



UNIVERSIDAD DE JAÉN  
*Facultad de Ciencias Experimentales*

Trabajo Fin de Grado

# **Estudio de la composición fenólica de plantas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas**

**Alumno: Ramón Martínez Expósito**

**Junio, 2017**



**UNIVERSIDAD DE JAÉN**  
*Facultad de Ciencias Experimentales*

Trabajo Fin de Grado

# **Estudio de la composición fenólica de plantas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas**

**Alumno: Ramón Martínez Expósito**

**Junio, 2017**

## ÍNDICE

|                                                                                           | Pág.      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. RESUMEN / ABSTRACT</b>                                                              | <b>1</b>  |
| <b>2. INTRODUCCIÓN</b>                                                                    | <b>2</b>  |
| <b>2.1. Compuestos fenólicos de las plantas</b>                                           | <b>2</b>  |
| 2.1.1. <i>Clasificación</i>                                                               | <b>3</b>  |
| 2.1.2. <i>Funciones de los ácidos fenólicos y los flavonoides en las plantas</i>          | <b>7</b>  |
| 2.1.3. <i>Beneficios de los flavonoides en la salud humana</i>                            | <b>8</b>  |
| 2.1.4. <i>Biodisponibilidad de los polifenoles</i>                                        | <b>8</b>  |
| 2.1.5. <i>Capacidad antioxidante: métodos de determinación</i>                            | <b>9</b>  |
| 2.1.6. <i>Determinación del contenido total en polifenoles</i>                            | <b>12</b> |
| <b>2.2. Quercus Coccifera</b>                                                             | <b>13</b> |
| 2.2.1. <i>Floración</i>                                                                   | <b>13</b> |
| 2.2.2. <i>Hábitat</i>                                                                     | <b>13</b> |
| 2.2.3. <i>Reproducción</i>                                                                | <b>14</b> |
| <b>2.3. Cromatografía Líquida de Alta Resolución</b>                                      | <b>15</b> |
| 2.3.1. <i>Fundamento</i>                                                                  | <b>15</b> |
| 2.3.2. <i>Clasificación en función de la naturaleza de las fases móvil y estacionaria</i> | <b>16</b> |
| <b>2.4. Espectrometría de Masas</b>                                                       | <b>17</b> |
| 2.4.1. <i>Modos de ionización. Ionización por Electro Spray</i>                           | <b>18</b> |
| 2.4.2. <i>Analizadores. Trampa iónica tridimensional</i>                                  | <b>20</b> |
| 2.4.3. <i>Detectores</i>                                                                  | <b>23</b> |
| <b>2.5. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas</b>                      | <b>23</b> |
| <b>3. OBJETIVOS</b>                                                                       | <b>23</b> |
| <b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>                                                            | <b>24</b> |
| <b>4.1. Reactivos</b>                                                                     | <b>24</b> |
| <b>4.2. Aparatos e instrumentos</b>                                                       | <b>24</b> |
| <b>4.3. Procedimiento experimental</b>                                                    | <b>26</b> |
| 4.3.1. <i>Muestreo</i>                                                                    | <b>26</b> |
| 4.3.2. <i>Extracción de la fracción fenólica</i>                                          | <b>28</b> |
| 4.3.3. <i>Método cromatográfico</i>                                                       | <b>30</b> |
| <b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>                                                          | <b>31</b> |
| <b>5.1. Optimización del proceso de extracción</b>                                        | <b>31</b> |
| <b>5.2. Procedimiento para la identificación de compuestos</b>                            | <b>32</b> |
| <b>5.3. Identificación de compuestos en fruto</b>                                         | <b>34</b> |
| <b>5.4. Identificación de compuestos en hoja</b>                                          | <b>37</b> |
| <b>6. CONCLUSIONES</b>                                                                    | <b>43</b> |
| <b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>                                                                    | <b>45</b> |



## 1.- RESUMEN / ABSTRACT

En este trabajo se han estudiado e identificado por vez primera los compuestos fenólicos mayoritarios de la planta *Quercus Coccifera*, utilizando para ello la técnica Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas. Entre los polifenoles identificados cabe destacar la *Quercetina*, compuesto que actualmente tiene múltiples aplicaciones comerciales debido a su gran actividad antioxidante y a sus múltiples propiedades beneficiosas para la salud. Se han identificado también algunos taninos hidrolizables como *Digaloil Glucosa*, *Trigaloil Glucosa* y *Glucogalina*, metabolitos que desde antiguo se han aislado de plantas medicinales debido a sus actividades biológicas y farmacológicas, entre las que cabe citar efectos antisecretores y antiulcerogénicos.

La información obtenida acerca de la composición del extracto fenólico de la planta *Quercus Coccifera* puede ser de gran utilidad a fin de llevar a cabo posteriores estudios acerca de la posibilidad de su uso para aplicaciones medicinales o elaboración de fármacos.

In this work the main phenolic compounds of the *Quercus Coccifera* plant have been studied and identified for the first time, making use of High Performan Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry. Among the identified polyphenols, *Quercetin* is a compound that currently has multiple commercial applications due to its high antioxidant activity and its many beneficial properties for health. Some hydrolysable tannins such as *Digaloyl Glucose*, *Trigaloyl Glucose* and *Glucogaline* have also been identified, metabolites that have been isolated from medicinal plants since ancient times due to their biological and pharmacological activities, including anti-secretory and antiulcerogenic effects.

The information obtained about the composition of the phenolic extract of the *Quercus Coccifera* plant can be very useful in order to carry out further studies about the possibility of its use for medicinal applications or drug manufacture.

## 2.- INTRODUCCIÓN

### 2.1.- Compuestos fenólicos de las plantas

Durante siglos, las plantas y los compuestos vegetales han sido parte importante de la vida humana, ya que se utilizaban como medicamentos y agentes terapéuticos.

Por este motivo, a partir del año 2000, se han vuelto muy populares como valiosas fuentes de productos naturales debido a que los productos sintéticos son muy caros y tienen algún efecto secundario en contra de la salud humana. Por ejemplo, los principales metabolitos secundarios de las plantas, que son los ácidos fenólicos y los flavonoides tienen importantes propiedades biológicas tales como actividad antioxidante, antimicrobiana, anticancerígena y anti mutágeno y en comparación con los sintéticos, no tienen efectos negativos sobre la salud humana.

A raíz de estas importantes aplicaciones, muchos científicos han encaminado sus investigaciones en esta dirección para intentar caracterizar y comprobar los efectos biológicos de las plantas y sus metabolitos secundarios.

Actualmente, las plantas silvestres que no han sido foco del estudio de las líneas de investigación en el campo medicinal, son consideradas una prometedora fuente de agentes biológicos activos para fármacos y para los programas de desarrollo de nuevos alimentos funcionales (Llorent-Martínez *et al.*, 2016).

Focalizando ya más lo que son propiamente los compuestos fenólicos, llamados de forma común polifenoles, hay que destacar que estos son el grupo más extenso de sustancias no energéticas presentes en los alimentos de origen vegetal.

Los polifenoles son una clase de metabolitos secundarios, sintetizados por las plantas durante su desarrollo y también cuando son sometidas a situaciones de estrés para acelerar este proceso de desarrollo. Los diferentes grupos de polifenoles como por ejemplo los ácidos fenólicos y los flavonoides presentan una importante actividad antioxidante, por lo tanto tienen numerosos efectos

que son beneficiosos para la salud como son, actividad antiinflamatoria, antialérgica, antienvjecimiento y anticancerígena. A raíz de los numerosos beneficios que tienen para la salud se utilizan como un tipo de medicina preventiva (Spínola *et al.*, 2014).

En cuanto a la estructura de este tipo de compuestos, viene caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos. Además este tipo de moléculas presentan las siguientes características estructurales (Isaza, 2007):

- Solubilidad en agua.
- Masa molecular entre 500 y 3000-5000.
- Estructura y carácter polifenólico (12-16 grupos fenólicos y 5-7 anillos aromáticos por cada 1000 unidades de masa molecular relativa.

En las últimas décadas se ha producido un aumento en el interés de este tipo de compuestos debido a las numerosas evidencias científicas de los beneficios que produce la ingesta de alimentos vegetales ricos en polifenoles.

#### 2.1.1.- Clasificación

Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Quiñones *et al.*, 2012). Simplificando esta clasificación se puede decir que existen dos grupos generales de compuestos: los no flavonoides y los flavonoides.

- No flavonoides: comprenden, mayormente, alcoholes mono-fenólicos (ej. hidroxitirosol), ácidos fenólicos simples y estilbenos (ej. resveratrol). Los ácidos fenólicos simples constituyen la mayor parte de los polifenoles no-flavonoides.

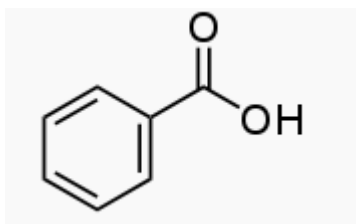


Figura 1.- Estructura ácido benzoico

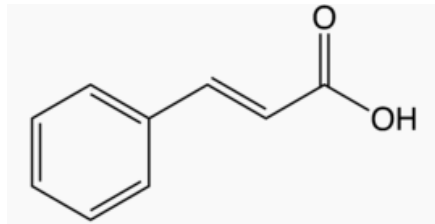


Figura 2.-Estructura ácido cinámico

(Fuente: es.wikipedia.org)

(Fuente: es.wikipedia.org)

- Ácidos fenólicos: este término designa a los fenoles que poseen un ácido carboxílico como grupo funcional (Stalikas, 2007). Hay dos tipos:
  - Ácido benzoico (Fig.1)(ej. protocatéuico, gálico, vanílico, p-hidroxibenzóico)
  - Ácido cinámico (Fig.2)(ej. clorogénico, caféico, ferúlico, p-cumárico)
- Estilbenos: resveratrol. El resveratrol es el polifenol más importante en el grupo de los estilbenos, es un tipo de fenol natural y una fitoalexina que se produce de manera natural en varias plantas como respuesta a una lesión o cuando éstas se encuentran bajo el ataque de patógenos, tales como bacterias u hongos (Fremont, 2000).

Tiene acción antioxidante y antiinflamatoria. Además, se ha demostrado su actividad anticancerígena, su eficacia en la prevención de enfermedades cardiovasculares, así como sus efectos en diferentes patologías y procesos relacionados con el envejecimiento (Rege *et al.*, 2014).

Actualmente, se estudian sus efectos sobre la respuesta inmunitaria, diversos tipos de cáncer, envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas. Parece que incluso podría proteger frente al daño cerebral y medular asociado a isquemia y a lesiones traumáticas (López-Miranda *et al.*, 2012).

- Flavonoides: Dentro de los polifenoles, el grupo más importante son los flavonoides. Se trata de un grupo de moléculas biológicamente activas cuyo nombre deriva del latín “flavus”, cuyo significado es “amarillo”, constituyen la subclase de polifenoles más abundante dentro del reino vegetal. El científico húngaro Albert Szent-Györgyi, premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1937, los descubrió en el siglo pasado cuando aisló de la cáscara de limón una sustancia, la citrina, y demostró que su consumo regulaba la permeabilidad de los capilares (Quiñones *et al.*, 2012).

Constituyen uno de los mayores grupos de metabolitos secundarios y juegan un papel importante en las plantas como defensa y señalización en la reproducción. Además los flavonoides actúan como respuesta al estrés, a la infección por microorganismos o al ataque herbívoro entre otros (De Rijke *et al.*, 2006).

Estructuralmente los flavonoides son un grupo de compuestos que están relacionados con un esqueleto de tipo cromona con un sustituyente fenilo en la posición C2 o C3, su estructura base es C6-C3-C6 representada en la Fig.3. Posteriormente puede sufrir muchas modificaciones y adiciones de grupos funcionales. Los flavonoides a menudo son hidroxilados en las posiciones 3, 5, 7, 3`y/o 5`. Con frecuencia uno o más de estos grupos se encuentran metilados, acetilados, prenilados o sulfonados (De Rijke *et al.*, 2006).

Los flavonoides comúnmente se presentan como glucósidos flavonoides, esto ocurre cuando uno o más grupos hidroxilo de la aglicona, nombre que se utiliza para denominar a un flavonoide cuando no tienen ligadas otras moléculas, se unen con un azúcar mediante un enlace O-glucosídico. El principal fin de esta glucosilación es hacer al flavonoide menos reactivo y más soluble en agua. Esto lo realizan las plantas como un mecanismo de defensa ya que al ser menos reactivos, los flavonoides son almacenados en las vacuolas y previenen a la planta de daños citoplasmáticos.

La glucosilación también puede tener lugar por enlace directo del azúcar con el núcleo del flavonoide, a través de un enlace C-C (Cuyckens *et al.*, 2004). El número de azúcares que puede presentar un flavonoide como sustituyentes va desde uno hasta cuatro (Stobiecki, 2000).

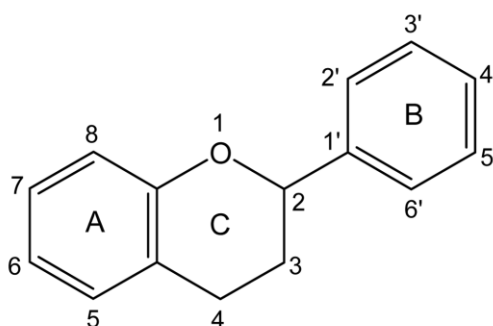


Figura 3.- Estructura de los flavonoides (Fuente: Stalikas, 2007).

En función de las características estructurales los flavonoides se pueden clasificar en (Martínez-Flores *et al.*, 2002):

- Flavanos, como la catequina, con un grupo –OH en la posición 3 del anillo C.
- Flavonoles, representados por la quercetina, que posee un grupo carbonilo en la posición 4 y un grupo –OH en la posición 3 del anillo C.
- Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en la posición 4 del anillo y carecen del grupo hidroxilo en la posición 3.
- Antocianidinas, que tienen unido el grupo –OH en la posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.

La estructura de los diferentes tipos de flavonoides es la mostrada a continuación en la Fig.4:

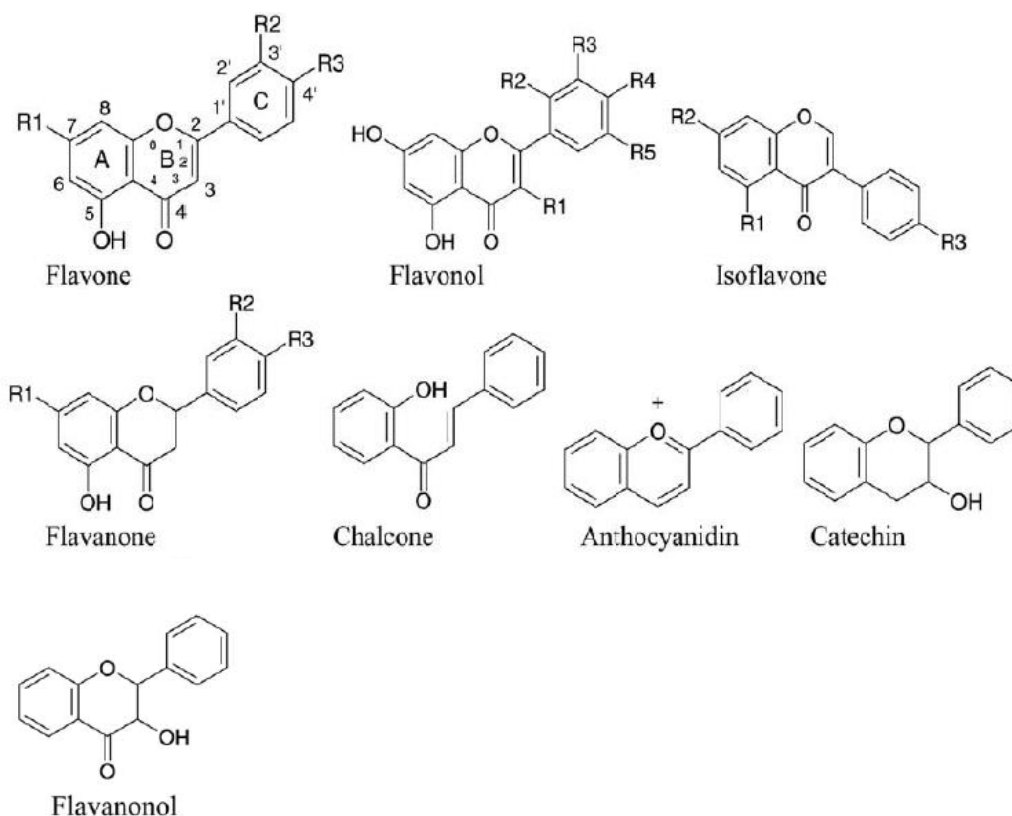


Figura 4.- Estructura de los diferentes tipos de flavonoides (Fuente: De Rijke *et al.*, 2006).

Como podemos observar la variedad estructural de los flavonoides es muy amplia, tanto es así que actualmente ya hay más de 4000 flavonoides conocidos que están comprendidos en 12 subclases. Ahora mismo hay más de 3000 flavonas y más de 700 isoflavonas conocidas en plantas así como en torno a los 6500 flavonoides identificados en éstas (De Rijke *et al.*, 2006).

#### *2.1.2.- Funciones de los ácidos fenólicos y los flavonoides en las plantas.*

Los ácidos fenólicos insolubles se distribuyen en las paredes celulares, mientras que los que son solubles se encuentran en las vacuolas de las plantas. Muchos de estos ácidos, como los derivados del ácido cinámico y benzoico se encuentran presentes en todas las plantas y en todos los alimentos de origen vegetal. Sin embargo, únicamente una minoría de los ácidos fenólicos se encuentran en forma de ácido libre, la mayor fracción están unidos mediante enlaces de tipo éster, éter o acetales a moléculas de celulosa, proteínas, lignanos, flavonoides, glucosa, terpenos, etc.

Esta diversidad es uno de los factores que contribuyen a la complejidad del análisis de los ácidos fenólicos.

Con respecto al papel de los ácidos fenólicos en las plantas, en la actualidad se la han atribuido diversas funciones como son: la absorción de nutrientes, síntesis de proteínas, actividad enzimática, fotosíntesis y funciones estructurales y de alelopatía.

Dentro del reino vegetal, los flavonoides son los pigmentos más comunes junto con la clorofila y los carotenoides. Generalmente en las plantas se encuentran como derivados glicosilados y sus funciones son muy diversas. Debido a sus llamativos colores, flavonas, flavonoles y antocianidinas pueden actuar como señales visuales para los insectos polinizadores. Debido a su astringencia, las catequinas y otros flavonoides pueden actuar como sistema de defensa contra los ataques de insectos perjudiciales a la planta. Además los flavonoides actúan como catalizadores durante la fase luminosa de la fotosíntesis y como

sistemas de transporte de electrones, por ultimo gracias a su propiedad para absorber rayos UV, protegen a la planta de la radiación UV del sol y de las especies de oxígeno reactivas (Stalikas, 2007).

#### *2.1.3.- Beneficios de los flavonoides en la salud humana.*

La mejor propiedad para el cuerpo humano que poseen casi todos los flavonoides es su capacidad para actuar como antioxidantes. Los flavonoides pueden interferir con al menos tres sistemas de producción de radicales libres. Gracias a su menor potencial redox son capaces de reducir la alta oxidación libre mediante la formación de radicales de flavonoides que son menos reactivos. Un ejemplo de esto es la peroxidación de lípidos que es una de las acciones más dañinas que provocan los radicales libres ya que ocasiona daños en la membrana y por última instancia, provocan la muerte celular.

Los flavonoides son usados para la prevención de cáncer, demencia, aterosclerosis y enfermedades del corazón. También interactúan con diversos sistemas enzimáticos, como por ejemplo en la inhibición de las enzimas ciclooxigenasa y lipoxigenasa. Muchas otras actividades biológicas que son atribuidas a los flavonoides son: antivirales, antimicrobianas, antihepatotóxico, antiosteoporótico, antialérgico, antiespasmódico y actividad anti ulcerosa (Cuyckens *et al.*, 2004).

#### *2.1.4.- Biodisponibilidad de los polifenoles*

La definición de biodisponibilidad más comúnmente aceptada hace referencia a “la proporción de nutrientes que se digieren, se absorben y se metabolizan a través de las rutas metabólicas habituales de asimilación”. Es importante conocer la cantidad total de polifenoles que está presente en un alimento o ingrediente alimentario, pero, teniendo en cuenta la definición anterior de biodisponibilidad, es más importante conocer la cantidad de polifenoles que es biodisponible, dentro del contenido total de un alimento. El concepto de biodisponibilidad cobra una gran importancia, dado que los polifenoles más abundantes no siempre son los más activos en el organismo, ya sea porque tienen una menor actividad intrínseca, su absorción en el intestino es baja, son altamente metabolizados o se excretan rápidamente.

La mayoría de los polifenoles están presentes en los alimentos como ésteres, glucósidos o polímeros, formas que no se pueden absorber. En realidad en los alimentos, prácticamente todos los polifenoles presentan formas glucosiladas. El destino de los glucósidos en el estómago aún no está claro. La mayoría resisten probablemente la hidrólisis ácida del estómago y llegan intactos al intestino. Estas sustancias deben hidrolizarse por enzimas intestinales o deben ser degradadas por la micro flora del colon antes de poder asimilarse.

Durante el proceso de adsorción los polifenoles sufren diversas modificaciones, como son procesos de metilación, sulfatación y/o glucoronidación en el hígado. Como consecuencia de estos procesos, las formas que se encuentran en el plasma y en los tejidos son muy diferentes de las que están presentes en los alimentos.

Para estudiar indirectamente la biodisponibilidad de los polifenoles se puede evaluar la capacidad antioxidante del plasma tras el consumo de alimentos ricos en estos compuestos. Para ello se puede medir la concentración del compuesto en el plasma y en la orina tras la ingestión de alimentos con cantidades conocidas, de los polifenoles que se quieran analizar (Quiñones *et al.*, 2012).

#### *2.1.5.- Capacidad antioxidante: métodos de determinación.*

Los antioxidantes son sustancias con capacidad para oponerse a la acción del oxígeno y de ciertas especies oxidantes, independientemente de su mecanismo. La importancia de estos compuestos es que son moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres que comienzan reacciones en cadena que dañan las células, los antioxidantes terminan estas reacciones quitando intermediarios del radical libre e inhibiendo otras reacciones de oxidación oxidándose ellos mismos, debido a esto, a menudo, los antioxidantes son agentes reductores (Justo *et al.*, 2002).

Las acciones nocivas de los radicales libres sobre el organismo han acelerado la búsqueda de moléculas con propiedades antioxidantes como agentes

terapéuticos. Unido además a la creciente preocupación por los efectos tóxicos producidos por los antioxidantes sintéticos utilizados en la conservación de alimentos, refuerza la urgencia de buscar sustancias antioxidantes menos tóxicas y de amplia utilidad en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica. Debido a esto se ha desarrollado el uso de plantas como una potencial fuente de obtención de metabolitos antioxidantes, debido a que, sintetizan y acumulan en sus órganos gran variedad de estos metabolitos como respuesta a estímulos o condiciones ambientales, estos cuentan con la capacidad de captar radicales libres tales como compuestos fenólicos, carotenoides, vitaminas y compuestos nitrogenados. Dentro de estas sustancias consideradas antioxidantes se encuentran las vitaminas (aminas indispensables para la vida, tales como la vitamina A, C y E), los flavonoides (quercetina, catequina), antocianinas, carotenoides o ácidos fenólicos (ácido caféico y ácido clorogénico) (Pareja *et al.*, 2010).

Los polifenoles en particular, son compuestos donadores de hidrógeno, en especial los flavonoides. Su potencial antioxidante depende del número y de la posición de los grupos hidroxilos y su conjugación, así como la presencia de electrones donadores en el anillo estructural.

La actividad antioxidante no puede ser medida directamente, pero puede determinarse por los efectos del compuesto antioxidante en un proceso de oxidación controlado. La gran mayoría de los ensayos para determinar la capacidad antioxidante pueden ser divididos en dos categorías: (1) Ensayos basados en la reacción por transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y (2) Ensayos basados en la reacción por transferencia de electrones (ET). Entre los ensayos de captación de radicales libres está el método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), este método se encuentra dentro de la segunda categoría, ensayos basados en la reacción por transferencia de electrones, es el más rápido, es simple y de menor costo en comparación con otros modelos. Por otro lado el ensayo de decoloración ABTS (ácido 2-2' azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico) se puede aplicar a antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos. Estos dos métodos son los más utilizados (Tovar, 2013).

### Determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo)

El fundamento del método desarrollado por Brand-William, DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color morado, decolorándose hacia amarillo pálido por la reacción de reducción que tiene lugar con la presencia de un compuesto antioxidante, Fig.5, posteriormente se mide la absorbancia espectrofotométricamente a 517nm. Por diferencia de absorbancia se determina el porcentaje de captación de radical libre DPPH a una determinada concentración (mg/L) (Brand-William *et al.*, 1995).

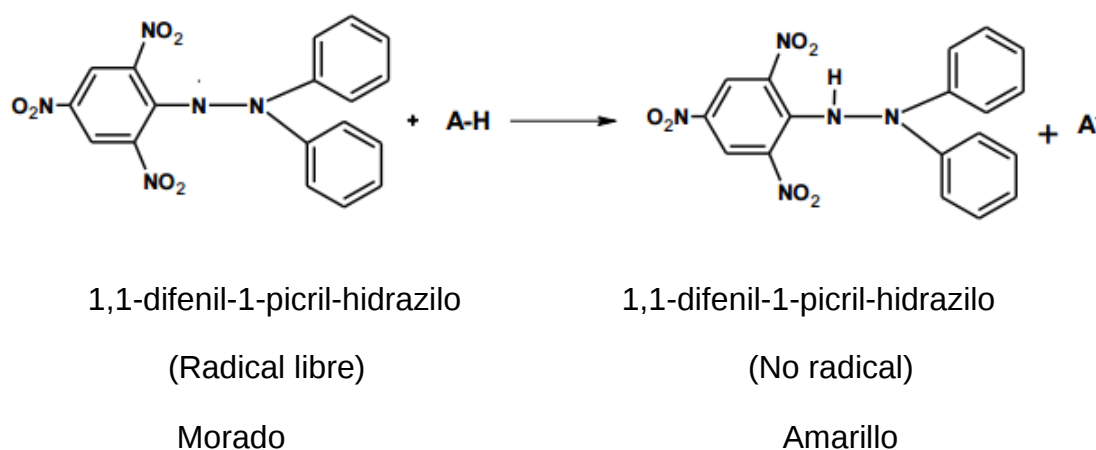


Figura 5.- Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante (Fuente: Tovar, 2013)

### Determinación de la actividad antioxidante mediante el ensayo ABTS

La generación del radical  $ABTS^{\bullet+}$  constituye la base de uno de los métodos espectrofotométricos que han sido aplicados para medir la actividad antioxidante total de soluciones o sustancias puras y mezclas acuosas. El ensayo original de  $ABTS^{\bullet+}$  estaba basado en la activación de la metilmioglobina con peróxido de hidrógeno en presencia de ABTS para producir un radical catión, en presencia o ausencia de antioxidantes, Fig.6. Este fue criticado debido a que la reacción rápida de los antioxidantes, contribuye a la reducción del radical ferrilmioglobina. Un formato más apropiado para el ensayo consiste en la técnica de decoloración, en la cual el radical es

generado directamente en una forma estable antes de la reacción con los antioxidantes (Re *et al.*, 1999).

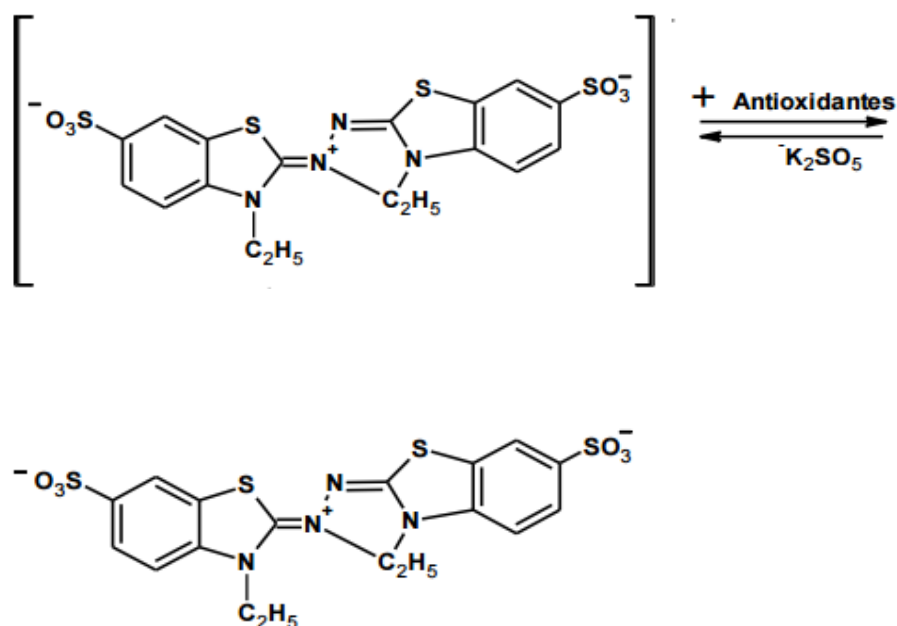


Figura 6.- Estructura del ABTS antes y después de la reacción con el antioxidante (Fuente: Tovar, 2013).

#### 2.1.6.-Determinación del contenido total en polifenoles.

##### Método de Folin-Ciocalteu

El ensayo Folin-Ciocalteu se utiliza como medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra.

El mecanismo de reacción es una reacción redox, por lo que además puede considerarse también, como un método de medida de la actividad antioxidante total. Este ensayo de análisis de los polifenoles totales, se utiliza con frecuencia

en el estudio de las propiedades antioxidantes de alimentos vegetales (García *et al.*, 2015).

A pesar de lo interesante de este método, en este trabajo no se ha llevado a cabo puesto que es más importante intentar identificar todos y cada uno de los polifenoles que hay presentes en la planta por separado y no todos juntos, que es lo que se consigue con este método.

## **2.2.-*Quercus Coccifera***

*Quercus Coccifera*, cuyo nombre común es coscoja, es una especie de arbusto, aunque a veces puede llegar a ser un árbol de hasta 6 metros de altura, perteneciente a la familia de las fagáceas originaria de la región del Mediterráneo. Es un roble del género *Quercus*, de hoja perenne y verde todo el año, arbusto de no más de 2 m de altura, aunque a veces se puede convertir en un arbolillo de hasta 4 o 6 m; suele ramificarse abundantemente desde la base, de forma que las ramas, de corteza lisa y cenicienta, se entrelazan a menudo haciéndola impenetrable. Tiene hojas sencillas, alternas, membranosas que caen rápidamente, rígidas, lampiñas por las dos caras, con el margen ondulado y armado de dientes espinosos en mayor o menor número; tienen color verde intenso, forma aovada o alargada y superficie brillante y lustrosa (Natividade, 1937)

Las flores masculinas son muy pequeñas, poco aparentes, con una envuelta acopada dividida en 4, 5, o 6 gajos y un número variable de estambres (4 a 10); se agrupan en espigas cortas, de color amarillento, delgadas, que cuelgan en grupos. Las femeninas nacen en la misma planta, solitarias o agrupadas por dos o tres. El fruto es una bellota, de una sola semilla, separable en dos mitades (cotiledones) longitudinalmente.

### **2.2.1.-Floración**

Florece por abril o mayo, madurando las bellotas al final del verano o ya en el otoño (octubre) del año siguiente. Son de sabor amargo, no se recomienda comerlas.

### **2.2.2.-Hábitat**

Esta especie de roble se desarrolla en las laderas secas y soleadas. Prolifera sobre terrenos calcáreos, pedregosos y suelos pobres. Es indiferente a la naturaleza química del suelo y amante de los climas cálidos, por lo que soporta bien las sequías estivales. En las zonas a partir de los 1000 m de altitud esta especie no es muy común.

*Quercus Coccifera* es un roble muy resistente de clima seco y semiárido que es capaz de soportar el clima mediterráneo continental con temperaturas extremas y escasas precipitaciones, sustituye a la encina en las zonas más secas, donde le aventaja en resistencia hídrica.

Soporta bien los veranos calurosos y los inviernos fríos del clima mediterráneo continental. Durante la estación estival las temperaturas superan los 35 °C, alcanzándose esporádicamente más de 40 °C. Sin embargo, en invierno es frecuente que las temperaturas bajen de los 0 °C, produciéndose la humedad por nieblas de condensación, numerosas heladas en las noches despejadas de nubes y nevadas esporádicas. También crece junto al mar en acantilados y zonas ventosas donde otras especies de *Quercus* o pino no pueden desarrollarse por la dureza de las condiciones meteorológicas.

### 2.2.3.-Reproducción

Se reproduce fácilmente por semilla (bellota) en noviembre y diciembre, y las bellotas pueden germinar incluso antes de caer del árbol, aunque también se multiplica por brotes de raíz y de cepa. Se cría bien en todo tipo de suelos en forma de arbusto: carrasco o chaparro.

El chaparro es propio de regiones con una apariencia desértica y sin ningún núcleo habitado debido a que los cultivos no son rentables económicamente, el clima se va haciendo progresivamente más continental y por tanto más seco y extremo en sus temperaturas. Se acompaña, entonces, de coníferas enanas de crecimiento lento como el enebro o la sabina. Es la última especie de quercínea en desaparecer por falta de precipitaciones.

Son muy importantes ecológicamente las espesuras que forma (bosques espesos con ejemplares de hasta 5 metros de alto) y la carrasca con

sus bellotas, aunque de sabor muy amargo, es el único hábitat que brinda en esas zonas protección para la nidificación de aves, y alimento para zorros, roedores y jabalíes.

### **2.3.-Cromatografía Líquida de Alta Resolución**

La cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente en bioquímica y química analítica. Esta técnica se utiliza para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

#### *2.3.1.- Fundamento*

En HPLC isocrática el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie) mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. El tipo isocrático se caracteriza porque la fase móvil es constante, es decir, no varía con el tiempo a diferencia del otro modo de trabajo con el que se puede trabajar que es en modo gradiente, donde la fase móvil va cambiando su composición durante la elución. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto en ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna y reduce así su difusión dentro de la columna mejorando la resolución de la cromatografía. Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el acetonitrilo. El agua puede contener tampones, sales, o compuestos como el ácido trifluoroacético, que ayudan a la separación de los compuestos.

Una mejora introducida a la técnica de HPLC descrita es la variación en la composición de la fase móvil durante el análisis, conocida como *elución en gradiente*. Un gradiente normal en una cromatografía de fase reversa puede empezar a un 5% de acetonitrilo y progresar de forma lineal hasta un 50% en 25 minutos. El gradiente utilizado varía en función de la hidrofobicidad del compuesto. El gradiente separa los componentes de la muestra como una función de la afinidad del compuesto por la fase móvil utilizada respecto a la afinidad por la fase estacionaria. En el ejemplo, utilizando un gradiente agua/acetonitrilo los compuestos más hidrofílicos van a eluir a mayor concentración de agua, mientras que los compuestos más hidrofóbicos eluirán a concentraciones elevadas de acetonitrilo. A menudo, hace falta realizar una serie de pruebas previas con tal de optimizar el gradiente de forma que permita una buena separación de los compuestos.

### *2.3.2.- Clasificación en función de la naturaleza de las fases móvil y estacionaria.*

Dentro de la técnica hay diferentes tipos de cromatografías en función de las fases que utilizan, algunas de los principales tipos son los siguientes:

- **Cromatografía de fase normal:** Fue la primera forma de trabajo utilizada en esta técnica, se caracteriza por separar los compuestos sobre la base de su polaridad. Esta técnica utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil apolar, y se utiliza cuando el compuesto de interés es bastante polar. El compuesto polar se asocia y es retenido por la fase estacionaria. La fuerza de adsorción aumenta a medida que aumenta la polaridad del compuesto y la interacción entre el compuesto polar y la fase estacionaria polar (en comparación a la fase móvil) aumenta el tiempo de retención. La utilización de disolventes más polares en la fase móvil disminuye el tiempo de retención de los compuestos mientras que los disolventes más hidrofóbicos tienden a aumentar el tiempo de retención.
- **Cromatografía de fase inversa:** En esta forma de trabajo se utiliza una fase estacionaria apolar y una fase móvil de polaridad moderada. Una de las fases estacionarias más comunes de este tipo de cromatografía

es la sílice tratada con  $\text{RMe}_2\text{SiCl}$ , donde la R es una cadena alquil tal como  $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$  o  $\text{C}_8\text{H}_{17}$ . El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente.

La cromatografía de fase inversa es tan utilizada que a menudo se lo denomina HPLC sin ninguna especificación adicional. La cromatografía de fase inversa se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar, y una fase estacionaria apolar.

Las características del compuesto de interés juegan un papel muy importante en la retención. En general, un compuesto con una cadena alquil larga se asocia con un tiempo de retención mayor porque aumenta la hidrofobicidad de la molécula. El tiempo de retención aumenta con el área de superficie hidrofóbica que suele ser inversamente proporcional al tamaño del compuesto. Los compuestos ramificados suelen eluir más rápidamente que sus isómeros lineales puesto que la superficie total se ve reducida.

Otra variable importante es el pH puesto que puede cambiar la hidrofobicidad del compuesto. Por este motivo, la mayoría de métodos utilizan un tampón como el fosfato de sodio para controlar el valor del pH.

## **2.4.- Espectrometría de Masas**

Los espectros de masas se obtienen convirtiendo los componentes de una muestra en iones gaseosos, que se mueven a gran velocidad en presencia de un campo magnético y se separan en función de su masa/carga. Un espectro de masas representa la abundancia relativa de los distintos iones en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ). Los espectros de masas nos proporcionan información sobre la estructura de especies moleculares complejas, las relaciones isotópicas de los átomos de las muestras, y la composición cualitativa y cuantitativa de analitos orgánicos e inorgánicos en muestras complejas.

Las etapas necesarias para la determinación de masas son las siguientes:

- Generación de moléculas (y fragmentos moleculares y/o átomos) en fase gaseosa.
- Ionización de estos fragmentos.
- Separación en función de su relación  $m/z$ .
- Detección de los iones.

El espectrómetro de masas tiene tres partes fundamentales, Fig.8:

1. Fuente de ionización. Convierte los componentes de la muestra en iones. Esto puede conseguirse por bombardeo con electrones, moléculas o fotones. En muchos casos la fuente de ionización y el sistema de entrada están combinados en un único componente.
2. Analizador de masa. La función del analizador de masas es la separación de los iones en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ).
3. Detector. El detector convierte el haz de electrones en una señal eléctrica que puede ser procesada y almacenada. El detector más empleado es el multiplicador de electrones. El haz de iones incide sobre un catodo, arrancando los electrones. Posteriormente una serie de dinodos colocados a potenciales cada vez más altos amplifican la corriente de electrones.

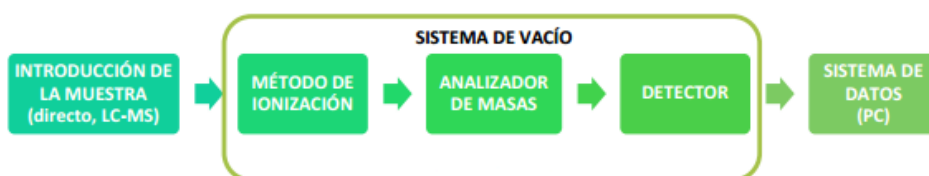


Figura 8.- Esquema de un Espectrómetro de masas (Fuente: Alcántara, 2015)

#### 2.4.1.- Modos de ionización. Ionización por Electro Spray

El éxito en el trabajo con MS recae en gran parte en la capacidad de conseguir que los compuestos neutros se conviertan en iones moleculares o fragmentos en estado gaseoso. La ionización de los analitos es de vital importancia porque es la base de la espectrometría de masas, ya que controlar, separar y dirigir

iones cargados resulta eficiente y sencillo mediante la aplicación de campos eléctricos y magnéticos.

Durante las últimas dos décadas, se ha hecho uso de diferentes técnicas para ionizar en fase líquida, en concreto: ionización por Termospray (TSP), ionización química a presión atmosférica (APCI), fotoionización a presión atmosférica (APPI) e ionización por Electrospray (ESI) (Gilbert, 2010).

En este caso se optó por la utilización de ESI, Fig.9, ya que era el más idóneo puesto que ioniza fácilmente los polifenoles, se puede detectar su peso molecular y además los fragmentos formados nos dan información más que suficiente para poder identificar los compuestos. Para la identificación de compuestos se pueden utilizar patrones comerciales, si no se dispone de ellos, se comparan los espectros de masas obtenidos con datos bibliográficos. La ionización se produce por la aplicación de un alto voltaje (3 - 6 KV) sobre un capilar conductor por el que circula un pequeño flujo de fase móvil de la HPLC a presión atmosférica. La elevada diferencia de potencial crea un campo eléctrico que induce la acumulación de cargas sobre la superficie del líquido al final del capilar, rompiéndose en pequeñas gotas de solvente cargado. Estas gotas se dispersan como consecuencia de la introducción de un flujo de gas inerte coaxial al flujo de la fase móvil, este gas también provoca la evaporación o pérdida del resto de solvente en las gotas, ya que circula a altas temperaturas (Grimalt, 2009).

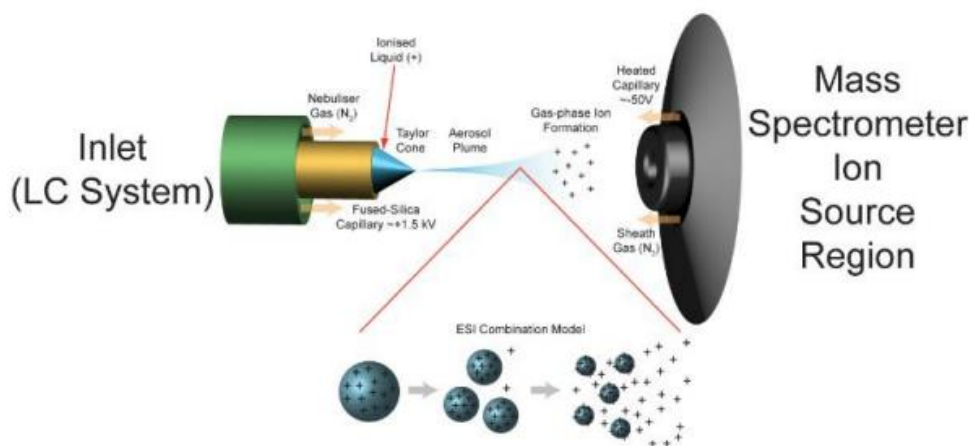


Figura 9.- Descripción general del sistema de ElectroSpray (ESI) y fuente de ionización (Fuente: Alcántara, 2015).

Originalmente la interfase ESI se consideró como una fuente de ionización dirigida a análisis de proteínas, pues es frecuente la formación de iones con más de una carga. De forma que permite el análisis de macromoléculas en instrumentos MS donde su rango de masas no alcanzaría su peso molecular. De ahí que, posteriormente, fuera aplicada no solo a otros polímeros o biopolímeros, sino también a moléculas polares de bajo peso molecular (Gilbert, 2010), (Grimalt, 2009).

Los iones que se forman en ESI pueden ser de carga positiva o negativa, generalmente se presentan como:

- En modo positivo (PI), iones de moléculas protonadas, aductos de sodio, potasio o amonio.
- En modo negativo (NI), iones moleculares desprotonados o aductos de formiato o acetato.

#### 2.4.2.- Analizadores. Trampa iónica tridimensional

Una vez los iones producidos en fase gaseosa alcanzan el analizador de masas, considerado como el alma del espectrómetro de masas, el principio físico en el que se basa su diseño y forma de dispersar los iones y después focalizarlos en función de la relación masa/carga ( $m/z$ ) es el que promueve la diferencia entre los distintos instrumentos de espectrometría de masas.

En el diseño de los analizadores de MS se distinguen como los más notorios: cuadrupolo (Q), trampa de iones tridimensional ((Q) IT), trampa de iones bidimensional o lineal (LIT), Orbitrap por transformada de Fourier (FT–OT), resonancia de ion-ciclotrón por transformada de Fourier (FT–ICR) y Tiempo de vuelo (TOF). La capacidad de un analizador se evalúa de forma general en base a las siguientes características: rango de masas, resolución de masa, eficiencia de iones, exactitud de masa, rango dinámico de linealidad, velocidad de barrido y sensibilidad. Por otro lado, otros factores que también determinan la elección de un instrumento u otro son su adaptabilidad y coste económico.

De todos los analizadores citados anteriormente nos centramos en el utilizado en el desarrollo experimental del trabajo que se presenta, la trampa iónica tridimensional (Gilbert, 2010) (Hoffmann *et al.*, 2002).

El analizador de masa tipo trampa de iones tridimensional o cuadrupolar ((Q) IT) se caracteriza porque tanto la ionización, como la separación y la detección de los iones tiene lugar en el mismo espacio, produciéndose de forma secuencial en el tiempo. La trampa de iones está formada por tres electrodos (Fig.10), dos de ellos hiperbólicos, y entre estos un electrodo en forma de anillo toroidal, situado entre ambos electrodos hiperbólicos.

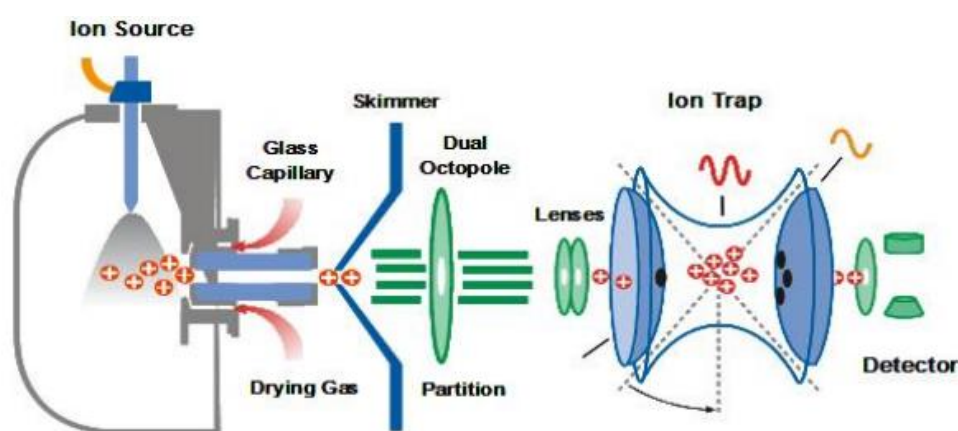


Figura 10.- Esquema trampa iónica (Fuente: Alcántara, 2015)

Una vez que las moléculas de analito alcanzan la trampa, son ionizadas y fragmentadas. Los iones son retenidos o expulsados de la trampa en función de su relación masa/carga, ya que, para unos voltajes de radiofrecuencia (RF) y corriente directa (DC) dados, sólo determinadas relaciones  $m/z$  describirán trayectorias tales que permitan que el ion se encuentre confinado en la trampa. Una vez que los iones son expulsados de la trampa pasan al detector.

Se aplican, simultáneamente, una corriente continua y un potencial de radiofrecuencia, de tal forma que los iones generados quedan confinados dentro del anillo toroidal. Los iones son expulsados de la cámara tras la aplicación de rampas de radiofrecuencia. Conforme aumenta el voltaje, aumenta la amplitud de su movimiento oscilatorio hasta ser expulsados.

Los iones de mayor masa se desestabilizan conforme va aumentando el voltaje de radiofrecuencia, de tal forma que los iones se detectan de forma secuencial, obteniendo así el espectro en función del voltaje y la masa.

Este tipo de analizador es muy útil para obtener espectros de masas en modo Scan en los que se filtran todos los iones comprendidos en un rango  $m/z$  determinado. Este tipo de espectros son muy ricos en iones y muy informativos. A diferencia de los analizadores de tipo cuadrupolar, en los analizadores de tipo trampa de iones estos espectros pueden ser obtenidos sin que se produzca una considerable pérdida de sensibilidad.

Otra característica de estos analizadores es que permiten obtener espectros de masas de iones productos ( $MS^n$ ) lo que tiene mucho interés en la elucidación estructural (Rubinson *et al.*, 2000) (Hoffmann *et al.*, 2002).

Modos de trabajo típicos de los analizadores de masas de trampa iónica:

Los modos de adquisición más usuales que se pueden aplicar son (Rubinson *et al.*, 2000):

- **Barrido de todos los iones (full scan):** En este modo de adquisición todas las moléculas que se ionizan en la interfase llegan al detector.
- **Adquisición de un ion seleccionado (Single Ion Monitoring, SIM):** dirigida a la medida de un solo ion.
- **Adquisición de la reacción seleccionada (Multiple/Selected Reaction Monitoring, MRM o SRM):** se fragmenta un ion precursor en presencia de gas inerte aplicando una energía de colisión óptima. Tras su destrucción en la trampa, se selecciona un ion específico (ion producto) que incida en el detector MS para lograr su detección.
- **Barrido de iones precursor (Precursor Ion Scan):** primero se realiza un barrido de todos los iones provenientes de la interfase, fragmentándose a una energía de colisión determinada, luego, se selecciona uno de todos los fragmentos obtenidos.

### 3.4.3.- Detectores

Tras la salida de los iones del analizador, estos se dirigen al detector, que registra la carga inducida o la corriente producida cuando un ion pasa muy cerca de su superficie o la golpea. Se distinguen varios tipos : Copa de Faraday, Multiplicadores de electrones de dinodos separados, multiplicadores de electrones de dínodo continuo y detectores de microcanales, en este caso nos centramos en el multiplicador de electrones de dínodo continuo, que es el que presenta el equipo de trabajo (Alcántara, 2015).

- Multiplicadores de electrones de dínodo continuo: los iones son desviados a un colector cuya entrada cónica, de vidrio o berilio, hace de cátodo de conversión. Los electrones liberados son atraídos hacia el electrodo positivo. Los constantes choques de los electrones con la pares provocan su multiplicidad.

### 2.5.- Cromatografía líquida de acoplada a espectrometría de masas

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada con la Espectrometría de Masas es una técnica química analítica que combina las capacidades de separación física de la Cromatografía Líquida con las capacidades de análisis de masas de la Espectrometría de Masas. Esta técnica analítica tiene una sensibilidad muy alta, lo que lo que resulta útil para muchas aplicaciones. Su aplicación está orientada a la separación, la detección y principalmente a la identificación de compuestos químicos en presencia de más compuestos, es decir, en mezclas complejas. Por ejemplo, identificación de productos naturales a partir de extractos de plantas naturales.

### 3.- OBJETIVOS

- Caracterizar por vez primera la fracción fenólica de una planta, en concreto *Quercus Coccífera*, perteneciente a una familia con reconocidas propiedades antioxidantes. Se identificaron y caracterizaron los principales compuestos fenólicos de manera individual.

- De acuerdo a su composición en polifenoles, hacer un estudio preliminar de la posible aplicación de sus extractos en el campo de la industria farmacéutica, cosmética o en la industria alimentaria (conservantes, antioxidantes, etc.).

#### 4.- MATERIALES Y MÉTODOS

##### 4.1.-Reactivos.

Metanol, PANREAC, 100%

Carbón activo

Acetonitrilo, PANREAC

Acetona, PANREAC

Ácido fórmico, PANREAC

Agua ultra pura (18,2  $\mu$ S) preparada por un sistema Mili-Q Gradient A 10.

##### 4.2.- Aparatos e instrumentos.



Figura 11.-Sistema cromatográfico Agilent 1100 – Esquire 6000  
(Fuente: Alcántara, 2015)

El sistema cromatográfico está compuesto de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución, (Agilent 1100), Fig.11, acoplado a un espectrómetro de masas con trampa iónica como analizador, equipado con un ionizador de electrospray (ESI), (Esquire 6000 de Bruker Daltonics).

Para secar la planta utilizamos un liofilizador, concretamente se utilizó el MODULYOD, Fig.12, que es un condensador de hielo de 5L de capacidad. Las características que presenta este equipo son las siguientes:

- Capacidad máxima de la cámara de condensación: 5L
- Temperatura de trabajo: -50°C
- Rango de temperatura del display: Desde temperatura ambiente hasta -60°C
- Rango de presión del display: 30µbar hasta 50 mbar



Figura 12.- Liofilizador, MODULYOD

(Fuente:<http://www10.ujaen.es/sites/default/files/users/cict/PB01-MODULYOD.jpg>).

Para realizar la extracción de manera correcta, es necesario que tanto la hoja como el fruto respectivamente, se disuelvan perfectamente cuando se le añade el disolvente. Para que esto se desarrolle de forma correcta, se utilizó el baño de ultrasonidos, concretamente el modelo Bandelin Sonorex Digital 10P, Fig.13, de la casa comercial Sigma-Aldrich con una potencia de 35 Hz y 280 W.



Figura 13.- Baño de ultrasonidos Bandelin Sonorex Digital 10P (Fuente: <http://www.directindustry.es/prod/bandelin/product-38509-546453.html>)

### 4.3.- Procedimiento experimental.

#### 4.3.1.- Muestreo

A la hora de la realización del trabajo se pretendía que la planta elegida fuese autóctona de la zona de Jaén y además que previamente no se hubiera realizado un estudio en cuanto a la composición en polifenoles. Primeramente se hizo una selección de las principales plantas autóctonas de la zona, preferentemente que se encontrasen en Sierra Morena. Una vez que se tuvo el abanico de las posibles plantas con las que trabajar se hizo una búsqueda acerca de los trabajos previos que se habían realizado sobre la determinación de polifenoles en estas plantas. Algunas de las plantas que se barajaron como posibles candidatas fueron, *Quercus ilex* (encina), *Arbutus unedo* (madroño) y *Quercus suber* (alcornoque). Algunas de las plantas candidatas son de la misma familia que la planta sobre la que se ha realizado el trabajo. El inconveniente que presentaban estas plantas es que ya estaban estudiadas en este aspecto, puesto que había varios trabajos descritos de ellas sobre determinación de polifenoles, contenido total de fenoles, propiedades beneficiosas de estas plantas, etc. Sin embargo en el caso de la *Quercus Coccifera* no había nada descrito, por lo tanto se eligió esta planta para la realización del trabajo.

Las coordenadas concretas del punto donde se recogió la muestra son: 38°08'01.97" N, 3°58'30.03"O. Altitud 549 metros. En la Fig.7 se muestra una de las plantas en las que se llevó a cabo la toma de muestra.

Las hojas y el fruto fueron recogidos de plantas diferentes, dentro de cada planta de distintos lugares de la misma, con el fin de que fuera lo más representativo posible.

Las condiciones climatológicas de la zona se caracterizan por ser una zona seca, donde las precipitaciones suelen ser escasas durante casi todo el año y con temperaturas extremas tanto en invierno como en verano. En verano, Andújar, es uno de los pueblos con mayores temperaturas, llegando muchos días a 40°C y en invierno las temperaturas son bajas; en esta zona de sierra suelen estar ligeramente por debajo de los 0°C.



Figura 7.- Una de las plantas donde se realizó la recolección.

La recogida tanto del fruto como de la hoja se produjo a principios del mes de octubre, recién comenzado el otoño. La recolecta se hizo en esta época puesto que es al comienzo del otoño cuando esta planta florece y da sus frutos. Debido al clima seco de la zona y a la escasez de precipitaciones se decidió hacer la recolección pronto para evitar que el fruto cayera al suelo. Todas las hojas y las bellotas recolectadas fueron cogidas directamente del árbol. Una vez que se tuvo las muestras fueron almacenadas en diferentes lugares, el fruto en el frigorífico y las hojas en un lugar seco y cerrado para evitar que cogieran humedad. Lo importante para asegurar el buen comportamiento de las muestras, es que sean tratadas al poco de ser recogidas. Se ha procedido a la preparación de la muestra una semana después de su recogida, primero se

empezó por las hojas mientras que el fruto siguió guardado en el frigorífico. Las hojas se secaron primero a temperatura ambiente durante una semana, para tener la certeza de que no contenían humedad, que puede interferir en el proceso, se liofilizaron.

#### 4.3.2.- Extracción de la fracción fenólica

Preparación de la muestra.

Hoja:

- 1.- Separación de las hojas de las ramas: las hojas que estaban en mal estado o amarillas se descartaron y se utilizaron únicamente las que tenían buen aspecto.
- 2.- Se pesó las hojas ya separadas, y había 39.6 g de estas.
- 3.- Las hojas se trituraron con un molinillo y se recolectaron en un recipiente que fue almacenado en el frigorífico a 4°C hasta que se realizó la extracción.

Fruto:

Preparación del fruto: se molturó con un mortero de cerámica hasta llegar a un punto de molturación homogéneo. El fruto fue almacenado en el frigorífico a 4°C hasta la realización del proceso de extracción.

Proceso de extracción.

Para la extracción se utilizaron unos 2 g de muestra, tanto del fruto como de la hoja, y se les añadió 25 mL de metanol al 100%. Ambos matraces se llevaron a ultrasonidos durante 1 hora, con el equipo trabajando al 100% de rendimiento y sin calentar; como es inevitable que el agua aumente un poco de temperatura, se controló la temperatura para que no se sobrepasen los 40°C. Para ello a los 30 min se le quitó un poco de agua al baño de ultrasonidos y se rellenó con agua destilada a temperatura ambiente, para disminuir un poco la temperatura y continuar con el proceso.

Una vez finalizado, se llevó a cabo una filtración. Para ello se utilizó filtros de pliegues y un embudo cónico, el proceso de filtración fue el siguiente:

1.- Se vertió el contenido del Erlenmeyer en un bote de plástico, se echó a través del filtro de pliegues con cuidado de que las hojas se queden en el matraz para no atrancar el filtro, y se trabajó únicamente con la fase líquida en el bote de plástico, desechando el resto de hojas y de fruto que quedaron en el matraz.

2.- Se volvió a hacer una segunda filtración. Al bote se le echó un poco de carbón activo, se agitó e inmediatamente se volvió a filtrar a otro bote de plástico, el objetivo fue continuar trabajando con la fase líquida pero con menos color, es importante que no pase nada de carbón activo, es decir, que se quede todo en el filtro. Después de esta segunda filtración la fase líquida está más decolorada, sigue teniendo un tono verde tenue, pero no el verde intenso del primer filtrado.

Este proceso se realizó para los 4 matraces.

El siguiente punto del proceso experimental fue intentar eliminar todo el disolvente que se añadió, para conservar únicamente el extracto de la planta, donde se encuentran los polifenoles. Para ello se trasvasó la disolución del bote de plástico a un matraz de fondo redondo de 100ml, cabe recordar que el proceso se llevó a cabo por duplicado por lo tanto cada bote de plástico se trasvasó a un matraz de fondo redondo distinto para seguir realizando el proceso paralelamente en ambas muestras. Posteriormente, estos matraces se introdujeron en el rotavapor para eliminar el metanol (disolvente). Como la disolución únicamente contiene metanol y el extracto de planta, la temperatura del baño donde se sumerge el matraz no debe ser muy elevada, se seleccionó una temperatura de 30°C. No conviene alcanzar mayores temperaturas puesto que podría ser que se evaporasen los compuestos que se tenían que analizar. El tiempo que cada matraz estuvo en el rotavapor fue de unos 30 minutos. Pasado este tiempo se observó que en el matraz se tenía el extracto, de color verde y aspecto gelatinoso, pegado a las paredes y se observó también pequeñas gotas que probablemente fueran restos de disolvente que no se consiguió evaporar.

Una vez que se tuvo los matraces después de pasar por el rotavapor, lo que se hizo es recoger este extracto mediante una espátula y se transfirió a un vial, como el contenido de extracto obtenido en ambos matraces es bajo, lo que se hizo fue juntar ambos extractos en un único vial, como las muestras se trataron de la misma manera y de forma paralela no pasa nada porque se juntase su contenido. Se ha conseguido arrastrar al vial un total de 39.93 mg del extracto de la hoja y 35.82 mg para el fruto. Esta cantidad fue suficiente para continuar trabajando, puesto que para inyectar en el cromatógrafo únicamente se utilizaron 5 mg, y nos quedó muestra sin utilizar por si ocurría algún problema y había que volver a inyectarlo.

El último paso fue pesar, en otro vial limpio, 5 mg del extracto y se disolvió en 1 ml de acetonitrilo: agua al 20%. Se homogenizó bien, se filtró y ya se tuvo la muestra lista para ser inyectada en el equipo. Los filtros utilizados fueron filtros PTFE de 0.45 mm de membrana. Después de la filtración, en el equipo se inyectó únicamente 10  $\mu$ L de cada extracto para obtener el cromatograma, el resto se guardó por si el equipo fallaba o el cromatograma no salía bien, para poder repetir la inyección.

#### 4.3.3.- Método cromatográfico

Considerando la naturaleza de la columna que se utilizó en el HPLC y la diferente naturaleza de los compuestos que fueron separados, como fase móvil se utilizó acetonitrilo (A) y una mezcla de ácido fórmico-agua (100:0.1, v/v) (B). La mejor separación se obtuvo utilizando el siguiente programa de gradiente: 10% A (0 min), 25% A (10–20 min), 50% A (40 min), 100% A (42–47 min), and 10% A (49 min). La velocidad de flujo de la fase móvil fue de 0.4 ml min<sup>-1</sup>. Los extractos se filtraron a través de un filtro PTFE de 0.45 mm de membrana, y después del filtrado se inyectaron 10  $\mu$ L de cada extracto en el cromatógrafo.

El equipo utilizado es un espectrómetro de masas Bruker modelo Esquire 6000 unido a un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) Agilent 1100, el equipo trabajó en modo de iones negativo. El rango de exploración se fijó en una relación m/z de 100 a 1200 con una velocidad de 13000 Da s<sup>-1</sup>. Las condiciones ESI fueron las siguientes: gas de secado (N<sub>2</sub>), velocidad de fluido y

temperatura, 10 mL min<sup>-1</sup> y 365 °C, gas nebulizador (N<sub>2</sub>), presión, 50psi, la tensión capilar es de 4500 V y la de salida -117.3 V. La adquisición de datos se hizo en modo de masas automático, con un ancho de aislamiento de 4.0 m/z y la amplitud de la fragmentación fue de 0.6 V hasta la cuarta fragmentación. El software utilizado para la adquisición de datos ha sido el Esquire control y para procesar estos datos el Data Analysis (Spínola *et al.*, 2014).

## 5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1.- Optimización del proceso de extracción.

Antes de que diera comienzo el procedimiento experimental, se debe de optimizar un proceso de extracción para las muestras. En nuestro caso, el proceso de extracción de los polifenoles se llevó a cabo mediante el método de Spínola con ligeras modificaciones (Spínola *et al.*, 2014). El proceso de optimización se resume a continuación. La acetona y el metanol han sido los disolventes de extracción con los que se ha hecho el ensayo. Lo que se hizo, brevemente, fue pesar 5 g de hoja en polvo y disolver con 100 mL de disolvente y se sometieron a un tratamiento con ultrasonidos con unas condiciones de 35 Hz y 200 V durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después, los extractos se filtraron y se concentraron a sequedad mediante presión reducida en un evaporador rotatorio (rotavapor) a 40°C.

La eficiencia de extracción con las diferentes condiciones se determinó por medio del ensayo de contenido total de polifenoles de la planta. Sobre estos resultados, fueron probadas también la concentración de disolvente en agua (% v/v) y la influencia del tiempo de extracción (60,30 y 15 min). Por último, cuando las condiciones cromatográficas más favorables se encontraron, se aplicaron a la planta con la que se iba a trabajar y los extractos resultantes se almacenaron a -4°C hasta su análisis.

Vamos a explicar ahora algunos puntos interesantes del procedimiento experimental. El primero de ellos es la razón por la que se añadió carbón activo, éste se le añade a la fase acuosa para decolorarla, es decir, para quitarle clorofilas. La fase acuosa del primer filtrado presentaba un color muy verde, esto es porque tiene un alto contenido en clorofilas que podrían

interferirnos a la hora del análisis de los polifenoles, por ello fue necesario añadir carbón activo que retiene las clorofilas. En principio se podría pensar que para eliminar más cantidad de clorofilas y tener la disolución incolora se debería dejar la muestra más tiempo en contacto con el carbón activo, pero en este caso se corría el riesgo de que quedaran retenidos además de la clorofila algún polifenol. El objetivo del trabajo es la determinación de los polifenoles presentes en la planta, por lo tanto sería conveniente que no quedaran retenidos.

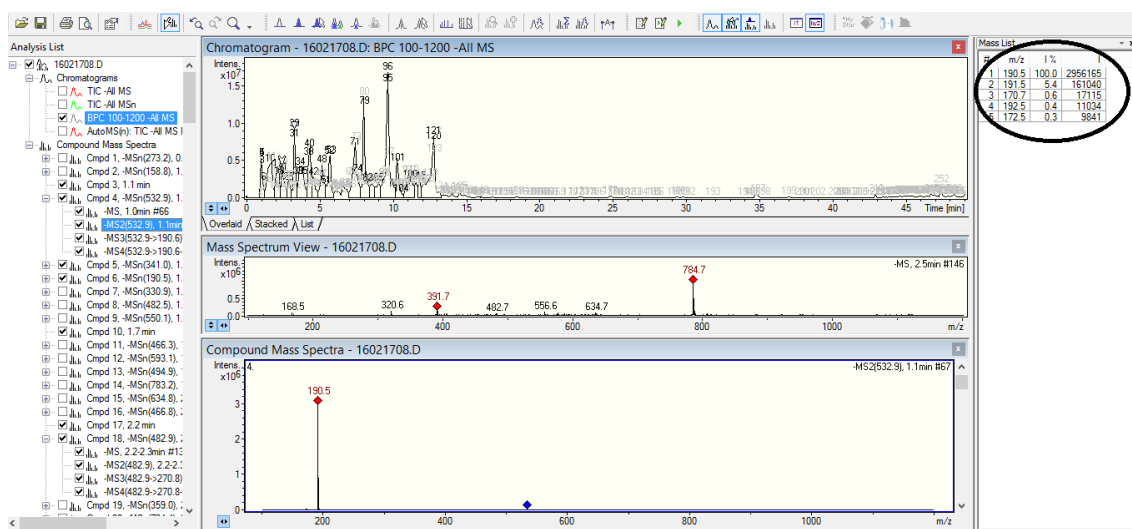
Otro de los aspectos interesantes de explicar, es por qué después de tener los matraces 30 min en el rotavapor para eliminar el disolvente, aparecen junto al extracto gotas de disolvente. Para intentar eliminarlo por completo se podría probar a volver a llevar el matraz al rotavapor durante más tiempo y aumentar un poco la temperatura, pero esto no se hizo debido a que estas pequeñas gotas no van a producir errores graves en el análisis puesto que se hizo un análisis cualitativo y además este extracto que se recogió, posteriormente se volvió a disolver en una mezcla de acetonitrilo-agua, si el análisis realizado hubiera sido cuantitativo si deberíamos habernos asegurarnos que no quedaban restos de disolvente.

## **5.2.- Procedimiento para la identificación de compuestos**

El programa que se ha utilizado para el tratamiento y la identificación de datos ha sido el *Bruker Daltonics Data Analysis*. Se han analizado dos tipos de cromatogramas, el de las hojas y el de los frutos. En el cromatograma se observa que hay cientos de picos de diferentes intensidades, en este caso solo nos van a interesar los de mayor intensidad, es decir, los más abundantes. Lo primero que se hace es en el apartado de opciones del programa, seleccionar el modo ion negativo, que es con el que se ha trabajado en el espectrómetro de masas, y poner un límite de intensidad mínima, con esto se consigue que los picos de menor intensidad no aparezcan y se pueda observar el cromatograma con más claridad. La intensidad mínima que se selecciono fue de 500000, de esta forma los picos que se encuentran por debajo de esta intensidad quedan sin señalar en el cromatograma y únicamente nos quedaron señalizados entre 10 y 15 picos, que es lo que se iba buscando, puesto que estos son los picos

## ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DE PLANTAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

de más intensidad y por lo tanto los más abundantes, que nos permitieron encontrar los compuestos fenólicos que se encuentren en mayor cantidad tanto en la hoja como en el fruto de la planta. El análisis de estos picos consistió en ver cuáles han sido las diferentes fragmentaciones que el equipo realizó en función de la relación  $m/z$ . En la imagen que hay a continuación, Fig.14, tenemos detallada toda la información que obtuvimos del cromatograma, lo que aparece en primer lugar es el tiempo de retención, es decir, el tiempo en el que el cromatógrafo de gases ha detectado esa fragmentación para una determinada relación  $m/z$ ; para esta determinada  $m/z$  aparecen también las sucesivas fragmentaciones, hasta MS4, indicando de qué  $m/z$  viene precedida la fragmentación y las relaciones  $m/z$  de los fragmentos así como su intensidad. Se ordenó los fragmentos de mayor a menor intensidad y se trabajó con los de mayor intensidad, cuando hay muchas fragmentaciones para una determinada relación  $m/z$  se seleccionan las que presentan mayor intensidad, que son las principales y las que nos sirvieron para posteriormente intentar identificar ese compuesto.



fragmentaciones. Un ejemplo de cómo intentar identificar uno de los picos en Google Académico sería el siguiente, Fig.15.

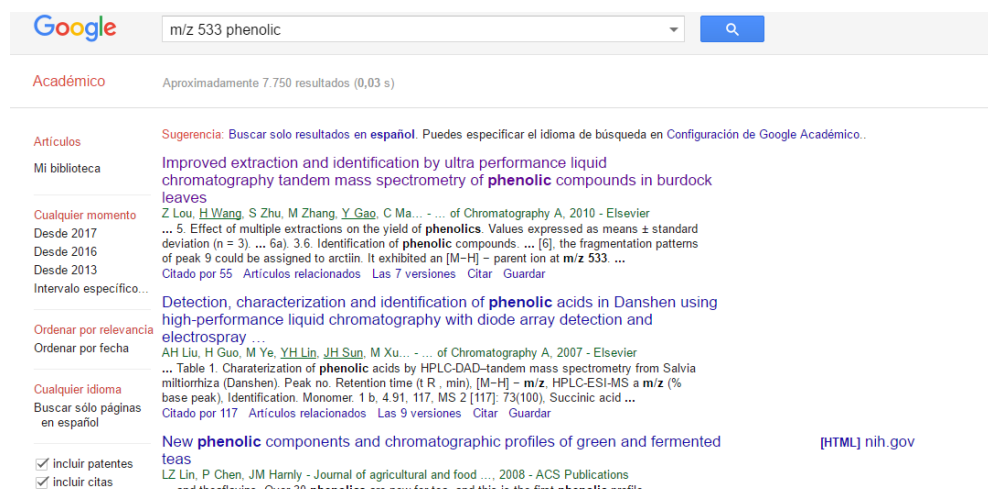


Figura 15.- Búsqueda para la identificación de las fragmentaciones

Se introdujo el pico principal, precedido de la relación masa carga ( $m/z$ ) y después la palabra phenolic para que el buscador nos relacione con trabajos de fenoles que es lo que se iba buscando, a partir de ahí se comparó los diferentes artículos encontrados en las tablas donde identifican compuestos y se comprobó si las fragmentaciones coincidían con las del pico que se estaba intentando identificar.

En general en el espectro en modo de ionización negativa (ESI-), el pico más intenso corresponde al ion molecular desprotonado  $[M-H]^-$ . Algunas de las pérdidas principales que se dan en las fragmentaciones suelen ser de restos de azúcar como hexosilo, desoxihexosilo, pentosilo, rutinosilo y glucoronilo (sus respectivas pérdidas son -162,-146,-132,-308 y -176) (Llorent-Martínez *et al.*, 2015a). A continuación, en las tablas, los compuestos han sido enumerados por su orden de elución

### 5.3.- Identificación de compuestos en fruto

| No. | t <sub>R</sub><br>(min) | [M-H] <sup>-</sup><br>m/z | m/z (% pico base)                                                                                                                                                                                                                     | Identificación asignada    | Referencia                     |
|-----|-------------------------|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| 1   | 1.1                     | 533                       | MS <sup>2</sup> [533]: 191 (100), 192(5.4)<br>MS <sup>3</sup> [533→191]: 191 (30.1), 127(28.9)                                                                                                                                        | Derivado del ácido quínico | (Spínola <i>et al.</i> , 2014) |
| 2   | 1.1                     | 341                       | MS <sup>2</sup> [341]: 179 (100), 143 (25.1), 161 (20.4), 119 (11.1),<br>MS <sup>3</sup> [341→179]: 149 (100), 161 (25.6)                                                                                                             | Sacárido                   | (Spínola <i>et al.</i> , 2016) |
| 3   | 1.2                     | 191                       | MS <sup>2</sup> [191]: 111 (100), 171 (27.2)                                                                                                                                                                                          | Ácido cítrico              | (Spínola <i>et al.</i> , 2016) |
| 4   | 2.3                     | 483                       | MS <sup>2</sup> [483]: 271 (100), 331 (27.8), 313 (24.8), 211 (15.8)                                                                                                                                                                  | Digaloil glucosa           | (Mämmelä <i>et al.</i> , 2000) |
| 5   | 3.3                     | 183                       | MS <sup>2</sup> [183]: 167 (5.2)<br>MS <sup>3</sup> [183→167]: 123 (100)                                                                                                                                                              | Desconocido                |                                |
| 6   | 3.9                     | 785                       | MS <sup>2</sup> [785]: 301 (76.8), 483 (51.3), 633 (12.7), 275 (9.1)<br>MS <sup>3</sup> [785→301]: 257 (26.5)<br>MS <sup>3</sup> [785→483]: 169 (100), 313 (59.1), 193 (39.8), 295 (30), 331 (29.7), 176 (14), 221 (12.4), 205 (10.8) | Desconocido                |                                |

|    |     |     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                   |                                          |
|----|-----|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|------------------------------------------|
| 7  | 4.3 | 387 | MS <sup>2</sup> [387]: 207 (100), 163 (66.6),<br>MS <sup>3</sup> [387→207]: 163 (100)                                                                                                                                                                                                                                                               | Medioresinol      | (Llorent-Martínez <i>et al.</i> , 2015b) |
| 8  | 5.5 | 635 | MS <sup>2</sup> [635]: 483 (100)<br>MS <sup>3</sup> [635→483]: 271 (100), 331 (33.1),<br>169 (20.3), 211 (13.4), 313 (10.1)<br>MS <sup>4</sup> [635→483→271]: 211 (100), 168<br>(25.7)                                                                                                                                                              | Trigaloil glucosa | (Mämmelä <i>et al.</i> , 2000)           |
| 9  | 7.6 | 335 | MS <sup>2</sup> [335]: 183 (100),<br>MS <sup>3</sup> [335→183]: 123 (31.8), 167 (21.2)                                                                                                                                                                                                                                                              | Desconocido       |                                          |
| 10 | 8.3 | 787 | MS <sup>2</sup> [787]: 635 (100), 617 (65), 636<br>(17.4), 618 (16.5), 483 (14.9)<br>MS <sup>3</sup> [787→635]: 483 (100),<br>MS <sup>4</sup> [787→617→483]: 271 (100), 331<br>(18.6), 313 (11.2)<br>MS <sup>3</sup> [787→617]: 331 (100), 465 (68.6),<br>447 (56), 573 (48.7), 403 (31.5), 211<br>(13)<br>MS <sup>4</sup> [787→617→331]: 456 (100) | Desconocido       |                                          |
| 11 | 9.7 | 671 | MS <sup>2</sup> [671]: 335 (100)<br>MS <sup>3</sup> [671→335]: 183 (100)                                                                                                                                                                                                                                                                            | Desconocido       |                                          |

|    |      |     |                                                                                                                                                                                                      |                                 |                                |
|----|------|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| 12 | 10.6 | 939 | MS <sup>2</sup> [939]: 787 (100)<br>MS <sup>3</sup> [939→787]: 787(100), 635 (74.3), 617 (74), 573 (26), 785 (20.2), 465 (15.6), 343 (11.7)<br>MS <sup>4</sup> [939→787→617]: 573 (37.2), 465 (26.7) | Desconocido                     |                                |
| 13 | 12.8 | 487 | MS <sup>2</sup> [487]: 335 (100), 183 (11.1)<br>MS <sup>3</sup> [487→335]: 183 (100)<br>MS <sup>4</sup> [487→335→183]: 123 (70.9), 167 (29)                                                          | Ácido ferúlico-O-pentosilhexosa | (Spínola <i>et al.</i> , 2016) |

#### 5.4.- Identificación de compuestos en hoja

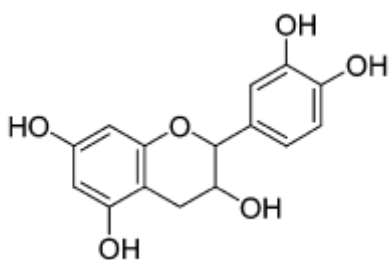
| No. | t <sub>R</sub><br>(min) | [M-H] <sup>-</sup><br>m/z | m/z (% pico base)                                                                                                        | Identificación asignada | Referencia                     |
|-----|-------------------------|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| 1   | 1.2                     | 191                       | MS <sup>2</sup> [191]: 111 (100)                                                                                         | Ácido cítrico           | (Spínola <i>et al.</i> , 2016) |
| 2   | 1.3                     | 331                       | MS <sup>2</sup> [331]: 169 (100), 271 (43.1), 211 (40.3), 193 (18.2)<br>MS <sup>3</sup> [331→169]: 125 (100), 167 (31.2) | Glucogalina             | (Mena <i>et al.</i> , 2012)    |
| 3   | 3.0                     | 289                       | MS <sup>2</sup> [289]: 245 (100), 205 (34), 203                                                                          | Catequina               | (Rockenbach <i>et al.</i> ,    |

|   |     |     |                                                                                                                                                                                                      |                            |                                |
|---|-----|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|--------------------------------|
|   |     |     | (28.8), 179 (11.2)<br>MS <sup>3</sup> [289→245]: 203 (100), 227 (68), 187 (46.1), 161 (31.8), 149 (24), 159 (21.2)<br>MS <sup>4</sup> [289→245→203]: 203 (100)                                       |                            | 2012)                          |
| 4 | 4.4 | 431 | MS <sup>2</sup> [431]: 385 (100), 161 (9.4)<br>MS <sup>3</sup> [431→385]: 153 (100), 205 (67.7), 223 (47.7), 161 (44.5), 137 (18.9), 113 (10), 187 (9.6)<br>MS <sup>4</sup> [431→385→153]: 137 (100) | Roseoside                  | (Spínola <i>et al.</i> , 2014) |
| 5 | 7.3 | 391 | MS <sup>2</sup> [391]: 183 (100), 345 (54.7), 207 (16.1)<br>MS <sup>3</sup> [391→183]: 121 (100), 139 (69.8), 165 (52.3), 119 (38.4),                                                                | Loganina (Aducto fórmico)  | (Ye <i>et al.</i> , 2014)      |
| 6 | 7.3 | 345 | MS <sup>2</sup> [345]: 183 (100),<br>MS <sup>3</sup> [345→183]: 165 (100), 139 (84.6), 121 (78.5)                                                                                                    | Loganina o isómero         | (Ye <i>et al.</i> , 2014)      |
| 7 | 7.7 | 615 | MS <sup>2</sup> [615]: 463 (100), 301 (35.5), 463 (31),<br>MS <sup>3</sup> [615→463]: 301 (100), 179 (11.1)<br>MS <sup>4</sup> [615→463→301]: 255 (100), 151                                         | Quercetina hexósido-galato | (Fang <i>et al.</i> , 2007)    |

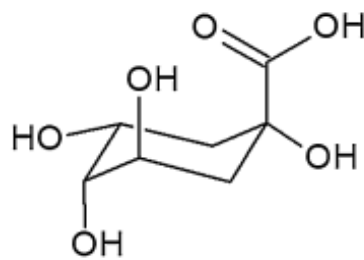
|    |      |     |                                                                                                                                                                                                                |                                         |                                |
|----|------|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------|
|    |      |     | (61.8), 179 (61.6), 271 (22.6), 159 (19.3)                                                                                                                                                                     |                                         |                                |
| 8  | 7.7  | 509 | MS <sup>2</sup> [509]: 463 (100)<br>MS <sup>3</sup> [509→463]: 149 (100), 331 (81.9),<br>311 (30.4), 131 (13.2), 297 (8.3)<br>MS <sup>4</sup> [509→463→149]: 113 (100)                                         | Desconocido (Aducto fórmico)            |                                |
| 9  | 7.9  | 377 | MS <sup>2</sup> [377]: 331 (100), 179 (13.5)<br>MS <sup>3</sup> [377→331]: 179 (100), 161 (33.9),<br>143 (33.6), 159 (29.4), 113 (19.6), 119<br>(19.2), 125 (14.9)<br>MS <sup>4</sup> [377→331→143]: 113 (100) | Derivado Sacárido                       |                                |
| 10 | 8.1  | 345 | MS <sup>2</sup> [345]: 119 (100), 121 (40.2), 113<br>(33.3), 129 (26.8), 101 (23.2), 161 (22),<br>301 (18.9), 183 (17.5), 125 (16.6), 159<br>(10.4)<br>MS <sup>3</sup> [345→119]: 101 (100)                    | Desconocido                             |                                |
| 11 | 14.7 | 507 | MS <sup>2</sup> [507]: 461 (100), 293 (44.8),<br>MS <sup>3</sup> [507→461]: 293 (100), 149 (16.9)<br>MS <sup>4</sup> [507→461→293]: 125 (100), 149<br>(17.5)                                                   | Trihidroxi-metoxiflavonona-O-<br>hexosa | (Spínola <i>et al.</i> , 2016) |
| 12 | 15.1 | 493 | MS <sup>2</sup> [493]: 447 (100)                                                                                                                                                                               | Desconocido (Aducto fórmico)            |                                |

|    |      |     |                                                                                                                                                                                                          |                                    |  |
|----|------|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|--|
|    |      |     | MS <sup>3</sup> [493→447]: 149 (100), 131 (31.6), 191 (18.5), 165 (18.2)<br>MS <sup>4</sup> [493→447→149]: 131 (100), 113 (18.2), 118 (18.2)                                                             |                                    |  |
| 13 | 15.5 | 507 | MS <sup>2</sup> [507]: 461 (100), 293 (32.3), 462 (18.9), 339 (10.6)<br>MS <sup>3</sup> [507→461]: 293 (100), 131 (30.2), 149 (17.3), 163 (12.2)<br>MS <sup>4</sup> [507→461→293]: 191 (100), 125 (97.6) | Desconocido (Aducto fórmico)       |  |
| 14 | 15.7 | 493 | MS <sup>2</sup> [493]: 447 (100)<br>MS <sup>3</sup> [493→447]: 149 (100), 161 (21), 191 (18.8), 311 (13.6), 221 (11.9), 131 (11)<br>MS <sup>4</sup> [493→447→149]: 131 (100)                             | Derivado Sacárido (Aducto fórmico) |  |

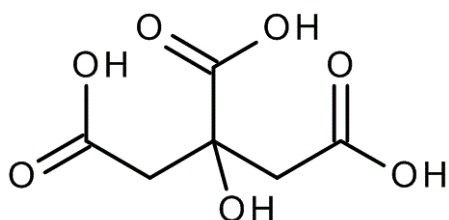
A continuación aparecen las estructuras de los principales compuestos identificados, tanto en la hoja como en el fruto, Fig.16.



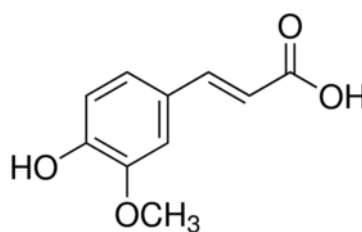
Catequina (Fuente: es.wikipedia.org)



Ácido quínico (Fuente: Llorent-Martínez  
*et al.*, 2015b)



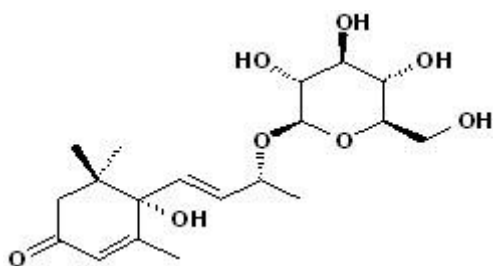
Ácido Cítrico



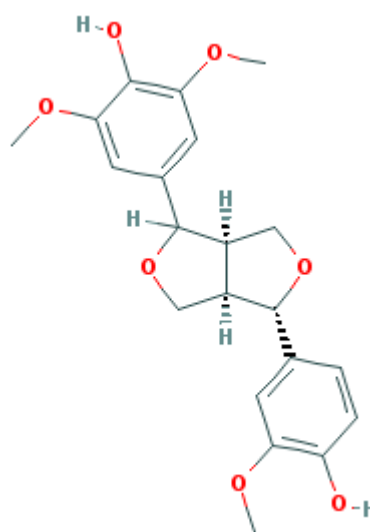
Ácido Ferúlico

Ácido Cítrico: (Fuente: <http://www.nortemchem.com/descripcion-del-acido-citrico/>)

Ácido Ferúlico: (Fuente: <http://www.sigmaaldrich.com>)



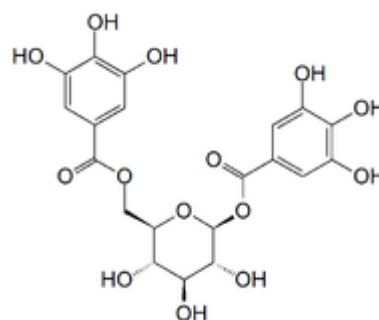
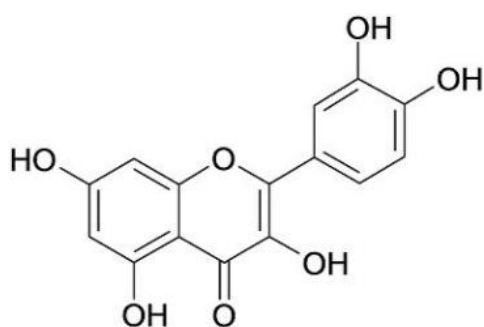
Roseoside



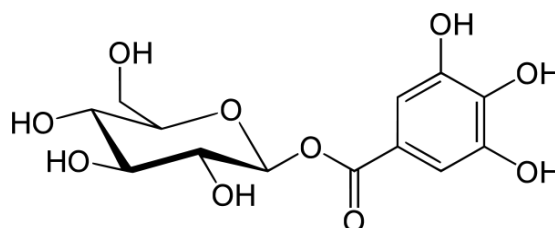
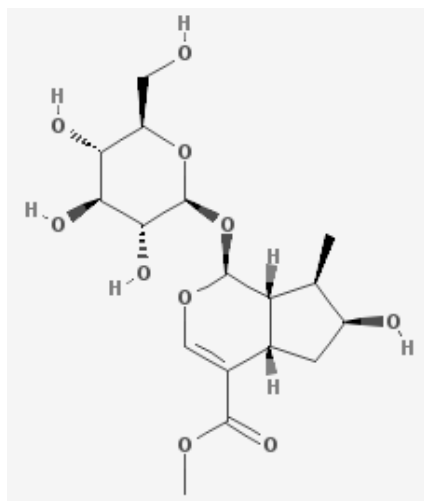
Medioresinol

Roseoside (Fuente: <http://www.hpfaces.com/product/Roseoside-7825.html>)

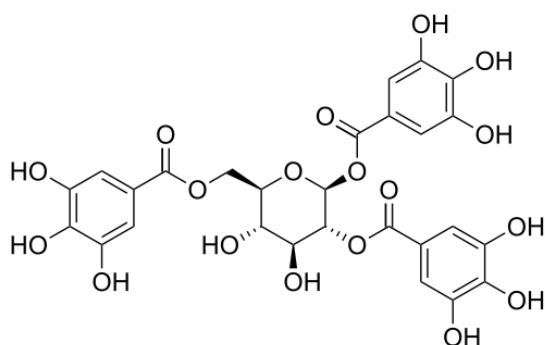
Medioresinol (Fuente: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/332425>)



Quercetina (Fuente: [es.wikipedia.org](https://es.wikipedia.org)) Digaloil glucosa (Fuente: [es.wikipedia.org](https://es.wikipedia.org))



Loganina (Fuente: [es.wikipedia.org](https://es.wikipedia.org)) Glucogalina (Fuente: [es.wikipedia.org](https://es.wikipedia.org))



Trigaloil glucosa (Fuente: [es.wikipedia.org](https://es.wikipedia.org))

Figura 16.- Estructura de los principales compuestos identificados

## 6.- CONCLUSIONES

Se ha determinado la composición en compuestos fenólicos de una planta, *Quercus Coccifera*, que no había sido estudiada hasta la actualidad, aportando así conocimiento sobre la misma, tanto sobre sus componentes como sobre sus posibles propiedades. Aunque no se han identificado todos los componentes del extracto fenólico, sí muchos de ellos que poseen conocida actividad biológica y farmacológica. El trabajo realizado puede servir como punto de partida para futuras líneas de investigación que aborden las posibles aplicaciones de esta planta en la industria alimentaria y farmacéutica.

A continuación se relacionan los compuestos fenólicos mayoritarios que se han identificado en la planta *Quercus Coccifera*. Entre ellos cabe destacar la *Quercetina* y los galotaninos *Digaloil glucosa*, *Trigaloil glucosa* y *Glucogalina*, por sus propiedades beneficiosas para la salud.

- Ácido quínico: pertenece a la familia de los ácidos fenólicos. Además de sus propiedades antioxidantes, algunos estudios han demostrado su actividad antiviral y propiedades anticarcinogénicas (Gui-Feng *et al.*, 2009). En cuanto a sus aplicaciones, inicialmente se pensó que era un compuesto farmacológicamente inactivo, pero en la actualidad se utiliza como material de partida para la síntesis de nuevos productos farmacéuticos.
- Ácido cítrico: este compuesto pertenece a la misma familia que el anterior, es un ácido tricarboxílico. Está presente en la mayoría de las frutas, de forma mas abundante en cítricos como el limón y la naranja. Este compuesto es un buen conservante y antioxidante natural, por lo que se utiliza como aditivo en el envasado de muchos alimentos.
- Ácido ferúlico: pertenece al grupo de los ácidos hidroxicinámicos. Se encuentra en la pared celular de las plantas y tiene propiedades antioxidantes, pudiendo ser utilizado para prevenir la oxidación de lípidos en los alimentos; además previene de enfermedades inducidas por radicales libres, como el cáncer, y aterosclerosis o envejecimiento causados por la degeneración del tejido oxidativo (Hiroe *et al.*, 2002).

- Catequina: es un antioxidante procedente de las plantas, en las cuales aparece como metabolito secundario. Pertenecce al grupo de los flavonoles.
- Digaloil glucosa, Trigaloil glucosa y Glucogalina: pertenecen al grupo de los taninos, compuestos que presentan diferentes actividades biológicas y farmacológicas entre las que cabe citar efectos antiseoretos y antiulcerogénicos (Okuda *et al.*, 1992). Tradicionalmente se han usado en todo el mundo para tratar las úlceras gástricas.
- Quercetina: es el compuesto fenólico de mayor importancia identificado en la planta en estudio. La quercetina es un flavonol que generalmente se encuentra unida a azúcares en forma de O-glicósidos, que son muy difíciles de absorber. Estos últimos son hidrolizados en el intestino delgado y, completado este proceso, la quercetina aglicada es absorbida eficientemente. La quercetina es el flavonoide mas abundante y más habitual en la dieta humana, destacando por su elevada actividad antioxidante, además es el precursor de otros flavonoides como la naringenina o la rutina. Muchas plantas, ya sean consideradas medicinales o no, deben su gran parte de sus beneficios a los altos niveles de quercetina que presentan. En cuanto a sus aplicaciones, destacan principalmente las terapéuticas. La mayor de sus propiedades, es un elevado poder antioxidante, además posee actividad cardiovascular, antiinflamatoria, antitumoral, inmunológica, antiviral y previene la obesidad (Morand *et al.*, 1998). La quercetina posee también actividad antihistamínica lo que provoca que sea útil para la prevención de ataques alérgicos y de asma. Hoy en día la quercetina es comercializada en multitud de suplementos alimenticios, ya sea como comprimidos o tabletas, y se recomienda que sea ingerida en 2-3 dosis diarias junto con la comida.

Podemos concluir que, teniendo en cuenta los compuestos fenólicos identificados en la planta *Quercus Coccifera* y sus propiedades, y que muchos de ellos no se han identificado aún, esta planta podría tener interés para la elaboración de fármacos o para su aplicación en la industria alimentaria en la elaboración de suplementos.

En el ámbito personal, la ejecución de este proyecto ha sido muy importante puesto que me ha servido para aprender y conocer el modo de trabajar a la hora de analizar polifenoles en las plantas. He conocido la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas, y he podido comprobar que se trata de una herramienta muy poderosa a la hora de realizar este tipo de investigaciones puesto que nos muestra muy eficazmente todos los compuestos presentes en la planta.

Otra cosa importante que he aprendido ha sido a utilizar el programa informático con el que se ha llevado a cabo el tratamiento de resultados, que es el *Bruker Daltonic Data Analysis*. Este programa era desconocido para mí y este trabajo me ha servido para saber utilizarlo y tener conocimiento de un programa más para futuras investigaciones.

## 7.- BIBLIOGRAFÍA

Alcántara, J. P.C. (2015). *Optimización de un método para la determinación de una mezcla de compuestos orgánicos en suplementos alimenticios mediante HPLC*. Trabajo fin de grado. Universidad de Jaén.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. P.C. (1995). *Use of free radical method to evaluate antioxidant activity*. Lebensm. Wiss. Technol, 22, 25-30.

Cuyckens, F. and Claeys, M. P.C. (2004). *Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids*. J. Mass Spectrom. 39, 1-15.

De Rijke, E., Out, P., Niessen, W.M.A., Ariese, F., Gooijer, C. and Brinkman, U.A.Th. P.C. (2006). *Analytical separation and detection methods for flavonoids*. J. Chromatogr. A, 1112, 31-63.

Fang, Z., Zhang, M. and Wang, L. P.C. (2007). *HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in bayberries (Myrica rubra Sieb. et Zucc.)*. Food Chemi., 100, 845-852.

Fremont, L. P.C. (2000). *Biological Effects of Resveratrol*. Life Sci., 66, 663-673.

- García, E., Fernández, I. and Fuentes, A.P.C. (2015). *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu*. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. Universitat Politècnica de Valencia.
- Gilbert, B. P.C. (2010). *Nuevas metodologías analíticas basadas en espectrometrías de masas para el análisis multi-residuo de plaguicidas y otros contaminantes en vegetales con alto contenido graso y en productos alimenticios de origen vegetal*. Tesis doctoral. Universidad de Jaén.
- Grimalt, S. P.C. (2009). *Nuevas aportaciones de LC-MS con analizadores de triple cuadrupolo y tiempo de vuelo en el análisis de residuos de plaguicidas y metabolitos en alimentos de origen vegetal*. Tesis doctoral. Universitat Jaume I de Castellón.
- Gui-Feng, W., Li-Ping, S., Yu-Dan, R., Qun-Fang, L., Hou-Fu, L., Ru-Jun, Z., Zhuang, L., Feng-Hua, Z., Pei-Lan, H., Wei, T., Pei-Zhen, T., Chuan, L., Wei-Min, Z., Jian-Ping, Z. (2009). *Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid in vivo and in vitro*. Antiviral Res., 83, 186-190.
- Hiroe, K., Masashi, H., Kanae, H., Kayo, A., Hisaji, T. (2002). *Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Related Compounds*. J. Agric. Food Chem., 50, 2161-2168.
- Hoffmann, E. and Stroobant, V. P.C. (2002). *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. Editorial: Wiley. Lugar de publicación: Estados Unidos.
- Isaza, J.H. P.C. (2007). *Taninos o polifenoles vegetales*. Scientia et Technica, 33, 13-16.
- Justo, C. and Venereo, R. P.C. (2002). *Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes*. Rev. Cubana Med. Milit., 31, 126-133.
- Llorent-Martínez, E.J., Gouveia, S. and Castilho, P.C. (2015a). *Analysis of phenolic compounds in leaves from endemic trees from Madeira Island. A contribution to the chemotaxonomy of Laurisilvaforest*. Ind Crops Prod., 64, 135-151.

- Llorent-Martínez, E.J., Ortega-Barrales, P., Zengin, G., Uysal, S., Ceylan, R., Guler, G.O., Mocan, A. and Aktumsek, A. P.C. (2016). *Lathyrus aureus and Lathyrus pratensis: characterization of phytochemical profiles by liquid chromatography-mass spectrometry, and evaluation of their enzyme inhibitory and antioxidant activities*. RSC Adv. 6, 88996-89006.
- Llorent-Martínez, E.J., Spínola, V., Gouveia, S. and Castilho, P.C. (2015b). *HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> characterization of phenolic compounds, terpenoid saponins and other minor compounds in Bituminaria bituminosa*. Ind Crops Prod., 69, 80-90.
- López-Miranda, V., Soto-Montenegro, M.L., Vera, G., Herradón, E., Desco, M. and Abalo, R. P.C. (2012). *Resveratrol: un polifenol neuroprotector de la dieta mediterránea*. Rev. Neurología, 54, 349-356.
- Mämmelä, P., Savolainen, H., Lindroos, L., Kangas, J. and Vartiainen, T. P.C. (2000). *Analysis of oak tannins by liquid chromatography electrospray ionisation mass spectrometry*. J. Chromatogr. A, 891, 75-83.
- Martínez-Flores, S., González-Gallego, J., Culebras, J.M. and Tuñón, M.<sup>a</sup>J. P.C. (2002). *Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes*. Nut. Hosp., 6, 271-278.
- Mena, P., Calani, L., Dall'Asta, C., Galaverna, G., García-Viguera, C., Bruni, R., Crozier, A. and Del Rio, D. P.C. (2012). *Rapid and Comprehensive Evaluation of (Poly) phenolic Compounds in Pomegranate (Punic granatum L.) Juice by UHPLC-MS<sup>n</sup>*. Molecules, 17, 14821-14840.
- Morand, C., Crespy, V., Manach, C., Besson, C., Demigné, C., Rémésy, C. (1998). *Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties*. Am. J. Physiol., 275, R212-R219.
- Natividade, J.V. P.C. (1937). *Recherches cytologiques sur quelques espèces et hybrides du genre Quercus*. Bol. Soc. Brot. ser., 2, 21-85.
- Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T. (1992). *Pharmacologically active tannins isolated from medicinal plants*. Basic Life Sci., 59, 539-569.

- Pareja, S.E., Carrascal, M. and Díaz, F. P.C. (2010). *Evaluación de la capacidad antioxidante de extractos etanólicos totales de frutos y semillas de 36 plantas de la región caribe colombiana*. Artículo de revisión. Universidad de Cartagena, Colombia.
- Quiñones, M., Miguel, M. and Aleixandre, A. P.C. (2012). *Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular*. Nut. Hosp., 27, 76-89.
- Re, R., Pellegrini, Ni., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. P.C. (1999). *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. Free Radic. Biol. Med., 26, 1231–1237.
- Rege, S.D., Geetha, T., Griffin, G.D., Broderick, T.L. and Babu, J.R. P.C. (2014). *Neuroprotective effects of resveratrol in Alzheimer disease pathology*. Front. Aging Neurosci., 6, 1-8.
- Rockenbach, I.I., Jungfer, E., Ritter, C., Santiago-Schübel, B., Thiele, B., Fett, R. and Galensa, R. P.C. (2012). *Characterization of flavan-3-ols in seeds of grape pomace by CE, HPLC-DAD-MSn and LC-ESI-FTICR-MS*. Food Res. Int. 48, 848–855.
- Rubinson, K.A. and Rubison, J.F. P.C. (2000). *Analisis instrumental*. Editorial: Pearson Education. Lugar de publicación: Estados Unidos.
- Spínola, V., Llorent-Martínez, E.J., Gouveia, S. and Castilho, P.C. (2014). *Myrica faya: A New Source of Antioxidant Phytochemicals*. J. Agric. Food Chem. 62, 9722–9735.
- Spínola, V., Llorent-Martínez, E.J., Gouveia-Figueira, S. and Castilho, P.C. (2016). *Ulex europaeus: from noxious weed to source of valuable isoflavones and flavanones*. Ind Crops Prod., 90, 9-27.
- Stalikas, C.D. P.C. (2007). *Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids*. J. Sep. Sci. 30, 3268-3295.
- Stobiecki, M. P.C. (2000). *Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides*. Phytochemistry, 54, 237-256.

Tovar, J. P.C. (2013). *Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecorregión cafetera*. Trabajo fin de grado. Universidad Tecnológica de Pereira.

Ye, J., Su, J., Chen, K., Liu, H., Yang, X., He, Y. and Zhang, W. P.C. (2014). *Comparative investigation of chemical constituents of flower bud, stem and leaf of Lonicera japonica Thunb. by HPLC-DAD-ESI-MS/MS<sup>n</sup> and GC-MS*. J. Anal. Chem., 69, 777-784.