

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 415**

21 Número de solicitud: 201630788

51 Int. Cl.:

**A61K 8/97** (2007.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**09.06.2016**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**13.12.2017**

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN UNIVERSITARIA SAN PABLO  
(50.0%)**

**C/ Isaac Peral nº 58  
28040 Madrid ES y  
BIELSA PONS, Eva M<sup>a</sup> (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ACERO DE MESA, Nuria y  
MUÑOZ-MINGARRO, Dolores**

74 Agente/Representante:

**FUENTES PALANCAR, José Julian**

54 Título: **Extractos de biorresiduos del azafrán como principios activos de productos cosméticos antioxidantes.**

57 Resumen:

Extractos de biorresiduos florales del azafrán tras la separación de la especia, para ser utilizados como principios activos de productos cosméticos con propiedades antioxidantes, una vez confirmada la actividad antioxidante esperada de los mismos por su alto contenido en fenoles, flavonoides y antocianósidos, y evaluada favorablemente dicha actividad frente al estrés oxidativo celular mediante experimentación in vitro y sobre cultivo celular de carcinoma hepático. Su importancia radica, en que además de servir de base para la elaboración de una nueva gama de cosméticos con dichas propiedades, se da un aprovechamiento a la gran cantidad de desechos florales generados en la recolección del azafrán, para los que hasta el momento no se ha encontrado ninguna utilidad práctica.

**ES 2 646 415 A1**

**DESCRIPCION**

**Extractos de biorresiduos del azafrán como principios activos de productos cosméticos antioxidantes.-**

5

Se presenta y reivindica de invención unos extractos obtenidos de los residuos florales del azafrán tras la separación de la especia, para ser utilizados como principios activos de productos cosméticos con propiedades antioxidantes. Su importancia radica, en que además de servir de base para la elaboración de una nueva gama de cosméticos con dichas propiedades, da un aprovechamiento a la gran cantidad de desechos florales o biorresiduos generados en la recolección del azafrán, para los que hasta el momento no se ha encontrado ninguna utilidad práctica.

10

Sabiendo que el azafrán muestra elevada actividad antioxidante, se han estudiado los trabajos recientes sobre capacidad antioxidante de los biorresiduos de esta planta con objeto de utilizarlos como base para la obtención de extractos con la comentada finalidad, se han obtenido estos extractos, extractos polares en frío y en caliente, se ha confirmado la actividad antioxidante esperada de los mismos por su alto contenido en fenoles, flavonoides y antocianósidos, y se ha evaluado dicha actividad frente al estrés oxidativo celular mediante experimentación in vitro y sobre cultivo celular de carcinoma hepático, obteniéndose unos resultados que les hacen idóneos para ser utilizados como principios activos de productos cosméticos para el rejuvenecimiento corporal y facial.

15

20

**CAMPO DE APLICACIÓN.-**

25

El campo en que se encuadra la invención es el de la elaboración de cosméticos y productos para tratamientos de higiene y de belleza para personas, encontrando aplicación en la industria farmacéutica y cosmética en particular.

30

**ESTADO DE LA TECNICA.-**

En la producción tradicional del azafrán, la recolección de las flores de la planta se realiza a mano, y la separación de los estigmas rojos del resto de la flor, que constituyen la especia del azafrán, también. Esta práctica encarece el producto final, pero además genera una gran cantidad de desechos florales, estimados en 63 Kg de biorresiduos por cada Kg de especia producido, para los que recientemente ha aumentado el interés en buscar alguna aplicación.

35

La búsqueda de nuevos compuestos naturales o fitoextractos complejos con actividad antioxidante, resulta particularmente interesantes en la actualidad para la industria alimentaria y cosmética (Karimi *et al.*, 2010). Su estudio es de interés ya que los antioxidantes son moléculas capaces de prevenir o retardar la oxidación de otros compuestos, y tienen un importante potencial para reducir el desarrollo de algunas enfermedades cada vez más frecuentes en la población mundial.

En este sentido y como demuestra una búsqueda simple en Internet, es conocido que el azafrán, como la especia derivada de la flor de *Crocus sativus*, entre otros beneficios para la salud, tiene propiedades antioxidantes, pudiendo ser potencialmente utilizable como base de productos cosméticos (IMujer y Botanical), debido a componentes activos como la crocina y el safranal, que son sustancias que "secuestran" los radicales libres, retrasando el envejecimiento de las células del cuerpo y mejorando la salud en general.

Más concretamente, estudios sobre la composición química de los tépalos de *C. sativa*, revelan la presencia de quinsenósido, goodierosido, 3-hidroxi- $\gamma$ -butirolactona (Righi *et al.*, 2015), así como crocina y una elevada concentración de fenoles (Montoro *et al.*, 2012), especialmente kaepferol y sus glicósidos (Zeka *et al.*, 2015). La actividad antioxidante de los tépalos ha sido determinada mediante el ensayo del ABTS y del DPPH, revelando una elevada actividad antioxidante, superior en ocasiones a la del  $\alpha$ -Tocoferol (Li *et al.*, 2004).

A la vista de estos datos ya ha sido propuesto en diferentes trabajos científicos que los restos florales del azafrán tienen un potencial comercial elevado como fuente natural de antioxidantes (Zeka *et al.*, 2015; Righi *et al.*, 2015; Hosseinzadeh y Younesi, 2002).

Termentzi y Kokkalou (2008) atribuyen la capacidad antioxidante y las posibles aplicaciones de esta parte de la planta a la presencia de flavonoides. Por otro lado, pero en la misma línea de estudios de antioxidación, Omid *et al.* (2014) concluyen que los extractos de tépalos de *C. sativus* reducen las complicaciones del estrés oxidativo inducido por hepatotóxicos en ratas.

Son varias las publicaciones que demuestran un alto contenido en fenoles y otros compuestos antioxidantes en los biorresiduos de azafrán otorgándole una elevada actividad y presentándolos como un posible alimento o ingrediente funcional. Además de la actividad antioxidante se han detectado otras actividades biológicas en extractos de biorresiduos de azafrán como: ausencia de citotoxicidad en fibroblastos (Serrano-Díaz *et al.*, 2013); efecto antiinflamatorio y antinociceptivo (Serrano-Díaz *et al.*, 2012; Hosseinzadech y Younesi,

2002); actividad inhibidora de la tirosinasa (Kubo y Kinst-Hori, 1999); o capacidad para reducir la presión arterial (Fatehi *et al.*, 2003).

Sin embargo, en ninguna de dichas publicaciones se propone que los biorresiduos de azafrán puedan tener un posible uso cosmético, que es precisamente el objetivo de la presente invención, el de proporcionar unos extractos de los residuos florales de *Crocus sativus* que puedan servir como principios activos antioxidantes para la elaboración de cosméticos y productos de tratamiento de higiene y belleza personal.

#### 10 COMPENDIO DE LA INVENCION.-

Los extractos de biorresiduos del azafrán en cuestión han sido obtenidos de muestras congeladas y frescas de los desechos florales de *Crocus sativus*, una vez separados los estigmas rojos de la flor durante el proceso de recolección tradicional de la especia, tanto por extracción continua en caliente, como por extracción alcohólica en frío, utilizado metanol como disolvente, y han sido caracterizados por su contenido en fenoles, flavonoides, y antocianósidos.

El contenido en fenoles, determinado por el método de Folin-Ciocalteu, ha resultado ser de 117,10 mg eq ácido gálico /g extracto obtenido en frío y 51,39-42,5 mg eq ácido gálico /g extracto obtenido en caliente, según muestra el gráfico de la **figura 1** del final de la presente memoria, lo que pone de manifiesto que el método de extracción óptimo para obtener los principios activos con actividad antioxidante de la droga propuesta es la extracción en frío, ya que la concentración de compuestos fenólicos, responsables de esta actividad es significativamente mayor cuando no se calienta el extracto.

El contenido en flavonoides y antocianósidos, determinado por ensayo colorimétrico para el extracto obtenido en frío, ha sido de  $20,12 \pm 4,45$  mg eq epicatequina/g extracto, y  $9,3013 \pm 0,764$  mg cianidin 3-glucósido /g extracto, respectivamente, según el gráfico de la **figura 2**.

A continuación se ha evaluado a actividad antioxidante de los extractos frente al estrés oxidativo celular mediante experimentación in vitro, llevada a cabo por ensayos del DPPH y de la Xantina/Xantina oxidasa, y sobre cultivo celular de carcinoma hepático, mediante ensayo del MTT, ensayo del diacetato 2-7-diclorodihidrofluorescina (DCFH-DA) y ensayo de glutatión de Cayman.

El resultado del ensayo del DPPH para los extractos obtenidos en caliente a una concentración de extracto de 500 µg/mL en metanol, revela una capacidad de captura del radical DPPH- en comparación con ácido gálico utilizado como sustancia de referencia, con IC<sub>50</sub> de 5,664 ± 0,232 µg/mL, del 27%, y para los extractos obtenidos en frío a la misma concentración en metanol, del 37%.

El ensayo de la Xantina/Xantina oxidasa revela la capacidad de captura del radical superóxido O<sub>2</sub><sup>-</sup> en comparación con ácido gálico con IC<sub>50</sub> de 7,01 ± 0,4731 µg/mL, y la capacidad de inhibición de la Xantina Oxidasa en comparación con ácido gálico a una concentración de 8,33 µg/mL, mostradas en las **figuras 3 y 4** en porcentajes para distintas concentraciones de extracto obtenido en caliente, tanto a partir de muestras frescas como congeladas.

Los resultados de estos ensayos realizados *in vitro* permiten concluir que los extractos estudiados presentan una capacidad de captura del DPPH y el O<sub>2</sub><sup>-</sup> baja con respecto a la sustancia de referencia.

Mediante el ensayo sobre cultivo celular del MTT se ha conseguido determinar que el efecto sobre la viabilidad de células Hep G2 en condiciones normales y bajo estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 µM) para distintas concentraciones de extracto obtenido en caliente, tanto a partir de muestras frescas como congeladas, es el mostrado los gráficos de las **figuras 5 y 6** en porcentajes de inhibición de crecimiento celular frente al control con PBS (100%).

Mediante el ensayo del diacetato 2-7-diclorodihidrofluorescina (DCFH-DA), se ha podido asimismo determinar que la capacidad de reducir los niveles de concentración de ROS intracelular en cultivo de Hep G2 para distintas concentraciones de extracto congelado y fresco obtenido en caliente es la mostrada en los gráficos de las **figuras 7 y 8** en porcentajes de fluorescencia a los 90 minutos con respecto al control con PBS (100%), en presencia y ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (control estresado y sin estresar), y en las **figuras 9 y 10** en índices de fluorescencia a lo largo del tiempo para distintas concentraciones de extracto obtenido en frío.

Por último, el ensayo de glutatión de Cayman, basado en el reciclado enzimático de GSSG a GSH en presencia de la enzima glutatión reductasa para la cuantificación de GSH, determina que la capacidad de aumentar los niveles de concentración de GSH en cultivo de

Hep G2 es la mostrada en la **figura 11** en porcentajes de GSH frente al control en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (control sin estresar).

- 5 Los resultados de estos ensayos realizados sobre cultivos celulares ponen de manifiesto que a las concentraciones ensayadas, los extractos carecen de actividad citotóxica relevante en células Hep G2, y que muestran actividad antioxidante significativa como protectores celulares frente a estrés oxidativo inducido, reduciendo los niveles de ROS intracelulares y aumentando la concentración de GSH.
- 10 Todo ello demuestra que los extractos obtenidos a partir de los biorresiduos de azafrán pueden utilizarse como principios activos de productos cosméticos antioxidantes, ya que, por un lado, los extractos son capaces de captar radicales libres, disminuyendo el estrés oxidativo que podrían ocasionarle a las células factores externos como la contaminación o el estrés, y, por otro lado, son capaces de preparar a la célula para un eventual estrés
- 15 oxidativo, actuando como preventivo de posibles daños celulares.

#### FIGURAS Y GRAFICOS.-

- Al final de la presente memoria descriptiva se incluyen las siguientes figuras con los gráficos
- 20 de resultados de los ensayos realizados, que van a ser explicados y comentados en detalle en el apartado forma de realización de la invención:

**Figura 1.** Cantidad de fenoles presentes en los extractos de *Crocus sativus*, (planta del azafrán) determinada por el método de Folin-Ciocalteau.

25

**Figura 2:** Concentración de flavonoides y antocianósidos en los extractos de *Crocus sativus* obtenidos en frío, determinado por ensayo colorimétrico.

**Figura 3.** Porcentaje de captura del Radical O<sub>2</sub><sup>-</sup> frente a las distintas concentraciones de los extractos obtenidos en caliente, determinado por ensayo de la Xantina/Xantina oxidasa

30

**Figura 4.** Porcentajes de inhibición de la xantina oxidasa frente a las distintas concentraciones de los extractos de *Crocus sativus* y de ácido gálico a una concentración de 8,33 µg/mL, determinado por dicho mismo ensayo.

35

**Figura 5.** Efecto del extracto del azafrán congelado sobre la viabilidad de células Hep G2 en condiciones normales y bajo estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 µM), determinado mediante ensayo sobre cultivo celular del MTT

5 **Figura 6.** Efecto del extracto del azafrán fresco sobre la viabilidad de células Hep G2, en condiciones normales y bajo estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 µM), mediante el ensayo anterior.

**Figura 7.** Efecto de los extractos de flores de *Crocus sativus* sobre la concentración de ROS intracelular en cultivo de Hep G2, determinado mediante el ensayo del diacetato 2-7-diclorodihidrofluorescina (DCFH-DA)

**Figura 8.** Efecto protector de los extractos de flores de *Crocus sativus* sobre la concentración de ROS intracelular en cultivo de Hep G2, determinado por DCFH-DA.

15

**Figura 9:** Efecto directo de distintas concentraciones del extracto de azafrán sobre la concentración de ROS intracelular a lo largo del tiempo, según DCFH-DA.

**Figura 10:** Efecto protector de distintas concentraciones del extracto de azafrán sobre la concentración de ROS intracelular a lo largo del tiempo, según DCFH-DA.

20

**Figura 11:** Efecto de los extractos de biorresiduos florales del azafrán sobre los niveles de glutatión reducido (GSH), determinado por el ensayo de glutatión de Cayman.

25 FORMA DE REALIZACIÓN.-

### 1. Obtención de los extractos de biorresiduos del azafrán.-

Las muestras vegetales fueron cedidas por Don Antonio Bielsa Moliner, agricultor interesado en la recuperación del cultivo tradicional del Azafrán ecológico en el municipio de Vinaceite, provincia de Teruel. Tras permanecer la finca en barbecho veinte años, en junio del 2013 se plantaron a mano bulbos de *C. sativus* autóctonos de Teruel. Las flores fueron recogidas a principios de noviembre de 2013, dado que la floración fue algo tardía debido a la climatología. Tras obtener los estigmas, parte de los desechos florales fueron trasladados en nevera al laboratorio para su extracción, constituyendo las muestras frescas; otra parte fue congelada a -18 °C, y trasladada al laboratorio en frío para evitar su descongelación.

30

35

### 1.1. Obtención de los extractos en caliente.-

Se llevó a cabo una extracción continua en caliente de muestras congeladas y frescas durante 180 minutos, con la ayuda de un equipo Soxhlet (Buchi B-811). Para ello se utilizaron 2 g de muestra y metanol al 80 % como disolvente.

Los extractos metanólicos obtenidos, se evaporaron a sequedad en rotavapor (Buchi R-114) y se conservaron en nevera a 4 °C hasta su utilización.

El porcentaje de humedad de la muestra fue del  $85,21 \pm 0,16$  % y los rendimientos obtenidos de 10,15 % y 40, 83% para las muestras congeladas y frescas respectivamente.

### 1.2. Obtención del extracto en frío.-

Se llevó a cabo una extracción alcohólica en frío de las muestras congeladas, preservando en todo momento el extracto de la luz para evitar posibles alteraciones de sus componentes.

Se emplearon 35 g de flores de azafrán congeladas y 300 mL de metanol con 0,1% HCl comercial (37 %) como disolvente. La mezcla se introdujo en baño de ultrasonidos durante diez minutos en 4 ocasiones: al inicio de la extracción, a las 3, 9 y 24 h.

El extracto metanólico obtenido se evaporó a sequedad en rotavapor (Buchi R-114) a 22 °C y se conservó en nevera a 4 °C y protegido de la luz.

El porcentaje de humedad de la muestra fue del  $85,58 \pm 0,46$  %; y el rendimiento de la extracción fue del 8,91 % (p/p).

## 2. Estudio experimental y resultados.-

### 2.1. Determinación del contenido en fenoles totales.-

El contenido en fenoles totales fue determinado mediante el método de Folin-Ciocalteu (Abdelwahab *et al.*, 2014), donde los grupos fenólicos se oxidan con ácido fosfomolibdico-túngstico, formándose un complejo verde-azulado cuantificable a 750 nm.

Para realizar el ensayo se dispusieron 5 µL de los extractos a distintas concentraciones en placa de 96 pocillos. A continuación se añadieron 80 µL de Folin-Ciocalteu al 10% y se agitó la placa para que los reactivos se mezclasen de forma efectiva. Tras cinco minutos se añadieron 160 µL de carbonato sódico ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 7,5 %. La mezcla volvió a agitarse y 30 minutos después se midió la absorbancia a 765 nm en lector de placas Versa Max

(Molecular Devices). El contenido en fenoles totales se expresó como equivalentes de ácido gálico en mg/g de extracto, obtenidos por la interpolación en la recta de calibrado del ácido gálico. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

5 Resultados:

Los resultados obtenidos se muestran en el gráfico de **la figura 1**, que revela que el contenido en fenoles de los extractos de *Crocus sativus* a estudio, es muy superior al de los estigmas iraníes, pese a no resultar especialmente llamativo si lo comparamos con el  
10 contenido de otros extractos vegetales (Acero y Muñoz-Mingarro, 2012). El contenido en este tipo de compuestos resultó ser notablemente mayor en los extractos obtenidos en frío. Los compuestos fenólicos han sido descritos en múltiples ocasiones como los responsables del efecto antioxidante de extractos vegetales (Wenzig *et al.*, 2008), por este motivo y dado que los estigmas de las flores de *C. sativus*, han demostrado un efecto antioxidante notorio,  
15 el hecho de que los tépalos tengan un contenido casi ocho veces superior al de los estigmas, nos hace suponer que esta parte de la flor también podría resultar de interés como antioxidante natural.

**2.2. Determinación del contenido en flavonoides y antocianósidos.-**

20

Una vez analizado el contenido en fenoles, se estudió la concentración de flavonoides y antocianósidos.

Para conocer la cantidad de flavonoides totales presentes en los distintos extractos se utilizó  
25 un ensayo colorimétrico (Zhishen *et al.*, 1999). Se realizó una recta de calibrado con epicatequina como estándar.

El protocolo del ensayo consiste en utilizar 200  $\mu$ L de extracto a diferentes concentraciones, 200  $\mu$ L de agua Mili-Q como blanco, ó 200  $\mu$ L de diferentes concentraciones de  
30 epicatequina (5 diluciones seriadas partiendo de 0,1 mg/mL), a los que se les añadieron 800  $\mu$ L de agua Mili-Q y 60  $\mu$ L de nitrito sódico ( $\text{NaNO}_2$ ) al 5 %. Transcurridos cinco minutos se añadieron 60  $\mu$ L de tricloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) al 10%, y al minuto siguiente 400  $\mu$ L de hidróxido sódico (NaOH) 1 M. Inmediatamente se produce la aparición de color, leyéndose las absorbancias frente al blanco a 510 nm en espectrofotómetro UV-1603 (Shimadzu).

35

Todos ensayos se realizaron por triplicado. Tras interpolar en la recta de calibrado, los resultados se expresaron como miligramos de epicatequina por gramo de extracto.

El contenido en antocianósidos totales fue determinado mediante el método de pH diferencial (Fuleki y Francis, 1968a, b). Se basa en la medición espectroscópica de la transformación estructural reversible del cromóforo antocianina en función del pH, proporcionando diferentes espectros de absorbancia.

5

A partir del extracto de azafrán (2 mg/mL), se prepararon dos disoluciones, por triplicado, de 500 µL del extracto en 7000 µL de tampón 0,2 M KCl a pH 1.0 o 1 M acetato sódico a pH 4,5.

10 Las disoluciones se incubaron durante 15 min, protegidas de la luz. Se midió la absorbancia de ambas disoluciones a 510 nm y 700 nm.

El cálculo de la absorbancia se realizó de acuerdo a la ecuación 1:

$$\text{Abs} = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 4,5}$$

15

El contenido de antocianósidos se calculó mediante la ecuación de Lambert – Beer ( $\text{Abs} = \epsilon \cdot C \cdot L$ ) y fue expresado como mg de equivalentes de delphinidina-3-glucósido / 100g de extracto de azafrán de acuerdo con la ecuación 2:

$$20 \quad C \text{ (mg/L)} = \text{Abs} / (\epsilon \cdot l) \cdot P_m \cdot \text{factor de dilución} \cdot 10^3$$

Ecuación 2: Ecuación de Lambert-Beer adaptada. C = concentración; Abs = absorbancia;  $\epsilon$  = coeficiente de extinción molar de cianidin-3-glucósido: 29000L/mol\*cm; L = ancho de cubeta: 1cm; Pm = peso molecular de delphinidina-3-glucósido: 500,84g/mol

25

La delphinidina-3-glucósido ha sido descrita como el antocianósido mayoritaria en los biorresiduos del azafrán (Serrano-Díaz *et al.*, 2014), motivo por el cual se empleó para el cálculo de equivalentes de antocianósidos.

30 Resultados:

El gráfico de la **figura 2** muestra la concentración de flavonoides y antocianósidos en los extractos de azafrán obtenidos en frío

35 El contenido de Flavonoides es de  $20.12 \pm 4.45$  mg epicatequina/g extracto, este dato no se obtuvo para los extractos obtenidos en caliente.

El contenido en antocianósidos fue de  $9,3013 \pm 0,764$  mg /g de extracto equivalentes de cianidin 3-glucósido.

5 Como se puede observar en el referido gráfico, existe una elevada cantidad de antocianósidos en los biorresiduos florales de azafrán. El color de la flor apunta a la existencia de este tipo de compuestos, por lo que se procedió a su análisis. De hecho, el extracto obtenido en frío tenía un color claramente distinto al obtenido en caliente. Este tipo de compuestos, también presente en moras, fresas, arándanos, etc., tiene un elevado potencial antioxidante, sin embargo, se degradan con relativa facilidad, por lo que en los  
10 extractos en caliente pudieran haberse degradado por efecto de la temperatura.

### 2.3. Determinación de la actividad antioxidante *in vitro*.-

#### 2.3.1 Ensayo del DPPH.-

15

Capacidad de captura del radical DPPH.

El estudio de la capacidad antioxidante mediante el ensayo del DPPH (Koleva *et al.*, 2002), consiste en estudiar la capacidad del extracto, en este caso de azafrán, para reducir el  
20 radical DPPH• mediante la donación de un hidrógeno dando lugar a la forma DPPH-H. Dicha reducción da lugar a una decoloración pasando el compuesto de color azul en su forma oxidada, a amarillo en la reducida.

Para el desarrollo del método se prepararon tres baterías de diluciones en metanol con cada  
25 uno de los extractos y una sustancia de referencia, en este caso, ácido gálico. El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos. A cada pocillo se le añadieron 100µL de cada una de las diluciones preparadas, y 100µL de DPPH 1mM en metanol. El control se realizó con 100µL de metanol y 100µL de DPPH 1mM. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

30 La placa se dejó incubar durante 20 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente se midieron las absorbancias a 517 nm en un lector de placas Versa Max (Molecular Devices). Con los datos obtenidos se calculó el % de reducción como  $[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$ , donde  $A_0$  es la absorbancia del control y  $A_1$  la del extracto/ácido gálico a determinada concentración. A continuación se estimó la  $IC_{50}$  de los extractos y del ácido gálico, que  
35 indica la concentración que produce la reducción del 50 % del radical DPPH•.

Resultados:

En cuanto a la actividad antioxidante, se ha detectado una mayor actividad antioxidante en los extractos en frío; si en los extractos obtenidos en caliente a una concentración de 500 µg/mL obteníamos una reducción del 27% del radical, con los obtenidos en frío el porcentaje de reducción aumentaba hasta el 37 % de reducción a la misma concentración. Para el ácido gálico la IC<sub>50</sub> resultó de 5,664 ± 0,232 µg/mL.

A la vista de estos resultados, el azafrán muestra una reducida capacidad de captura del radical DPPH si se compara con la sustancia de referencia utilizada.

Dada la complejidad de los procesos de oxidación-antioxidación y de la composición química de los extractos de las plantas, es evidente que el empleo de un sólo método no es suficiente en la evaluación de las propiedades antioxidantes de mezclas complejas. En este sentido, muchos autores confirman la necesidad de utilizar varios métodos para determinar la actividad antioxidante (Koleva *et al.*, 2002), por lo que se procedió a realizar dos pruebas antioxidantes en cultivo celular, que se exponen a continuación.

### 2.3.2. Ensayo de la Xantina / Xantina oxidasa.-

Como consecuencia de la actividad de la enzima xantina oxidasa, la hipoxantina es transformada en xantina y ésta en ácido úrico. Durante este último paso se genera también un radical superóxido, capaz de producir la reducción del NBT (azul de nitrotetrazolio), dando lugar a cristales de formazán, producto coloreado y por tanto, cuantificable colorimétricamente (**figura 4**). Las sustancias con capacidad antioxidante, son capaces de captar dicho radical y evitan la reducción del NBT.

El objetivo de este ensayo es estudiar si nuestros extractos tienen capacidad para inhibir la reducción del NBT, mediante la captura del radical superóxido. Por otro lado, se comprobará la capacidad que tienen los extractos para inhibir la enzima, mediante la cuantificación de la producción de ácido úrico.

#### Capacidad de captura del radical O<sub>2</sub><sup>-</sup>

La capacidad de captura del radical superóxido por parte de los extractos obtenidos en caliente se cuantifica mediante la disminución de la absorbancia a 560 nm, ya que evitarán la reducción del NBT. A la vista de los resultados decidimos no estudiar el efecto de los extractos obtenidos en frío.

Para realizar el ensayo, se prepararon:

Blanco: 100  $\mu$ L de tampón fosfato 50 mM, 10  $\mu$ L de EDTA 15 mM, 15  $\mu$ L de hipoxantina 3 mM y 25  $\mu$ L de NBT 0,6 mM.

5

Control Positivo: 75  $\mu$ L de tampón fosfato 50 mM, 10  $\mu$ L de EDTA 15 mM, 15  $\mu$ L de hipoxantina 3 mM, 25  $\mu$ L de NBT 0,6 mM y 25  $\mu$ L de xantina oxidasa.

10 Muestras: 62,5  $\mu$ L de tampón fosfato 50 mM, 10  $\mu$ L de EDTA 15 mM, 15  $\mu$ L de hipoxantina 3 mM, 25  $\mu$ L de NBT 0,6 mM y 25  $\mu$ L de xantina oxidasa y 12,5  $\mu$ L de cada extracto y sustancia de referencia a cada concentración.

15 El ensayo se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos, siguiendo el protocolo de Mc Cune y Johns (2002). Todos los reactivos se prepararon en tampón fosfato (50 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ , pH= 7,4), al igual que las diluciones del ácido gálico y de los extractos. Las absorbancias se midieron durante 30 minutos, a intervalos de 5 minutos, en el lector de placas Versa Max (Molecular Divices). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. El resultado se expresó en porcentaje de inhibición de la reducción del NBT.

20 El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con un ANOVA de medidas repetidas, utilizando el programa IBM SPSS Statistics 20. La comparación por pares basada en las medias marginales estimadas, se llevó a cabo mediante ajuste para comparaciones múltiples DMS (Diferencia Mínima Significativa).

25 Capacidad de inhibición de la Xantina Oxidasa.

La capacidad para inhibir la xantina oxidasa se puede cuantificar analizando la producción de ácido úrico a 295 nm.

30 Para realizar el ensayo, se añadieron:

Blanco: 750  $\mu$ L de tampón fosfato 50 mM, 60  $\mu$ L de EDTA 15 mM, 90  $\mu$ L de hipoxantina 3 mM.

35 Control Positivo: 600  $\mu$ L de tampón fosfato 50 mM, 60  $\mu$ L de EDTA 15 mM, 90  $\mu$ L de hipoxantina 3 mM y 150  $\mu$ L de xantina oxidasa.

Muestras: 525  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato 50 mM, 60  $\mu\text{L}$  de EDTA 15 mM, 90  $\mu\text{L}$  de hipoxantina 3 mM  $\mu\text{L}$ , 150  $\mu\text{L}$  de xantina oxidasa y 75  $\mu\text{L}$  de cada extracto y sustancia de referencia a cada concentración.

- 5 El ensayo se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Mc Cune y Johns (2002). Todos los reactivos se prepararon en tampón fosfato (50 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ , pH= 7,4), al igual que las diluciones del ácido gálico y de los extractos. Las absorbancias se midieron en espectofotómetro durante 40 minutos, a intervalos de 10 minutos. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. El resultado se expresó en porcentaje de inhibición de la producción
- 10 de ácido úrico.

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con un ANOVA de medidas repetidas, utilizando el programa IBM SPSS Statistics 20. La comparación por pares basada en las medias marginales estimadas, se llevó a cabo mediante ajuste para comparaciones

15 múltiples DMS.

Resultados:

Ambos extractos son capaces de captar el radical  $\text{O}_2^-$ , evitando la reducción del NBT, con

20 mayor eficacia que la detectada en el ensayo del DPPH. Los resultados aparecen representados en el gráfico de la **figura 3** por el porcentaje de captura del Radical  $\text{O}_2^-$  frente a las distintas concentraciones de los extractos. Las distintas letras indican diferencias significativas (ANOVA-Test DMS  $p < 0,05$ ).

25 Es observable una capacidad dosis dependiente, más patente en el caso del azafrán congelado que en el fresco. Sin embargo, a la misma concentración no se detectaron diferencias significativas entre el azafrán fresco y el congelado, siendo ligeramente mayor la capacidad antioxidante del congelado a las dosis más altas. Como en el ensayo anterior, no se llegó a alcanzar el 50 % de captura del radical, por lo que nos fue imposible calcular la

30  $\text{IC}_{50}$  de los extractos, que en el caso del ácido gálico resultó ser del  $7,01 \pm 0,4731 \mu\text{g/mL}$ . Además de captar el radical superóxido alguno de los componentes del extracto podría inhibir la xantina oxidasa, reduciéndose por tanto la producción de ácido úrico.

El gráfico de la **figura 4** refleja los porcentajes de inhibición de la xantina oxidasa frente a

35 las distintas concentraciones de los extractos de *C. sativus* y de ácido gálico a una concentración de  $8,33 \mu\text{g/mL}$ . Las distintas letras indican diferencias significativas (ANOVA-Test DMS  $p < 0,05$ ).

Se observa que ninguno de los dos extractos es capaz de inhibir de forma considerable a la enzima. La inhibición máxima alcanzada por los extractos es de entorno al 7,5 % y se alcanza con la concentración de 83,33 µg/mL. No aparecen diferencias significativas ni entre los dos extractos de la planta a la misma concentración, ni entre concentraciones próximas del mismo extracto.

#### **2.4. Determinación de la actividad antioxidante en cultivo celular.-**

##### **2.4.1. Estudio de la viabilidad celular.-**

Antes de realizar los estudios para evaluar la capacidad antioxidante de los extractos de azafrán en cultivo celular de Hep G2 se procedió a determinar su posible toxicidad sobre esta línea celular mediante el ensayo del MTT. Esta técnica, se basa en la transformación metabólica de la sal de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium (MTT) de color amarillo, en cristales de formazán de color morado. La reacción tiene lugar en la mitocondria de las células vivas, por lo que mayores absorbancias a 550 nm, implican una mayor supervivencia celular.

Se analizó el efecto de los extractos sobre el crecimiento de células tumorales en condiciones normales y bajo condiciones de estrés oxidativo inducido con peróxido de hidrógeno.

Se prepararon placas de 96 pocillos, a razón de 8.000 células/pocillo de la línea de Hep G2, en medio de cultivo EMEM suplementado con 1% de aminoácidos no esenciales, 2 mM de glutamina, 1% de suero fetal bovino y un 1% de antibióticos (10000 U de penicilina y 10 mg de estreptomycin/mL). La placa se incubó durante 24h y posteriormente se añadieron 50 µL de cada una de las concentraciones de extracto preparadas en PBS. Se estudiaron 5 concentraciones de cada extracto, comprendidas entre 0,5 mg/mL y 0,0625 mg/mL. Se realizó así mismo, un control con PBS y uno negativo sin células. Las placas se incubaron 20 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se aspiró el medio y se añadió medio solo o con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 µM). Tras tres horas de incubación se aspiró el medio y se añadieron 150 µL de medio EMEM y 50 µL de MTT al 0,1% en PBS. Las placas se volvieron a incubar durante 3 horas, aspirándose a continuación el medio y añadiendo 100 µL de DMSO, con el objetivo de disolver los cristales de formazán formados (Denizot y Lang, 1986).

La absorbancia se midió en un lector de placas Versa Max (Molecular Devices) a 550 nm. Los resultados se expresaron en porcentajes de inhibición de crecimiento celular frente al

control con PBS, calculando a partir de estos datos, si procede, la concentración del extracto que inhibe el 50% del crecimiento celular (IC<sub>50</sub>).

5 El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con un ANOVA de medidas repetidas, utilizando el programa IBM SPSS Statistics 20. La comparación por pares basada en las medias marginales estimadas, se llevó a cabo mediante ajuste para comparaciones múltiples Bonferroni. Determinación de la actividad antioxidante en cultivo celular.

Resultados:

10

En las gráficas de las **figuras 5 y 6** se muestra el efecto de los extractos de *Crocus sativus* sobre la viabilidad de células Hep G2, en condiciones normales y bajo estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200µM).

15 La **figura 5** muestra el efecto del extracto del azafrán congelado sobre la viabilidad de células Hep G2 en condiciones normales y bajo estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 µM). Los datos aparecen representados cómo % de crecimiento con respecto al control con PBS (100%).

20 La **figura 6** muestra el efecto del extracto del azafrán fresco sobre la viabilidad de células Hep G2, en condiciones normales y bajo estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 µM). Los datos aparecen representados cómo % de crecimiento con respecto al control con PBS (100%).

25 Se observan claras diferencias entre ambos extractos; mientras que el procedente de azafrán congelado no reduce el porcentaje de crecimiento por debajo del 67 %, el extracto del biorresiduo fresco produce una citotoxicidad más acusada. Este hecho nos permite calcular la IC<sub>50</sub> para este extracto que resultó ser de 272 ± 27 µg/mL. Es patente además en el caso del extracto de azafrán fresco, un efecto dosis dependiente que en el otro extracto  
30 no se detecta.

Según *The American National Cancer Institute* (NCI), un extracto crudo presenta una actividad citotóxica considerable cuando su IC<sub>50</sub> es menor de 20 µg/mL (Boyd, 1997). Por lo tanto, a la vista de los resultados podemos concluir que los extractos de *Crocus sativus* no  
35 presentan una actividad citotóxica destacable. Este dato permitió considerar los extractos estudiados como posibles agentes protectores frente a daños oxidativos, al carecer de citotoxicidad relevante. Estos datos concuerdan con la baja toxicidad de seis extractos de

biorresiduos florales de *C. sativus*, descrita por Serrano-Díaz *et al.* (2014) en líneas celulares de fibroblastos no tumorales.

5 Al tratar las células con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se observa cómo se produce un descenso significativo del crecimiento celular frente al control con PBS. El objetivo del estudio es analizar si extractos obtenidos son capaces de revertir o prevenir los daños ocasionados por este agente oxidante. Ninguno de los dos extractos es capaz de revertir este estrés a la concentración de tóxico ensayada, de hecho el extracto fresco incluso reduce, a las concentraciones más altas, el crecimiento celular en presencia de peróxido de hidrógeno.

10

Tanto al someter las células a estrés oxidativo, como en condiciones normales, se observa la misma tendencia general en cada extracto: el extracto congelado no modifica significativamente el crecimiento celular con respecto al control (tratado o no con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en cada caso); mientras que el extracto fresco lo reduce significativamente, a las  
15 concentraciones más altas.

#### **2.4.2. Determinación de las especies reactivas de oxígeno (ROS).-**

Se estudió la capacidad de los extractos para reducir los niveles de ROS intracelulares.

20 Para ello se determinó el efecto directo de los extractos y su capacidad protectora frente al daño oxidativo causado por un agente prooxidante, como el peróxido de hidrógeno (Wang y Joseph, 1999; Fernández-Gómez *et al.*, 2005).

Para llevar a cabo la determinación de las especies reactivas de oxígeno, se utilizó el  
25 ensayo del diacetato 2-7-diclorodihidrofluorescina (DCFH-DA). Este compuesto no fluorescente, atraviesa la membrana celular gracias a su baja polaridad y es deacetilado por esterasas intracelulares dando lugar a la 2-7-diclorodihidrofluorescina (DCFH), que tampoco es fluorescente. Sin embargo, ante la presencia de especies reactivas de oxígeno, pasa a su forma oxidada, 2-7-diclorodihidrofluoresceína (DCF), que si emite fluorescencia.

30

Se puede decir que la fluorescencia emitida es directamente proporcional a la concentración de ROS, y por tanto, un mayor potencial antioxidante del extracto se asociará a bajos niveles de florescencia (Cardomy y Cotter, 2000).

35 Para realizar este ensayo, se prepararon placas de 96 pocillos en las que se dispusieron 8.000 células/pocillo en un volumen final de 150 µL de medio EMEM suplementado con 2 mM de glutamina, 1 % de suero fetal bovino, 1 % de aminoácidos no esenciales y 1 % de

antibióticos (10000 U de penicilina y 10 mg/mL de estreptomina). Las placas se mantuvieron en incubador 24 h a 37°C y una atmosfera de 5 % CO<sub>2</sub>.

5 A continuación, para evaluar el efecto directo de los extractos, se aspiró el medio, y se añadió la DCFH-DA 0,02 mM (200 µL/pocillo). Las placas se incubaron 30 minutos en oscuridad en incubador. La manipulación de las placas desde el momento en que se añade el DCFH-DA se realizó en oscuridad. Tras la aspiración y lavado con PBS glucosado (1,8 mg de glucosa/mL PBS) se añadieron distintas concentraciones de los extractos en PBS glucosado, utilizando PBS glucosado como control.

10 Para estudiar el efecto protector frente al estrés inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pretratamos las células durante 20 h con diferentes dosis de cada extracto. Una vez transcurrido ese tiempo, se añadió la DCFH-DA y se incubó 30 minutos. A continuación se aspiró el medio, se lavó con PBS glucosado y se añadió medio de cultivo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 µM.

15 La fluorescencia se midió en el momento de añadir los extractos (efecto directo) o el peróxido de hidrógeno (ensayo de protección) durante 90 minutos a intervalos de 15 minutos en lector de placas Fluostar optima (BMG Labtech) con λ de excitación de 485 nm y de emisión de 520 nm.

20 Los resultados se expresaron como porcentaje de fluorescencia a los 90 minutos, con respecto al control con PBS (100%). El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con un ANOVA de medidas repetidas, utilizando el programa IBM SPSS Statistics 20. La comparación por pares basada en las medias marginales estimadas, se llevó a cabo  
25 mediante ajuste para comparaciones múltiples Bonferroni.

#### Resultados:

30 El gráfico de la **figura 7** refleja el efecto de los extractos de flores de *C. sativus* sobre la concentración de ROS intracelular en cultivo de Hep G2. Las unidades de fluorescencia fueron medidas a los 90 minutos de añadir el extracto. Los datos se expresan como % de ROS con respecto al control. Distintas letras indican diferencias significativas (ANOVA-Test Bonferroni p< 0,005). Ac: Extracto de azafrán congelado obtenido en caliente; Af: Extracto de azafrán fresco obtenido en caliente.

35

Como se observa en la figura 7 las dos concentraciones más altas de los dos extractos obtenidos en caliente aumentan de forma significativa la concentración de ROS intracelulares con respecto al control.

5 Los resultados del ensayo realizado para observar el posible efecto protector de los extractos de flores de *C. sativus* frente al estrés oxidativo, es decir, sobre la concentración de ROS intracelular en cultivo de Hep G2, se muestra en la **figura 8**.. Las unidades de fluorescencia fueron medidas a los 90 minutos de añadir el agente oxidante (200µM) tras un pretratamiento de 20 h con el extracto. Los datos se expresan como % de ROS con respecto  
10 al control sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 %). Distintas letras indican diferencias significativas (ANOVA-Test Bonferroni p< 0,005). Ac: Extracto de azafrán congelado obtenido en caliente; Af: Extracto de azafrán fresco obtenido en caliente.

Se observa en esta otra figura cómo en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se produce un aumento  
15 significativo de los niveles de ROS en el control estresado (en color rojo) frente al control sin estresar (en color verde). Los tratamientos con las concentraciones más elevadas, son capaces de mantener los niveles de ROS próximos a los valores observados en el control de células sin estresar, lo que demuestra una actividad antioxidante como protectores celulares frente a un posible estrés oxidativo.

20

En los gráficos de las **figuras 9 y 10** se muestra el efecto de los extractos fríos de *C. sativus* sobre la concentración de ROS intracelular en cultivo de Hep G2 a lo largo del tiempo. En la **figura 9** el efecto directo de distintas concentraciones del extracto, y en la **figura 10**, el efecto protector de distintas concentraciones del extracto. Las distintas letras indican  
25 diferencias significativas entre tratamientos para cada tiempo (ANOVA-Test Bonferroni p<0,005).

En lo referente al efecto directo (**figura 9**), se ve como los niveles más bajos de ROS se producen en el control, mientras que los tratamientos con el extracto de flores de azafrán  
30 producen un incremento de los niveles de estos radicales, no siempre significativo con respecto al control. A la concentración más alta, la producción de ROS se dispara siendo significativamente mayor que el control a todos los tiempos. Sin embargo, cuando se observan los resultados del efecto protector (**figura 10**), se ve como todos los tratamientos y el control siguen la misma pauta, pero la menor concentración de ROS se obtiene con el  
35 tratamiento más concentrado del extracto. Pese a todo ello, no existen diferencias significativas entre el control y este tratamiento, por lo que no podemos hablar de un marcado efecto protector del extracto en lo que se refiere a los niveles de ROS intracelulares.

Los resultados del ensayo realizado para observar el posible efecto protector de los extractos frente al estrés oxidativo se muestra en la referida **figura 10**. En presencia de  $H_2O_2$ , se observa cómo se produce un aumento significativo de los niveles de ROS en el control estresado (en color rojo) frente al control sin estresar (en color verde). Los  
5 tratamientos con las concentraciones más elevadas, son capaces de mantener los niveles de ROS próximos a los valores observados en el control de células sin estresar, lo que demuestra una actividad antioxidante como protectores celulares frente a un posible estrés oxidativo. Este efecto puede ser debido a la capacidad de los compuestos fenólicos para secuestrar radicales de oxígeno en cultivos celulares (Pavlica y Gebhardt, 2010). Los  
10 resultados indican que los ROS generados durante el estrés oxidativo, son neutralizados por los compuestos presentes en los extractos. Por lo tanto, los extractos muestran una actividad antioxidante relevante aunque únicamente como protectores celulares frente a un posible estrés oxidativo, que podría derivar en múltiples patologías, como cáncer, inflamación o diversos trastornos cutáneos, entre otras (Bickers y Athar, 2006).

15

#### **2.4.3. Estudio del estado Red-ox celular.-**

Se estudió el estado redox celular mediante la determinación de los niveles de GSH y GSSH intercelulares. La concentración de estos compuestos permitió observar si el extracto tiene  
20 capacidad antioxidante al aumentar la concentración de los mismos en las células. De nuevo, se estudió el efecto directo y el efecto protector tras la inducción de estrés oxidativo con  $H_2O_2$ .

Este estudio se llevó a cabo únicamente con los extractos obtenidos en frío, y siguiendo las  
25 indicaciones del protocolo del ensayo de glutatión de Cayman (Chemical Company) (Baker *et al.*, 1990), basado en el reciclado enzimático de GSSG a GSH en presencia de la enzima glutatión reductasa para la cuantificación de GSH.

La incubación de las células con los extractos se realizó en placas de 6 pocillos en las que  
30 se dispusieron 300.000 células/pocillo y 3 mL de medio EMEM suplementado con 2 mM de glutamina, 1 % de suero fetal bovino, 1 % de aminoácidos no esenciales y 1 % de antibióticos (10.000 U de penicilina y 10 mg/mL de estreptomycin). Tras incubar durante 24 h en incubador a 37 °C y 5 %  $CO_2$ , se aspiró el medio, se añadió medio con 6 concentraciones diferentes del extracto comprendidas entre 1 mg/mL y 40 mg/mL en medio  
35 de cultivo y se incubó en las condiciones anteriores durante otras 20 h. Transcurrido este tiempo, se aspiró el medio, se lavó con PBS y las células se recogieron mediante raspado en 1 mL de PBS.

Para estudiar el efecto protector, tras las 20 horas de pretratamiento con el extracto, se aspiró el medio y se sustituyó por 3 mL de medio de cultivo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 µM) y se incubó durante 3 h. A continuación, se aspiró el medio, se lavó con PBS y se recogieron las células mediante raspado en 1 mL de PBS.

5

Para realizar el ensayo es preciso lisar las células y hacer accesible el GSH intracelular. Para ello las células se sonicaron durante 10 segundos en 1 mL de tampón fosfato 50 mM pH 6-7, con 1 mM de EDTA. A continuación, los restos celulares sedimentan al centrifugarlos a 10.000 g durante 15 minutos a 4 °C y se desechan, conservando el sobrenadante en hielo.

10

Se prosigue con una desproteinización, la cual es necesaria para evitar interferencias de grupos tiol presentes en las proteínas celulares. Para ello se mezclaron volúmenes iguales de metafosfórico al 10 % en agua y el sobrenadante, se agitó en vortex y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se centrifugó a 2.000 g dos minutos y se recogió el sobrenadante. A 1 mL de sobrenadante se le añadieron 50 µL de trietanolamina 4 M para elevar el pH de la disolución.

15

Se preparó una recta de calibrado con GSSG comercial a distintas concentraciones. 50 µL de cada uno de los tratamientos (distintas concentraciones de azafrán para el estudio del efecto directo y del efecto protector) y de las diluciones del patrón se dispusieron en placa de 96 pocillos y se les añadió 150 µL de la mezcla de reacción (tampón MES (ácido (N-morfolino)-etanesulfónico 0,4 M, fosfato 0,1 M y EDTA 2 mM, pH 6), NADP<sup>+</sup>, glucosa-6-fosfato, glutatión reductasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, agua y DTNB). La placa se incubó en oscuridad durante 30 minutos y a continuación se midió la absorbancia a 405 nm en lector de placas Versa Max (Molecular devices).

20

25

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como concentración de GSH/GSSG tras interpolar en una recta de calibrado. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con un ANOVA de medidas repetidas, utilizando el programa IBM SPSS Statistics 20. La comparación por pares basada en las medias marginales estimadas, se llevó a cabo mediante ajuste para comparaciones múltiples Bonferroni (p<0.05).

30

Resultados:

35

Al estudiarse el efecto directo del extracto no se observan diferencias significativas entre el control y los tratamientos con las distintas concentraciones de extractos de azafrán. Los

resultados apuntan, a que no existe un efecto directo antioxidante en lo que se refiere a un aumento en los niveles de GSH en los tratamientos con extractos de azafrán a ninguna de las concentraciones ensayadas. En cuanto al efecto protector, se encontró un marcado aumento, significativo estadísticamente hablando, de los niveles de GSH total con un efecto  
 5 dosis dependiente que aumenta con la concentración de extracto. Uno de los principales antioxidantes endógenos del organismo es la GSH, debido a la presencia del grupo tiol de la cisteína que lo convierte en un excelente donador de protones. De esta manera el tripéptido GSH interacciona con ROS como el peróxido de hidrógeno, bien directamente o mediado por la actividad glutatión peroxidasa, reduciendo el estrés oxidativo causado por estos  
 10 radicales.

El gráfico de la **figura 11** muestra el comentado efecto de los extractos sobre los niveles de glutatión reducido (GSH). Los valores se expresan como % frente al control sin estresar (100%). Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA-test Benferroni,  $p < 0.05$ ).

15

## BIBLIOGRAFIA.-

Valeria, R., Parenti, F., Tugnol, V., Schenetti, L., Mucci, A. 2015. Crocus sativus Petals: Waste or Valuable Resource? The Answer of High-Resolution and High-Resolution Magic  
 20 Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance. J. Agric. Food Chem., 63 (38), pp 8439–8444. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b03284

Zeka, K, Ruparella, K.C., Continenza, M.A., Stagos, D., Vegliò, F., Arroo, R.R. 2015. Petals of Crocus sativus L. as a potential source of the antioxidants crocin and kaempferol.  
 25 Fitoterapia, 107: 128-34. DOI: 10.1016/j.fitote.2015.05.014.

Omidi, A., Riahinia, N., Montazer Torbati, M.B., Behdani, M.A. 2014. Hepatoprotective effect of Crocus sativus (saffron) petals extract against acetaminophen toxicity in male Wistar rats. Avicenna J Phytomed, 4 (5): 330-336.

30

Montoro, P., Maldini, M.T., Luciani, L., Tuberoso, C.I.G., Congiu, F., Pizza, C. 2012. Radical Scavenging Activity and LC-MS Metabolic Profiling of Petals, Stamens, and Flowers of Crocus sativus L. Journal of Food Science, 10.1111/j.1750-3841.2012.02803.x

Termentzi, A., Kokkalou, E. 2008. LC-DAD-MS (ESI+) analysis and antioxidant capacity of  
 35 Crocus sativus petal extracts. Planta Med., 74(5):573-81. doi: 10.1055/s-2008-1074498.

Hosseinzadeh, H., Ghenaati, J. 2006. Evaluation of the antitussive effect of stigma and petals of saffron (*Crocus sativus*) and its components, safranal and crocin in guinea pigs. *Fitoterapia*. 77(6): 446-8.

- 5 Li, C.Y., Lee, E.J., Wu, T.S. 2004. Antityrosinase principles and constituents of the petals of *Crocus sativus*. *J Nat Prod.*, 67(3):437-40.

Fatehi, M., Rashidabady, T., Fatehi-Hassanabad, Z. 2003. Effects of *Crocus sativus* petals' extract on rat blood pressure and on responses induced by electrical field stimulation in the rat isolated vas deferens and guinea-pig ileum. *J Ethnopharmacol.*, 84(2-3):199-203.

10

Hosseinzadeh, H., Younesi, H.M. 2002. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. *BMC Pharmacol.*, 15;2:7.

- 15 Kubo, I., Kinoshita, I. 1999. Flavonols from saffron flower: tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism. *J Agric Food Chem.*, 47(10):4121-5.

Serrano-Díaz, J., Estevan, C., Sogorb, M.Á., Carmona, M., Alonso, G.L., Vilanova, E. 2014. Cytotoxic effect against 3T3 fibroblasts cells of saffron floral bio-residues extracts. *Food Chem.* 15;147:55-9. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.09.130.

20

Serrano-Díaz, J., Sánchez, A.M., Maggi, L., Martínez-Tomé, M., García-Diz, L., Murcia, M.A., Alonso, G.L. 2012. Increasing the applications of *Crocus sativus* flowers as natural antioxidants. *J Food Sci.*, 77(11):C1162-8. doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.02926.x.

25

Rubio Moraga, A., Ahrazem, O., Rambla, J.L., Granell, A., Gómez Gómez, L. 2013. Crocins with high levels of sugar conjugation contribute to the yellow colours of early-spring flowering crocus tepals. *PLoS One*, 13;8(9):e71946. doi: 10.1371/journal.pone.0071946.

**REIVINDICACIONES**

1.- Extractos de biorresiduos del azafrán, obtenidos de muestras congeladas y frescas de los desechos florales de *Crocus sativus* una vez separados los estigmas rojos de la flor en el proceso de recolección de la especia, tanto por extracción continua en caliente, como por extracción alcohólica en frío, utilizado metanol como disolvente, CARACTERIZADOS por presentar un contenido en fenoles determinado por el método de Folin-Ciocalteu, de 117,10 mg eq ácido gálico /g extracto obtenido en frío y 51,39-42,5 mg eq ácido gálico /g extracto obtenido en caliente, y un contenido en flavonoides y antocianósidos determinado por ensayo colorimétrico, de  $20.12 \pm 4.45$  mg eq epicatequina/g extracto obtenido en frío, y  $9,3013 \pm 0,764$  mg cianidin 3-glucósido /g extracto obtenido en frío, respectivamente.

2.- Extractos de biorresiduos del azafrán, según reivindicación 1, CARACTERIZADOS por su capacidad antioxidante frente al estrés oxidativo celular, al presentar en el ensayo *in vitro* del DPPH, una capacidad de captura del radical DPPH• en comparación con ácido gálico utilizado como sustancia de referencia, con  $IC_{50}$  de  $5,664 \pm 0,232$  µg/mL, del 27% para los extractos obtenidos en caliente y del 37% para los extractos obtenidos en frío, a una concentración de extracto de 500 µg/mL en metanol.

3.- Extractos de biorresiduos del azafrán, según reivindicación 1, CARACTERIZADOS por su capacidad antioxidante frente al estrés oxidativo celular, al presentar en el ensayo *in vitro* de la Xantina/Xantina oxidasa, la capacidad de captura del radical superóxido O<sub>2</sub><sup>-</sup> en comparación con ácido gálico con  $IC_{50}$  de  $7,01 \pm 0,4731$  µg/mL, y la capacidad de inhibición de la Xantina Oxidasa en comparación con ácido gálico a una concentración de 8,33 µg/mL, en porcentajes para distintas concentraciones de extracto obtenido en caliente, de muestras congeladas y frescas.

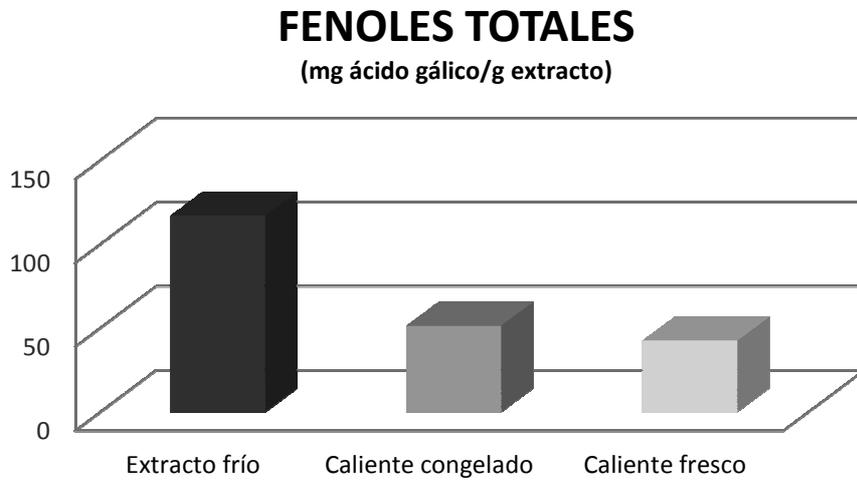
4.- Extractos de biorresiduos del azafrán, según reivindicación 1, CARACTERIZADOS por su capacidad antioxidante frente al estrés oxidativo celular, al presentar en el ensayo sobre cultivo celular del MTT, el efecto sobre la viabilidad de células Hep G2 en condiciones normales y bajo estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 µM) en porcentajes de inhibición de crecimiento celular frente al control con PBS (100%) para distintas concentraciones de extracto obtenido en caliente, de muestras congeladas y frescas.

5.- Extractos de biorresiduos del azafrán, según reivindicación 1, CARACTERIZADOS por su capacidad antioxidante frente al estrés oxidativo celular, al presentar en el ensayo sobre cultivo celular del diacetato 2-7-diclorodihidrofluorescina (DCFH-DA), la capacidad de reducir

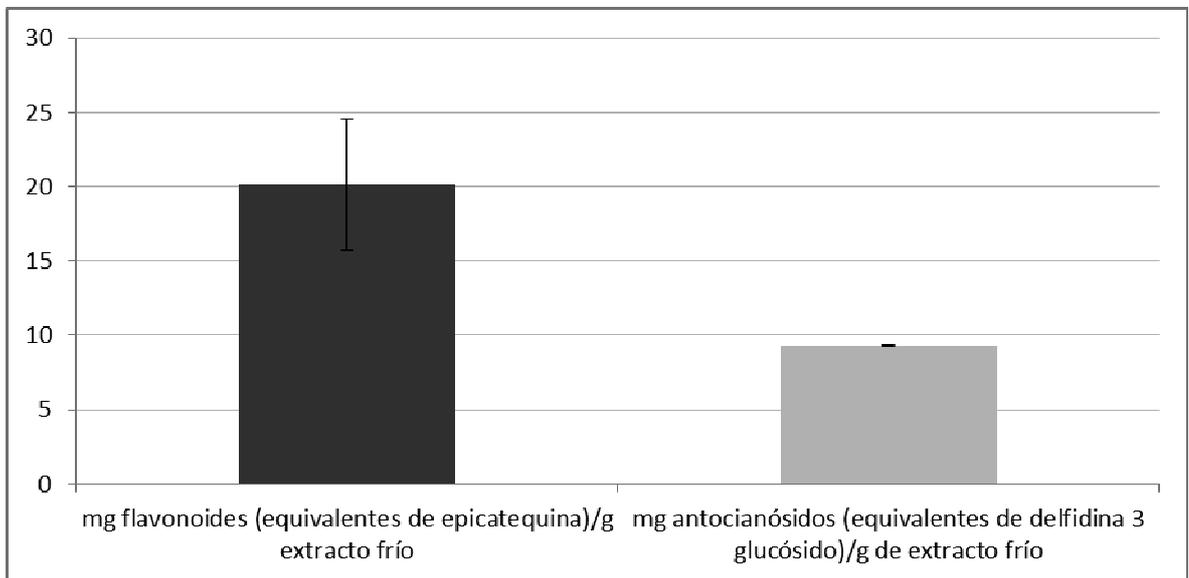
los niveles de concentración de ROS intracelular en cultivo de Hep G2 en porcentajes de fluorescencia a los 90 minutos con respecto al control con PBS (100%), en presencia y ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (control estresado y sin estresar), para distintas concentraciones de extracto congelado y fresco obtenido en caliente, en índices de fluorescencia a lo largo del tiempo para distintas concentraciones de extracto obtenido en frío.

**6.-** Extractos de biorresiduos del azafrán, según reivindicación 1, CARACTERIZADOS por su capacidad antioxidante frente al estrés oxidativo celular, al presentar en el ensayo sobre cultivo celular de glutatión de Cayman la capacidad de aumentar los niveles de concentración de GSH en cultivo de Hep G2 en porcentajes de GSH frente al control en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (control sin estresar).

**7.-** Uso de extractos de biorresiduos del azafrán, según reivindicaciones anteriores, como principios activos de productos cosméticos antioxidantes, para su aplicación corporal humana a fin de disminuir o prevenir el estrés oxidativo de las células frente a factores externos contaminantes.



**Figura 1**



**Figura 2**

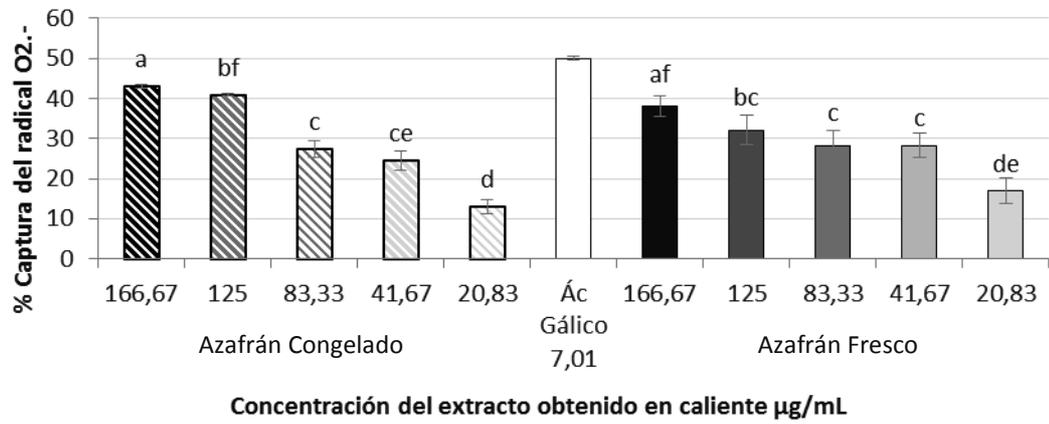


Figura 3

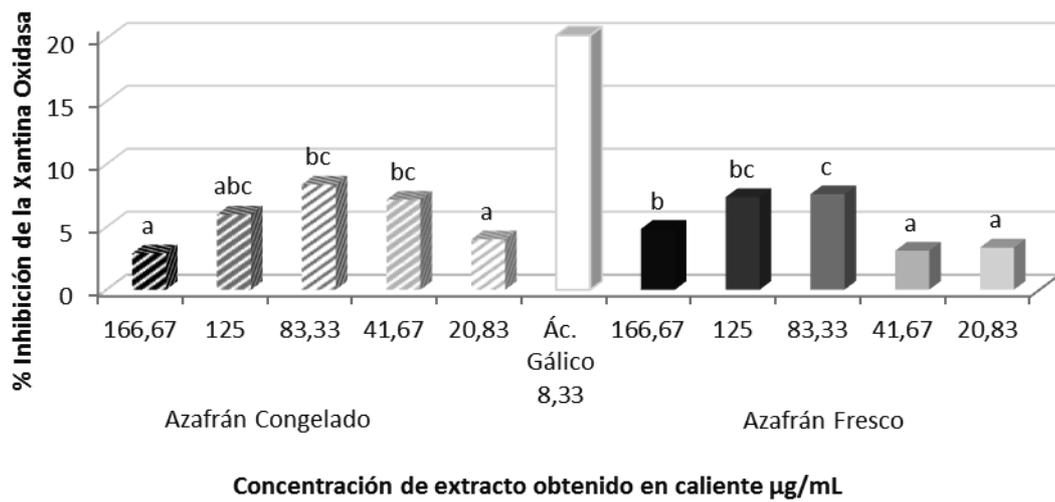


Figura 4

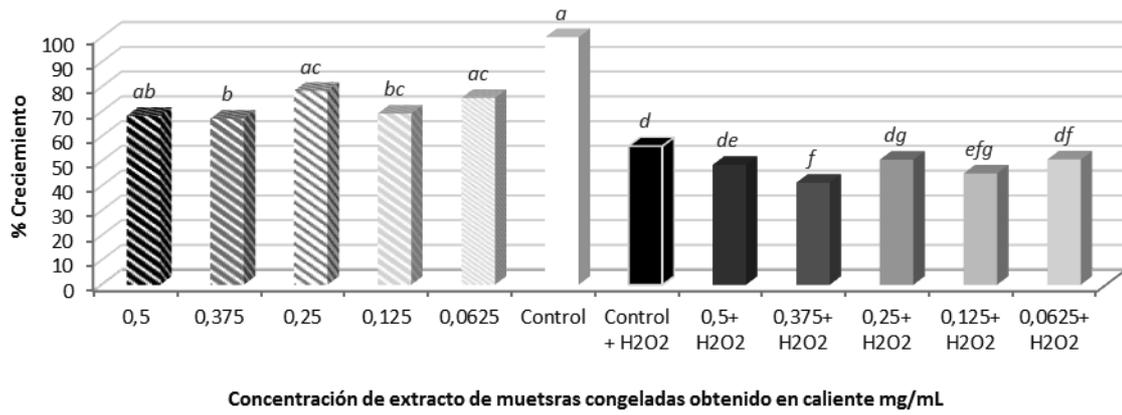


Figura 5

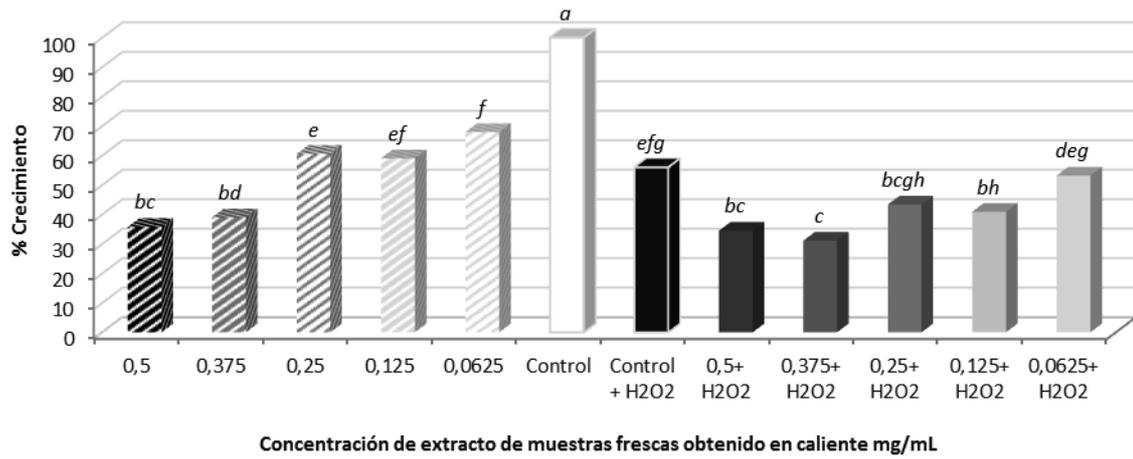


Figura 6

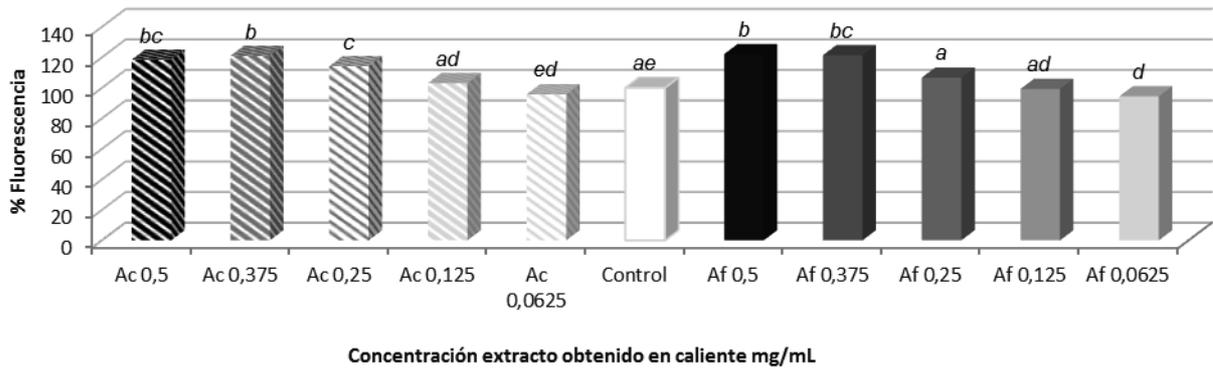


Figura 7

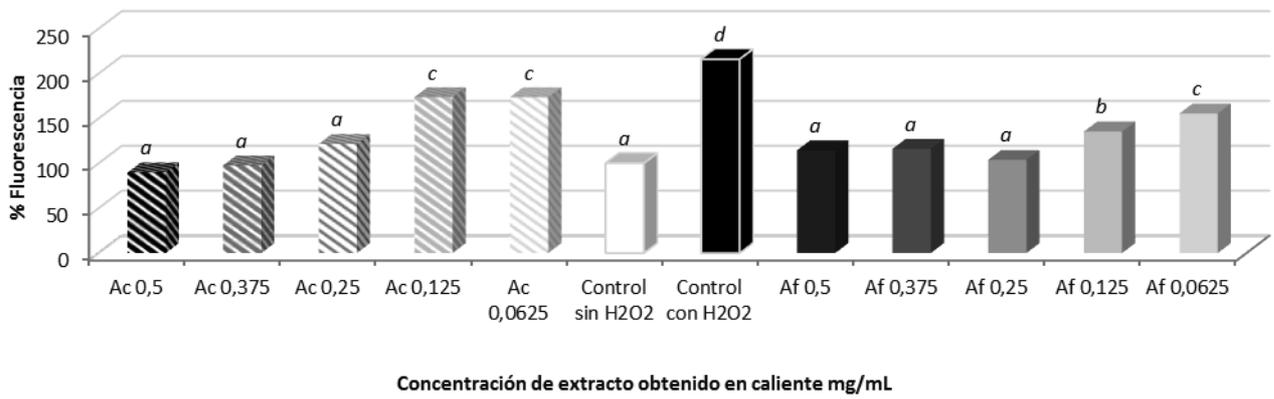


Figura 8

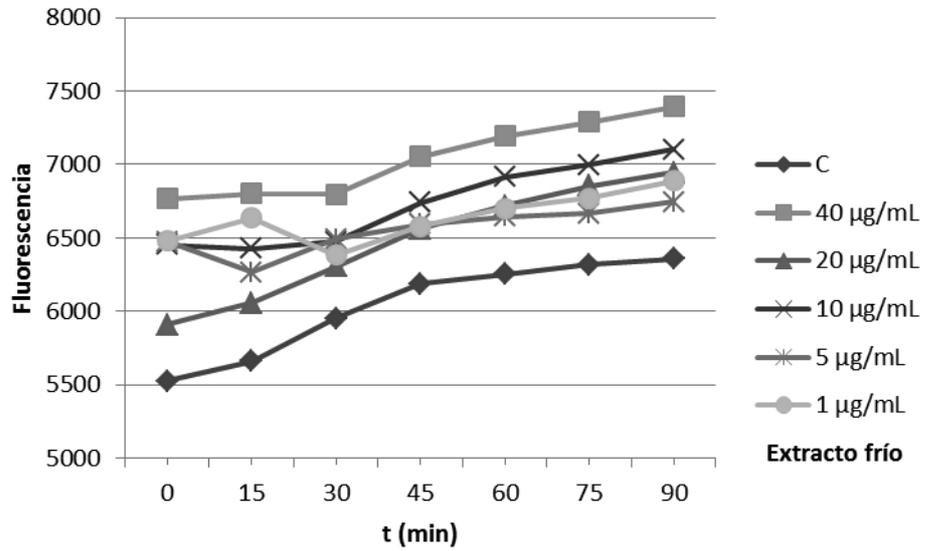


Figura 9

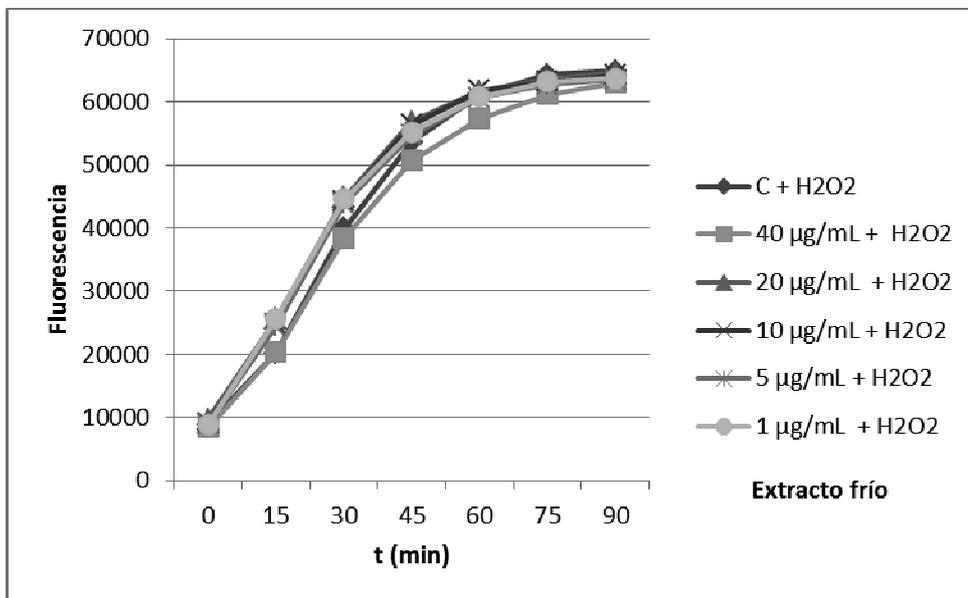
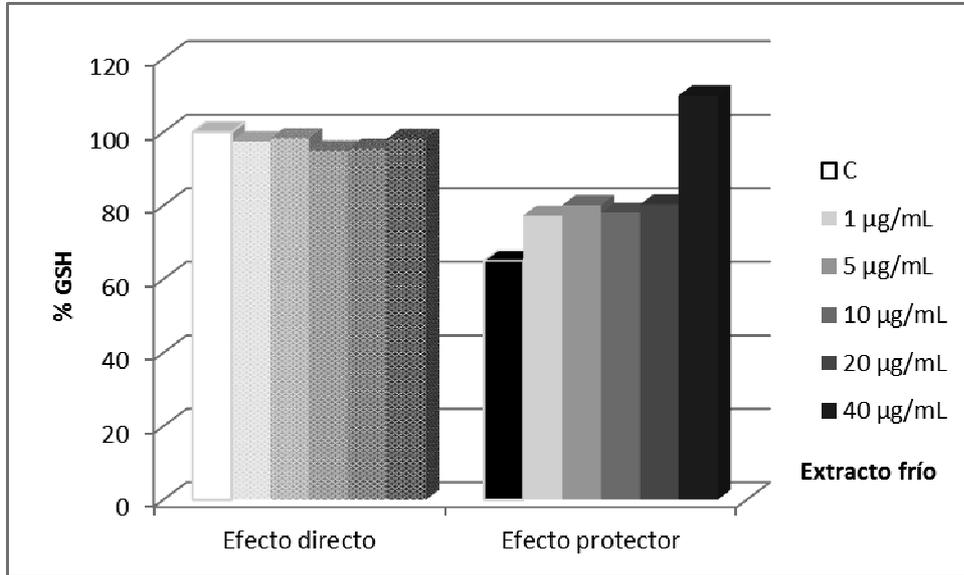


Figura 10



**Figura 11**



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA

- ②① N.º solicitud: 201630788  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 09.06.2016  
③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K8/97** (2017.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MONTORO PAOLA et al. Radical Scavenging Activity and LC-MS Metabolic Profiling of Petals, Stamens, and Flowers of <i>Crocus sativus</i> L. Journal of Food Science. 2012. VOL: 77 No: 8 Paginas: C893-C900 ISSN 0022-1147(print) ISSN 1750-3841(electronic) Doi: doi:10.1111/j.1750-3841.2012.02803.x, páginas 893 y 900	1
Y		7
Y	ZEKA KETI et al. Petals of <i>Crocus sativus</i> L. as a potential source of the antioxidants crocin and kaempferol. FITOTERAPIA. 2015. VOL: 107 Paginas: 128 - 134 ISSN 0367-326X Doi: doi:10.1016/j.fitote.2015.05.014, página 133	7
A	RIGHI VALERIA et al. <i>Crocus sativus</i> Petals: Waste or Valuable Resource? The Answer of High-Resolution and High-Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2015. VOL: 63 No: 38 Paginas: 8439-8444 ISSN 0021-8561(print) ISSN 1520-5118(electronic) Doi: doi:10.1021/acs.jafc.5b03284, resumen	1-7

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
10.03.2017

Examinador  
I. Rueda Molíns

Página  
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.03.2017

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-7	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 2-6	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1,7	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	MONTORO PAOLA et al. Radical Scavenging Activity and LC-MS Metabolic Profiling of Petals, Stamens, and Flowers of <i>Crocus sativus</i> L. Journal of FoodScience. VOL: 77 No: 8 Pags:	2012
D02	ZEKA KETI et al. Petals of <i>Crocus sativus</i> L. as a potential source of the antioxidants crocin and kaempferol. FITOTERAPIA.VOL: 107 Paginas: 128 – 134	2015

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de Marzo, de Patentes sobre novedad y actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo a esta declaración****NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (artículos 6 y 8 LP11/86)**Reivindicación 1

En el documento D01 se divulga (ver páginas 893 y 900) como pétalos y otros biorresiduos de *Crocus sativus* representan una fuente de compuestos fenólicos y flavonoides.

La diferencia entre el objeto de la reivindicación 1 y la información que se muestra en el documento D01 reside en los métodos empleados para la cuantificación de los compuestos fenólicos y flavonoides. Además en la reivindicación 1 también se cuantifica el contenido de antocianósidos.

El experto en la materia, a la vista del documento D01, y motivado por la idea de la cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides de otro modo, hubiera empleado métodos conocidos en el estado de la técnica para determinar este tipo de compuestos, como el método Folin-Ciocalteu, para la determinación de fenoles. Del mismo modo que para cuantificar el contenido en antocianósidos hubiera empleado procedimientos conocidos en el estado de la técnica, como el método del pH diferencial.

Por tanto la reivindicación 1 de la solicitud de patente presenta novedad pero carece de actividad inventiva (artículos 6 y 8 LP11/86).

Reivindicación 7

El documento D02 refleja (ver página 133) como los pétalos de *Crocus sativus* presentan diferentes compuestos con actividad antioxidante, como los flavonoides. Lo que hace que puedan resultar de interés para múltiples aplicaciones, como formulaciones cosméticas.

La reivindicación 7, que es dependiente de la reivindicación 1, reivindica el uso de extractos de biorresiduos del azafrán como principios activos de productos cosméticos antioxidantes. Por lo que, teniendo en cuenta la información divulgada en los documentos D01 y D02 la reivindicación 7 de la solicitud de patente presenta novedad, pero no actividad inventiva (artículos 6 y 8 LP11/86).

En conclusión, se considera que las reivindicaciones 1 y 7 de la solicitud de patente no satisfacen los requisitos de patentabilidad establecidos en el artículo 4 de la LP11/86.