50 | 50 |
| 60 | 85 | 15 |

Para la identificación de compuestos fenólicos mediante HPLC-MS se han inyectado las muestras con concentración aproximada de 1,5 g/L en etanol.

La dificultad de identificación de compuestos mediante esta técnica radica en que no existe una biblioteca que facilite la identificación como en el caso de la cromatografía de gases masas (CG-MS) y el resultado depende del sistema o del método de ionización. El modo de trabajar para la identificación ha sido el siguiente: partiendo de los posibles compuestos (según bibliografía) presentes en *H.stoechas* y con las masas exactas y fórmula “empírica” $C_nH_xO_y$ de dichos compuestos se realiza la búsqueda en el cromatograma para ver que pico presenta un espectro con masas características de dicho compuesto. Además también se han tratado de identificar otros compuestos a partir de los datos de sus masas características aportados en diversos estudios sobre identificación de compuestos fenólicos en material vegetal (Fu *et al.*, 2014; Ruiz *et al.*, 2013; Brito *et al.*, 2014; Nováková, Vildová, Mateus, Gonçalves y Solich, 2010; Sapoznikova, 2013; Plazonic *et al.*, 2009).

3. Resultados y discusión

A continuación se muestran los resultados obtenidos de los distintos procedimientos aplicados a las muestras objeto de estudio.

3.1 Tamizado

Con el objetivo de conseguir una muestra representativa de material vegetal con un tamaño de partícula óptimo (0,3 mm) para la extracción se prepara una muestra compuesta a partir de diferentes cantidades de cada uno de los tamices utilizados. Este procedimiento asegura una manera sistemática de preparar muestras para extracción de manera homogénea. En la Tabla 13 se muestran las cantidades tomadas de cada uno de los tamices tras el tamizado de 100 g de material vegetal seco y triturado.

Tabla 13. Masa obtenida en cada uno de los tamices utilizando como material de partida 100 g de flores secas de Helichrysum stoechas trituradas.

| Diámetro tamices (μm) | Masa obtenida (g) |
|-----------------------|-------------------|
| 74-150 | 7,2 |
| 150-246 | 27,4 |
| 246-400 | 37,2 |
| 400-495 | 14,6 |
| 495-589 | 3,2 |
| 589-710 | 6,0 |
| 710-900 | 4,4 |

En la Figura 34 se representa gráficamente las cantidades de material vegetal obtenidas en cada uno de los tamices.

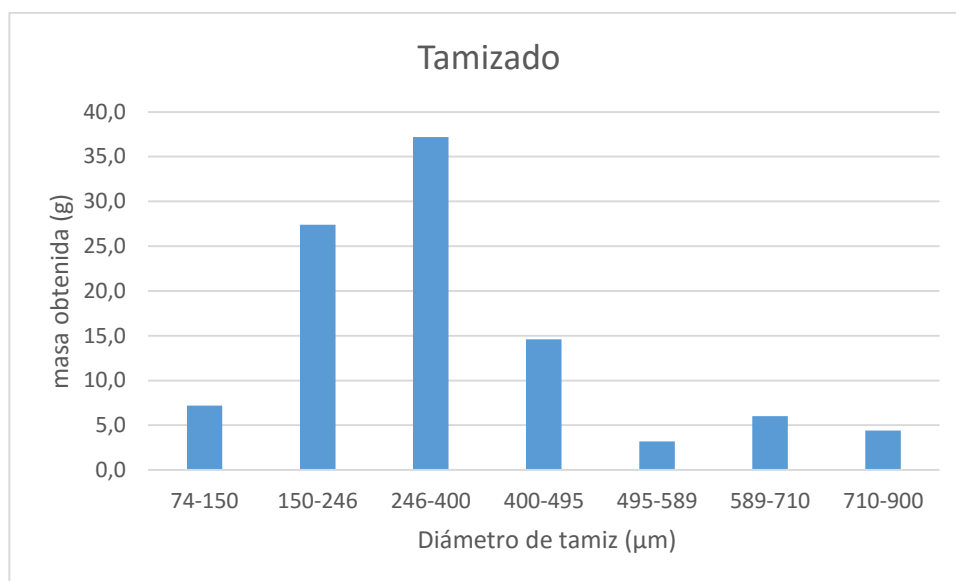


Figura 34. Representación de la masa obtenida en cada uno de los tamices.

Para la preparación de la muestra con un tamaño de partícula óptimo (0,3 mm) se debe tomar cierta cantidad de material vegetal de cada uno de los tamices, y puede calcularse según el método expuesto en la Norma ANSI/ASAE S319.4 mediante la siguiente expresión:

$$d_m = \log^{-1} \left[\frac{\sum_{i=1}^n (m_i \log \bar{d}_i)}{\sum_{i=1}^n m_i} \right]$$

donde:

$$\bar{d}_i = (d_i \times d_{i+1})^{0,5}$$

m_i : masa recogida sobre el tamiz i ; d_i y d_{i+1} : diámetros de la luz de malla de los tamices i e $i+1$

En la Tabla 14 se muestran los resultados de la aplicación de la anterior expresión con la que se obtienen los gramos a tomar de cada uno de los tamices para conseguir tres muestras compuestas de 20 gramos cada una de ellas.

Tabla 14. Masa de material vegetal tomada de cada uno de los tamices para la preparación de muestra compuesta para el análisis.

| Diámetro tamices (μm) | Masa tomada (g) |
|-----------------------|-----------------|
| 74-150 | 2,3 |
| 150-246 | 3,50 |

| | |
|----------------|------|
| 246-400 | 6,20 |
| 400-495 | 4,50 |
| 495-589 | 0,75 |
| 589-710 | 1,75 |
| 710-900 | 1,00 |

Con esta distribución se consiguió un tamaño de partícula de 0,313. En la Figura 35 puede observarse gráficamente dicha distribución.

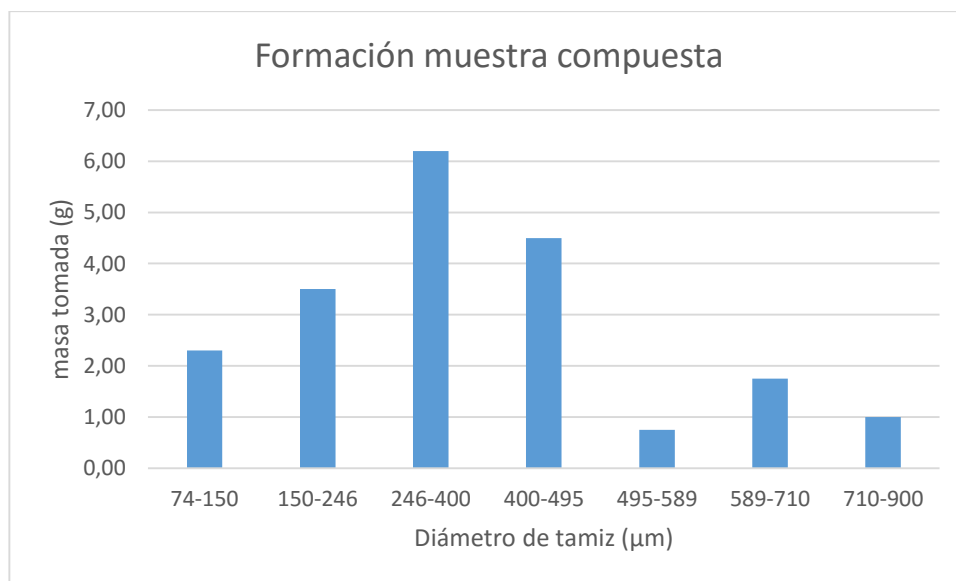


Figura 35. Representación de la masa de material vegetal tomada de cada uno de los tamices.

Como puede observarse en el gráfico la mayor masa tomada ha sido del tamiz con un diámetro (0,246-0,4 mm) que comprende el tamaño de partícula que se pretende conseguir (0,3 mm), sin embargo, es necesario tomar masa del resto de tamices para la formación de la muestra compuesta según indica la normativa anteriormente mencionada.

3.2 Rendimiento de las extracciones

A continuación se muestran los resultados obtenidos en el rendimiento de las extracciones con hexano, etanol y fraccionamiento SAF (cámara y espurgo).

Han sido realizados 3 extractos (3 botellas) con cada uno de los disolventes, hexano y etanol. En la Tabla 15 se muestran los resultados obtenidos tras las extracciones para cada una de las botellas, así como el resultado final. En ella también se muestra el rendimiento obtenido tras la extracción, calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{\text{Masa extracto obtenido}}{\text{Masa material vegetal inicial}} \times 100$$

Tabla 15. Rendimiento de las extracciones con hexano y con etanol.

| Extracción | | Masa inicial (g) | Masa extracto obtenido (g) | Rendimiento (%) |
|------------|-----------|------------------|-------------------------------|--------------------|
| Hexano | Botella 1 | 20 | 0,42 | 2,08 |
| | Botella 2 | 20 | 0,48 | 2,38 |
| | Botella 3 | 20 | 0,45 | 2,25 |
| | Media | | | 2,24 |
| Etanol | Botella 1 | 20 | 1,55 | 7,78 |
| | Botella 2 | 19,9 | 1,53 | 7,71 |
| | Botella 3 | 20,2 | 1,37 | 6,80 |
| | Media | | | 7,43 |

Como se observa la extracción con etanol consigue mayores rendimientos que la de hexano, esto es esperable debido a la mayor capacidad extractiva del etanol y la mayor presencia de compuestos polares en el material vegetal. Esto suele ser frecuente en el tratamiento de hojas y flores de plantas aromáticas y medicinales (Pinilla Paricio, 2015; Martín Navarro, 2012).

De los extractos etanólicos se ha realizado el fraccionamiento con CO₂, realizando dos experimentos, variando únicamente la presión de trabajo. En la Tabla 16 se muestran las masas obtenidas tanto de cámara como de espurgo para cada uno de los experimentos, así como el rendimiento obtenido.

Tabla 16. Resultados del fraccionamiento supercrítico antidisolvente.

| Experimento | P(bar) | m _{inicial} (g) | m _{final} (g) | Rendimiento (%) |
|-------------|--------|--------------------------|------------------------|-------------------|
| SAF 1 | 140 | 1,53 | Cámara: 0,82 | Cámara: 53,72 |
| | | | Espurgo: 0,37 | Espurgo: 24,28 |
| SAF 2 | 115 | 1,22 | Cámara: 0,53 | Cámara: 43,27 |
| | | | Espurgo: 0,25 | Espurgo: 20,48 |

Como se puede observar el rendimiento ha sido mayor con el experimento 1, es decir, con una mayor presión de trabajo.

3.3 Resultados de la actividad antioxidante en los extractos de *H.stoechas*

3.3.1 Obtención de las rectas de calibrado de DPPH

Para la obtención de cada una de las rectas de calibrado se preparó una disolución madre de DPPH de aproximadamente 0,5 g/L, a partir de la cual se prepararon 5 disoluciones seriadas. En la Tabla 17 se muestran las concentraciones de las disoluciones empleadas para cada recta y sus absorbancias.

Tabla 17. Datos calibración de DPPH.

| | Concentración disoluciones (g/L) | Absorbancias |
|------------|--|--------------|
| Recta 1 | 0,0100 | 0,2739 |
| | 0,0201 | 0,5690 |

| | | |
|----------------|--------|--------|
| | 0,0302 | 0,8462 |
| | 0,0504 | 1,4604 |
| | 0,0403 | 1,1572 |
| Recta 2 | 0,0099 | 0,2781 |
| | 0,0199 | 0,5554 |
| | 0,0298 | 0,8327 |
| | 0,0398 | 1,1259 |
| | 0,0498 | 1,3942 |
| Recta 3 | 0,0101 | 0,2839 |
| | 0,0202 | 0,5860 |
| | 0,0303 | 0,8702 |
| | 0,0404 | 1,1632 |
| | 0,0506 | 1,4665 |

Con estas concentraciones y absorbancias se obtiene la recta de calibrado. En la Figura 36 se muestra la recta de calibrado y el coeficiente de correlación (R^2).

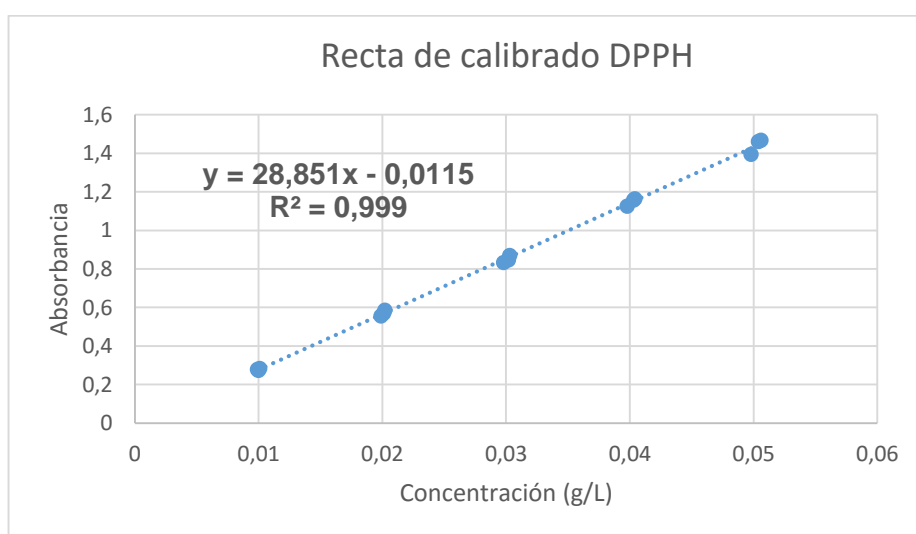


Figura 36. Recta de calibrado DPPH.

3.3.2 Validación del método mediante el Trolox

Para la validación del método mediante el Trolox se prepararon 4 disoluciones a partir de una disolución madre de Trolox de 1 g/L. Además se preparó una disolución de DPPH de 0,3 g/L. Se realizó por triplicado, utilizando nuevas disoluciones para cada una de ellas. En la Tabla 18 se muestran las concentraciones de Trolox de todas las disoluciones, la relación Trolox/DPPH, la absorbancia final y la concentración remanente relativa de DPPH.

Tabla 18. Concentraciones de Trolox de las disoluciones de partida, ratio Trolox/DPPH, absorbancia final y concentración remanente de DPPH.

| | C_{Trolox} (mol/l) | mol Trolox/mol DPPH | Abs _{final} | CR _{DPPH} (%) |
|----------------|-----------------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| Serie 1 | | | | |
| 1 | $4,035 \cdot 10^{-4}$ | 0,098 | 0,734 | 80,116 |
| 2 | $8,071 \cdot 10^{-4}$ | 0,203 | 0,522 | 58,943 |
| 3 | $1,211 \cdot 10^{-3}$ | 0,300 | 0,366 | 41,082 |
| 4 | $1,614 \cdot 10^{-3}$ | 0,398 | 0,167 | 19,401 |
| Serie 2 | | | | |
| 1 | $4 \cdot 10^{-4}$ | 0,097 | 0,749 | 81,093 |
| 2 | $8 \cdot 10^{-4}$ | 0,194 | 0,507 | 55,381 |
| 3 | $1,2 \cdot 10^{-3}$ | 0,290 | 0,360 | 39,447 |
| 4 | $1,601 \cdot 10^{-3}$ | 0,387 | 0,187 | 21,094 |
| Serie 3 | | | | |
| 1 | $4,075 \cdot 10^{-4}$ | 0,107 | 0,615 | 72,335 |
| 2 | $8,111 \cdot 10^{-4}$ | 0,214 | 0,487 | 57,740 |
| 3 | $1,219 \cdot 10^{-3}$ | 0,322 | 0,235 | 28,688 |
| 4 | $1,622 \cdot 10^{-3}$ | 0,427 | 0,147 | 18,308 |

Con las rectas resultantes de la representación mol Trolox/mol DPPH frente a la CRD_{DPPH} fueron calculados los valores de EC_{50} para cada una de ellas (Tabla 19).

Tabla 19. Resultados EC_{50} para el Trolox.

| Serie | EC_{50} (mol Trolox/ mol DPPH) |
|--------------|----------------------------------|
| 1 | 0,25 |
| 2 | 0,24 |
| 3 | 0,25 |
| Media | 0,24 |

El valor proporcionado por Bortolomeazzi, Sebastianutto, Toniolo y Pizzariello (2007) de EC_{50} para el Trolox en $0,26 \pm 0,01$ mol Trolox/mol DPPH. Otros valores encontrados han sido 0,24 (Gordon, Paiva-Martins y Almeida, 2001) y 0,21 (Nenadis, Boyle, Bakalbassis y Tsimidou, 2003). Los valores obtenidos se encuentran dentro de este intervalo, por lo que podemos confirmar que el método aplicado para la determinación de la actividad antioxidante, así como el funcionamiento del espectrofotómetro para hacer las medidas son correctos.

3.3.3 Actividad antioxidante de los extractos

Tras verificar, mediante la determinación de la actividad antioxidante del Trolox, que la metodología experimental era la adecuada se procedió a determinar la actividad antioxidante de los extractos vegetales. Se realizaron análisis de las tres botellas de extracto etanólico y duplicado de cámara y espurgo de cada una de las dos experiencias de supercrítico. A continuación, en la Tabla 20, se muestran los resultados con los tres índices (EC_{50} , IC_{50} , AAI), así como la media de cada uno de ellos.

Tabla 20. Actividad antioxidante de los extractos de H.stoechas.

| Extractos | Muestra | EC_{50} (g extracto/g DPPH) | IC_{50} (μ g extracto/ml disolución) | AAI |
|-----------|-----------|-------------------------------|---|------|
| | Botella 1 | 1,06 | 9,22 | 2,97 |

| | | | | |
|---------------------------|--------------|-------------|--------------|-------------|
| Extracto etanólico | Botella 2 | 0,97 | 11,28 | 2,70 |
| | Botella 3 | 0,99 | 9,11 | 3,40 |
| | Media | 1,01 | 9,87 | 3,02 |
| | σ | 0,05 | 1,22 | 0,35 |
| SAF 1 | Cámara 1 | 0,72 | 6,60 | 4,62 |
| | Cámara 2 | 0,70 | 8,47 | 3,60 |
| | Media | 0,71 | 7,54 | 4,11 |
| | σ | 0,01 | 1,32 | 0,72 |
| | Espurgo 1 | 4,84 | 12,32 | 2,31 |
| | Espurgo 2 | 5,05 | 18,73 | 1,63 |
| | Media | 4,95 | 15,52 | 1,97 |
| | σ | 0,15 | 4,53 | 0,48 |
| | | | | |
| SAF 2 | Cámara 1 | 0,80 | 6,37 | 4,73 |
| | Cámara 2 | 0,79 | 11,22 | 2,68 |
| | Media | 0,79 | 8,79 | 3,70 |
| | σ | 0,01 | 3,43 | 1,45 |
| | Espurgo 1 | 5,16 | 15,32 | 2 |
| | Espurgo 2 | 5,25 | 18,12 | 1,70 |
| | Media | 5,20 | 16,72 | 1,85 |
| | σ | 0,06 | 1,98 | 0,21 |
| | | | | |

En base al resultado del AAI vemos que la mayoría de resultados son mayor que 2, por lo que podemos decir que la actividad antioxidante de esta planta es muy alto (Tabla 7). Tanto la fracción cámara como el extracto etanólico presenta una actividad considerada muy alta ($AAI > 2$), mientras que el espurgo entra en el rango considerado como alto ($1 < AAI < 2$).

La actividad antioxidante de la fracción cámara es bastante superior a la obtenida de espurgo, por lo tanto, la mayor parte de los compuestos responsables de la capacidad antioxidante del material vegetal se han concentrado en cámara. Por lo que la aplicación del fraccionamiento al extracto inicial de etanol sí que es factible llevarlo a cabo y en este caso el tratamiento SAF 1, a mayor presión, da mejores resultados.

En el trabajo de Tepe *et al.* (2004), se determina la actividad antioxidante de otras especies de *Helichrysum*: *H.arenariu*, *H.noeanum*, *H.plicatum* y *H.chionophilum*, siendo esta última la que presentó una mayor capacidad antioxidante con un $IC_{50}=40,5 \mu\text{g/ml}$. Así mismo, en el trabajo de Albayrak *et al.* (2010), también se realiza un estudio de la actividad antioxidante de diferentes especies *Helichrysum*, siendo los extractos metanólicos de *H.stoechas* los que presenta mayor actividad antioxidante ($IC_{50}=7,95 \mu\text{g/ml}$). Este valor es algo inferior al encontrado en las muestras analizadas en el presente estudio ($IC_{50}=9,87 \mu\text{g/ml}$). En el trabajo de Haddouchi *et al.* (2014), también este valor es inferior $IC_{50}=6,57 \mu\text{g/ml}$ en extractos etanólicos. En él también se realiza una comparación con muestras de *Phagnalon saxatile*, las cuales presentan mucha menor capacidad antioxidante ($IC_{50}=129,77 \mu\text{g/ml}$).

En el trabajo de Yasmina María (2016) se mide la actividad antioxidante de *Salvia Sclarea*, otra planta aromática, dando como resultados un EC_{50} (g extracto/g DPPH) de 1,36 y un AAI de 0,69, lo que muestra una actividad antioxidante significativamente menor que la obtenida en el presente trabajo para *H.stoechas*. En este trabajo también se realizó un fraccionamiento con CO_2 supercrítico y tras él se observó una gran concentración de compuestos con capacidad antioxidante en la fracción cámara ($EC_{50}=1,13$; AAI=0,87), al igual que sucede en el presente trabajo.

3.4 Contenido de fenoles totales en extractos y en flor de *H.stoechas*

Cada uno de los extractos han sido analizados por duplicado. En la Tabla 21 se muestra la media de los resultados obtenidos, en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg EAG/g) para cada uno de los extractos, además de la desviación estándar total (σ).

Tabla 21. Concentración media de fenoles totales (FT) en los extractos y en y flor de *H.stoechas*.

| | Fenoles Totales extracto (mg EAG/g) | Fenoles totales flor (mg EAG/g) |
|-----------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| Extractos etanólicos | | |
| Botella 1 | 210,23 | 16,34 |
| Botella 2 | 212,07 | 16,35 |
| Botella 3 | 221,80 | 15,09 |
| Media | 214,70 | 15,93 |
| σ | 6,22 | 0,73 |

| | | |
|----------------------------|---------------|--|
| SAF 1 | | |
| Cámara | 236,07 | |
| | 244,28 | |
| Media | 240,18 | |
| σ | 5,80 | |
| Espurgo | 222,24 | |
| | 228,74 | |
| Media | 225,49 | |
| σ | 4,60 | |
| SAF 2 | | |
| Cámara | 224,13 | |
| | 231,33 | |
| Media | 227,73 | |
| σ | 5,09 | |
| Espurgo | 194,82 | |
| | 192,23 | |
| Media | 193,53 | |
| σ | 1,83 | |

A continuación, en la Figura 37 se muestran gráficamente los resultados, para poder ver la variabilidad entre los diferentes extractos.

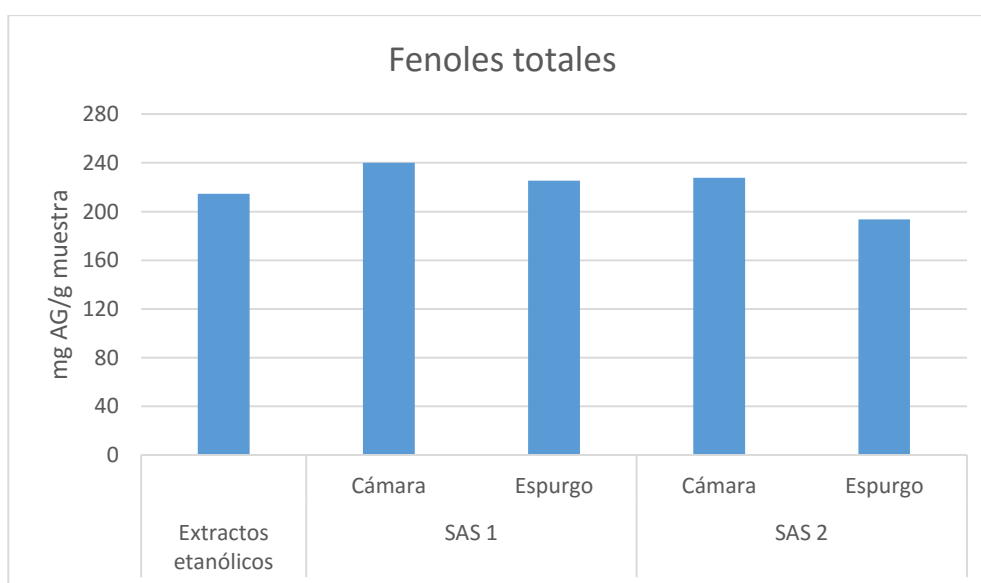


Figura 37. Gráfico del contenido de fenoles totales (mg AG/g) en los extractos de *H.stoechas*.

Como puede observarse en el gráfico la diferencia entre espurgo y cámara es muy pequeña, por lo que no se han concentrado los fenoles en ninguno de ellos tras el fraccionamiento, aunque el contenido es algo inferior en espurgo. Si comparamos ambos fraccionamientos (SAF 1 y SAF 2) podemos ver que es menor el contenido fenólico en la segunda experiencia, en la cual el rendimiento de extracción también era menor.

Comparando con artículos sobre *Helichrysum stoechas* observamos que los valores obtenidos son mayores que en el trabajo de Haddouchi *et al.* (2014) donde el valor de fenoles totales en flores de *H. stoechas* subsp. *rupestre* es de $31,34 \pm 1,92$ mg EAG/g muestra para extractos metanólicos, determinados mediante el método Folin-Ciocalteu. Sin embargo, en el estudio de Albayrak *et al.* (2010), el contenido en fenoles totales de extractos metanólicos de *H. stoechas* subsp. *barellieri* es de $94,16 \pm 0,5$ mg EAG/g extracto, valor inferior al resultado obtenido aquí. En el trabajo de Haddouchi *et al.* (2014), también se realiza un análisis de muestras de *Phagnalon saxatile* mostrando esta mucho menos contenido de fenoles totales (4,80 mg EAG/g muestra) que *H. stoechas* (15,93 mg EAG/g).

En el Trabajo de Fin de Grado de Yasmina María Coman (2016) se midió el contenido de fenoles totales en muestras de otra planta aromática, *Salvia Sclarea*, dando como resultado un contenido de fenoles totales en la maceración etanólica de 134,99 mg EAG/g de extracto, mucho menor que el obtenido en el presente trabajo para *H. stoechas* (214,70 mg EAG/g extracto). Tras un fraccionamiento con CO₂ supercrítico, se observa una concentración de fenoles totales en la fracción cámara (161,49 mg EAG/g extracto). El contenido de fenoles totales en espurgo fue de 61,03 mg EAG/g extracto.

3.5 Contenido de flavonoides totales en extractos y en flor de *H. stoechas*

Para la determinación del contenido de flavonoides totales se han realizado análisis de cada uno de los extractos por duplicado. En la Tabla 22 se muestran los resultados de flavonoides totales expresados en miligramos equivalentes de quercetina por gramo de muestra (mg EQ/g), con la media final de cada uno de los extractos, así como la desviación estándar (σ).

Tabla 22. Concentración media de flavonoides totales en los extractos y en flor de *H. stoechas*.

| Flavonoides totales extracto (mg EQ/g) | Flavonoides totales flor (mg EQ/g) |
|--|------------------------------------|
|--|------------------------------------|

| | | |
|-----------------------------|---------------|--------------|
| Extractos etanólicos | | |
| Botella 1 | 177,07 | 13,77 |
| Botella 2 | 175,85 | 13,56 |
| Botella 3 | 183,47 | 12,48 |
| Media | 178,79 | 13,27 |
| σ | 4,09 | 0,69 |
| SAF 1 | | |
| Cámara | 236,80 | |
| | 219,27 | |
| Media | 228,04 | |
| σ | 12,39 | |
| Espurgo | 68,67 | |
| | 77,01 | |
| Media | 72,84 | |
| σ | 5,90 | |
| SAF 2 | | |
| Cámara | 219,70 | |
| | 202,28 | |
| Media | 210,99 | |
| σ | 12,31 | |
| Espurgo | 59,15 | |
| | 61,22 | |
| Media | 60,19 | |
| σ | 1,47 | |

A continuación, en la Figura 38 se muestran gráficamente los resultados, para poder ver la variabilidad entre los diferentes extractos.

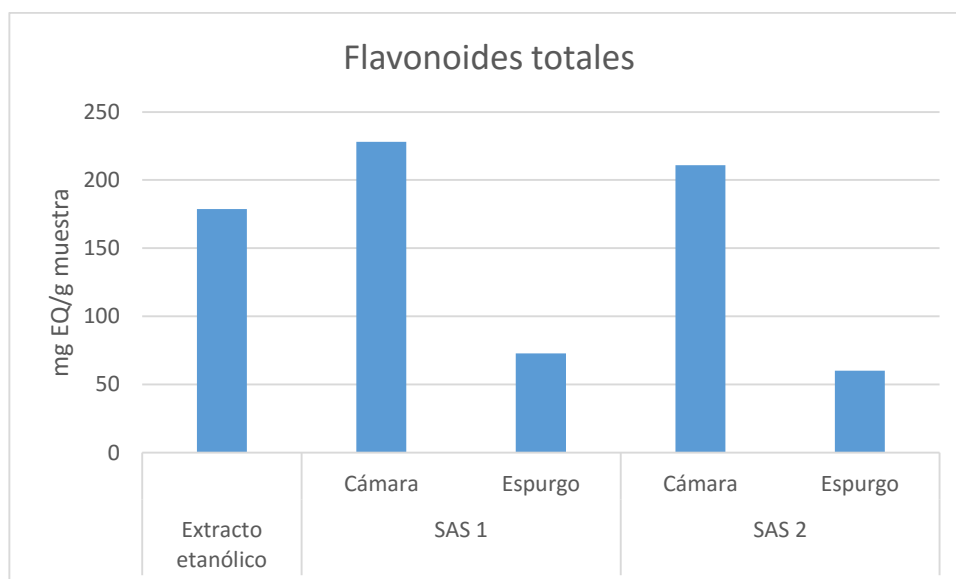


Figura 38. Gráfico del contenido de flavonoides totales (mg AG/g) en los extractos de *H.stoechas*.

Como puede observarse en el gráfico, en el caso de los flavonoides totales si es evidente una concentración de estos en cámara tras el fraccionamiento. Al igual que en el caso de los fenoles totales, la diferencia entre los dos experimentos (SAF 1 y SAF 2) no es muy significativa, si bien es menor en el segundo caso.

Estos valores son mayores a los encontrados en trabajos anteriores. En el trabajo de Haddouchi *et al.* (2014) el contenido de flavonoides totales en extractos metanólicos de *H.stoechas* subsp. *rupestre* es de $10,48 \pm 0,28$ mg de catequina/g de muestra, medido también mediante el método colorimétrico del cloruro de aluminio. En el trabajo de Barroso *et al.* (2014) el contenido de flavonoides totales en extractos metanólicos de *H.stoechas* es de $61,45 \pm 1,67$ mg/g extracto, muy inferior al resultado obtenido en este trabajo (178,74 mg EQ/g extracto).

Comparando con otras flores, en el trabajo de Meneses-Reyes, Soto-Hernández, Espinosa-Solares y Ramírez-Gúzman (2008) se realiza un análisis del contenido de flavonoides en flor de manzanilla (*Matricaria recutita*) arrojando un resultado de flavonoides totales de 6,48 mg EQ/g muestra seca, contenido significativamente menor que el obtenido en este trabajo para flores de *H.stoechas* (13,27 mg EQ/g).

3.6 Compuestos fenólicos separados e identificados en los extractos de *H.stoechas*

Con objeto de identificar los compuestos fenólicos presentes en el extracto etanólico y en los extractos fraccionados de cámara y espurgo de *Helichrysum stoechas* se han realizado una serie de ensayos/pruebas aplicando las técnicas cromatográficas (HPLC y cromatografía de

gases) ya comentadas en el apartado de procedimientos. A continuación se van a exponer brevemente las pruebas realizadas con ambas técnicas y los resultados obtenidos.

3.6.1. Análisis mediante HPLC-UV/Vis

Para la determinación de compuestos mediante HPLC se han analizado cada uno de los extractos (etanólico y cámara-espurgo de SAF 1 y SAF 2) con sus réplicas correspondientes e inyectadas por duplicado y se han registrado los cromatogramas a dos longitudes de onda: 280 y 330 nm. Se toman estas longitudes ya que tras realizar un barrido de longitudes de onda fueron estas las longitudes de mayor absorción a las cuales se detectan los compuestos mayoritarios.

En la siguiente Figura 39 se muestra el cromatograma perteneciente a uno de los extractos etanólicos:

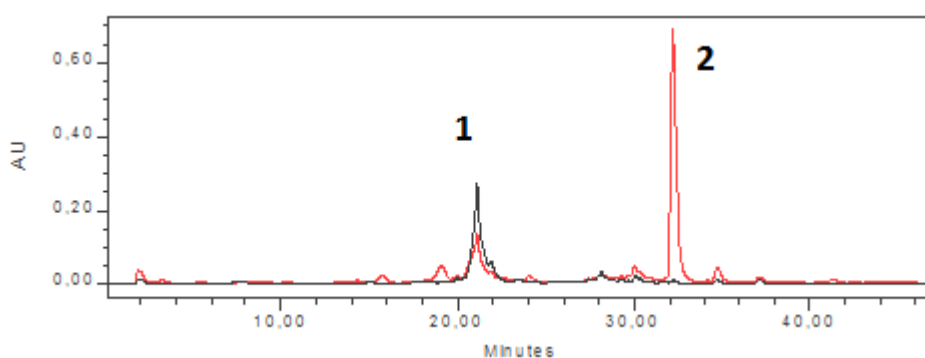


Figura 39. Cromatograma HPLC-UV extracto etanólico (1,55 g/L) a 280 nm (línea roja) y 330 nm (línea negra).

Como puede observarse hay dos compuestos mayoritarios: el compuesto mayoritario 1 con un tiempo de retención de 21,1 minutos puede observarse a ambas longitudes de onda (280 y 330 nm), mientras que el compuesto mayoritario 2 con un tiempo de retención de 32,1 minutos solamente se observa a 280 nm.

A continuación, en la Figura 40 se muestran los espectros de absorción de ambos compuestos:

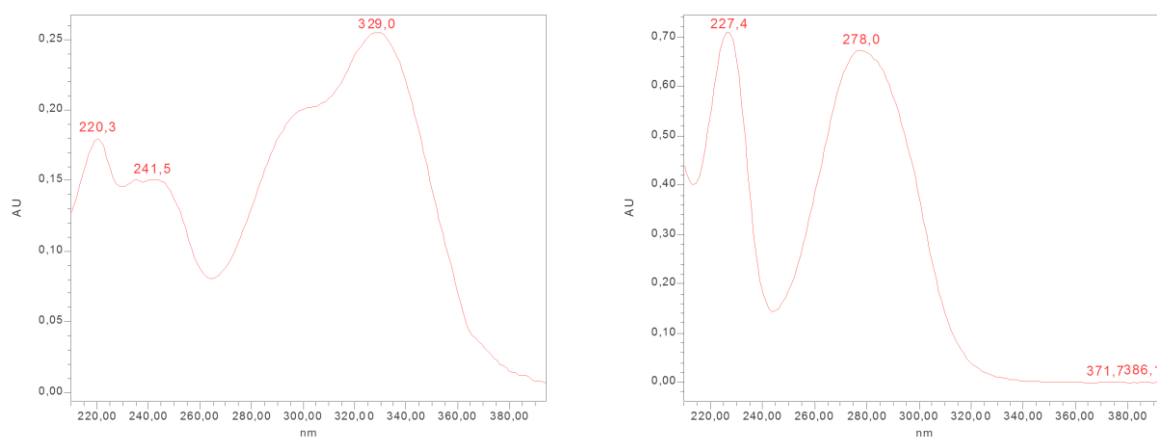


Figura 40. Espectros de absorción de los compuestos mayoritarios: Compuesto 1 (izquierda) y Compuesto 2 (derecha).

Para el caso de la cámara se muestra a continuación, en la Figura 41, el cromatograma resultante:

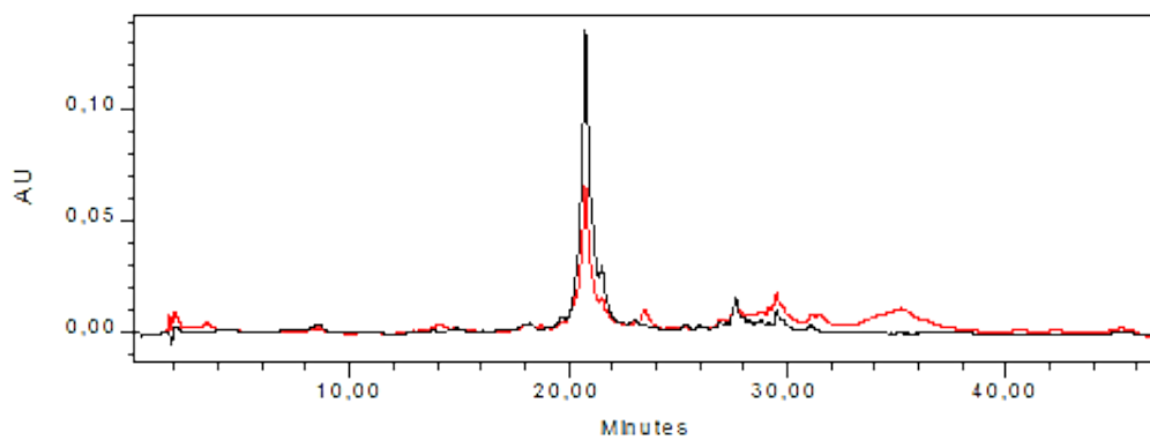


Figura 41. Cromatograma HPLC-UV de extracto de cámara SAF 1 (0,514 g/L) a 280 nm (línea roja) y a 330 nm (línea negra).

Como puede observarse en cámara se ha concentrado el compuesto perteneciente al pico mayoritario 1, absorbiendo a ambas longitudes de onda, mientras que el pico mayoritario 2 no aparece.

El cromatograma perteneciente al espurgo se muestra en la Figura 42:

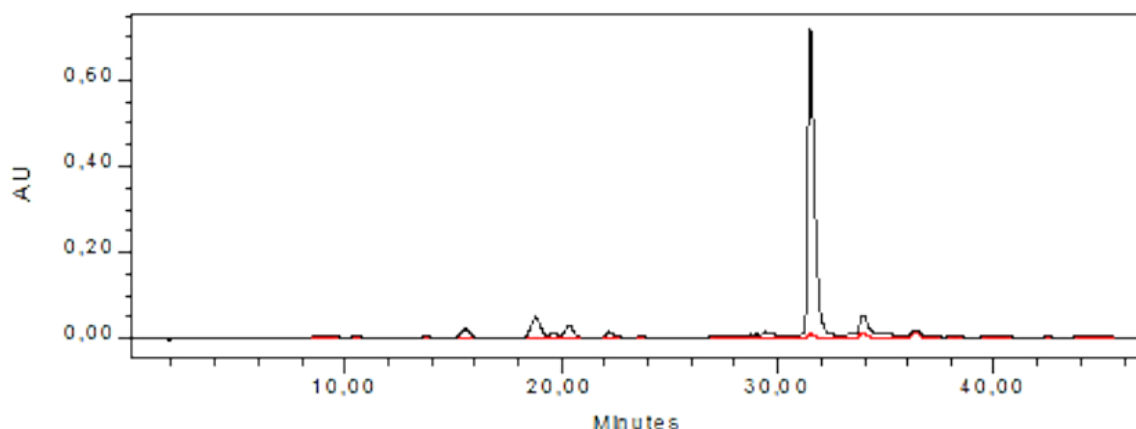


Figura 42. Cromatograma HPLC-UV de extracto de espurgo SAF 1 (0,4994 g/L) a 280 nm (línea negra) y 330 nm (línea roja).

En el espurgo se ha concentrado el compuesto perteneciente al pico mayoritario 2, el cual absorbe a la longitud de onda máxima de 280 nm.

Como se ha visto anteriormente los flavonoides se han concentrado en cámara, según el resultado de flavonoides totales, por lo que el hecho de que el compuesto 1 se haya concentrado en cámara puede ser que se trate de un flavonoide, mientras que el compuesto perteneciente al pico 2, concentrado en espurgo, puede tratarse de otro tipo de compuesto fenólico.

Atendiendo a sus espectros bien diferenciados se puede decir que estos compuestos pertenecen a dos familias de compuestos fenólicos, sin embargo, es muy difícil su identificación con solamente el espectro de absorción UV/VIS sin disposición de los patrones de los compuestos. En el laboratorio se dispone de patrones de los siguientes compuestos fenólicos: ácido cinámico, tirosol, ácido gentísico, ácido 3,4-dihidroxifenilglicol, ácido p-cumárico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido caféico, kaempferol y quercetina. Se ha analizado un multipatrón con estos compuestos obteniendo el cromatograma resultante en la Figura 43:

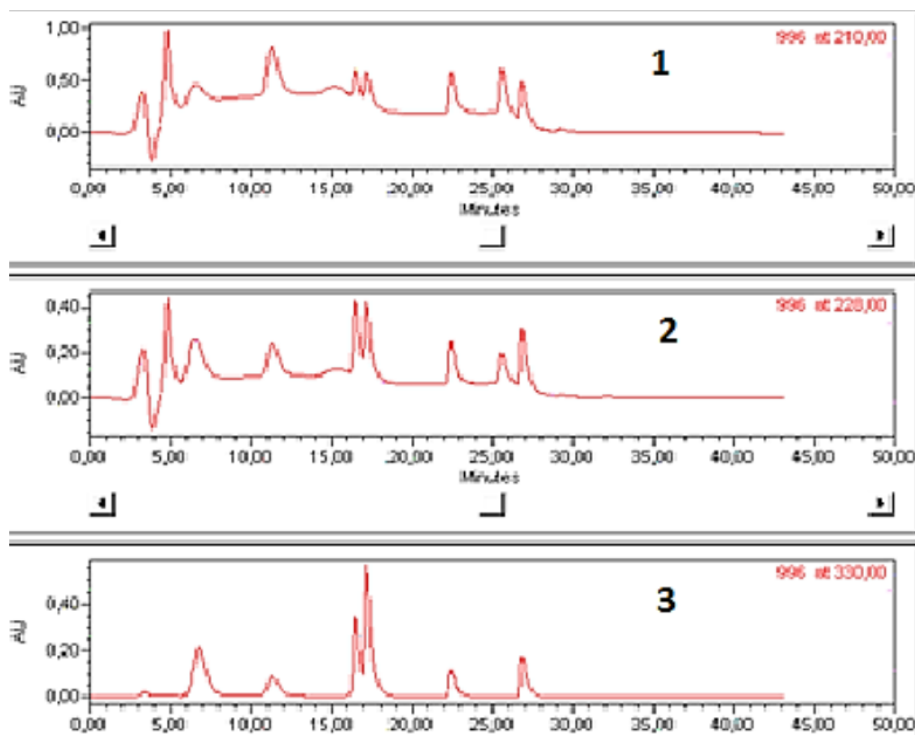


Figura 43. Cromatogramas multipatrón de ácido cinámico, tirosol, ácido gentísico, ácido 3,4-dihidroxifenilglicol, ácido p-cumárico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido caféico, kaempferol y quercetina registrado a 3 longitudes de onda: 210 nm (1), 228 nm (2) y 330 nm (3).

Se descarta la presencia de estos compuestos en las muestras ya que los tiempos de retención no coinciden ni con los compuestos mayoritarios 1 y 2 ni con los minoritarios.

Con el objeto de identificar los compuestos mayoritarios que pudieran estar presentes en las muestras se ha realizado una revisión bibliográfica en trabajos sobre *H. stoechas*. En la Tabla 23 se muestran las longitudes máximas de absorción de los compuestos identificados en el trabajo de Barroso *et al.*, 2014.

Tabla 23. Longitudes de onda de máxima absorción de los compuestos identificados en Barroso *et al.*, 2014.

| Compuesto | Tr (min) | λ_{max} (nm) |
|--------------------------|----------|-----------------------------|
| 3-O-Caffeoylquinic acid | 5.26 | 326 |
| Protocatechuic acid | 6.14 | 260, sh296 |
| 5-O-Caffeoylquinic acid | 8.03 | 326 |
| 5-p-Coumaroylquinic acid | 13.09 | 310 |
| 5-O-Feruloylquinic acid | 14.81 | 330 |

| | | |
|---------------------------------------|-------|-----------|
| Myricetin 3-O-glucoside | 16.23 | 354 |
| Myricetin 7-O-acetylhexoside | 19.67 | 366 |
| Quercetin 3-O-glucoside | 20.64 | 344 |
| cis-3,5-O-Dicaffeoylquinic acid | 21.78 | 326 |
| Quercetin O-acetylhexoside | 22.19 | 354 |
| trans-3,5-O-Dicaffeoylquinic acid | 22.22 | 328 |
| Quercetin O-acetylhexoside | 24.33 | 358 |
| 4,5-O-Dicaffeoylquinic acid | 24.91 | 330 |
| Quercetin 7-O-hexoside | 27.21 | 370 |
| Isorhamnetin O-acetylhexoside | 27.91 | 354 |
| Caffeoyl-O-feruloylquinic acid | 28.31 | 326 |
| Kaempferol O-acetylhexoside | 29.41 | 366 |
| Quercetin 3-O-[p-coumaroyl]-glucoside | 31.77 | 315,sh360 |

En el trabajo de Carini *et al.*, 2000 se muestra el cromatograma y los espectros de absorción de los compuestos presentes (Figura 44).

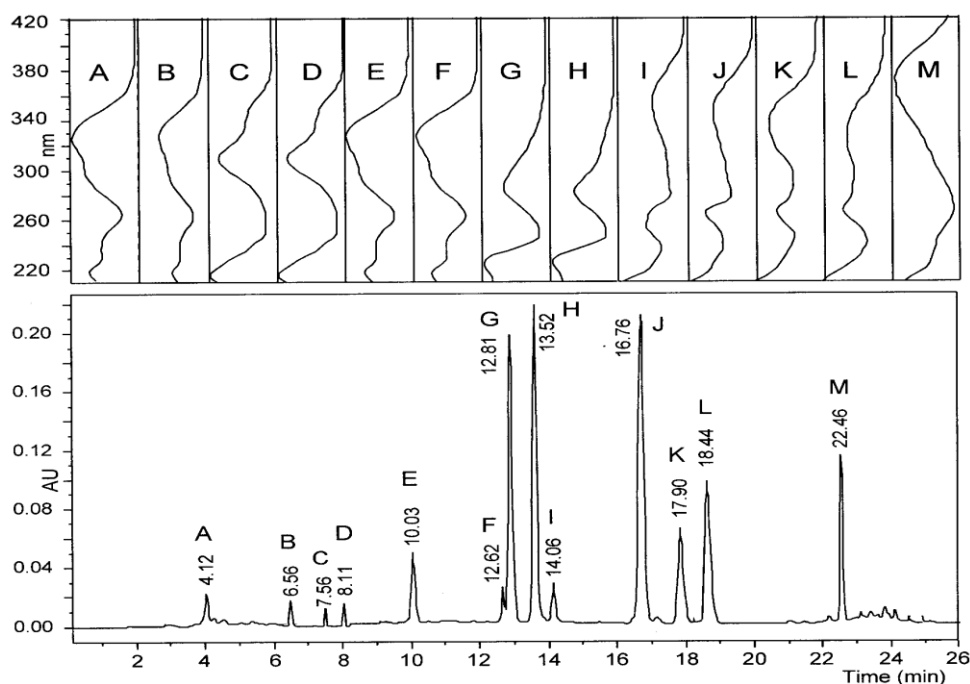


Figura 44. Perfil de HPLC-UV-DAD de extractos de *H.stoechas*. A: Chlorogenic acid, B: Cryptochlorogenic acid, C y D: no identificados, E y F: Dicafeoylquinic acid, G y H: Naringenin-glucoside, I: Quercetin 3-O-glucoside, J: Kaempferol-3-O-glucoside, K y L: Apigenin-glucoside, M: Tetrahydroxychalcone-2'-O-glucoside (Carini et al., 2000).

A partir de ello se llega a la conclusión que el compuesto mayoritario 1 puede tratarse del Dicafeoylquinic acid, ya que coincide el espectro de absorción de este y se trata de uno de los compuestos mayoritarios que aparecen en los trabajos sobre *H.stoechas*. Además, los compuestos G y H del trabajo de Carini *et al.*, 2000 (Naringenin-glucoside) presentan unos espectros similares al del compuesto mayoritario 2.

Llegado a este punto como no se dispone de patrones para poder identificar a través del tiempo de retención y debido a que esta técnica (espectrofotetría UV/VIS) no es muy selectiva y por lo tanto presenta limitaciones a la hora de identificar los compuestos, no ha sido posible la identificación de los dos compuestos mayoritarios.

Con el objeto de conocer la magnitud en la que aparecen los compuestos en cada uno de los extractos, en la Tabla 24 se muestran las áreas de los dos picos en cada uno de los extractos, para la misma concentración (0,5 g/L). Al finalizar este estudio no fue posible realizar la cuantificación al no disponer de patrón del compuesto identificado por HPLC-MS, el compuesto 1, que se comentará en el siguiente apartado. No obstante, los resultados en la Tabla 24 muestran que se han concentrado tras el fraccionamiento en las dos fracciones en las que aparecen (Compuesto 1 en cámara y compuesto 2 en espurgo). Esto significa que se ha realizado el fraccionamiento y hay que comentar que apenas existe diferencia entre ambos experimentos

(SAF 1 Y SAF 2), al igual que sucede en la cuantificación de la capacidad antioxidante, fenoles y flavonoides totales.

Tabla 24. Áreas de los picos mayoritarios 1 y 2 en los extractos de *H.stoechas*.

| Extracto | Repetición | Área para 0,5 g/L | Área media |
|-----------------|------------|-------------------|------------|
| Pico 1 (330 nm) | | | |
| Botella 1 | | 2.894.603 | 2.797.462 |
| Botella 2 | | 2.852.535 | |
| Botella 3 | | 2.645.248 | |
| Cámara SAF 1 | 1 | 4.094.301 | 3.991.355 |
| | 2 | 3.888.410 | |
| Cámara SAF 2 | 1 | 4.027.404 | 3.956.586 |
| | 2 | 3.885.768 | |
| Pico 2 (280 nm) | | | |
| Botella 1 | | 4.372.943 | 4.484.097 |
| Botella 2 | | 4.676.116 | |
| Botella 3 | | 4.403.232 | |
| Espurgo SAF 1 | 1 | 14.569.433 | 13.220.278 |
| | 2 | 11.871.122 | |
| Espurgo SAF 2 | 1 | 12.486.936 | 12.671.714 |
| | 2 | 12.856.493 | |

3.6.2. Análisis mediante CG-MS

Con el objeto de ampliar y aportar más información sobre la presencia de compuestos fenólicos en los extractos, estos se analizaron mediante cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS), técnica más sensible que la HPLC-UV. Como se ha comentado en el apartado procedimientos, ha sido necesario derivatizar los extractos, por lo que los compuestos que se observen en los cromatogramas están derivatizados. En la Figura 45 se

muestra los cromatogramas de cada una de las fracciones (extracto etanólico, cámara y espurgo). Como puede observarse, aparecen gran número de picos y señales bastante elevadas. Los perfiles de los cromatogramas etanol y cámara son bastante similares y difieren del cromatograma espurgo. Se observan 3 picos mayoritarios (Tr 13,75, Tr 13,86 y Tr 14,84 min) que se han separado perfectamente en cámara y espurgo, al igual que sucedía en HPLC-UV. En la Figura 46 se muestra el cromatograma ampliado perteneciente al intervalo 10-20 minutos y en la Figura 47 el cromatograma perteneciente al intervalo 20-40 minutos para observar mejor las diferencias.

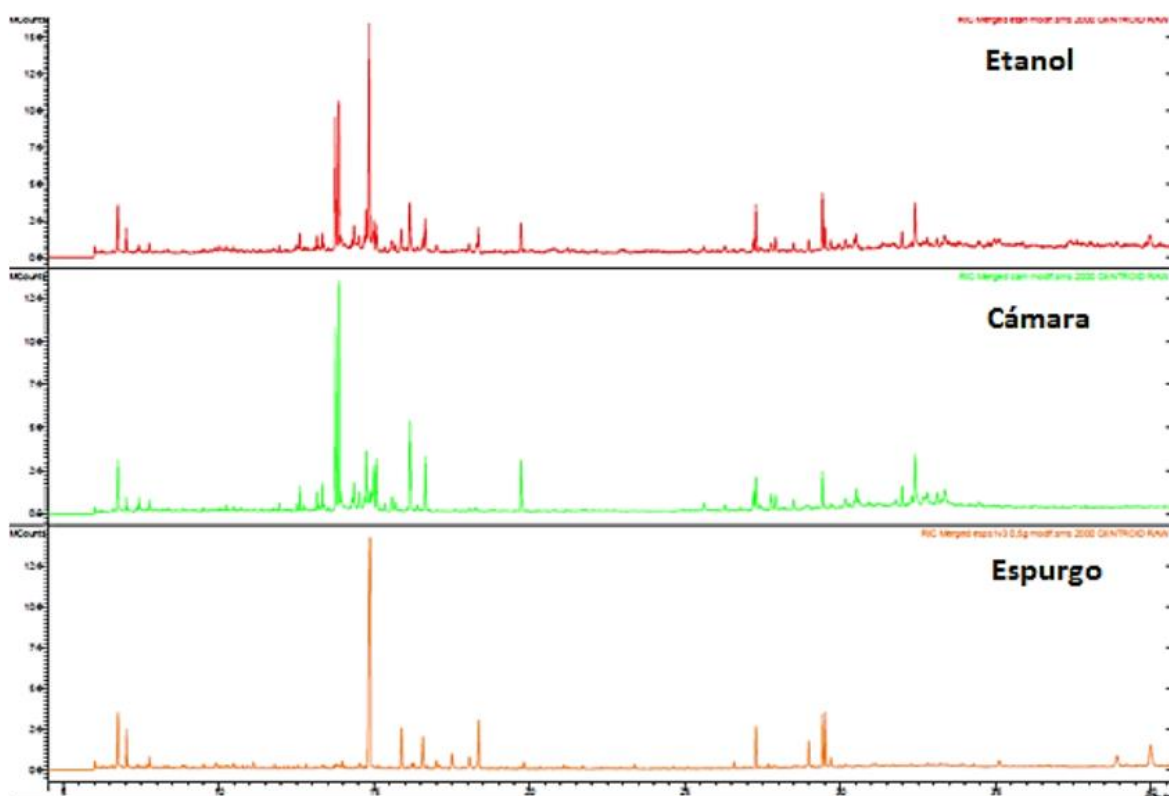


Figura 45. Cromatograma GC-MS de extracto etanólico, cámara y espurgo.

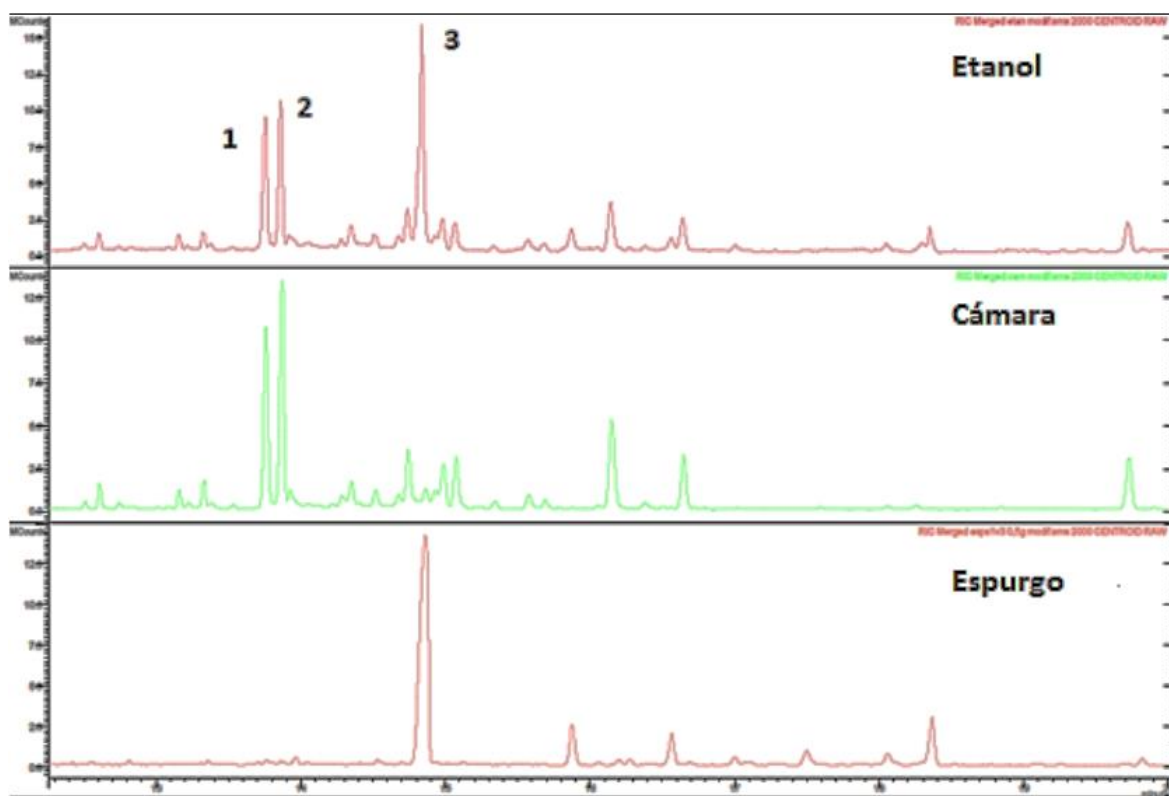


Figura 46. Cromatograma GC-MS Tr 10-20 min: extracto etanólico (C1), cámara (C2) y espurgo (C3).

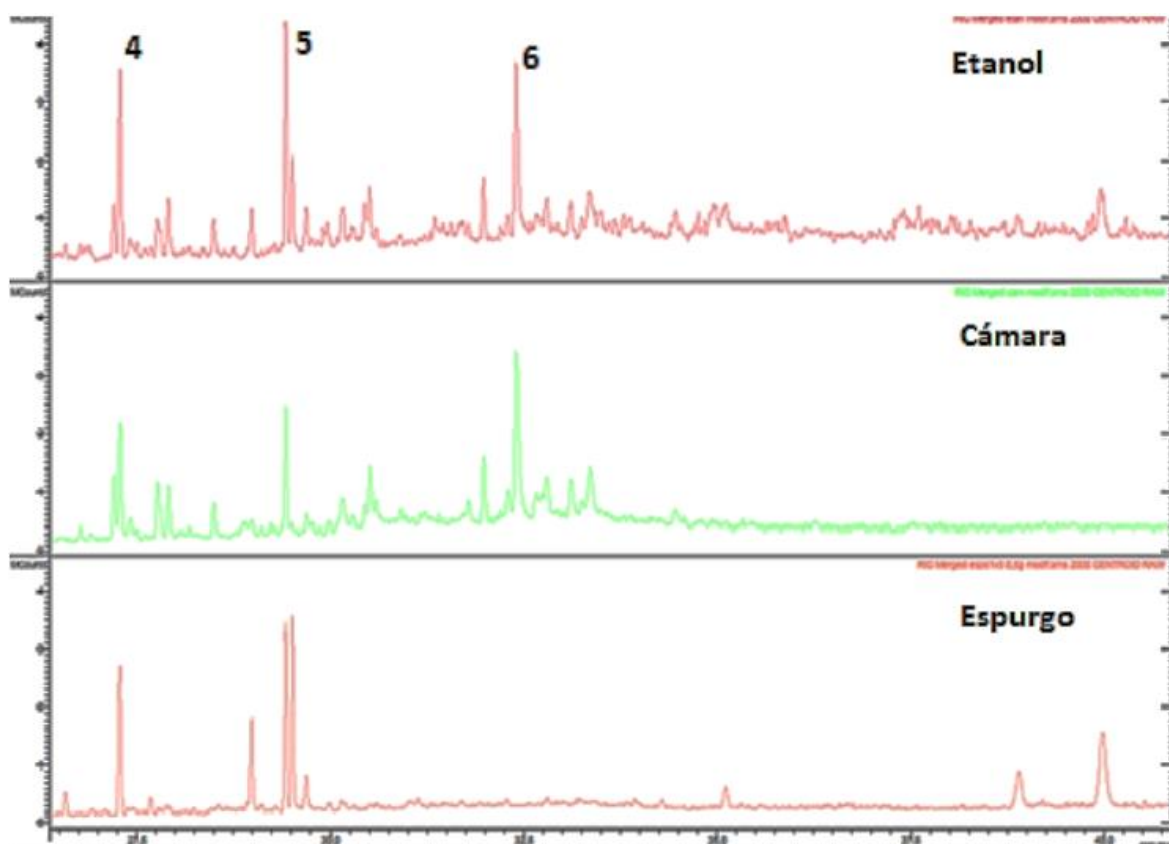


Figura 47. Cromatograma GC-MS Tr 20-40 min: extracto etanólico (C1), cámara (C2) y espurgo (C3).

En la Tabla 25 se muestran las masas de estos 6 compuestos mayoritarios.

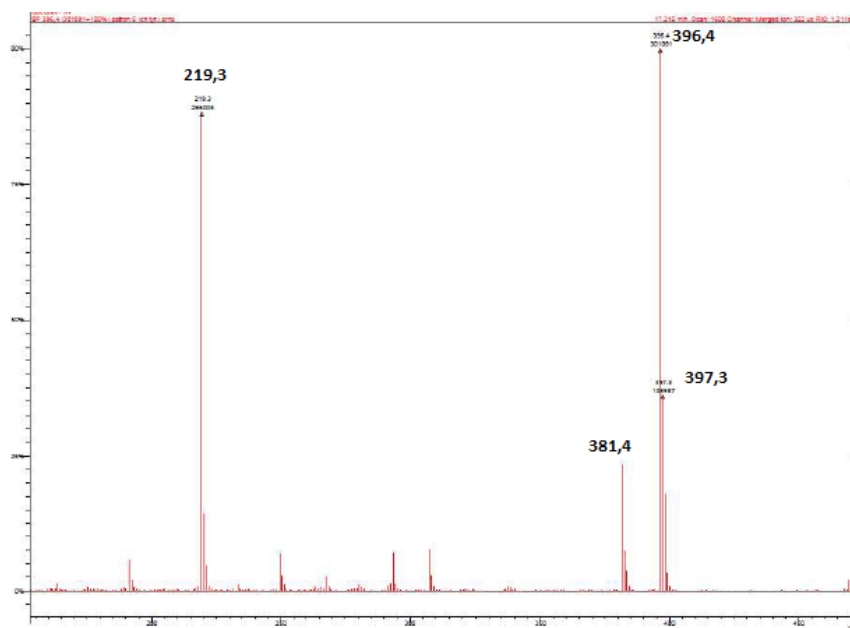
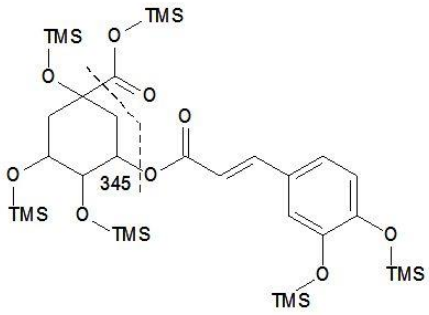
Tabla 25. Compuestos mayoritarios con tiempo de retención, masas y extractos en los que aparecen.

| Pico | Tr (min) | m/z (abundancia) | Presente en |
|------|----------|---|--------------------------|
| 1 | 13,75 | 217(100), 257(27), 437(90), 438 (25) | Etanol y cámara |
| 2 | 13,86 | 217(100), 257(27), 437(90), 438 (25) | Etanol y cámara |
| 3 | 14,84 | 205(27), 233 (100), 261(75) | Etanol y espurgo |
| 4 | 27,30 | 371 (100), 372 (25) | Etanol, cámara y espurgo |
| 5 | 29,43 | 399 (100), 400 (34) | Etanol, cámara y espurgo |
| 6 | 32,40 | 255 (60), 307 (30), 345 (100), 346 (33) | Etanol y cámara |

Con ayuda de la base de datos del equipo en la que se muestran los espectros de masas de compuestos, diferentes artículos sobre CG-MS (Moldoveanu, 2014; Vernin y Poite, 1998) y con bases de datos como NIST o Massbank se ha recabado información para identificar estos compuestos.

La CG-MS a pesar de ser una técnica muy sensible y selectiva tiene el inconveniente de que los extractos se deben derivatizar para poder determinar compuestos fenólicos, compuestos no volátiles, que se transforman en sus respectivos compuestos derivatizados trimetilsilil. Tanto la biblioteca de equipo instrumental utilizado como las bases de datos estudiadas, no aportan mucha información sobre los espectros de masas de este tipo de compuestos. Y por otro lado, según los resultados obtenidos en las pruebas anteriores (HPLC-UV) y teniendo en cuenta la bibliografía consultada sobre *H. Stoechas*, los compuestos presumiblemente presentes son flavonoides glicosilados que al derivatizarse forman compuestos de elevado peso molecular y por lo tanto dificulta su análisis por cromatografía de gases. Lo mismo ocurre con el compuesto dicaffeoylquinic que se ha detectado en el análisis de HPLC.

El único compuesto identificado mediante esta técnica ha sido el Pico 6, el cual corresponde al ácido clorogénico. A continuación observamos en la Figura 48 el espectro de masas de un estándar de ácido clorogénico, el cual coincide con nuestro espectro resultante al tiempo de retención de 32,40 minutos.



3.6.3. Análisis mediante HPLC-MS

Con objeto de ampliar información e identificar nuevos compuestos, se ha aplicado la cromatografía de líquidos con detector de espectrometría de masas (HPLC-MS), ya que como se ha señalado en el apartado de procedimientos se trata de una técnica más sensible que la HPLC-UV y se mejora la separación cromatográfica, obteniendo además los espectros con las masas características de los compuestos. Se han analizado cada uno de los extractos (etanólico y cámara- espurgo de SAF 1 y SAF 2) en modo negativo (ESI-).

En la Figura 50 se muestran los cromatogramas obtenidos. Se han representado los extractos del SAF 1 ya que ambos experimentos (SAF 1 y SAF 2) presentaban un perfil cromatográfico similar. Se puede observar que el perfil difiere bastante con los cromatogramas HPLC-UV. La separación ha sido más efectiva y el número de compuestos detectados mucho más elevado.

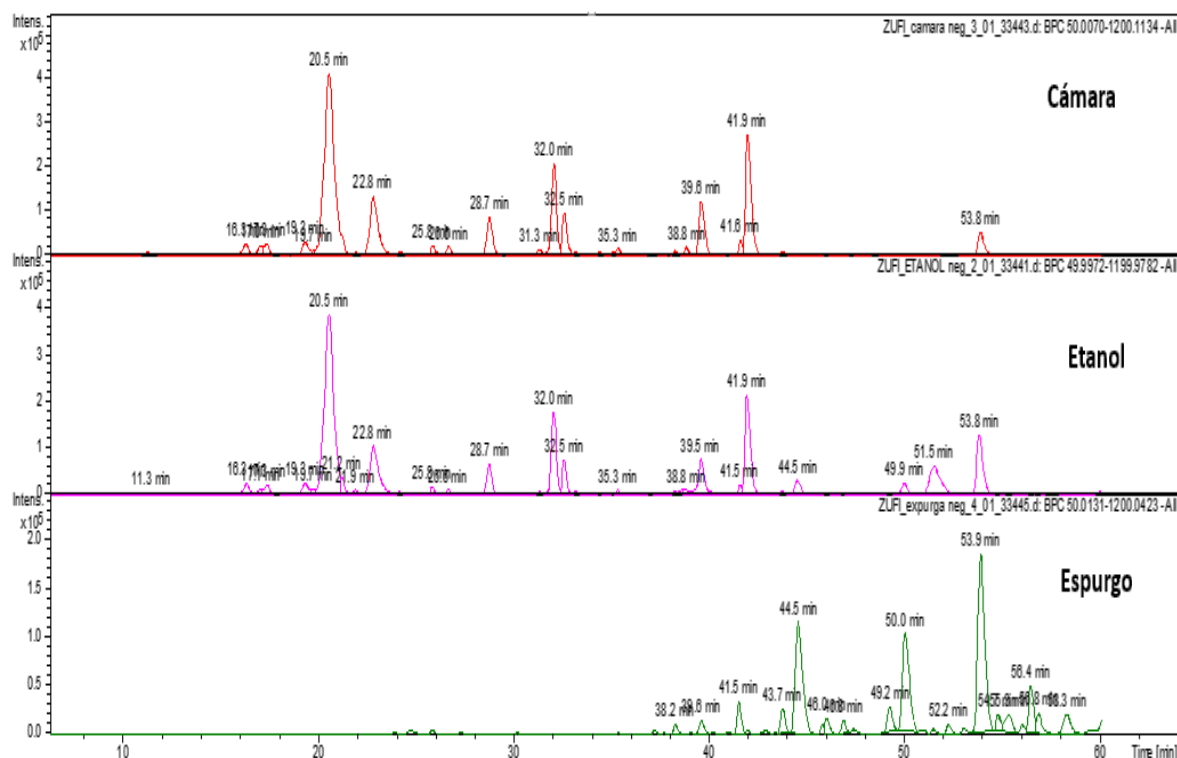


Figura 50. Cromatogramas HPLC-MS (ESI-): fracción cámara, extracto etanólico y fracción espurgo.

En la Figura 51 se muestra con más detalle la franja en la que aparecen las señales (20-60 minutos).

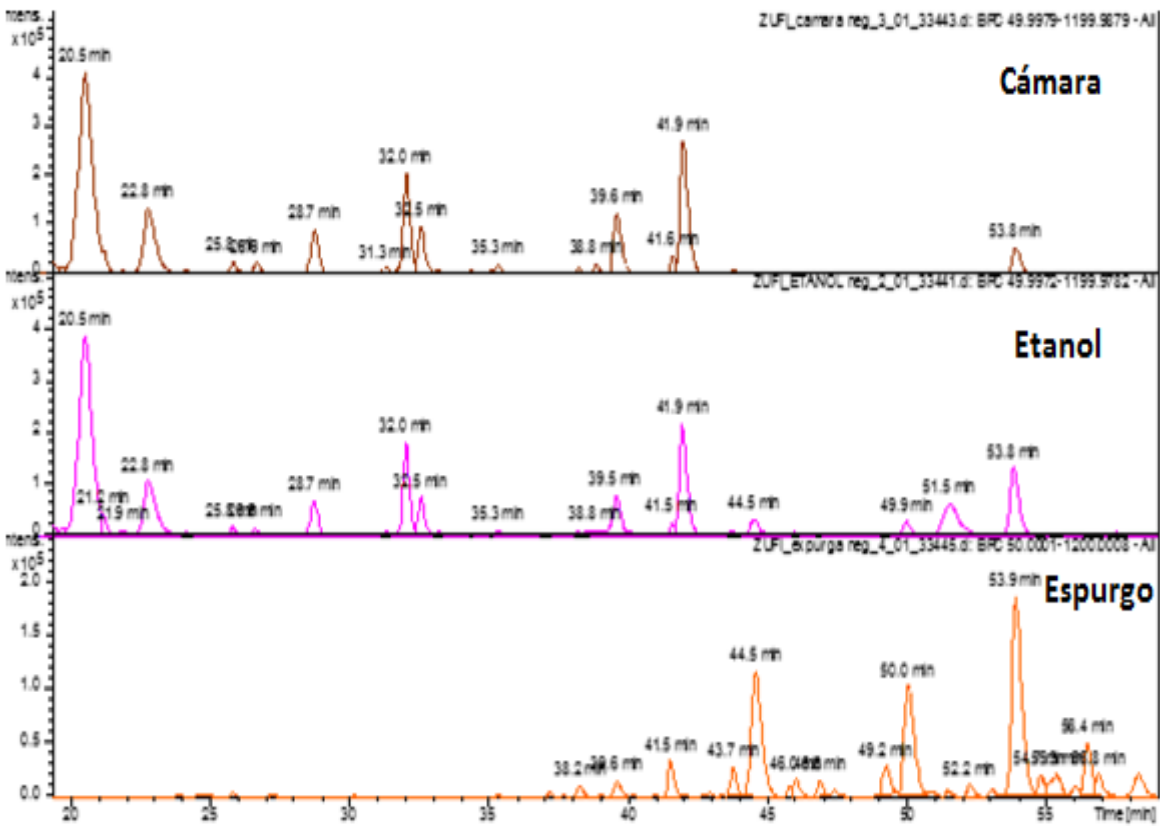


Figura 51. Cromatogramas HPLC-MS (ESI-) Tr 20-60 min: fracción cámara, extracto etanólico y fracción espurgo .

En la Tabla 26 se muestran las masas características de los picos detectados y la identificación de los mismos y en la Tabla 27 se muestran los compuestos mayoritarios cuya identificación no ha sido posible.

Tabla 26. Compuestos identificados mediante HPLC-MS (ESI-) en extractos de *H.stoechas*.

| Pico | Tr (min) | m/z (%) | Atribución | Compuesto | Presente en |
|------|-------------|-----------|--------------------------------|------------------|--------------------|
| 1 | 2,9 | 353 (100) | [M-H] ⁻ | Chlorogenic acid | Etanol y cámara |
| | | 191 (20) | [Ácido quínico-H] ⁻ | | |

| | | | | | |
|----|------|-----------|---|---|-----------------|
| 2 | 4,1 | 353 (90) | [M-H] ⁻ | Chlorogenic acid | Etanol y cámara |
| 3 | 5,3 | 353 (100) | [M-H] ⁻ | Chlorogenic acid | Etanol y cámara |
| 4 | 11,3 | 479 (100) | [M-H] ⁻ | Myricetin 3-O-glucoside | Etanol y cámara |
| 5 | 17,3 | 463 (100) | [M-H] ⁻ | Quercetin-3-O-glucoside | Etanol y cámara |
| | | 521 (10) | [M-H] ⁻ | Myricetin acetylhexoside | |
| 6 | 20,5 | 447 (10) | [M-H] ⁻ | Kaempferol-3- <i>O</i> -glucoside | Etanol y cámara |
| | | 515 (100) | [M-H] ⁻ | Dicafeoylquinic acid | |
| | | 353 (30) | [M-H-cafeoil] ⁻ | | |
| 7 | 21,8 | 505 (100) | [M-H] ⁻ | Quercetin <i>O</i> -acetylhexoside | Etanol y cámara |
| | | 301 (20) | [M-H-42-162] ⁻ | | |
| 8 | 24,1 | 463 (100) | [M-H] ⁻ | Quercetin- <i>O</i> -glucoside | Etanol y cámara |
| 9 | 24,6 | 519 (80) | [M-H] ⁻ | Isorhamnetin- <i>O</i> -acetylhexoside | Etanol y cámara |
| 10 | 25,9 | 529 (40) | [M-H] ⁻ | Caffeoyl- <i>O</i> -feruloylquinic acid | Etanol y cámara |
| | | 367 (10) | [<i>O</i> -feruloylquinic acid-H] ⁻ | | |

Tabla 27. Compuestos no identificados mediante HPLC-MS (ESI-) en extractos de *H.stoechas*.

| <u>Tr (min)</u> | <u>Masas</u> | <u>Presente en</u> |
|-----------------|--------------|--------------------------|
| 22,8 | 515,1160 | Etanol y cámara |
| | 501,1386 | |
| | 537,0994 | |
| 28,7 | 609,1160 | Etanol y cámara |
| 32 | 593,1286 | Etanol y cámara |
| | 543,1493 | |
| 32,5 | 623,1312 | Etanol y cámara |
| | 541,1645 | |
| 39,5 | 527,1846 | Etanol, cámara y espurgo |
| | 435,1054 | |
| | 299,0604 | |
| 41,9 | 569,1939 | Etanol y cámara |
| | 613,1833 | |
| 44,5 | 203,1188 | Etanol y espurgo |
| 50 | 283,0819 | Etanol y espurgo |
| | 405,1097 | |
| 51,5 | 449,1216 | Etanol y espurgo |
| | 283,0676 | |
| 53,8 | 435,1047 | Etanol, cámara y espurgo |
| | 283,0660 | |
| 56,4 | 421,2332 | Etanol y espurgo |

Las estructuras de los picos 1,2 y 3 con $[M-H]^-$ a m/z 353 (M.M 354) y el ion debido al ácido quínico (m/z 191) puede atribuirse al ácido clorogénico, formado por una molécula ácido quínico y dos moléculas de ácido cafeico, si bien es cierto que no aparece la masa de este último (m/z 179).

El pico 4 (Myricetin 3-O-glucoside) ha sido identificado por su $[M-H]^-$ a m/z 479, masa característica de este compuesto. La masa característica del Quercetin-3-O-glucoside (m/z 463) ha sido identificada en los picos 5 y 8. En el pico 5 (Tr 17,3) a su vez eluye también el Myricetin acetylhexoside con $[M-H]^-$ 521.

En el pico 6 aparece la $[M-H]^-$ característica del Kaempferol-3-O-glucoside (m/z 447). A su vez eluyen también el ácido dicaffeoylquinic, identificado anteriormente en HPLC-UV, con su masa característica m/z 515 y un ion de fragmentación característico, m/z 353, debido a la pérdida de un grupo cafeoil.

El pico 7 ha sido identificado como Quercetin O-acetylhexoside con m/z 505, resultado de la suma de la masa del Quercetin- O-glucoside (m/z 463, pico 8) y un grupo acetylhexoside (m/z 42). Además aparece la masa m/z 301, resultado de la pérdida de una glucosa y un grupo acetylhexoside.

El pico 9 ha sido atribuido al Isorhamnetin-O-acetylhexoside por su $[M-H]^-$ a m/z 519. Por último, el pico 10 ha sido identificado como Caffeoyl-O-feruloylquinic acid por su $[M-H]^-$ a 529 y su fragmento m/z 367 perteneciente a la pérdida de un protón del O-feruloylquinic acid.

No ha sido posible la identificación de los compuestos mostrados en la Tabla 27, compuestos cuyas masas no coinciden con los compuestos fenólicos identificados en diverso material vegetal de la bibliografía consultada (Fu *et al.*,2014; Barroso *et al.*, 2014; Carini *et al.*, 2001; Ruiz *et al.*,2013; Brito *et al.*,2014; Nováková *et al.*, 2010; Sapozhnikova, 2013; Plazonic *et al.*,2009). La mayoría de estos compuestos se encuentran en espurgo y al igual que en HPLC-UV/Vis no han podido ser identificados.

En conclusión, han sido identificados mediante HPLC-MS dos ácidos fenólicos: el ácido clorogénico (Figura 52) y el ácido dicafeoilquínico (Figura 53), que confirma el compuesto mayoritario 1 observado en los cromatogramas de HPLC-UV/Vis. El resto de compuestos se tratan de flavonoides glicosilados, en concreto de flavonoles (quercetina, kaempferol, miricetina e isorhamnetina) (Figura 55). Todos estos compuestos se han concentrado en la fracción de extracto etanólico de cámara. En la Figura 55 se muestra uno de ellos glicosilado (Myricetin 3-O-glucoside).

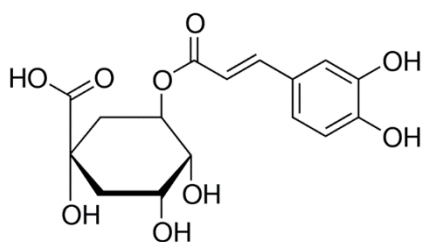


Figura 52. Estructura del ácido clorogénico.

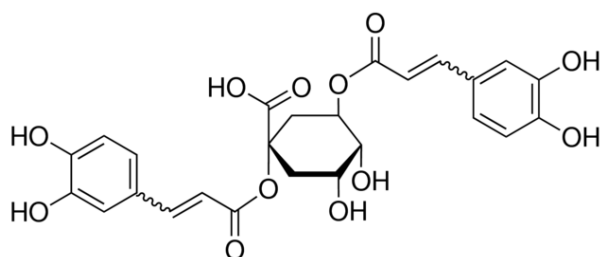


Figura 53. Estructura del ácido dicafeoilquínico.

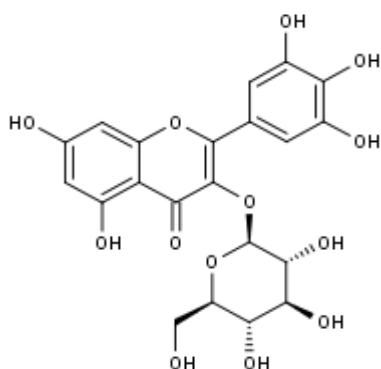
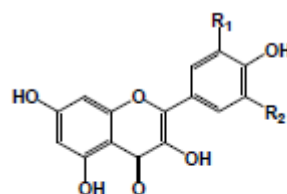


Figura 54. Estructura del Myricetin 3-O-glucoside.



| | |
|--------------|------------------------|
| Kaempferol | $R_1 = H, R_2 = H$ |
| Quercetin | $R_1 = H, R_2 = OH$ |
| Myricetin | $R_1 = OH, R_2 = OH$ |
| Isorhamnetin | $R_1 = OCH_3, R_2 = H$ |

Figura 55. Estructura de los flavonoles identificados.

3.7 Relación entre los parámetros estudiados

En este apartado se estudia la relación entre los tres parámetros evaluados: actividad antioxidante, fenoles totales y flavonoides totales, así como la relación de estos resultados con los compuestos identificados. En la Tabla 29 se muestra la media de los resultados de los 3 parámetros para cada una de las fracciones.

Tabla 28. Resultados medios de actividad antioxidante, fenoles totales y flavonoides totales en extracto de *H.stoechas*.

| | | <u>Actividad</u> <u>antioxidante</u> | <u>Fenoles</u> <u>totales</u> | <u>Flavonoides</u> <u>totales</u> |
|--|--|---|----------------------------------|--------------------------------------|
| | | AAI | mg EAG/g extracto | mg Q/g extracto |

| | | | | |
|---------------------------|---------|------|--------|--------|
| Extracto etanólico | | 3,02 | 214,7 | 178,79 |
| SAF 1 | Cámara | 4,11 | 240,18 | 228,04 |
| | Espurgo | 1,97 | 225,49 | 72,84 |
| SAF 2 | Cámara | 3,71 | 227,73 | 210,99 |
| | Espurgo | 1,85 | 193,53 | 60,19 |

En la Figura 56 se representan gráficamente los resultados de la Tabla 29 para mostrar la relación entre los tres parámetros estudiados para el extracto etanólico y los extractos resultantes del SAF 1. No se ha representado el SAF 2 debido a su similitud con el SAF 1.

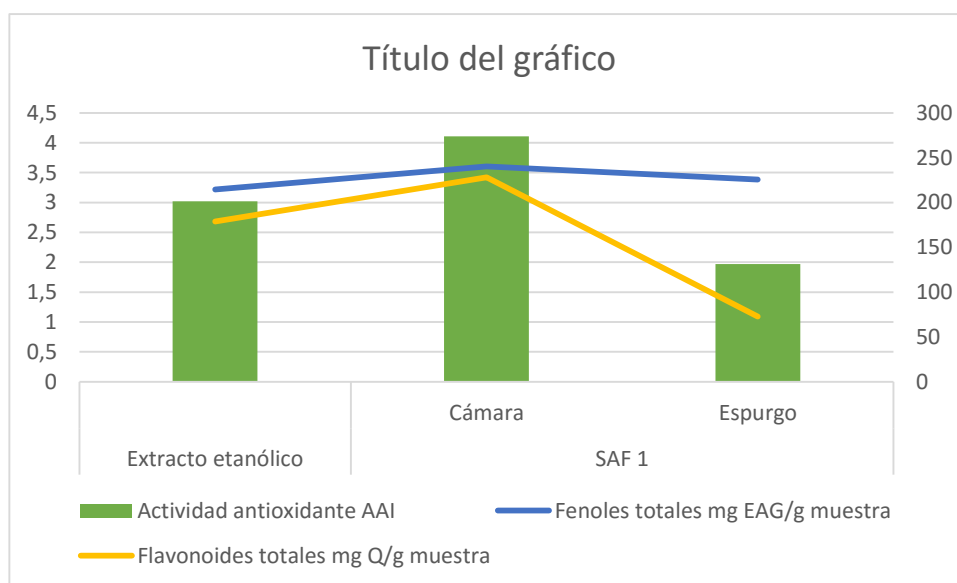


Figura 56. Gráfico de la relación entre los parámetros estudiados: actividad antioxidante (AAI), fenoles totales y flavonoides totales entre extracto etanólico y SAF 1.

Como se puede observar un aumento de la actividad antioxidante, visible por el aumento del índice AAI, lleva asociado el aumento en la cantidad de fenoles totales. Esto era esperable debido a la conocida capacidad antioxidante de estos compuestos. Y si se compara los datos numéricos, en el extracto etanólico y por supuesto en cámara, los flavonoides son mayoritarios dentro del contenido total de fenoles. A su vez se observa una evidente correlación

entre el contenido de fenoles y flavonoides totales, lo que nos demuestra la existencia de flavonoides en las muestras a estudio.

La mayor diferencia entre el contenido de fenoles y flavonoides totales en espurgo puede ser indicativo de que en esta fracción es mayor el contenido de compuestos fenólicos no flavonoides que en cámara. Esto queda confirmado con la identificación de compuestos mediante HPLC-MS, mediante la cual se han identificado flavonoides presentes únicamente en la fracción cámara, derivados de quercetina, kaempferol, miricetina e isorhamnetina.

4. Conclusiones

Las conclusiones derivadas de la realización del presente estudio son las siguientes:

- De las dos extracciones secuenciadas realizadas, la primera de ella con hexano para la retirada de componentes lipídicos (apolares) y la segunda con etanol para la extracción de los compuestos polares, se han obtenido mayores rendimientos con la extracción etanólica, de ello se deriva que los compuestos presentes son polares.
- Se han logrado elevados rendimientos por medio del fraccionamiento supercrítico para ambos experimentos realizados, siendo con el primero de ellos (140 bar) con el que ha obtenido un mayor rendimiento de fraccionamiento (78%), mientras que con el segundo a presión de 115 bar se ha obtenido un 63,76 % de rendimiento.
- Se ha demostrado la correcta aplicación del método del radical DPPH utilizando como antioxidante un patrón de referencia, el trolox, obteniendo resultados de su capacidad antioxidante que se encuentran dentro del rango establecido en estudios bibliográficos previos, lo cual también indica un buen funcionamiento del espectrofotómetro utilizado.
- Los extractos etanólicos de la planta *Helichrysum stoechas* presentan un elevado poder antioxidante.
- Las fracciones del extracto etanólico obtenidas en cámara presentan los mayores valores de AAI respecto de las fracciones obtenidas en espurgo y mayores que el extracto etanólico, siendo el valor encontrado en la experiencia 1 (SAF 1) ligeramente mayor que para la experiencia 2 (SAF2).
- La técnica SAF, en las 2 condiciones de operación ensayadas, logra concentrar en cámara gran parte de los compuestos responsables del poder antioxidante ya que este es mayor que el poder antioxidante del extracto etanólico y que la fracción de espurgo.
- La mayor concentración en la fracción de cámara de compuestos flavonoides junto con el mayor poder antioxidante asociado indicaría que la mayor parte de los compuestos responsables del poder antioxidante de *H. stoechas* son de naturaleza flavonoide.

- A la vista de los resultados obtenidos, tanto de la capacidad antioxidante como de fenoles y flavonoides totales, se puede concretar que la aplicación de la técnica de fraccionamiento con fluido supercrítico (CO₂) ha logrado concentrar en cámara los compuestos activos mejorando los resultados de la extracción etanólica.
- Se han logrado identificar en el extracto etanólico y en su fracción de cámara, mediante la técnica HPLC-MS, los siguiente compuestos fenólicos: dos ácidos fenólicos, el ácido clorogénico y ácido dicafeoilquínico (compuesto mayoritario) y flavonoides glicosilados derivados de los siguientes flavonoles: quercetina, kaempferol, miricetina e isorhamnetina. Todos estos compuestos se han concentrado en la fracción de extracto etanólico de cámara.
- No se ha conseguido identificar los componentes de la fracción de espurgo del extracto etanólico. Sin embargo del análisis de los flavonoides totales se observa que los polifenoles de naturaleza no flavonoide en espurgo son mayoritarios en comparación con los flavonoides.
- Tanto por el adecuado rendimiento obtenido en los extractos de la planta como el elevado poder antioxidante que presenta la planta *H. stoechas* es candidata para implementar la extracción de sus compuestos bioactivos a escala industrial. Dada su adaptabilidad al terreno y de su escasa demanda hídrica supone que su cultivo sea medioambientalmente sostenible y una alternativa a la agricultura intensiva medioambientalmente insostenible.
- Como actividad futura cabría considerar el estudio de la toxicidad de los extractos para su posible aplicación industrial y otras posibles bioactividades (actividades: biocida, antibacteriana, fungicida, acaricida, entre otras).

5. Bibliografía

- Albayrak, S., Aksoy, A., Sagdic, O., y Hamzaoglu, E. (2010). Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey. *Food Chemistry*, 119(1), 114-122. doi:10.1016/j.foodchem.2009.06.003
- Andersen, O., y Markham, K. (2006). *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Boca Raton: CRC Press.
- ANSI/ASAE S319.4. (4FEB2008). Method of determining and Expressing Fineness of Feed Materials by Sieving. *American Society of Agricultural and Biological Engineers*.
- Anouar, E. H., Gierschner, J., Duroux, J., y Trouillas, P. (2012). UV/Visible spectra of natural polyphenols: A time-dependent density functional theory study. *Food Chemistry*, 131(1), 79-89. doi:10.1016/j.foodchem.2011.08.034
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., y Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1), 183-198. doi:10.1039/b009171p
- Barroso, M. R., Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., Fernandes, I. P., . . . Ferreira, I. C. F. R. (2014). Exploring the antioxidant potential of *Helichrysum stoechas* (L.) Moench phenolic compounds for cosmetic applications: Chemical characterization, microencapsulation and incorporation into a moisturizer. *Industrial Crops and Products*, 53, 330-336. doi:10.1016/j.indcrop.2014.01.004
- Benzie, I. y Strain, J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Bortolomeazzi, R., Sebastianutto, N., Toniolo, R., y Pizzariello, A. (2007). Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential. *Food Chemistry*, 100(4), 1481-1489. doi:10.1016/j.foodchem.2005.11.039
- Brewer, M. S. (2011). Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(4), 221-247. doi:10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x
- Brito, A., Ramirez, J. E., Areche, C., Sepúlveda, B., y Simirgiotis, M. J. (2014). HPLC-UV-MS profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in northern chile. *Molecules*, 19(11), 17400-17421. doi:10.3390/molecules191117400

Burillo, J., Vila, R., Cañigüeral, S., Urieta, J., Langa, E., y Sanz, J. (2010). Comportamiento al cultivo experimental en Aragón de *lippia alba* para la normalización de la materia prima obtenida. En E. Dellacasa (Org). Normalización de productos naturales obtenidos de especies de la Flora Aromática Latinoamericana (pp. 131-173). Porto Alegre: Edipucrs.

Carini, M., Aldini, G., Furlanetto, S., Stefani, R., y Facino, R. M. (2001). LC coupled to ion-trap MS for the rapid screening and detection of polyphenol antioxidants from *Helichrysum stoechas*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24(3), 517-526. doi:10.1016/S0731-7085(00)00431-3

Cervera, J.B. (2013). *Determinación de compuestos fenólicos en hojas de fresnos del Pirineo Aragonés*. (Trabajo Fin de Grado no publicado). Escuela Politécnica Superior de Huesca, Aragón.

Castro, M., Litter, M., Wong, M., y Mori, V. (2009). Métodos espectrofotométricos UV-Vis. In M. Litter, M. Armienta y S. Farías, *Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos* (1st ed., pp. 43-63). Argentina: CYTED.

Chang C., Yang M., Wen H., y Chern J. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178-182.

Falcone, M. L., Rius, S. P., y Casati, P. (2012). Flavonoids: Biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 3 doi:10.3389/fpls.2012.00222

Faraldos, M., y Goberna, C. (2002). Técnicas de análisis y caracterización de materiales. *Biblioteca de ciencias* (pp. 844). Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Fernández, L. (2004). *Los Súper Antioxidantes*. Málaga: Editorial Sirio.

Fu, S., Zhang, J., Li, T., Wang, S., Ding, W., Zhao, M., . . . Jia, J. (2014). Multi-responses extraction optimization based on response surface methodology combined with polarity switching HPLC-MS/MS for the simultaneous quantitation of 11 compounds in Cortex Fraxini: Application to four species of Cortex Fraxini and its 3 confusable species. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 91, 210-221. doi:10.1016/j.jpba.2013.12.033

García-Abarrio, S. M., Martin, L., Burillo, J., Porta, G. D., & Mainar, A. M. (2014). Supercritical fluid extraction of volatile oil from *lippia alba* (mill.) cultivated in aragón (spain). *Journal of Supercritical Fluids*, 94, 206-211. doi:10.1016/j.supflu.2014.07.016

García, E., Fernández, I., y Fuentes, A. (2015). *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu*. ETSIAMN. Universitat Politècnica de València, Valencia.

- García-Abarrio, S. M., Martín, L., Burillo, J., Porta, G. D., y Mainar, A. M. (2014). Supercritical fluid extraction of volatile oil from *Lippia alba* (mill.) cultivated in Aragón (Spain). *Journal of Supercritical Fluids*, 94, 206-211. doi:10.1016/j.supflu.2014.07.016
- Giuliani, C., Lazzaro, L., Calamassi, R., Calamai, L., Romoli, R., Fico, G., . . . Mariotti Lippi, M. (2016). A volatilomic approach for studying plant variability: The case of selected *Helichrysum* species (Asteraceae). *Phytochemistry*, 130, 128-143. doi:10.1016/j.phytochem.2016.07.013
- Gordon, M. H., Paiva-Martins, F., y Almeida, M. (2001). Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2480-2485. doi:10.1021/jf000537w.
- Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Calhêla, R. C., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., . . . Ferreira, I. C. F. R. (2013). Nutrients, phytochemicals and bioactivity of wild roman chamomile: A comparison between the herb and its preparations. *Food Chemistry*, 136(2), 718-725. doi:10.1016/j.foodchem.2012.08.025
- Haddouchi, F., Chaouche, T. M., Ksouri, R., Medini, F., Sekkal, F. Z., y Benmansour, A. (2014). Antioxidant activity profiling by spectrophotometric methods of aqueous methanolic extracts of *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre* and *Phagnalon Saxatile* subsp. *saxatile*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 12(6), 415-422. doi:10.1016/S1875-5364(14)60065-0
- Kalani, M., y Yunus, R. (2011). Application of supercritical antisolvent method in drug encapsulation: A review. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 1429-1442.
- Kamtekar, S., Keer, V., y Patil, V. (2014). Estimation of phenolic content, flavonoid content, antioxidant and alpha amylase inhibitory activity of marketed polyherbal formulation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4(9), 61-65. doi:10.7324/JAPS.2014.40911
- Kulisić, T., Radonić, A., Katalinić, V., y Miloš, M. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, 85(4), 633-640.
- Kuskoski, E., Asuero, A., García-Parilla, M., Troncoso, A., y Fett, R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Ciência E Tecnologia De Alimentos*, 24(4), 691-693.
- Likhanov, A. (2014). Identification of intervarietal affinity of *Rubus Idaeus* L. plants on biochemical profiles of phenolic compounds. *Notes of Ukraine*, 49(7), 1-12.

Li, F., Liu, Q., Cai, W., y Shao, X. (2009). Analysis of scopoletin and caffeic acid in tobacco by GC-MS after a rapid derivatization procedure. *Chromatographia*, 69(7-8), 743-748. doi:10.1365/s10337-008-0938-2

López Corona, M.G.B (2013). *Identificación y cuantificación del ácido clorogénico y de flavonoides presentes en hojas y frutos de Crataegus gracilior PHIPPS*. (Tesis doctoral no publicada). Universidad autónoma de Querétaro, Santiago de Querétaro, Querétaro.

López-Gutiérrez, B., Pérez-Escandón, B., y Villavicencio, M. (2014). Aprovechamiento sostenible y conservación de las plantas medicinales en Cantarranas, Huehuetla, Hidalgo, México, como un medio para mejorar la calidad de vida en la comunidad. *Botanical Sciences*, 92(3), 389-404.

Mabry, T.J., Markham, K.R., y Thomas, M.B. (1970). *The Systematic Identification of Flavonoids*. New York: Springer-Verlag.

María Coman, Y. (2016). Plantas aromáticas y medicinales: antioxidantes naturales para la eliminación de radicales libres (Trabajo Fin de Grado no publicado). Universidad de Zaragoza, Aragón.

Martín Navarro, L. (2012). *Aplicación de procesos de separación con CO₂ supercrítico a la producción y optimización de bioplaguicidas* (Tesis doctoral). Universidad de Zaragoza, Aragón.

Martín, A. y Puech, S. (2001). Interannual and interpopulation variation in *Helichrysum stoechas* (Asteraceae), a species of disturbed habitats in the Mediterranean región. *Plant Species Biology*, 16, 29-37. doi:10.1046/j.1442-1984.2001.00052.x

Massbank, High Quality Mass Spectral Database. <http://www.massbank.jp/>

Meneses-Reyes, J. C., Soto-Hernández, R. M., Espinosa-Solares, T., & Ramírez-Guzmán, M. E. (2008). Optimization of the process of flavonoid extraction from chamomile (*Matricaria recutita* L.). *Agrociencia*, 42(4), 425-433.

Moldoveanu, S. (2014). The Utilization of Gas Chromatography/Mass Spectrometry in the Profiling of Several Antioxidants in Botanicals, *Advances in Gas Chromatography*, Dr Xinghua Guo (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/57292. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/howtoreference/advances-in-gas-chromatography/the-utilization-of-gas-chromatography-mass-spectrometry-in-the-profiling-of-several-antioxidants-in->

Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219.

Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Manuel Domínguez, J., Sineiro, J., Domínguez, H., ... Carlos Parajó, J. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72(2), 145-171. doi:10.1016/S0308-8146(00)00223-5.

Nenadis, N., Boyle, S., Bakalbassis, E. G., & Tsimidou, M. (2003). An experimental approach to structure-activity relationships of caffeic and dihydrocaffeic acids and related monophenols. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(5), 451-458.

NIST, The National Institute of Standards and Technology. The NIST Chemistry WebBook.

<http://webbook.nist.gov>

Nováková, L., Vildová, A., Mateus, J. P., Gonçalves, T., y Solich, P. (2010). Development and application of HPLC-MS/MS method for the determination of phenolic compounds in chamomile flowers and chamomile tea extracts. *Talanta*, 82(4), 1271-1280. doi:10.1016/j.talanta.2010.06.057

Palacio, L. (2000). Las plantas medicinales y aromáticas. Una alternativa de futuro para el desarrollo rural. *Boletín Económico De ICE*, 2652(1), 29-39.

Perpetua amarilla, siempreviva (*Helichrysum stoechas*). (26 de julio de 2017). En *Flora y fauna de Malpica de Tajo*. Recuperado el 26 de julio de 2017 de <http://acorral.es/malpiweb/florayfauna/siempreviva.html>

Pinilla Paricio, M. (2015). *Extracción y Fraccionamiento de Productos Bioactivos a Partir de Materias Primas Renovables* (Trabajo Fin de Máster no publicado). Universidad de Zaragoza, Aragón.

Plazonić, A., Bucar, F., Maleš, Z., Mornar, A., Nigović, B., y Kujundžić, N. (2009). Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*caucalis platycarpus* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Molecules*, 14(7), 2466-2490. doi:10.3390/molecules14072466

- Pontis, J. A., da Costa, L. A. M. A., da Silva, S. J. R., y Flach, A. (2014). Color, phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity of honey from roraima, brazil. *Food Science and Technology*, 34(1), 69-73. doi:10.1590/S0101-20612014005000015
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., y Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237. doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3
- Rodriguez, S. (2008). *Antioxidantes naturales. Cómo reducir el riesgo de cáncer, Alzheimer y enfermedades cardiovasculares*. Madrid: Ediciones Nowtilus.
- Rover, M. R., y Brown, R. C. (2013). Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin-Ciocalteu method. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 104, 366-371. doi:10.1016/j.jaap.2013.06.011
- Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H., & Kanazawa, K. (2003). Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 571-581. doi:10.1021/jf020926l
- Sampietro, D., Catalan, C., y Vattuone, M. (2009). Isolation, identification and characterization of allelochemicals/natural products. *Science Publishers*.
- Ruiz, A., Mardones, C., Vergara, C., Hermosín-Gutiérrez, I., von Baer, D., Hinrichsen, P., . . . Dominguez, E. (2013). Analysis of hydroxycinnamic acids derivatives in calafate (*berberis microphylla* G. forst) berries by liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 1281, 38-45. doi:10.1016/j.chroma.2013.01.059
- Sapozhnikova, Y. (2013). Development of liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for analysis of polyphenolic compounds in liquid samples of grape juice, green tea and coffee. *Food Chemistry*, 150, 87-93.
- Scherer, R., y Teixeira H. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 112, 654-658.
- Shah, M. A., Bosco, S. J. D., y Mir, S. A. (2014). Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat Science*, 98(1), 21-33. doi:10.1016/j.meatsci.2014.03.020
- Shobhy, E. y El-Feky, S. (2007). Chemical Constituents and Antimicrobial Activity of *Helichrysum stoechas*. *Asian Journal Of Plant Sciences*, 6(4), 692-695.

- Tepe, B., Sokmen, M., Askin Akpulat, H., y Sokmen, A. (2005). In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of four *Helichrysum* species from Turkey. *Food Chemistry*, 90(4), 685-689. doi:10.1016/j.foodchem.2004.04.030
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246. doi:10.3390/nu2121231
- Vernin, G., y Poite, J. C. (1998). GC/MS analysis of volatile components of everlasting (*Helichrysum stoechas* L.) essential oil. *Journal of Essential Oil Research*, 10(5), 553-557. doi:10.1080/10412905.1998.9700969
- Xu, J., Shen, J., Cheng, Y., y Qu, H. (2008). Simultaneous detection of seven phenolic acids in danshen injection using HPLC with ultraviolet detector. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 9(9), 728-733. doi:10.1631/jzus.B0820095
- Yu, Z., y Dahlgren, R. A. (2000). Evaluation of methods for measuring polyphenols in conifer foliage. *Journal of Chemical Ecology*, 26(9), 2119-2140. doi:10.1023/A:1005568416040