

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER  
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN  
MÓDULO DE QUÍMICA ANALÍTICA

“ESTUDIO ANALÍTICO DE LOS COMPUESTOS  
FUNCIONALES DE UN EXTRACTO DE AZAFRÁN Y  
BIOACCESIBILIDAD TRAS SU DIGESTIÓN IN VITRO”

**Autor/a: Paula Almodóvar Hortelano**

**Tutor/a: Gema Paniagua González**

FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS ANALÍTICAS

Junio 2019

*Gracias a las personas que están en mi misma longitud de onda,  
sin ellas no habría sido posible lograrlo*

# ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>7</b>
<b>I. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.....</b>	<b>8</b>
<b>II. TRABAJO DE FIN DE MÁSTER.....</b>	<b>10</b>
1. INTRODUCCIÓN A LOS EXTRACTOS BOTÁNICOS.....	10
1.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO A PARTIR DE LA PLANTA .....	10
1.2. LEGISLACIÓN DE LOS EXTRACTOS BOTÁNICOS.....	16
2. AZAFRÁN ( <i>CROCUS SATIVUS</i> L.): DE LA PLANTA AL EXTRACTO .....	18
3. BENEFICIOS DEL CONSUMO DE EXTRACTO DE AZAFRÁN.....	22
3.1. DEPRESIÓN .....	22
3.2. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y PARKINSON.....	22
3.3. SALUD OCULAR.....	23
3.4. DIABETES MELLITUS .....	23
3.5. ATROSCLEROSIS.....	23
3.6. CÁNCER .....	24
3.7. DISFUNCIÓN SEXUAL .....	24
4. ABSORCIÓN, DISTRIBUCIÓN, METABOLISMO Y EXCRECIÓN (ADME) DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DEL AZAFRÁN.....	24
4.1. CROCINA Y CROCETINA .....	24
4.1.1. Absorción .....	24
4.1.2. Distribución.....	26
4.1.3. Metabolismo .....	27
4.1.4. Excreción.....	27
4.2. PICROCROCINA.....	28
4.2.1. Absorción .....	28
4.2.2. Excreción.....	28
4.3. SAFRANAL.....	28
4.3.1. Absorción .....	28
4.3.2. Distribución.....	28
4.3.3. Metabolismo .....	28
4.3.4. Excreción.....	29
4.4. KAEMPFEROL .....	29
4.4.1. Absorción .....	29
4.4.2. Distribución.....	30

4.4.3.	Metabolismo .....	30
4.4.4.	Excreción.....	30
5.	ÚLTIMOS ESTUDIOS DE LA FARMACOCINÉTICA DEL AZAFRÁN.....	31
<b>III.</b>	<b>PROYECTO DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>33</b>
1.	REACTIVOS Y MATERIALES.....	33
1.1.	<i>REACTIVOS Y DISOLVENTES .....</i>	<i>33</i>
1.2.	<i>MATERIALES DE REFERENCIA .....</i>	<i>33</i>
2.	PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.....	34
2.1.	<i>DIGESTIÓN IN VITRO .....</i>	<i>34</i>
2.1.1.	Digestión salivar .....	34
2.1.2.	Digestión gástrica.....	34
2.1.3.	Digestión intestinal .....	34
2.2.	<i>ANÁLISIS MEDIANTE HPLC-DAD/MS DE LOS EXTRACTOS DE AZAFRÁN DIGERIDOS .....</i>	<i>35</i>
2.3.	<i>EVALUACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DURANTE LA DIGESTIÓN.....</i>	<i>37</i>
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
3.1.	<i>IDENTIFICACIÓN HPLC-DAD/MS.....</i>	<i>37</i>
3.2.	<i>CUANTIFICACIÓN HPLC-DAD DE LOS PRINCIPALES COMPUESTOS BIOACTIVOS.....</i>	<i>45</i>
3.3.	<i>ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DURANTE LA DIGESTIÓN .....</i>	<i>52</i>
<b>IV.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>54</b>
<b>V.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>56</b>

## RESUMEN

En los últimos años, el consumo de complementos alimenticios a base de plantas ha aumentado debido a las propiedades beneficiosas que proporcionan. El desarrollo de estos productos también ha mejorado en la última década, analizándose los principios activos que contienen y controlando sus características fisicoquímicas.

Un ejemplo de esta clase de productos sería el extracto de azafrán, al cual se le atribuyen propiedades neuroprotectivas, anti-inflamatorias y antioxidantes entre otras. Los principales principios activos relacionados con dichas propiedades son los isómeros de crocina, el safranal, la picrocrocina y los derivados del kaempferol. Existen una gran cantidad de estudios que demuestran sus propiedades, sin embargo, muy pocos tratan sobre su transformación y metabolización durante el proceso digestivo. Por ello, en el presente trabajo se han estudiado los cambios en la composición de principios activos de un extracto de azafrán durante su digestión *In Vitro*. Finalmente, se ha podido demostrar que ciertos compuestos como los derivados del kaempferol no se ven afectados durante el proceso digestivo. Por el contrario, otros compuestos como los isómeros de crocina sí se ven afectados. Asimismo, existen otros casos, como la picrocrocina y el safranal cuya composición se ve influenciada de forma opuesta dependiendo de la etapa digestiva donde se encuentren dichos compuestos. Se puede concluir que, a pesar del distinto efecto del proceso digestivo en estos compuestos, todos ellos son capaces de alcanzar el intestino donde se produce la correspondiente absorción.

## I. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

La utilización de extractos vegetales por el hombre con fines curativos y para prevenir los daños ocasionados por plagas y enfermedades es una práctica muy utilizada desde la antigüedad.

Hoy en día las técnicas de extracción permiten obtener y concentrar los extractos botánicos para su utilización en diferentes aplicaciones dentro de la industria alimentaria, medicina, perfumería, etc. En el sector de la industria alimentaria este tipo de productos y compuestos ha experimentado una creciente aplicación, relacionada con las exigencias de los consumidores que buscan productos innovadores y con valor añadido (alimentos con bases naturales, propiedades beneficiosas para la salud, mayor tiempo de duración sin uso de aditivos químicos, etiquetas simplificadas con ingredientes en los que puedan confiar, etc.). Por otro lado, los extractos botánicos también han experimentado un creciente desarrollo en el campo de la *nutracéutica* debido a la funcionalidad característica y distintas aplicaciones terapéuticas (control de peso, bienestar, nutrición deportiva, gestión del estrés, etc.).

El creciente interés de los extractos botánicos en las últimas décadas ha aumentado el número de estudios científicos llevados a cabo para corroborar sus propiedades beneficiosas y la de sus compuestos bioactivos en una concentración determinada. Un ejemplo destacable es el caso del azafrán, cuyo consumo está relacionado con la mejora del estado de ánimo, la calidad del sueño, la actividad deportiva, etc. Las cualidades beneficiosas que el azafrán presenta son debidas a la presencia de una serie de compuestos bioactivos como es el caso de los isómeros de crocina (carotenoides), el safranal (aldehído volátil) o el kaempferol (flavonol) y cuya evidencia científica ha quedado demostrada en una gran cantidad de trabajos y publicaciones científicas. Sin embargo, pocos estudios se centran en el metabolismo de estos compuestos bioactivos durante la digestión, y menos aún en productos comerciales obtenidos a escala industrial. En base a todo lo expuesto anteriormente, estableceremos los objetivos de este trabajo para las dos partes que lo conforman, Trabajo Fin de Máster y Proyecto de Investigación.

Con respecto al **Trabajo Fin de Máster**, los objetivos principales que se han establecido son los siguientes:

- Realizar un estudio, desde un punto de vista general y teórico, de la importancia de los extractos botánicos, sus posibles aplicaciones y los métodos de obtención

del extracto a partir de la planta, así como de las técnicas de estandarización/titulación de los extractos botánicos. De forma más concreta, estudiar las características y propiedades del azafrán, producto objeto de estudio de este trabajo, así como los beneficios de su consumo. Por otro lado, revisar la legislación vigente aplicable, tanto a los extractos botánicos en general, como la relativa a la Denominación de Origen del producto azafrán.

- Realizar una búsqueda bibliográfica de los trabajos existentes hasta la actualidad relacionados con métodos de análisis para la determinación de los compuestos funcionales del azafrán. Para ello se estudiarán cuáles son los componentes bioactivos de un extracto de azafrán, cómo poder llevar a cabo su análisis y los estudios que hasta ahora se han realizado sobre su transformación durante su metabolización.

Referente al **Proyecto de Investigación** desarrollado en este trabajo, su objetivo general consistirá en el estudio de la transformación de los principales compuestos bioactivos de un extracto de azafrán comercial durante la digestión. Para la consecución de este objetivo principal, se llevan a cabo los siguientes objetivos específicos:

- Identificación y caracterización de los compuestos bioactivos del extracto de azafrán mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-DAD/MS).
- Simulación de la digestión *In Vitro* del producto, simulando condiciones de digestión bucal, gástrica y estomacal.
- Cuantificación de los principios activos del producto en cada una de las etapas de la digestión mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD).
- Análisis de capacidad antioxidante del producto en cada una de las etapas de la digestión.

## II. TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

### 1. INTRODUCCIÓN A LOS EXTRACTOS BOTÁNICOS

#### 1.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO A PARTIR DE LA PLANTA

El uso de plantas como medicina es la forma más antigua de cuidado de la salud que la humanidad ha usado en la historia. Los primeros humanos descubrieron que, para mantener un estilo de vida saludable, existía una dependencia hacia la naturaleza y, desde entonces, los humanos han dependido de la diversidad de los recursos vegetales para la alimentación, producción de ropa, refugio y como medicina para curar innumerables dolencias<sup>1</sup>.

Los remedios naturales o fitoterapia consisten en el uso de plantas o porciones de plantas en polvo o en formato de extracto, los cuales contienen numerosos constituyentes que actúan de manera sinérgica, y que son aplicados con un fin terapéutico<sup>2</sup>. Estos componentes pueden proceder de cualquier parte de la planta, pero principalmente se obtienen a partir de las hojas, raíces, semillas, corteza o de las flores. El momento de recolecta depende de qué parte de la materia prima sea la de interés<sup>3</sup> (ver **Tabla 1**).

**Tabla 1.** Época de cosecha recomendada según la parte de la planta de interés.

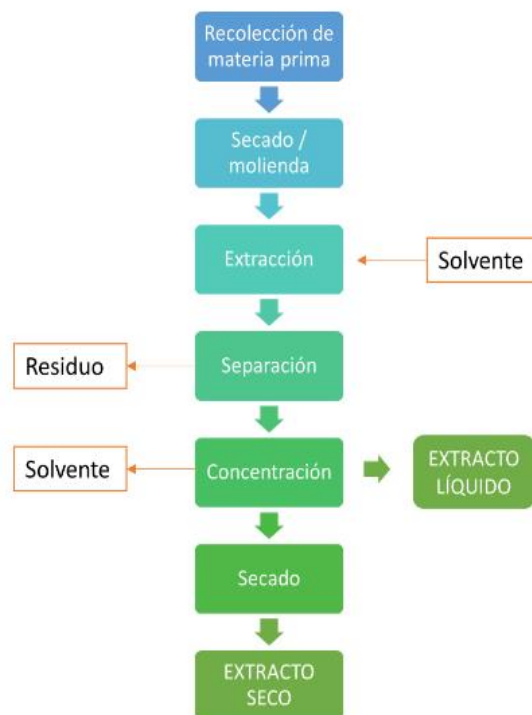
Parte de la planta	Época de cosecha o recolección
Hojas	Fase más activa de la fotosíntesis
Frutos	Cuando están totalmente desarrollados
Flores	Estado de botón floral
Raíces	Cuando están bien desarrolladas
Cortezas	En primavera, evitando períodos de lluvias intensas

Su consumo puede realizarse de múltiples maneras: en pastillas, cápsulas, masticables, líquido, inhalado o vehiculizado en cremas que se aplican de forma tópica. Estos productos contienen de forma natural una serie de compuestos, habitualmente se tratan de metabolitos secundarios, los cuales están relacionados con los beneficios



otorgados al consumo de estas plantas. Estos compuestos son conocidos como “ingredientes activos” o “principios activos” y su presencia y concentración depende de numerosos factores como por ejemplo la especie botánica, el tiempo y la estación de recolecta, la forma de preparación del producto, entre otros<sup>4</sup>. Con el fin de poder aislar y concentrar estos compuestos se desarrollaron los extractos de estas plantas, los cuales se obtienen mediante la separación de porciones biológicamente activas presentes en los tejidos de plantas, mediante el uso de un solvente (alcohol, agua, mezcla de estos u otro solvente selectivo) y llevándose a cabo un adecuado proceso de extracción. El procedimiento de obtención de un extracto vegetal se esquematiza en la **Figura 1**. En particular, los procesos de extracción se pueden clasificar en:

- **Maceración.** La materia prima (planta fresca, seca, en polvo, triturada, etc.) se mezcla con una cantidad de solvente suficiente en un tanque cerrado a temperatura ambiente durante 2-14 días hasta el agotamiento de la materia prima, utilizándose agitación o no.
- **Digestión.** La materia prima se mezcla con el solvente a una temperatura inferior a la temperatura de ebullición.
- **Decocción.** En este caso el solvente se encuentra a temperatura de ebullición junto con la materia prima.
- **Infusión.** Una vez que el solvente llega a ebullición se mezcla con la materia prima y se deja de aplicar calor.
- **Percolación o lixiviación.** Se mezcla la materia prima junto con el solvente hasta cubrir la capa de sólido. Posteriormente, el solvente se renueva de modo continuo manteniéndose un gradiente de concentración, el disolvente puro desplaza al que contiene la sustancia extraída sin ser necesario aplicar presión. La materia



**Figura 1.** Esquema de producción de un extracto vegetal.

prima residual es prensada y el fluido obtenido es combinado con el percolado para concentrar el extracto<sup>5</sup>.

La variabilidad de los constituyentes en los extractos realizados a base de plantas puede deberse a factores genéticos, culturales y medioambientales haciendo que el uso de éstos como medicamentos sea todo un reto. En primera instancia, la biodisponibilidad y calidad de la materia prima suele llevar asociada cierta problemática, ya que los principios activos son diversos y, en muchas ocasiones, desconocidos. Por ello, el control en cada lote es esencial para obtener siempre extractos de las mismas características<sup>6</sup>.

La **estandarización** de los extractos vegetales es el proceso de analizar diferentes principios activos característicos u otras propiedades de interés con el fin de que permanezcan constantes, definiendo de forma cualitativa y cuantitativa valores que aseguren la calidad, eficacia, seguridad y reproducibilidad del producto. Por tanto, antes de poder lanzar un producto al mercado es necesario el proceso de estudio y desarrollo para fijar dichos estándares técnicos. Los estándares específicos se elaboran mediante experimentación y observaciones, lo que llevaría al proceso de prescripción de un conjunto de características exhibidas por el extracto en particular. Por lo tanto, la estandarización es una herramienta en el proceso de control de calidad. Según la OMS<sup>7</sup>, la estandarización y el control de calidad de los extractos a base de plantas son los procesos involucrados en la evaluación fisicoquímica de aspectos característicos del producto, como la selección y manejo de la materia prima, la seguridad, eficacia y evaluación de la estabilidad del producto terminado, documentación de seguridad y riesgo basada en la experiencia, provisión de información del producto para el consumidor y promoción del producto. Normalmente se presta atención a índices de calidad tales como se muestran a continuación y que se recogen de forma resumida en **la Figura 2**:

- Examen macro y microscópico. Para la identificación de la variedad correcta y la búsqueda de adulterantes.
- Materia orgánica extraña. Implica la eliminación de la materia que no sea la planta de origen para obtener el extracto en forma pura.
- Valores de ceniza. Son criterios para juzgar la identidad y la pureza del extracto en bruto (ceniza total, ceniza sulfatada, ceniza soluble en agua y ceniza insoluble en ácido, etc.).

- Contenido de humedad. La verificación del contenido de humedad ayuda a reducir los errores en la estimación del peso real del material del producto. La baja humedad sugiere una mejor estabilidad contra la degradación del producto.
- Valores de ratio. Indican la cantidad de materia prima que se ha necesitado para realizar el extracto puro o nativo.
- Fibra bruta. Ayuda a determinar el componente del material leñoso, y es un criterio para juzgar la pureza del extracto.
- Evaluación química cualitativa. Cubre la identificación y caracterización de la materia prima con respecto al componente fitoquímico o extracto final. Emplea diferentes técnicas analíticas para detectar y aislar los constituyentes activos. Las técnicas de cribado fitoquímico incluyen la identificación botánica, extracción con solventes adecuados, purificación y caracterización de los componentes activos de importancia farmacéutica.
- Evaluación química cuantitativa. Estima la cantidad de las principales clases de constituyentes. Suelen ser los compuestos en los que finalmente se estandariza el producto y a los cuales se les otorga la actividad beneficiosa.
- Estudios toxicológicos. Ayudan a determinar los residuos de pesticidas, elementos potencialmente tóxicos. En el caso de los animales, son estudios de seguridad en animales como LD50 y el ensayo microbiano para establecer la ausencia o presencia de microorganismos potencialmente dañinos<sup>8</sup>.



**Figura 2.** Resumen de las analíticas realizadas para la estandarización de extractos botánicos. Modificación de Bijauliya y col., (2017)<sup>9</sup>.

Para la identificación y caracterización de estos extractos existen numerosas técnicas analíticas, entre las cuales caben destacar:

- **Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

Tanto la preparativa como la analítica son las más utilizadas en la industria farmacéutica para el aislamiento y purificación de compuestos procedentes de las plantas<sup>10</sup>. La frecuente aplicación de esta técnica analítica en el campo de la fitoterapia es debido a que presenta una gran resolución y sensibilidad además de ser una técnica rápida. Otra gran ventaja es que mediante HPLC se pueden analizar un gran abanico de compuestos bioactivos, pudiendo ser utilizada para una multitud de extractos procedentes de diferentes materias primas<sup>11</sup>. El único inconveniente que presenta es que en la mayoría de los casos es necesario el uso de patrones externos, por ello, su combinación con la espectrometría masas (LC/MS) es la solución técnica más versátil para el control de calidad de las hierbas medicinales<sup>12</sup>. También se empieza a ver un cambio de tendencia al uso de la cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC), ya que ofrece gran resolución y menor tiempo de análisis<sup>13</sup>.

- **Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC)**

Durante mucho tiempo, la técnica de cromatografía en capa fina (TLC) se ha utilizado como método de identificación para el análisis de plantas<sup>14</sup>. Con esta técnica, se ha conseguido demostrar la autenticidad de diferentes extractos, así como la evaluación de la estabilidad y consistencia de éstos en diferentes productos<sup>15</sup>. Por ello, en los últimos años se ha desarrollado la técnica HPTLC, que ha sustituido a las TLC tradicionales y la cual se utiliza ampliamente en la industria farmacéutica para la identificación y detección de adulterantes en los extractos. Entre sus usos también destaca el análisis del contenido en pesticidas, micotoxinas compuestos de baja o moderada polaridad y, en general, para el control de calidad de los productos realizados a base de plantas<sup>16</sup>.

- **Cromatografía líquida acoplada a masas (LC-MS)**

El método de LC-MS se ha convertido en la opción de muchas empresas para la primera caracterización del producto, debido a que permite identificar una gran variedad de compuestos en una matriz heterogénea como es un extracto vegetal<sup>17</sup>. El gran inconveniente que presenta es su elevado precio, por ello, suelen utilizarse únicamente para una primera caracterización del producto, pero no como analítica rutinaria<sup>18</sup>.

- **Combinación de cromatografía líquida y resonancia magnética nuclear (LC-NMR)**

Se trata de una técnica híbrida que combina dos técnicas analíticas. Es menos usada en la industria dada su complejidad y alto coste. Sin embargo, su rapidez y alta sensibilidad de detección hacen de ésta una técnica muy útil para el estudio de la farmacocinética o toxicidad de estos extractos<sup>19</sup>.

- **Cromatografía de gases (GC) y GC acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)**

Los instrumentos de cromatografía de gases acoplados a masas han sido utilizados para la identificación de un gran número de compuestos que se encuentran de forma natural en los sistemas biológicos<sup>20</sup>. Por ejemplo, es de gran utilidad a la hora de analizar compuestos volátiles en estos extractos, mediante la microextracción en fase sólida del espacio de cabeza<sup>21</sup>. Además, en la actualidad también se utiliza para la detección de residuos de pesticidas<sup>22</sup>. Esta técnica es ampliamente utilizada en fitoterapia para la estandarización de diferentes extractos botánicos<sup>23</sup>.

- **Cromatografía de fluidos supercríticos (SFC)**

La SFC permite la separación y determinación de los grupos de compuestos que no son posible de analizar por cromatografía líquida o de gases, aplicándose a una gran diversidad de productos, como extractos de plantas, alimentos, medicamentos o pesticidas<sup>24</sup>. Por ejemplo, permitió la resolución de componentes desconocidos y marcadores conocidos tales como Azadirachtin A y B, Salannin y Nimbin en extractos de semilla de Nimbo<sup>25</sup>.

- **Electroforesis capilar (CE)**

Se ha evaluado la importancia de la CE para el control de calidad de extractos botánicos<sup>26</sup>. Esta técnica ha sido utilizada en diversos estudios para el análisis de diferentes compuestos activos, como, por ejemplo, alcaloides<sup>27</sup> y flavonoides<sup>28</sup>, principios activos de gran uso en la industria. Además, han sido evaluadas su especificidad, sensibilidad y precisión en comparación con HPLC. Los resultados fueron muy similares entre ellos, obteniendo un menor tiempo de análisis y consumo de disolvente con CE. Se ha utilizado por ejemplo para el análisis de adulteración de extractos realizados a partir de *Radix sctellariae* o para el análisis de *Flos carthami* entre otros<sup>29</sup>.

En conclusión, la estandarización de los extractos a base de plantas comprende toda la Información y controles posibles para garantizar una composición constante de todos los lotes, incluyendo la caracterización analítica. Operaciones de identificación, búsqueda de marcadores y cuantificación de principios activos son básicos para este objetivo. El inconveniente actualmente es que no existe un modelo de control legal sobre medicamentos realizados a base de plantas. En cada país se definen plantas medicinales o productos derivados de ellos de diversas formas y adoptan diferentes enfoques para la concesión de licencias, dispensación, fabricación y comercialización para garantizar su seguridad, calidad y eficacia. La caracterización y conocimiento de estos productos es la base de comprensión de la autenticidad y control de calidad de los extractos botánicos.

## 1.2. LEGISLACIÓN DE LOS EXTRACTOS BOTÁNICOS

Los extractos botánicos podrían considerarse principios activos cuando pueden demostrar una indicación terapéutica, entonces, se les tratará como medicamento y se aplicará la legislación pertinente.

En el Real Decreto 1345/2007 del 11 octubre<sup>30</sup> se abrió un plazo para la adecuación como Medicamento Tradicional a base de Plantas (MTP) de aquellos productos que antes se comercializaban al amparo del registro especial de Plantas Medicinales de la citada Orden Ministerial, plazo que finalizó el 30 de abril de 2011. En la actualidad, sólo pueden denominarse medicamentos aquellos productos a base de plantas que hayan superado los estándares de calidad, eficacia, seguridad e información que se exige a los medicamentos.

La definición de medicamento viene establecida en el artículo 8.a de la Ley 29/2006 de 26 de julio<sup>31</sup>, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. Según esta Ley, medicamento de uso humano es «toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico».

El capítulo V de la anterior comentada “Ley de Garantías” se ocupa de una serie de medicamentos especiales, particularmente, en el artículo 51 se tratan las plantas medicinales, donde se establece:

- I. Las plantas y sus mezclas, así como los preparados obtenidos de plantas en forma de extractos, liofilizados, destilados, tinturas, cocimientos o cualquier otra preparación galénica que se presente con utilidad terapéutica, diagnóstica o preventiva seguirán el régimen de las fórmulas magistrales, preparados oficinales o medicamentos industriales, según proceda y con las especificidades que reglamentariamente se establezcan.
- II. El Ministerio de Sanidad y Consumo establecerá una lista de plantas cuya venta al público estará restringida o prohibida por razón de su toxicidad.
- III. Podrán venderse libremente al público las plantas tradicionalmente consideradas como medicinales y que se ofrezcan sin referencia a propiedades terapéuticas, diagnósticas o preventivas, quedando prohibida su venta ambulante.

Un producto botánico que no esté registrado como medicamento no podrá presentarse como principio activo y, por tanto, no podrá alegar propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades, siendo éste un factor diferencial de otros productos de consumo. Para poder llevar a cabo este registro hay que tener en cuenta el artículo 51 del Real Decreto 1345/2007, donde se indica que los medicamentos a base de plantas deben registrarse por el procedimiento simplificado, en el cual se establecen las siguientes condiciones:

- a. Que los medicamentos tengan indicaciones apropiadas exclusivamente para medicamentos tradicionales a base de plantas, que, por su composición y finalidad, estén destinados y concebidos para su utilización sin el control de un médico a efectos de diagnóstico, prescripción o seguimiento de un tratamiento.
- b. Que se administren siempre de acuerdo con una dosis o posología determinada.
- c. Que se trate de preparados para uso por vía oral, externo o por inhalación.
- d. Que haya transcurrido el periodo de uso tradicional, consistente en un periodo mínimo de treinta años, de los cuales al menos quince, se haya utilizado en la Unión Europea.
- e. Que la información sobre uso tradicional sea suficiente y en particular que el producto demuestre no ser nocivo en las condiciones de uso establecidas y la acción farmacológica o la eficacia del medicamento a base de plantas, se pueda deducir de la experiencia en la utilización tradicional.

Sin perjuicio de lo dispuesto en el artículo 2.28 del Real Decreto 1345/2007, un medicamento tradicional a base de plantas podrá contener vitaminas o minerales cuya



seguridad esté bien documentada podrá ser registrado de acuerdo con el artículo 50. En estos casos, la acción de las vitaminas y minerales ha de ser secundaria con respecto a las sustancias activas vegetales en lo referente a las indicaciones específicas autorizadas.

En resumen, las plantas medicinales podrán tener dos condiciones en función de su utilización:

- 1) **Medicamento de plantas medicinales**, si sus indicaciones terapéuticas, diagnósticas o preventivas son publicadas. Además, deberán de cumplir con la legislación referente a los medicamentos, siendo sólo su comercialización posible si la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios lo ha autorizado. Estos productos, al igual que el resto de medicamentos, sólo pueden comprarse en farmacias.
- 2) **Producto de plantas de venta libre**, no haciendo referencia a propiedades terapéuticas, siendo su comercialización como suplemento alimenticio o bajo otra denominación siempre y que no sea como medicamento.

## 2. AZAFRÁN (*CROCUS SATIVUS* L.): DE LA PLANTA AL EXTRACTO

*Crocus sativus* L. es una especie perenne de la familia de las Iridaceae, conocida como oro rojo por su alto valor, siendo la especie más cara que existe en la actualidad. El origen de la palabra azafrán proviene de la palabra francesa “safran”, que a su vez deriva de la palabra en latín “safranum” que significa amarillo<sup>32</sup>. Esta palabra queda lejos de parecerse a la utilizada originalmente en Oriente Medio, próximo de Zagros, donde se denominaba “karkum” y donde se ha documentado que se utilizaba con fines culinarios en el Imperio aqueménida<sup>33</sup>. El azafrán crece a partir de bulbos que se cultivan bajo tierra y de los cuales sale de entre una a siete flores de color morado y con tres estigmas de unos 25-30 mm cada una (ver **Figura 3**). Estos estigmas son los que tienen los compuestos bioactivos y de los que se obtiene lo que se denomina azafrán debido a su poder colorante.



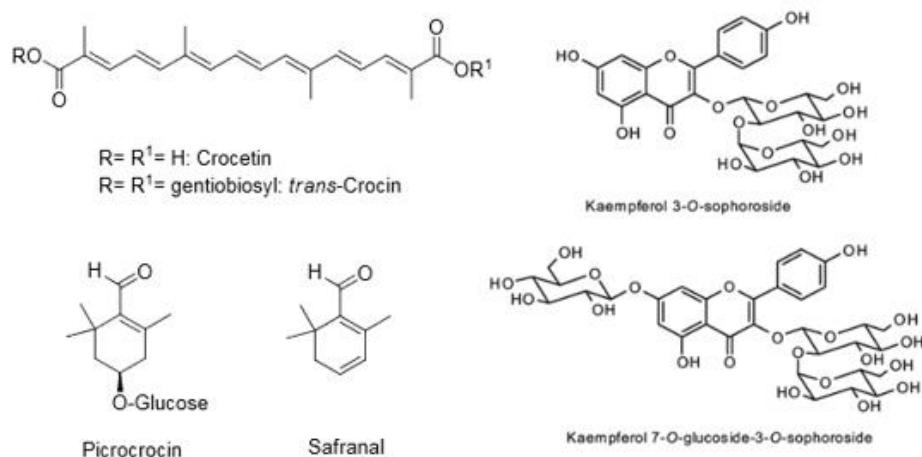


**Figura 3.** Flor de azafrán y sus estigmas secos.

*C. sativus* se cultiva y comercializa masivamente en Irán (Khorasan del Sur) y en la India (Jammu y Cachemira) siendo importantes economías agrícolas. En Irán comprende un área de 1,64 millones de km<sup>2</sup> aproximadamente y se encuentra en el norte, en la zona templada; siendo el 12% del área total cultivo únicamente de azafrán. La provincia nororiental de Khorasan Razavi exportó 57 toneladas de azafrán en 2010. Además de Irán, siendo una de las áreas más importantes para el cultivo, el este de Asia y países mediterráneos, que tienen un invierno frío y cálido verano especialmente con menos humedad, son adecuadas zonas para cultivo de azafrán; España, Italia, Grecia, India, Marruecos y Azerbaiyán son los mejores ejemplos<sup>34</sup>.

Con respecto a la obtención de lo que se conoce como azafrán, es importante saber que son necesarias unas 80000 flores para la obtención de un solo kilogramo de estigmas<sup>35</sup>. Teniendo en cuenta que posteriormente el estigma hay que secarlo, unos 200.000 estigmas secos sólo equivalen a medio kilogramo de producto final, de ahí su elevado precio<sup>36</sup>. Además de por sus características organolépticas, el azafrán ha sido utilizado en la medicina tradicional como sedativo, expectorante, anti-asmático, emenagogo y analgésico<sup>37</sup>.

Sus cualidades beneficiosas y organolépticas se deben a sus principios activos, entre los que se pueden destacar el contenido en crocinas y crocetas, compuestos carotenoides que dan el color a las hebras. Por otro lado, su flavor característico proviene principalmente del safranal, un carboxaldehído y compuesto volátil mayoritario de azafrán, el cual se produce por la deglicosilación de la picrocrocina, siendo ésta última responsable del sabor amargo. Además, tiene otros compuestos de interés biológico por su actividad antioxidante como son los derivados del kaempferol<sup>38</sup>. Sus estructuras químicas se muestran a continuación en la **Figura 4**:



**Figura 4.** Principales principios activos del azafrán.

En España, el cultivo de azafrán está bastante extendido y es de gran importancia. Tanto es así, que, además de poseer una denominación de origen de azafrán, DO azafrán de Castilla-La Mancha<sup>39</sup>, se han generado una serie de Reglamentos para garantizar la calidad del producto:

- Reglamentación Técnico-Sanitaria (BOE 1994).
- Norma de Calidad del Comercio Exterior del Azafrán (NCCE, 1988, julio de 1999).
- Especificación Técnica ISO 3632-1 y 2 (2011).
- Norma Española UNE 3632-1 y 2 (2012).
  - o Norma Española UNE 34802. Determinación por espectrofotometría UV-Vis de picrocrocina (2011).
  - o Norma Española UNE 34803. Determinación por UV-Vis de safranal (2011).
- Pliego de condiciones del “Azafrán de La Mancha” (1999).

Dentro de las normas anteriormente mencionadas, la ISO 3632-1 (2011) es de carácter internacional. En ella se establecen unos parámetros de medición del poder de coloración producido por la crocina, picrocrocina y safranal analizados por espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis), mediante la cual el azafrán puede ser clasificado en cuatro estándares de calidad, tal y como se muestra en la **Tabla 2**.

Las cuatro categorías del azafrán, en polvo o en hebras, fueron posteriormente reducidas a tres, en base al poder colorante únicamente a 440 nm (longitud de onda con la que se analiza el contenido en isómeros de crocina y las causantes del color), en los

valores anteriormente mencionados: 190, 150 y 100. La cuarta categoría fue eliminada porque una sustancia con un poder colorante de 80 unidades no se puede considerar azafrán. Además, en la última actualización se unificaron los criterios de “contenido máximo de cenizas no solubles” para las tres categorías y anuló las especificaciones relativas al nitrógeno y celulosa.

**Tabla 2.** Características químicas del azafrán según la ISO 3632-1 (2011).

<b>Características principales</b>	<b>Polvo de azafrán</b>	<b>Estigma de azafrán</b>
<b>Sustancias volátiles y contenido de humedad (porcentaje de masa)</b>	10	12
<b>Cenizas (porcentaje de masa) en peso seco</b>	8	8
<b>Cenizas insolubles en HCl (porcentaje de masa) e peso seco</b>		
Para Grados 1 y 2	1	1
Para Grados 3 y 4	1,5	1,5
<b>E 1% cm 257 mm en peso seco, min. (valor de absorción máximo de la picrocrocina)</b>		
Grado 1	70	70
Grado 2	55	55
Grado 3	40	40
Grado 4	30	30
<b>E 1% 1 cm 330 nm en peso seco (valor de absorción máximo del safranal)</b>	20 – 50	20 – 50
<b>Colorante E 1% 1 cm 440 en peso seco, min. (valor de absorción máximo de las crocinas)</b>		
Grado 1	190	190
Grado 2	150	150
Grado 3	110	110
Grado 4	80	80

Es importante definir las diferencias entre el consumo de hebras o de un extracto estandarizado con fines fitoterapéuticos. Como se ha explicado anteriormente, los exámenes de estandarización de estos últimos son mucho más similares que la simple caracterización y clasificación por el poder colorante que se establece en la Normativa ISO-3632 (2011). Esto se traduce en un control no sólo de los principios activos, lo cual permite definir una dosis adecuada, sino además, un control físico-químico y microbiológico<sup>40</sup>.

### 3. BENEFICIOS DEL CONSUMO DE EXTRACTO DE AZAFRÁN

#### 3.1. DEPRESIÓN

Varios ensayos clínicos han demostrado que diferentes extractos hidroalcohólicos de azafrán en una dosis diaria entre 20-30 mg son capaces de mejorar la depresión moderada, mejorando el estado de ánimo, reduciendo el estrés y la ansiedad, y mejorando la calidad de sueño<sup>41-43</sup>. También se ha utilizado con éxito un tratamiento con extracto de azafrán para paliar los síntomas depresivos encontrados en las mujeres postmenopáusicas sanas<sup>44</sup>.

Estos efectos antidepresivos se asocian a los niveles de safranal y crocinas que presentan los extractos de azafrán, ya que se ha observado como éstos son capaces de inhibir la recaptación de neurotransmisores como dopamina, serotonina (5-HT) y noradrenalina<sup>45,46</sup>, controlando algunos síntomas de la depresión. Además, la crocina es capaz de inhibir de manera no competitiva las monoamino oxidasas (MAO), inhibiendo la degradación de serotonina y dopamina y favoreciendo que estos neurotransmisores se encuentren más tiempo en el espacio intersináptico<sup>47</sup>.

#### 3.2. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y PARKINSON

Se ha probado varias veces los efectos del extracto de azafrán y sus componentes como tratamientos auxiliares para las enfermedades de Alzheimer y Parkinson<sup>48-51</sup>. Los efectos neuroprotectores del azafrán en estas enfermedades se asocian a la actividad inhibitoria de la actividad de la acetilcolinesterasa por la presencia de las crocinas, por lo que aumenta la concentración de acetilcolina en el espacio intersináptico promoviendo la activación de los receptores muscarínicos<sup>52</sup>, y por otro lado a la reducción de diferentes factores proinflamatorios y neurotóxicos<sup>53</sup>.

Por otra parte, en un ensayo clínico aleatorio a doble-ciego realizado por Akhondzadeh y col. (2010), se observó una mejora de las funciones cognitivas en el grupo tratado con extracto de azafrán respecto al placebo en pacientes con Alzheimer. Esto se asocia a las propiedades antioxidantes de los compuestos del estigma de azafrán que además tienen la capacidad de reducir la síntesis de las placas  $\beta$ -amiloides, reduciendo la progresión de la enfermedad<sup>49</sup>.

### 3.3. SALUD OCULAR

Debido a los múltiples efectos neuroprotectores en el sistema nervioso central asociados a las crocinas y la crocetina<sup>54,55</sup> se han estudiado los efectos del extracto de azafrán y su relación con la salud ocular.

En el ojo, la crocina aumenta de manera significativa el flujo sanguíneo en la retina, mejorando la oxigenación y el aporte de nutrientes a las diferentes estructuras que la forman<sup>56</sup>. Por otro lado, la crocetina es capaz de prevenir el daño producido en la retina tras un episodio isquémico debido a la reducción del estrés oxidativo que se ve aumentado en estos casos<sup>57</sup>, además de disminuir la expresión de factores proapoptóticos, como la caspasa-3 y la caspasa-9, protegiendo la retina del daño neuronal<sup>58</sup>.

Gracias a los descubrimientos de los efectos beneficiosos del extracto de azafrán en la retina, se realizaron con éxito estudios para observar el potencial terapéutico de estos compuestos en diferentes enfermedades oculares neurodegenerativas como la degeneración macular asociada a la edad<sup>59,60</sup>, el glaucoma<sup>61</sup> y la retinopatía diabética<sup>62</sup>.

### 3.4. DIABETES MELLITUS

Se han encontrado diferentes evidencias *In Vitro* e *In Vivo* sobre los posibles efectos beneficiosos del azafrán en la diabetes mellitus. El extracto de estigmas de azafrán es capaz de inhibir *In Vitro* la actividad enzimática de la  $\alpha$ -glucosidasa,  $\alpha$ -amilasa y las colinesterasas, disminuyendo la concentración de monosacáridos y disacáridos en la luz del intestino y así disminuyendo la cantidad de glucosa que es absorbida tras la comida, controlando sus niveles<sup>63</sup>. Además de estos efectos, la crocetina es capaz de aumentar la secreción de insulina de las células  $\beta$ -pancreáticas mientras que aumenta la sensibilidad a la misma en el tejido muscular esquelético, estimulando la captación de glucosa<sup>64</sup>.

### 3.5. ATEROSCLEROSIS

Diferentes estudios *In Vivo* han demostrado que el tratamiento con azafrán es capaz de producir la reducción de la presión sanguínea y de los niveles de colesterol circulante, por lo que mejora el curso clínico de la aterosclerosis y de la isquemia cardíaca<sup>65</sup>.

Por otra parte, la crocina es capaz de inhibir la recaptación de las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (ox-LDL), por lo que reduce la formación de las células espumosas que están implicadas en la formación de las placas de ateroma<sup>66</sup>.

### 3.6. CÁNCER

Hasta el momento no se ha realizado ningún ensayo clínico para evaluar los posibles efectos potenciales del azafrán en el cáncer, ni solo ni en asociación con terapias anticancerígenas convencionales. Basándose en datos preclínicos, tanto *In Vivo* como *In Vitro*, se ha visto que diferentes extractos de azafrán y sus principales componentes pueden tener efectos anticancerígenos, entre los que se encuentran diferentes efectos inhibitorios en células tumorales<sup>67,68</sup>.

Los efectos antitumorales del azafrán involucran diferentes mecanismos. Por un lado los componentes del azafrán pueden tener un efecto inhibitorio en la síntesis de ADN y ARN<sup>69</sup>, mientras que también se ha visto que pueden interactuar con el ciclo de replicación celular interactuando con la Topoisomerasa II<sup>70</sup>.

### 3.7. DISFUNCIÓN SEXUAL

Algunos tipos de disfunciones sexuales aparecen a causa de una depresión. Por este motivo, se han realizado estudios preclínicos y clínicos con azafrán para tratar la disfunción sexual en hombres y mujeres. Se ha comprobado que la administración de extracto de azafrán mejora algunos problemas sexuales inducidos por el tratamiento de la depresión con fluoxetina en mujeres, entre los que se encuentran la excitación y la lubricación<sup>71</sup>.

En lo referente a hombres, en cultivos de músculo liso se ha demostrado que las crocinas pueden inhibir el flujo de calcio extracelular, además de inhibir el flujo intracelular de calcio de los depósitos del retículo endoplásmico<sup>72</sup>, lo que contribuye a la relajación del cuerpo cavernoso con la consecuente erección<sup>73</sup>. Aunque existan datos preclínicos que corroboran la hipótesis, no se han encontrado resultados que demuestren la efectividad del azafrán para tratar la disfunción eréctil<sup>74</sup>.

## 4. ABSORCIÓN, DISTRIBUCIÓN, METABOLISMO Y EXCRECIÓN (ADME) DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DEL AZAFRÁN

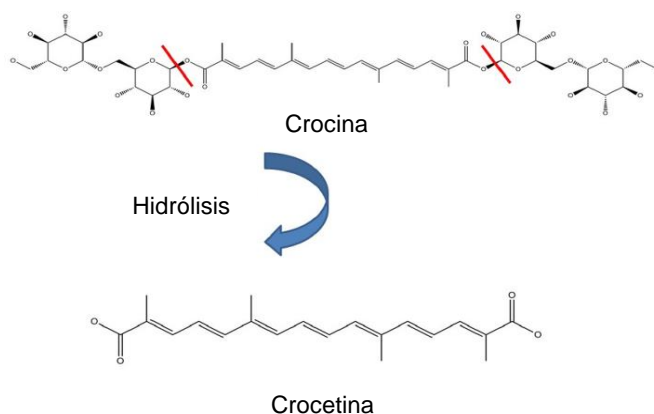
### 4.1. CROCINA Y CROCETINA

#### 4.1.1. Absorción

La absorción se define como el paso de una sustancia hacia el torrente sanguíneo. Según los datos obtenidos por Asai y col., (2005), la crocetina se produce por hidrólisis

de la crocina y de dos moléculas de gentobiosil como se observa en la **Figura 5**, siendo este compuesto, la crocetina, la forma metabolizada. Así pues, las crocinas tal cual, no pueden actuar como compuestos bioactivos<sup>75</sup>.

La absorción de la crocina mediante el tracto gastrointestinal es bastante baja, por lo que tras una administración oral de una determinada dosis baja de crocina prácticamente no se va a llegar a detectar en el plasma. Asimismo, repetidas dosis orales en ratas de crocina no producen al final una acumulación de las concentraciones de crocetina en el plasma comparado con la aplicación de una única dosis oral, lo que demuestra que la crocetina se elimina rápidamente, demostrando que el corto tiempo de vida media de dicho compuesto es corto. A pesar de ello, en este mismo estudio se observó que la crocetina se llegaba a mantener en el plasma a una concentración superior de los 50 ng/mL durante 10 horas, obteniendo un primer pico máximo de concentración a los 20 minutos y otro secundario a las 6 horas<sup>76</sup>. Esto es debido a que se ha observado que algunos componentes de origen vegetal como las isoflavonas son capaces de mostrar un patrón de absorción bifásico, el que se relaciona con un reciclaje enterohepático<sup>77</sup>, o que por otro lado un pico inicial aparece por la absorción del compuesto en el intestino delgado y el más tardío se debe a la absorción en el intestino grueso<sup>78</sup>.



**Figura 5.** Estructuras químicas de la hidrólisis de la crocina.

Se ha observado que el modelo farmacocinético que sigue la crocetina es de primer orden, donde su distribución es de manera monocompartmental, es decir, que se distribuye de igual forma por todo el organismo<sup>79</sup>. Además, debido a la rápida hidrolización de la crocina en el tracto gastrointestinal a crocetina, y su alta absorción en esta forma, las concentraciones de crocetina en sangre fueron similares tras una administración oral e intravenosa<sup>80</sup>.

Según los valores obtenidos por Mohammadpour y col., (2013), tras una administración de una única dosis oral de 16 mg de crocetina en una cápsula en voluntarios sanos el rango de concentración de crocetina estuvo entre 0,09-0,35

$\mu\text{g/mL}$ <sup>81</sup>. Con una administración de tres diferentes dosis de crocetina se demostró que la crocetina se absorbe rápidamente, y el tiempo que tarda en alcanzar la concentración máxima en sangre ( $T_{\text{max}}$ ) está entre las 4,0-4,8 horas, teniendo una concentración máxima ( $C_{\text{max}}$ ) de 100,9-279,7  $\text{ng/mL}$ <sup>82</sup>. Este valor de  $T_{\text{max}}$  se considera bastante bajo comparado con los obtenidos de estudios farmacocinéticos con otros carotenoides C40, como son el  $\beta$ -caroteno, la luteína y el licopeno, los cuales necesitan más tiempo para alcanzar su  $C_{\text{max}}$ <sup>83</sup>. Así, este valor de tiempo ( $T_{\text{max}}$ ) más bajo de la crocetina comparado con los otros carotenoides demuestra que es más rápidamente absorbida y detectada en plasma con más antelación.

Mediante cultivos *In Vitro* de enterocitos Caco-2 se evaluó el transporte de los ésteres de crocetinas con diferentes azúcares, los cuales a pesar de tener una bioaccesibilidad alta tuvieron un transporte bastante bajo, solamente alrededor de un 0,5% fue absorbido. Este valor fue 10 veces más bajo que el de la crocetina por si sola<sup>84</sup>.

#### **4.1.2. Distribución**

Varios estudios han demostrado como diferentes carotenoides son absorbidos por las células intestinales a través de difusión pasiva, como en el caso del colesterol y los ácidos grasos, para posteriormente ser transportados por el sistema linfático hasta el torrente sanguíneo<sup>85</sup>.

En el caso de la crocetina, es más hidrofílica que muchos de los carotenoides y además tiene un tamaño menor comparado con la luteína, el licopeno o el  $\beta$ -caroteno. Debido a esto, la crocetina tiene una velocidad de absorción más rápida que los otros carotenoides mencionados, pensando pues que su transporte al torrente sanguíneo se realiza desde la vena porta (vaso sanguíneo grueso que transporta la sangre desde el tracto gastrointestinal y el bazo hacia el hígado para que la metabolización de los nutrientes) y no mediante el sistema linfático<sup>75</sup>.

Una vez en el torrente sanguíneo la crocetina puede distribuirse por varios tejidos. Esta molécula es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que puede alcanzar el sistema nervioso central y ejercer diferentes efectos para tratar diferentes enfermedades neurológicas<sup>86</sup>. Se ha descubierto que la crocetina circula en la sangre unido a la albúmina, ocupando el sitio de unión de los ácidos grasos en dicha proteína<sup>86</sup>. Además, esta unión es bastante débil, por lo que la crocetina se distribuye a lo largo del cuerpo en todos los tejidos de manera bastante rápida<sup>87</sup>, aunque su unión se inicia a concentraciones muy bajas<sup>88</sup>.



### **4.1.3. Metabolismo**

El metabolismo de la crocetina se produce en dos regiones del cuerpo, por un lado, se da en la mucosa intestinal, donde se produce su absorción y por otro en el hígado tras ella, donde se conjugaría con una o dos moléculas de glucorónido<sup>75</sup>. La glucoronización es una ruta metabólica importante ya que influencia bastante la distribución y la excreción de los diferentes compuestos activos, o incluso llega a formar metabolitos que tienen una bioactividad aún más potente que el compuesto original<sup>89</sup>. Los conjugados de crocetina-glucorónido se mantienen en el plasma sanguíneo más de 8 horas después de una administración de crocinas o crocetas<sup>75</sup>.

Una fracción de estos complejos se consideran restos metabólicos que irán a ser excretados en la bilis o en la orina, ya que mayoritariamente la glucoronización se considera un proceso por parte del cuerpo para aumentar la solubilidad en agua de los xenobióticos y así favorecer su eliminación<sup>90</sup>. En cambio, la gran parte de los glucorónidos de crocetina actúan por sí solos como moléculas bioactivas, y además transportan la crocetina a los tejidos diana<sup>75</sup>. La rápida absorción y glucoronización de la crocetina indican que su destino metabólico es bastante diferente del resto de carotenoides C40<sup>91</sup>.

De manera contraria a la administración oral, cuando la crocina es administrada de manera intravenosa, los niveles de crocetina son muy bajos en plasma. Esto demuestra que el principal punto de conversión de crocina a crocetina es el tracto gastrointestinal<sup>92</sup>. Ahí las diferentes crocinas se deglicosilan en las células epiteliales como resultado de procesos enzimáticos, mientras que una menor fracción se deglicosila por parte del microbioma fecal mediante la  $\beta$ -glucosidasa<sup>88</sup>. Algunas de las enzimas involucradas en la hidrólisis de las crocinas son la glucosidasa en los enterocitos (células epiteliales del intestino encargadas de la absorción de diversos nutrientes esenciales y del transporte de agua y electrolitos al interior del organismo) y la lactasa floricina hidrolasa que cataliza la hidrólisis extracelular de algunos compuestos glicosilados<sup>88</sup>.

### **4.1.4. Excreción**

La gran mayoría de las crocinas se excretan a través de las heces tras una administración oral<sup>75,93</sup>. Prácticamente no se llegan a excretar por la orina, donde no se ha podido detectar la presencia de crocina o derivados 24 horas después de su consumo<sup>76</sup>.

## 4.2. PICROCROCINA

### 4.2.1. Absorción

Mediante cultivos *In Vitro* de enterocitos Caco-2 se evaluó el transporte de la picrocrocina a través de este epitelio intestinal. Se observó que por muy alta que fuese la concentración de picrocrocina no se llegó a detectar en el lado basolateral<sup>84</sup>. Esto puede ser debido a que la presencia de un azúcar en la estructura de esta molécula complica la difusión pasiva del propio compuesto, disminuyendo su afinidad a las membranas celulares<sup>94</sup>. Así, muchos estudios han demostrado que es necesaria una hidrólisis mediante enzimas digestivas o por la propia microflora intestinal para que diferentes glucósidos o compuestos fenólicos puedan ser absorbidos dada su complejidad estructural, como en el caso de la crocina<sup>84</sup>.

### 4.2.2. Excreción

Como se ha mencionado previamente, la picrocrocina no puede llegar a ser absorbida por los enterocitos, por lo que esta queda en la luz intestinal a no ser que parte de ella llegue a ser digerida por la microflora intestinal. Por lo tanto, la gran mayoría será excretada por las heces sin sufrir ningún cambio<sup>94</sup>.

## 4.3. SAFRANAL

### 4.3.1. Absorción

A diferencia de la picrocrocina, una vez esta ha sido degradada por calor a safranal durante el tratamiento de las hebras sí que puede ser absorbida por los enterocitos, aunque su complicada estructura en forma de terpeno monoaldehído complica mucho su absorción, produciendo que su biodisponibilidad sea bastante baja<sup>95</sup>.

### 4.3.2. Distribución

Una vez el safranal alcanza el torrente sanguíneo, éste se une fuertemente a la albúmina mediante interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno, por lo que su liberación en los órganos diana es más complicada, perdurando más tiempo en el torrente sanguíneo. Esta interacción se produce en el sitio de unión de Sudlow, el cual se localiza en el subdominio IIA de la albúmina<sup>96</sup>.

### 4.3.3. Metabolismo

Hasta el momento no hay muchos estudios realizados sobre la farmacocinética del safranal, por lo que el metabolismo del mismo no ha sido descrito.

Teniendo en cuenta su estructura, los terpenos suelen sufrir ciertas modificaciones en ésta a lo largo de su permanencia en el organismo. Estos pueden ser oxidados para hacerlos más solubles y así poder viajar por el torrente sanguíneo con más facilidad, mientras que en la gran mayoría de estos compuestos se produce como metabolismo de fase II la glucoronización del compuesto, el cual suele tener como destino la orina para su eliminación<sup>97</sup>.

#### **4.3.4. Excreción**

Una pequeña parte de los terpenos volátiles como el safranal se eliminan por las heces sin modificar al no ser absorbidos, pero la gran mayoría de ellos se eliminan por la orina en su forma conjugada con glucurónido. Además, algunos de ellos tienen un retraso en su eliminación debido a una circulación enterohepática, es decir aquella que se refiere principalmente al proceso de secreción y reabsorción de las sales biliares desde el hígado hacia el intestino y viceversa, alargando su presencia en el organismo<sup>97</sup>.

### **4.4. KAEMPFEROL**

#### **4.4.1. Absorción**

El kaempferol en el estigma del azafrán (*Crocus sativus* L.) se encuentra en forma de diglucósido de kaempferol<sup>98</sup>, por lo que, según los datos obtenidos por DuPont y col., (2004), requerirá por acción de la microflora ser hidrolizado anteriormente para poder absorber la forma aglicona mediante la  $\beta$ -galactosidasa<sup>99</sup>. Una vez que el kaempferol se encuentra en su forma libre, se ha observado que entre un 66 – 86% de este es capaz de ser absorbido por los enterocitos y pasar a la circulación portal<sup>100</sup>. El pico de tiempo máximo de absorción de kaempferol ( $T_{max}$ ) se encuentra a las 5,8 horas, coincidiendo con el paso del compuesto en la sección más distal del intestino delgado, prácticamente ya en el colon, debido a que ahí se encuentra la flora bacteriana intestinal que se encarga de hidrolizar los glucósidos de kaempferol a la forma aglicona<sup>99</sup>.

De una forma mucho menos común, los glucósidos de kaempferol pueden ser absorbidos mediante transporte activo en el intestino delgado, ya que debido a su compleja estructura, al ser tan hidrofílico y encontrarse ionizado a pH del intestino delgado, no se puede absorber por difusión pasiva a través de la membrana de los enterocitos<sup>99</sup>.

#### **4.4.2. Distribución**

Una vez que el kaempferol alcanza el torrente sanguíneo es capaz de interaccionar con la albúmina mediante interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno para unirse fuertemente a ella mediante el punto de unión II<sup>101,102</sup>. Así, el kaempferol se distribuye lentamente a lo largo del organismo permaneciendo más tiempo en el torrente sanguíneo.

Se ha observado que este compuesto es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, barrera permeable altamente selectiva que separa la sangre del fluido extracelular cerebral en el sistema nervioso central (SNC), distribuyéndose por el sistema nervioso central con cierta preferencia por el hipocampo, el cerebelo y el córtex prefrontal<sup>103</sup>.

#### **4.4.3. Metabolismo**

Según los datos de metabolismo *In Vitro* realizados por Barve y col., (2009), el kaempferol sufre un ratio de glucoronización como metabolismo secundario de una manera mucho más alta que metabolismos oxidativos de Fase 1, fase que engloba todas las reacciones sobre xenobióticos que impliquen el aumento de la solubilidad en sangre<sup>104</sup>. Así, gran parte del kaempferol que pasa a la circulación portal (flujo de sangre venosa desde los órganos gastrointestinales y del bazo al hígado antes de regresar al corazón) tras ser absorbido sufre una glucoronización directamente al llegar al hígado, el cual puede ser distribuido por el resto de los órganos o más adelante ser destinado a la excreción<sup>104</sup>.

Además, se ha observado que hay una recirculación enterohepática bastante grande, formando un segundo pico de concentración de kaempferol que vuelve al torrente sanguíneo tras volver a pasar a su forma aglicona en el intestino y ser reabsorbido<sup>99</sup>.

#### **4.4.4. Excreción**

El kaempferol es excretado en sus formas conjugadas, mayoritariamente una vez ha sufrido la glucoronización, tanto por la orina como por la bilis<sup>104</sup>.

## 5. ÚLTIMOS ESTUDIOS DE LA FARMACOCINÉTICA DEL AZAFRÁN

Hasta la fecha no hay ningún estudio farmacocinético realizado en humanos con un extracto de azafrán comercial, únicamente puede encontrarse en bibliografía un trabajo sobre la farmacocinética de la crocetina, cuando ésta es administrada de forma pura en pacientes sanos<sup>82</sup>.

Sobre el extracto comercial de estigmas de azafrán utilizado, affron<sup>®42</sup>, utilizado como material de referencia para los estudios en el Proyecto de Investigación llevado a cabo en este trabajo, se elaboró una comunicación presentada en el que se estudia la farmacocinética de la crocetina tras la administración de este extracto de azafrán a pacientes sanos<sup>105</sup>.

Como puede observarse en los valores recopilados para los distintos parámetros farmacocinéticos de la crocetina recogidos en la **Tabla 3**, hay bastantes diferencias en lo que respecta a los valores de  $T_{max}$ . En el estudio de Umigai y col., (2011) se obtuvieron unos valores cercanos a 5 horas, para los tres niveles de crocetina suministrados mientras que, en el estudio realizado por Almodóvar y col., (2019) los valores conseguidos estaban entre 1 y 1,5 horas. Esta diferencia de prácticamente 4 horas puede ser explicada debido a la manera en la que se encontraba la crocina o crocetina en la forma administrada. Mientras que en el primer estudio se administra crocetina en estado puro, en el segundo se encuentra mayoritariamente en forma de crocina en un extracto de azafrán. Así, en el extracto ésta debe de ser hidrolizada para liberar la crocetina, la cual será absorbida por los enterocitos y llevada al sistema portal. El retraso en la aparición del pico de concentración máxima puede ser debido a que los isómeros de crocina presentes en el extracto de azafrán son bastante más hidrosolubles que la crocetina pura, ya que presentan unos azúcares en su estructura, facilitando su disolución en agua y haciendo que estén más bioaccesibles para su hidrólisis y absorción<sup>106</sup>.

**Tabla 3.** Parámetros farmacocinéticos de la crocetina en el estudio de Umigai y col., (2011)<sup>82</sup> y Almodóvar y col., (2019)<sup>105</sup>.

Parámetros	Umigai N. y col. (2011)			Almodóvar P. y col. (2019)	
	crocetina 7,5 mg	crocetina 15 mg	crocetina 22,5 mg	56 mg EA (1.96mg crocina)	84 mg EA (2.94mg crocina)
<b>T<sub>max</sub> (h)</b>	4,8 ± 1,0	4,9 ± 0,9	4,6 ± 1,0	1,0 ± 0,5	1,5 ± 0,5
<b>C<sub>max</sub> (µg/mL)</b>	0,10 ± 0,05	0,20 ± 0,05	0,27 ± 0,10	0,16 ± 0,23	0,46 ± 0,24
<b>AUC<sub>(0-∞)</sub> (h µg/mL)</b>	0,67 ± 0,42	1,13 ± 0,21	1,84 ± 0,40	10,34 ± 2,11	21,14 ± 4,23

EA = Extracto de azafrán; T<sub>max</sub> = Tiempo para la concentración máxima; C<sub>max</sub> = Concentración máxima; AUC = Área bajo la curva.

Los resultados obtenidos en el trabajo presentado por Almodóvar y col., (2019)<sup>124</sup> demuestran que se obtienen niveles superiores de crocetina en sangre con extracto de azafrán (crocinas) en comparación con la crocetina pura, siendo este resultado determinante para establecer la importancia de la necesidad de desarrollar estudios que permitiesen conocer y establecer el mecanismo a través del cual se pueda explicar por qué los niveles de crocetina aumentan con el consumo de un extracto de azafrán. Con este objetivo, y como ya se ha mencionado anteriormente en el **Apartado I “Objetivos y justificación del trabajo”**, se decidieron realizar estudios relativos a la digestión *In Vitro* con este mismo extracto de azafrán.

### III. PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

#### 1. REACTIVOS Y MATERIALES

##### 1.1. REACTIVOS Y DISOLVENTES

Los reactivos para llevar a cabo la digestión *In Vitro* fueron adquiridos en diferentes casas comerciales. El hidróxido sódico (NaOH) fue comprado a la casa comercial Symta (Madrid, España). El ácido clorhídrico (HCl) y el bicarbonato sódico (NaHCO<sub>3</sub>) fue adquirido en Merck (Madrid, España). Las enzimas digestivas α-amilasa (E.C. 232-565-6), pepsina (E.C. 232.629.3), pancreatina (E.C. 232-468-9) y el extracto de bilis (E.C. 232-369-0) fueron adquiridos en Merck (Madrid, España).

Para el análisis de capacidad antioxidante por 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) se compró reactivo DPPH a Merck (Madrid, España). El etanol, de calidad analítica, se adquirió en VWR (Barcelona, España).

Los disolventes necesarios para el análisis por HPLC-DAD/MS (acetonitrilo (ACN), metanol (MeOH) y ácido trifluoroacético (TFA)) son de la casa comercial VWR (Barcelona, España). El patrón de safranal, crocetina y *p*-nitroanilina fueron comprados a Merck (Madrid, España). El patrón de kaempferol, por otro lado, fue adquirido en Extrasynthese (Genay, Francia) y el de crocina (*trans*-crocina 4) en Phytolab (Vestenbergsgreuth, Alemania).

El agua MiliQ necesaria fue obtenida mediante el sistema de purificación de la marca Millipore, conectado a un dispensador remoto de la misma marca y modelo Q-POD.

##### 1.2. MATERIALES DE REFERENCIA

El extracto comercial de estigmas de azafrán (*Crocus sativus* L.) affron® fue proporcionado por Pharmactive Biotech Products, S.L. Este extracto está estandarizado en un contenido superior al 3,5 % en Lepticrosalides®, los cuales hacen referencia a la suma de dos compuestos bioactivos del azafrán, safranal e isómeros de crocina<sup>41,42</sup>.

## 2. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

### 2.1. DIGESTIÓN *IN VITRO*

La digestión *In Vitro* se llevó a cabo de manera “abiótica”, es decir, sin presencia de microbiota y siguiendo el protocolo establecido por Hollebeeck y col., (2013)<sup>107</sup>. Esta digestión *In Vitro* consistía en tres pasos o fases:

#### 2.1.1. Digestión salivar

Se disolvió 1 gramo de muestra en 10 mL de agua MiliQ y posteriormente se ajustó el pH de la disolución a 6,9 con 1300 mL de NaOH 1 M. A esta disolución se le añadieron 3,9 unidades de  $\alpha$ -amilasa por mL y se incubó a 37°C durante 5 minutos bajo condiciones aeróbicas. Posteriormente, se llevó a 90°C durante 3 minutos con el fin de desactivar las enzimas presentes. Esta etapa se llevó a cabo con seis muestras, dos de las cuales fueron centrifugadas a 7000 rpm durante 40 minutos a 4°C. La fracción soluble se congeló (-20°C) para su posterior análisis, mientras que las cuatro restantes fueron sometidas a la siguiente etapa.

#### 2.1.2. Digestión gástrica

Las muestras obtenidas en la anterior fase se ajustaron a un pH 2 con 450 mL de HCl 0,1 M, posteriormente se añadieron 71,2 unidades de pepsina por mL. Esta disolución se incubó a 37°C durante 90 minutos en condiciones anaeróbicas. Al igual que en la etapa anterior, tras la incubación la disolución resultante se sometió a 90°C durante 3 minutos. De las cuatro muestras resultantes, dos de ellas se centrifugaron y congelaron (bajo las mismas condiciones de la etapa de digestión salivar) y las otras dos se utilizaron para realizar la última etapa.

#### 2.1.3. Digestión intestinal

Para simular las condiciones intestinales, el pH de las muestras se ajustó a pH 7 mediante la adición de 1200 mL de NaHCO<sub>3</sub>, posteriormente se adicionaron 9,2 mg de pancreatina y 55,2 mg de extracto de bilis y, bajo condiciones anaeróbicas, se incubó a 37°C durante 150 minutos. Como en las etapas anteriores, con el fin de su posterior análisis, las muestras fueron centrifugadas y la fracción soluble congelada (-20°C).



## 2.2. ANÁLISIS MEDIANTE HPLC-DAD/MS DE LOS EXTRACTOS DE AZAFRÁN DIGERIDOS

El análisis de las muestras de extracto de azafrán digeridas y previamente sin digerir se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Los principios activos que se tuvieron en cuenta a la hora de analizar fueron safranal, kaempferol diglucósido, isómeros de crocinas, y picocrocina que se analizarán mediante el método propuesto por Kell y col., (2017)<sup>42</sup>. La separación y cuantificación de dichos compuestos se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo Agilent Technologies 1220 Infinity con un detector de luz de haz de diodos (DAD); mientras que la identificación se realizó mediante espectrometría de masas usando un Agilent series 1100 HPLC acoplado a un detector de masas cuadrupolo (Hewlett-Packard, series 1100 MSD) con ionización por electrospray (ESI). Las muestras inyectadas fueron separadas mediante una columna Luna C18 (4,6 X 250 nm, 5µm) empleando como fases móviles (A) Agua:ACN (85:15) y (B) 100 % metanol con un flujo de 1 mL/min. El gradiente de elución aplicado fue: 10 % fase B inicialmente; 100 % fase B después de 60 min y vuelta a las condiciones iniciales en otros 10 min, las cuales se mantienen durante 1 min. La duración del método es de un total de 71 minutos, posteriormente, el equipo se mantiene en condiciones iniciales otros dos minutos con el fin de estabilizar la columna.

Los espectros de las moléculas se registraron en un rango de 200-500 nm de longitud de onda mientras que los cromatogramas quedaron registrados a 250 nm para la cuantificación de la picocrocina; a 265 nm para la cuantificación de kaempferol diglucósido; a 310 nm para la cuantificación de safranal; y a 440 nm para cuantificar todos los isómeros de crocina así como la *trans*-crocina-4.

Los datos de espectrometría de masas fueron registrados en modo positivo y negativo. Las condiciones de ionización fueron ajustadas a 2000 V tanto para la tensión capilar como para la de carga. La presión del nebulizador fue de 40 psi y el flujo del nitrógeno de 10 L/min. La temperatura de secado del gas era de 340°C y la temperatura de vaporación de 150°C. La monitorización del rango de masas se estableció para una relación masa/carga ( $m/z$ ) desde 50 hasta 1500.

Para la preparación de la muestra se pesaron aproximadamente 40 mg (tanto de la muestra sin digerir como de las muestras digeridas) y se disolvieron en metanol:agua 50:50 v/v en un matraz de 10 mL preservando las disoluciones de la exposición a la luz. Seguidamente, las muestras se homogenizan en vortex y sonicán mediante ultrasonidos

durante 5 min para, finalmente, ser filtradas con un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  a viales ámbar previamente etiquetados.

La preparación de la recta de calibrado de crocina se llevó a cabo pesándose 5 mg de *trans*-crocina-4 estándar y disolviéndose en 10 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O (50:50, v/v). Para lograr la completa disolución del patrón se homogenizó mediante Vortex y ultrasonidos durante 5 minutos. En todo momento, la disolución fue protegida de la luz y sobrecalentamiento. Así, se obtuvo una disolución madre o concentrada de aproximadamente 500 ppm a partir de la cual se preparó cuatro disoluciones patrón de 250, 100, 50 y 25 ppm. Teniendo en cuenta el peso exacto y la riqueza, la recta de calibrado se realizó finalmente para concentraciones de 227,0; 90,8; 45,4 y 22,7 ppm.

El procedimiento para obtener el resto de las rectas de calibrado de los diferentes compuestos sigue las pautas detalladas en la preparación anterior, ajustando la concentración de las alícuotas de la recta de calibrado a la concentración de la muestra. Para la recta de calibrado de safranal se utilizaron las concentraciones de 0,24; 0,48; 0,96 y 4,81 ppm. Para la cuantificación de kaempferol diglucósido se utilizó kaempferol en concentraciones de 6,9; 13,8; 34,6; 69,2 y 138,3 ppm. Finalmente, para la cuantificación de picrocricina se utilizó como patrón *p*-nitroanilina<sup>108</sup> en concentraciones de 39 ppm, 97,5 ppm 195 ppm y 390 ppm. En todos los casos se tuvo en cuenta la pureza real del patrón y el peso exacto obtenido.

La crocetina no es posible de analizar por el método anterior. Su análisis se llevó a cabo mediante el método establecido por Umigai y col., (2011)<sup>109</sup>. Para ello, se realizó una recta patrón con un estándar externo de crocetina. El equipo HPLC utilizado y la columna fueron los mismos que en el método anterior, aunque en este caso no se realizaron análisis de masas, la identificación se hizo teniendo en cuenta el tiempo de retención y coincidencia de espectro en relación con el patrón utilizado. Las fases móviles utilizadas fueron 0,025 % (v/v) TFA en agua como fase A y MeOH:Fase A (9:1) como fase B. El gradiente consistió en 25 % de fase B al comienzo llegando a 100 % de ésta en 10 min, manteniéndose estas condiciones durante 5 min y, posteriormente, se volvió a las condiciones iniciales en 5 min. Por tanto, el tiempo total del programa fue de un total de 22 minutos con un flujo de 1mL/min, que se mantuvo constante durante todo el análisis. Para el acondicionamiento del equipo, las condiciones iniciales se mantuvieron 2 min. Los espectros de los picos obtenidos se registraron en un intervalo de longitud de onda de 200–550 nm para poder realizar la identificación; mientras que el cromatograma se registró a 430 nm para la cuantificación. La recta de calibrado se

preparó en concentraciones de 0,47; 0,93; 2,33; 4,67 y 9,33 ppm, teniendo en cuenta el peso real y pureza del patrón.

Todos los parámetros de digestión obtenidos fueron tratados usando el programa estadístico GraphPad Prim 7.

### 2.3. EVALUACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DURANTE LA DIGESTIÓN

El análisis de la capacidad antioxidante del extracto en cada una de las etapas de la digestión *In Vitro* se realizó mediante el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) establecido por Karimi y col., (2010)<sup>110</sup>. Para ello, se prepararon disoluciones en agua de cada una de las muestras con una concentración de 500 ppm. Posteriormente, 150 microlitros de cada una de las disoluciones se hicieron reaccionar con 50 microlitros de una disolución 0,1 mM de DPPH. Finalmente, se dejó reaccionar durante media hora y se midió cada una de las muestras con sus respectivos blancos. Para realizar el cálculo del % de inhibición se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición de la actividad de DPPH} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

Donde  $A_0$  es el valor de la absorbancia del blanco o reacción control y  $A_1$  es el valor de la muestra tras la reacción

Debe tenerse en cuenta, que las menores absorbancias obtenidas tras la reacción con las muestras indicarán una mayor actividad de la capacidad de inhibición del DPPH, lo cual se puede traducir en una mayor actividad antioxidante del componente bioactivo. Las reacciones se llevaron a cabo por duplicado, mientras que las medidas de absorbancia de cada uno de estos componentes se realizaron por triplicado.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. IDENTIFICACIÓN HPLC-DAD/MS

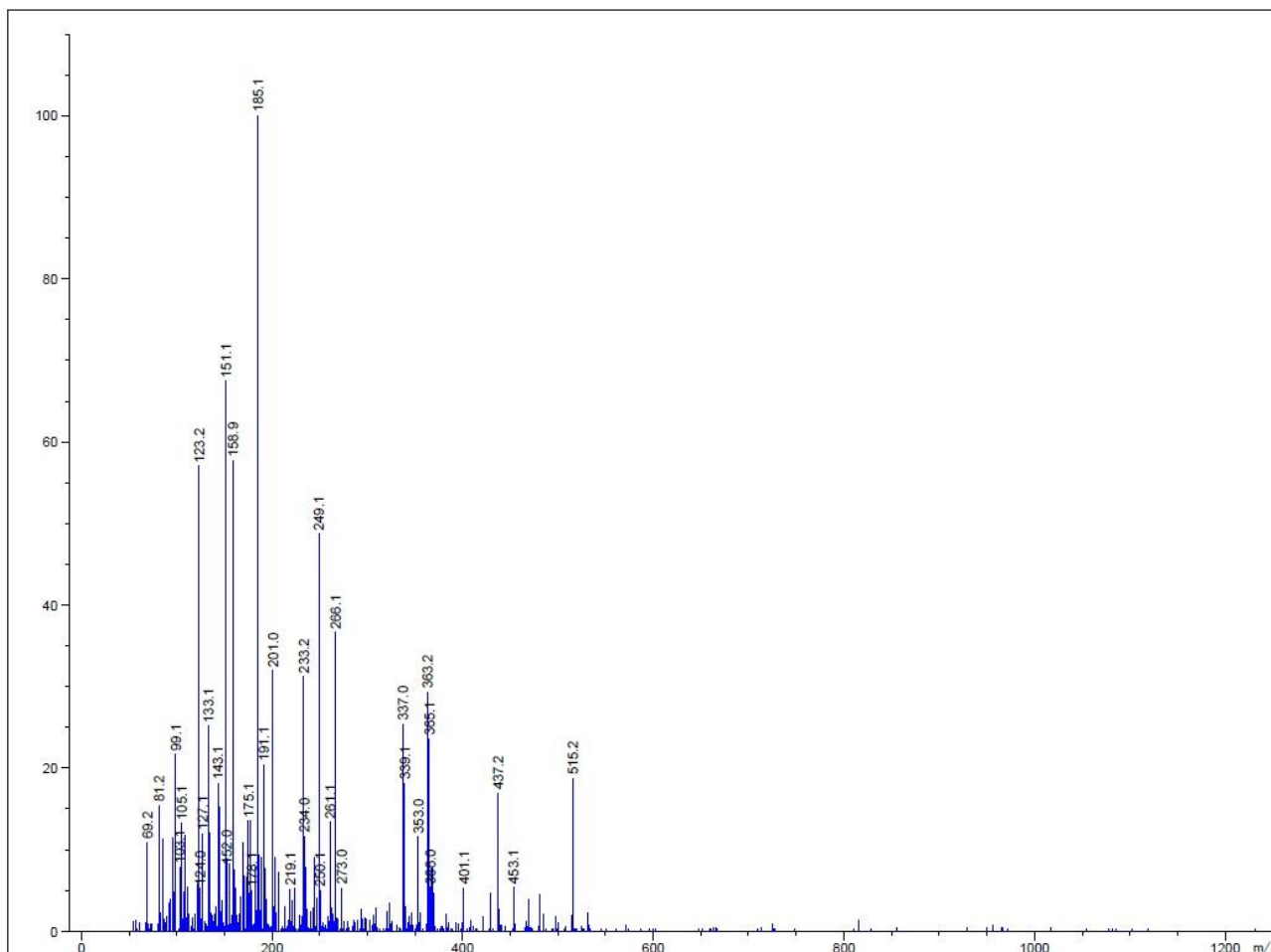
La identificación de los principales compuestos bioactivos de los extractos digeridos del azafrán (exceptuando la crocetina, cuya identificación se llevó a cabo con otro método analítico), se realizaron mediante el análisis HPLC-DAD/MS. En la **Tabla 4** se recogen los resultados obtenidos en los análisis realizados para la identificación cromatográfica de los diferentes compuestos bioactivos objeto de estudio en este trabajo.

**Tabla 4.** Identificación cromatográfica de los compuestos bioactivos mayoritarios encontrados en el extracto comercial de azafrán mediante HPLC acoplado a masas con detector en modo ESI+ y ESI-.

$T_r$ (minutos)	Compuesto	Máximo UV-Vis (nm)	ESI+ ( $m/z$ )	ESI- ( $m/z$ )
7,6	<b>Picrocrocina</b>	251	515,2; 365,1; <b>353,0</b> ; 337,1; 329,1; 185,1; 159,9; <b>151,2</b> ; <b>123,2</b> ; 81,2	1480,8; 667,2; 517,1; 385,0; 181,2; 153,1
11,5	<b>Kaempferol diglucósido</b>	266; 347	<b>633,0</b> ; 347,1	<b>609,0</b> ; 284,0
22,1	<b>trans-crocina-4</b>	261; 323; 441; 464	<b>999,4</b> ; <b>675,2</b> ; <b>511,5</b> ; 347,1	1336,2; <b>651,2</b> ; 326,8; 283,1
26,7	<b>trans-crocina-3</b>	261; 323; 440; 463	<b>837,3</b>	
30,7	<b>trans-crocina-2'</b>	261; 328; 440; 464	<b>675,2</b> ; 593,0; <b>513,3</b> ; 130,1; 102,2; 74,2	
33,9	<b>Safranal</b>	313	-	-
36,2	<b>cis-crocina-4</b>	225; 262; 325; 433; 456	<b>999,4</b> ; 821,3; 611,0; 391,0; 347,1	<b>651,2</b>
37,6	<b>trans-crocina-2</b>	260; 322; 433; 458	<b>675,2</b> ; 541,1	<b>651,2</b> ; 327,1; 311,1; 283,1

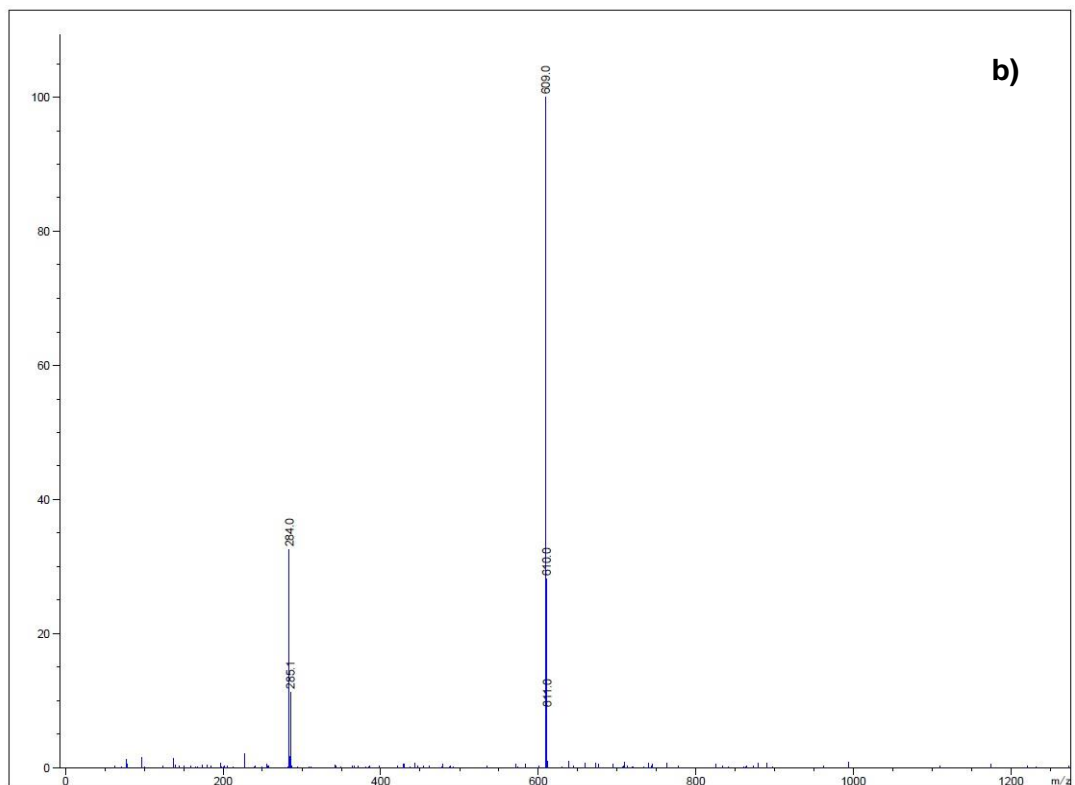
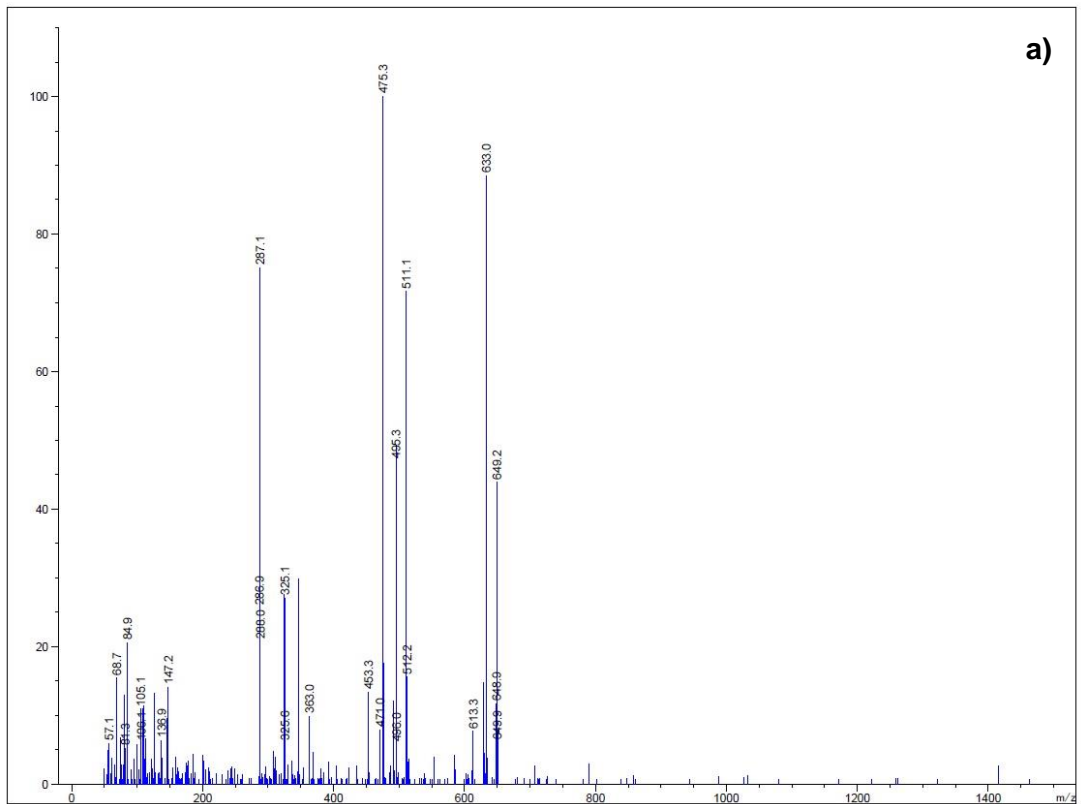
Los valores en negrita indican coincidencias en las fracciones moleculares obtenidas por Lech y col., (2009)<sup>111</sup>.

La **Tabla 4** muestra los resultados obtenidos en el análisis cromatográfico individual de los principales compuestos bioactivos hallados en las muestras de extracto de azafrán digeridas. En el caso de la picrocrocina, podemos identificarla a una longitud de onda de a 250 nm (ya que tiene un máximo de absorción de longitud de onda de 251 nm) y un característico ion molecular 353  $m/z$  y fragmentos de 151,2 y 123,2  $m/z$  en modo ESI+, tal y como se presenta a continuación en la **Figura 6**.



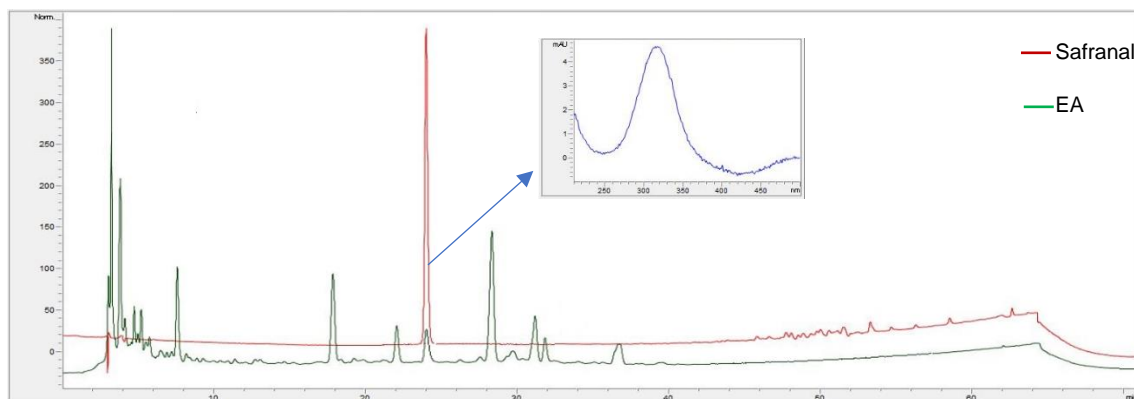
**Figura 6.** Espectro de masas en modo ESI+ correspondiente a la picrocrocina, obtenido mediante el análisis de extracto de azafrán (EA) affron®.

En el caso del kaempferol diglucósido, podemos encontrar a 265 nm un espectro típico de flavonoide, con dos máximos de absorción a longitudes de onda de 266 y 347 nm. En observarse en la **Figura 7**, cuando se trabaja en modo ESI+, se obtiene el ion molecular a 633,0 m/z, mientras que, cuando el espectro de este compuesto es obtenido trabajando en modo ESI- el correspondiente pico del ion molecular se aprecia a m/z 609. Estos resultados son concordantes con los resultados obtenidos en el trabajo desarrollado por Lech y col., (2009)<sup>111</sup>.



**Figura 7.** Espectros de masas correspondientes al kaempferol diglucósido obtenidos en el análisis del EA affron® estudiado en **a)** modo ESI+ y **b)** modo ESI-.

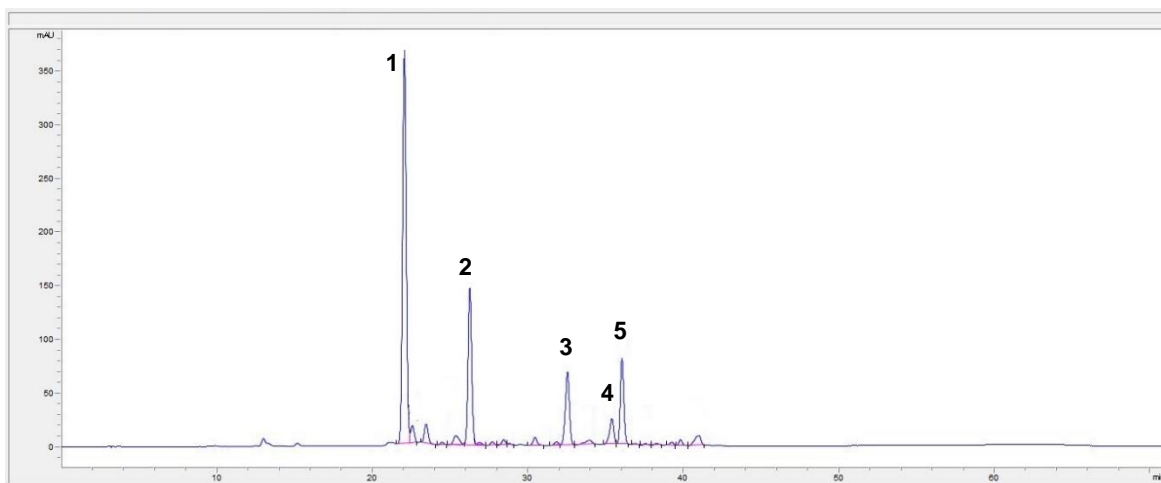
La identificación de la molécula de safranal por espectrometría de masas no fue posible, ya que no se encontraron fragmentos correspondientes a ella. Su identificación se realizó mediante cromatografía de líquidos teniendo en cuenta el tiempo de retención utilizando un patrón externo, y por comparación con el espectro UV obtenido, en el cual podía observarse un máximo de absorción de 313 nm, tal y como se muestra en la **Figura 8**.



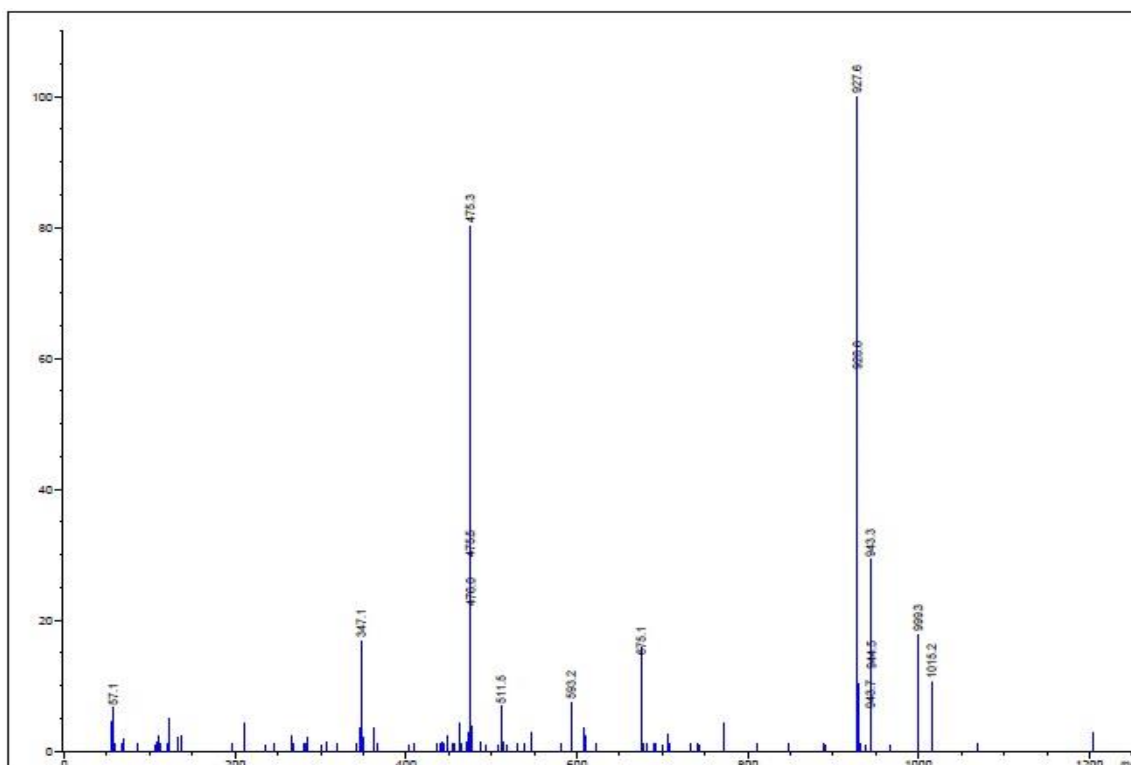
**Figura 8.** Cromatograma de una muestra del EA affron® y un patrón de safranal registrados a 330nm.

Con este mismo protocolo de análisis, a 440 nm se pudieron observar una serie de picos con similar espectro de absorción, ya que tenían máximos a 260, 325, 440 y 460 nm aproximadamente, los cuales son característicos de los carotenoides y, más concretamente, de derivados de crocina. Para poder realizar una identificación más adecuada de cada uno de ellos, se tuvieron en cuenta los tiempos de retención y los fragmentos iónicos, tanto en modo positivo como en modo negativo, utilizando como referencia los resultados obtenidos con anterioridad por Lech y col., (2009)<sup>111</sup>. En base a estos parámetros (tiempo de retención y fragmentos iónicos) se pudo identificar la *trans*-crocina-4, isómero de crocina mayoritario en el azafrán que, además, presenta el menor tiempo de retención como puede comprobarse en el cromatograma de la **Figura 9**, y un fragmento en modo positivo de 511,5 m/z (ver **Figura 10a**). A continuación, se identificó la *trans*-crocina-3 con un fragmento en modo positivo característico de 837,3 m/z (ver **Figura 10b**). Posteriormente, se pudo reconocer la *trans*-crocina-2' con un fragmento en modo positivo de 513,3 m/z (ver **Figura 10c**) y un tiempo de retención con una diferencia de 4 minutos respecto a la anterior crocina, tal y como se observa en la **Figura 9**. Seguidamente, se procedió a la identificación de la *cis*-crocina-4, con un

máximo de absorción a 225 nm, característico de carotenoides *cis*<sup>112</sup>, y un único fragmento molecular en modo negativo de 651,2 m/z (ver **Figura 10d**). En última instancia se identificó el compuesto *trans*-crocina-2, obteniéndose fragmentos moleculares característicos en modo positivo, 675,2 m/z, y modo negativo, 651,2 m/z (**Figura 10e**).

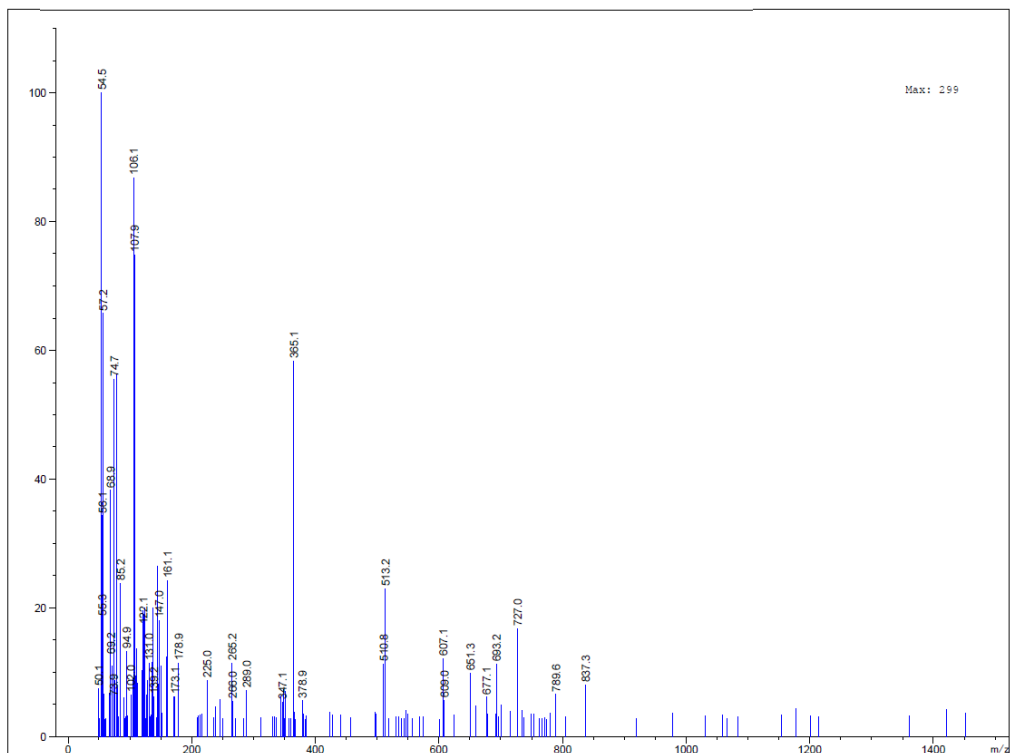


**Figura 9.** Cromatograma del EA affron® registrado a 440 nm, donde se identifican los siguientes picos correspondientes a los compuestos analizados: **(1)** *trans*-crocina-4, **(2)** *trans*-crocina-3, **(3)** *trans*-crocina-2', **(4)** *cis*-crocina-4 y **(5)** *trans*-crocina-2.

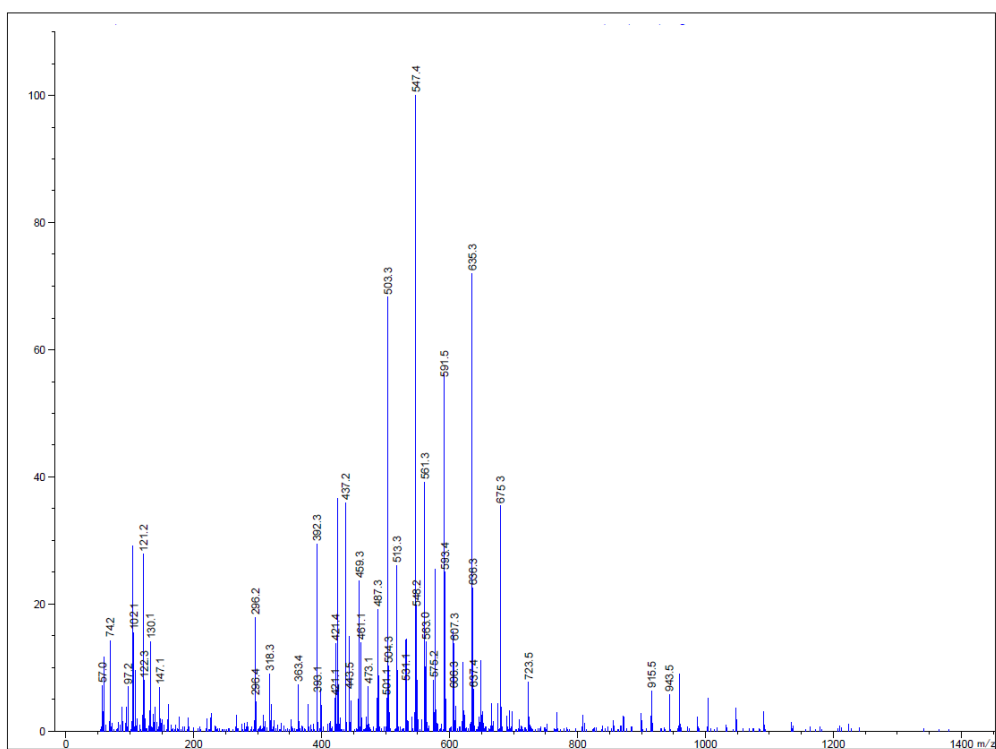


**Figura 10a.** Espectro de masas de *trans*-crocina-4 mediante análisis del EA en modo ESI+.

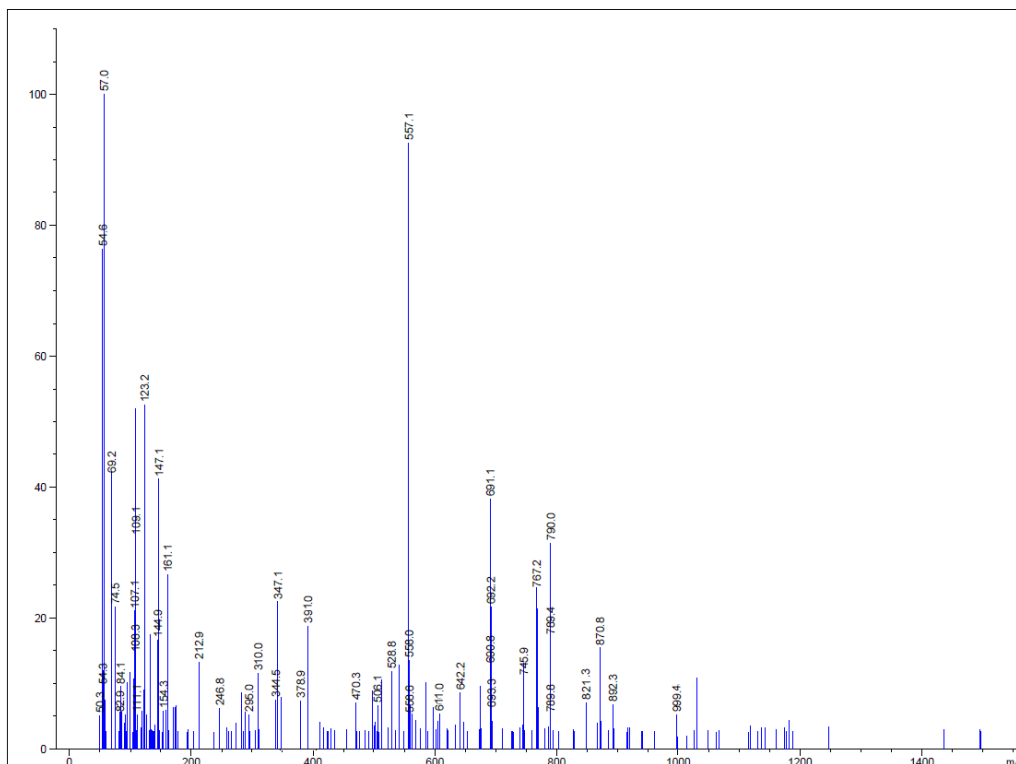




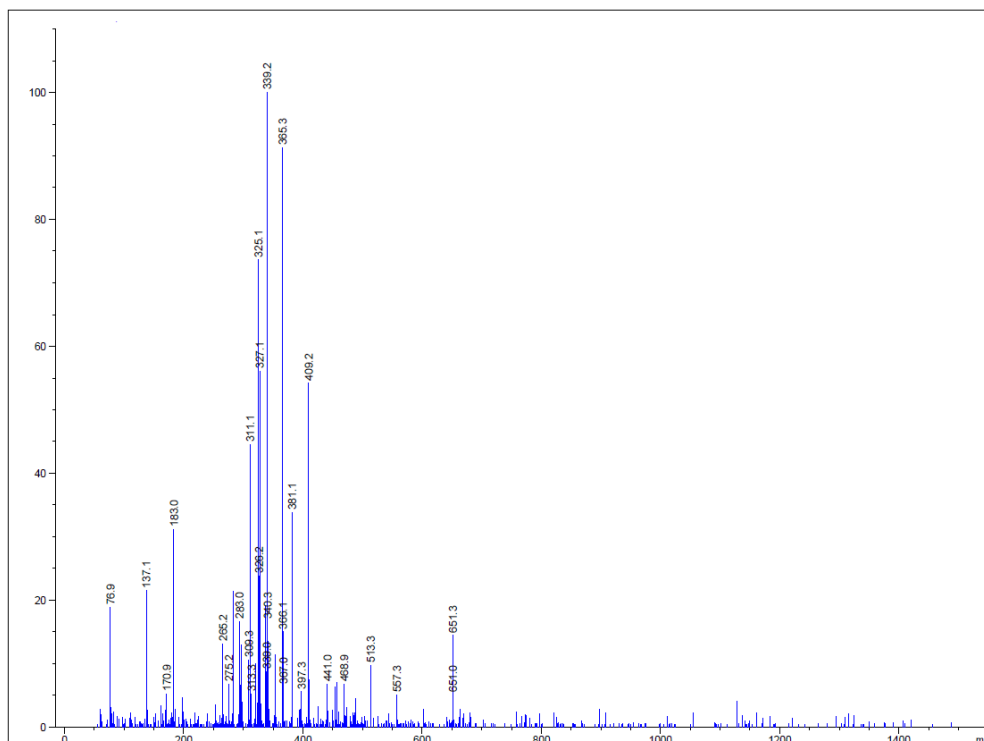
**Figura 10b.** Espectro de masas correspondiente a *trans*-crocina-3 obtenido mediante análisis del EA affron® en modo ESI+.



**Figura 10c.** Espectro de masas de la *trans*-crocina-2' obtenido mediante análisis de un EA affron® en modo ESI+.

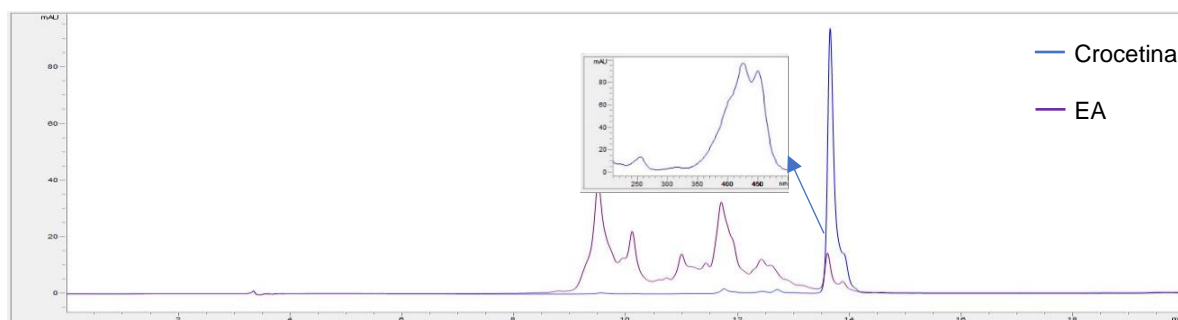


**Figura 10d.** Espectro de masas de *cis*-crocina-4 obtenido mediante análisis de un EA affron® en modo ESI+.



**Figura 10e** Espectro de masas de *trans*-crocina-2 obtenido para el análisis de un EA affron® en modo ESI-.

Como se ha comentado anteriormente en la memoria de este Proyecto de Investigación, la identificación de crocetina se realizó mediante un análisis HPLC-DAD siguiendo el método establecido por Mohammadpour y col., (2013)<sup>113</sup> y comparando el tiempo de retención y los espectros de absorción con un patrón. A continuación, se muestran los cromatogramas obtenidos (**Figura 11**).



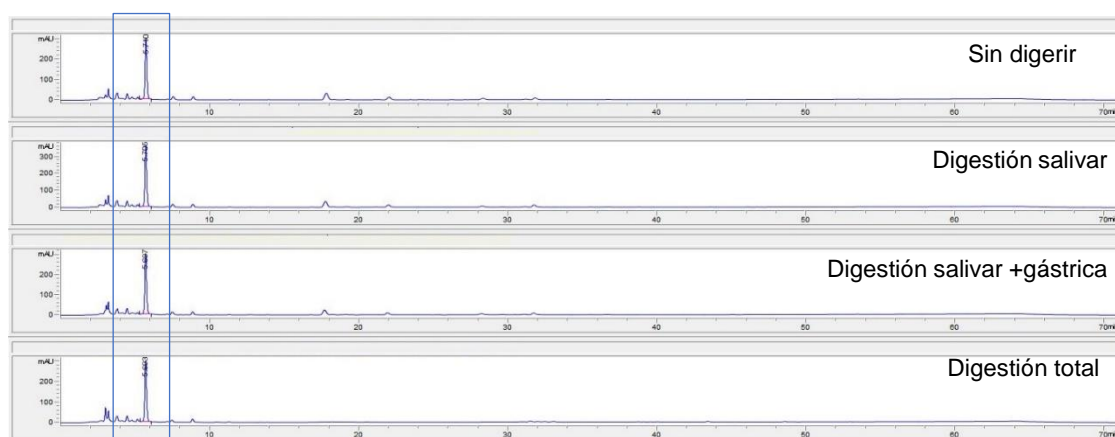
**Figura 11.** Cromatograma de una muestra de EA affron® y un patrón de crocetina registrados a 430nm.

Como se observa en la **Figura 11** tanto en el patrón externo como en la muestra aparece un pico a un tiempo de retención de 13,5 min y su espectro de absorción correspondiente presenta dos máximos de absorción a longitudes de onda de 426 y 451 nm. Por tanto, se confirma la identificación de crocetina y la presencia de ésta en el extracto de azafrán, confirmando los resultados obtenidos por otros autores<sup>114,115</sup>.

### 3.2. CUANTIFICACIÓN HPLC-DAD DE LOS PRINCIPALES COMPUESTOS BIOACTIVOS

- **Picrocrocina**

La cuantificación y evolución de la picrocrocina durante la digestión *In Vitro* se registró a 250 nm. Los cromatogramas obtenidos en cada una de las fases se muestran a continuación en la **Figura 12**:



**Figura 12.** Cromatogramas de las muestras del EA affron® durante la digestión *In Vitro* (250 nm).

Entre los cromatogramas registrados a esta longitud de onda en cada una de las etapas de la digestión de la muestra no se aprecian apenas diferencias más allá del contenido en picrocrocina. Los resultados obtenidos se recogen en la **Tabla 5**:

**Tabla 5.** Cuantificación de picrocrocina en el EA en la muestra inicial y en cada uno de los pasos de la digestión.

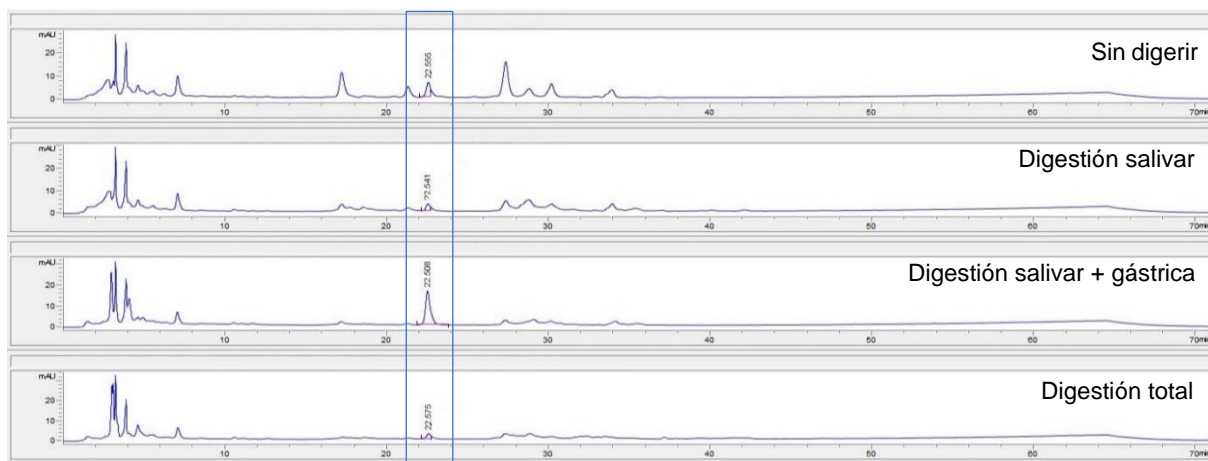
Compuesto bioactivo	Muestra inicial		Muestra digerida	
	Extracto de azafrán	Digestión salivar	Digestión salivar + gástrica	Digestión total
Picrocrocina	3,21 ± 0,07 <sup>c</sup>	3,14 ± 0,11 <sup>c</sup>	2,07 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,61 ± 0,05 <sup>b</sup>

Las diferentes letras (a-c) indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) del contenido en picrocrocina en cada uno de los pasos de la digestión.

Como se puede observar, existe una reducción del contenido en picrocrocina durante la digestión de aproximadamente un 19 %, resultados similares a los obtenidos por Kyriakoudi y col., (2015)<sup>84</sup>. En los cromatogramas no puede apreciarse variaciones en ninguno de los picos observados a 250 nm que se correlacione con la pérdida de picrocrocina, con lo cual, es muy probable que la molécula a la que dé lugar no presente absorbancia a esta longitud de onda. Existen diversos estudios que relacionan el tratamiento térmico y/o cambios de pH con la transformación de picrocrocina en safranal<sup>116</sup>, por tanto, es de esperar que el contenido de safranal aumente durante la digestión. Por otro lado, la picrocrocina restante que no ha sido transformada tiene baja bioaccesibilidad, ya que su estructura compleja glicosilada es difícil que atraviese la membrana celular y, por tanto, la mayoría no será absorbida<sup>84</sup>.

- **Safranal**

Los resultados obtenidos para el análisis del safranal en las muestras del extracto de azafrán sometidas a las diferentes etapas digestivas se muestran en los cromatogramas que aparecen en la **Figura 13**. Estos cromatogramas fueron registrados a 310 nm. A partir de estos cromatogramas se cuantificó el contenido en safranal en las muestras de EA. En ellos se observa claramente un cambio en el contenido de azafrán durante las etapas de digestión, siendo bastante llamativo el aumento que se produce durante la etapa de digestión gástrica.



**Figura 13.** Cromatogramas registrados a 310 nm de las muestras de EA affron® durante la digestión *In Vitro*.

A continuación, en la **Tabla 6**, se muestran los resultados de la cuantificación de dicho compuesto bioactivo:

**Tabla 6.** Cuantificación de safranal en el EA en la muestra inicial y en cada uno de los pasos de la digestión *In Vitro*.

Compuesto bioactivo	Muestra inicial		Muestra digerida	
	Extracto de azafrán	Digestión salivar	Digestión salivar + gástrica	Digestión total
Safranal	0,04 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>b</sup>

Las diferentes letras (a-c) indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) del contenido en safranal en cada uno de los pasos de la digestión.

Como se puede apreciar en el cromatograma y confirmar con la posterior cuantificación, durante la fase salivar el contenido de safranal disminuye, sin embargo, cuando se llega a la fase gástrica y duodenal aumenta incluso hasta 5 veces con respecto al contenido inicial (de 0,04 a 0,21 %). Esto puede explicarse, como se ha comentado anteriormente, a que la picrocrocina, que además se comporta de manera inversa, se transforma en safranal durante la digestión. Además, existen otros compuestos en el azafrán, como el 4-hidroxi-2,6,6-trimetil-1-ciclohexano-1-carboxaldehído (HTCC) que no son cuantificados en este estudio y son precursores de safranal y, por tanto, también podrían estar implicados en el aumento de ésta<sup>117</sup>.

- **Kaempferol**

La cuantificación de los derivados de kaempferol se realizó a 265 nm utilizando como patrón kaempferol aglicona. En la **Figura 14** se muestran los cromatogramas resultantes:



**Figura 14.** Cromatogramas registrados a 265 nm de las muestras de EA affron® durante la digestión *In Vitro*.

En los cromatogramas no se observan cambios con respecto al contenido en kaempferol o con la variación de otros picos de importancia (**Figura 14**). Este hecho se puede corroborar también a la hora de cuantificar los resultados obtenidos y que se muestran en la **Tabla 7**. En dicha tabla puede observarse como los resultados de cuantificación reflejan una pérdida de aproximadamente un 30% del contenido en kaempferol diglucósido durante el proceso de la digestión.

**Tabla 7.** Cuantificación de kaempferol en el EA antes y en cada uno de los pasos de la digestión *In Vitro*.

Compuesto bioactivo	Muestra inicial	Muestra digerida		
	Extracto de azafrán	Digestión salivar	Digestión salivar + gástrica	Digestión total
Kaempferol diglucósido	0,13 ± 0,00 <sup>b,c</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,12 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,09 ± 0,00 <sup>a</sup>

Las diferentes letras (a-c) indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) del contenido en kaempferol en cada uno de los pasos de la digestión.

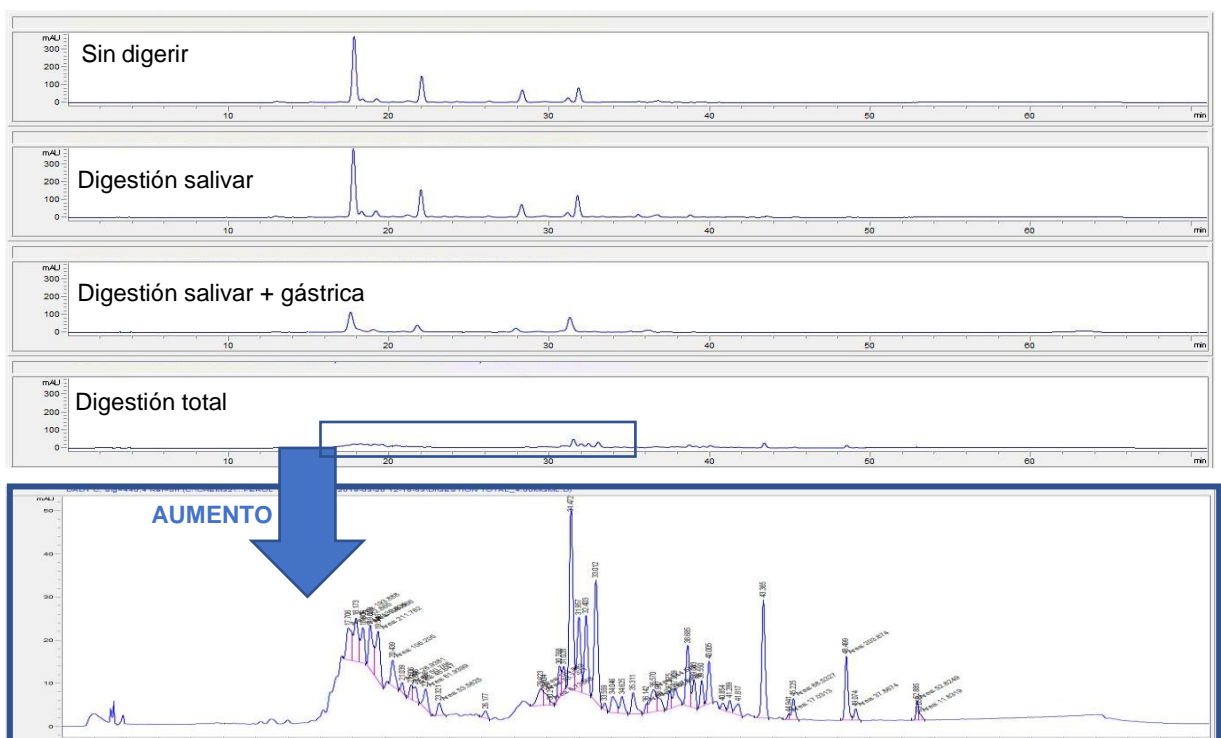
Los resultados obtenidos en este estudio no se pueden comparar con otros anteriores realizados con azafrán, ya que no se han hallado publicaciones que estudien este proceso. Sin embargo, existen otros estudios similares realizados con otras especies botánicas que son fuentes de kaempferol. Por ejemplo, Yang y col., (2018)<sup>118</sup>

describen el cambio de composición del contenido de polifenoles, entre los que se incluye 18 derivados diferentes de kaempferol, de una muestra de kale concluyendo que el 69,4% es capaz de aguantar las condiciones de digestión. Los resultados también concuerdan con los obtenidos por Goh y col., (2004)<sup>119</sup> donde se registra una pérdida de tan sólo el 5% de los flavonoides iniciales. Sin embargo, otros autores han obtenido resultados muy diferentes, obteniendo la pérdida parcial o total del contenido en polifenoles de los diferentes extractos botánicos y concluyendo que éstos son susceptibles a las condiciones gastrointestinales<sup>120</sup>.

- **Isómeros de crocina**

Existe una gran cantidad de isómeros de crocina en las hebras de azafrán. De todos estos isómeros, en este trabajo se pudieron identificar mediante el estudio realizado por espectrometría de masas los mayoritarios: *trans*-crocina-4, *trans*-crocina-3, *trans*-crocina-2', *cis*-crocina-4 y *trans*-crocina-2 y son los que se tendrán en cuenta a la hora de cuantificar los isómeros de crocina.

Para la cuantificación de estos isómeros, se registró un cromatograma a 440nm (**Figura 15**). A continuación, podemos ver los resultados en cada etapa digestiva:



Como se puede observar en los cromatogramas anteriores (**Figura 15**) la etapa de digestión gástrica afecta en gran manera a la composición de las crocinas del extracto de azafrán. Esto se refleja en los resultados obtenidos para la cuantificación de los compuestos (**Tabla 8**), confirmándose, además, una disminución significativa en la última etapa.

**Tabla 8.** Cuantificación de isómeros de crocina en el EA affron® en la muestra inicial y en cada uno de los pasos de la digestión *In Vitro*.

Compuestos bioactivos	Muestra inicial		Muestra digerida	
	Extracto de azafrán	Digestión salivar	Digestión salivar + gástrica	Digestión total
Isómeros de crocina	3,63 ± 0,05 <sup>b</sup>	3,43 ± 0,12 <sup>b</sup>	1,87 ± 0,35 <sup>a</sup>	1,38 ± 0,22 <sup>a</sup>

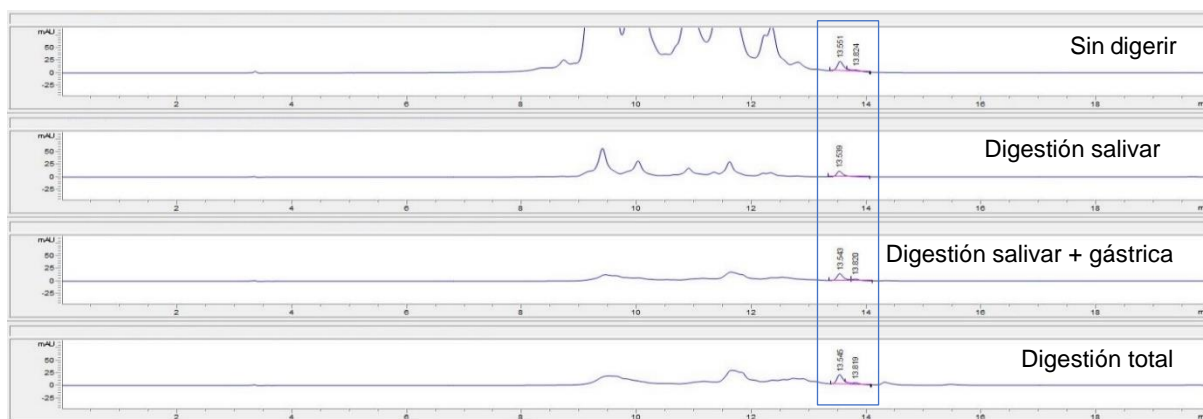
Las diferentes letras (a-c) indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) del contenido en crocina en cada uno de los pasos de la digestión.

El contenido de isómeros de crocina, disminuye significativamente hasta un 62% (de 3,63 a 1,38 %) (ver **Tabla 8**), siendo en las etapas de digestión gástrica y duodenal las etapas cruciales en esta disminución. Otro estudio anterior proporcionó resultados parecidos, aunque un poco menores, siendo sólo aproximadamente el 50% de las crocinas los que se veían degradados durante la digestión<sup>121</sup>. Por otro lado, es importante confirmar si las crocinas que se han visto degradadas no se han hidrolizado y transformado a crocetina con el fin de verificar los resultados obtenidos por otros autores, los cuales determinan que la hidrólisis de las crocinas durante la digestión no se produce por las condiciones gástricas o intestinales, sino por diversas enzimas de las células intestinales y por acción de la microbiota intestinal<sup>75,122</sup>.

- **Crocetina**

Como se especificó anteriormente, el análisis y cuantificación de crocetina se realizó con un método diferente, específico de crocetina (Umigai y col., (2011)<sup>82</sup>). Los cromatogramas registrados a 430 nm de cada una de las fases se representan en la **Figura 16**:





**Figura 16.** Cromatogramas registrados a 430 nm para las muestras de EA affron® durante la digestión *In Vitro*.

Como se refleja en los cromatogramas anteriores (**Figura 16**), existe una disminución en la concentración de los picos posteriores a la crocetina. Posiblemente sea debido a que esos picos corresponden a los isómeros de crocina, ya que éstos absorben a la longitud de onda a la que está registrada el cromatograma, y dado que tienen una menor hidrofobicidad, tendrán un tiempo de retención menor en fase inversa. Sin embargo, el contenido de crocetina no se ve alterado durante éste. En efecto, lo observado en el cromatograma se confirma tras la cuantificación (**Tabla 9**).

Por tanto, se confirma, por un lado, que el contenido en crocetina es bastante inferior al contenido en isómeros de crocina<sup>123</sup>, y por otro, que durante la digestión en condiciones abióticas no se produce un aumento del contenido en crocetina, siendo la transformación de isómeros de crocina a crocetina ocasionada por otras reacciones, donde muy posiblemente intervengan enzimas microbianas o pertenecientes a los enterocitos intestinales<sup>75,122</sup>.

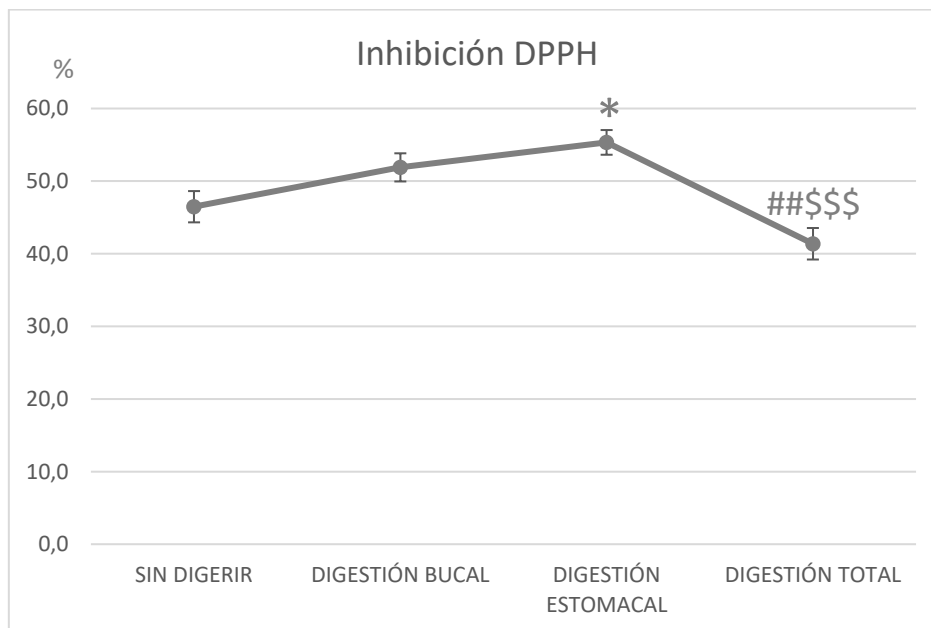
**Tabla 9.** Cuantificación de crocetina en el EA affron® antes y en cada uno de los pasos de la digestión *In Vitro*.

Compuestos bioactivos	Muestra inicial		Muestra digerida	
	Extracto de azafrán	Digestión salivar	Digestión salivar + gástrica	Digestión total
Crocetina	0,03 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,00 <sup>a</sup>

Las diferentes letras (a-c) indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) del contenido en picrocrocina en cada uno de los pasos de la digestión.

### 3.3. ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DURANTE LA DIGESTIÓN

Como se muestra en la **Figura 17**, la actividad antioxidante o capacidad de inhibición del 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) de la muestra no digerida fue de 46,5%, esta actividad aumentó, aunque no de manera significativa, durante la digestión bucal llegando a ser de un 51,9 %. Sin embargo, el alcance de la mayor actividad antioxidante se ve durante la digestión estomacal donde se aprecia un aumento significativo alcanzando un 55,3%, ( $p$  valor  $\leq 0,05$ ). es decir, la capacidad de inhibición del DPPH se incrementa un 20% con respecto a la muestra sin digerir. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Rodríguez-Roque y col., (2013)<sup>124</sup> donde incluso se alcanza un aumento de un 30%. Por otro lado, Baublis y col., (2000)<sup>125</sup> demostraron que las condiciones ácidas del estómago durante la digestión alteraban la actividad, composición y concentración de las moléculas hidrosolubles y de bajo peso molecular, produciendo un aumento significativo de su actividad antioxidante. Además, Noguera y col., (2008)<sup>126</sup> hallaron la formación de otros compuestos durante la digestión gástrica en muestras de vino tinto que no se encontraban en la matriz alimentaria, los cuales producían el aumento de la actividad antioxidante durante esta etapa.



**Figura 17.** Cambios de la actividad antioxidante del extracto de azafrán durante las diferentes etapas de digestión. Los valores se representan como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). (\*,  $p \leq 0,05$  vs “SIN DIGERIR”; ##,  $p \leq 0,01$  vs “DIGESTIÓN BUCAL”; \$\$\$,  $p \leq 0,005$  vs “DIGESTIÓN ESTOMACAL”).

Sin embargo, la actividad antioxidante de las muestras se vio reducida significativamente ( $p$  valor  $\leq 0,05$ ) tras la etapa de digestión total en comparación con los resultados tras la digestión gástrica, siendo el valor final de 41,4%, y por tanto, resultando en una reducción del 25% coincidiendo con los resultados de Rodríguez-Roque (2013)<sup>124</sup>. La disminución de la capacidad antioxidante bajo las condiciones de digestión intestinal puede deberse al hecho de que algunas sustancias antioxidantes, como compuestos fenólicos, pueden ser transformados en diferentes formas estructurales con otras propiedades químicas debido a su sensibilidad a pH alcalino<sup>127</sup>.

Por otro lado, este cambio de actividad antioxidante es proporcional al contenido en safranal en las muestras durante la digestión, pudiendo ser ésta la principal causante de su cambio. El safranal, a diferencia de la picrocrocina, es un compuesto que presenta una gran actividad antioxidante y, junto con las crocinas y los derivados del kaempferol las principales moléculas implicadas en el mecanismo antioxidante en el extracto de azafrán<sup>128</sup>.

## IV. CONCLUSIONES

Las conclusiones más relevantes obtenidas a través de la realización de este Trabajo Fin de Máster y del Proyecto de Investigación se han dividido en dos bloques correspondientes a cada uno de ellos, respectivamente.

Con respecto al **Trabajo Fin de Máster** pueden establecerse las siguientes conclusiones:

1. En la actualidad, existen múltiples herramientas para identificar y estandarizar principios activos en los extractos botánicos con el fin de garantizar una actividad biológica y una homogeneidad entre lotes.
2. Los extractos botánicos pueden considerarse medicamento siempre y cuando estén registrados y aprobados como éstos.
3. El azafrán se obtiene de los estigmas de la flor de *Crocus sativus* L., y corresponde a uno de los cultivos más antiguos de la humanidad, abarcando diferentes culturas, continentes y civilizaciones. Ha perdurado en todo el mundo a lo largo de la historia como una de las sustancias más caras (en relación con su peso). Se trata de una especia bastante preciada desde tiempos inmemoriales, no solo por sus cualidades organolépticas, sino además por sus usos y aplicaciones en la medicina tradicional debido a sus propiedades neuroprotectivas, las cuales están relacionadas con el contenido de principios activos como las crocinas, el safranal o el kaempferol.
4. Existen una gran cantidad de estudios que abalan las propiedades beneficiosas del consumo de extracto de azafrán, sin embargo, pocos analizan la transformación y farmacocinética de sus principios activos tras su ingesta oral.

Las conclusiones correspondientes a la parte de **Proyecto de Investigación** son las que se resumen a continuación:

5. En este trabajo se llevó a cabo el estudio de la transformación de los compuestos bioactivos presentes en el azafrán durante la digestión. En los estudios realizados se pudo comprobar que, durante la digestión bucal, el contenido en estos compuestos bioactivos del azafrán no varía. Sin embargo, durante la digestión gástrica se produce la reducción de algunos de ellos como es el caso de los isómeros de crocina o picrocrocina; en el caso de safranal, aumenta su concentración en esta etapa y el kaempferol diglucósido o la crocetina se mantienen estables. Posteriormente, durante la etapa de digestión intestinal se

puede observar una reducción del contenido de todos ellos en el extracto de azafrán, sobre todo en el caso del safranal.

6. Tras este estudio, se puede concluir que los principios activos glucosidados del extracto de azafrán, como las crocinas o el kaempferol no se hidrolizan de forma química durante la digestión, sino que sería necesaria la intervención de enzimas pertenecientes a la microbiota intestinal o localizadas en el enterocitos, donde finalmente se produce su absorción y la de todos los compuestos bioactivos.
7. Finalmente, se podría decir que las condiciones gástricas afectan de manera negativa a estos compuestos bioactivos presentes en el azafrán. Como consecuencia, gracias a este estudio se podría recomendar el uso de recubrimientos entéricos para el consumo de este suplemento alimenticio.

## V. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Barnes, J.; Anderson, L. A.; Phillipson, J. D. Herbal Medicines. *Herb. Med.* **2007**, No. 3rd Edition.
- (2) Polanco, X. Calidad En La Producción y Elaboración de Plantas Medicinales (II). *Boletín Plantas Med. y Aromáticas* **2003**, 8, 357–718.
- (3) Chife, C. Garantía y Control de Calidad de Materias Primas Vegetales Para Fines Farmacéuticos. *Rev Lab Cienc.* **2005**, 4, 6–8.
- (4) Mukherjee, P. K. *Quality Control of Herbal Drugs: An Approach to Evaluation of Botanicals*; Business Horizons, 2002.
- (5) Fauron, R. Galénica y Fitoterapia: Aspectos Cualitativos. *Nat. Medicat.* **1994**, 37–38, 54–60.
- (6) Bauer, R. Quality Criteria and Standardization of Phytopharmaceuticals: Can Acceptable Drug Standards Be Achieved? *Ther. Innov. Regul. Sci.* **1997**, 32 (1), 101–110.
- (7) Akerele, O. Summary of WHO Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines. *Herb. Gram* **1993**, 28 (13), 13–19.
- (8) Kumar, V.; Kumar, V. An Overview of Herbal Medicine. *Int. J. Ph. Sci* **2009**, 1 (1), 1–20.
- (9) Kumar Bijauliya, R.; Alok, S.; Chanchal, K.; Kumar, M. A Comprehensive Review on Standardization of Herbal Drugs. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2017**, 8 (9), 3663–3677.
- (10) Mišan, A.; Mimica-Dukić, N.; Mandić, A.; Sakač, M.; Milovanović, I.; Sedej, I. Development of a Rapid Resolution HPLC Method for the Separation and Determination of 17 Phenolic Compounds in Crude Plant Extracts. *Open Chem.* **2011**, 9 (1), 133–142.
- (11) Rao, B.; Nikalje, A. Stability-Indicating HPLC Method for the Determination of Efavirenz in Bulk Drug and in Pharmaceutical Dosage Form. *African J. Pharm. Pharmacol.* **2009**, 3 (12), 643–650.
- (12) Zhang, Q.; Ye, M. Chemical Analysis of the Chinese Herbal Medicine Gan-Cao (Licorice). *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216 (11), 1954–1969.
- (13) Li, S.; Lai, S.; Song, J.; Qiao, C.; Liu, X.; Zhou, Y. Decocting-Induced Chemical Transformations and Global Quality of Du–Shen–Tang, the Decoction of Ginseng Evaluated by UPLC–Q-TOF-MS/MS Based Chemical. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, 53 (4), 946–957.
- (14) Vogel, H.; González, M.; Faini, F.; Razmilic, I.; Rodríguez, J.; San Martín, J.; Urbina, F. Antioxidant Properties and TLC Characterization of Four Chilean Haplopappus-Species Known as Bailahuén. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, 97 (1), 97–100.
- (15) Xie, P.; Chen, S.; Liang, Y.; Wang, X.; A, R. T.-... of chromatography; 2006, undefined. Chromatographic Fingerprint Analysis—a Rational Approach for Quality Assessment of Traditional Chinese Herbal Medicine. *Elsevier*.
- (16) Fan, X.-H.; Cheng, Y.-Y.; Ye, Z.-L.; Lin, R.-C.; Qian, Z.-Z. Multiple Chromatographic Fingerprinting and Its Application to the Quality Control of

- Herbal Medicines. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 555 (2), 217–224.
- (17) Patil, R. Y.; Patil, S. A.; Chivate, N. D.; Patil, Y. N. Herbal Drug Nanoparticles: Advancements in Herbal Treatment. *Res. J. Pharm. Tech* **2018**, 11 (1).
  - (18) Lee, M.-C.; Tsao, C.-H.; Iou, S.-C.; Chuang, W.-C.; Sheu, S.-J. Analysis of Aristolochic Acids in Herbal Medicines by LC/UV and LC/MS. *J. Sep. Sci.* **2003**, 26 (9–10), 818–822.
  - (19) Dachtler, M.; van de Put, F. H. M.; v. Stijn, F.; Beindorff, C. M.; Fritsche, J. On-Line LC-NMR-MS Characterization of Sesame Oil Extracts and Assessment of Their Antioxidant Activity. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2003**, 105 (9), 488–496.
  - (20) Dwivedi, B.; Kumar, S.; Nayak, C. Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) Analysis of the Hexane and Benzene Extracts of the Piper Betle (Leaf Stalk)(Family: Piperaceae) from India. *J. Med. Plants Res.* **2010**, 4 (21), 2252–2255.
  - (21) Sha, Y.; Shen, S.; Duan, G. Analysis of Rhioxma Curcumae Aeruginosae Volatiles by Solid-Phase Microextraction with Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Zeitschrift für Naturforsch. C* **2004**, 59 (7/8), 533–537.
  - (22) Yan, Z.; Feng, D.; Li, S.; Zhao, Y.; Yang, H. Determination of Organochlorine Pesticide Residue in Nine Chinese Herbs by Gas Chromatography. *Se pu= Chinese J. Chromatogr.* **2005**, 23 (2), 308–311.
  - (23) Lisec, J.; Schauer, N.; Kopka, J.; Willmitzer, L.; Fernie, A. R. Gas Chromatography Mass Spectrometry–Based Metabolite Profiling in Plants. *Nat. Protoc.* **2006**, 1 (1), 387.
  - (24) Henry, M. C.; Yonker, C. R. Supercritical Fluid Chromatography, Pressurized Liquid Extraction, and Supercritical Fluid Extraction. *Anal. Chem.* **2006**, 78 (12), 3909–3916.
  - (25) Agrawal, H.; Kaul, N.; Paradkar, A. R.; Mahadik, K. R. Standardization of Crude Extract of Neem Seed Kernels (*Azadirachta Indica* A. Juss) and Commercial Neem Based Formulations Using HPTLC and Extended Length Packed-Columns SFC Method. *Chromatographia* **2005**, 62 (3–4), 183–195.
  - (26) Ganzera, M. Quality Control of Herbal Medicines by Capillary Electrophoresis: Potential, Requirements and Applications. *Electrophoresis* **2008**, 29 (17), 3489–3503.
  - (27) Gao, W. H.; Lin, S. Y.; Jia, L.; Guo, X. K.; Chen, X. G.; Hu, Z. De. Analysis of Protoberberine Alkaloids in Several Herbal Drugs and Related Medicinal Preparations by Non-Aqueous Capillary Electrophoresis. *J. Sep. Sci.* **2005**, 28 (1), 92–97.
  - (28) Pietta, P.; Mauri, P.; Rava, A.; Sabbatini, G. Application of Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography to the Determination of Flavonoid Drugs. *J. Chromatogr. A* **1991**, 549, 367–373.
  - (29) Wang, L. C.; Cao, Y. H.; Xing, X. P.; Ye, J. N. Fingerprint Studies of Radix Scutellariae by Capillary Electrophoresis and High Performance Liquid Chromatography. *Chromatographia* **2005**, 62 (5–6), 283–288.
  - (30) *REAL DECRETO 1345/2007, de 11 de Octubre, Por El Que Se Regula El Procedimiento de Autorización, Registro y Condiciones de Dispensación de Los Medicamentos de Uso Humano Fabricados Industrialmente.*

- (31) *Ley 29/2006, de 26 de Julio, de Garantías y Uso Racional de Los Medicamentos y Productos Sanitarios.*
- (32) Sharma, B. Analysis of Adulterants in Saffron. In *Adulteration Analysis of Some Foods and Drugs*; 2018; pp 161–174.
- (33) Kafi, M.; Koocheki, A.; Rashed, M. Saffron (*Crocus Sativus*): Production and Processing. **2006**.
- (34) Sampathu, S. R.; Shivashankar, S.; Lewis, Y. S.; Wood, A. B. Saffron (*Crocus Sativus* Linn.) — Cultivation, Processing, Chemistry and Standardization. *C R C Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1984**, *20* (2), 123–157.
- (35) Anjum, N.; Pal, A.; Tripathi, Y. Phytochemistry and Pharmacology of Saffron, the Most Precious Natural Source of Colour, Flavour and Medicine. *SMU Med* **2015**, *2*, 335–347.
- (36) Basker, D. Saffron, the Costliest Spice: Drying and Quality, Supply and Price. *Acta Hortic.* **1993**, No. 344, 86–97.
- (37) Schmidt, M.; Betti, G.; Hensel, A. Saffron in Phytotherapy: Pharmacology and Clinical Uses. *Wiener Medizinische Wochenschrift* **2007**, *157* (13–14), 315–319.
- (38) Pfander, H.; Rychener, A. Separation of Crocetin Glycosyl Esters by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.* **1982**, *234* (2), 443–447.
- (39) Rubio-Terrado, P. El Azafrán. Aspectos Socioeconómicos y Culturales. *Rev. Humanidades* **2007**, *13*, 199–228.
- (40) Almodóvar, P.; Prodanov, M.; Arruñada, O.; Inarejos-García, A. M. Affron®eye, a Natural Extract of Saffron (*Crocus Sativus* L.) with Colorant Properties as Novel Replacer of Saffron Stigmas in Culinary and Food Applications. *Int. J. Gastron. Food Sci.* **2018**, *12* (March), 1–5.
- (41) Lopresti, A. L.; Drummond, P. D.; Inarejos-García, A. M.; Prodanov, M. Affron®, a Standardised Extract from Saffron (*Crocus Sativus* L.) for the Treatment of Youth Anxiety and Depressive Symptoms: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *J. Affect. Disord.* **2018**, *232*, 349–357.
- (42) Kell, G.; Rao, A.; Beccaria, G.; Clayton, P.; Inarejos-García, A. M.; Prodanov, M. Affron®a Novel Saffron Extract (*Crocus Sativus* L.) Improves Mood in Healthy Adults over 4 Weeks in a Double-Blind, Parallel, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Complement. Ther. Med.* **2017**, *33*, 58–64.
- (43) Nishide, A.; Fujita, T.; Nagaregawa, Y.; Shoyama, Y.; Ohnuki, K.; Shimizu, K.; Yamamoto, T.; Watanabe, T.; Ohnuki, K. Sleep Enhancement by Saffron Extract in Randomized Control Trial. *Japanese Pharmacol. Ther.* **2018**, *46* (8), 1407–1415.
- (44) Kashani, L.; Esalatmanesh, S.; Eftekhari, F.; Salimi, S.; Foroughifar, T.; Etesam, F.; Safiaghdam, H.; Moazen-Zadeh, E.; Akhondzadeh, S. Efficacy of *Crocus Sativus* (Saffron) in Treatment of Major Depressive Disorder Associated with Post-Menopausal Hot Flashes: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Arch. Gynecol. Obstet.* **2018**, *297* (3), 717–724.
- (45) Hosseinzadeh, H.; Karimi, G.; Niapoor, M. Antidepressant Effects of *Crocus Sativus* Stigma Extracts and Its Constituents, Crocin and Safranal, in Mice. *Acta Hortic.* **2004**, *650*, 435–445.



- (46) Khazdair, M. R.; Boskabady, M. H.; Hosseini, M.; Rezaee, R.; M Tsatsakis, A. The Effects of Crocus Sativus (Saffron) and Its Constituents on Nervous System: A Review. *Avicenna J. phytomedicine* **2015**, 5 (5), 376–391.
- (47) De Monte, C.; Carradori, S.; Chimenti, P.; Secci, D.; Mannina, L.; Alcaro, F.; Petzer, A.; N'Da, C. I.; Gidaro, M. C.; Costa, G.; et al. New Insights into the Biological Properties of Crocus Sativus L.: Chemical Modifications, Human Monoamine Oxidases Inhibition and Molecular Modeling Studies. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 82, 164–171.
- (48) Ahmad, A. S.; Ansari, M. A.; Ahmad, M.; Saleem, S.; Yousuf, S.; Hoda, M. N.; Islam, F. Neuroprotection by Crocetin in a Hemi-Parkinsonian Rat Model. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2005**, 81 (4), 805–813.
- (49) Akhondzadeh, S.; Sabet, M. S.; Harirchian, M. H.; Togha, M.; Cheraghmakani, H.; Razeghi, S.; Hejazi, S. S.; Yousefi, M. H.; Alimardani, R.; Jamshidi, A.; et al. Saffron in the Treatment of Patients with Mild to Moderate Alzheimer's Disease: A 16-Week, Randomized and Placebo-Controlled Trial. *J. Clin. Pharm. Ther.* **2010**, 35 (5), 581–588.
- (50) Akhondzadeh, S.; Shafiee Sabet, M.; Harirchian, M. H.; Togha, M.; Cheraghmakani, H.; Razeghi, S.; Hejazi, S. S.; Yousefi, M. H.; Alimardani, R.; Jamshidi, A.; et al. A 22-Week, Multicenter, Randomized, Double-Blind Controlled Trial of Crocus Sativus in the Treatment of Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. *Psychopharmacology (Berl)*. **2010**, 207 (4), 637–643.
- (51) Pitsikas, N. The Effect of Crocus Sativus L. and Its Constituents on Memory: Basic Studies and Clinical Applications. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **2015**, 1–7.
- (52) Geromichalos, G. D.; Lamari, F. N.; Papandreou, M. A.; Trafalis, D. T.; Margarity, M.; Papageorgiou, A.; Sinakos, Z. Saffron as a Source of Novel Acetylcholinesterase Inhibitors: Molecular Docking and in Vitro Enzymatic Studies. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60 (24), 6131–6138.
- (53) Finley, J. W.; Gao, S. A Perspective on Crocus Sativus L. (Saffron) Constituent Crocin: A Potent Water-Soluble Antioxidant and Potential Therapy for Alzheimer's Disease. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, 65 (5), 1005–1020.
- (54) Lv, B.; Huo, F.; Zhu, Z.; Xu, Z.; Dang, X.; Chen, T.; Zhang, T.; Yang, X. Crocin Upregulates CX3CR1 Expression by Suppressing NF-KB/YY1 Signaling and Inhibiting Lipopolysaccharide-Induced Microglial Activation. *Neurochem. Res.* **2016**, 41 (8), 1949–1957.
- (55) Nam, K. N.; Park, Y.-M.; Jung, H.-J.; Lee, J. Y.; Min, B. D.; Park, S.-U.; Jung, W.-S.; Cho, K.-H.; Park, J.-H.; Kang, I.; et al. Anti-Inflammatory Effects of Crocin and Crocetin in Rat Brain Microglial Cells. *Eur. J. Pharmacol.* **2010**, 648 (1–3), 110–116.
- (56) Xuan, B.; Zhou, Y.-H.; Li, N.; Min, Z.-D.; Chiou, G. C. Y. Effects of Crocin Analogs on Ocular Blood Flow and Retinal Function. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **1999**, 15 (2), 143–152.
- (57) Ishizuka, F.; Shimazawa, M.; Umigai, N.; Ogishima, H.; Nakamura, S.; Tsuruma, K.; Hara, H. Crocetin, a Carotenoid Derivative, Inhibits Retinal Ischemic Damage in Mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, 703 (1–3), 1–10.
- (58) Yamauchi, M.; Tsuruma, K.; Imai, S.; Nakanishi, T.; Umigai, N.; Shimazawa, M.;

- Hara, H. Crocetin Prevents Retinal Degeneration Induced by Oxidative and Endoplasmic Reticulum Stresses via Inhibition of Caspase Activity. *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *650* (1), 110–119.
- (59) Falsini, B.; Piccardi, M.; Minnella, A.; Savastano, C.; Capoluongo, E.; Fadda, A.; Balestrazzi, E.; Maccarone, R.; Bisti, S. Influence of Saffron Supplementation on Retinal Flicker Sensitivity in Early Age-Related Macular Degeneration. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **2010**, *51* (12), 6118.
- (60) Piccardi, M.; Marangoni, D.; Minnella, A. M.; Savastano, M. C.; Valentini, P.; Ambrosio, L.; Capoluongo, E.; Maccarone, R.; Bisti, S.; Falsini, B. A Longitudinal Follow-Up Study of Saffron Supplementation in Early Age-Related Macular Degeneration: Sustained Benefits to Central Retinal Function. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **2012**, 1–9.
- (61) Jabbarpoor Bonyadi, M. H.; Yazdani, S.; Saadat, S. The Ocular Hypotensive Effect of Saffron Extract in Primary Open Angle Glaucoma: A Pilot Study. *BMC Complement. Altern. Med.* **2014**, *14* (1), 399.
- (62) Abou-Hany, H. O.; Atef, H.; Said, E.; Elkashef, H. A.; Salem, H. A. Crocin Mediated Amelioration of Oxidative Burden and Inflammatory Cascade Suppresses Diabetic Nephropathy Progression in Diabetic Rats. *Chem. Biol. Interact.* **2018**, *284*, 90–100.
- (63) Menghini, L.; Leporini, L.; Vecchiotti, G.; Locatelli, M.; Carradori, S.; Ferrante, C.; Zengin, G.; Recinella, L.; Chiavaroli, A.; Leone, S.; et al. Crocus Sativus L. Stigmas and Byproducts: Qualitative Fingerprint, Antioxidant Potentials and Enzyme Inhibitory Activities. *Food Res. Int.* **2018**, *109*, 91–98.
- (64) Shirali, S.; Zahra Bathaie, S.; Nakhjavani, M. Effect of Crocin on the Insulin Resistance and Lipid Profile of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Phyther. Res.* **2013**, *27* (7), 1042–1047.
- (65) Huang, Z.; Nan, C.; Wang, H.; Su, Q.; Xue, W.; Chen, Y.; Shan, X.; Duan, J.; Chen, G.; Tao, W. Crocetin Ester Improves Myocardial Ischemia via Rho/ROCK/NF-KB Pathway. *Int. Immunopharmacol.* **2016**, *38*, 186–193.
- (66) He, S.-Y.; Qian, Z.-Y.; Tang, F.-T.; Wen, N.; Xu, G.-L.; Sheng, L. Effect of Crocin on Experimental Atherosclerosis in Quails and Its Mechanisms. *Life Sci.* **2005**, *77* (8), 907–921.
- (67) Geromichalos, G. D.; Papadopoulos, T.; Sahpazidou, D.; Sinakos, Z. Safranin, a Crocus Sativus L Constituent Suppresses the Growth of K-562 Cells of Chronic Myelogenous Leukemia. In Silico and in Vitro Study. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *74*, 45–50.
- (68) Samarghandian, S.; Shoshtari, M. E.; Sargolzaei, J.; Hossinimoghadam, H.; Farahzad, J. A. Anti-Tumor Activity of Safranin against Neuroblastoma Cells. *Pharmacogn. Mag.* **2014**, *10* (Suppl 2), S419-24.
- (69) Nair, S. C.; Kurumboor, S. K.; Hasegawa, J. H. Saffron Chemoprevention in Biology and Medicine: A Review. *Cancer Biother.* **1995**, *10* (4), 257–264.
- (70) Molnár, J.; Szabó, D.; Pusztai, R.; Mucsi, I.; Berek, L.; Ocsóvszki, I.; Kawata, E.; Shoyama, Y. Membrane Associated Antitumor Effects of Crocine-, Ginsenoside- and Cannabinoid Derivates. *Anticancer Res.* **2000**, *20* (2A), 861–867.
- (71) Kashani, L.; Raisi, F.; Saroukhani, S.; Sohrabi, H.; Modabbernia, A.; Nasehi, A.-

- A.; Jamshidi, A.; Ashrafi, M.; Mansouri, P.; Ghaeli, P.; et al. Saffron for Treatment of Fluoxetine-Induced Sexual Dysfunction in Women: Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Study. *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.* **2013**, *28* (1), 54–60.
- (72) He, S.; Qian, Z.; Tang, F. Effect of Crocin on Intracellular Calcium Concentration in Cultured Bovine Aortic Smooth Muscle Cells. *Yao Xue Xue Bao* **2004**, *39* (10), 778–781.
- (73) Williams, B. A.; Liu, C.; Deyoung, L.; Brock, G. B.; Sims, S. M. Regulation of Intracellular Ca<sup>2+</sup> Release in Corpus Cavernosum Smooth Muscle: Synergism between Nitric Oxide and cGMP. *Am. J. Physiol.* **2005**, *288* (3), C650–C658.
- (74) Safarinejad, M. R.; Shafiei, N.; Safarinejad, S. An Open Label, Randomized, Fixed-Dose, Crossover Study Comparing Efficacy and Safety of Sildenafil Citrate and Saffron (*Crocus Sativus* Linn.) for Treating Erectile Dysfunction in Men Naïve to Treatment. *Int. J. Impot. Res.* **2010**, *22* (4), 240–250.
- (75) Asai, A.; Nakano, T.; Takahashi, M.; Nagao, A. Orally Administered Crocetin and Crocins Are Absorbed into Blood Plasma as Crocetin and Its Glucuronide Conjugates in Mice. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (18), 7302–7306.
- (76) Xi, L.; Qian, Z.; Du, P.; Fu, J. Pharmacokinetic Properties of Crocin (Crocetin Digentiobiose Ester) Following Oral Administration in Rats. *Phytomedicine* **2007**, *14* (9), 633–636.
- (77) Ahn-Jarvis, J. H.; Clinton, S. K.; Grainger, E. M.; Riedl, K. M.; Schwartz, S. J.; Lee, M.-L. T.; Cruz-Cano, R.; Young, G. S.; Lesinski, G. B.; Vodovotz, Y. Isoflavone Pharmacokinetics and Metabolism after Consumption of a Standardized Soy and Soy-Almond Bread in Men with Asymptomatic Prostate Cancer. *Cancer Prev. Res.* **2015**, *8* (11), 1045–1054.
- (78) Franke, A. A.; Lai, J. F.; Halm, B. M. Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion of Isoflavonoids after Soy Intake. *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, *559*, 24–28.
- (79) Christodoulou, E.; Grafakou, M. E.; Skaltsa, E.; Kadoglou, N.; Kostomitsopoulos, N.; Valsami, G. Preparation, Chemical Characterization and Determination of Crocetin's Pharmacokinetics after Oral and Intravenous Administration of Saffron (*Crocus Sativus* L.) Aqueous Extract to C57/BL6J Mice. *J. Pharm. Pharmacol.* **2019**, *71* (5), 753–764.
- (80) Christodoulou, E.; Kakazanis, Z.; Kostomitsopoulos, N.; Dokoumetzidis, A.; Valsami, G. Pharmacokinetics of *Crocus Sativus* L. Aqueous Extract after per Os and Intravenous Administration to C57/BL6J Mice. In *Abstracts of the Annual Meeting of the Population Approach Group in Europe.*; 2015; p 24.
- (81) Hooshang Mohammadpour, A.; Ramezani, M.; Tavakoli Anaraki, N.; Malaekhe-Nikouei, B.; Amel Farzad, S.; Hosseinzadeh, H.; Anaraki, T. N.; Farzad, A. S.; Houshang Mohammadpour, A. Development and Validation of HPLC Method for Determination of Crocetin, a Constituent of Saffron. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **2013**, *16* (1), 47–55.
- (82) Umigai, N.; Murakami, K.; Ulit, M. V.; Antonio, L. S.; Shirotori, M.; Morikawa, H.; Nakano, T. The Pharmacokinetic Profile of Crocetin in Healthy Adult Human Volunteers after a Single Oral Administration. *Phytomedicine* **2011**, *18* (7), 575–578.

- (83) Gustin, D. M.; Rodvold, K. A.; Sosman, J. A.; Diwadkar-Navsariwala, V.; Stacewicz-Sapuntzakis, M.; Viana, M.; Crowell, J. A.; Murray, J.; Tiller, P.; Bowen, P. E. Single-Dose Pharmacokinetic Study of Lycopene Delivered in a Well-Defined Food-Based Lycopene Delivery System (Tomato Paste-Oil Mixture) in Healthy Adult Male Subjects. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2004**, *13* (5), 850–860.
- (84) Kyriakoudi, A.; OCallaghan, Y. C.; Galvin, K.; Tsimidou, M. Z.; O'Brien, N. M. Cellular Transport and Bioactivity of a Major Saffron Apocarotenoid, Picrocrocin (4-(β-D-Glucopyranosyloxy)-2,6,6-Trimethyl-1-Cyclohexene-1-Carboxaldehyde). *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63* (39), 8662–8668.
- (85) Parker, R. S. Absorption, Metabolism, and Transport of Carotenoids. *FASEB J.* **1996**, *10* (5), 542–551.
- (86) Lautenschläger, M.; Sendker, J.; Hüwel, S.; Galla, H. J.; Brandt, S.; Düfer, M.; Riehemann, K.; Hensel, A. Intestinal Formation of Trans-Crocin from Saffron Extract (*Crocus Sativus* L.) and in Vitro Permeation through Intestinal and Blood Brain Barrier. *Phytomedicine* **2015**, *22* (1), 36–44.
- (87) Kanakis, C. D.; Tarantilis, P. A.; Tajmir-Riahi, H. A.; Polissiou, M. G. Crocetin, Dimethylcrocetin, and Safranal Bind Human Serum Albumin: Stability and Antioxidative Properties. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55* (3), 970–977.
- (88) Jafarisani, M.; Bathaie, S. Z.; Mousavi, M. F. Saffron Carotenoids (Crocetin and Crocin) Binding to Human Serum Albumin as Investigated by Different Spectroscopic Methods and Molecular Docking. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2018**, *36* (7), 1681–1690.
- (89) Tukey, R. H.; Strassburg, C. P. Human UDP-Glucuronosyltransferases: Metabolism, Expression, and Disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2000**, *40* (1), 581–616.
- (90) Zhu, A.; Lao, C.; Wang, Z.; Chen, Y.; Bai, C. Characterization of Crocetin-Monoglucuronide as a Neuron-Protective Metabolite of Crocin-1. *Mol. Nutr. Food Res.* **2019**.
- (91) Li, X.; Feng, W.; Azhu, J.; Nima, C. Effect of Tibetan Medicine Zuotai on in Vivo Pharmacokinetics of Crocin-1 in Rats. *Chinese Tradit. Herb. Drugs* **2009**, *40*, 1425–1428.
- (92) Zhang, Y.; Fei, F.; Zhen, L.; Zhu, X.; Wang, J.; Li, S.; Geng, J.; Sun, R.; Yu, X.; Chen, T.; et al. Sensitive Analysis and Simultaneous Assessment of Pharmacokinetic Properties of Crocin and Crocetin after Oral Administration in Rats. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2017**, *1044–1045*, 1–7.
- (93) Martin, G.; Goh, E.; Neff, A. . Evaluation of the Developmental Toxicity of Crocetin on *Xenopus*. *Food Chem. Toxicol.* **2002**, *40* (7), 959–964.
- (94) Murota, K.; Shimizu, S.; Chujo, H.; Moon, J.-H.; Terao, J. Efficiency of Absorption and Metabolic Conversion of Quercetin and Its Glucosides in Human Intestinal Cell Line Caco-2. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *384* (2), 391–397.
- (95) Ahmad, N.; Ahmad, R.; Abbas Naqvi, A.; Ashafaq, M.; Alam, M. A.; Ahmad, F. J.; Al-Ghamdi, M. S. The Effect of Safranal Loaded Mucoadhesive Nanoemulsion on Oxidative Stress Markers in Cerebral Ischemia. *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* **2017**, *45* (4), 775–787.

- (96) Ali, M. S.; Al-Lohedan, H. A. Spectroscopic and Computational Evaluation on the Binding of Safranal with Human Serum Albumin: Role of Inner Filter Effect in Fluorescence Spectral Correction. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2018**, *203*, 434–442.
- (97) Kohlert, C.; van Rensen, I.; März, R.; Schindler, G.; Graefe, E. U.; Veit, M. Bioavailability and Pharmacokinetics of Natural Volatile Terpenes in Animals and Humans. *Planta Med.* **2000**, *66* (6), 495–505.
- (98) Tarantilis, P. A.; Tsoupras, G.; Polissiou, M. Determination of Saffron (*Crocus Sativus* L.) Components in Crude Plant Extract Using High-Performance Liquid Chromatography-UV-Visible Photodiode-Array Detection-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1995**, *699* (1–2), 107–118.
- (99) DuPont, M. S.; Day, A. J.; Bennett, R. N.; Mellon, F. A.; Kroon, P. A. Absorption of Kaempferol from Endive, a Source of Kaempferol-3-Glucuronide, in Humans. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2004**, *58* (6), 947–954.
- (100) Crespy, V.; Morand, C.; Besson, C.; Cotelle, N.; Vézín, H.; Demigné, C.; Rémésy, C. The Splanchnic Metabolism of Flavonoids Highly Differed According to the Nature of the Compound. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **2003**, *284* (6), G980–G988.
- (101) Matei, I.; Hillebrand, M. Interaction of Kaempferol with Human Serum Albumin: A Fluorescence and Circular Dichroism Study. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *51* (3), 768–773.
- (102) Tian, J.; Liu, J.; Tian, X.; Hu, Z.; Chen, X. Study of the Interaction of Kaempferol with Bovine Serum Albumin. *J. Mol. Struct.* **2004**, *691* (1–3), 197–202.
- (103) Ude, C.; Schubert-Zsilavec, M.; Wurglics, M. Ginkgo Biloba Extracts: A Review of the Pharmacokinetics of the Active Ingredients. *Clin. Pharmacokinet.* **2013**, *52* (9), 727–749.
- (104) Barve, A.; Chen, C.; Hebbar, V.; Desiderio, J.; Saw, C. L.-L.; Kong, A.-N. Metabolism, Oral Bioavailability and Pharmacokinetics of Chemopreventive Kaempferol in Rats. *Biopharm. Drug Dispos.* **2009**, *30*, 356–365.
- (105) Almodóvar, P.; Briskey, D.; Rao, A.; Prodanov, M.; Inarejos-García, A. Pharmacokinetics of Affron®, Commercial Saffron (*Crocus Sativus* L) Extract. In *Journal of Clinical Nutrition & Dietetics*; iMedPub: Prague, Czech Republic, 2019; Vol. 05.
- (106) Kubinyi, H. Nonlinear Dependence of Biological Activity on Hydrophobic Character: The Bilinear Model. *Farmaco. Sci.* **1979**, *34* (3), 248–276.
- (107) Hollebeeck, S.; Borlon, F.; Schneider, Y. J.; Larondelle, Y.; Rogez, H. Development of a Standardised Human in Vitro Digestion Protocol Based on Macronutrient Digestion Using Response Surface Methodology. *Food Chem.* **2013**, *138* (2–3), 1936–1944.
- (108) Caballero-Ortega, H.; Pereda-Miranda, R.; Abdullaev, F. I. HPLC Quantification of Major Active Components from 11 Different Saffron (*Crocus Sativus* L.) Sources. *Food Chem.* **2007**, *100* (3), 1126–1131.
- (109) Umigai, N.; Murakami, K.; Ulit, M. V.; Antonio, L. S.; Shirotori, M.; Morikawa, H.; Nakano, T. The Pharmacokinetic Profile of Crocetin in Healthy Adult Human Volunteers after a Single Oral Administration. *Phytomedicine* **2011**, *18* (7), 575–



578.

- (110) Karimi, E.; Oskoueian, E.; Hendra, R.; Jaafar, H. Z. E. Evaluation of Crocus Sativus L. Stigma Phenolic and Flavonoid Compounds and Its Antioxidant Activity. *Molecules* **2010**, *15* (9), 6244–6256.
- (111) Lech, K.; Witowska-Jarosz, J.; Jarosz, M. Saffron Yellow: Characterization of Carotenoids by High Performance Liquid Chromatography with Electrospray Mass Spectrometric Detection. *J. Mass Spectrom.* **2009**, *44* (12), 1661–1667.
- (112) Rodriguez-Amaya, D. A Guide to Carotenoid Analysis in Foods. **2001**.
- (113) Mohammadpour, A. H.; Ramezani, M.; Anaraki, N. T.; Malaekheh-Nikouei, B.; Farzad, S. A.; Hosseinzadeh, H. Development and Validation of Hplc Method for Determination of Crocetin, a Constituent of Saffron, in Human Serum Samples. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **2013**, *16* (1), 47–55.
- (114) Gismondi, A.; Serio, M.; Canuti, L.; Canini, A.; Chen, Y.; Zhang, H.; Tian, X.; Zhao, C.; Cai, L.; Liu, Y.; et al. Evaluation of Crocus Sativus L. Stigma Phenolic and Flavonoid Compounds and Its Antioxidant Activity. *Food Chem.* **2008**, *165* (3), 149–153.
- (115) Moraga, A. R.; Nohales, P. F.; Pérez, J. A. F.; Gómez-Gómez, L. Glucosylation of the Saffron Apocarotenoid Crocetin by a Glucosyltransferase Isolated from Crocus Sativus Stigmas. *Planta* **2004**, *219* (6), 955–966.
- (116) Sánchez, A. M.; Carmona, M.; Jarén-Galán, M.; Mínguez Mosquera, M. I.; Alonso, G. L. Picrocrocin Kinetics in Aqueous Saffron Spice Extracts (Crocus Sativus L.) upon Thermal Treatment. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59* (1), 249–255.
- (117) Carmona, M.; Zalacain, A.; Salinas, M. R.; Alonso, G. L. Generation of Saffron Volatiles by Thermal Carotenoid Degradation. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (18), 6825–6834.
- (118) Yang, I.; Jayaprakasha, G. K.; Patil, B. In Vitro Digestion with Bile Acids Enhances the Bioaccessibility of Kale Polyphenols. *Food Funct.* **2018**, *9* (2), 1235–1244.
- (119) Goh, L. M. L.; Barlow, P. J. Flavonoid Recovery and Stability from Ginkgo Biloba Subjected to a Simulated Digestion Process. *Food Chem.* **2004**, *86* (2), 195–202.
- (120) Siracusa, L.; Kulisic-Bilusic, T.; Politeo, O.; Krause, I.; Dejanovic, B.; Ruberto, G. Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Aqueous Infusions from Capparis Spinosa L. and Crithmum Maritimum L. before and after Submission to a Two-Step in Vitro Digestion Model. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59* (23), 12453–12459.
- (121) Kyriakoudi, A.; Tsimidou, M. Z.; O’Callaghan, Y. C.; Galvin, K.; O’Brien, N. M. Changes in Total and Individual Crocetin Esters upon in Vitro Gastrointestinal Digestion of Saffron Aqueous Extracts. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61* (22), 5318–5327.
- (122) Lautenschläger, M.; Sendker, J.; Hüwel, S.; Galla, H. J.; Brandt, S.; Düfer, M.; Riehemann, K.; Hensel, A. Intestinal Formation of Trans-Crocetin from Saffron Extract (Crocus Sativus L.) and in Vitro Permeation through Intestinal and Blood Brain Barrier. *Phytomedicine* **2015**, *22* (1), 36–44.
- (123) Cossignani, L.; Urbani, E.; Simonetti, M. S.; Maurizi, A.; Chiesi, C.; Blasi, F. Characterisation of Secondary Metabolites in Saffron from Central Italy. *Food Chem.* **2014**, *143*, 446–451.

- (124) Rodríguez-Roque, M. J.; Rojas-Graü, M. A.; Elez-Martínez, P.; Martín-Belloso, O. Soymilk Phenolic Compounds, Isoflavones and Antioxidant Activity as Affected by in Vitro Gastrointestinal Digestion. *Food Chem.* **2013**, *136* (1), 206–212.
- (125) Baublis, A.; Decker, E. A.; Clydesdale, F. M. Antioxidant Effect of Aqueous Extracts from Wheat Based Ready-to-Eat Breakfast Cereals. *Food Chem.* **2000**, *68* (1), 1–6.
- (126) Noguer, M.; Cerezo, A. B.; Rentzsch, M.; Winterhalter, P.; Troncoso, A. M.; García-Parrilla, M. C. Simulated Digestion and Antioxidant Activity of Red Wine Fractions Separated by High Speed Countercurrent Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56* (19), 8879–8884.
- (127) Bermúdez-Soto, M. J.; Tomás-Barberán, F. A.; García-Conesa, M. T. Stability of Polyphenols in Chokeberry (*Aronia Melanocarpa*) Subjected to in Vitro Gastric and Pancreatic Digestion. *Food Chem.* **2007**, *102* (3), 865–874.
- (128) Rahaiee, S.; Moini, S.; Hashemi, M.; Shojaosadati, S. A. Evaluation of Antioxidant Activities of Bioactive Compounds and Various Extracts Obtained from Saffron (*Crocus Sativus* L.): A Review. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52* (4), 1881–1888.