



UNIVERSIDAD DE JAÉN
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

GRADO EN QUÍMICA
Trabajo Fin de Grado

Extracción de flavonoides de arándano rojo



Sandra Puentenueva Murillo
Jaén, Septiembre de 2014



UNIVERSIDAD DE JAÉN
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

GRADO EN QUÍMICA
Trabajo Fin de Grado

Extracción de flavonoides de arándano rojo

Sandra Puente Nueva Murillo
Jaén, Septiembre de 2014

ÍNDICE	Página
1. ABSTRACT Y RESUMEN.....	2
2. INTRODUCCIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	3
3. OBJETIVOS.....	5
4. ANTECEDENTES.....	6
4.1 Composición química de <i>Vaccinium macrocarpon</i> Ait.....	6
4.1.1 Flavonoides identificados en <i>Vaccinium macrocarpon</i>	7
4.1.2 Datos de UV y MS de los compuestos identificados en <i>Vaccinium macrocarpon</i> Ait.	12
4.2 Actividad biológica de <i>Vaccinium macrocarpon</i> Ait.....	13
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
5.1 Obtención de extractos.....	15
5.2 Análisis de los extractos mediante HPLC-DAD.....	21
5.3 Fraccionamiento y purificación de los compuestos 1 y 6.....	21
5.4 Elucidación estructural de los compuestos aislados 1 y 6.....	22
5.5 Estudio de los extractos de arándano rojo mediante HPLC-MS.....	24
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	29
6.1 Técnicas generales e instrumentación.....	29
6.1.1 Técnicas cromatográficas (CCF, CC, y HPLC).....	29
6.1.2 Extracción en fase sólida (SPE).....	30
6.1.3 Espectroscopía de resonancia magnética y nuclear (RMN).....	30
6.1.4 Técnica combinada (HPLC-MS).....	31
6.2 Estudio de la composición química de extractos de arándano rojo	
6.2.1 Procesado del fruto.....	31
6.2.2 Obtención de extractos.....	31
6.2.3 Análisis de los extractos mediante HPLC-DAD.....	35
6.2.4 Fraccionamiento de los extractos ES-5-AcOEt y ES-6-AcOEt.....	36
6.2.5 Fraccionamiento y caracterización estructural de los compuestos aislados.....	37
6.2.6 Estudio de los extractos de arándano rojo mediante HPLC-MS....	40
7. CONCLUSIONES.....	42
8. BIBLIOGRAFÍA.....	43
9. ANEXOS.....	46

1. ABSTRACT Y RESUMEN

The search of optimized extraction methods from plant foods which allow the isolation of phenolic compounds, such as flavonoids, is an activity of considerable scientific and business interest. In the present work, the chemical composition of hydroalcoholic and ethyl acetate extracts from dry cranberries (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) has been studied. The HPLC-DAD profiles of several ethyl acetate extracts have been analyzed and the differences observed have been established. One ethyl acetate extract has been chromatographed to obtain two main pure compounds which have been identified as 1-O- β -D-glucopyranosyl benzoate and quercetin 3-O-glucoside, respectively. The hyphenated technique HPLC-MS applied to the study of two fractions from an ethyl acetate extract and an aqueous extract has allowed the tentative identification of other thirteen components: three hydroxycinnamic acids, nine flavonoids and one A-type procyanidin.

La búsqueda de métodos optimizados para la extracción de alimentos de origen vegetal que permitan obtener compuestos fenólicos, tales como flavonoides, es una actividad de considerable interés científico y comercial. En el presente trabajo, se ha estudiado la composición química de extractos hidroalcohólicos y de acetato de etilo de arándano rojo desecado (*Vaccinium macrocarpon* Ait.). El proceso de extracción se ha ensayado bajo diferentes condiciones y los extractos obtenidos se han analizado mediante HPLC-DAD. De uno de los extractos de acetato de etilo se han conseguido aislar cromatográficamente los dos componentes mayoritarios, los cuales han sido identificados como benzoato de 1-O- β -D-glucopiranosilo y quercetina 3-O-glucósido, respectivamente. Así mismo, el estudio de dos fracciones de un extracto de acetato de etilo y de un extracto acuoso mediante la técnica combinada HPLC-MS ha permitido identificar tentativamente trece componentes más: tres ácidos hidroxicinámicos, nueve flavonoides y una procianidina tipo A.

2. INTRODUCCIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO

El arándano rojo de América del Norte, arándano americano o *cranberry* (*Vaccinium macrocarpon* Ait.), es un arbusto autóctono de América del Norte. Hoy en día, esta especie se cultiva fundamentalmente en cuatro zonas de Estados Unidos (Massachusetts, Nueva Jersey, Wisconsin y Oregón), pero es en la primera donde se obtiene la cosecha mayoritaria (65% de la producción total, aproximadamente) [Fernández, 2008].

Es un arbusto con ramas finas de máximo 20 cm de altura, generalmente entre 4 y 15 cm, que se extiende sobre el suelo hasta 1 m de diámetro. Las hojas son

verdes en verano y de color bronce en invierno, elípticas, miden 1 a 2 cm de largo. Las flores tienen forma de campana, con pétalos de 5 a 10 mm de largo, rosados, curvados hacia atrás y con las anteras y el estigma sobresalientes, divididas en cuatro lóbulos estrechos sostenidos por los pecíolos delgados. Se cuelgan de las axilas de las hojas por separado o en grupos de dos a diez (figura 1). Los frutos son bayas esféricas de 9 a 14 mm de diámetro, de color rojo oscuro y sabor fuerte y picante [Aiton, 2009] que maduran justo antes del invierno, siendo una de las pocas bayas disponibles durante esta estación [Fernández, 2008].

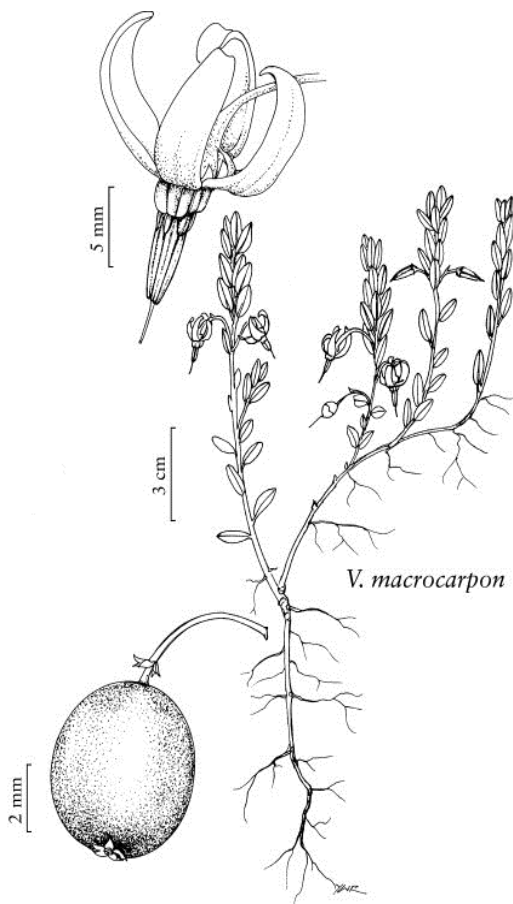


Figura 1. *Vaccinium macrocarpon* Ait.
[Aiton, 2009].

El género *Vaccinium* pertenece a la familia de las *Ericaceae*, entre otras especies de *Vaccinium* se encuentran [Cunningham et al., 2005]:

- Arándano azul (*V. corymbosum* L.; *blueberry*).

- Arándano azul silvestre (*V. angustifolium* Ait.; *wild blueberry*).
- Arándano europeo (*V. oxycoccus* L.; European cranberry, *small cranberry*).
- Mirtillo o arándano (*V. myrtillus* L.; *bilberry*, *whortleberry*).
- Arándano rojo (*V. vitis-idaea* L.; *ligonberry*).

La industria del arándano americano representa un mercado mundial de 2.000 millones de dólares (estimación del 2001), cuyos productos incluyen el fruto fresco, zumos, compotas, fruto desecado, fruto congelado, concentrados de zumo y el zumo desecado por atomización [Cunningham *et al.*, 2005]. Además, se comercializa como nutracéutico (arándano rojo pulverizado en cápsulas o sobres) o alimento funcional [Fernández, 2008; Jiménez, 2013].

En cuanto a las actividades biológicas atribuibles al arándano rojo y sus derivados, numerosos estudios han demostrado, desde hace más de 50 años, que el arándano rojo cuenta con diversos efectos beneficiosos para la salud, entre las que se pueden citar el poder antioxidante, la actividad anticancerígena [Neto, 2007], la protectora del sistema cardiovascular [Cote *et al.*, 2010], frente a enfermedades periodontales [Feghali *et al.*, 2012] y la más importante descrita en numerosas referencias hasta la actualidad, con excelentes resultados clínicos obtenidos, la antiinfecciosa urinaria [Liu *et al.*, 2008; Jass *et al.*, 2009]. Se conocen hasta 120 componentes con más de 700 actividades biológicas en distintas especies del género *Vaccinium*¹ aunque sólo unas pocas de estas referencias son específicas de *Vaccinium macrocarpon* Ait. Los efectos beneficiosos para la salud mencionados anteriormente están directamente relacionados con los constituyentes de tipo flavonoide, debido a su gran actividad biológica observada en numerosos ensayos. Los flavonoides son el grupo de compuestos polifenólicos más común en la dieta de los seres humanos y se encuentran normalmente en las plantas [Biswas *et al.*, 2013]. Las exclusivas propiedades antibacterianas del arándano americano implican que este debe poseer una composición polifenólica muy diferente a otros tipos de frutas [Chen *et al.*, 2001]. La falta de comercialización de determinados flavonoides identificados previamente en arándano americano dificulta su

¹Base de datos NAPRALERT. Program of Collaborative Research in the Pharmaceutical Sciences. Chicago, College of Pharmacy, University of Illinois. Bases de datos fitoquímicas y etnobotánicas del doctor Duke. Disponibles en www.ars-grin.gov/duke.

identificación y cuantificación, así como el estudio de variabilidad en la composición, debida ésta al origen de la muestra o a su procesado. Además, desde el punto de vista biológico, se necesita disponer de los componentes puros para poder estudiar su actividad así como la forma en que estos compuestos se absorben y metabolizan, para determinar de este modo los mecanismos implicados, lo que permitirá una mejor supervisión del seguimiento de los estudios clínicos [Fernández, 2008]. Es por ello que la hipótesis de trabajo planteada en este TFG sea la mejora de los métodos de extracción y fraccionamiento de las complejas mezclas que son los extractos de arándano rojo, hasta conseguir aislar y caracterizar componentes potencialmente activos. En la presente memoria, después de esta breve introducción al tema de estudio y de exponer la hipótesis de trabajo, se recogen los objetivos a conseguir en el apartado siguiente. A continuación, en el apartado de “Antecedentes”, se presenta un resumen de la bibliografía existente sobre arándano rojo y especialmente se presta especial atención en las actividades biológicas descritas y en la composición química identificada. Posteriormente en el apartado “Resultados y discusión” se comentan los resultados a los que se ha llegado a través de la experimentación realizada y recogida en el apartado “Material y métodos”. Finalmente, en el apartado “Conclusiones” se sintetizan los resultados obtenidos y por último, en los apartados “Bibliografía” y “Anexos” se relacionan los artículos y trabajos científicos consultados así como los espectros generados durante la realización de este TFG.

3. OBJETIVOS

Los objetivos concretos que se pretenden conseguir con el presente Trabajo Fin de Grado son los siguientes:

1. Obtener extractos de polaridad media-alta de arándano rojo desecado.
2. Establecer un método de fraccionamiento adecuado para aislar flavonoides de los extractos de arándano rojo desecado.
3. Elucidar la estructura de los compuestos presentes en los extractos.

Además, para el correcto estudio de la composición química de un extracto natural es necesario plantearse otros objetivos más generales como son los que se citan a continuación:

4. Realizar una buena revisión bibliográfica sobre compuestos ya identificados en la misma fuente natural.
5. Conocer el manejo de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC).
6. Conocer el manejo del software específico para el procesado de espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectros de masas (MS).

4. ANTECEDENTES

En el presente Trabajo Fin de Grado (TFG) se va a prestar especial atención a la información bibliográfica existente sobre este fruto en cuanto a la composición química de tipo fenólico, principalmente de estructura flavonoide (apartado 4.1) y las actividades biológicas asociadas a dichos compuestos (apartado 4.2).

4. 1 Composición química de *Vaccinium macrocarpon* Ait.

El arándano americano está compuesto principalmente por fibra, siendo más de la tercera parte insoluble. Contiene baja cantidad de grasas, proteínas y azúcares. Los datos se recogen a continuación (tabla 1).

Tabla 1. Composición de *Vaccinium macrocarpon* Ait. [White *et al.*, 2010].

Componente	Composición (g/100g)
Proteínas	2,2
Grasa	12
Cenizas	1,5
Fibra soluble	65,5
Fibra insoluble	5,7
Otros carbohidratos	8,4
Humedad	4,5

Los ácidos fenólicos contribuyen al sabor característico de las bayas. La presencia de ácidos hidroxibenzoicos es menos frecuente que la de ácidos

hidroxicinámicos, siendo los derivados de estos últimos el grupo más ampliamente distribuido de compuestos fenólicos [Cote *et al.*; 2010]. Información sobre los más representativos, así como las cantidades presentes, se recogen en la tabla 2.

Tabla 2. Composición en ácidos orgánicos en *Vaccinium macrocarpon* [Obón *et al.*, 2011; Díaz-García, 2013].

ÁCIDOS FENÓLICOS

Compuesto	Composición (mg/100g)
Vitaminas	
Ácido ascórbico	21,913
Ácidos hidroxibenzoicos	
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	4,814
Ácido vanílico	33,176
Ácido sirínigico	0,363
Ácido elágico	*
Ácido gálico	*
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	4,814
Ácidos hidroxicinámicos	
Ácido cinámico	0,489
Ácido cafeoil 4-glucósido	2,151
Ácido <i>p</i> -coumárico 4-glucósido	79,305
Ácido cafeico	6,086
Ácido clorogénico	0,489
Ácido ferúlico	10,718
Ácido ferúlico 4-glucósido	3,318

* Se ha identificado pero no se dispone de datos cuantitativos [Díaz-García, 2013].

4.1.1 Flavonoides identificados en *Vaccinium macrocarpon*.

Los flavonoides son los compuestos sobre los que tratará este trabajo, por ello es conveniente describirlos con más detalle. Se trata de pigmentos universales en los vegetales, casi siempre hidrosolubles y responsables de la coloración de las flores, frutos y a veces de las hojas. En algunos casos la zona de absorción de la molécula se sitúa en el ultravioleta próximo, siendo la “coloración”

percibida únicamente por los insectos. Todos los flavonoides (más de 4000) poseen un origen biosintético común y por este motivo, un mismo elemento estructural básico, a saber un encadenamiento 2-fenilcromano.

Se pueden reagrupar en diferentes clases (figura 2) según el grado de oxidación del núcleo piránico central, que puede estar abierto y vuelto a ciclar en una estructura furánica [Bruneton, 2001].

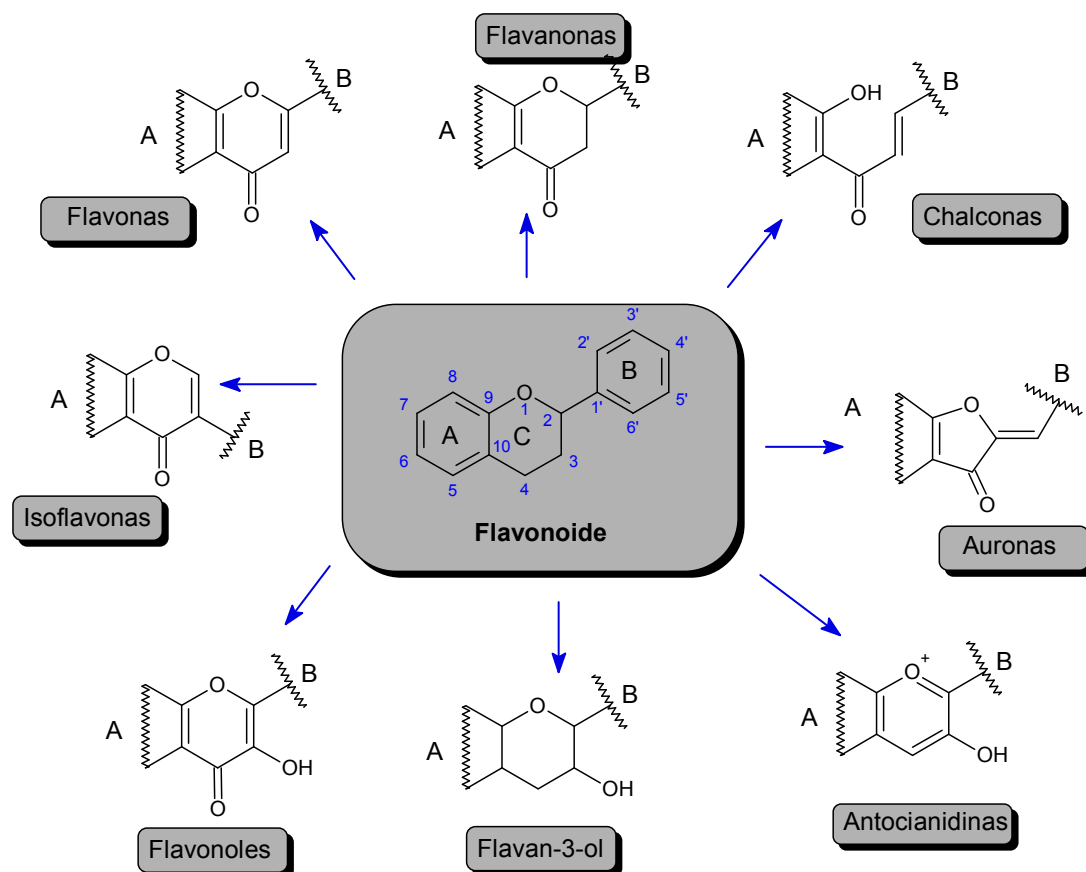


Figura 2. Clasificación de flavonoides.

Uno de los tipos de flavonoides característicos del arándano americano son las antocianinas. Se trata de pigmentos rosas, azules, rojos o morados que se encuentran presentes principalmente en los tejidos epidérmicos de frutas y verduras. Pueden estar presentes en diferentes formas en base al pH, el cual, de hecho, determina si estas son coloreadas o incoloras. El contenido en antocianinas tiende a incrementarse al mismo tiempo que la fruta madura, en respuesta a factores climatológicos como luz y temperatura [Cote *et al.*; 2010].

Suelen encontrarse glicosiladas con varios azúcares que incrementan su estabilidad. La forma aglicón de las antocianinas conocida como antocianidinas, es muy inestable [White *et al.*, 2010]. Existen principalmente 6 tipos de antocianidinas pero sólo dos de ellas se encuentran de forma mayoritaria en el arándano americano, la cianidina y la peonidina. La mayor parte son galactósidos y arabinósidos de cianidina y peonidina [Neto, 2007]. A continuación se muestra la estructura (figura 3) y las cantidades presentes (tabla 3) de cada una de ellas, en el arándano americano.

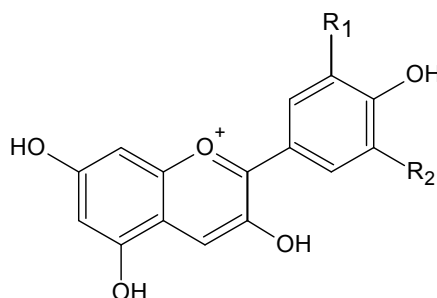


Figura 3. Estructura de las antocianidinas.

Tabla 3. Contenido en antocianidinas en *Vaccinium macrocarpon* Ait. [Bhagwat *et al.*; 2014].

Antocianidina	R ₁	R ₂	Concentración (mg/100g)
Cianidina	H	OH	46,43
Delfinidina	OH	OH	7,67
Peonidina	H	OMe	49,16
Pelargonidina	H	H	0,32
Malvidina	OMe	OMe	0,44

Los flavonoles son otro tipo de flavonoide constituyente del arándano americano. Se caracterizan por tener un grupo hidroxilo en la posición 3, un grupo carbonilo en la posición 4 y un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C (figura 4). Quercetina y mircetina son los dos tipos de flavonoides comúnmente encontrados en *cranberry*. Al igual que las antocianinas, los flavonoles están normalmente glicosilados. También pueden estar acilados con ácidos fenólicos. Los flavonoles son típicamente incoloros, a diferencia de las antocianinas, pero absorben fuertemente la luz en la región del UV y aparecen

de color amarillo a elevadas concentraciones [White *et al.*, 2010]. En la siguiente tabla se recogen las cantidades presentes de este tipo de compuestos en el arándano americano (tabla 4).

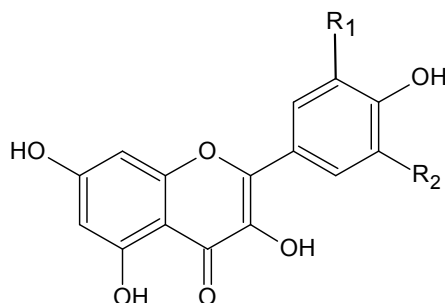


Figura 4. Estructura de los flavonoles.

Tabla 4. Contenido en flavonoles en *Vaccinium macrocarpon* Ait. [Bhagwat *et al.*; 2014].

Flavonol	R ₁	R ₂	Concentración (mg/ 100g)
Quercetina	OH	H	2,20
Kaempferol	H	H	0,01
Mircetina	OH	OH	0,23

El último tipo de flavonoide mayoritario presente en el arándano americano son los flavan-3-ol. Comparten la misma estructura molecular flavonoide con los flavonoles, pero como se muestra en la figura 5, estos pierden el grupo carbonilo del carbono 4. En contraste con otros flavonoides, aparecen en la naturaleza como aglicones de catequina y epicatequina, lo suficientemente solubles para mantenerse sin glicosilación [Cote *et al.*; 2010]. En la tabla se recoge la concentración de estos compuestos en una muestra de arándano americano (tabla 5).

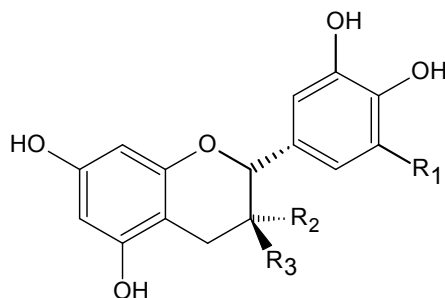


Figura 5. Estructura de los flavan-3-ol.

Tabla 5. Contenido en flavan-3-ol en *Vaccinium macrocarpon* Ait. [Bhagwat *et al.*; 2014].

Flavan-3-ol	R ₁	R ₂	R ₃	Concentración (mg/100g)
(+)-Catequina	H	H	OH	0,39
(-)-Epicatequina	H	OH	H	4,37
(-)-Epigallocatequina	OH	OH	H	0,74
(-)-Epigallocatequina 3-galato	OH	Galato	H	0,39

Actualmente, hay un creciente interés los compuestos de proantocianidinas oligoméricas (PACs). Al ser capaces de reducir las reacciones radicalarias en el organismo, las PACs a veces son referidas como “hormona de la juventud” [Sprygin *et al.*, 2004]. Estos compuestos son oligómeros normalmente formados por 2-50 subunidades. Las subunidades (catequina, epicatequina, epigallocatequina) se encuentran comúnmente unidas vía enlace simple entre C4 y C8 o entre C4 y C6 (ambos tipo-B). Los oligómeros tipo B han sido encontrados en alimentos como frutas y chocolate. Los oligómeros tipo A son

menos comunes y poseen al menos un enlace intermolecular entre O7 y C2, además del enlace carbono-carbono (figura 6). Este número de enlaces se incrementa al aumentar el grado de polimerización [Feghali *et al.*, 2012]. Las cantidades de flavan-3-ol de tipo monómero son pequeñas en comparación con las encontradas en forma de oligómero. Las proantocianidinas diméricas tipo A son las más abundantes, seguidas de las triméricas tipo A, tetraméricas tipo A y otros polímeros de mayor peso molecular (tabla 6).

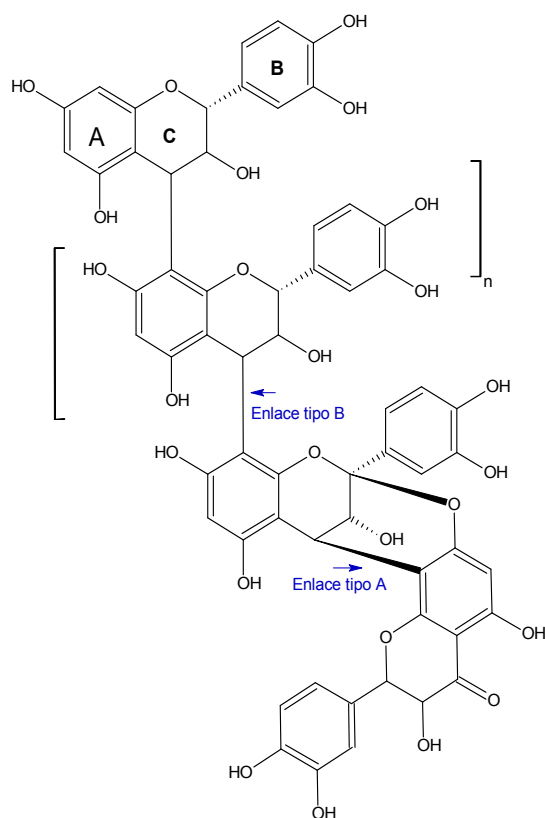
**Figura 6.** Enlaces tipo A y tipo B en proantocianidinas.

Tabla 6. Contenido en procianidinas en *Vaccinium macrocarpon* Ait. [White et al., 2010].

Procianidina	Concentración (mg/100g)
Dímero tipo A	82,6
Dímero tipo B	4,4
Trímero tipo A	30,8
Trímero tipo B	1,5
Tetrámero tipo B	22,9
Pentámero tipo A	7,1
Hexámero tipo A	12,1

4.1.2 Datos de UV y MS de los compuestos identificados en *Vaccinium macrocarpon* Ait.

En la tabla 7 se recogen los datos de $\lambda_{\max}$ (nm) de absorción en UV así como el ión quasimolecular $[M-H]^-$ (m/z) característico de los constituyentes del arándano americano.

Tabla 7. Datos de UV y MS de los principales compuestos identificados en *Vaccinium macrocarpon* Ait.

COMPUESTO	$\lambda_{\max}$ (nm)	$[M-H]^-$ (m/z)	Referencias ²
Vitaminas			
Ácido ascórbico	240	-	[1], [7]
Ácidos hidroxibenzoicos			
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	259, 294	152,94	[2], [7]
Ácido vanílico	260, 292	166,90	[2], [7]
Ácido sirínico	274, 238	197,17	[2], [7]
Ácido elágico	253, 366	301,21	[2], [7]
Ácido gálico	271	168,88	[2], [7]
Ácidos hidroxicinámicos			
Ácido cafeoil 4-O-glucósido	259, 294	340,12	[3], [7]
Ácido <i>p</i> -cumárico 4-O-glucósido	310, 241	325,05	[2], [7]
Ácido cafeico	323, 247	178,91	[2], [7]

² [1], [Wittine et al., 2004]; [2], [Obón et al., 2011]; [3], [Regos et al., 2009]; [4], [Jungmin, 2013]; [5], [Kay et al., 2004]; [6], [Escribano-Bailón et al., 2002]; [7], [Díaz-García et al., 2013].

Ácido clorogénico	325,249	353,93	[2], [7]
Ácido ferúlico	323, 247	192,76	[2], [7]
Ácido ferúlico 4-O-glucósido	291,315	354,85	[3], [7]
Ácido cinámico	265	146,86	[3], [7]
Antocianinas			
Cianidina 3-O-glucósido	517	447,23	[4], [5], [7]
Cianidina 3-O-galactósido	518	447,23	[4], [5], [7]
Cianidina 3-O-arabinósido	517	417,25	[4], [5], [7]
Peonidina 3-O-glucósido	518	461,26	[4], [7]
Peonidina 3-O-galactósido	520	461,26	[4], [7]
Peonidina 3-O-arabinósido	518	431,10	[4], [7]
Delfinidina 3-O-glucósido	524	463,26	[2], [6], [7]
Delfinidina 3-O-galactósido	524	463,26	[2], [6], [7]
Flavonoles			
Mircetina 3-O-arabinósido	259, 349	449,01	[3], [7]
Quercetina 3-O-glucósido	256, 353	463,32	[3], [7]
Quercetina 3-O-ramnósido	256, 348	447,43	[3], [7]
Kaempferol 3-O-glucósido	264, 346	447,23	[3], [7]
Monómeros de flavan-3-ol			
Epigallocatequina	269	305,22	[3], [7]
Catequina	280	288,93	[3], [7]
Epicatequina	280	288,89	[3], [7]

4.2 Actividad biológica de *Vaccinium macrocarpon* Ait.

Existen claras evidencias que relacionan una dieta rica en frutas y verduras con beneficios para la salud. Estos beneficios han sido asociados con varios grupos de compuestos como son los flavonoides y ácidos fenólicos. Se va a prestar especial atención en la actividad antioxidante, prevención de enfermedades degenerativas, cardiovasculares y cáncer.

Respecto a los ácidos fenólicos, estos se encuentran muy relacionados con dichos efectos, incluyendo principalmente ácidos hidroxicinámicos y ácidos hidroxibenzoicos [Obón *et al.*, 2011]. A la vista de diversas investigaciones, el consumo de zumos de frutas a largo plazo podría proporcionar protección

contra la enfermedad del Alzheimer. Se piensa que este efecto podría estar potenciado por el consumo de zumos ricos en compuestos fenólicos, como el arándano americano [Mullen *et al.*, 2007]. El arándano americano se encuentra entre las frutas con mayor cantidad de antioxidantes debido a su gran contenido en flavonoides y su abundancia en ácidos fenólicos. Los extractos ricos en estos compuestos han demostrado inhibir diversos procesos oxidativos.

Por otra parte, los flavonoles han demostrado contar con actividad anticancerígena, en concreto la quercetina. Entre todos los flavonoides existentes en la naturaleza, la quercetina es uno de los más ampliamente estudiados debido a ser el flavonol predominante en frutas y verduras. Existen numerosas referencias sobre la habilidad de la quercetina contra la proliferación de las células cancerígenas, siendo clave su papel en la apoptosis en la actividad anticancerígena del arándano americano, propiedad que podría estar ligada al contenido en quercetina del fruto [Neto, 2007]. Las antocianinas también han sido relacionadas con esta propiedad, incluyendo además, otras actividades biológicas como la antioxidante, la anti-inflamatoria y la anti-microbiana [Obón *et al.*, 2011]

Entre las infecciones microbianas vamos a centrarnos las del tracto urinario. Estas son provocadas por bacterias patógenas, principalmente por *Escherichia coli*, ya sea en las vías urinarias altas (riñones o uréteres) o en las vías urinarias bajas (vejiga, uretra y próstata). Las bacterias utilizan estructuras proteicas para adherirse a otras superficies, en concreto, se ha podido concluir que son las proantocianidinas presentes en el zumo de arándano los constituyentes responsables de la actividad antiadherente de *E. Coli* a las células uroepiteliales de la pared del tracto urinario. Al parecer, el enlace interflavano tipo A en las proantocianidinas es necesario para que estas cuenten con actividad antiadherente contra *E. Coli* [Liu *et al.*, 2008; Fernández, 2008].

El tratamiento de la cistitis es muy importante debido a que es una afección muy habitual, sobre todo entre mujeres (hasta un 60% tienen una infección de este tipo en algún momento de su vida, siendo muy frecuente la reinfección), de ahí la importancia de su tratamiento y prevención [Fernández, 2008; Jass *et al.*, 2009].

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Obtención de extractos.

El procedimiento que se sigue para llevar a cabo la extracción de una fuente natural es de marcada importancia en lo que se refiere a rendimiento y composición del extracto obtenido (Moure *et al.*, 2001). De aquí la necesidad de estudiar algunas de las variables que pueden influir en los resultados, tales como tipo de materia prima, polaridad y pH del disolvente extractor, temperatura o la secuencia de extracciones líquido-líquido posteriores a la primera extracción.

Los principales productos de arándano americano que se pueden encontrar con facilidad comercializados son: zumos, compotas, fruto desecado, concentrados de zumo y el zumo desecado, pero no es fácil adquirir fruto fresco o congelado. En el presente TFG se ha seleccionado arándano desecado por ser el producto menos procesado de entre los que pueden conseguirse en cualquier supermercado (1,50 euros/ 250 g). Sin embargo, un trabajo reciente sobre identificación de compuestos fenólicos en arándano procesado establece que el contenido de fenoles en extractos de arándano desecado es el más bajo frente a otros derivados como zumos o salsas [Biswas *et al.*, 2013]. El uso de metanol, etanol o mezclas acuosas de estos alcoholes en diferentes proporciones es un procedimiento muy extendido en la obtención de compuestos fenólicos de diversas fuentes naturales [Sprygin *et al.*, 2004; Sanz *et al.*, 2010; Sánchez-Patán *et al.*, 2012]. Además, el disolvente acetato de etilo presenta una polaridad muy apropiada para la obtención de compuestos de polaridad media-alta y es por ello que también queda recogido en bibliografía su uso para la obtención de extractos de composición fenólica a partir de frutas del género *Rubus* y *Prunus* [Jacobek *et al.*, 2009]. Así, en este TFG se han seleccionado como disolventes para la extracción de arándano desecado la mezcla MeOH/H₂O (1:1 v/v) y acetato de etilo. En concreto, se han ensayado seis métodos de extracción en las que se emplean estos disolventes pero siguiendo procedimientos diferentes, además de otras cuatro réplicas. En

los cuatro primeros métodos (ES-1, ES-2, ES-3 y ES-5) y sus réplicas (ES-4 y ES-6) se comenzó la extracción de la fruta con una mezcla MeOH/H₂O y después de evaporar el metanol se hicieron otras dos extracciones líquido-líquido con dos disolventes de polaridad creciente, éter dietílico y acetato de etilo, sucesivamente (esquema 1). La extracción de la fase acuosa con éter dietílico se llevó a cabo con la finalidad de retirar, previamente a la extracción con acetato de etilo, componentes poco polares, que no son objeto de estudio en este trabajo. También es bien conocida la influencia que ejerce el pH en la estabilidad de los compuestos fenólicos y es por ello que algunos métodos de extracción bibliográficos llevan a cabo el proceso con disolvente que contiene una porción de ácido [Sánchez-Patán, 2012]. Con la finalidad de estudiar el efecto del pH en las extracciones ES, una de ellas, la extracción ES-3 y su réplica ES-4, se llevaron a cabo adicionando al disolvente 3 ml de ácido clorhídrico 2 M. La extracción ES-2 está basada en el procedimiento descrito por Sanz *et al.* para extraer compuestos fenólicos de madera de cerezo [Sanz *et al.*, 2010]. Los procedimientos ES-1 y ES-5 y su réplica ES-6 presentan ligeras modificaciones del método bibliográfico y se comentan al final de este apartado, en la discusión de resultados.

Por otra parte, en las extracciones EJ-1 y EJ-2 y en las réplicas EJ-3 y EJ-4 el proceso de extracción consistió en el tratamiento sucesivo del arándano con los dos disolventes, acetato de etilo y la mezcla MeOH/H₂O, en el mismo orden que el aumento de polaridad de ambos (esquema 2). El procedimiento EJ-2 y sus réplicas (EJ-3 y EJ-4) están basados en el procedimiento descrito por Jacobek *et al.* [Jacobek *et al.*, 2009]. El procedimiento EJ-1 se lleva a cabo con una ligera diferencia al método bibliográfico y se comenta al final de este apartado, en la discusión de resultados.

Las fases acuosas que se obtuvieron en todas las extracciones (ES y EJ) presentaban color rojizo, característico de la presencia de antocianinas. Se tomó una alícuota de cada una de ellas para su análisis mediante extracción en fase sólida (apartado 6.1.2), siguiendo la metodología descrita en bibliografía para el análisis de este tipo de compuestos [Grace *et al.*, 2014]. De este modo se obtuvieron los extractos ES-1-SPE, ES-2-SPE, ES-3-SPE, la réplica de este último (ES-4-SPE), EJ-1-SPE y EJ-2-SPE, (esquemas 1 y 2).

Esquema 1. Método de extracción ES.

Esquema 2. Método de extracción EJ.

Los resultados obtenidos en los seis procedimientos y cuatro réplicas, en cuanto a rendimiento de extracción con acetato de etilo, además de los rendimientos de extracción con MeOH/H₂O (SPE), se exponen a continuación (tabla 8).

Tabla 8. Rendimientos de extracción, media y desviación estándar de las réplicas

Método	Referencia	R (%)	$\bar{X} \pm \sigma$	R (%)	$\bar{X} \pm \sigma$
ES					
AcOEt				SPE	
1	ES-1	0,48	-	0,10	-
2	ES-2	0,75	-	0,06	-
3	ES-3	0,17	0,14 ± 0,04	0,08	0,11 ± 0,04
	ES-4	0,11		0,13	
4	ES-5	0,17	0,17 ± 0,00	-	-
	ES-6	0,17		-	-
EJ					
AcOEt				SPE	
5	EJ-1	3,91	-	0,16	-
6	EJ-2	3,66	3,80 ± 0,95	0,67	-
	EJ-3	2,92		-	-
	EJ-4	4,81		-	-

Los rendimientos obtenidos en los procedimientos EJ son del orden de 25 veces superiores a los obtenidos en los procedimientos ES y no se observa una diferencia importante entre llevar a cabo el proceso calentando a 40 °C (EJ-1) o a temperatura ambiente (EJ-2, EJ-3 y EJ-4). En cuanto a los procedimientos ES, tampoco se observa un mayor rendimiento al efectuar la extracción a 40 °C (ES-1) respecto a temperatura ambiente (ES-2). La presencia de ácido en la primera etapa de la extracción (ES-3 y ES-4) no supuso un aumento en el rendimiento de extracción frente a los extractos realizados a la misma temperatura ambiente pero sin ácido (ES-2, ES-3 y ES-4).

5.2 Análisis de los extractos mediante HPLC-DAD.

El estudio preliminar de los diferentes extractos de acetato de etilo obtenidos a partir de arándano americano desecado se llevó a cabo por comparación cualitativa de los cromatogramas de HPLC obtenidos para cada extracto. A la vista de los perfiles cromatográficos y espectros de UV cabe destacar la similitud observada entre los seis correspondientes a los seis extractos ES. En la figura 7 se reproduce el cromatograma correspondiente a uno de ellos (ES-5-AcOEt). Así mismo, también existe similitud entre los cuatro cromatogramas correspondientes a los extractos EJ y en la figura 8 se puede observar el obtenido a partir de uno de ellos (EJ-4-AcOEt). Sin embargo, como se aprecia en las figuras 7 y 8, sí que se observa diferencia entre ambos tipos cromatogramas (tipo ES y tipo EJ), obtenidos a la misma longitud de onda (280 nm). El cromatograma del extracto ES-5-AcOEt presentaba mayor número de compuestos y se seleccionó este extracto y su réplica ES-6-AcOEt para seguir el estudio de la composición química.

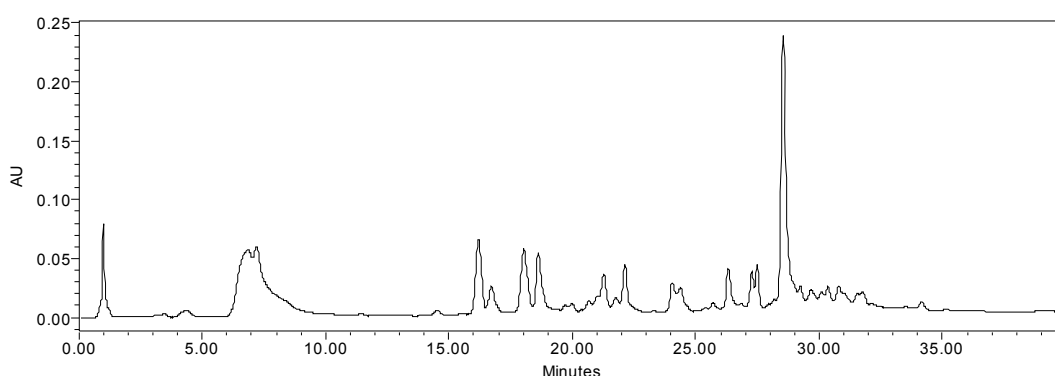


Figura 7. Cromatograma HPLC del extracto ES-5-AcOEt, $\lambda = 280$ nm.

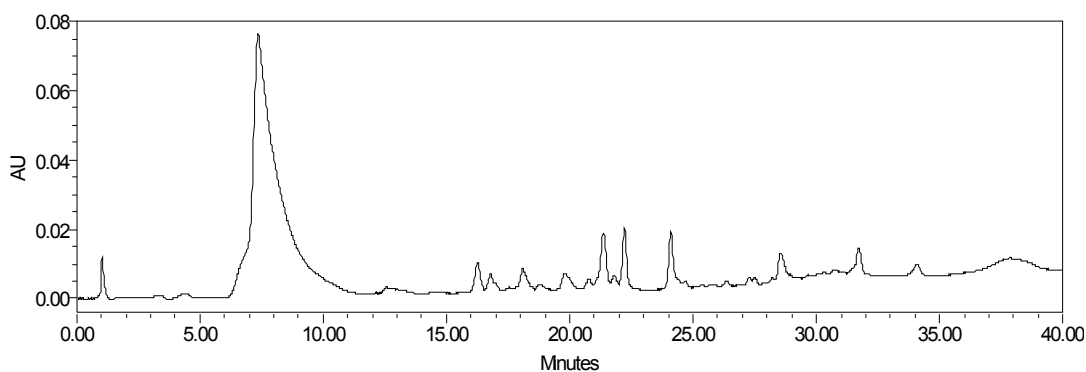


Figura 8. Cromatograma HPLC del extracto EJ-4-AcOEt, $\lambda = 280$ nm.

El cromatograma tridimensional del extracto ES-5-AcOEt, registrado a diferentes longitudes de onda, permitió observar dos señales mayoritarias a tiempos de retención de 15,61 min y 27,55 min. En la figura 9 se recoge el cromatograma HPLC-DAD.

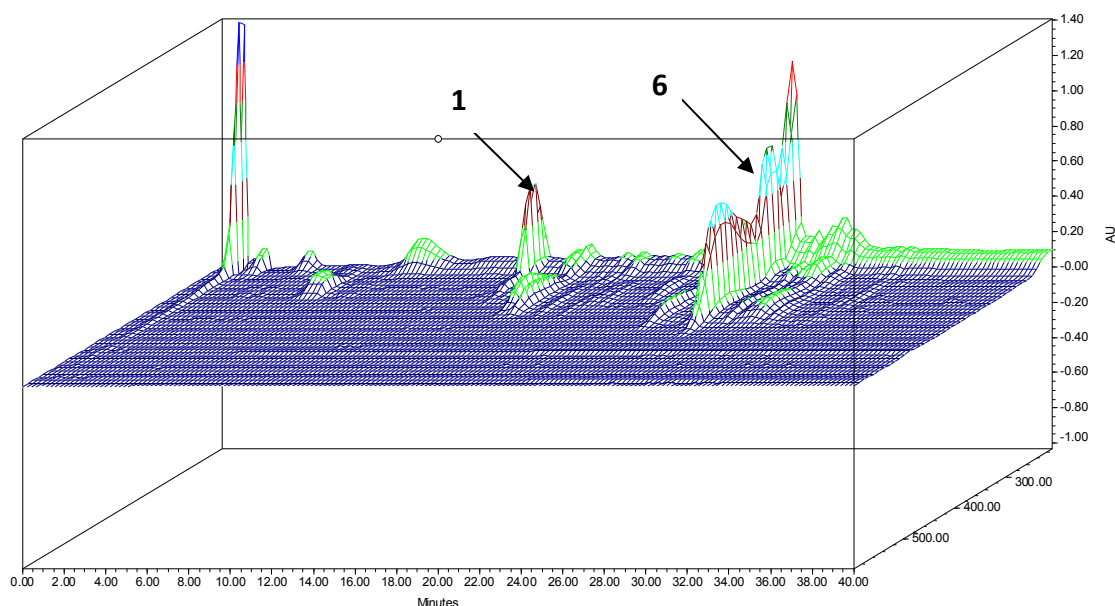
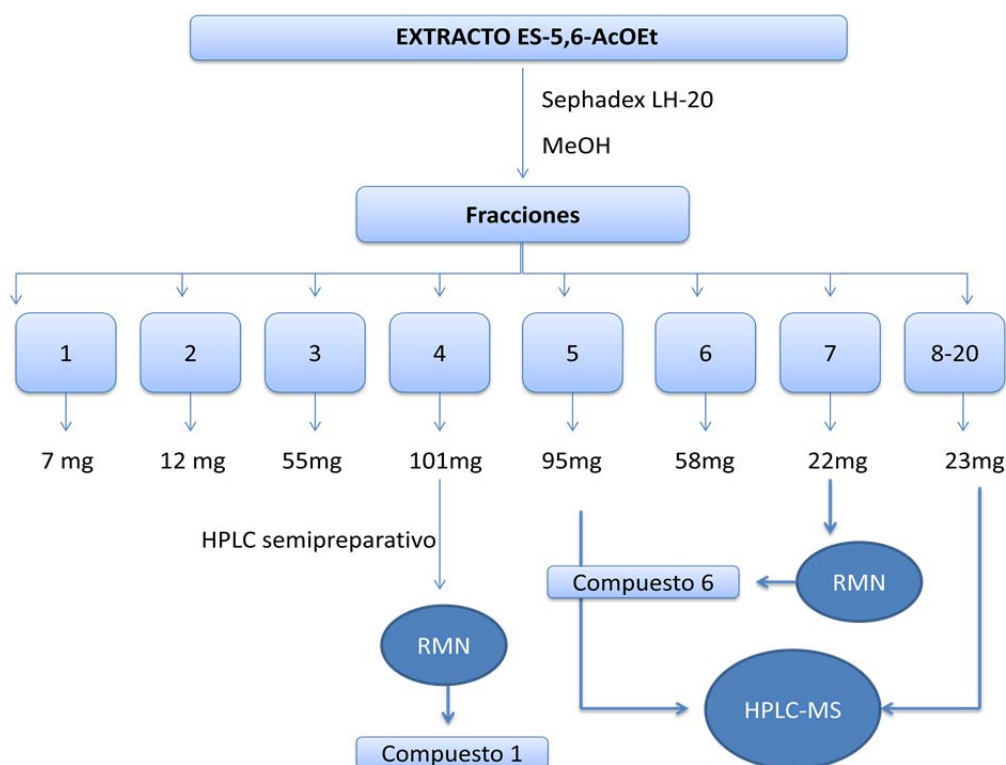


Figura 9. Cromatograma HPLC-DAD del extracto ES-5-AcOEt.

5.3 Fraccionamiento y purificación de los compuestos 1 y 6.

Después del estudio de los diferentes extractos de acetato de etilo mediante HPLC, se agruparon los extractos ES-5-AcOEt y ES-6-AcOEt. Éstos presentaban igual perfil cromatográfico y se habían obtenido en mayor cantidad. Una alícuota de la mezcla de ambos extractos (ES-5,6-AcOEt, 571 mg) se sometió a una cromatografía de exclusión por tamaño con la fase estacionaria Sephadex LH-20 y se obtuvieron 20 fracciones (esquema 3). Todas las fracciones se analizaron mediante CCF (apartado 6.1.1), lo que permitió seleccionar las fracciones 2, 3, 4, 5, 6 y 8 para su análisis mediante HPLC. Teniendo en cuenta el peso de las fracciones y la presencia o no de un compuesto mayoritario en su correspondiente cromatograma, se seleccionó la fracción 4 para otra etapa de purificación mediante HPLC semipreparativo (apartado 6.1.1), la fracción 5 y la agrupación de las fracciones de la 8 a la 20 para un estudio mediante la técnica combinada HPLC-MS (apartado 6.1.4) y la

fracción 7 para una caracterización espectroscópica mediante RMN (apartado 6.1.3). Para mayor claridad se presenta el esquema 3.



Esquema 3. Fraccionamiento del extracto ES-5,6-AcOEt.

5.4 Elucidación estructural de los compuestos aislados 1 y 6.

La elucidación estructural de los compuestos **1** y **6** se desarrolló mediante la técnica de resonancia magnética nuclear (apartado 6.1.3), utilizando tanto espectros monodimensionales (RMN- ^1H , RMN- ^{13}C , Dept-135), como bidimensionales (HMBC).

En el espectro de RMN- ^1H del compuesto **1** aparecen 3 señales que integran por 5 protones aromáticos, con un sistema de constantes de acoplamiento del tipo AA'BB'C. La primera de ellas a 8,09 ppm (doblete, $J = 8,5$ Hz, H-2,6) corresponde a los dos protones en posición *orto* respecto al grupo éster. La señal a 7,49 ppm (tripleto, $J_{3,2} = J_{5,6} = 8,3$ Hz; $J_{3,4} = J_{5,4} = 7,6$ Hz; H-3,5) corresponde con los protones en posición relativa *meta* y por último la señal a 7,63 ppm (tripleto, $J_{4,3} = 7,5$ Hz; $J_{4,5} = 7,5$ Hz; H-4) se asigna al protón en posición relativa *para*. A 5,72 ppm (doblete, $J = 8,1$ Hz; H-1') se encuentra la

señal correspondiente al protón anomérico, el cual podemos determinar que se encuentra en posición β mediante su desplazamiento químico y su constante de acoplamiento característicos [Tedder; Nechvatal; Murray; Carnduff, 1979]. En la zona de 3,52-3,41 ppm se localizan las señales asignables a una unidad de azúcar (multiplete; H-2,3,4,5). En el espectro de RMN- ^{13}C se observa una señal correspondiente al carbono de un grupo éster a 166,79 ppm (C-7) y 4 señales correspondientes a los carbonos de un anillo aromático monosustituido. La primera de ellas a 130,85 ppm (C-1) asignable al carbono cuaternario; las señales correspondientes a los carbonos metínicos se encuentran a 130,93 ppm (C-2,6) para la posición relativa *orto*, 129,63 ppm (C-3,5) para la posición relativa *meta* y por último a 134,74 ppm se encuentra la señal del carbono en posición relativa *para* (C-4). Asimismo, el espectro de RMN- ^{13}C muestra también las señales correspondientes a una unidad de glucosa. La posición de unión de la estructura se intentó determinar mediante el experimento HMBC, pero no se encontró la correlación correspondiente entre el protón anomérico y C-7. Estos datos permitieron identificar el compuesto **1** como **benzoato de 1-O- β -D-glucopiranosilo**, lo que se confirma por comparación directa de sus datos con los descritos en bibliografía [Paudel *et al.*, 2013]. Este compuesto se había identificado previamente en *Black Raspberry* (*Rubus occidentalis*), no así en extractos de *Vaccinium macrocarpon* u otros extractos del género *Vaccinium*.

Por su parte, en el espectro de RMN- ^1H del compuesto **6** aparecen dos señales correspondientes a dos protones aromáticos a 6,20 ppm y 6,39 ppm (doblete, $J = 2,1$ Hz; H-6,8), son señales intercambiables indicativas de dos protones aromáticos en disposición relativa *meta*, con constante de acoplamiento alílica pequeña, asignables a un anillo aromático 1,2,3,5-tetrasustituido (anillo A). Se observan tres señales más de protones aromáticos, a 7,83 ppm (doblete, $J = 2,1$ Hz, H-2'), a 6,86 ppm (doblete, $J = 8,5$ Hz, H-5') y a 7,57 ppm (doble doblete, $J = 8,5$ Hz; 2,1 Hz, H-6'). Este conjunto de señales forman parte de un sistema de espín ABX propio de un anillo aromático 1,3,4-trisustituido (anillo B). A 5,15 ppm (doblete, $J = 7,9$ Hz; H-1'') se encuentra la señal correspondiente al protón anomérico, el cual podemos determinar que se encuentra en posición β mediante su desplazamiento químico y su constante de acoplamiento

característicos [Tedder; Nechvatal; Murray; Carnduff, 1979]. En la zona de 3,52-3,41 ppm se localizan las señales asignables a una unidad de azúcar (multiplete; H-2,3,4,5). En el espectro de RMN- ^{13}C se observa la presencia de una señal a 179,53 ppm correspondiente a un grupo carbonilo (C-4), además de siete señales de carbonos oxigenados cuaternarios a 135,78 ppm (C-3), 145,80 ppm (C-3'), 149,94 ppm (C-4'), 166,04 ppm (C-7), 158,81 ppm (C-2), 162,99 ppm (C-5 ó C-9) y 158,43 ppm (C-9 ó C-5). Las señales correspondientes a los carbonos 5 y 7 son intercambiables ya que no se han encontrado correlaciones en el espectro bidimensional que permitan la asignación de manera inequívoca. También se observa una señal de carbono cuaternario aromático a 122,87 ppm (C-1'), dos señales correspondientes a los carbonos metínicos a 99,88 ppm (C-6 ó C-8) y 94,72 ppm (C-6 ó C-8) asignables al anillo A e intercambiables entre sí y tres señales a 122,92 ppm (C-6'), 117,76 ppm (C-5') y 116,08 ppm (C-2') asignables a los carbonos metínicos del anillo B. Asimismo, el espectro de RMN- ^{13}C muestra también las señales correspondientes a una unidad de glucosa. La posición de unión de la estructura se determinó mediante el experimento HMBC, encontrándose la correlación correspondiente entre el protón anomérico (H-1'') y el carbono 3 del anillo C. Estos datos espectroscópicos permitieron identificar el compuesto **6** como **quercetina 3-O-glucósido**, lo que se confirma por comparación directa de sus datos con los descritos en bibliografía [Paudel *et al.*, 2013]. Este compuesto había sido identificado previamente en extractos de *Vaccinium macrocarpon*, así como en otros extractos del género *Vaccinium* [Neto, 2007]; [Díaz-García *et al.*; 2013].

5.5 Estudio de los extractos de arándano rojo mediante HPLC-MS.

Tal y como se ha comentado en el apartado anterior, la fracción 5 y la agrupación de las fracciones de la 8 a la 20 se han estudiado mediante la técnica combinada HPLC-MS, además también se ha estudiado con esta técnica el extracto rico en antocianinas, ES-1-SPE (apartado 5.1, esquema 1). En las tablas 15, 16 y 17 (apartado 6.2.6) se recogen los iones quasimoleculares $[\text{M}-1]^-$ y $[\text{M}+1]^+$, así como iones correspondientes aductos,

en modo negativo y en modo positivo, y algunos de los fragmentos observados. A continuación se muestran los cromatogramas generados en cada una de las fracciones estudiadas (figuras 10 y 11), así como el *ion extracted chromatogram* (figura 12) correspondiente al extracto ES-1-SPE. La tabla 9 presenta los compuestos identificados, junto con el tiempo de retención (t_R) y el ión quasimolecular $[M-H]^-$.

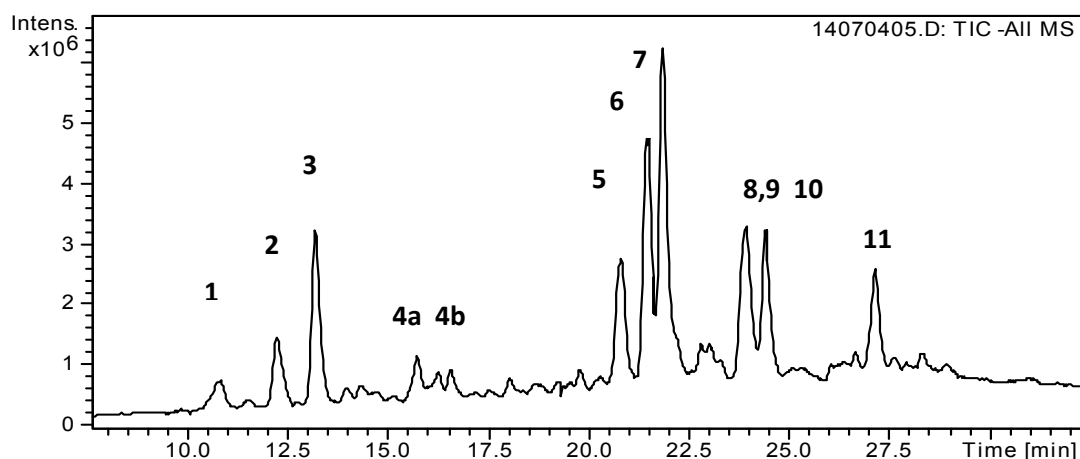


Figura 10. Cromatograma HPLC-MS de la fracción 5, $\lambda=280\text{nm}$.

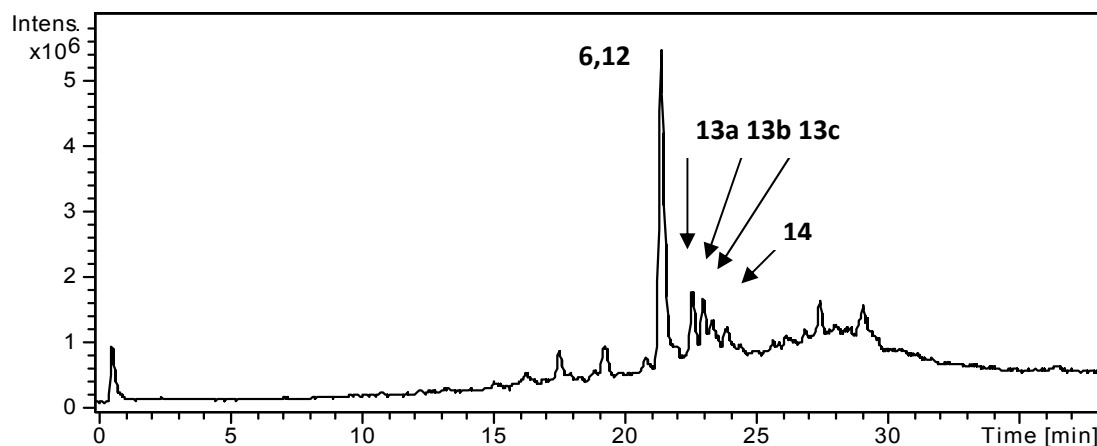


Figura 11. Cromatograma HPLC-MS de la fracción 8, $\lambda=280\text{nm}$.

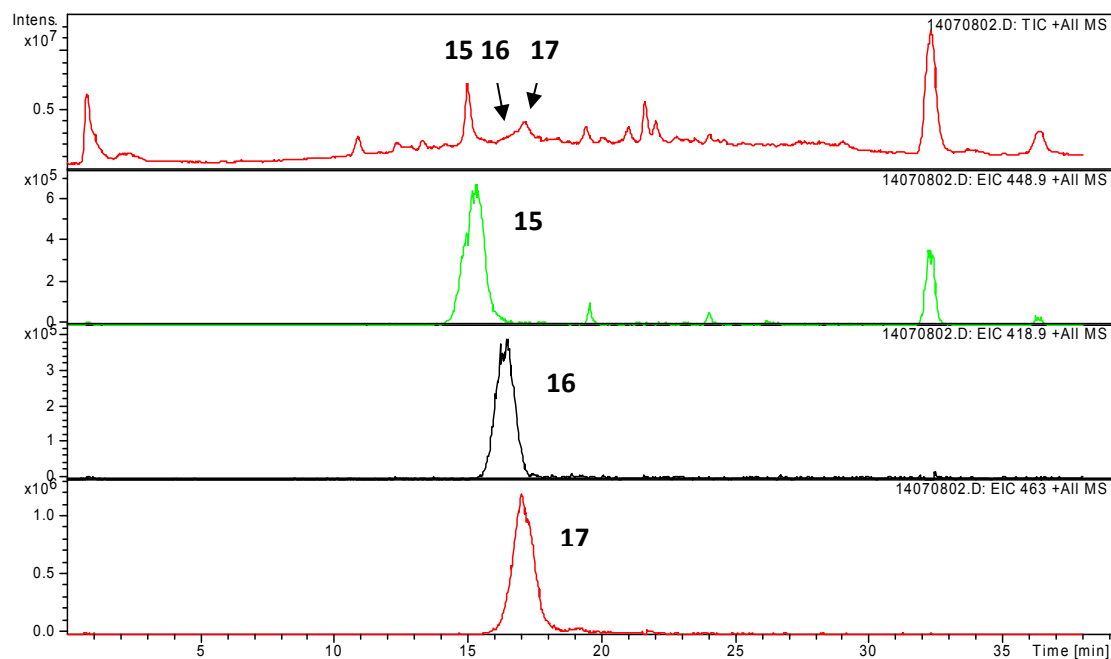


Figura 12. Ion extracted chromatogram del extracto ES-1-SPE.

Tabla 9. Información del espectro de masas e identificación.

Nº	t_R (min)	Compuesto	$[M+H]^+$ (m/z)	Referencias ³
1	10,7	benzoato de 1-O-β-D-glucopiranosilo	282,7	[1]
2	12,2	ácido <i>p</i> -cumárico 4-O-glucósido	324,7	[2], [3]
3	13,1	ácido cafeoilquínico	352,7	[2], [3]
4a	15,7	ácido <i>p</i> -cumaroilquinico (isómero)	336,7	[2], [3]
4b	16,5	ácido <i>p</i> -cumaroilquinico (isómero)	336,8	[2], [3]
5	20,8	Desconocido	534,8	-
6	21,4	quercetina 3-O- glucósido	462,7	[1], [2], [3]
7	21,8	Desconocido	536,8	-
8	23,9	quercetina 3-O-ramnósido	446,7	[2], [3]

³ [1], [Paudel *et al.*, 2013]; [2], [Regos *et al.*, 2009]; [3], [Díaz-García *et al.*, 2013]; [4], [Lin *et al.*, 2007]; [5], [White *et al.*, 2010]; [6], [Grace *et al.*, 2014].

9	23,9	quercetina 3-O-glucurónido	476,7	[2], [3]
10	24,4	siringetina 3-O-glucósido	506,7	[6]
11	27,1	glycitina	444,7	[4]
12	21,3	proantocianidina A2	574,7	[5], [6]
13a	22,5	quercetina 3-O-arabinósido (isómero)	423,7	[2], [3]
13b	22,9	quercetina 3-O-arabinósido (isómero)	423,7	[2], [3]
13c	23,2	quercetina 3-O-arabinósido (isómero)	423,7	[2], [3]
14	23,8	metoxiquercetina 3-O-xilósido	446,7	[5]
15	15,3	cianidina 3-O-arabinósido	448,9	[3]
16	16,4	cianidina 3-O-galactósido	418,9	[3]
17	17,0	peonidina 3-O-galactósido	463,0	[3]

Esta información ha sido suficiente para poder identificar, en primer lugar, tres ácidos hidroxicinámicos: ácido *p*-cumárico 4-O-glucósido (**2**), ácido cafeoilquínico (**3**) y dos isómeros del ácido *p*-cumaroilquinico (**4a** y **4b**). En segundo lugar, nueve flavonoides, entre los cuales se encuentran cinco flavonoles, quercetina 3-O-ramnósido (**8**), quercetina 3-O-glucurónido (**9**), tres isómeros de quercetina 3-O-arabinósido (**13a**, **13b** y **13c**), siringetina 3-O-glucósido (**10**) y metoxiquercetina 3-O-xilósido (**14**), una isoflavona, glycitina (**11**) y tres antocianinas: cianidina 3-O-arabinósido (**15**), cianidina 3-O-galactósido (**16**) y peonidina 3-O-galactósido (**17**). También se identificó una proantocianidina tipo A (**12**).

Todos ellos, a excepción de los compuestos **10** y **11**, habían sido identificados previamente en extractos *Vaccinium macrocarpon* Ait. Tanto el compuesto 10 como el 11 han sido identificados en otros extractos del género *Vaccinium*, en concreto, en *Vaccinium uliginosum* [Wang *et al.*, 2014] y *Vaccinium myrtillus* [Amakura *et al.*, 2011], respectivamente. En la figura 13 se recogen las estructuras de los compuestos identificados tentativamente mediante HPLC-MS.

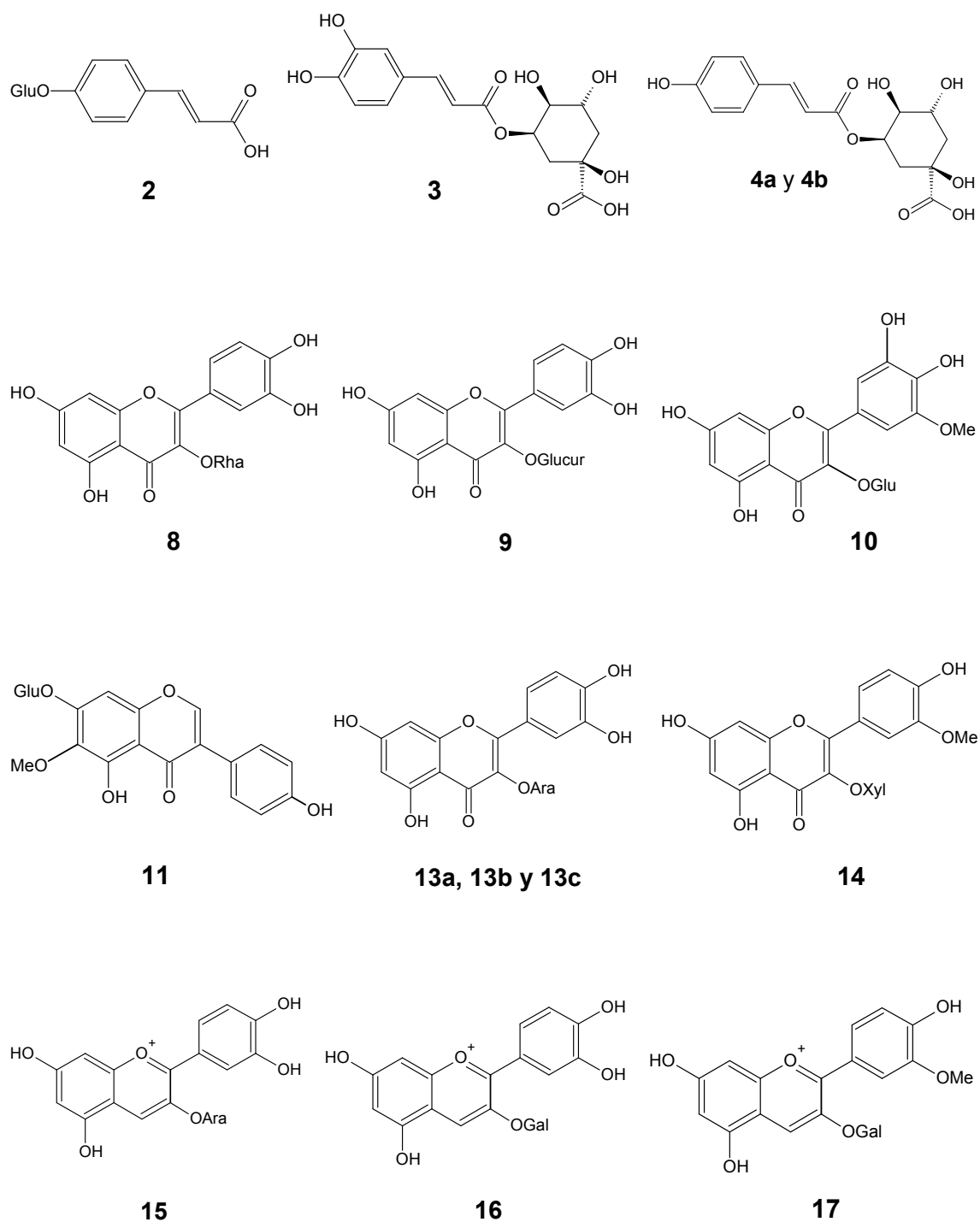
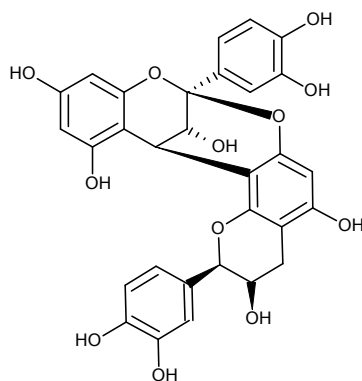


Figura 13. Compuestos identificados tentativamente mediante HPLC-MS en arándano rojo desecado (ES-5,6-AcOEt).



12

Figura 13. (Continuación). Compuestos identificados tentativamente mediante HPLC-MS en arándano rojo desecado (ES-5,6-AcOEt).

6. MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1 Técnicas generales e instrumentación.

6.1.1 Técnicas cromatográficas (CCF, CC Y HPLC)

Cromatografía en capa fina (CCF)

Se utilizan cromatofolios comerciales Merck 60 F₂₅₄ de 0,25 mm de espesor de gel de sílice como fase estacionaria y soporte de aluminio. Como fase móvil se emplea una mezcla de diclorometano/etanol (96%)/ ácido acético en proporción 8:2:0,2 (v/v/v). Las manchas se observan mediante el empleo de una lámpara de luz UV a una longitud de onda de 254 nm.

Cromatografía en columna (CC)

Se utiliza una columna de 4 cm de diámetro rellena hasta 15 cm de altura con la fase estacionaria. Esta se prepara mezclando Sephadex LH-20 con el humectante adecuado, MeOH en nuestro caso. La muestra se introduce, disuelta en la mínima cantidad de MeOH necesaria, por la parte superior de la columna con ayuda de una pipeta. La elución de los componentes se lleva a cabo añadiendo volúmenes sucesivos de MeOH hasta que casi la totalidad de la muestra es recuperada. Se recogieron distintas fracciones de 50 ml de volumen, que se llevaron a sequedad eliminando el disolvente, a presión

reducida y temperatura inferior a 40°C. Cada fracción se analiza mediante CCF y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Equipo 1. Cromatógrafo que cuenta con bomba cuaternaria *Waters 600E*, desgasificador con He, inyector manual *Reodyne 7725*, columna analítica de fase reversa *C 18 Water Spherisorb[®] ODS2* (3 x 125 mm, 5µm), celda de detección de 10 mm de paso óptico, detector de diodos en serie *Waters 2996 Photodiode Array Detector* (DAD), colector de fracciones *Waters Fraction Collector* y controlador *Waters 600 Controller*.

Cromatografía de líquidos de alta resolución semipreparativa (HPLC semipreparativo)

Equipo 1 modificado con una columna semipreparativa de fase reversa *C 18 Water Spherisorb[®] S5 ODS2* (10 x 250 mm, 5µm) y celda de detección de 10 mm de paso óptico.

6.1.2 Extracción en fase sólida (SPE)

Se utilizan cartuchos de extracción en fase sólida *Bond Elut C18* (*Agilent Technologies*) de 500mg de fase estacionaria y 6 ml de capacidad. La filtración se lleva a cabo empelando vacío. Antes de pasar la muestra, el cartucho se activa con MeOH (10 ml) y a continuación con HCl acuoso al 0,01% (10 ml). Entonces la muestra se pasa por el cartucho y después se añade, en este orden, (a) agua acidulada con HCl al 0,01% (10 ml), (b) AcOEt (10 ml) y (c) MeOH acidulado con HCl al 0,01% (10 ml) [Logos, 2005; Grace *et al.*, 2014].

6.1.3 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).

Se realizan espectros monodimensionales RMN-¹H, RMN-¹³C, DEPT-135 y bidimensionales (HMBC); en un espectrómetro *Bruker DPX 400* a una frecuencia de 400MHz. Como disolvente y referencia interna se utilizó CD₃OD, ajustándose la escala con el pico central del quintuplete a 3,30 ppm para el caso de RMN-¹H y con el pico central del heptuplete a 49,00 ppm para el RMN-¹³C. El DEPT-135 se utiliza para determinar el grado de sustitución de los distintos átomos de carbono. Los desplazamientos químicos se encuentran expresan en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en

hertzios (Hz). La multiplicidad de las señales se describe según la nomenclatura convencional: *s* (singlete), *d* (doblete), *dd* (doble doblete), *t* (triplete), *m* (multiplete). La muestra se prepara en disolución, previamente filtrada, en un tubo de RMN.

6.1.4 Técnica combinada (HPLC- MS)

Esta técnica se ha desarrollado en un equipo que combina los equipos 2 y 3.

Equipo 2. Cromatógrafo que consta de bomba cuaternaria *Agilent 1100 Series*, desgasificador a vacío, inyector automático *Agilent 1100 Series*, columna analítica de fase reversa *C 18 Kinetex®* (50 x 2,10 mm, 2,6 µm), detector de diodos en serie *Agilent 1100 Series* (DAD) y controlador *Agilent 1100 Series*.

Equipo 3. Espectrómetro de masas *Esquire 6000* de *Bruker Daltonics*, con fuente de ionización a presión atmosférica, electrospray (ESI), y con trampa de iones como analizador. La fuente de ionización ESI se utiliza en modo negativo y positivo, con los siguientes parámetros de trabajo: *Capillary voltaje*: 4 kV, *Cap exit*: -100 V, *Skimmer*: -40 V, *Trap Drive*: 70; *Nebulizer*: 50 psi, *Dry Gass*: 10 L/min, *Dry Temp*: 350 °C; 50-1000 m/z.

6.2 Estudio de la composición química de extractos de arándano rojo.

6.2.1 Procesado del fruto.

El arándano rojo desecado (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) objeto de estudio del presente TFG está comercializado por el grupo “SoyVital” (www.soyvital.es) y es de origen canadiense (según se recoge en el envoltorio). Se adquieren 700 g de bayas de aproximadamente 1 cm de diámetro y se congelan a -20 °C hasta su procesado. Este consiste en triturar la fruta congelada con ayuda de un molinillo eléctrico justo antes de su extracción.

6.2.2 Obtención de extractos.

Se han llevado a cabo 6 procesos de extracción de arándano rojo desecado, 4 de ellos están basados, con ligeras modificaciones, en el procedimiento experimental descrito en bibliografía para extraer compuestos fenólicos de madera de cerezo (Sanz *et al.*, 2010) y otros 2 se basan, con ligeras

modificaciones, en el procedimiento experimental descrito en bibliografía para extraer compuestos fenólicos de los frutos de diferentes especies de *Rubus* y *Prunus* (Jacobek *et al.*, 2009). También se han realizado réplicas de algunos de los métodos de extracción, hasta un total de 4 réplicas.

Las extracciones basadas en el método descrito por Sanz se referencian con las letras ES (esquema 1, apartado 5.1) y las extracciones basadas en el método descrito por Jacobek *et al.* se referencian con las letras EJ (esquema 2, apartado 5.1).

Extracción ES-1.

En un matraz erlenmeyer de 250 ml provisto de agitación y refrigerante de reflujo se pone una muestra de arándano triturado (20,74 g) y se extrae durante 2 h a 40 °C con 100 ml de una mezcla MeOH/agua (1:1, v/v). Los extractos se filtran a vacío con un embudo Büchner y después se elimina el metanol, a presión reducida, a temperatura inferior a 40°C. La solución acuosa resultante se extrae sucesivamente con éter dietílico (2 x 25 ml) y acetato de etilo (2 x 25 ml). Ambas fases orgánicas se lavan con salmuera (25 ml), se secan sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtran y se llevan a sequedad eliminando el disolvente, a presión reducida, a una temperatura inferior a 40 °C. Así se obtienen los correspondientes extractos de Et₂O: ES-1-éter (27 mg) y AcOEt: ES-1-AcOEt (96 mg). La fase acuosa, después de ser extraída con éter dietílico y acetato de etilo se somete a vacío para retirar las trazas de disolvente orgánico. Una alícuota (30 ml) de la fase acuosa se pasa a través de un cartucho de extracción en fase sólida (SPE, apartado 6.1.2), se lleva a sequedad y se obtienen 20 mg del extracto ES-1-SPE.

Extracción ES-2.

En un matraz erlenmeyer de 250 ml provisto de agitación se pone una muestra de arándano triturado (21,97 g) y se extrae durante 24 h a temperatura ambiente con 100 ml de una mezcla MeOH/agua (1:1, v/v). Los extractos se filtran a vacío con un embudo Büchner y después se elimina el metanol, a presión reducida, a temperatura inferior a 40°C. La solución acuosa resultante se extrae sucesivamente con éter dietílico (2 x 25 ml) y acetato de etilo (2 x 25 ml). Ambas fases orgánicas se lavan con salmuera (25 ml), se secan sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtran y se llevan a sequedad eliminando el disolvente, a

presión reducida, a una temperatura inferior a 40 °C. Así se obtienen los correspondientes extractos de Et₂O: ES-2-éter (19 mg) y AcOEt: ES-2-AcOEt (149 mg). La fase acuosa, después de ser extraída con éter dietílico y acetato de etilo se somete a vacío para retirar las trazas de disolvente orgánico. Una alícuota (30 ml) de la fase acuosa se pasa a través de un cartucho de extracción en fase sólida (SPE, apartado 6.1.2), se lleva a sequedad y se obtienen 33 mg del extracto ES-2-SPE.

Extracción ES-3

En un matraz erlenmeyer de 250 ml provisto de agitación se pone una muestra de arándano triturado (19,72 g) y se extrae durante 24 h a temperatura ambiente con 100 ml de una mezcla MeOH/agua (1:1, v/v) acidulada con 3 ml de HCl 2M. Los extractos se filtran a vacío con un embudo Büchner y después se elimina el metanol, a presión reducida, a temperatura inferior a 40°C. La solución acuosa resultante se extrae sucesivamente con éter dietílico (2 x 25 ml) y acetato de etilo (2 x 25 ml). Ambas fases orgánicas se lavan con salmuera (25 ml), se secan sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtran y se llevan a sequedad eliminando el disolvente, a presión reducida, a una temperatura inferior a 40 °C. Así se obtienen los correspondientes extractos de Et₂O: ES-3-éter (33 mg) y AcOEt: ES-3-AcOEt (34 mg). La fase acuosa, después de ser extraída con éter dietílico y acetato de etilo se somete a vacío para retirar las trazas de disolvente orgánico. Una alícuota (30 ml) de la fase acuosa se pasa a través de un cartucho de extracción en fase sólida (SPE, apartado 6.1.2), se lleva a sequedad y se obtienen 15 mg del extracto ES-3-SPE.

Extracción ES-4.

Esta extracción es una réplica de la ES-3. Partiendo de 19,73 g de arándano se obtienen los correspondientes extractos de Et₂O: ES-4-éter (17 mg) y AcOEt: ES-4-AcOEt (21 mg), así como 25 mg del extracto ES-4-SPE.

Extracción ES-5

En un matraz erlenmeyer de 1000 ml provisto de agitación se pone una muestra de arándano triturado (201,03 g) y se extrae durante 24 h a temperatura ambiente con 800 ml de una mezcla MeOH/agua (1:1, v/v) acidulada con 3 ml de HCl 2M. Los extractos se filtran a vacío con un embudo Büchner y después se elimina el metanol, a presión reducida, a temperatura

inferior a 40°C. La solución acuosa resultante se extrae sucesivamente con éter dietílico (4 x 100 ml) y acetato de etilo (4 x 100 ml). Ambas fases orgánicas se lavan con salmuera (100 ml), se secan sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtran y se llevan a sequedad eliminando el disolvente, a presión reducida, a una temperatura inferior a 40 °C. Así se obtienen los correspondientes extractos de Et₂O: ES-5-éter (312 mg) y AcOEt: ES-5-AcOEt (335 mg).

Extracción ES-6

Esta extracción es una réplica de la extracción ES-5. Partiendo de 255,97 g de arándano se obtienen los correspondientes extractos de Et₂O: ES-6-éter (586 mg) y AcOEt: ES-4-AcOEt (428 mg).

Extracción EJ-1

En un matraz erlenmeyer de 250 ml provisto de agitación y refrigerante de reflujo se pone una muestra de arándano triturado (20,66 g) y se extrae durante 2 h a 40 °C con 100 ml de acetato de etilo. Los extractos se filtran a vacío con un embudo Büchner y se llevan a sequedad eliminando el disolvente, a presión reducida, a una temperatura inferior a 40 °C, obteniéndose el correspondiente extracto de AcOEt: EJ-1-AcOEt (807 mg). El fruto se vuelve a extraer con 100 ml de una mezcla MeOH/agua (1:1, v/v) acidulada con 3 ml de HCl 2M, durante 1 h a temperatura ambiente. El extracto se filtra a vacío con un embudo Büchner y después se elimina el metanol, a presión reducida, a temperatura inferior a 40°C. Una alícuota (30 ml) de la fase acuosa se pasa a través de un cartucho de extracción en fase sólida (SPE, apartado 6.1.2), se lleva a sequedad y se obtienen 33 mg del extracto EJ-1-SPE.

Método de extracción EJ-2.

En un matraz erlenmeyer de 250 ml provisto de agitación se pone una muestra de arándano triturado (20,01 g) y se extrae durante 24 h a temperatura ambiente con 100 ml de acetato de etilo. Los extractos se filtran a vacío con un embudo Büchner y se llevan a sequedad eliminando el disolvente, a presión reducida, a una temperatura inferior a 40 °C, obteniéndose el correspondiente extracto de AcOEt: EJ-2-AcOEt (733 mg). El fruto se vuelve a extraer con 100 ml de una mezcla MeOH/agua (1:1, v/v) acidulada con 3 ml de HCl 2M, durante 1 h a temperatura ambiente. El extracto se filtra a vacío con un embudo Büchner y después se elimina el metanol, a presión reducida, a temperatura

inferior a 40°C. Una alícuota (30 ml) de la fase acuosa se pasa a través de un cartucho de extracción en fase sólida (SPE, apartado 6.1.2), se lleva a sequedad y se obtienen 134 mg del extracto EJ-2-SPE.

Extracción EJ-3 y extracción EJ-4.

Estas dos extracciones son réplicas de la extracción EJ-2. Partiendo de 20,63 g y 19,89 g de arándano para EJ-3 y EJ-4 respectivamente, se obtienen los correspondientes extractos: EJ-3-AcOEt (602 mg) y EJ-4-AcOEt (957 mg).

6.2.3 Análisis de los extractos por HPLC-DAD.

Todos los extractos de AcOEt obtenidos a partir de arándano rojo desecado (apartado 6.2.2) se analizan mediante HPLC analítico (equipo 1). Se preparan disoluciones de los extractos en MeOH a una concentración de 10 mg/ml, se filtran a través de filtros de politetrafluoroetileno (PTFE) de 13 mm de diámetro y 0.45 µm de tamaño de poro y se inyecta en el equipo un volumen de 10 µl de cada muestra. Se emplea un método de elución en gradiente (método ACN) con agua milliQ acidificada al 0,2% con AcOH (canal B) y acetonitrilo con un 0,2% de AcOH (canal C), a un flujo de 0,7 ml/min. El método ACN consiste en un aumento lineal de 0 a 20% de C en 22 min, seguido de un segundo aumento lineal de 20 a 22,5% de C en 0,80 min, se mantiene durante 5,2 min a 22,5% de C y por último un tercer aumento lineal en 8 min de 22,5 a 25% de C, para finalizar volviendo a las condiciones iniciales, de 0% de C en 4 min (Monagas *et al.*, 2007). La duración total del análisis es de 40 min, además del tiempo necesario para la estabilización de la presión del sistema. Un análisis representativo de las extracciones ES y EJ son los que se recogen en la tablas siguientes.

Tabla 10. Información de los tiempos de retención y espectros de UV-Vis de los compuestos presentes en el extracto EJ-1-AcOEt.

Compuesto	t _R (min)	λ _{max} (nm)	Compuesto	t _R (min)	λ _{max} (nm)
1	7,72	284	7	22,23	220, 310
2	16,27	232	8	24,10	217, 289
3	16,77	-	9	28,49	219, 310
4	18,14	216, 311	10	31,80	220, 267

5	19,79	217,277	11	34,1	219, 335
6	21,37	230			

Tabla 11. Información de los tiempos de retención y espectros de UV-Vis de los compuestos presentes en el extracto ES-5- AcOEt.

Compuesto	t _R (min)	λ _{max} (nm)	Compuesto	t _R (min)	λ _{máx.} (nm)
1	6,84	279	12	26,30	262, 356
2	7,20	284	13	27,25	297
3	16,00	233	14	27,47	311
4	16,58	261	15	28,16	269
5	17,95	316	16	28,50	255, 354
6	18,52	325	17	28,50	312
7	21,16	228	18	29,65	256, 357
8	22,07	309	19	30,33	257, 353
9	24,00	289	20	30,75	254, 347
10	24,27	271	21	34,09	218, 316
11	25,10	327			

6.2.4 Fraccionamiento de los extractos ES-5-AcOEt y ES-6-AcOEt.

Los extractos ES-5-AcOEt y ES-6-AcOEt se han agrupado para llevar a cabo su fraccionamiento y a partir de aquí esta agrupación se nombrará extracto ES-5,6-AcOEt. Una alícuota del extracto ES-5,6-AcOEt (571 mg) se cromatografía en una columna de 4 cm de diámetro rellena hasta 15 cm de altura con Sephadex LH-20 como fase estacionaria y humectada con MeOH. La muestra (571 mg) se introduce, disuelta en 5 ml de MeOH por la parte superior de la columna con ayuda de una pipeta. La elución se lleva a cabo MeOH (1000 ml). Se recogen 20 fracciones de 50 ml cada una, las cuales se llevan a sequedad evaporando el disolvente a presión reducida en un rotavapor, a temperatura inferior a 40°C. Por diferencia de pesada se determina la cantidad de extracto en cada una de ellas (tabla 12). Todas las fracciones se analizan mediante CCF (apartado 6.1.1) y las fracciones 2, 3, 4, 5, 6 y 8 mediante HPLC analítico

(apartados 6.1.1 y 6.2.3). En la siguiente tabla se recogen las cantidades obtenidas en cada una de las fracciones.

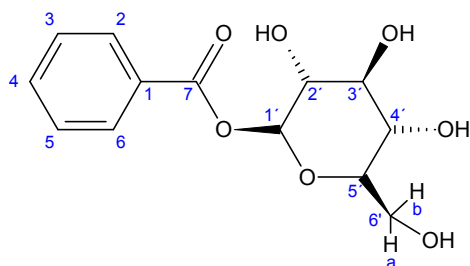
Tabla 12. Fraccionamiento del extracto ES-5,6-AcOEt y cantidades obtenidas en mg.

Fracción	Masa (mg)	Fracción	Masa (mg)
1	7	11	7
2	12	12	5
3	55	13	6
4	101	14	2
5	95	15	6
6	58	16	4
7	22	17	10
8	11	18	2
9	7	19	1
10	4	20	2

6.2.5. Purificación y caracterización estructural de los compuestos aislados.

La fracción 4 (101 mg, apartado 6.2.4) se cromatografía en HPLC semipreparativo (equipo 1). La muestra se disuelve en MeOH a una concentración de 100 mg/ml, se filtra a través de filtros de politetrafluoroetileno (PTFE) de 13 mm de diámetro y 0.45 µm de tamaño de poro y se inyectan en el equipo volúmenes de entre 100 y 200 µl. Se emplea un método de elución en gradiente (método 5ACPR) con agua milliQ acidificada al 0,2% con AcOH (canal B) y acetonitrilo con un 0,2% de AcOH (canal C), a un flujo de 5 ml/min. El método consiste en el aumento lineal de 10 a 25% de C en 40 min y se recoge el pico que eluye entre 9.7 y 10.2 minutos. Esta fracción se lleva a sequedad eliminando el disolvente, a presión reducida, a una temperatura inferior a 40 °C y se obtienen 12 mg de un compuesto puro **1**.

El compuesto **1** se analiza mediante HPLC analítico (equipo 1 y método ACN) y RMN, los datos obtenidos se exponen a continuación (figura 14, tabla 13).

**Figura 14.** Estructura de benzoato de 1-O-β-D-glucopiranosilo (**1**)**Tabla 13.** Datos de RMN-¹H, RMN-¹³C y RMN-2D (HMBC) en CD₃OD.**benzoato de 1-O-β-D-glucopiranosilo**

Posición	¹ H (δ en ppm, <i>J</i> en Hz)	¹³ C	HMBC
1	-	130,85	-
2	8,09 (<i>d</i> , <i>J</i> _{2,3} = 8,5)	130,93	166,79; 134,74; 130,85; 129,63
3	7,49 (<i>t</i> , <i>J</i> _{3,2} = 8,3; <i>J</i> _{3,4} = 7,6)	129,63	134,74; 130,93; 130,85
4	7,63 (<i>t</i> , <i>J</i> _{4,3} = 7,5; <i>J</i> _{4,5} = 7,5)	134,74	130,93
5	7,49 (<i>t</i> , <i>J</i> _{5,4} = 7,6; <i>J</i> _{5,6} = 8,3)	129,63	134,74; 130,93; 130,85
6	8,09 (<i>d</i> , <i>J</i> _{6,5} = 8,5)	130,93	166,79; 134,74; 130,85; 129,63
7	-	166,79	-
1'	5,72 (<i>d</i> , <i>J</i> _{1',2'} = 8,1)	96,32	-
2'	3,52-3,41 (<i>m</i>)	74,08	-
3'	3,52-3,41 (<i>m</i>)	78,12	-
4'	3,52-3,41 (<i>m</i>)	71,10	-
5'	3,52-3,41 (<i>m</i>)	78,95	-
6'a	3,85 (<i>dd</i> , <i>J</i> _{6a,6b} = 12,20; <i>J</i> _{6a,5'} = 2,07)	62,34	71,10
6'b	3,70 (<i>dd</i> , <i>J</i> _{6a,6b} = 12,20; <i>J</i> _{a,5'} = 4,76)	62,34	71,10

La fracción 7 (22 mg, apartado 6.2.4) presenta un compuesto mayoritario (**6**) en su análisis mediante HPLC analítico (equipo 1 y método ACN). Se lleva a cabo un estudio mediante RMN para la caracterización de dicho compuesto **6** (figura 15, tabla 14).

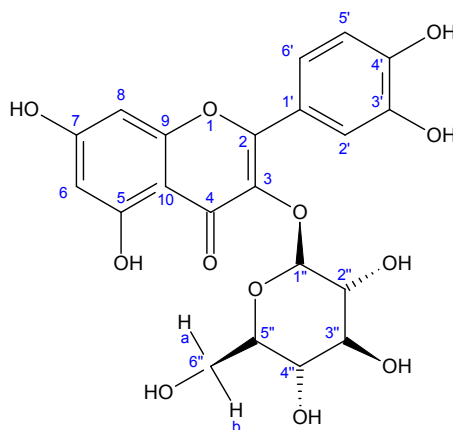


Figura 15. Estructura de quercetina 3-O-glucósido (6)

Tabla 14. Datos de RMN-¹H, RMN-¹³C y RMN-2D (HMBC) en CD₃OD.

quercetina 3-O-glucósido			
Posición (Anillo)	¹ H (δ en ppm, J en Hz)	¹³ C	HMBC
1 (C)	-	-	-
2 (C)	-	158,81	-
3 (C)	-	135,78	-
4 (C)	-	179,53	-
5 (A)	-	162,99#	-
6 (A)	6,20 (s, $J_{8,6}^4 = 2,1$)	99,88*	166,04; 162,99; 105,42; 94,72
7 (A)	-	166,04	-
8 (A)	6,39 (s, $J_{8,6}^4 = 2,1$)	94,72*	166,04; 158,43; 105,42; 99,88
9 (A)	-	158,43#	-
10 (A)	-	105,42	-
1' (B)	-	122,87	-
2' (B)	7,83 (s, $J_{2',6'}^4 = 2,1$)	116,08	149,94; 122,95; 122,87
3' (B)	-	145,80	-
4' (B)	-	149,94	-
5' (B)	6,86 (d, $J_{5',6'} = 8,5$)	117,76	145,80; 122,87
6' (B)	7,57 (d, $J_{6',5'} = 8,5$; $J_{6',2'}^4 = 2,1$)	122,95	149,94
1''	5,15 (d, $J_{1'',2''} = 7,9$)	99,88	135,78
2''	3,66-3,47 (m)	73,18	-

3''	3,66-3,47 (m)	75,10	-
4''	3,66-3,47 (m)	70,02	-
5''	3,66-3,47 (m)	77,17	-
6''a	3,85-3,73 (m)	61,94	-
6''b	3,85-3,73 (m)	61,94	-

*Señales intercambiables # Señales intercambiables

6.2.6 Estudio de los extractos de arándano rojo mediante HPLC-MS

La fracción 5 y la agrupación de fracciones de la 8 a la 20 (apartado 6.2.4) se estudian mediante la técnica combinada HPLC-MS (apartado 6.1.4). Una alícuota de cada muestra se disuelve en MeOH a una concentración de 1 mg/ml, se filtra a través de filtros de PTFE de 13 mm de diámetro y 0.45 µm de tamaño de poro y se inyectan en el equipo volúmenes de 2 µl. El método de elución empleado (método de elución ACN) es el mismo que se programa para el análisis de los extractos mediante HPLC analítico (apartado 6.2.3) y trabajando con un flujo de 0.25 ml/min. También se ha estudiado mediante la técnica HPLC-MS el extracto ES-1-SPE (apartado 6.2.2). La información obtenida se recoge en las tablas 15, 16 y 17 respectivamente.

Tabla 15. Información de los tiempos de retención y espectros de masas de los compuestos presentes en la fracción 5 de los extractos ES-5,6-AcOEt.

Compuesto	t _R (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Aductos	MS/MS de [M-H] ⁻ (m/z)	[M+H] ⁺ (m/z)	Aductos
1	10,7	282,7	-	120,7	-	307 [M+Na] ⁺
2	12,2	324,7	-	162,5	-	349 [M+Na] ⁺
3	13,1	352,7	706,8 [2M-H] ⁻	190,6	354,9	
4a	15,7	336,7	-	190,6	-	-
4b	16,5	336,8	-	190,6	-	-
5	20,8	534,8	1072,8 [2M-H] ⁻	-	-	561 [M+Na] ⁺

6	21,4	462,7	926,7 [2M-H] ⁻	299,7	464,4	-
7	21,8	536,8	1074,9 [2M-H] ⁻	-	-	561 [M+Na] ⁺
8	23,9	446,7	894,8 [2M-H] ⁻	299,6	-	-
9	23,9	476,7	476,7	272,2	-	-
10	24,4	506,7	1014,8 [2M-H] ⁻	-	508,9	-
11	27,1	444,7	-	-	446,9	468,9 [M+Na] ⁺

Tabla 16. Información de los tiempos de retención y espectros de masas de los compuestos presentes en la agrupación 8-20 de los extractos ES-5,6-AcOEt.

Compuesto	t_R (min)	[M-H]⁻ (m/z)	Aductos	MS/MS de [M-H]⁻ (m/z)	[M+H]⁺ (m/z)	Aductos
12	21,3	574,7	-	-	-	-
13a	22,5	423,7	866,7 [2M-H] ⁻	299,7	-	-
13b	22,9	423,7	866,7 [2M-H] ⁻	299,7	-	-
13c	23,2	423,7	866,7 [2M-H] ⁻	299,7	-	-
14	23,8	446,7	-	285	-	-

Tabla 17. Información de los tiempos de retención y espectros de masas de los compuestos presentes en la fase acuosa ES-1-SPE.

Compuesto	t_R (min)	[M-H]⁻ (m/z)	Aductos	MS/MS de [M-H]⁻ (m/z)	[M+H]⁺ (m/z)	Aductos
15	15,3	-	-	286,9	448,9	-
16	16,4	-	-	286,9	418,9	-
17	17,0	-	-	301,0	463,0	-

7. CONCLUSIONES.

Primera. El proceso de extracción de arándano rojo desecado (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) se ha ensayado bajo diferentes condiciones, llevándose a cabo hasta seis procedimientos diferentes. De los resultados obtenidos se pueden destacar las siguientes conclusiones: (a) el aumento de la temperatura de extracción de temperatura ambiente a 40 °C no supuso un aumento en el rendimiento, (b) la adición de ácido al disolvente de extracción tampoco supuso un aumento en el rendimiento y (c) el extracto de acetato de etilo obtenido directamente de la fruta condujo a los extractos con mayores rendimientos (2.2%-4.8%).

Segunda. Los perfiles cromatográficos de dos extractos de acetato de etilo, obtenido uno mediante extracción líquido-líquido a partir de un extracto hidroalcohólico y otro mediante extracción directa, son diferentes. El primero de ellos mostraba un mayor número de compuestos, destacando dos de ellos como componentes mayoritarios.

Tercera. El fraccionamiento y purificación de un extracto de acetato de etilo de arándano rojo desecado mediante cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía líquida de alta resolución semipreparativa ha permitido el aislamiento y posterior identificación estructural de los dos componentes mayoritarios del extracto: benzoato de 1-O-β-D-glucopiranosilo (**1**) y quercetina 3-O- glucósido (**6**).

Cuarta. El estudio de dos fracciones del extracto de acetato de etilo mediante la técnica combinada HPLC-MS ha permitido proponer la identificación de diez componentes más de arándano, tres ácidos hidroxicinámicos: ácido *p*-cumárico 4-O-glucósido (**2**), ácido cafeoilquínico (**3**) y dos isómeros del ácido *p*-cumaroilquinico (**4a** y **4b**), seis flavonoles: quercetina 3-O-ramnósido (**8**), quercetina 3-O-glucurónido (**9**), siringetina 3-O-glucósido (**10**), tres isómeros de quercetina 3-O-arabinósido (**13a**, **13b** y **13c**), metoxiquercetina 3-O-xilósido (**14**), una isoflavona: glycitina (**11**), así como una proantocianidina tipo A (**12**).

Quinta. El estudio mediante la técnica combinada HPLC-MS de un extracto acuoso purificado por extracción en fase sólida ha permitido proponer la

identificación de tres antocianinas: cianidina 3-O-arabinósido (**15**), cianidina 3-O-galactósido (**16**) y peonidina 3-O-galactósido (**17**).

Sexta. Los compuestos **10** y **11** no se habían identificado previamente en extractos de *Vaccinium macrocarpon* Ait., aunque sí en otros extractos del género *Vaccinium*. El compuesto **1** no ha sido identificado previamente en extractos del género *Vaccinium*.

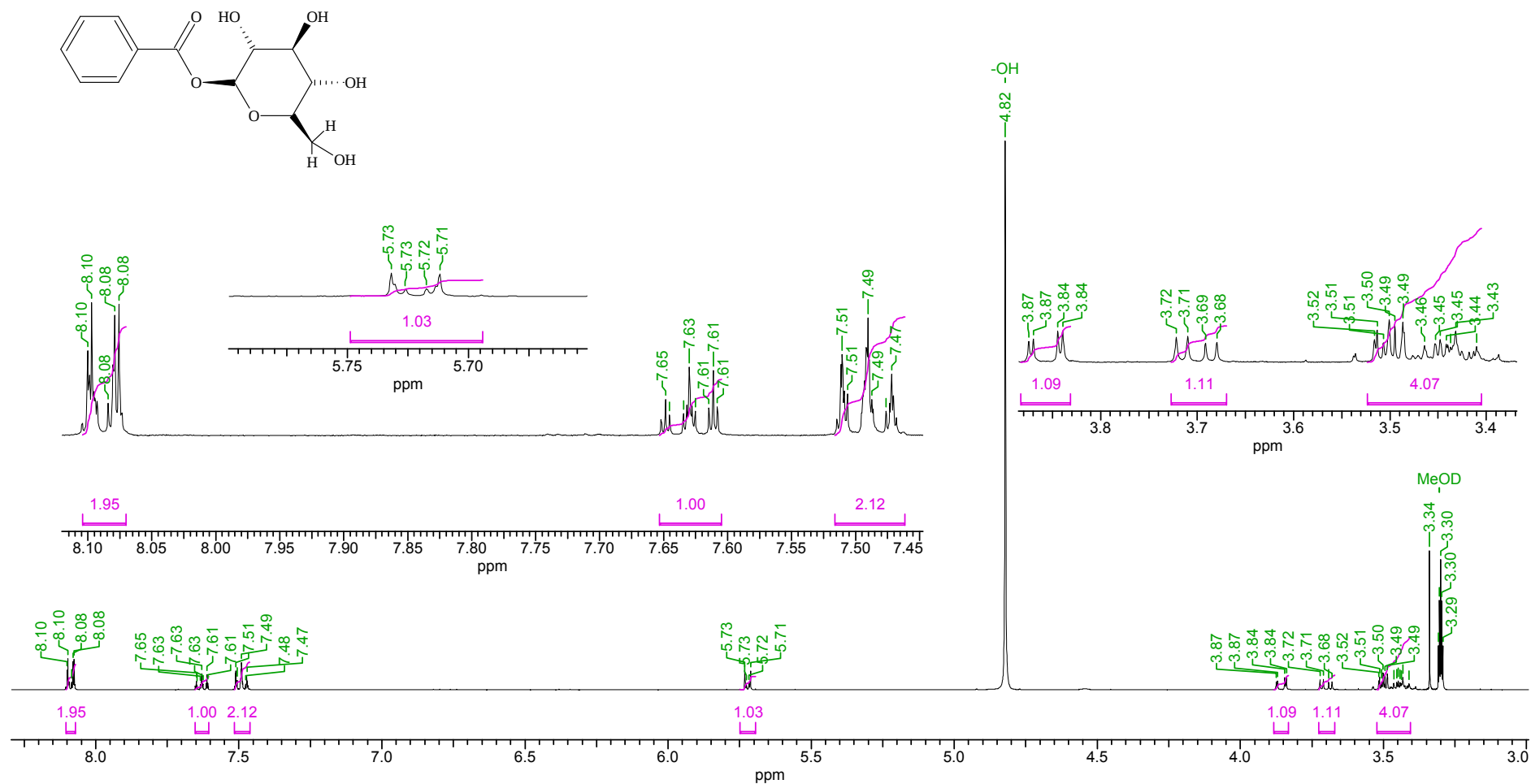
8. BIBLIOGRAFÍA.

- Aiton, W. *Vaccinium macrocarpon*. *Flora of North América*. **2009**, 8, 372, 511, 515, 516, 519.
- Amakura, Y.; Tsutsumi, T.; Nakamura M.; Handa H., Yoshimura M.; Matsuda R.; Yoshida T. Aryl hydrocarbon receptor ligand activity of commercial health foods. *Food Chemistry*. **2011**, 126, 1515–1520.
- Bhagwat, S., Haytowitz, D.B.; Holden, J.M. (Ret.). USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, Release 3.1. U.S. **2014**. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. Nutrient Data Laboratory Home Page: <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata/flav>.
- Biswas, N.; Balac, P.; Narlakanti, S.; Enamul Haque, MD; Mehedi Hassan, MD. Identification of Phenolic Compounds in Processed Cranberries by HPLC Method. *Journal of Nutrition and Food Sciences*. **2013**, 3(1), 181.
- 33. Bruneton, J. **2001**. Farmacognosia: Fitoquímica, Plantas medicinales. Acribia, Zaragoza.
- Chen, H.; Zuo, Y.; Deng, Y. Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. **2001**, 913, 387–395.
- Cote, J.; Caillet, S.; Doyon, G.; Sylvain, J.-F.; Lacroix, M. Bioactive compounds in cranberries and their biological properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **2010**, 50(7), 666-679.
- Cunningham, D. G.; Vannozi, S.A.; Turk, R.; Roderik, R.; O'Shea, E.; Brilliant, K. Constituyentes fitoquímicos del arándano americano (*Vaccinium macrocarpon*) y sus beneficios para la salud. *Revista de fitoterapia*. **2005**, 5(1), 5-16.

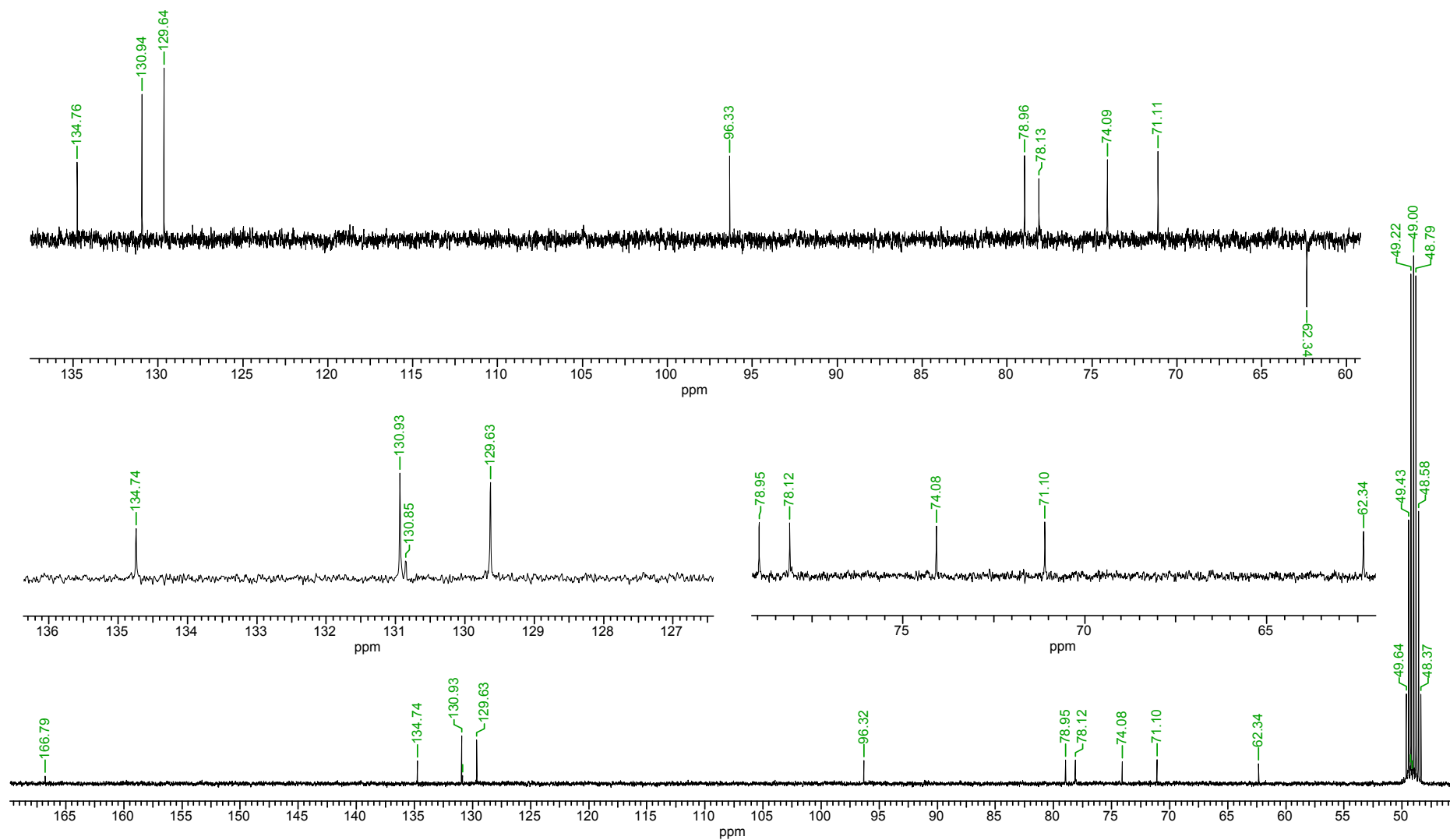
- Díaz-García, M.C.; Obón, J.M.; Castellar, M.R.; Collado, J.; Alacid, M. Quantification by HPLC of total individual polyphenols in fruit juices. *Food Chemistry*. **2013**, 138, 938-949.
- Escribano-Bailón, M.; Santos-Buelga, C.; Alonso, G.; Salinas, M. Anthocyanin Composition on the Fruit of *Coriaria myrtifolia* L. *Phytochemical analysis*. **2002**, 13, 354-357.
- Feghali, K.; Feldman, M.; La, V. D.; Santos, J.; Grenier, D. Cranberry Proanthocyanidins: Natural Weapons against Periodontal Diseases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2012**, 60(23), 5728-5735.
- Fernández, A. Aplicaciones fitoterapéuticas del arándano rojo. *Ámbito farmacéutico*. **2008**, 27(9), 71-78.
- Grace, M.; Esposito, D.; Dunlap, K.; Lila, M. Comparative Analysis of Phenolic Content and Profile, Antioxidant Capacity, and Anti-inflammatory Bioactivity in Wild Alaskan and Commercial *Vaccinium* Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2014**, 62, 4007-4017.
- Jacobeck, L.; Seruga, M.; Seruga, B.; Novak, I.; Medvidovic-Kosanovic, M. Phenolic compound composition and antioxidant activity of fruits of *Rubus* and *Prunus* species from Croatia. *Food Science & Technology*. **2009**, 44, 860-868.
- Jass, J.; Reid, G. Effect of cranberry drink on bacterial adhesion in vitro and vaginal microbiota in healthy females. *The Canadian journal of urology*. **2009**, 16(6), 4901-7.
- Jiménez, C. El papel de los productos naturales en el mercado actual. *Divulgación de la química*. **2013**, 109(2), 134-141.
- Jungmin, L. Proanthocyanidin A2 purification and quantification of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) products. *Journal of Functional Foods*. **2013**, 5, 144-153.
- Kay, C.; Mazza, G.; Holub, B.; Wang, J. Anthocyanin metabolites in human urine and serum. *British Journal of Nutrition*. **2004**, 91, 933-942.
- Lin, Z.; HARNLY, J.A Screening Method for the Identification of Glycosylated Flavonoids and Other Phenolic Compounds Using a Standard Analytical Approach for All Plant Materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2007**, 55, 1084-1096.

- Liu, Y.; Gallardo, A. M.; Pinzon, P. A.; Reynolds, Y.; Rodriguez, G.; Camesano, T.A. Cranberry changes the physicochemical surface properties of *E. coli* and adhesion with uroepithelial cells. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*. **2008**, 65(1), 35-42.
- Monagas, M.; Garrido, I.; Lebrón-Aguilar, R.; Bartolome, B.; Gomez-Cordovés, C. Almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) Skins as a Potential Source of Bioactive Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2007**, 55, 8498-8507.
- Moure, A.; Cruz, J. M.; Franco, D.; Domínguez, J. M.; Sineiro, J.; Domínguez, H.; Núñez, M. J.; Parajó, J. C. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*. **2001**, 72, 145-171.
- Mullen, W., Marks, S.C., Crozier, A. Evaluation of phenolic compounds in commercial fruit juices and fruit drinks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2007**, 55, 3148–3157.
- Neto, C.C. Cranberry and Its Phytochemicals: A Review of In Vitro Anticancer Studies. *The Journal of Nutrition*. **2007**, 137, 186S–193S.
- Paudel, L.; Wyzgoski, F.J.; Scheerens, J.; Chanon, A.; Reese, R.; Smiljanic, D.; Wesdemiotis, C.; Blakeslee, J.; Riedl, K.; Rinaldi, P. Nonanthocyanin Secondary Metabolites of Black Raspberry (*Rubus occidentalis* L.) Fruits: Identification by HPLC-DAD, NMR, HPLC-ESI-MS, and ESI-MS/MS Analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2013**, 61, 12032–12043.
- Regos, I.; Urbanella, A.; Treutter, D. Identification and Quantification of Phenolic Compounds from the Forage Legume Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2009**, 57, 5843-5852.
- Sanchez, P.; Bartolomé, B.; Martín-Alvarez, P.; Anderson, M.; Howell, A.; Monagas, M. Comprehensive Assessment of the Quality of Commercial Cranberry Products. Phenolic Characterization and in Vitro Bioactivity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2012**, 60, 3396–3408.
- Sanz, M.; Cadahía, E.; Esternuelas, E.; Muñoz, A.; Fernández de Simón, B.; Hernández, T.; Estrella, I. Phenolic Compounds in Cherry (*Prunus avium*) Heartwood with a View to Their Use in Cooperage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**, 58, 4907-4914.

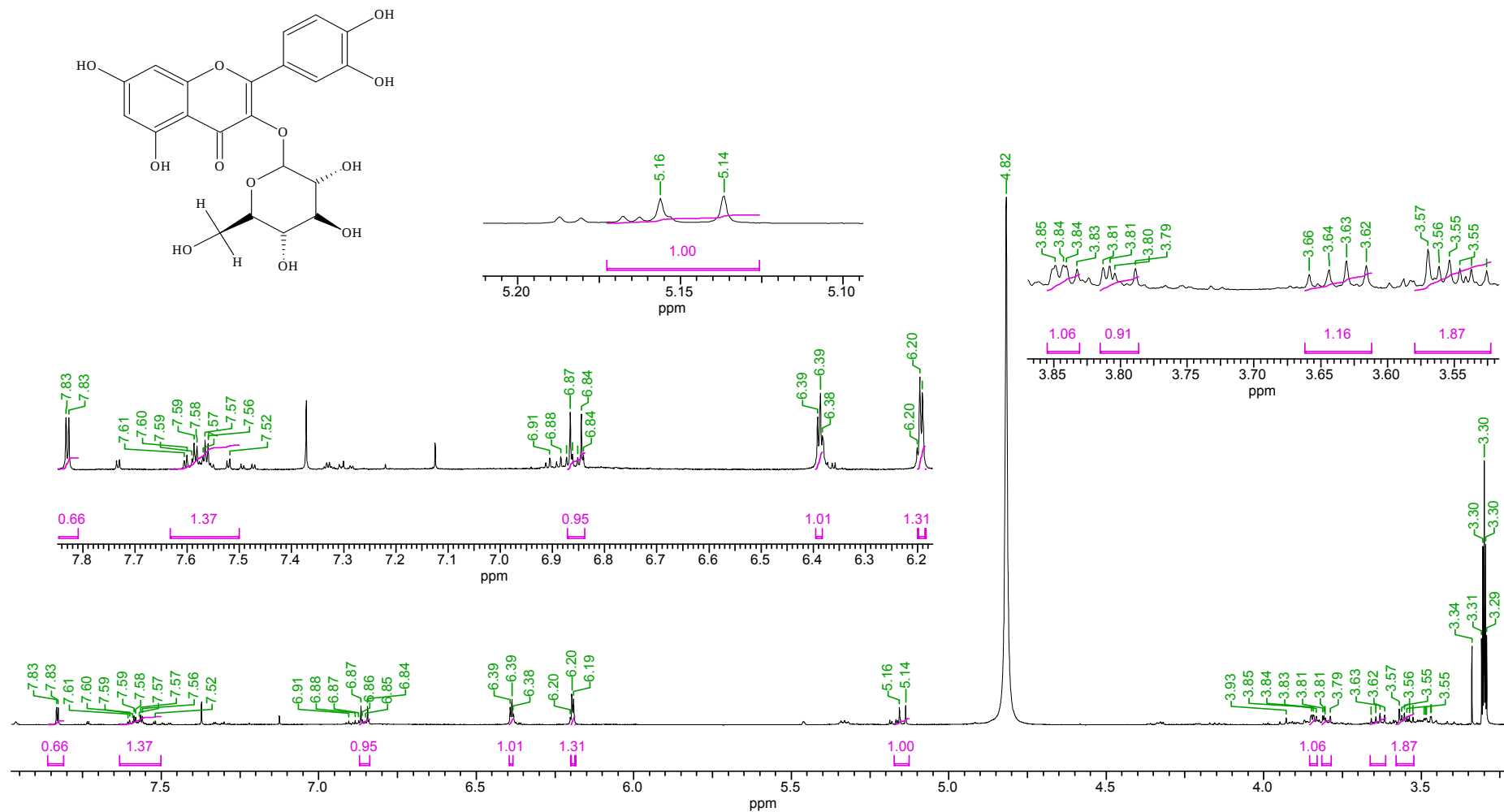
- Sprygin, V. G.; Kushnerova, N. F. Cranberry: A new source of oligomeric proanthocyanidins. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. **2004**, 38(2), 100-104.
- Tedder, J.M; Nechvatal, A.; Murray, A.W.; Carnduff, J. **1979**. Química Orgánica, un método mecanicista. Urmo, Bilbao.
- Wang, L.; Su, S.; Wua, J.; Dua, H.; Li, S.; Huo J.; Zhang Y.; Wanga, L. Variation of anthocyanins and flavonols in *Vaccinium uliginosum* berry in Lesser Khingan Mountains and its antioxidant activity. *Food Chemistry*. **2014**, 160, 357–364.
- White, B.L; Howard, L.R; Prior, R.L. Proximate and Polyphenolic Characterization of Cranberry Pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**, 58, 4030-4039.
- Wittine, K.; Gazivoda T.; Markus, M.; Mrvos̃-Sermekb, D.; Hergold-Brundic, A.; Cetinac, M.; Ziherd, D.; Gabelicad, V.; Mintasa, M.; Raic´-Malic, S. Crystal structures, circular dichroism spectra and absolute configurations of some L-ascorbic acid derivatives. *Journal of Molecular Structure*. **2004**, 687, 101-106.

benzoato de 1-O- β -D-glucopiranosiloFigura 16. Espectro de RMN- ^1H del compuesto 1.

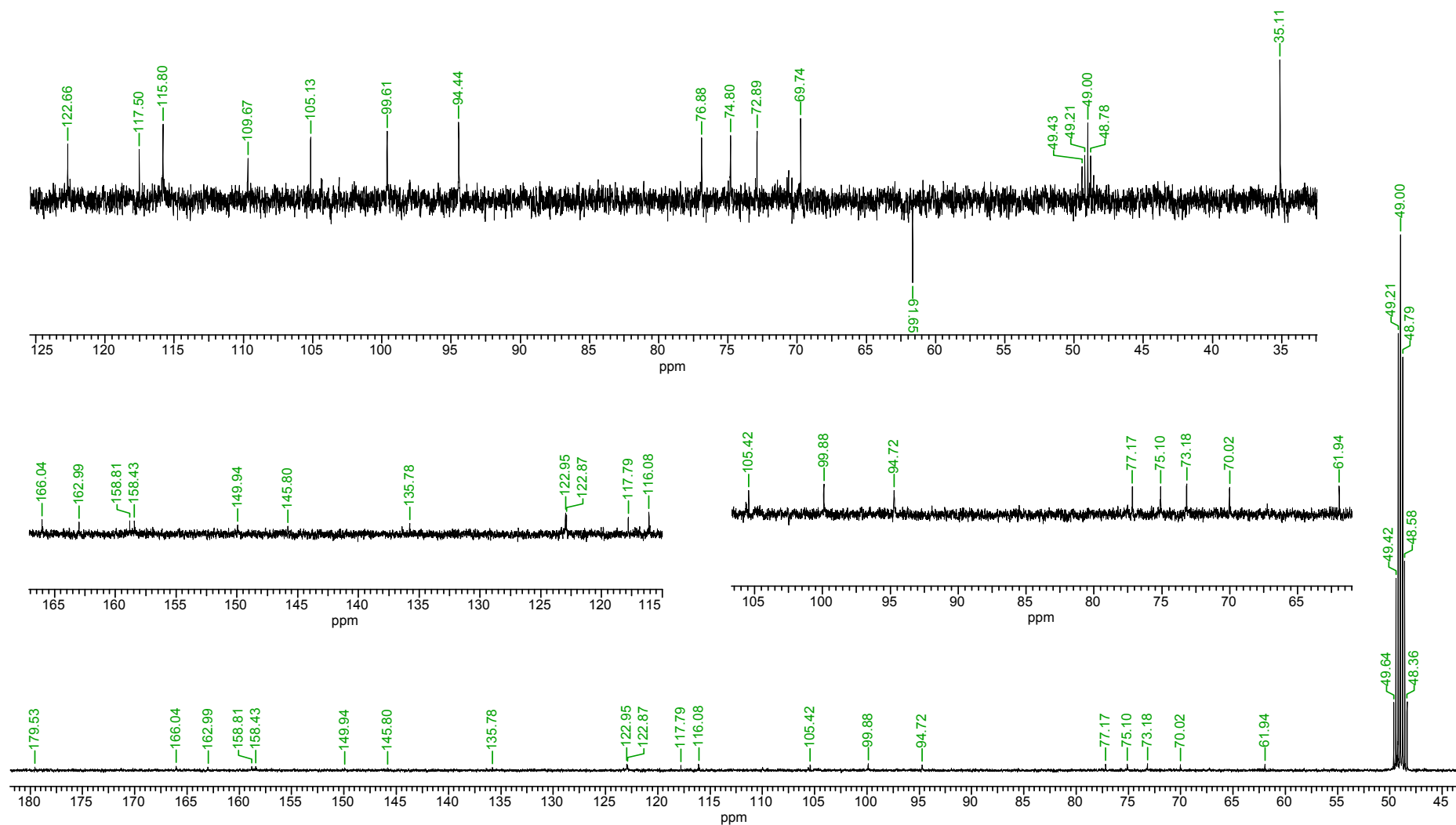
Sandra Puentenueva Murillo

Figura 17. Espectros de RMN- C^{13} y Dept-135 del compuesto 1.

quercetina 3-O-glucósido

Figura 18. Espectro de RMN- H^1 del compuesto 6.

Sandra Puentenueva Murillo

Figura 19. Espectros de RMN- C^{13} y Dept-135 del compuesto 6.