



Universidad de Jaén

Facultad de Ciencias  
Experimentales

# Caracterización del perfil fitoquímico de *Limonium quesadense*

Ana Iraly Gordo Moreno

Grado en Química

Fecha: 02/07/2024



CREA



UNIVERSIDAD  
DE JAÉN



Trabajo Fin de Grado

# Caracterización del perfil fitoquímico de *Limonium quesadense*



A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized, flowing script.

**Alumno: Ana Iraly Gordo Moreno**

**Jaén, Julio, 2024**

## INDICE

### RESUMEN/ABSTRACT

|                                                                       |           |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>                                          | <b>2</b>  |
| <b>1.1. Compuestos fenólicos. Características y propiedades. ....</b> | <b>2</b>  |
| <b>1.1.1. Ácidos fenólicos .....</b>                                  | <b>3</b>  |
| <b>1.1.2. Flavonoides .....</b>                                       | <b>5</b>  |
| <b>1.2. Género Limonium.....</b>                                      | <b>7</b>  |
| <b>1.1.3. Limonium quesadense .....</b>                               | <b>8</b>  |
| <b>1.3. Cromatografía HPCL-ESI-QTOF-MS. ....</b>                      | <b>8</b>  |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>                                              | <b>11</b> |
| <b>3. METODOLOGÍA .....</b>                                           | <b>12</b> |
| <b>3.1. Identificación de las muestras. ....</b>                      | <b>12</b> |
| <b>3.2. Pretratamiento y tratamiento de las muestras.....</b>         | <b>13</b> |
| <b>1.1.4. Pretratamiento.....</b>                                     | <b>13</b> |
| <b>1.1.5. Tratamiento.....</b>                                        | <b>15</b> |
| <b>3.3. Material y aparatos.....</b>                                  | <b>18</b> |
| <b>3.4. Instrumentación. ....</b>                                     | <b>19</b> |
| <b>4. RESULTADOS .....</b>                                            | <b>20</b> |
| <b>4.1. Caracterización de compuestos. ....</b>                       | <b>20</b> |
| <b>4.2. Cromatograma.....</b>                                         | <b>23</b> |
| <b>4.3. Mapa de calor.....</b>                                        | <b>25</b> |
| <b>5. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....</b>                           | <b>27</b> |
| <b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>                                          | <b>28</b> |
| <b>7. ANEXOS .....</b>                                                | <b>32</b> |

## RESUMEN

Las plantas suponen una gran fuente de compuestos bioactivos, especialmente de polifenoles, bien conocidos por su actividad antioxidante entre otros muchos beneficios para la salud. En el presente Trabajo de Fin de Grado se ha llevado a cabo la determinación del perfil fenólico de la planta *Limonium quesadense*. Para ello se recogieron muestras de plantas en cinco localizaciones diferentes situadas en las localidades de Priego de Córdoba (Córdoba) y Alcaudete (Jaén), se obtuvieron sus extractos fenólicos con metanol y se analizó su composición empleando la técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-ESI-QTOF-MS). Se identificaron un total de veintinueve compuestos, que consistían mayoritariamente en ácidos fenólicos y flavonoides, y se comprobó cuáles eran los principales compuestos para poder llevar a cabo una comparación con otras especies del género *Limonium*.

**Palabras clave:** composición fenólica, HPLC-ESI-QTOF-MS, *Limonium quesadense*.

## ABSTRACT

Plants are a great source of bioactive compounds, especially polyphenols, which are well-known for their antioxidant activity, among other health benefits. In the present Final Degree Project, the phenolic profile of the plant *Limonium quesadense* was determined. Plant samples were collected from five different locations in Priego de Córdoba (Córdoba) and Alcaudete (Jaén), their phenolic extracts were obtained with methanol, and their composition was analyzed using High-Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (HPLC-ESI-QTOF-MS). Twenty-nine compounds were identified, consisting mainly of phenolic acids and flavonoids. The obtained composition was checked against the results previous reported in other species of the genus *Limonium*.

**Keywords:** phenolic composition, HPLC-ESI-QTOF-MS, *Limonium quesadense*.

## 1. INTRODUCCIÓN

El estudio del perfil fitoquímico de nuevas plantas para fines medicinales se fundamenta en la caracterización de los compuestos bioactivos presentes en las mismas. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), una planta medicinal es aquella especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser utilizadas con propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos (Oliveira Miranda, 2005). La investigación de especies vegetales contribuye a resaltar la importancia de la diversidad biológica, así como su preservación.

### 1.1. Compuestos fenólicos. Características y propiedades.

Han sido identificados más de 200.000 compuestos químicos procedentes de especies vegetales, clasificándose en dos grupos: metabolitos primarios, aquellos encargados del desarrollo y crecimiento de la planta, y metabolitos secundarios, esenciales para la supervivencia, ya que cumplen funciones tales como la absorción de nutrientes y la reproducción, desempeñando un papel protagónico en la fisiología de la planta (Bennett & Wallsgrove, 1994). Atendiendo a las rutas biosintéticas que originan los metabolitos secundarios se establecen tres grupos: los terpenos, las sustancias fenólicas y los compuestos con nitrógeno (Korkina, 2007).

Los compuestos fenólicos, también llamados polifenoles, son metabolitos secundarios de bajo y medio peso molecular que son sintetizados durante la etapa de desarrollo de la planta. Entre sus principales funciones, se encuentran la protección contra patógenos y la radiación ultravioleta procedente del sol. Son sustancias antioxidantes y contribuyen, además, al color y características sensoriales de las especies vegetales, proporcionando diferentes aromas y sabores.

En cuanto a su estructura química, los polifenoles se caracterizan por tener uno o más grupos hidroxilo ( $\text{—OH}$ ), de reacción ácida, unidos, al menos, a un anillo aromático. El comportamiento ácido es debido a que el oxígeno del grupo hidroxilo está fuertemente unido al anillo fenilo, mientras que la debilidad del enlace  $\text{O—H}$  permite la disociación de un protón, que se libera al medio originando un ión fenolato cargado negativamente (Bowsher, 2008).

### 1.1.1. Ácidos fenólicos

Son derivados del ácido benzoico (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) y del ácido cinámico (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>). Los ácidos hidroxibenzoicos (tabla 1) se caracterizan por la presencia de un grupo carboxilo sustituido en un fenol, son abundantes en la naturaleza de forma libre, como ácidos (p.e. ácido gálico) o aldehídos (p.e. vanilina). Los ácidos hidroxicinámicos (tabla 2), también se encuentran de forma libre (p.e. ácido caféico) o esterificados con azúcares o alcoholes alifáticos entre otros compuestos (p.e. ácido cafeil-tartárico). Constituyen sobre un tercio de los compuestos fenólicos de la dieta humana, siendo los más abundantes los derivados hidroxicinámicos, presentes en una gran variedad de alimentos como legumbres, café, cereales y frutas. Además, son más efectivos en términos de capacidad antioxidante y han mostrado actividad antígeno tóxica y antiproliferativa en células (Mauricio Peñarrieta, 2014).

Tabla 1.- Principales ácidos derivados del ácido benzoico.

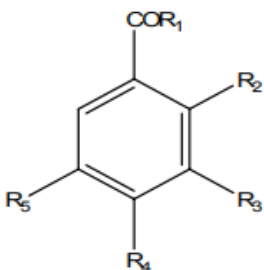
| Ácidos Benzoicos; C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>                                    | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub>   | R <sub>4</sub>   | R <sub>5</sub>   |                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------|----------------|------------------|------------------|------------------|----------------------|
|  | OH             | H              | OH               | OH               | OH               | Ácido gálico         |
|                                                                                     | OH             | OH             | H                | H                | H                | Ácido salicílico     |
|                                                                                     | OH             | H              | OH               | OH               | H                | Ácido protocatéquico |
|                                                                                     | OH             | H              | OCH <sub>3</sub> | OH               | H                | Ácido vanílico       |
|                                                                                     | OH             | H              | OCH <sub>3</sub> | OH               | OCH <sub>3</sub> | Ácido siringico      |
|                                                                                     | H              | H              | OCH <sub>3</sub> | OH               | H                | Vanillina            |
|                                                                                     | H              | H              | H                | OCH <sub>3</sub> | H                | Anisaldehído         |

Tabla 2.- Principales ácidos derivados del ácido cinámico.

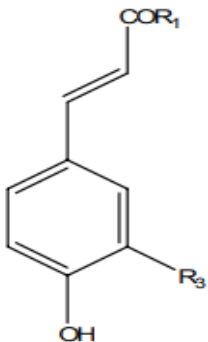
| Ácidos Cinámicos; C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>                                    | R <sub>1</sub>  | R <sub>3</sub>   |                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|------------------|------------------------|
|  | OH              | OH               | Ácido caféico          |
|                                                                                     | OH              | H                | Ácido p-cumárico       |
|                                                                                     | OH              | OCH <sub>3</sub> | Ácido ferúlico         |
|                                                                                     | Ácido tartárico | OH               | Ácido cafeil-tartárico |
|                                                                                     | Ácido quínico   | OH               | Ácido clorogénico      |
|                                                                                     |                 |                  |                        |

Diagrama de síntese de compostos fenólicos:

- Ácido shikímico → L-Fenilalanina
- L-Fenilalanina → Ácido cinâmico (via PAL)
- Ácido cinâmico → Ácido benzoico (via Ox)
- Ácido cinâmico → Ácido p-cumárico (via C4H)
- Ácido benzoico → Ácido p-hidroxibenzoico (via B4H)
- Ácido p-hidroxibenzoico → Ácido protocatecuico (via pHB3H)
- Ácido p-hidroxibenzoico → Ácido gálico (via pHB3H)
- Ácido protocatecuico → Ácido vanílico (via P3OMT)
- Ácido protocatecuico → Ácido gálico (via P5H)
- Ácido vanílico → Ácido siringico (via V5H/V5OMT)
- Ácido p-cumárico → Ácido cafeico (via pC3H)
- Ácido cafeico → Ácido ferúlico (via COMT-1)
- Ácido ferúlico → Ácido sinápico (via F5H/COMT-1)
- Ácido sinápico → 4-Cumaril coenzima A (via 4CL)
- 4-Cumaril coenzima A → SCoA

pág. 4

Los ácidos fenólicos más comunes son el caféico y el *p*-cumárico, que suponen entre el 75% y el 100% de los hidroxicinámicos hallados en frutas, mientras que el ácido más representativo dentro de los hidroxibenzoicos es el gálico y sus derivados.

### 1.1.2. Flavonoides

La estructura general comprende un anillo A, un anillo B y tres átomos que unen ambos anillos, conformando un esqueleto del tipo C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Son los compuestos fenólicos más abundantes, ya que están presentes en todo el reino vegetal y se encuentran en concentraciones elevadas en la epidermis de las hojas y la piel de los frutos. Suelen almacenarse unidos a una o varias moléculas de azúcar (glucósidos), formando una estructura más estable que en su forma libre (denominada aglicona).

Si la estructura conforma un heterociclo (pirona), da lugar a los compuestos mayoritarios, que engloban flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles y antocianinas (fig. 2).

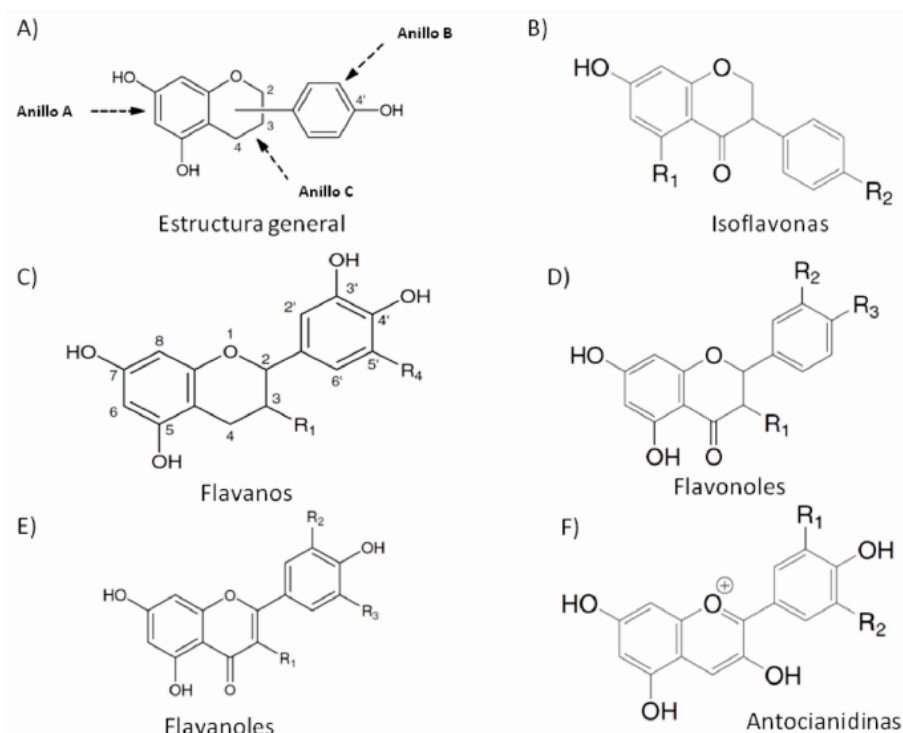


Figura 2.- Estructura de los principales flavonoides. En A) Estructura general de los flavonoides, B) Isoflavonas, C) Flavanos, D) Flavonoles, E) Flavanoles y F) Antocianidinas. (Limón, 2010).

La capacidad antioxidante de los flavonoides está directamente relacionada con el número y posición de los grupos hidroxilo en la molécula; un incremento en el número de grupos oxhidrilo implica una mayor actividad antioxidante. La pérdida de un grupo hidroxilo decrece la actividad ligeramente, mientras que la pérdida de dos grupos hidroxilo decrece significativamente la actividad. Además, la glicosilación resulta en una menor actividad antioxidante para algunos flavonoides como la quercetina; la adición de un grupo de azúcar disminuye la actividad de la aglicona y la adición de un segundo grupo decrece aún más la actividad, probablemente debido al impedimento estérico (Cartea, 2011).

### Isoflavonas

Están presentes como glicósidos y, en consecuencia, son compuestos altamente polares. Derivan de la unión de un precursor aromático con un alifático, lo que conlleva a su estructura característica compuesta por dos anillos bencénicos unidos por un anillo pirano heterocíclico. Su estructura química es muy similar a la de los estrógenos humanos, y numerosos estudios han demostrado que una dieta rica en isoflavonas reduce significativamente los síntomas pre y post menopáusicos en las mujeres, además de reducir el riesgo de cánceres como el de próstata y mama, al inhibir la angiogénesis (Ludueña, 2007). Se encuentran en más de 200 especies vegetales, especialmente en la soja y sus derivados.

### Flavanos y flavanoles

Su estructura de dihidroflavona posee un anillo C saturado. Los más destacados son la catequina y la epicatequina. Los flavanoles poseen hidroxilos adicionales, encontrándose compuestos como epicatequina galato. Presentes en el té verde, vino tinto, chocolate y algunas frutas.

### Flavonoles

Son el tipo de flavonoides más abundante, ya que se encuentran en verduras, semillas, productos lácteos y especias. Ejemplo de ellos son la quercetina, kaempferol y miricetina.

## Antocianidinas

Son las responsables de los colores rojo, morado y azul presentes en frutos como las cerezas y las ciruelas. Cuando la aglicona se conjuga con una o más unidades de azúcar, se trata entonces de antocianinas.

Se muestra un esquema-resumen con las principales familias que conforman los compuestos fenólicos y algunos ejemplos (fig. 3).

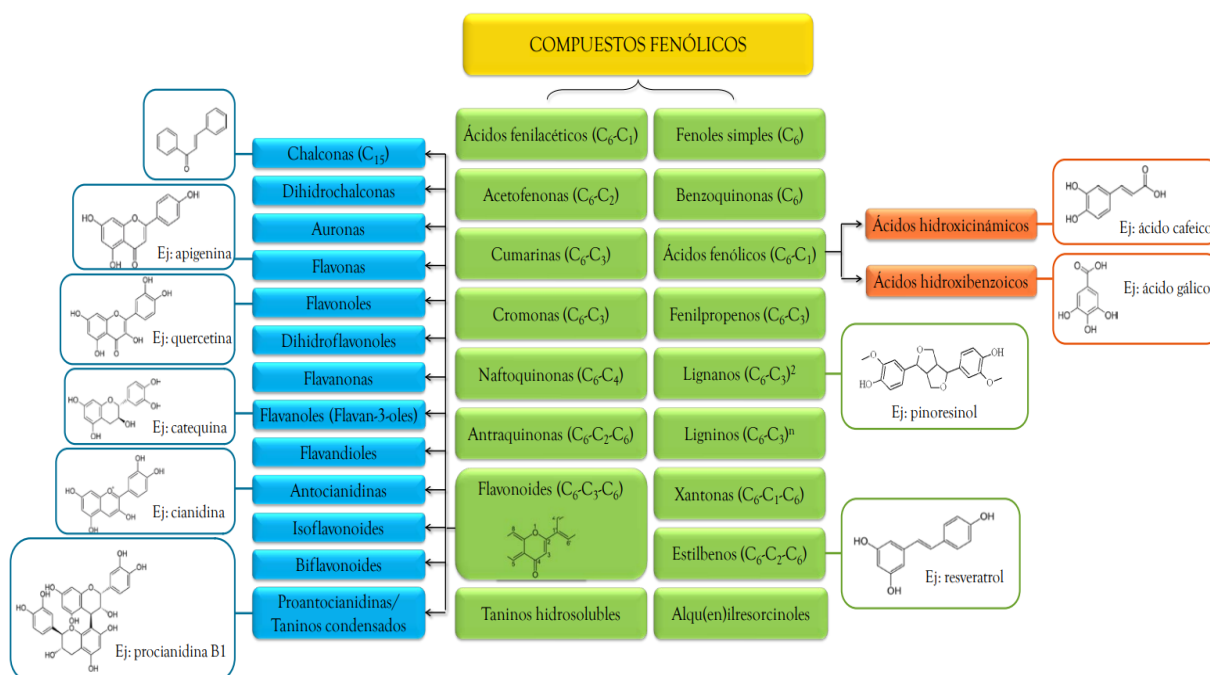


Figura 3.- Principales familias de los compuestos fenólicos (López Cobo, 2017).

## 1.2. Género Limonium.

El género *Limonium* ("lavanda del mar") se trata del más representativo dentro de la familia *Plumbaginaceae*, que engloba unas 600 especies. La mayor parte de los táxones se distribuyen en las áreas secas y salinas de las regiones mediterránea y macaronésica, aunque podemos encontrar especies en prácticamente todo el mundo (Kubitzki, 1993).

La mayor parte de las especies son plantas perennes con rosetas cortamente ramificadas, que emiten tallos floríferos de desarrollo estacional. Generalmente, los limonios son plantas totalmente glabras, es decir, carecen de indumento en todas sus partes. No obstante, algunas especies presentan cierta pilosidad o algún tipo de papilas en sus órganos, permitiendo una clasificación en

grandes grupos y la detección de introgresiones híbridativas en poblaciones donde conviven distintas especies (Crespo Villalba & Lledó Barrena, 1998).

#### 1.1.3. *Limonium quesadense*

Se trata de una especie endémica de la provincia de Jaén, cuyas hojas son de color verde azulado a verde violáceo. Florece de junio a agosto, desarrollando tallos de 20 a 50 centímetros con espigas de 7 a 20 milímetros y espiguillas de 4.5 a 5 milímetros (fig. 4). Forma parte de la vegetación halófila continental y los matorrales gipsófilos en el valle del Guadiana Menor entre 500 y 700 metros sobre el nivel del mar. Es considerada una planta “en peligro de extinción” (Ruiz-Riaguas, 2020).



Figura 4.- *L. quesadense*: a) hábito, b) porción apical de una ramilla de la inflorescencia, c) brácteas externas, d) brácteas medias, e) bráctea interna, f) cáliz, g) limbo del cáliz extendido.

### 1.3. Cromatografía HPCL-ESI-QTOF-MS.

Existen diversas técnicas cromatográficas para el análisis de componentes bioactivos, aunque predomina la cromatografía mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography), al ofrecer una mayor reproducibilidad, versatilidad y precisión en cuanto a separación y cuantificación de compuestos fenólicos (Vichapong, 2010).

La cromatografía de fase inversa, que es la utilizada en este trabajo de fin de grado, se basa en las interacciones resultantes de las fuerzas repulsivas entre un disolvente de polaridad moderada, un compuesto relativamente apolar y una fase estacionaria apolar. Además, se emplea en modo gradiente, variando la composición de la fase móvil de forma gradual durante el análisis en función de la hidrofobicidad de los analitos. El gradiente utilizado es de agua/acetonitrilo, por lo que los compuestos más hidrofílicos (afines al agua) eluyen cuanto mayor sea la concentración de agua, mientras que los más hidrofóbicos eluyen al elevarse la concentración de acetonitrilo.

Se muestra un esquema con los componentes de un HPLC (fig. 5), distinguiendo las siguientes partes: reservorios de fase móvil (1), degasificador (2), bomba de alta presión (3), inyector (4), precolumna (5), columna analítica (6), detector (7), colector de desechos (8) y el sistema de datos cromatográficos (9).

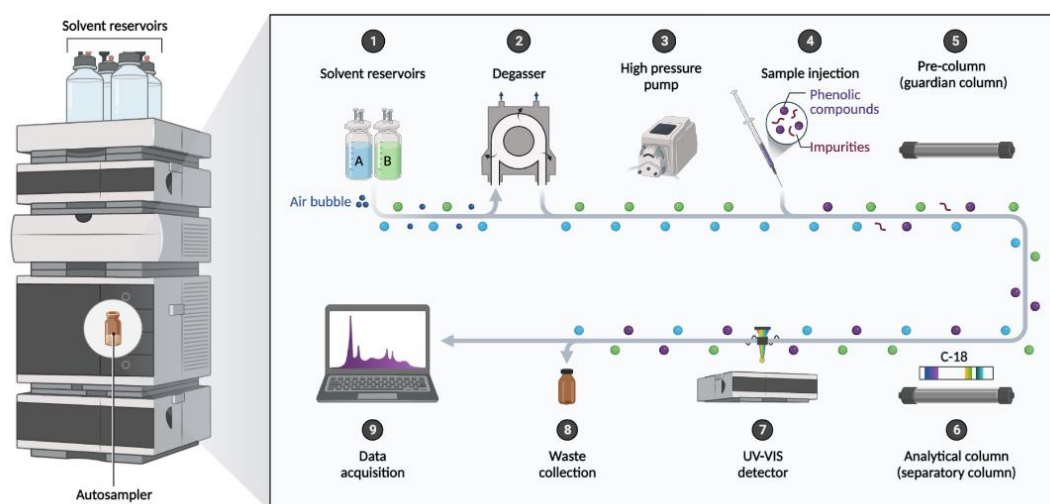


Figura 5.- Componentes de un HPCL (imagen creada por Kristina Grozic en BioRender).

Los detectores de HPLC precisan de dos requisitos: responder ante muestras líquidas y hacerlo en régimen de flujo continuo. Hay muchas formas de clasificar los detectores, siendo la más habitual el hacerlo por su fundamento instrumental, diferenciando entonces entre detectores ópticos (UV-VIS, diodo array, fluorimétricos...), eléctricos (electroquímicos, conductimétricos), específicos (radiométricos, viscosimétricos) y de detección híbrida, acoplando otras técnicas (LC-RMN, LC-ICP...), como el espectrómetro de masas en este caso.

## Espectrometría de masas

Un problema importante del acoplamiento de la espectrometría de masas (fig. 6) con la cromatografía de líquidos es el contraste entre los requerimientos de vacío de la primera, con los grandes volúmenes de disolvente que necesita la segunda. Para solucionarlo, se utilizan interfases que permiten la transferencia eficiente de los analitos desde la fase líquida a la gaseosa. Las técnicas que se usan en la actualidad para la introducción y análisis de muestras líquidas pueden clasificarse en dos grupos: las que sólo introducen la muestra líquida en la fuente iónica del instrumento (PB: Particle Beam) y las que además consiguen la ionización de esta (ESI: Electrospray Ionization, entre otras).



Figura 6.- Esquema general de un espectrómetro de masas (elaboración propia).

En cuanto a la fuente de iones, pueden distinguirse dos categorías: fuentes de fase gas, en las que las muestras son primero volatilizadas y posteriormente sus componentes gaseosos se ionizan de diferentes formas; y fuentes de desorción, en la que se prescinde de la vaporización y requiere del uso de sonda. Una ventaja de la ionización por desorción es que permite analizar moléculas no volátiles y térmicamente inestables. Otra posible clasificación es en dura y blanda: fuente de impacto de electrones y fuente de ionización química, respectivamente. Ambas resultan en espectros diferentes entre sí, pero muy útiles, pues mientras que los espectros sencillos de las fuentes blandas permiten la determinación exacta del peso molecular, los espectros más complejos permiten una identificación inequívoca del mismo. Las fuentes de ionización generan un haz de iones positivos o negativos, que es acelerado en el analizador de masas. Las más utilizadas para el análisis de compuestos fenólicos son: la ionización por electrospray (ESI), idónea para ionizar moléculas antioxidantes polares; la ionización química a presión atmosférica (APCI), para moléculas de menor polaridad; y la ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI), muy

empleada para proteínas y péptidos, es decir, compuestos de elevado peso molecular (Tsao & Deng, 2004).

La función del analizador de masas es semejante a la de la rejilla de un espectrómetro óptico, aunque la dispersión en este caso está basada en las relaciones masa/carga de los iones del analito y no en la longitud de onda de los fotones. Existen varios tipos de analizadores: los de sector magnético, de trampa de iones (IT-MS, ion-trap MS o ITD), de tiempo de vuelo (TOF), filtros de masas de cuadrupolo (Q) y de resonancia ciclotrónica por transformada de Fourier. Una de las ventajas de utilizar analizadores de trampa iónica es la de realizar análisis de MS<sup>n</sup> para conocer la estructura de los compuestos. Esta técnica consiste en dos etapas; la primera, en la que los iones se aíslan para ser fragmentados, y la segunda, en la que se induce su disociación por colisión con las moléculas de un gas inerte, produciendo nuevos fragmentos. Es muy útil para caracterizar los azúcares unidos a los compuestos fenólicos, sin embargo, carece de la alta resolución que proporciona el analizador de tiempo de vuelo (Fulcrand, 2008).

En este trabajo se emplea, por un lado, el analizador de masas de cuadrupolo y, por otro, el analizador de tiempo de vuelo, lo que nos permite conocer la masa exacta de los compuestos y, por tanto, su fórmula molecular al ser un espectrómetro de masas de alta resolución. El analizador de cuadrupolo, debido a que funciona por supresión selectiva de iones, también se le llama filtro de masas, siendo parecido a un filtro de banda estrecha variable que en determinadas condiciones transmite únicamente iones de un pequeño intervalo de relaciones  $m/z$ . En cuanto al analizador de tiempo de vuelo, este se basa en la medición del tiempo que tardan los iones en recorrer una distancia conocida después de ser acelerados por un campo eléctrico.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo de fin de grado es la determinación del perfil fitoquímico de la especie vegetal *Limonium quesadense*, principalmente los polifenoles, cuyas principales familias son ácidos fenólicos y flavonoides. Actualmente, existe un gran interés por el empleo de productos de origen vegetal con fines medicinales, ya sea para su incorporación en la dieta, actuando en el marco de

la medicina preventiva, así como fuente natural para la obtención de compuestos biológicamente activos que sustituyan a los desarrollados sintéticamente.

El objetivo secundario es evaluar si hay variaciones en el perfil fenólico de la planta seleccionada dependiendo de la ubicación geográfica y el grado de exposición solar durante su crecimiento.

### 3. METODOLOGÍA

A continuación, se describe cómo se ha realizado el análisis y caracterización de los compuestos fenólicos presentes en la especie *L. quesadense*. Se detalla el trabajo realizado tanto en laboratorio, como posteriormente en el tratamiento de los datos obtenidos.

#### 3.1. Identificación de las muestras.

Se analizan 5 muestras procedentes de localizaciones diferentes: dos de ellas de Priego de Córdoba, ciudad de la provincia de Córdoba, y las tres restantes de Alcaudete, situado en la provincia de Jaén. Ambos municipios pertenecen a la comarca Subbética, donde encontramos el Parque Natural de las Sierras Subbéticas, región conocida por su paisaje montañoso y su patrimonio histórico-cultural.

Las muestras procedentes de Alcaudete pertenecen a dos ubicaciones distintas. Parte de las hojas se recogieron en un talud de la Vía Verde, mientras que el resto proceden de la Laguna Honda (fig. 7), una Reserva Natural localizada al suroeste de la provincia de Jaén, en el paraje de Tumbalagraja. La zona se encuentra rodeada de grandes superficies de terrenos agrícolas de secano, se inunda con las primeras lluvias del otoño y se mantiene con una pequeña cantidad de agua hasta la primavera, por lo que se trata de una laguna estacional.



Figura 7.- Laguna Honda (Alcaudete, s.f.).

A su vez, todas las muestras (a excepción de las extraídas del talud) se recogen por duplicado, diferenciando si la planta se encontraba en zonas más sombrías o expuestas al sol. Se quiere ver si hay influencia del microclima e impacto del estrés ambiental que puedan afectar a la abundancia de los compuestos fenólicos.

### **3.2. Pretratamiento y tratamiento de las muestras.**

La extracción de los compuestos bioactivos de interés va a depender, fundamentalmente, de la matriz de la muestra. Por esta razón, se hace necesario realizar un secado (liofilización), molienda y homogeneización previos al proceso de extracción.

#### **1.1.4. Pretratamiento**

Las muestras, previamente recogidas y seleccionadas, se conservan en bolsas con cierre hermético aptas para congelador, ya que mantenerlas a baja temperatura evita que los polifenoles se degraden. En primer lugar, las hojas son liofilizadas, aunque previamente se determina su porcentaje de humedad (Anexo I) empleando para ello un analizador de humedad (fig. 8).



Figura 8.- Analizador de humedad Radwag MA-50.R.

El proceso de liofilización es uno de los métodos más usados para eliminar el agua presente en muestras biológicas. Este método de deshidratación consiste en la congelación de la muestra y posterior sublimación de la fracción de hielo (fig. 9). Se desarrolla, por tanto, en dos etapas: la primera, que consiste en congelar la muestra a temperaturas

inferiores a  $-40^{\circ}\text{C}$  y la segunda, en la que se somete a vacío de aproximadamente 10 milímetros de mercurio de presión, provocando la sublimación del hielo, obteniendo la muestra en un estado prácticamente anhidro. Este método no altera la composición ni propiedades de los compuestos, ya que detiene la actividad microbiológica, así como los procesos de degradación, proporcionando un resultado de mayor calidad (Sagar & Suresh Kumar, 2010).

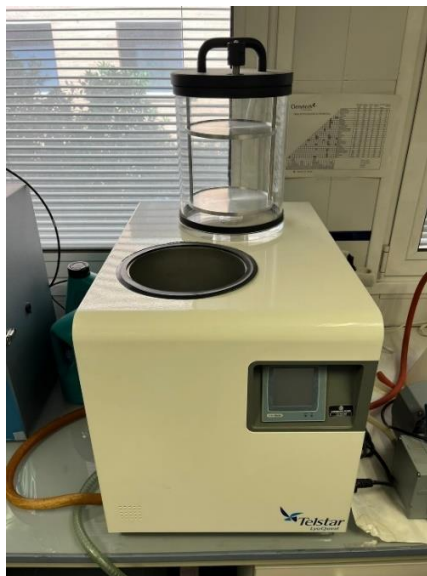


Figura 9.- Liofilizador Telstar LYOQUEST-55.

Finalmente, son trituradas empleando el molinillo de café (voltaje nominal: 125-200V, frecuencia: 50 Hz, potencia: 160W), conservadas en duquesitas de plástico y almacenadas para su posterior extracción (fig. 10).



Figura 10.- Proceso de trituración y homogeneización de las muestras.

#### 1.1.5. *Tratamiento*

Como se ha mencionado anteriormente, para aislar los compuestos fenólicos de otras sustancias existentes en la matriz de las muestras, se lleva a cabo una extracción. En esta experiencia, se lleva a cabo una extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos (UAE).

La extracción sólido-líquido consiste en un proceso de transferencia de materia mediante el cual el analito de interés pasa desde la matriz del sólido hasta el seno de la fase líquida. Tiene lugar en dos fases: la primera, de lavado, en la que se produce una transferencia rápida desde la superficie del sólido al disolvente; y la segunda, desde el interior del sólido, mediante difusión. La segunda etapa es el paso limitante del proceso, debido a la resistencia de la fase sólida (tejido vegetal). No existe una metodología universal capaz de recuperar todos los compuestos bioactivos, por lo que el rendimiento de la extracción es función de las condiciones experimentales y del material del que se parte (Pinelo, 2005).

##### Extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos

Conlleva tiempos de extracción más cortos, necesitando menos solventes orgánicos y reduciendo el consumo de energía. Esta técnica, también llamada sonoquímica, se fundamenta en el fenómeno de la cavitación, que implica la formación, crecimiento y colapso de burbujas de vapor o gas inducidas por la acción de un campo ultrasonoro dentro de un líquido. Las ondas de alta frecuencia penetran en el disolvente, provocando un incremento de la solubilidad de los compuestos fenólicos que se encuentran en el líquido.

La sonda ultrasonidos (fig. 11) rompe la pared celular, reduce el tamaño de las partículas e incrementa la masa que se transfiere a través de las membranas, por lo que facilita la rehidratación del tejido y la abertura de los poros por los que serán extraídos los compuestos de interés. Al reducir el tamaño de partícula, se incrementa el área de contacto entre el disolvente y la fase sólida, favoreciendo la transferencia de masa de los componentes solubles, mediante procesos osmóticos y de difusión (Rodríguez-Riera, 2014).



Figura 11.- Sonda de ultrasonidos QSonica Sonicators.

Para llevarla a cabo, se pesa en torno a 2.5 gramos de muestra (previamente liofilizada y triturada). Posteriormente, se disuelve en 50 mililitros de etanol y se introduce la sonda, durante 10 minutos y con una amplitud del 50%.

Transcurrido este tiempo, las muestras se filtran por gravedad (fig. 12) y se llevan a sequedad en el rotavapor, por lo que se filtra directamente sobre matraces de fondo redondo.



Figura 12.- Filtración por gravedad.

### Evaporador rotatorio

Anteriormente se ha comentado que, tras filtrar las muestras, éstas son llevadas a sequedad, empleando para ello un evaporador rotatorio. La finalidad de este paso es intentar eliminar todo el disolvente empleado en la extracción para conservar únicamente el extracto de las hojas, donde se encuentran los polifenoles. El rotavapor (fig. 13) permite concentrar el extracto etanólico, permitiendo la evaporación del solvente bajo presión reducida (337 mbar) y a bajas temperaturas (40°C en vapor).



Figura 13.- Rotavapor Heidolph Hei-VAP. Las condiciones del equipo se consultan en una tabla facilitada por el fabricante.

En cuanto al desarrollo de este trabajo, las muestras estuvieron evaporando el contenido en alcohol durante media hora cada una, siendo en algunos casos necesario el empleo de una corriente de nitrógeno para acelerar el secado (Anexo II). El extracto vegetal se rascó con una espátula y se almacenó en tubos Eppendorf, que fueron sellados con celo y conservados en frío.

### Redisolución

Finalmente, parte del extracto (entre 5 y 10 miligramos, pesados en balanza analítica) se disuelve en 1 mililitro de metanol-agua (7:3). La disolución se pasa por filtros PTFE de 0.45 µm de membrana. Este paso

se realiza para preparar la muestra de cara al análisis mediante HPCL-ESI-QTOF-MS, siendo necesario el uso del baño de ultrasonidos (fig. 14) en algunas de las muestras para facilitar la disolución.



Figura 14.- Baño de ultrasonidos Bandelin SONOREX DIGITAL 10P.

### 3.3. Material y aparatos.

A continuación, en la tabla (tabla 3) se recoge todo el material utilizado para la preparación de las muestras en el laboratorio. Finalmente, para su medición se recurre a los servicios del CICT, el Centro de Instrumentación Científico-Técnica de la Universidad de Jaén.

Tabla 3.- Material y aparatos.

|                                                   |                                               |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Balanza analítica                                 | Sartorius CPA225D<br>(inv. 117998)            |
| Analizador de humedad                             | Radwag MA-50.R                                |
| Molinillo de café                                 | Taurus INOX                                   |
| Baño ultrasónico                                  | Bandelin SONOREX DIGITAL<br>10P (inv. 117951) |
| Liofilizador                                      | Telstar LYOQUEST-55<br>(inv. 143504)          |
| Sonda de ultrasonidos                             | Qsonica Sonicators                            |
| Rotavapor                                         | Heidolph Hei-VAP<br>(inv. 136687)             |
| Matraces Erlenmeyer esmerilado 50 mL (x5)         |                                               |
| Matraces de fondo redondo esmerilados 100 mL (x5) |                                               |
| Micropipeta monocanal y puntas desechables        |                                               |
| Tubos Eppendorf y viales para HPLC                |                                               |
| Filtros PTFE 0.45 $\mu$ m y jeringas              |                                               |

### 3.4. Instrumentación.

El equipo empleado es el cromatógrafo de líquidos de alta resolución (fig. 15) Agilent 1200 (Agilent Technologies, Sta Clara, CA, EE. UU.) acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 6530B con fuente de ionización por electro spray (ESI) y analizadores de iones de cuadrupolo (Q) y otro de tiempo de vuelo (TOF) que pueden hacerse trabajar en tándem para experimentos de masas/masas (MS/MS o MS<sup>2</sup>), hasta 3200 umas (SCAI, s.f.).



Figura 15.- Espectrómetro de masas QTOF-HPLC/CE.

Para la separación de los compuestos se utiliza una columna Luna Omega Polar C18 de fase inversa (la fase estacionaria es apolar y la móvil de polaridad moderada) de 150 × 3.0 mm y tamaño de partícula de 5 µm (Phenomenex, Torrance, CA, EE. UU.) con una precolumna de seguridad de 4 × 3.0 mm. El sistema de fase móvil que se emplea consiste en: el solvente, agua acidificada con ácido fórmico 0.1% v/v (eluyente A) y un disolvente orgánico polar, mezcla de acetonitrilo y ácido fórmico 0.1% (eluyente B). La acidificación evita la ionización de los compuestos fenólicos (Tsao & Deng, 2004).

Para la determinación de los compuestos se utiliza el sistema de elución en gradiente, debido a la complejidad del extracto vegetal. Este método se lleva a cabo variando continuamente la composición de los disolventes, de manera que su fuerza vaya aumentando durante el análisis (San Cristóbal, 2011). Las condiciones son: 10-25% B en 0-25 min, 25% B en 25-30 min y 25-100% B en 30-35 min; el eluyente B se retorna al 10% con un tiempo de estabilización de 7 min. La velocidad de flujo es de 0.4 mL·min<sup>-1</sup>.

Se utiliza la fuente de ionización (ESI) en modo negativo, ya que este parámetro ha demostrado resultados más sensibles y una mayor eficiencia. Las condiciones son: voltaje de 3500 V, presión del nebulizador de 45 psi, flujo de gas de secado de 10 L·min<sup>-1</sup>, temperatura del gas de 325 °C, voltaje del skimmer de 60 V y voltaje del fragmentador 140 V. Se realiza una calibración interna continua durante los análisis empleando señales a  $m/z$  112.9855 y 1033.9881. Los modos MS y Auto MS/MS (utilizando energías de colisión de 10, 20 y 40 V) se ajustan para adquirir valores de  $m/z$  comprendidos entre 50 y 1200, a una velocidad de barrido de 2 y 3 espectros por segundo, respectivamente (Stefanucci, 2024).

Para el procesamiento de datos se utiliza el software Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis versión B.06.00. A partir de los ficheros facilitados por el CICT, se extraen los cromatogramas de las diferentes muestras. Se trabaja con los picos de mayor intensidad, pues son los que presentan mayor abundancia (fig. 16).

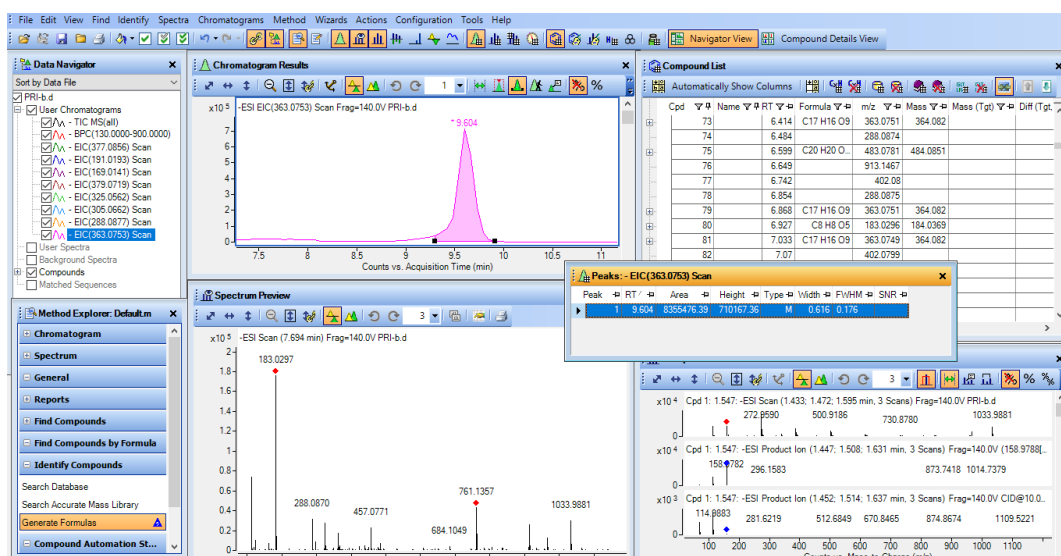


Figura 16.- Ejemplo de integración de picos de forma manual en Mass Hunter.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caracterización de compuestos.

El análisis de los espectros de masas denotó la presencia de un total de 29 compuestos fenólicos en las muestras analizadas (tabla 4). Para la caracterización de los picos que aparecen en los distintos cromatogramas se han

utilizado datos de masas exactas y sus respectivas fragmentaciones, apoyados en una búsqueda bibliográfica, así como el uso de estándares analíticos.

Tabla 4.- *Muestras y sus códigos.*

|                   | Localización | Código |
|-------------------|--------------|--------|
| Priego de Córdoba | Sol          | PRI-a  |
|                   | Sombra       | PRI-b  |
| Alcaudete         | Sol          | ALC-a  |
|                   | Sombra       | ALC-b  |
|                   | Talud        | ALC-t  |

En la siguiente tabla (tabla 5) se muestra cada uno de los compuestos identificados, enumerados según el orden de elución (tiempo de retención), la relación  $m/z$  correspondiente al ion molecular desprotonado ( $[M-H]^-$ ), la fórmula molecular, la diferencia entre la masa teórica y experimental (ppm), los fragmentos, el nombre del compuesto y la muestra en la que se encuentra. Algunas pérdidas principales que se pueden encontrar a la hora de identificar este tipo de compuestos suelen ser de restos de azúcar, como hexósido, desoxihexósido, pentósido, rutinósido y glucurónido, cuyas pérdidas son -162, -146, -132, -308 y -176 Da, respectivamente (Llorent-Martínez, 2015).

Tabla 5.- *Caracterización de los compuestos encontrados en el análisis del extracto de L. quesadense mediante Q-TOF.*

| N <sup>a</sup> | t <sub>R</sub><br>(min) | [M-H] <sup>-</sup> | Fórmula<br>molecular                              | Error<br>(ppm) | Fragmentos                                                                             | Compuesto                   | Muestra |
|----------------|-------------------------|--------------------|---------------------------------------------------|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|---------|
| 1              | 1.746                   | 377.0856           | C <sub>12</sub> H <sub>23</sub> ClO <sub>11</sub> | -0.59          | 341.1079,<br>179.0544,<br>161.0437,<br>143.0303,<br>131.0387,<br>119.0360,<br>113.0216 | Disacárido (aducto<br>HCl)  | Todas   |
| 2              | 1.914                   | 191.0193           | C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>      | 3.81           | 173.0068,<br>129.0187,<br>111.0079,<br>87.0086,                                        | Ácido cítrico               | Todas   |
| 3              | 2.424                   | 191.0194           | C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>      | 1.79           | 173.0078,<br>129.0179,<br>111.0083,<br>87.0090                                         | Ácido isocítrico            | Todas   |
| 4              | 3.102                   | 169.0141           | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>      | 0.97           | 124.9837,<br>114.9884                                                                  | Ácido gálico                | Todas   |
| 5              | 3.841                   | 379.0719           | C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>15</sub>   | 4.96           | 241.0022,<br>96.9599                                                                   | Desconocido                 | Todas   |
| 6              | 4.306                   | 325.0562           | C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>    | -0.46          | 169.0142,<br>125.0254                                                                  | Derivado de ácido<br>gálico | Todas   |
| 7              | 7.106                   | 305.0662           | C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>    | 1.05           | 219.0662,<br>179.0364,<br>125.0234                                                     | Epigallocatequina           | Todas   |
| 8              | 8.097                   | 288.0877           | C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>5</sub>   | -0.14          | 151.0025,<br>136.0751                                                                  | Desconocido                 | Todas   |

|    |        |          |                                                 |       |                                                                           |                                               |                                     |
|----|--------|----------|-------------------------------------------------|-------|---------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------|
| 9  | 9.360  | 363.0753 | C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>14</sub> | 7.83  | 241.0104,<br>150.9713                                                     | Desconocido                                   | Todas                               |
| 10 | 11.665 | 477.0674 | C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>13</sub> | -0.78 | 325.0557,<br>169.0150,<br>125.0227                                        | Ácido digaloil shikímico                      | Todas                               |
| 11 | 12.661 | 385.1137 | C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub> | 0.87  | 223.0819,<br>179.0361,<br>137.0226                                        | Sinapoil-glucósido                            | Todas                               |
| 12 | 13.143 | 457.0774 | C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub> | 0.59  | 331.0457,<br>305.0661,<br>287.0568,<br>193.0143,<br>169.0138,<br>125.0242 | Isómero de<br>galo(epi)catequina-O-<br>galato | Todas                               |
| 13 | 15.435 | 631.0938 | C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> O <sub>17</sub> | 0.40  | 479.0819,<br>316.0225,<br>271.0310                                        | Miricetina galoil-<br>hexósido                | Todas                               |
| 14 | 16.503 | 625.1409 | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub> | 0.17  | 317.0318,<br>316.0195,<br>271.0197,<br>178.9963,<br>151.0035              | Miricetina-O-rutinósido                       | Todas                               |
| 15 | 17.321 | 479.0834 | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>13</sub> | -0.60 | 316.0234,<br>271.0250,<br>179.0025,<br>151.0035                           | Miricetina-O-hexósido                         | Todas                               |
| 16 | 17.713 | 440.098  | C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>9</sub> | 1.60  | 288.0784,<br>151.0035                                                     | Desconocido                                   | Todas                               |
| 17 | 19.099 | 615.0990 | C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> O <sub>16</sub> | 0.40  | 463.0900,<br>301.0369,<br>178.9980,<br>151.0037                           | Quercetina galoil-<br>hexósido                | Todas                               |
| 18 | 19.379 | 609.0887 | C <sub>29</sub> H <sub>22</sub> O <sub>15</sub> | 0.17  | 457.0747,<br>169.0139,<br>125.0248                                        | Galo(epi)catequina-3,5-<br>digalato           | Todas                               |
| 19 | 19.830 | 609.1445 | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub> | 2.59  | 301.0354,<br>169.0132                                                     | Rutina                                        | Todas                               |
| 20 | 20.065 | 463.0880 | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub> | 0.52  | 316.0219,<br>178.9978                                                     | Miricetina-O-<br>deoxihexósido                | Todas                               |
| 21 | 20.065 | 463.0876 | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub> | 1.79  | 301.0342,<br>179.2098                                                     | Quercetina-O-hexósido                         | Todas                               |
| 22 | 23.378 | 599.1029 | C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> O <sub>15</sub> | 1.31  | 447.0903,<br>313.0575,<br>285.0477,<br>169.0152                           | Kaempferol-O-galoil-<br>hexósido              | Todas                               |
| 23 | 23.439 | 593.1507 | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub> | 1.63  | 285.0398,<br>257.0334,<br>151.0052                                        | Kaempferol-O-<br>rutinósido                   | PRI-a                               |
| 24 | 23.989 | 549.0885 | C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> O <sub>15</sub> | 0.37  | 505.0976,<br>316.0222,<br>271.0241,<br>178.9983,<br>151.0031              | Derivado de miricetina                        | Todas                               |
| 25 | 24.308 | 447.0928 | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub> | 1.27  | 301.0843,<br>179.0015,<br>151.0032                                        | Quercetina-O-<br>deoxihexósido                | Todas                               |
| 26 | 28.081 | 615.0988 | C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> O <sub>16</sub> | 0.48  | 317.0294,<br>179.0006,<br>151.0024                                        | Miricetina-O-galoil-<br>deoxihexósido         | Todas                               |
| 27 | 29.296 | 533.0933 | C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> O <sub>14</sub> | 0.22  | 447.1043,<br>301.0332                                                     | Quercetina malonil-<br>deoxihexósido          | Todas                               |
| 28 | 33.235 | 599.1034 | C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> O <sub>15</sub> | 1.52  | 301.0351,<br>178.9961,<br>151.0067                                        | Quercetina-O-galoil-<br>deoxihexósido         | Todas                               |
| 29 | 34.332 | 301.0353 | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>  | 0.05  | 179.0104,<br>151.0051                                                     | Quercetina                                    | PRI-b,<br>ALC-a,<br>ALC-b,<br>ALC-t |

Se observa que el compuesto número 23, kaempferol-O-rutinósido, se detecta únicamente en una de las muestras de Priego de Córdoba (PRI-a), mientras que el compuesto 29, la quercetina, no aparece en esta pero sí en todas las demás.

## 4.2. Cromatograma.

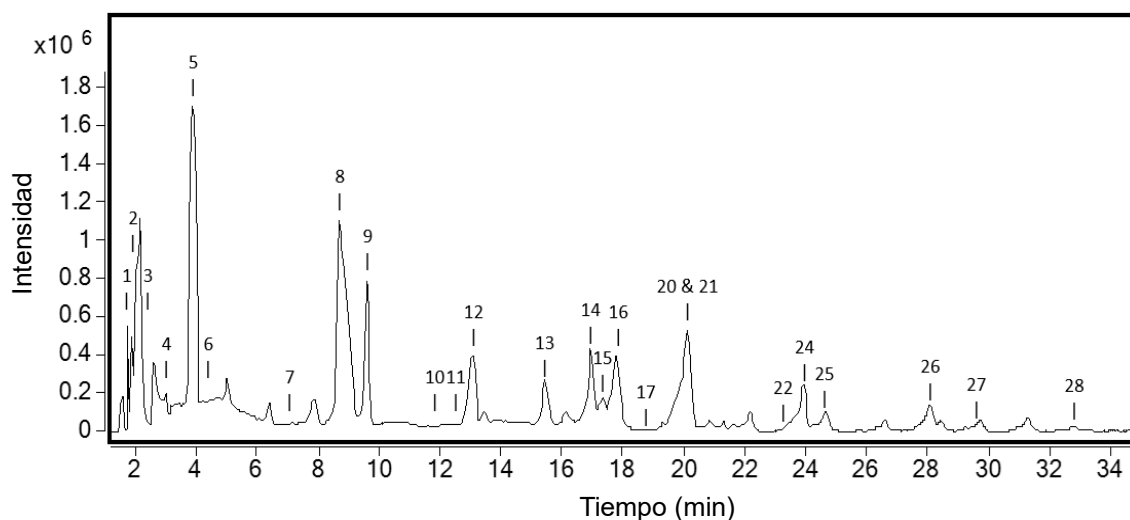


Figura 17.- Cromatograma BPC correspondiente a la muestra PRI-a (Anexo III).

Sirva el cromatograma de pico base (fig. 17) para visualizar los picos correspondientes a los compuestos; se procede a la identificación de los compuestos caracterizados a partir de la masa del ion desprotonado  $[M-H]^-$ , sus fragmentaciones y tiempos de retención, así como empleando datos experimentales de estándares analíticos en los casos de kaempferol, quercetina, ácido gálico, ácido cítrico, miricetina y rutina.

El compuesto **1** corresponde a un disacárido (aducto de HCl) debido a su patrón de fragmentación, ya que muestra un valor de 377  $[M-H]^-$ , con pérdida de HCl visible en la primera fragmentación (pérdida de 36 Da). El compuesto **2** se identificó como ácido cítrico y el **3** como isocítrico, ya que ambos presentaban el ion desprotonado a  $m/z$  191 y pico base a  $m/z$  111, típicos de ácido (iso)cítrico; la distinción entre isómeros se llevó a cabo por tiempo de retención, usando un patrón de ácido cítrico. El ácido gálico corresponde al compuesto **4**, ya que presenta un ion  $[M-H]^-$  a  $m/z$  169 y un  $[M-COOH]^-$  a  $m/z$  124. El compuesto **5**, el que presenta mayor abundancia, no ha podido ser identificado, así como los compuestos **8**, **9** y **16**. El compuesto **6** se corresponde con un derivado del ácido

gálico, caracterizado por la pérdida de 156 Da desde  $m/z$  325, generando un fragmento a  $m/z$  169. El compuesto **7** corresponde a epigallocatequina, ya que presenta  $[M-H]^-$  a  $m/z$  305 e iones fragmentados a  $m/z$  219 y 179. El compuesto **10** se identifica como un isómero de ácido digaloil shikímico, con  $[M-H]^-$  a  $m/z$  477 que produce un fragmento a  $m/z$  325 debido a la pérdida neutra de 152 Da de una posible unidad de galato (Ersan, 2016). El compuesto **11**, de  $[M-H]^-$  a  $m/z$  385, presenta una pérdida neutra de 162 Da debido a una molécula de hexósido, tratándose por tanto de sinapoil-glucósido (Engels, 2012). El **12** se trata de un isómero de galo(epi)catequina-O-galato ( $[M-H]^-$  a  $m/z$  457 y fragmentos a  $m/z$  331, 305, 169 y 125) mientras que el compuesto **18** es un isómero de galo(epi)catequina-3,5-digalato ( $[M-H]^-$  a  $m/z$  609 y fragmentos a  $m/z$  457, 169 y 125). Se observan varios derivados de la miricetina, caracterizados a partir de las siguientes pérdidas: en el compuesto **13** ( $[M-H]^-$  a  $m/z$  631) es de 152 (grupo galoil), produciendo un fragmento a  $m/z$  479 y tratándose entonces de miricetina galoil-hexósido; en **14** ( $[M-H]^-$  a  $m/z$  625) de 308 (rutinósido), generando un fragmento a  $m/z$  317, correspondiéndose con miricetina-O-rutinosido; en **15** ( $[M-H]^-$  a  $m/z$  479), de 162 (hexósido) reflejado en el fragmento correspondiente 316, presente en miricetina-O-hexósido; en **20** ( $[M-H]^-$  a  $m/z$  463), de 146 (deoxihexósido) produciendo una fragmentación a  $m/z$  316, por lo que se trata de miricetina-O-deoxihexósido; en **24** (ion desprotonado a  $m/z$  549) y **26** ( $[M-H]^-$  a  $m/z$  615) también se observan pérdidas similares. Por comparación con un estándar analítico de quercetina, se caracteriza el compuesto **29** ( $[M-H]^-$  a  $m/z$  301 y fragmentos típicos a  $m/z$  179 y 151) y varios derivados, como los compuestos **17** ( $[M-H]^-$  a  $m/z$  615 y pérdida de grupo galoil) la quercetina galoil-hexósido; **19** ( $[M-H]^-$  a  $m/z$  609) **21** ( $[M-H]^-$  a  $m/z$  463 y pérdida de grupo hexósido (162 Da), quercetina-O-hexósido; **25** ( $[M-H]^-$  a  $m/z$  447), quercetina-O-deoxihexósido; **27** ( $[M-H]^-$  a  $m/z$  533) que presenta una pérdida de un grupo malonil (86 Da), tratándose por lo tanto de quercetina malonil-deoxihexósido y **28** ( $[M-H]^-$  a  $m/z$  599), cuya fragmentación se corresponde a quercetina-O-galoil-deoxihexósido. También se caracterizan derivados del kaempferol, como los compuestos **22** y **23**, que se identifican como kaempferol-O-galoil-hexósido y kaempferol-O-rutinósido, respectivamente, debido a sus  $[M-H]^-$  a  $m/z$  599 y 593.

### 4.3. Mapa de calor.

Se elabora un mapa de calor (fig. 18), representando las abundancias relativas para cada compuesto en cada una de las muestras. Para ello, se calculan las áreas de pico de cada uno de los compuestos para cada una de las muestras utilizando los cromatogramas de ion extraído (EIC) usando la relación  $m/z$  del ion molecular desprotonado correspondiente. Una vez calculados los valores de las áreas (%) de cada uno de los compuestos identificados con respecto al área total, se realiza el mapa de calor utilizando la hoja de cálculo de Excel (Microsoft), con el fin de visualizar la contribución de cada uno de los compuestos a los extractos vegetales

|                                        | PRI-a | PRI-b | ALC-a | ALC-b | ALC-t |
|----------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Disacárido (aducto de HCl)             | 1,22  | 0,27  | 0,85  | 0,88  | 0,90  |
| Ácido cítrico                          | 1,46  | 0,72  | 0,57  | 1,07  | 0,84  |
| Ácido isocítrico                       | 1,06  | 1,12  | 0,70  | 1,60  | 1,13  |
| Ácido gálico                           | 0,88  | 1,81  | 2,51  | 0,95  | 1,65  |
| Desconocido                            | 19,92 | 4,03  | 9,16  | 24,41 | 3,48  |
| Derivado de ácido gálico               | 1,28  | 0,98  | 1,36  | 0,58  | 1,35  |
| Epigallocatequina                      | 0,50  | 0,16  | 0,10  | 1,12  | 0,10  |
| Desconocido                            | 21,86 | 36,65 | 36,90 | 15,08 | 28,39 |
| Desconocido                            | 7,56  | 5,14  | 6,20  | 11,61 | 8,74  |
| Ácido digaloil shikímico               | 0,13  | 0,21  | 0,42  | 0,13  | 0,33  |
| Sinapoil-glucósido                     | 1,87  | 0,76  | 0,78  | 1,41  | 1,23  |
| Isómero de galo(epi)catequina-O-galato | 6,24  | 7,77  | 5,52  | 5,78  | 4,78  |
| Miricetina galoil-hexósido             | 4,16  | 1,68  | 1,96  | 5,46  | 3,18  |
| Miricetina-O-rutinósido                | 5,81  | 2,16  | 2,39  | 4,77  | 5,73  |
| Miricetina-O-hexósido                  | 2,74  | 0,69  | 0,77  | 3,42  | 2,03  |
| Desconocido                            | 4,97  | 15,96 | 15,61 | 4,36  | 13,72 |
| Quercetina galoil-hexósido             | 0,58  | 0,46  | 0,85  | 1,49  | 1,19  |
| Galo(epi)catequina-3,5-digalato        | 0,10  | 1,16  | 1,02  | 0,73  | 0,72  |
| Rutina                                 | 0,07  | 0,68  | 0,67  | 0,87  | 1,09  |
| Miricetina-O-deoxihexósido             | 10,44 | 5,90  | 4,51  | 8,66  | 10,43 |
| Quercetina-O-hexósido                  | 0,28  | 0,19  | 0,23  | 0,55  | 0,31  |
| Kaempferol-O-galoil-hexósido           | 0,02  | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| Derivado de miricetina                 | 2,94  | 6,76  | 2,65  | 0,46  | 2,09  |
| Quercetina-O-deoxihexósido             | 1,45  | 1,23  | 1,18  | 2,13  | 2,52  |
| Miricetina-O-galoil-deoxihexósido      | 2,00  | 2,46  | 2,11  | 2,02  | 3,21  |
| Quercetina malonil-deoxihexósido       | 0,28  | 0,62  | 0,45  | 0,09  | 0,26  |
| Quercetina-O-galoil-deoxihexósido      | 0,18  | 0,32  | 0,47  | 0,33  | 0,54  |
| Quercetina                             | 0,00  | 0,10  | 0,06  | 0,03  | 0,05  |



Compuestos más abundantes



Compuestos menos abundantes

Figura 18.- Mapa de calor y su leyenda.

Se observa que los compuestos más abundantes son los compuestos **5**, **8**, **9** y **16**, siendo todos ellos catalogados como “desconocidos” al no haber podido ser identificados. El compuesto 8, que presenta  $[M-H]^-$  a  $m/z$  288 y fragmentaciones a  $m/z$  151 y 136, supone el compuesto mayoritario en todas las muestras. Como el objetivo principal es la caracterización de ácidos fenólicos y flavonoides, se elabora un nuevo mapa de calor (fig. 19) y se excluyen compuestos como el mencionado anteriormente, ya que contiene nitrógeno en su fórmula y no pertenece a ninguna de las dos familias químicas mencionadas. De igual forma, se han excluido otros compuestos desconocidos para centrar la discusión en polifenoles.

| Ácidos fenólicos                       | PRI-a | PRI-b | ALC-a | ALC-b | ALC-t |
|----------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Ácido gálico                           | 2,11  | 5,00  | 8,36  | 2,32  | 3,85  |
| Derivado de ácido gálico               | 3,05  | 2,70  | 4,52  | 1,40  | 3,16  |
| Ácido digaloi shikímico                | 0,31  | 0,59  | 1,40  | 0,32  | 0,78  |
| Sinapoil-glucósido                     | 4,46  | 2,11  | 2,61  | 3,45  | 2,87  |
| Flavonoides                            |       |       |       |       |       |
| Epigallocatequina                      | 1,20  | 0,44  | 0,33  | 2,73  | 0,24  |
| Isómero de galo(epi)catequina-O-galato | 14,87 | 21,52 | 18,40 | 14,11 | 11,17 |
| Miricetina galoil-hexósido             | 9,91  | 4,66  | 6,52  | 13,31 | 7,43  |
| Miricetina-O-rutinósido                | 13,85 | 5,98  | 7,97  | 11,63 | 13,39 |
| Miricetina-O-hexósido                  | 6,52  | 1,91  | 2,58  | 8,35  | 4,73  |
| Quercetina galoil-hexósido             | 1,39  | 1,29  | 2,82  | 3,64  | 2,77  |
| Galo(epi)catequina-3,5-digalato        | 0,23  | 3,22  | 3,41  | 1,78  | 1,68  |
| Rutina                                 | 0,17  | 1,88  | 2,24  | 2,13  | 2,54  |
| Miricetina-O-deoxihexósido             | 24,89 | 16,34 | 15,02 | 21,13 | 24,37 |
| Quercetina-O-hexósido                  | 0,67  | 0,52  | 0,75  | 1,35  | 0,74  |
| Kaempferol-O-galoil-hexósido           | 0,05  | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| Kaempferol-O-rutinósido                | 7,00  | 18,72 | 8,84  | 1,12  | 4,89  |
| Derivado de miricetina                 | 3,45  | 3,42  | 3,93  | 5,21  | 5,89  |
| Quercetina-O-deoxihexósido             | 4,77  | 6,82  | 7,03  | 4,94  | 7,50  |
| Miricetina-O-galoil-deoxihexósido      | 0,66  | 1,72  | 1,51  | 0,22  | 0,61  |
| Quercetina malonil-deoxihexósido       | 0,44  | 0,88  | 1,58  | 0,80  | 1,25  |
| Quercetina                             | 0,00  | 0,27  | 0,19  | 0,06  | 0,12  |

Figura 19.- Mapa de calor de los compuestos, agrupados en ácidos fenólicos y flavonoides.

Atendiendo a la tabla, se observa que los compuestos más abundantes son galo(epi)catequina-O-galato, miricetina-O-deoxihexósido (compuesto 20) y quercetina-O-hexósido (compuesto 21), encontrando estos últimos agrupados ya que no aparecen resueltos; presentan la misma fórmula molecular y tiempos de retención, pero distintas fragmentaciones, gracias a

las cuales han podido ser identificados, aunque no es posible integrar su área de forma independiente.

En conclusión, la especie *L. quesadense* presenta un perfil fitoquímico rico en flavonoides, que constituyen un 89% de la composición de esta especie en cuanto a compuestos fenólicos se refiere, y un 11% de ácidos fenólicos. Destaca, sobre todo, la presencia de flavanoles como el isómero galo(epi)catequina-O-galato, encontrándose en un rango 11-22%, y flavonoles como quercetina-O-deoxihexósido y miricetina-O-hexósido, sobre el 20%. Derivados de la miricetina también pueden encontrarse en rangos comprendidos entre el 2 y el 14%. En cuanto a los ácidos fenólicos más abundantes se encuentran el ácido gálico (entre un 2 y un 8%), así como el compuesto sinapoyl-glucósido (en torno al 3%). Anteriormente, ha sido reportado que compuestos que contienen grupos galoyl, como el dímero de galocatequina-O-galato, contribuyen a las propiedades antioxidantes de este tipo de especies (Ruiz-Riaguas, 2020).

Uno de los objetivos de este trabajo es evaluar el impacto de la localización y la exposición solar sobre la composición fenólica de la planta y, atendiendo a los resultados, no se observan diferencias significativas en las muestras, pues los datos son semejantes entre las que se encontraban más expuestas y las que estaban en zonas de sombra. Numerosos autores han señalado que una mayor exposición solar influye directamente en el contenido de antocianos y fenoles en el caso de frutos como la uva (Smart, 1988). Este estudio, sin embargo, no es concluyente en este aspecto.

## 5. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Se ha comentado que el género *Limonium* engloba en torno a 600 especies, encontrándose un número elevado (más de 115 y varios híbridos) en la Península Ibérica (Ferrer Gallego, 2018).

La comparativa entre la especie *L. quesadense* con el resto de las especies de la familia *Limonium*, como *L. delicatulum*, *L. effusum* y *L. sinuatum*, muestra diferencias significativas en el contenido y tipo de compuestos fenólicos presentes. En el presente trabajo, para *L. quesadense*, se identifican 29 compuestos en su extracto, siendo los más abundantes el dímero de galocatequina-O-galato y varios glucósidos

de miricetina. En comparación, los compuestos predominantes en *L. delicatulum* son también los glucósidos de miricetina, que ya habían sido reportados como compuestos bioactivos en *L. densiflorum* (Medini, 2015).

Hay estudios que muestran que *L. effusum* y *L. sinuatum* tienen un contenido fenólico muy rico debido a sus altos niveles de ácido tánico e hiperósido, respectivamente (Baysal, y otros, 2021). En cuanto a los flavonoides, *L. effusum* muestra altas cantidades de miricetina, quercetina y apigenina, a diferencia de *L. sinuatum* donde no se detecta miricetina, y las cantidades de quercetina y apigenina son significativamente menores.

Otros compuestos identificados en extractos de *L. delicatulum* incluyen ácido *p*-cumárico y ácido clorogénico, siendo el ácido *p*-cumárico el compuesto mayoritario. Altas concentraciones de catequinas, chalconas, glicósidos de quercetina y miricetina también se han reportado en *L. contortirameum* y *L. virgatum*.

Destaca la diversidad y riqueza fenólica del género *Limonium* que caracteriza a las especies mencionadas. Esta diversidad en el contenido de compuestos bioactivos puede tener importantes implicaciones en sus propiedades, así como en el desarrollo de aplicaciones terapéuticas. Llegados a este punto, sería interesante tratar de caracterizar los compuestos más abundantes que no han podido ser identificados, así como realizar otros estudios para evaluar el perfil bioquímico de la especie *L. quesadense*, ya que se encuentran muy pocas publicaciones al respecto.

*Limonium quesadense* es una especie amenazada, no protegida, cuyo cultivo podría suponer un impulso económico para la población de las áreas colindantes.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Alcaudete, E. A. (s.f.). *Alcaudete.es*. Obtenido de <https://www.alcaudete.es/es/2015-06-29-09-43-29/turismo-rural-y-de-naturaleza/112-laguna-honda>

Baysal, I., Ekizoglu, M., Ertas, A., Temiz, B., Agalar, H. G., Yabanoglu-Ciftci, S., & Turkmenoglu, F. P. (2021). Identification of phenolic compounds by LC-MS/MS and evaluation of bioactive properties of two edible halophytes: *Limonium effusum* and *L. sinuatum*. *Molecules*, vol. 26, nº 13, 4040.

- Bennett, R. N., & Wallsgrove, R. M. (1994). Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *The New phytologist*, 617-633.
- Bowsher, C., W. Steer, M., & K. Tobin, A. (2008). *Plant Biochemistry*. New York: Garland Science.
- Cartea, M. E., Francisco, M., Soengas, P., & Velasco, P. (2011). Phenolic Compounds in Brassica Vegetables. *Molecules*, 251-280.
- Crespo Villalba, M. B., & Lledó Barrena, M. D. (1998). *El Género Limonium en la Comunidad Valenciana*. Alicante: Generalitat Valenciana, Conselleria de Medio Ambiente.
- Engels, C., Gräter, D., Esquivel, P., Jiménez, V. M., Gänzle, M. G., & Schieber, A. (2012). Characterization of phenolic compounds in jocote (*Spondias purpurea* L.) peels by ultra high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Food Research International*, ;46(2):557-62.
- Ersan, S. e. (2016). Identification of phenolic compounds in red and green pistachio (*Pistacia vera* L.) hulls (exo-and mesocarp) by HPLC-DAD-ESI-(HR)-MS n. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 64, nº 26, 5334-5344.
- Fernández Poyatos, M. P. (2020). Caracterización y estudio de compuestos bioactivos en especies vegetales. Jaén, España.
- Ferrer Gallego, P., Navarro, A., & Laguna, E. (2018). Importantes disyunciones para dos especies del género *Limonium* mill. (plumbaginaceae) en la comunidad valenciana. *Flora Montiberica*, nº 70, 73-79.
- Fulcrand, H., Mané, C., Preys, S., Mazerolles, G., Bouchut, C., Mazauric, J. P., . . . Cole, R. (2008). Direct mass spectrometry approaches to characterize polyphenol composition of complex samples. *Phytochemistry*, 69, 3131-3138.
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., & Roberts, T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 2328-2375.
- Korkina, L. G. (2007). Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*., 15-25.

- Kubitzki, K. (1993). *The Families and Genera of Vascular Plants*. Berlin: J. W. Kadereit.
- Limón, D., Díaz, A., MENDIENTA, L., Luna, F., Zenteno, E., & Guevara, J. (2010). Los Flavonoides: mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos. *Research Gate*.
- Llorent-Martínez, E. J., Gouveia, S., & Castilho, P. C. (2015). Analysis of phenolic compounds in leaves from endemic trees from Madeira Island. A contribution to the chemotaxonomy of Laurisilva forest species. *Industrial Crops and Products*, 64, 135-151.
- López Cobo, A. (2017). *Caracterización de compuestos bioactivos en productos y subproductos vegetales mediante técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas*. Granada.
- Ludueña, B., Mastandrea, C., Chichizola, C., & Franconi, M. C. (2007). Isoflavonas en soja, contenido de daidzeína y genisteína y su importancia biológica. *Redalyc*, 54-66.
- Mauricio Peñarrieta, J., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Bravo, J. A. (2014). Phenolic Compounds in Food. *Bolivian Journal of Chemistry*, 68-81.
- Medini, F., Bourgou, S., & Lalancette, K. e. (2015). Phytochemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities of the halophyte *Limonium densiflorum* extracts on human cell lines and murine macrophages. *South African Journal of Botany*, vol. 99, 158-164.
- Oliveira Miranda, M. A., Velázquez, D., & Bermúdez, A. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*, ISSN 0378-1844, Vol. 30, N° 8, 453-459.
- Pinelo, M., Del Fabbro, P., Manzocco, L., Núñez, M. J., & Nicoli, M. C. (2005). Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chemistry* vol. 92, 109-117.
- Rodríguez-Riera, Z., Robaina-Mesa, M., Jáuregui-Haza, U., Blanco-González, A., & Rodríguez-Chanfrau, J. E. (2014). Empleo de la radiación ultrasónica para la

- extracción de compuestos bioactivos provenientes de fuentes naturales: estado actual y perspectivas. *Revista CENIC Ciencias Químicas Vol. 45*, 139-147.
- Ruiz-Riaguas, A., Zengin, G., Sinan, K. I., Salazar-Mendías, C., & Llorent-Martínez, E. J. (2020). Phenolic Profile, Antioxidant Activity, and Enzyme Inhibitory Properties of *Limonium delicatulum* (Girard) Kuntze and *Limonium quesadense* Erben. *Journal of Chemistry*, 1-10.
- Sagar, V. R., & Suresh Kumar, P. (2010). Recent advances in drying and dehydration of fruits and vegetables: a review. *J. Food Sci. Technol.*, 15-26.
- San Cristóbal, M., Peña, E. M., Aguiar, B. A., Córdoba, C. V., & González, M. E. (2011). Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC): Prácticas de laboratorio y cuestiones teórico-prácticas. Parte III. Práctica de laboratorio: optimización en la separación de compuestos semejantes mediante modificación de la fase móvil. *REDUCA (Biología)*, vol 4, nº 3.
- SCAI, S. C. (s.f.). *UJA.es*. Obtenido de <https://www.ujaen.es/servicios/scai/recursos/dm06-espectrometro-de-masas-qtof-hplc>
- Smart, R., Smith, E., & Winchester, R. V. (1988). Light quality and quantity effects on fruit ripening for Cabernet Sauvignon. *American journal of enology and viticulture*, 39 (3), 250-258.
- Stefanucci, A., Marinaccio, L., Llorent-Martínez, E. J., Zengin, G., Bender, O., Dogan, R., & Mollica, A. (2024). Assessment of the in-vitro toxicity and in-vivo therapeutic capabilities of *Juglans regia* on human prostate cancer and prostatic hyperplasia in rats. *Food Bioscience*, vol. 57, p. 103539.
- Tsao, R., & Deng, Z. (2004). Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 812, 85-99.
- Verardo, G., Duse, I., & Callea, A. (2009). Analysis of underivatized oligosaccharides by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry with post-column addition of formic acid. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 23, nº 11, 1607-1618.

Vichapong, J., Sookserm, M., Srijesdaruk, V., Swatsitang, P., & Srijaranai, S. (2010). High performance liquid chromatography analysis of phenolic compounds and their antioxidant activities in rice varieties. *LWT - Food Sci. Technol.*, 1325-1330.

## 7. ANEXOS

ANEXO I – Determinación del porcentaje de humedad de las muestras.

| <i>Muestra</i> | <i>% Humedad</i> |
|----------------|------------------|
| <i>PRI-a</i>   | 57.434           |
| <i>PRI-b</i>   | 53.898           |
| <i>ALC-a</i>   | 53.623           |
| <i>ALC-b</i>   | 56.594           |
| <i>ALC-t</i>   | 58.846           |

Las muestras presentan prácticamente los mismos valores de humedad, sin aparentes diferencias significativas que puedan correlacionarse con su exposición al sol o su posición geográfica.

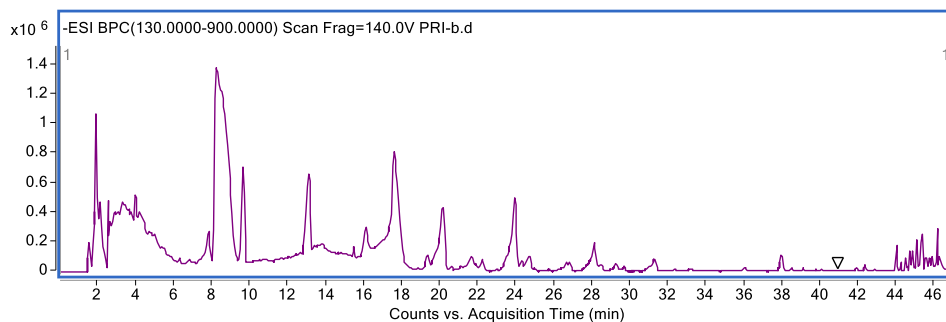
ANEXO II – Rendimiento de la evaporación

| <i>Muestra</i> | <i>Peso muestra (g)</i> | <i>Peso matraz vacío (g)</i> | <i>Peso matraz post rotavapor (g)</i> | <i>Peso extracto (g)</i> | <i>Rendimiento %</i> |
|----------------|-------------------------|------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|----------------------|
| <i>PRI-a</i>   | 2.5045                  | 79.0109                      | 79.7842                               | 0.7733                   | 30.9                 |
| <i>PRI-b</i>   | 2.5073                  | 77.6471                      | 78.4781                               | 0.8310                   | 33.1                 |
| <i>ALC-a</i>   | 2.5015                  | 75.3678                      | 76.1847                               | 0.8169                   | 32.7                 |
| <i>ALC-b</i>   | 2.5229                  | 79.1913                      | 80.0138                               | 0.8225                   | 32.6                 |
| <i>ALC-t</i>   | 2.5115                  | 74.6367                      | 75.2139                               | 0.5772                   | 23.0                 |

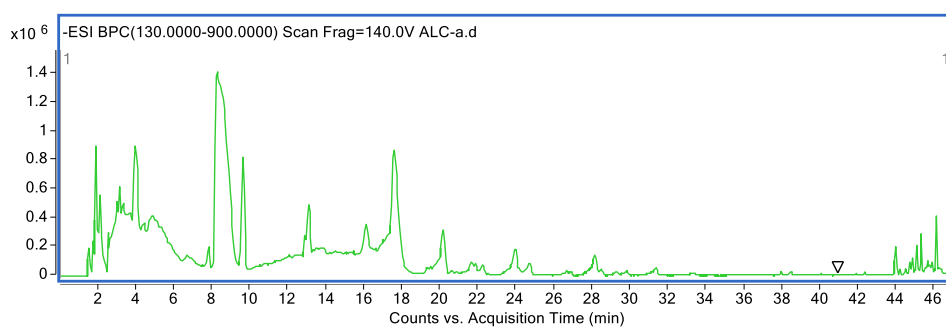
Después de secar las muestras en el rotavapor, es necesario pasar algunas de ellas por una corriente de nitrógeno para terminar el proceso, ya que se forma una especie de baba que se intenta disolver con hexano, sin éxito.

## ANEXO III – Cromatogramas del resto de muestras.

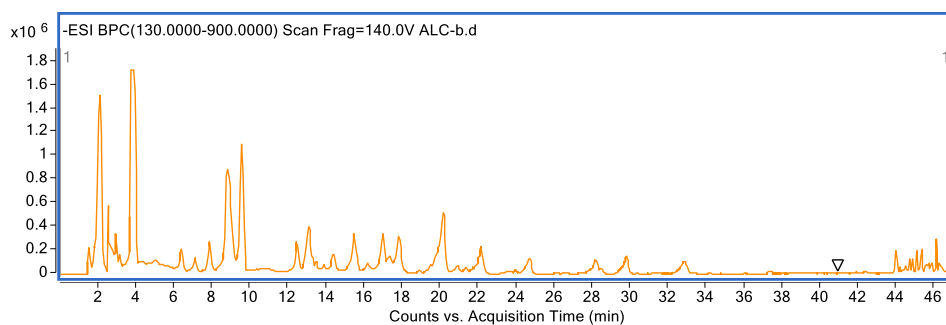
Muestra PRI-b:



Muestra ALC-a:



Muestra ALC-b.



Muestra ALC-t.

