

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Analítica

Centro de Investigación y Desarrollo del Alimento Funcional



**USO DE TÉCNICAS SEPARATIVAS ACOPLADAS A ESPECTROMETRÍA
DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA ESTUDIOS
METABOLÓMICOS DE
NUTRACÉUTICOS Y MATRICES VEGETALES**

presentada por:

M^a Isabel Borrás Linares

para optar al grado de:

Doctor Internacional por la Universidad de Granada

Tesis doctoral dirigida por:

D. Alberto Fernández Gutiérrez

D. Antonio Segura Carretero

D. David Arráez Román

Granada, 2013

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: M^a Isabel Borrás Linares
D.L.: GR 1044-2014
ISBN: 978-84-9028-951-8

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a una beca predoctoral de formación de personal investigador concedida por el Ministerio de Economía y Competitividad (BES-2009-028128) y a la financiación con cargo a fondos del Centro de Investigación y Desarrollo del Alimento Funcional (CIDAF) procedentes de diferentes proyectos, contratos y subvenciones de las Administraciones central y autonómica, plan propio de investigación de la UGR, así como de empresas interesadas en los resultados de la investigación.



**USO DE TÉCNICAS SEPARATIVAS ACOPLADAS A ESPECTROMETRÍA
DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA ESTUDIOS
METABOLÓMICOS DE
NUTRACÉUTICOS Y MATRICES VEGETALES**

por

M^a Isabel Borrás Linares

Visado en Granada a 2 de Diciembre de 2013

Fdo: Prof. Dr. D. Alberto Fernández Gutiérrez
Catedrático del Departamento de Química Analítica
Facultad de Ciencias. Universidad de Granada

Fdo: Prof. Dr. D. Antonio Segura Carretero
Catedrático del Departamento de Química Analítica
Facultad de Ciencias. Universidad de Granada

Fdo: Prof. Dr. D. David Arráez Román
Profesor Titular del Departamento de Química Analítica
Facultad de Ciencias. Universidad de Granada



**Memoria para optar al grado de Doctor Internacional por la
UGR:**

Fdo: M^a Isabel Borrás Linares



El Prof. Dr. D. ALBERTO FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ, Catedrático de Universidad en el Departamento de Química Analítica “Profesor Fermín Capitán” y en el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos “José Mataix” y Director del Centro de Investigación y Desarrollo del Alimento Funcional (CIDAF) de la Universidad de Granada,

CERTIFICA

Que el trabajo que se presenta en esta tesis doctoral con el título: **“USO DE TÉCNICAS SEPARATIVAS ACOPLADAS A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA ESTUDIOS METABOLÓMICOS DE NUTRACÉUTICOS Y MATRICES VEGETALES”**, que ha sido realizado bajo mi dirección, la del Prof. Dr. D. Antonio Segura Carretero y la del Prof. Dr. D. David Arráez Román en los laboratorios del Centro de Investigación y Desarrollo del Alimento Funcional (Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud) y también parcialmente, en las instalaciones que la compañía Bruker Daltonik GmbH tiene en Bremen (Alemania) y el laboratorio de la Facultad de Tecnología de Novi Sad (Serbia), reúne todos los requisitos legales, académicos y científicos para hacer que el doctorando Dña. M^a Isabel Borrás Linares pueda optar al grado de Doctor Internacional por la Universidad de Granada.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Granada a 2 de Diciembre de 2013:



Índice

Índice



ABREVIATURAS	29
RESUMEN	37
SUMMARY	47
OBJETIVOS	57
INTRODUCCIÓN	63
1. Alimentación funcional y nutraceuticos.....	63
2. Extractos vegetales como fuente de compuestos bioactivos.....	67
2.1 <i>Rosmarinus officinalis</i>	69
2.2 <i>Hibiscus sabdariffa</i>	72
3. Compuestos fenólicos como compuestos bioactivos ..	75
3.1 Estructura, biosíntesis y clasificación de los compuestos fenólicos.....	76
3.2 Bioactividad de los compuestos fenólicos.	81
3.2.1 Cáncer.....	83
3.2.2 Infección microbiana.....	92
3.2.3 Obesidad.....	96
3.3 Ensayos <i>in vitro</i> para la evaluación de bioactividad	99



	3.3.1 Determinación de la capacidad anticancerígena.	101
	• Ensayo de azul de tripán.	102
	• Ensayo de reducción del MTT.	102
	• Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo.	104
	3.3.2 Determinación de la capacidad antimicrobiana.	105
	3.4 Absorción, metabolismo y biodisponibilidad de compuestos fenólicos.	106
14	4. Determinación de compuestos fenólicos.	111
	4.1 Tratamiento de muestra para la determinación de compuestos fenólicos.	112
	4.1.1 Extracción de compuestos fenólicos en matrices vegetales.	114
	• Extracción con Fluidos Presurizados (PLE).	119
	• Extracción con Fluidos Supercríticos (SFE).	125
	• Extracción asistida con Microondas (MAE).	138



4.2Técnicas analíticas para la determinación de compuestos fenólicos.....	150
4.2.1 Técnicas separativas para el análisis de compuestos fenólicos: Cromatografía Líquida (LC).....	151
4.2.1.1 Fundamentos de la LC.	153
4.2.1.2 Análisis de compuestos fenólicos mediante HPLC/UPLC.	159
4.2.2Sistemas de detección.....	162
4.2.2.1 Espectroscopía de absorción UV-Vis.....	165
4.2.2.2 Espectrometría de masas (MS).	167
• Sistemas de ionización: Ionización por electrospray (ESI).....	170
• Analizadores de masas: Tiempo de vuelo (TOF), Cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF) y Cuadrupolo-tiempo de vuelo de ultra-alta resolución (UHR-Qq-TOF).....	174
○ Tiempo de vuelo (TOF)	175
○ Cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF)..	178
○ Cuadrupolo-tiempo de vuelo de ultra-alta resolución (UHR-Qq-TOF).....	180



METODOLOGÍA	187
Bloque I: <i>Rosmarinus officinalis</i>	187
1.Reactivos.....	187
2.Muestras.....	188
3.Procesos de extracción.....	192
3.1Extracción con Fluidos Supercríticos (SFE).....	192
3.2Extracción con Fluidos Presurizados (PLE).	194
3.3Extracción asistida con Microondas (MAE).....	197
4.Aislamiento y purificación de compuestos de romero mediante Cromatografía Semi-preparativa.	199
5.Análisis de extractos y fracciones de romero.	201
5.1Análisis mediante HPLC-DAD-ESI-TOF-MS.	202
5.2Análisis mediante HPLC-ESI-QTOF-MS.	208
6.Cultivos celulares.....	213
7.Ensayos de actividad antiproliferativa.	214
8.PCA.....	215
Bloque II: <i>Hibiscus sabdariffa</i>	219
1.Reactivos.....	219
2.Muestras.....	222
3.Cultivos celulares.....	227



3.1Cultivo de bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	227
3.2Cultivo de células Caco-2.....	228
3.3Cultivo de células pre-adipocíticas 3T3-L1.	229
4.Recolección de muestras de orina, suero y plasma... ..	230
5.Protocolos de tratamiento de muestras biológicas... ..	231
5.1Protocolos de tratamiento de medio de cultivo, citoplasma y membrana de células Caco-2.....	231
5.2Protocolo de tratamiento de citoplasma de células pre-adipocíticas 3T3-L1.	233
5.3Protocolos de tratamiento de suero y plasma.....	236
5.4 Protocolos de tratamiento de orina.....	237
6.Análisis de extractos y muestras biológicas.....	240
6.1Análisis mediante HPLC-DAD-ESI-TOF-MS.	240
6.2Análisis mediante HPLC-ESI-QTOF-MS.	244
6.3Análisis mediante HPLC-ESI-UHR-Qq-TOF-MS.	246
7.Determinación de capacidad antioxidante mediante el método DPPH.	250
8.Determinación de polifenoles totales, contenido en flavonoides, antocianinas, cianidina y delfinidina.	251



9.Ensayos de actividad antimicrobiana..... 254

10.Análisis estadístico. 255

RESULTADOS 261

Bloque I: *Rosmarinus officinalis*..... 261

Capítulo 1: Caracterización de compuestos fenólicos bioactivos en extractos de *Rosmarinus officinalis* obtenidos con distintos sistemas de extracción mediante RP-HPLC-DAD-ESI-TOF..... 261

Capítulo 2: Caracterización de extractos obtenidos mediante extracción asistida con microondas de hojas de *Rosmarinus officinalis* recolectadas en diferentes zonas geográficas de Serbia. 280

Capítulo 3: Aislamiento y purificación de compuestos bioactivos de romero con actividad anticancerígena frente a líneas celulares de cáncer de colon..... 309

Bloque II: *Hibiscus sabdariffa*..... 333

Capítulo 4: Caracterización de 25 extractos de *Hibiscus sabdariffa* de distintas variedades procedentes de Méjico con actividad antimicrobiana. 333

Capítulo 5: Estudio de permeabilidad de un extracto enriquecido en compuestos fenólicos de *Hibiscus*



<i>sabdariffa</i> libre y liposomado, y de distintos compuestos presentes en su composición.	359
Capítulo 6: Estudio de absorción de quercetina y quercetina-3-glucurónido en células pre-adipocíticas 3T3-L1.	379
Capítulo 7: Análisis de muestras de suero, plasma y orina tras la ingesta de un extracto enriquecido en compuestos fenólicos de <i>Hibiscus sabdariffa</i> en humanos.	389
CONCLUSIONES	413
FINAL CONCLUSIONS	423
BIBLIOGRAFÍA	431



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Papiro de Ebers (1700 a.C.)	67
Figura 2. Arbusto de <i>Rosmarinus officinalis</i> , hojas y flores....	70
Figura 3. Hibiscus sabdariffa.....	73
Figura 4. Clasificación de familias de compuestos bioactivos	76
más comunes en alimentos.....	76
Figura 5. Clasificación de las principales familias de	
compuestos fenólicos.....	79
Figura 6. Clasificación de la familia de los flavonoides	80
20 Figura 7. Bioactividad de los compuestos fenólicos (Adaptada	
de {{529 Han,X. 2007}}Han 2007	82
Figura 10. Tinción de Gram (izquierda) y esquema simplificado	
de la pared.....	94
celular (derecha) de una bacteria Gram negativa como <i>E. coli</i>	
(superior)	94
y una bacteria Gram positiva como <i>S. aureus</i> (inferior)	94
Figura 11. Enfermedades.....	97
relacionadas con la obesidad	97



Figura 12. Esquema del proceso de absorción de los compuestos	110	
fenólicos glicosados y su transformación metabólica.....	110	
Figura 13. Diagrama de los principales sistemas de extracción.	114	
Figura 14. Diagrama esquemático de un equipo de PLE.....	121	
Figura 15. Diagrama de fases de una sustancia pura.....	128	
Figura 16. Esquema básico de un equipo de SFE ({{543 Herrero, M. 2006}})	131	
Figura 17. Modos y sistemas de MAE: (A) MAE presurizado, (B) MAE atmosférico	144	21
Figura 18. Cartuchos y estación para SFE (izquierda)	149	
Figura 19. Esquema simplificado de un equipo de LC junto a uno comercial	155	
Figura 20. Diagrama de los principales sistemas de detección	164	
Figura 21. Esquema de proceso de formación del electropray.....	172	
Figura 22. Esquema detallado de las partes de un espectrómetro de masas TOF.....	176	



Figura 23. Esquema detallado de las partes de un espectrómetro de masas QTOF.....	180
Figura 24. Esquema detallado de las partes de un espectrómetro de masas.....	182
UHR-Qq-TOF, con detalle de las diferencias en el diseño respecto del QTOF.	182
Figura 25. Mapa de Serbia mostrando las diferentes zonas de recolección de los extractos del Capítulo III	190
Figura 26. Extractor SFE modelo SF 2000, Thar Technology.	193
Figura 27. Extractor de disolventes PLE modelo ASE 200, Dionex.....	194
22	
Figura 28. Equipo de cromatografía semi-preparativa Gilson GX-281.	201
Figura 29. Equipo de RRLC 1200 de Agilent y microTOF II de Bruker Daltonik.....	203
Figura 30. Equipo de UPLC Acquity Waters y microTOF Q-II de Bruker Daltonik	210
Figura 31. Mapa de Méjico con las provincias resaltadas.....	223
en donde se recolectaron los extractos del Capítulo IV.....	223
Figura 32. Equipo de UPLC Dionex Ultimate 3000 y	247



UHR-QTOF maXis de Bruker Daltonik.....247



INDICE DE TABLAS

	Tabla 1. FSC más habituales y sus constantes críticas	133
	Tabla 2. Ventajas e inconvenientes del uso de FSC.	137
	Tabla 3. Disolventes más empleados en MAE.	141
	Tabla 4. Modos de LC en función de la fase estacionaria empleada.	156
	Tabla 5. Principales diferencias de los distintos tipos de LC.	158
	Tabla 6. Bandas de absorción características de diversas familias de compuestos	167
24	Tabla 7. Sistemas de ionización y analizadores de masas más utilizados en el acoplamiento HPLC-MS	169
	Tabla 8. Codificación de los extractos de romero del Capítulo III, junto con origen geográfico, altitud y fecha de recolección. ¡Error! Marcador	
	Tabla 9. Parámetros de la fuente de ionización y de la zona de transferencia del método de ESI-TOF-MS	206
	Tabla 10. Parámetros de la fuente de ionización y de la zona de transferencia del método de ESI-QTOF-MS	212
	Tabla 11. Codificación de los extractos de HS del Capítulo IV, junto con variedad, origen geográfico e imagen de los cálices. ¡Error! Marcador	



Tabla 12. Parámetros de la fuente de ionización y de la zona detransferencia del método de ESI-TOF-MS. 242

Tabla 13. Parámetros de la fuente de ionización y de la zona detransferencia del método de ESI-QTOF-MS. 246

Tabla 14. Parámetros de la fuente de ionización y de la zona detransferencia del método ESI-UHR-Qq-TOF-MS. 249



26



Abreviaturas

Abreviaturas



ABREVIATURAS

APC: gen de la poliposis adenomatosa

APCI: ionización química a presión atmosférica

ASE: extracción acelerada con disolventes

ATCC: American Type Culture Collection

CBG: β -glucosidasa citosólica

CE: electroforesis capilar

CF-FAB: ionización por flujo continuo y bombardeo con átomos rápidos

29

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

COMT: catecol-O-metiltransferasas

DAD: detector de batería de diodos

DMEM: medio de cultivo "eagle" modificado

DMSO: dimetil sulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

ECD: detección electroquímica

EGCG: epigallocatequina galato



ABREVIATURAS

ESI: ionización por electrospray

FD: detección fluorimétrica

FDA: Food and Drug Administration

FIM: Fundación para Innovación de la Medicina

FSC: fluido supercrítico

FT-ICR: analizador de masas detransformada de Fourier-
resonancia ciclotrónica

GC: cromatografía de gases

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

30

HPHPSE: extracción con disolventes a elevadas presiones y
elevadas temperaturas

HPSE: extracción con disolventes a elevada presión

HTWE: extracción con agua a elevadas temperaturas

HWE: extracción con agua caliente

ICP: plasma acoplado inductivamente

ILSI: International Life Sciences Institute

IMIM: Instituto Municipal de Investigación Biomédica



INT: cloruro de 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)5-feniltetrazolio

IT: analizador de masas de trampa de iones

LC: cromatografía líquida

LDL: lipoproteínas de baja densidad

LLE: extracción líquido-líquido

LP: lipasa pancreática

LPH: lactasa floricin-hidrolasa

MAE: extracción asistida por microondas

MALDI: desorción/ionización asistida por una matriz

31

MIC: concentración inhibitoria mínima

MS: espectrometría de masas

MSPE: microextracción en fase sólida

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

nanoLC: nanocromatografía líquida

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCA: análisis de componentes principales

PHSE: extracción con disolventes calientes presurizados



ABREVIATURAS

PHWE: extracción con agua caliente presurizada

PLE: extracción con fluidos presurizados

Q: analizador de masas cuadrupolo

QqQ: analizador de masas triple cuadrupolo

Q-TOF: analizador de masas cuadrupolo-tiempo de vuelo

RF: radiofrecuencia

RMN: resonancia magnética nuclear

RRLC: cromatografía líquida de resolución rápida

SFC: cromatografía de fluidos supercríticos

32

SFE: extracción con fluidos supercríticos

SGLT1: transportador de glucosa dependiente de sodio

SLE: extracción sólido-líquido

SOD: superóxido dismutasa

SPE: extracción en fase sólida

SSE: extracción subcrítica con disolventes

SULT: sulfotransferasas

SWE: extracción con agua subcrítica



TEER: resistencia eléctrica transepitelial

TOF: analizador de masas de tiempo de vuelo

UGTs: uridin-5-*O*-difosfato glucuronosiltransferasas

UPLC: cromatografía líquida de ultra alta resolución

UV-Vis: ultravioleta-visible





Resumen

Resumen



RESUMEN

En esta memoria se reúnen los resultados obtenidos durante la realización de la tesis doctoral titulada “**Uso de técnicas separativas acopladas a espectrometría de masas de alta resolución para estudios metabolómicos de nutraceuticos y matrices vegetales**”, donde se evalúa el potencial de las hojas de *Rosmarinus officinalis* y de los cálices de *Hibiscus sabdariffa* como fuentes de compuestos fenólicos bioactivos para el desarrollo de nutraceuticos, así como la bioactividad que presentan. La memoria se ha dividido en dos secciones: introducción y parte experimental.

37

En la **introducción** se describen, en primer lugar, las principales características de los alimentos funcionales y los nutraceuticos, así como las diferencias que existen entre ellos. A continuación se detallan las principales características de las dos matrices vegetales bajo estudio, *Rosmarinus officinalis* e *Hibiscus sabdariffa*. Posteriormente se describen los compuestos fenólicos y el lugar que ocupan dentro de los compuestos bioactivos, su estructura, clasificación y bioactividad, prestando especial atención a su papel protector frente a cáncer, infección microbiana y obesidad. También se describen algunos ensayos *in vitro* para la evaluación de la



bioactividad de dichos compuestos y su absorción y metabolismo. Por último, se describen las diferentes etapas del procedimiento analítico para la determinación de compuestos fenólicos que se han empleado en la parte experimental: tratamiento de muestra (tanto para muestras vegetales como biológicas), separación (en especial la técnica separativa empleada en la parte experimental, LC) y detección (absorción UV-Vis, TOF-MS, QTOF-MS, UHR-Qq-TOF-MS).

38 La **parte experimental** se divide en dos secciones, metodología y resultados, ambas subdivididas en dos bloques cada una correspondientes a las matrices vegetales estudiadas, *Rosmarinus officinalis* e *Hibiscus sabdariffa*.

En la **metodología** se describen para cada bloque los reactivos y las muestras utilizadas en cada uno, así como los métodos de extracción, tratamiento de muestra, cultivos celulares y ensayos para la evaluación de la bioactividad de los compuestos fenólicos de estas matrices usados en cada caso. También se detallan las técnicas analíticas utilizadas a lo largo de los diferentes capítulos y se describen con detalle los parámetros de los métodos utilizados en la determinación de estos compuestos.



La sección **resultados** se divide en dos bloques, que a su vez constan de tres y cuatro capítulos respectivamente, correspondientes a las fuentes vegetales estudiadas, *Rosmarinus officinalis* e *Hibiscus sabdariffa*. En ambos bloques se abordan tanto la caracterización de ambas matrices, como estudios de absorción, metabolismo y bioactividad *in vitro* e *in vivo* de los compuestos fenólicos de dichas fuentes vegetales.

El **bloque I** se ha centrado en la caracterización exhaustiva de diferentes extractos de hojas de *Rosmarinus officinalis* de distinta procedencia obtenidos con diferentes sistemas de extracción, con el objetivo de encontrar extractos de variada composición ricos en compuestos bioactivos. Posteriormente se ha evaluado la actividad anticancerígena de uno de los extractos obtenidos anteriormente así como de algunos de sus compuestos aislados en líneas celulares de adenocarcinoma de colon. En el **capítulo 1**, llevado a cabo en colaboración con el Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Madrid, se emplea HPLC-DAD-ESI-TOF-MS para estudiar la composición de cinco extractos de *Rosmarinus officinalis* obtenidos mediante SFE y PLE utilizando diferentes condiciones de extracción. El uso de una



columna de pequeño tamaño de partícula que proporciona gran resolución, permitió la separación de varios isómeros. La información complementaria proporcionada por los distintos detectores, familia del compuesto indicada por los máximos de absorción, masas exactas y distribución isotópica proporcionada por el analizador TOF-MS, permiten la identificación tentativa de compuestos fenólicos de romero para los que no se dispone de patrones comerciales. Como continuación en la búsqueda de fuentes de compuestos bioactivos, en el **capítulo 2**, realizado en colaboración con la Facultad de Tecnología de Novi Sad (Serbia), se estudia la composición cualitativa y cuantitativa de quince extractos de *Rosmarinus officinalis* recolectados en diferentes zonas geográficas de Serbia. La obtención de estos extractos se realizó empleando MAE, y el análisis de los mismos mediante UPLC-ESI-QTOF-MS. La elevada exactitud de masas y distribución isotópica tanto de los espectros de masas como de masas/masas proporcionada por el analizador QTOF-MS permite la identificación de un gran número de compuestos fenólicos en los diferentes extractos, la mayoría de ellos flavonoides, diterpenos fenólicos y triterpenos tipo abietano. En el **capítulo 3**, realizado en colaboración con el Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC) de la Universidad Miguel



Hernández (Elche), se estudia el potencial bioactivo en tres líneas celulares de adenocarcinoma de colon (HT-29, SW 480 y HGUE-C-1) de un extracto de romero obtenido mediante SFE en el capítulo 1, así como de diferentes compuestos aislados del mismo mediante cromatografía semi-preparativa, en un intento de establecer qué compuestos fenólicos son los responsables de la actividad citotóxica mostrada por el extracto.

El **bloque II** se ha centrado en el estudio de la composición de distintos extractos de *Hibiscus sabdariffa*, y en la evaluación tanto de su actividad como agente antimicrobiano, como su permeabilidad intestinal y absorción en adipocitos de algunos compuestos presentes en dicho extracto. Asimismo se han realizado estudios de biodisponibilidad y excreción urinaria de un extracto de *Hibiscus sabdariffa* enriquecido en polifenoles, para los que se han puesto a punto diferentes procedimientos analíticos para la determinación de estos compuestos en muestras de suero, plasma y orina. En el **capítulo 4**, realizado en colaboración con el laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Tlajomulco (Méjico) se estudió la composición de 25 extractos de diferentes variedades de *Hibiscus sabdariffa* recolectados en las principales zonas productoras de Méjico



mediante HPLC-ESI-TOF-MS, determinándose el contenido total de compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas, así como los contenidos individuales de cianidina y delphinidina. También se evaluaron la actividad antioxidante y la actividad antimicrobiana de los extractos frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, algunos de ellos presentaron una capacidad antibacteriana similar a la que mostraron los antibióticos de amplio espectro utilizados como controles positivos. En el **capítulo 5**, realizado en colaboración con el Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC) de la Universidad Miguel Hernández (Elche), se estudió la permeabilidad en un modelo celular que simula la barrera intestinal de un extracto de *Hibiscus sabdariffa* enriquecido en polifenoles (PEHS), de su formulación liposomada y de algunos de los compuestos presentes en su composición. El análisis del extracto PEHS mediante UPLC-UHR-Qq-TOF reveló la presencia de 7 nuevos compuestos no detectados previamente en dicho extracto. En el **capítulo 6**, también realizado en colaboración con el Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC) de la Universidad Miguel Hernández (Elche), se estudió la absorción de quercetina y quercetina-3-glucurónido, dos compuestos relacionados con la composición y metabolismo del extracto PEHS, en células



pre-adipocíticas 3T3-L1, en las cuales dicho extracto había demostrado una potente actividad antiadipogénica disminuyendo la acumulación de triglicéridos. Para ello se analizó el contenido citoplasmático de estos compuestos a diferentes tiempos de incubación (0, 3, 6, 12, 18 horas) mediante HPLC-ESI-TOF, cuantificándose su contenido y el de los metabolitos encontrados. Por último, en el **capítulo 7**, realizado en colaboración con el Hospital Universitario Sant Joan de Reus, se evalúan diversos procedimientos de tratamiento de muestra y extracción para el análisis de los compuestos fenólicos del extracto PEHS en muestras de suero, plasma y orina, incluyendo la precipitación de proteínas con distintos disolventes, LLE y SPE utilizando diferentes fases sólidas. Los procedimientos desarrollados se aplican al análisis de muestras de suero, plasma y orina recolectados a diferentes tiempos de un voluntario tras la administración oral de 500 mg de PEHS.

43

Parte de los trabajos experimentales realizados en los capítulos 2, 5 y 7 se desarrollaron en diferentes estancias realizadas en el la Facultad de Tecnología de Novi Sad en Serbia (capítulo 2), y en la sede de la empresa Bruker Daltonik en Bremen, Alemania (capítulos 5 y 7).





Summary

Summary



SUMMARY

This work summarizes all the results presented in the PhD thesis entitled: “**Uso de técnicas separativas acopladas a espectrometría de masas de alta resolución para estudios metabolómicos de nutraceuticos y matrices vegetales**” (Use of separative techniques coupled to high-resolution mass spectrometry for metabolomic studies of nutraceuticals and vegetable matrices), which assesses the potential of leaves from *Rosmarinus officinalis* and *Hibiscus sabdariffa* calyces as a source of bioactive phenolic compounds for developing nutraceuticals. The current report is divided into the Introduction and the Experimental Section.

47

The **Introduction** presents noteworthy information concerning the main features of nutraceuticals and the differences between these and functional foods. Next, both plant sources under study, *Rosmarinus officinalis* and *Hibiscus sabdariffa* are described. Afterwards, phenolic compounds and their role as bioactive compounds are described (structure, classification, and healthy effects, focusing on anticancer, antimicrobial and anti-adipogenic activities) as well as their absorption, metabolism, and some *in vitro* bioactivity assays. Finally, the different stages of an analytical



SUMMARY

procedure for determining phenolic compounds used in the experimental section are described: sample treatment (for plant and biological samples), separation (especially the LC separation technique), and detection (UV-Vis spectroscopy, TOF-MS, QTOF-MS and UHR-Qq-TOF-MS).

The **Experimental Part** is divided in two sections, Methodology and Results, with two subsections each one corresponding to the plant matrices under study, i.e. rosemary and roselle.

In **Methodology**, all the reagents, samples, extraction methods, biological samples treatments, cell cultures and bioactivity assays used or applied in the subsequent studies are described for each subsection. The analytical techniques, the detection systems and the parameters of the chromatographic separation and detection systems are thoroughly described as well.

The **ResultsSection** is composed by 7 chapters, three comprising Subsection I, which is focused on the study of *Rosmarinus officinalis*, and the other four make up Subsection II, which is related to the study of *Hibiscus sabdariffa*. In these sections, the composition of these plant matrices is studied, and different studies are conducted on the absorption, metabolism and bioactivity of the phenolic compounds present in these plants.



Section I deals with the comprehensive characterization of the bioactive phenolic compounds from different extracts of *Rosmarinus officinalis* leaves obtained by various extraction systems. The aim of applying different extraction systems to the same plant matrix was to obtain separate extracts with varied compositions of bioactive compounds, and presumably different bioactivity. Then, the anticancer activity of one of these extracts and different compounds isolated by semi-preparative chromatography was assayed in different colon-cancer cell lines. In **Chapter 1**, HPLC-DAD-ESI-TOF-MS is used to study the composition of five extracts of *Rosmarinus officinalis* obtained by PLE and SFE under different extraction conditions. The use of a small-particle-size column provides high resolution, making it possible to separate several isomers. The complementary information provided by the different detectors, type of phenolic compound delimited by UV-visible spectroscopy, accurate mass measurements, and true isotopic pattern provided by TOF-MS, enabled the tentative identification of phenolic compounds from rosemary when commercial standards were not available. This work was conducted in collaboration with the Institute of Food Science Research from the Superior Council of Scientific Research (CIAL-CSIC). As a continuation of the search of bioactive phenolic



SUMMARY

compounds plant sources, in **Chapter 2**, the qualitative and quantitative composition of fifteen *Rosmarinus officinalis* extracts obtained by MAE was studied by UPLC-ESI-QTOF-MS. The rosemary leaves were collected from different geographical zones of Serbia. The high mass accuracy and true isotopic pattern in both MS and MS/MS spectra provided by a QTOF-MS analyzer enable the identification of a wide range of phenolic compounds in the extracts, including flavonoids, phenolic diterpenes and abietane triterpenoids, among others. This work was conducted in collaboration with the Faculty of Technology from the University of Novi Sad (Serbia). In **Chapter 3**, the anticancer activities of a rosemary extract obtained by SFE and different compounds isolated from this extract by semi-preparative chromatography are assayed. These studies were conducted in order to determine which phenolic compounds are responsible for the cytotoxic activity showed by the extract, in three different cell lines of colon cancer (HT-29, SW 480 and HGUE-C-1). This work was performed in collaboration with the Institute of Molecular and Cellular Biology (IBMC) of Miguel Hernández University (Alicante, Spain).

50

Section II is focused on the study of the composition of different *Hibiscus sabdariffa* extracts, and their evaluation as an antimicrobial agent. The permeability of *Hibiscus*



sabdariffa compounds and the uptake of some of them in adipocytes were studied. The different analytical procedures for the determination of phenolic compounds of this plant in biological matrices were also assessed. In **Chapter 4**, the aim was the characterization by HPLC-ESI-TOF-MS of different extracts obtained from 25 varieties of *Hibiscus sabdariffa* collected at different sites in Mexico. The total content in phenolics, flavonoids, anthocyanins, as well as the individual contents of delphinidin and cyanidin were subsequently determined. Furthermore, the antioxidant capacity and the antibacterial activity of the *Hibiscus sabdariffa* extracts were evaluated against Gram-negative bacteria (*E. coli*, *S. enteritidis*) and Gram-positive ones (*S. aureus*, *M. luteus*), demonstrating that the extracts were effective against all the bacterial strains tested, as these showed similar antibacterial capacity to broad-spectrum antibiotic, such as gentamycin. This work was performed in collaboration with the Laboratory of Molecular Biology from the Technological Institute of Tlajomulco (Mexico). **Chapter 5** evaluates the *in vitro* permeability of a phenolic-enriched *Hibiscus sabdariffa* extract (PEHS), a liposomed PEHS extract, and the individual compounds related to this matrix. The analysis of PEHS with the powerful analytical methodology UPLC-UHR-Qq-TOF-MS reveals the present of seven new



SUMMARY

52 compounds which had not previously been detected in the extract. **Chapter 6** studies the *in vitro* uptake of quercetin and quercetina-3-glucuronide in adipocytes 3T3-L1 at different incubation times (0, 3, 6, 12, 18 h) by HPLC-ESI-TOF-MS. These compounds are related to the composition and metabolism of PEHS, which showed an anti-adipogenic activity, lowering the levels of triglycerides in these cells. The studies made in Chapter 5 and 6 were performed in collaboration with the Institute of Molecular and Cellular Biology (IBMC) of Miguel Hernández University (Alicante, Spain). Finally, **Chapter 7** assesses different sample treatments and extraction procedures for the analysis of phenolic compounds from *Hibiscus sabdariffa* in serum, plasma and urine samples. The procedures tested include protein precipitation by using different solvents, LLE and SPE using several solid phases. The procedures developed are applied to the analysis of human serum, plasma and urine samples collected after the administration of the phenolic-enriched *Hibiscus sabdariffa* extract. This work was conducted in collaboration with Sant Joan University Hospital in Reus (Tarragona, Spain).

The studies in chapters 2, 5, and 7 were partially conducted during different stays in the Faculty of Technology of Novi Sad in Serbia (Chapter 2) and in the Applications



Department of the company Bruker Daltonik in Bremen,
Germany (Chapters 5 and 7).





Objetivos

Objetivos



OBJETIVOS

En los últimos años se ha despertado un creciente interés por el estudio de los compuestos fenólicos debido, fundamentalmente, a las numerosas evidencias de sus efectos beneficiosos para la salud. Es por esta demostrada bioactividad que gran parte de la investigación en el ámbito del desarrollo de nutraceuticos se ha centrado en estos compuestos, prestando especial atención a la búsqueda de fuentes vegetales ricas en compuestos fenólicos que presenten un determinado efecto biológico. Por todo ello, el objetivo global de la presente tesis doctoral es la evaluación del potencial de las hojas de *Rosmarinus officinalis* y los cálices de *Hibiscus sabdariffa* como fuente de compuestos fenólicos bioactivos para el desarrollo de nutraceuticos. Este ambicioso objetivo se puede concretar en dos actividades más específicas que se abordandurante el desarrollo de la parte experimental de esta tesis:

57

- El primer paso en la búsqueda de fuentes de compuestos bioactivos es la caracterización en profundidad de diferentes extractos de las dos matrices vegetales bajo estudio, *Rosmarinus officinalis* e *Hibiscus sabdariffa*. Para llevar a cabo esta



caracterización se emplearán diversas combinaciones de potentes plataformas analíticas. En el caso de los extractos de *Rosmarinus officinalis* obtenidos mediante PLE y SFE, y de los extractos de *Hibiscus sabdariffa* de distintas variedades procedentes de Méjico, se estudiará su composición mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a diversos sistemas de detección que proporcionan información complementaria, como es el caso de la espectroscopía UV/visible con detector de batería de diodos (DAD) y la espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (TOF-MS). En el caso de los extractos de romero obtenidos mediante MAE procedentes de distintas áreas geográficas de Serbia, se utilizará HPLC acoplada a espectrometría de masas con analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo (UPLC-ESI-QTOF-MS) para determinar la identidad de los compuestos fenólicos presentes en su composición. Finalmente, el extracto de *Hibiscus sabdariffa* enriquecido en polifenoles se caracterizará mediante HPLC acoplada a un analizador de masas de cuadrupolo-tiempo de vuelo de ultra-alta resolución (HPLC-ESI-UHR-Qq-TOF-MS).



- En la segunda etapa de la presente memoria se pretende estudiar la absorción, metabolismo, biodisponibilidad y excreción de los compuestos fenólicos caracterizados en ambas matrices vegetales, así como evaluar la capacidad anticancerígena del *Rosmarinus officinalis* y el potencial antimicrobiano del *Hibiscus sabdariffa*. En cuanto al romero, se estudiará la actividad antiproliferativa en diferentes líneas celulares de adenocarcinoma de colon de un extracto de romero obtenido en la primera etapa de la memoria así como de compuestos individuales aislados a partir de él mediante cromatografía semi-preparativa, en un intento por establecer qué compuestos fenólicos son los responsables de dicha actividad. En cuanto al *Hibiscus sabdariffa* se estudiará la actividad antimicrobiana de extractos de diferente variedad y origen geográfico. También se realizarán ensayos de permeabilidad de los compuestos fenólicos presentes en esta planta mediante UPLC-UHR-Qq-TOF utilizando un modelo celular que simula la barrera intestinal. Asimismo se estudiará la absorción y metabolismo *in vitro* de quercetina y quercetina-3-glucurónido, dos compuestos relacionados con esta matriz vegetal, en



OBJETIVOS

adipocitos utilizando HPLC-ESI-TOF. Finalmente se desarrollarán distintos procedimientos de extracción para el análisis de compuestos fenólicos de *Hibiscus sabdariffa* en muestras de suero, plasma y orina, los cuales se aplicarán al análisis de estas muestras biológicas recolectadas de un voluntario tras la administración de un extracto de esta planta.



Introducción



INTRODUCCIÓN

1. Alimentación funcional y nutraceuticos.

Aunque a lo largo de la historia siempre se ha conocido la relación existente entre los hábitos alimenticios y la salud, en los últimos años, el interés del consumidor por conseguir una alimentación saludable ha cambiado considerablemente. Factores tales como el deseo de una mejor calidad de vida, el costo sanitario como consecuencia del aumento de la esperanza de vida, sumado a un mayor y mejor conocimiento de la relación dieta-salud, han hecho que el concepto de una buena alimentación cambie sustancialmente. En el pasado tener unos hábitos alimenticios saludables era sinónimo de evitar el consumo de alimentos con un elevado contenido calórico, en grasas o en sal; sin embargo, actualmente el consumidor presta más atención a los efectos positivos o preventivos que los alimentos pueden tener en su salud gracias al contenido en compuestos funcionales que éstos presenten [1, 2]

A pesar de que los factores genéticos juegan un papel crucial en el desarrollo de ciertas patologías como cáncer,



obesidad, osteoporosis, enfermedades coronarias o artritis, éstas pueden prevenirse o minimizarse con una dieta apropiada y un estilo de vida saludable. De esta forma, la población puede mejorar su dieta mediante el consumo de alimentos formulados o fortificados con ingredientes funcionales que presenten efectos beneficiosos para la salud del individuo [3]

64 Esta tendencia de la sociedad actual se ha traducido en la aparición de una nueva gama de productos que suplen estas carencias, entre los que destacan los alimentos funcionales, nutracéuticos, complementos alimenticios, alimentos fortificados o enriquecidos, entre otros. En la actualidad no hay una definición consensuada para estos productos, aunque claramente existen ciertas similitudes entre las distintas definiciones acuñadas por diferentes expertos u organizaciones.

Japón fue pionero en introducir una definición para **alimentos funcionales** en 1991, denominados “alimentos de uso específico para la salud” o “Foods for Specific Health Use” (FOSHU)s, donde surgieron como una ayuda para reducir el coste sanitario derivado de la mermada salud de su población debido a los efectos de la II Guerra Mundial; además fue el primer país en establecer un sistema de aprobación para los



alimentos funcionales basado en resultados de investigación que evidencian los beneficios para la salud de productos concretos o de sus componentes. Posteriormente en Europa, en 1999, un grupo de expertos coordinados por el “International Life Sciences Institute” (ILSI) definieron un **alimento funcional** como “aquel alimento que contiene un componente, nutriente o no nutriente, con efecto selectivo sobre una o varias funciones del organismo, con un efecto añadido por encima de su valor nutricional y cuyos efectos positivos justifican que pueda reivindicarse su carácter funcional o incluso saludable. Dichos alimentos funcionales son considerados como alimentos, demostrando su efecto en cantidades que se encuentren de forma normal en la dieta y se consuman como parte de unos hábitos alimenticios comunes” [4]. Por tanto, un alimento funcional, además de proporcionar los nutrientes necesarios para satisfacer los requerimientos metabólicos del individuo, contiene otros componentes presentes de forma natural o procesada que pueden ejercer una serie de efectos fisiológicos beneficiosos sobre el organismo.

65

Por otra parte, el término **nutracéutico**, derivado de los conceptos nutrición y farmacéutico, fue acuñado por DeFelice y la Fundación para la Innovación de la Medicina



(FIM) en 1989, y se define como “cualquier sustancia que puede considerarse un alimento o parte de éste y que proporciona beneficios médicos o saludables, incluyendo la prevención y/o el tratamiento de enfermedades. Estos productos pueden abarcar desde nutrientes aislados, complementos alimenticios, alimentos diseñados genéticamente o alimentos funcionales, hasta productos herbales o alimentos procesados” [5].

66 Ambas definiciones son un poco ambiguas y pueden generar confusión, sin embargo el ámbito de los alimentos funcionales y el de los nutraceuticos pueden considerarse distintos tanto por la acción que poseen frente a las enfermedades como por el formato en el que se presentan. Mientras que los alimentos funcionales son utilizados para la reducción enfermedades y se presentan en forma de alimento ordinario, los nutraceuticos participan en la prevención y el tratamiento de dichas patologías y se presentan en formatos similares a los fármacos, tales como comprimidos o jarabes. La tendencia actual es diferenciar claramente ambos conceptos, considerando a los alimentos funcionales como aquellos que tienen apariencia similar a la de un alimento y se consumen como parte de una dieta normal, mientras que los nutraceuticos son productos



elaborados a partir de un alimento que se comercializan con presentaciones farmacéuticas no asociadas generalmente a los alimentos.

En cualquier caso, a pesar de las diferencias existentes entre ambos, la fase inicial en el desarrollo tanto de alimentos funcionales como de nutraceuticos es común, y se fundamenta en el conocimiento de la composición y búsqueda de compuestos bioactivos presentes en los alimentos que puedan ejercer un efecto beneficioso sobre la salud, el cual debe demostrarse en modelos *in vitro* e *in vivo*.

2. Extractos vegetales como fuente de compuestos bioactivos.

67



Figura 1. Papiro de Ebers (1700 a.C.)

Durante siglos las plantas se han utilizado en la medicina tradicional para la prevención y el tratamiento de enfermedades, ya sean consumidas como parte de la dieta o como pociones o brebajes, e incluso aplicadas en forma de cataplasmas. Este uso medicinal de las



plantas se encuentra documentado desde la antigüedad en todas las culturas, ejemplo de ello son una tablilla de arcilla sumeria datada del año 3000 a.C. o el conocido como “papiro de Ebers” fechado en el año 1700 a.C (**Figura 1**). Más recientemente, el uso medicinal de las plantas ha evolucionado hacia el aislamiento de compuestos bioactivos presentes en su composición [6].

68 Los metabolitos secundarios de las plantas representan una fuente importante de compuestos bioactivos utilizados dentro del ámbito de la investigación para el desarrollo de nuevos ingredientes funcionales en el campo de la industria alimentaria o de nuevos fármacos en la industria farmacéutica, de hecho numerosos principios activos usados actualmente son derivados directos o indirectos de las plantas [6-8]. No hay que olvidar que la fitoquímica es una de las madres de la farmacología actual y que el reino vegetal supone una fuente casi inagotable de nuevas moléculas bioactivas.

En este sentido, en la presente memoria se ha estudiado el potencial que presentan diferentes extractos de hojas de *Rosmarinus officinalis* y de cálices de *Hibiscus sabdariffa* como fuentes de compuestos bioactivos para el desarrollo de ingredientes funcionales o nutracéuticos que se



puedan emplear frente a diversas patologías como son el cáncer, la infección bacteriana o la obesidad. A continuación se describen las principales características de estas dos fuentes vegetales.

2.1 *Rosmarinus officinalis*.

Rosmarinus officinalis, (familia Lamiaceae) conocido con el nombre común de romero, es un arbusto leñoso muy ramificado, de hoja perenne, que puede llegar a medir hasta dos metros de altura.

Presenta unas hojas de color verde intenso, pequeñas y abundantes, de forma lineal. Se disponen opuestas, con los bordes hacia abajo, por el envés presentan un color blanquecino y están cubiertas de vellosidad. En la zona de unión de la hoja con el tallo nacen los ramilletes floríferos.

69

Las flores son de unos cinco milímetros de largo, con la corola bilabiada de una sola pieza, y su color es azul violeta pálido, rosa o blanco, con cáliz verde o algo rojizo, también bilabiado y acampanado. Son flores axilares, muy aromáticas y melíferas. Se localizan en la cima de las ramas y poseen dos estambres encorvados soldados a la corola con un pequeño diente. El fruto, encerrado en el fondo del cáliz, está formado



por cuatro pequeñas nuececitas trasovadas, en tetraquenio, de color pardusco (**Figura 2**).



70

Figura 2. Arbusto de *Rosmarinus officinalis*, hojas y flores

El hábitat natural de esta especie es la cuenca mediterránea (sur de Europa y norte de África), pudiéndose encontrar incluso en Asia Menor y Sudamérica. En España se halla en la mayor parte de Cataluña, Castilla La Mancha, Castilla León, La Rioja, Madrid, Murcia, Extremadura, en las zonas montañosas de la Comunidad Valenciana, Andalucía e Islas Baleares, siendo muy poco frecuente en puntos del norte o noroeste de la península con clima más frío y lluvioso.



Esta planta es una de las fuentes de compuestos bioactivos naturales más apreciada desde la antigüedad, de él se utilizan sobre todo sus hojas y a veces sus flores, ya que presentan un gran número de actividades farmacológicas. Entre las más destacadas se encuentran su actividad hepatoprotectora [9], antimicrobiana [10, 11], antitrombótica [12], diurética [13], antidiabética [14], antidepresiva [15], analgésica [16], antiinflamatoria [17], antioxidante [18] y anticancerígena [19-24].

La mayoría de estas actividades, en especial las actividades antioxidante y anticancerígena, se atribuyen a la presencia de compuestos fenólicos o polifenoles, fundamentalmente a la presencia de diterpenos fenólicos tipo abietano como el ácido carnósico, carnosol, rosmadial, rosmanol y otros productos derivados de la degradación de éstos; así como a la presencia de ácidos fenólicos como el ácido rosmarínico y flavonoides como la apigenina, genkwanina, cirsimaritina, scutelareína y homoplantagenina [24-26].

Existen múltiples razones que pueden explicar el interés por el romero, una planta que tradicionalmente ha sido muy utilizada como especie culinaria y cuyo uso como conservante alimentario se ha extendido ampliamente gracias



a su actividad antioxidante y antimicrobiana [27]. Por otro lado, su uso se ha extendido al sector cosmético, donde por sus propiedades antioxidantes se añade a los productos para prevenir el daño oxidativo producido por los radicales libres y la radiación UV [28].

En la presente memoria centramos nuestro interés en su actividad anticancerígena, ya que existen evidencias de que varios compuestos fenólicos presentes en el romero inhiben significativamente la iniciación y promoción de diferentes tipos de cáncer, razón por la cual se ha seleccionado esta matriz como objeto de estudio [19-21, 23, 29].

72

2.2 *Hibiscus sabdariffa*.

Hibiscus sabdariffa (Familia Malvaceae) comúnmente conocida como flor de Jamaica, rosella y en árabe como karkade, es una planta que crece y se desarrolla en las zonas tropicales y subtropicales, mayoritariamente en África central y occidental, en el sur y este de Asia y en América del sur. Morfológicamente es una planta herbácea con crecimiento arbustivo anual o bienal (**Figura 3**).

Presenta unos tallos de color rojo o verde con hojas alternas y simples en el tallo, o tri y pentalobuladas en las



ramas. Sus flores son axilares con pedúnculos largos articulados cerca de la base, y su cáliz es acampanado, con cinco pétalos, de tonos rosados, rojos o morados [27].

Tradicionalmente esta planta se ha consumido mundialmente como infusión o como bebida refrescante. Gracias a que apenas contiene sustancias excitantes en su



Figura 3. Hibiscus sabdariffa

composición, a diferencia de otros tés, su ingesta es muy recomendable en todo tipo de personas. Asimismo esta planta también es consumida como alimento, concretamente los

cáliz y las semillas se ingieren como acompañamiento en comidas por su alto contenido en proteínas, lípidos, vitaminas y minerales. A nivel industrial se comercializan extractos de esta planta para la preparación de bebidas instantáneas o infusiones, siropes, gelatinas y mermeladas, así como para su uso como colorante natural. También posee aplicaciones en el ámbito de la alimentación animal, nutracéuticos, cosmecéuticos y aplicaciones farmacéuticas [30-32].



Asimismo, esta planta se ha utilizado por las diferentes actividades que presenta frente a diversas patologías, entre las más destacadas se encuentran su uso en el tratamiento de la hipertensión [33-35], enfermedades hepáticas [23, 36-39], por su actividad neuroprotectora [40, 41], antiinflamatoria [42-44], anticancerígena [45, 46], antioxidante [40, 47-50], o antimicrobiana [51-54]. Recientemente, ha adquirido relevancia su acción cardioprotectora, gracias a su actividad antihipertensiva, hipolipemiante, hipocolesterolémica, y a su eficacia en la inhibición de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) [44, 55-62].

74

En cuanto a su composición química, esta planta presenta una gran variedad de compuestos, como son proteínas, grasas, hidratos de carbono, minerales, vitaminas, así como otros compuestos menos polares como son los esteroides (β -sitosterol, ergosterol, campesterol) presentes fundamentalmente en sus semillas. Sin embargo, son los compuestos fenólicos que posee los que han recibido especial atención debido a los ya conocidos efectos beneficiosos para la salud que éstos presentan. Los compuestos fenólicos encontrados en esta planta son muy variados, se encuentran ácidos orgánicos y fenólicos como el ácido cítrico, ácido hibiscico o protocatecuico; flavonoides tales como la



quercetina, luteolina y sus respectivos glicósidos; así como antocianinas, entre las que destacan la cianidina-3-O-glucósido, cianidina-3-O-sambubiósido, o delphinidina-3-O-sambubiósido, responsables del color rojo intenso de los cálices de la planta.

3. Compuestos fenólicos como compuestos bioactivos.

Los **compuestos bioactivos** pueden definirse como aquel conjunto de sustancias naturales que ejercen una actividad biológica que conduce a efectos metabólicos asociados con propiedades beneficiosas sobre la salud, como pueden ser la mejora de ciertas funciones en el organismo o la reducción del riesgo de padecer alguna enfermedad. Se consideran compuestos bioactivos una amplia variedad de sustancias con diferentes estructuras y actividades biológicas, los principales se recogen en la **Figura 4**.

75

Como puede observarse en la figura, los compuestos fenólicos son una de las familias que se engloban dentro de los compuestos bioactivos y cuyo estudio ha despertado recientemente un creciente interés por la comunidad científica. Este hecho es derivado de su amplia diversidad, tanto estructuralmente como en lo referente a las actividades



biológicas que presentan [63, 64]. Es por esto, que en la presente memoria se ha dedicado un apartado especial a estos compuestos.



76

Figura 4. Clasificación de familias de compuestos bioactivos más comunes en alimentos

3.1 Estructura, biosíntesis y clasificación de los compuestos fenólicos.

Dentro de la amplia variedad de sustancias que sintetizan las plantas se encuentra un conjunto de compuestos de bajo peso molecular conocidos como metabolitos secundarios, sustancias que no son esenciales para la supervivencia de la planta en su conjunto o de alguna de sus partes, pero que ejercen una serie de funciones importantes dentro de ésta.



Los compuestos fenólicos, conocidos también como polifenoles, conforman uno de los principales grupos de metabolitos secundarios de las plantas. Estos compuestos exhiben una gran diversidad de funciones y estructuras químicas, pero la mayoría presentan un esqueleto básico común conformado por un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo. De hecho constituyen uno de los grupos de sustancias más numeroso y ampliamente distribuido en el reino vegetal, con más de 8000 estructuras fenólicas conocidas actualmente [65].

Sintéticamente son derivados de dos principales rutas metabólicas: la ruta del ácido shikímico y la ruta del acetato. Son sintetizados por las plantas durante su desarrollo normal y cumplen una serie de funciones muy variadas, entre las que destacan su acción como atrayentes para la polinización o como fitoalexinas, sustancias generadas por las plantas en respuesta a ataques microbianos. También actúan en los mecanismos de protección frente a la radiación UV, en los procesos de crecimiento y reproducción, proporcionando protección contra patógenos y depredadores, y contribuyen además a la pigmentación de la planta, entre otras acciones. Como consecuencia de algunas de sus funciones, el contenido de estos compuestos puede incrementarse bajo ciertas



condiciones de estrés, como por ejemplo debido a una infección por patógenos o parásitos, por exposición a altas temperaturas, estrés hídrico, contaminación atmosférica o radiación UV. Además, otros factores como el tipo y técnicas de cultivo, condiciones de crecimiento, proceso de maduración, así como condiciones de procesado y almacenamiento pueden afectar el nivel de estos compuestos en las plantas o en sus productos derivados como frutas o zumos.

Los compuestos fenólicos se pueden clasificar en base a su estructura química en diferentes familias, las principales se muestran en la **Figura 5** junto con su esqueleto básico:



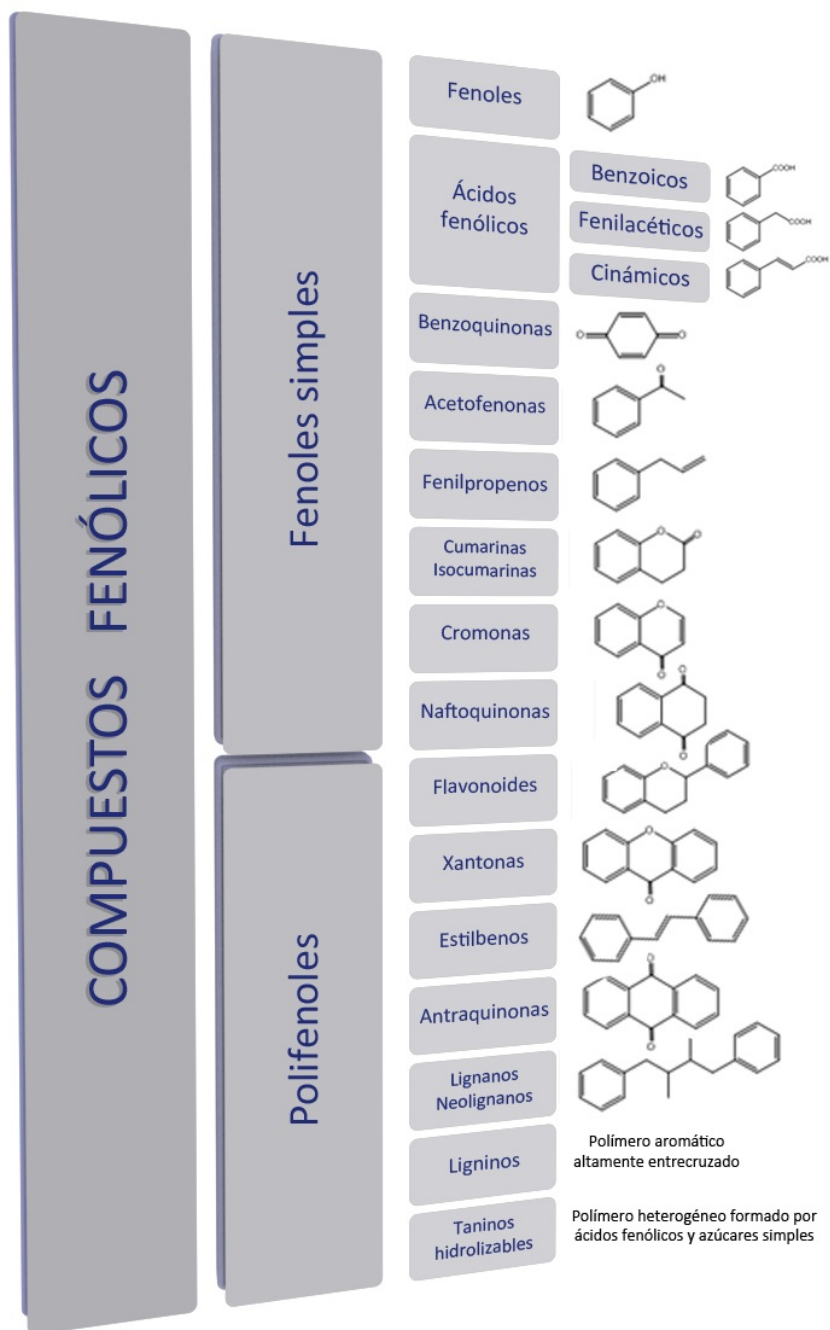


Figura 5. Clasificación de las principales familias de compuestos fenólicos



Los flavonoides merecen una atención especial por ser la familia de polifenoles más importante y ampliamente distribuida en la naturaleza, a su vez pueden subdividirse en distintas subclases que se recogen en la **Figura 6**.

80

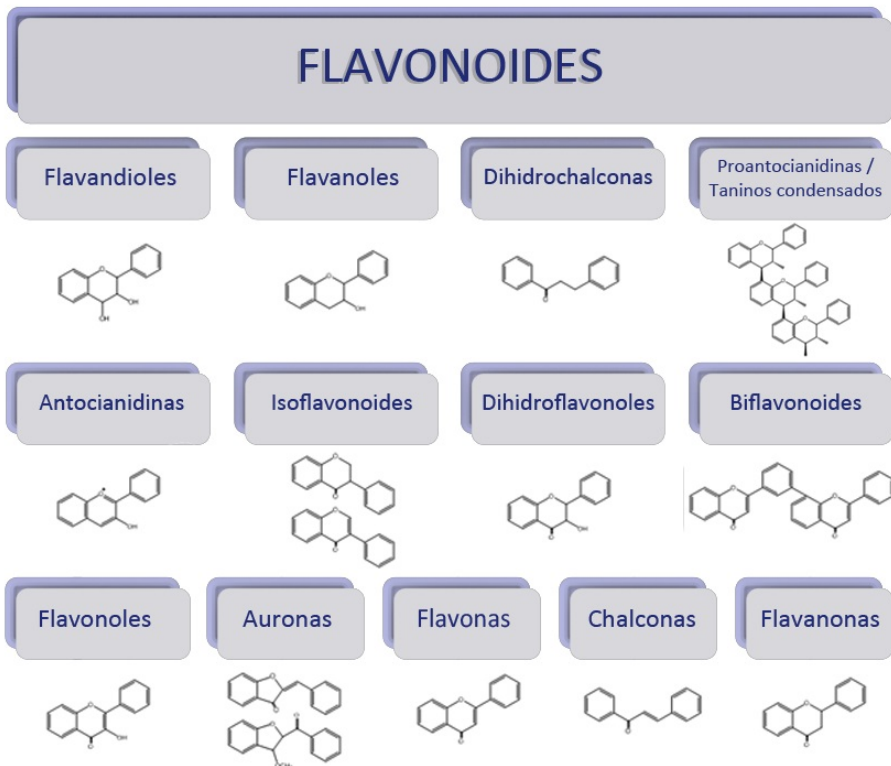


Figura 6. Clasificación de la familia de los flavonoides



3.2 Bioactividad de los compuestos fenólicos.

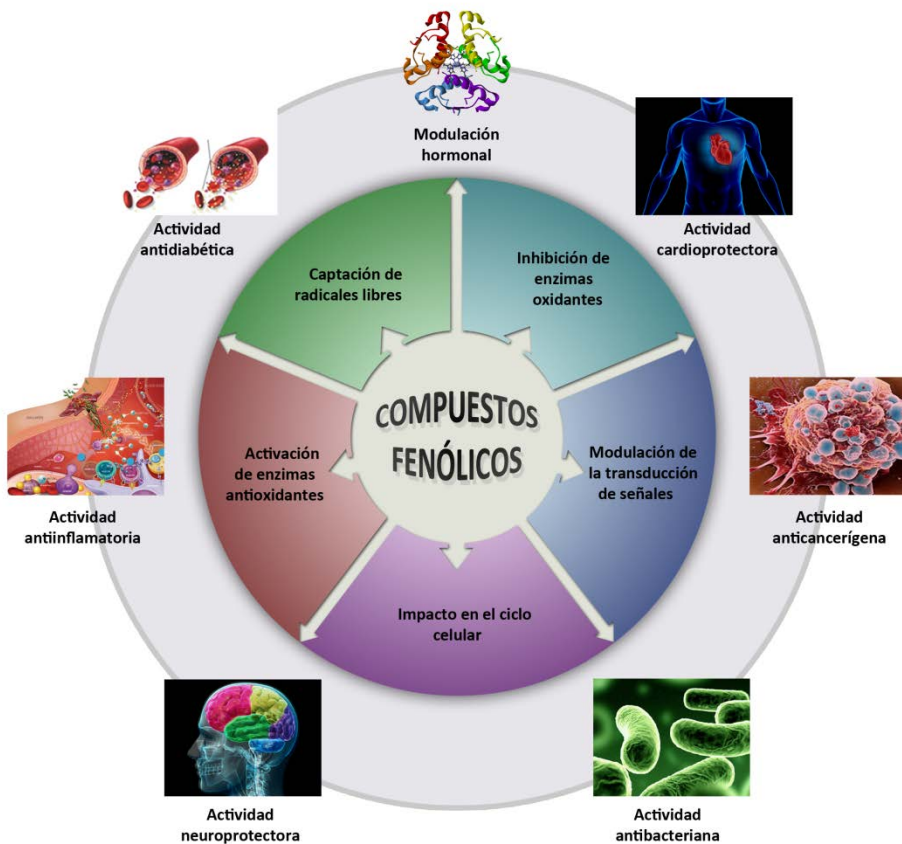
En los últimos años el estudio de compuestos bioactivos o fitoquímicos procedentes de las plantas que posean efectos beneficiosos sobre la salud ha sido una de las actividades destacadas orientadas al desarrollo de alimentos funcionales, nutraceuticos y fármacos. En este sentido, el estudio de los compuestos fenólicos ha ocupado un lugar destacado debido a la evidencia científica derivada del gran número de estudios epidemiológicos que relacionan un consumo elevado de alimentos ricos en compuestos fenólicos con una menor incidencia de diversas patologías [64, 66-68], como enfermedades cardiovasculares [69-71], neurodegenerativas [72-75], cáncer [76-78], obesidad [79], o diabetes [80].

81

En el intento de establecer el mecanismo mediante el cual los compuestos fenólicos ejercen sus efectos beneficiosos sobre la salud, se han llevado a cabo numerosos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* que han aclarado ciertos aspectos. Sin embargo, el mecanismo de acción de estos compuestos en el caso de algunas patologías sigue siendo desconocido y es objeto de estudio de numerosos grupos de investigación en todo el mundo. En la **Figura 7** se muestran



los principales efectos saludables descritos para los compuestos fenólicos.



82

Figura 7. Bioactividad de los compuestos fenólicos (Adaptada de Han 2007)

En el caso de los compuestos fenólicos presentes en las matrices vegetales objeto de estudio de esta memoria, *Rosmarinus officinalis* e *Hibiscus sabdariffa*, éstos han demostrado poseer unas actividades biológicas destacables frente al cáncer en el caso del romero, y frente a infecciones



microbianas y a obesidad en el caso del hibiscus. Es por ello, por lo que vamos a detallar aspectos particulares de estas patologías y cómo actúan los polifenoles sobre ellas.

3.2.1 Cáncer

Las células que forman un organismo sano se dividen de forma regular con la finalidad de reemplazar a aquellas que ya están envejecidas o muertas, de manera que se garantiza el correcto funcionamiento y la integridad del organismo. El ciclo celular se define como el intervalo entre cada división celular, comprende cuatro fases estrictamente reguladas denominadas fase G1, S, G2 y M. En la fase S (de síntesis) el material genético se duplica, en la fase M (mitosis/meiosis) la célula se divide, y entre ambas fases se encuentran las fases G1 y G2 en las que la célula se detiene para crecer lo necesario antes de continuar la división (**Figura 8**). Existe una fase denominada G0 en la cual las células están en un estado quiescente sin dividirse. Los factores que regulan la salida de G0 y entrada en G1 son cruciales para determinar la frecuencia del crecimiento [81].

83

Entre cada una de las fases del ciclo celular se encuentran puntos de control para asegurar la correcta duplicación del ADN y la corrección de errores que se hayan



podido producir durante su replicación. Se necesita de la acción de proteínas específicas para que la célula pueda superar esos puntos de control y asegurar una correcta división celular. Estas proteínas actúan como “centinelas”, deteniendo el ciclo celular en G1/S ó G2/M ante un daño en el ADN y activando enzimas reparadoras del mismo. Si el daño en el ADN es reparado, estas proteínas permiten a la célula continuar con un ciclo celular normal; en caso contrario, se pone en marcha una serie de procesos de autodestrucción para evitar que el daño celular se herede de la célula madre a las descendientes, y la célula entra en apoptosis y muere [82, 83].

84

El término cáncer engloba un conjunto de enfermedades asociadas a una perturbación en el control del metabolismo y del ciclo celular, cuya característica común es la proliferación autónoma de células neoplásicas que poseen ciertas alteraciones, como mutaciones o inestabilidad genética. Estas alteraciones genéticas y epigenéticas permiten a las células sobrevivir, replicarse y evadir los mecanismos reguladores de apoptosis, proliferación y ciclo celular [84].

Según la OMS el cáncer, considerado una enfermedad severa, es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, y se prevé que siga aumentando en los próximos



años. Los tipos de cáncer que causan mayor tasa de mortalidad son el de pulmón, estómago, hígado, colon y mama.

En la sociedad actual el manejo clínico del cáncer continúa siendo uno de los principales problemas de salud pública. Hoy día, existen numerosos tipos fármacos antitumorales disponibles para el tratamiento del cáncer, entre los que destacan: agentes antimetabolitos, antibióticos citotóxicos, agentes alquilantes, alcaloides de plantas y otros productos naturales, sales de platino, hormonas y antagonistas hormonales, inhibidores enzimáticos, y modificadores de la respuestas biológica, entre otros [85, 86]. Sin embargo, a pesar del gran número de agentes quimioterápicos disponibles, la inespecificidad de acción de los mismos, unido a la gran toxicidad que presentan y al frecuente desarrollo de resistencias por parte de las células cancerosas, desembocan en el frecuente fracaso del tratamiento de esta patología.

85

Es por esta razón por lo que la búsqueda de nuevos fármacos antitumorales así como las campañas de prevención y detección precoz de la enfermedad, han adquirido relevancia en los últimos años. La nutrición es una de las áreas de máxima prioridad en la investigación del cáncer y su



prevención, lo que ha llevado a los organismos correspondientes a promover estudios epidemiológicos a gran escala sobre nutrición y cáncer. Dichos estudios han puesto de manifiesto la existencia de una correlación inversa entre dietas ricas en frutas y vegetales y la incidencia de diversos tipos de cáncer [66, 87].

86 Dadas las evidencias epidemiológicas que apuntan a esta correlación inversa, parte de los esfuerzos en investigación se han dirigido a la identificación de compuestos bioactivos de origen vegetal con propiedades anticarcinogénicas. Dentro de la amplia variedad de agentes quimiopreventivos se encuentran los compuestos fenólicos, los cuales a día de hoy son objeto de estudio de numerosos grupos de investigación.

Estos compuestos fenólicos han demostrado a nivel celular que intervienen en el proceso de carcinogénesis y desarrollo tumoral mediante diversos mecanismos de acción [88]. Estos compuestos pueden por un lado interaccionar con intermediarios reactivos, [89] o carcinógenos y mutágenos activados [90], y por otro pueden modular la actividad de proteínas clave para el ciclo celular [91] e influir en la expresión de genes asociados a la carcinogénesis, inhibiendo



genes precursores de tumores o activando genes supresores de tumores [92].

Numerosos estudios in vitro con diversas líneas celulares han puesto de manifiesto las propiedades anticancerígenas de diversos compuestos fenólicos. Este es el caso de los flavonoides del té verde [93, 94], y en especial el flavonol epigallocatequina galato, que induce apoptosis e inhibe el crecimiento de células cancerosas mediante la alteración de la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular y la actividad de proteínas de señalización implicadas en la proliferación celular, transformación y metástasis [95]. También los compuestos fenólicos del aceite de oliva y las hojas de olivo, principalmente alcoholes fenólicos, lignanos y secoiridoides, han mostrado actividad anticancerígena frente a diversas líneas celulares, principalmente de cáncer de mama [96-99], adenocarcinoma de colon [100] y leucemia [101, 102].

87

Los efectos anticancerígenos de los compuestos fenólicos también están documentados in vivo en estudios con animales en los que tras el tratamiento con un agente cancerígeno o la implantación de una línea celular humana se administran compuestos fenólicos. En su mayoría estos estudios han mostrado un efecto protector de estos



compuestos, induciendo una reducción del número o tamaño de los tumores inducidos. Estos efectos se han demostrado ensayando distintos compuestos fenólicos pertenecientes a diferentes familias, como flavonoides, flavanonas, lignanos, isoflavonas y catequinas entre otros, en líneas de diversos tipos de cáncer, como el de pulmón, mama, colon, hígado, estómago, boca, duodeno o piel [103, 104].

88 En humanos las propiedades anticancerígenas de los compuestos fenólicos también se han puesto de manifiesto. En estudios de intervención se ha observado que el consumo de té verde, con gran cantidad de flavonoides, reduce significativamente el riesgo de padecer diversos tipos de cáncer [105], entre ellos el de mama [106], colon [107], vejiga [108] o tracto biliar [93]. También el consumo de café también se ha asociado con un menor riesgo de cáncer de colon [109].

Especial atención merece el cáncer de colon o colorectal, objeto de estudio de esta memoria. Este tipo de cáncer es el segundo en cuanto a número de muertes que causa, en nuestro país se producen 11.000 nuevos casos al año, y la mortalidad es de 10 muertes por cada 100.000 habitantes [110]. En los nuevos casos, entre un 22-36 % la enfermedad se encuentra en un estado avanzado para el que



el índice de supervivencia es prácticamente nulo. En la **Figura 9** se muestran la evolución del adenocarcinoma rectal y sus distintos estadios.

Este cáncer puede presentarse de manera esporádica, lo que representa un 70 % de los nuevos casos, pero también puede ser hereditario (con una incidencia menor del 10 %) y familiar (con hasta un 25 % de los nuevos casos). Algunos de los factores de riesgo para la aparición del cáncer de colon son la existencia previa de ciertas patologías como poliposis adenomatosa, síndrome de Lynch, o enfermedades inflamatorias del colon (como la colitis ulcerosa o enfermedad de Chron), y por último la dieta, que tiene también gran influencia [111].

89

En la aparición del cáncer de colon intervienen mutaciones en varios genes [112, 113]. En los casos hereditarios, se encuentra como responsable una mutación en el gen APC [114, 115], que da lugar a una poliposis adenomatosa familiar y posteriormente al desarrollo del cáncer de colon. En otros casos hereditarios no aparece poliposis, pero se encuentran mutados genes reparadores como el MSH2 y el MLH1 [114]. Otro gen frecuentemente mutado es el oncogén K-ras [116, 117], con lo que se estimula el crecimiento de las células tumorales. En muchos casos



también se ha visto mutado el gen supresor de tumores que codifica la proteína p53 [118, 119].

Los estudios sobre la influencia de los compuestos fenólicos en el cáncer de colon están adquiriendo cierta relevancia en los últimos años. Actualmente se han estudiado compuestos fenólicos individuales, como la quercetina, el ácido elágico o el ácido clorogénico o matrices vegetales, como por ejemplo el té verde o el aceite de oliva para combatir este tipo de cáncer [120-124].

90 En este sentido cabe destacar la importancia del romero, una de las matrices estudiadas en esta memoria, en la prevención y tratamiento del cáncer. Ya en la década de los 90 el grupo de alimentación Nestlé publicó diversos estudios que apuntaban la capacidad quimiopreventiva de los compuestos de romero en diferentes líneas celulares, y tenían como objetivo desarrollar sistemas modelo in vitro adecuados para el estudio a nivel celular y molecular de los mecanismos quimiopreventivos y toxicológicos de estos compuestos naturales. [125, 126]. Paralelamente otros estudios demostraron la capacidad de los compuestos de romero de inhibir la iniciación y promoción de tumores cutáneos inducidos en ratones, o la actividad antitumoral frente al cáncer de mama en ratas [29, 127]. Los datos derivados de



estos estudios apuntan a varios mecanismos moleculares quimiopreventivos de los compuestos de romero. Por un lado la capacidad antioxidante de estos compuestos evita la formación de aductos en el ADN. Sin embargo por otro lado, diversas evidencias apuntan a que los efectos mostrados van más allá de su potente actividad antioxidante, pudiendo actuar sobre la expresión y/o actividad de enzimas detoxificadoras hepáticas de fase I (las cuales pueden provocar la activación metabólica de sustancias procarcinógenas y su transformación en carcinógenos finales) y de fase II (las cuales pueden inhibir el proceso de activación de procarcinógenos producido por las enzimas de fase I) [128, 129]. Esto también se ha corroborado en estudios más recientes sobre el efecto de compuestos del romero en líneas de leucemia y cáncer de colon, donde se han realizado un estudio transcriptómico con ayuda de microarrays y un estudio metabolómico mediante CE/UPLC-TOF-MS. En ellos se puso de manifiesto por una parte, diferencias transcripcionales que mostraban la activación de genes que codifican las enzimas antioxidantes y detoxificadores de fase II, y por otra diferencias en los perfiles metabólicos, ambos indicios de que los polifenoles de romero poseen un efecto quimiopreventivo sobre distintas líneas celulares [130, 131].



3.2.2 Infección microbiana.

Una infección se define como la colonización de un organismo huésped por especies patógenas, viéndose afectadas el correcto funcionamiento y supervivencia del huésped. Este proceso de infección puede ser localizado, cuando sólo se ve afectado parte del organismo huésped, o generalizada si esta infección está extendida por todo el huésped.

92 Hay multitud de factores que afectan la aparición y desarrollo de una infección, las principales son la vía de entrada del organismo patógeno, la carga bacteriana, el período de incubación, la virulencia, toxicidad y poder invasivo del patógeno, así como el estado inmune del huésped. Cuando se produce el proceso infeccioso, los patógenos comienzan a reproducirse rápidamente en el organismo huésped, excretando toxinas que dañan los tejidos, lo que provoca la afluencia de neutrófilos o glóbulos blancos que fagocitarán a estos microorganismos agresores, lo que desencadena una respuesta inflamatoria asociada a la infección.

Las bacterias pueden dividirse en dos grandes grupos dependiendo de su envuelta celular, al responder de manera positiva o negativa a la tinción de Gram. Pueden encontrarse



bacterias Gram positivas, cuando se tiñen de azul en la tinción de Gram, gracias a la presencia de una única membrana lipídica y una gruesa pared de peptidoglicanos, como es el caso de *Staphylococcus aureus*; o bacterias Gram negativas, como *Escherichia coli*, las cuales no se tiñen de azul en la tinción de Gram debido a la presencia de una membrana lipídica externa recubierta de polisacáridos que rodea a una membrana lipídica interna, existiendo entre ambas una fina pared de peptidoglicanos (**Figura 10**).

En la actualidad existen una gran variedad de tratamientos para erradicar los microorganismos patógenos que afectan a los humanos. Sin embargo, estos tratamientos fracasan en muchas ocasiones debido a la resistencia a los fármacos que son capaces de desarrollar estos patógenos causados en parte por el uso indiscriminado que se realiza de estos agentes antimicrobianos. Por esta razón existe una urgente necesidad de desarrollar nuevas sustancias que posean gran actividad antimicrobiana para el desarrollo de nuevos tratamientos. [132].



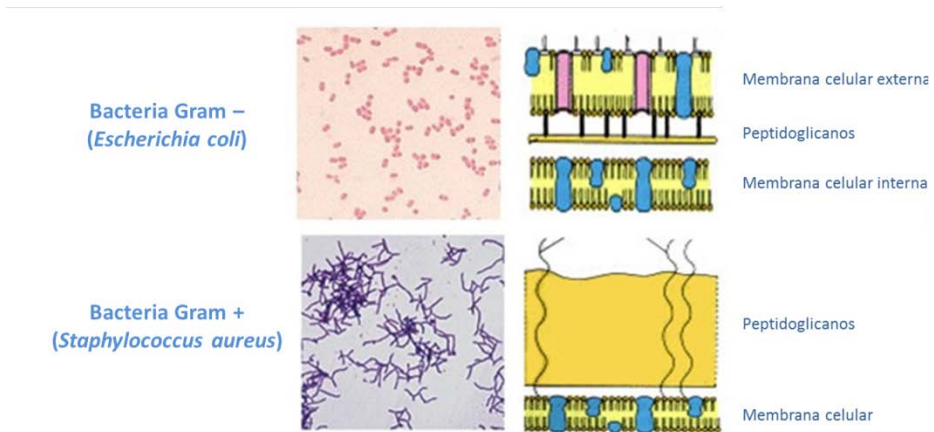


Figura 10. Tinción de Gram (izquierda) y esquema simplificado de la pared celular (derecha) de una bacteria Gram negativa como *E. coli* (superior) y una bacteria Gram positiva como *S. aureus* (inferior)

94

Es de especial interés estudiar el potencial antibacteriano de distintas matrices vegetales que ayuden a combatir o frenar estas infecciones, con el objetivo de desarrollar nuevos tratamientos que usen los componentes activos de estas plantas solos o combinados con los tratamientos típicos basados en antibióticos. Numerosos estudios se han llevado a cabo para tal fin ensayando multitud de matrices vegetales ricas en compuestos fenólicos [133-136]. Las conclusiones derivadas de estos estudios ponen de manifiesto que los compuestos fenólicos que poseen un grupo galoil en su estructura, como es el caso de la epigallocatequina galato, manifiestan una potente actividad



antimicrobiana. Por otro lado, la actividad antibacteriana de los compuestos fenólicos ha sido también relacionada con su polaridad, ya que cuanto mayor sea su hidrofobicidad más fácilmente penetran en el interior celular a través de la membrana. También se ha puesto de manifiesto una tendencia general de la actividad antibacteriana de los compuestos fenólicos, por lo general su efecto antimicrobiano es superior frente a bacterias gram positivas, ya que las bacterias gram negativas dificultan la permeabilización de los polifenoles al poseer una capa de lipopolisacáridos que recubren su membrana lipídica externa.

En el caso del *Hibiscus sabdariffa*, matriz vegetal para la cual hemos estudiado su actividad antimicrobiana, se ha visto cierta relación entre algunos compuestos fenólicos presentes en su composición y su actividad antimicrobiana. En este sentido la quercetina, ha mostrado ser un potente agente antimicrobiano, mostrando efectos sinérgicos con eritromicina frente *Propionibacterium acnes* [137]. Otros compuestos presentes en esta matriz, como el ácido protocatecuico ha mostrado una potente actividad frente a *Enterobacter cloacae* y *Helicobacter pylori* [138], también ha sido descrita la actividad antimicrobiana del ácido clorogénico en literatura.



3.2.3 Obesidad.

La obesidad se define como una enfermedad crónica multifactorial caracterizada por un aumento de masa grasa, y por lo tanto también de peso corporal, como consecuencia de un balance energético positivo mantenido en el tiempo. [139]. El incremento de peso supone normalmente un aumento de las reservas del organismo en forma de grasa dentro de las células del tejido adiposo, produciéndose como consecuencia un aumento del número de adipocitos (hiperplasia) y del tamaño de los mismos (hipertrofia).

96 La obesidad se considera una de las alteraciones metabólicas de mayor repercusión desde el punto de vista sanitario, económico, social e incluso psicológico del enfermo [140]. Esta enfermedad tiene un origen multifactorial, abarcando, entre otros, factores genéticos, neuroendocrinos, dieta, sedentarismo, y el uso de algunos fármacos (antidepresivos, anticonceptivos o glucocorticoides).

Actualmente este trastorno se define como pandemia, con creciente prevalencia, y supone una grave amenaza para la salud pública debido al riesgo de desarrollar enfermedades asociadas como la diabetes, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, alteraciones inflamatorias, aumento del



riesgo de padecer cáncer, insuficiencia respiratoria y osteoartritis, entre otras (**Figura 11**).

Se han llevado a cabo numerosos estudios utilizando extractos vegetales y compuestos fenólicos purificados con el objetivo de prevenir o disminuir la obesidad. Cabe destacar los que usaron flavonoides extraídos del té, mayoritariamente catequinas como la epigallocatequina galato (EGCG), quedemostraron que diversos extractos de hojas de té poseen una importante actividad hipolipemiante en ratas [141]. También se ha observado que la administración

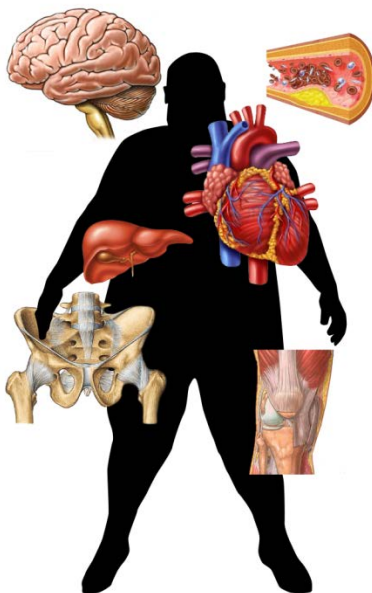


Figura 11. Enfermedades relacionadas con la obesidad

intraperitoneal de EGCG provocó una disminución de peso corporal en ratones alimentados con una dieta rica en grasa [142], e inhibió la proliferación de forma dosis-dependiente en adipocitos 3T3-L1 [143]. En resumen, los mecanismos moleculares encontrados muestran que los compuestos fenólicos del té ayudan a prevenir la obesidad modulando la absorción de



glucosa en el tejido adiposo y en el músculo esquelético, además de suprimir la expresión de factores de transcripción relacionados con la adipogénesis [144].

Muchos otros polifenoles como flavanoles, taninos y chalconas inhiben la lipasa pancreática (LP) [145-147], clave en la digestión de los triglicéridos al ser la responsable de la hidrólisis del 50-70 % de las grasas ingeridas cuando es secretada en el duodeno [145]. También se ha observado que las proantocianidinas bloquean la absorción de lípidos procedentes de la dieta disminuyendo así la concentración de triglicéridos en plasma [148], e inhiben enzimas digestivos como la amilasa, lipasa y tripsina [149]. Otros compuestos fenólicos con demostrada bioactividad frente a la obesidad son los polifenoles presentes en la uva [150-152], las catequinas del té verde [153], la curcumina [154, 155], y la quercetina [151]. En el caso del *Hibiscus sabdariffa*, se ha observado que extractos de esta planta inhiben la oxidación de las LDL, y disminuyen la concentración sérica de triglicéridos, colesterol y LDL-colesterol en modelos animales [156, 157].



3.3 Ensayos *in vitro* para la evaluación de bioactividad.

Para la evaluación de la bioactividad de un extracto vegetal o de sus componentes se necesita estudiar su eficacia y mecanismo de acción en las diferentes patologías que se pretende abordar. Para ello es necesario el uso de diferentes ensayos *in vitro* e *in vivo* que nos acerquen a comprender cómo actuarán frente a una patología en el organismo. Por un lado, los ensayos *in vitro* se definen como aquellos que se realizan fuera de un sistema vivo y en un ambiente controlado. Por el contrario, los ensayos *in vivo* son los que se realizan en organismos vivos, como su propio nombre indica.

99

Ambos tipos de ensayos tienen sus ventajas e inconvenientes, dado que en la presente memoria sólo se utilizan ensayos *in vitro* nos centramos en las ventajas e inconvenientes que estos presentan frente a los ensayos *in vivo*. Las principales ventajas se detallan a continuación:

- *Ámbito ético y moral*: la experimentación animal suscita en la sociedad cierta animadversión por lo que ello supone, y es por esto que este punto tal vez sea la mayor ventaja frente a los ensayos *in vivo*.



- *Ámbito legal:* según se recoge en el Directiva del Consejo 86/609/CEE y en el Real Decreto 1201/2005, “no deberá realizarse un experimento con animales si se dispone de otro método científicamente satisfactorio y contrastado que permita obtener las mismas conclusiones sin implicar la utilización de animales.”
- *Ámbito económico:* el uso y mantenimiento de los animales de experimentación conlleva un coste mucho más elevado que el de los ensayos *in vitro*.
- *Ámbito científico:* los ensayos *in vitro* permiten una gran versatilidad en el diseño experimental y la realización de un número elevado de réplicas, su monitorización y automatización, obteniendo así resultados de forma rápida y fiable. Esto es más difícil cuando se utilizan animales de experimentación, ya que la variabilidad biológica existente entre ellos hace que los resultados no siempre sean totalmente reproducibles, además de que se necesita de



personal muy cualificado para planificar y llevar a cabo los experimentos.

Por el contrario los principales inconvenientes de los ensayos *in vitro* estriban en una necesidad de validación de los métodos y la imposibilidad en muchas ocasiones de extrapolar los resultados, ya que no se tiene en cuenta el organismo al completo y no se pueden estudiar por tanto patologías paralelas, reacciones adversas y otras complicaciones que a menudo pueden desarrollarse en un organismo vivo. Además en el caso de nuevos compuestos bioactivos el estudio de la dosis y posología, la cinética de absorción y metabolismo, o las incompatibilidades y efectos secundarios sólo pueden estudiarse en animales de experimentación. También son necesarios los animales de experimentación en otro tipo de estudios, como en los realizados para establecer la eficacia de vacunas, estudiar las respuestas conductuales a psicofármacos, a implantes, o para producir anticuerpos mono y policlonales, entre otros.

101

3.3.1 Determinación de la capacidad anticancerígena.

Para la valoración de los efectos anticancerígenos de extractos de plantas que contienen compuestos bioactivos se



suelen realizar cultivos celulares *in vitro* en los que se estudian la viabilidad, proliferación y supervivencia celular en modelos de distintos tipos de cáncer. Para ello se llevan a cabo ensayos de viabilidad con azul de tripán y de proliferación celular con MTT, así como análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo, los cuales vamos a comentar brevemente.

- ***Ensayo de azul de tripán.***

102 Este ensayo de viabilidad permite diferenciar las células vivas de las muertas gracias a que el colorante usado, el azul de tripán, no es absorbido por las células vivas, que al tener la membrana intacta son muy selectivas respecto a los compuestos que dejan penetrar la misma. Sin embargo este colorante atraviesa la membrana de las células muertas, que se muestran de un distintivo color azul bajo el microscopio. Debido a que las células vivas son excluidas de la tinción, este método también es llamado método de tinción por exclusión.

- ***Ensayo de reducción del MTT.***

Este método simple se usa para determinar la viabilidad celular, condicionada por el número de células



viabiles presentes en el cultivo, que puede determinarse mediante la formación de un compuesto coloreado , debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viabiles [158]. Para ello se utiliza el bromuro de 3(4,5-dimetil-2-tiazoil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT), que es captado por las células y reducido por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial formando un compuesto insoluble, el formazán. Este producto de reacción queda retenido en las células, pudiendo liberarse mediante la lisis de las mismas, de manera que puede ser cuantificada la cantidad de MTT reducido mediante un método colorimétrico, ya que se produce como consecuencia de la reacción un cambio de coloración del amarillo al azul [159].

103

La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias, y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. La determinación de la capacidad de las células de reducir el MTT a formazán después de su exposición a un compuesto permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa.



- *Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo.*

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrico que permite la medida simultánea de múltiples características celulares al hacer pasar una suspensión de células alineadas una a una por delante de un haz láser focalizado. Algunos de los parámetros que pueden medirse, son el tamaño y forma celular, la granularidad del citoplasma, la estructura del citoesqueleto, el contenido de pigmentos o proteínas totales, o el contenido de ARN y ADN , entre otros.

104

Para la determinación del contenido de ADN se utiliza una sustancia fluorescente o fluorocromo, que se une estequiométricamente con el ADN. Las células marcadas fluorimétricamente se introducen en el citómetro de flujo, donde el fluorocromo es excitado a una determinada longitud de onda y emite fluorescencia, señal analítica que se puede relacionar con la cantidad de ADN presente en cada célula.

Dado que el contenido de ADN es dependiente de la fase del ciclo celular en la que se encuentre la célula, a excepción de las fases G2 y M, este análisis puede indicarnos la fase del ciclo en la que se encuentra cada organismo.



Además, el marcaje de ciertas proteínas específicas de cada fase del ciclo con anticuerpos unidos a fluorocromos permite establecer con mayor precisión la fase del ciclo celular en la que se encuentra la célula.

3.3.2 Determinación de la capacidad antimicrobiana.

Para el estudio de la capacidad antimicrobiana de extractos vegetales o compuestos fenólicos se realizan ensayos antimicrobianos con el objetivo de calcular la concentración mínima inhibitoria (MIC50) del extracto vegetal o del compuesto a la cual el 50 % de las bacterias mueren. Generalmente estos ensayos se realizan utilizando *Escherichia coli* como modelo de bacteria gram negativa y *Staphylococcus aureus* como bacteria gram positiva.

105

El fundamento de esta determinación consiste en incubar las bacterias en un medio de cultivo basado en agar a 37 °C en presencia de diferentes concentraciones del extracto. Se usa como colorante una sal de tetrazolio, el cloruro de 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-feniltetrazolio (INT), que se reduce rápidamente por las deshidrogenasas de la cadena de transporte de electrones asociada a la respiración de las bacterias. Esta sal, al reducirse, precipita



formando un complejo insoluble de color rojo intenso, que puede detectarse espectrofotométricamente a una longitud de onda de 570 nm.

Otra forma de determinar la actividad antimicrobiana es el denominado **método de Kirby-Bauer o de difusión en agar**, que consiste en inocular una cantidad estandarizada de bacterias sobre una placa de agar, sembrándolas de manera pareja para obtener un “césped bacteriano”. A continuación se colocan discos de papel de filtro impregnados con concentraciones conocidas de las sustancias a ensayar, y se incuba la placa. Trascurrido el período de incubación, los halos de inhibición formados se miden, cuanto mayor sea dicho halo mayor será la actividad antimicrobiana del agente estudiado.

106

3.4 Absorción, metabolismo y biodisponibilidad de compuestos fenólicos.

Para poder establecer una relación directa entre el consumo de compuestos fenólicos y un efecto beneficioso en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades, es vital entender el proceso de absorción, metabolismo y biodisponibilidad de estos compuestos en el organismo, lo



que les permitirá que alcancen los tejidos diana donde ejercerán su acción.

El concepto de biodisponibilidad expresa la fracción de la dosis administrada o ingerida de un compuesto que accede en forma inalterada a la circulación sistémica y la velocidad a la que se produce, alcanzando de esta manera los tejidos diana donde ejercerán su acción. De forma general, la biodisponibilidad de los polifenoles va a estar determinada por la facilidad que tengan estos compuestos de atravesar la barrera epitelial del intestino, las modificaciones metabólicas que sufran durante este proceso, y su eliminación antes de alcanzar los tejidos diana.

107

Una vez ingeridos los compuestos fenólicos, llegan al intestino delgado, donde se produce su absorción mediante procesos de difusión pasivos y activos. La mayoría de compuestos fenólicos, a excepción de las agliconas, no pueden ser absorbidos en su forma nativa ya que se encuentran formando ésteres, glicósidos o polímeros, y necesitan de una hidrólisis previa que dé lugar a la aglicona correspondiente. En las células epiteliales existen dos rutas por las cuales los compuestos fenólicos conjugados con glucosa se hidrolizan, denominados “**LPH/difusión**” y “**Transporte/CBG**” [160]. En el primero, la hidrólisis se



produce en el borde en forma de cepillo de las células epiteliales del intestino delgado por acción de la lactasa floridin-hidrosilasa (LPH). La LPH muestra una elevada especificidad por los flavonoides-O- β -D-glucósidos, los cuales una vez hidrolizados pueden penetrar en las células epiteliales mediante difusión pasiva gracias al aumento de su lipofilidad. En el segundo mecanismo, la hidrólisis es producida en el interior de los enterocitos por la β -glucosidasa citosólica (CBG), para lo cual los compuestos glucosados deben penetrar al interior de las células epiteliales, posiblemente a través del transportador de glucosa dependiente de sodio (SGLT1).

108

Por tanto, en esta primera etapa sólo las agliconas y algunos glucósidos son absorbidos en el intestino delgado, el resto de compuestos fenólicos ingeridos pasan al intestino grueso donde la microbiota del colon hidroliza los conjugados produciendo las agliconas. En este proceso la eficiencia de la absorción de las agliconas se reduce por dos razones, la primera es que estas agliconas pueden seguir degradándose por acción de la microbiota generándose ácidos aromáticos simples, y la segunda es que la zona de intercambio en el colon es más pequeña y hay una menor densidad de sistemas de transporte.



Las agliconas absorbidas en el intestino delgado, antes de pasar al torrente sanguíneo pueden sufrir una serie de transformaciones por acción del metabolismo de fase I y de fase II, proceso de desintoxicación metabólica común a muchos xenobióticos para restringir su toxicidad potencial y facilitar su eliminación biliar y urinaria mediante un aumento de su hidrofiliidad. En la fase I del metabolismo, las reacciones que tienen lugar son oxidaciones y reducciones producidas por la acción del sistema enzimático del citocromo P450. La fase II del metabolismo consiste en reacciones de conjugación que originan metabolitos metilados, sulfatados, y/o glucuronidados, mediante la acción de las enzimas catecol-O-metiltransferasas (COMT), las sulfotransferasas (SULT) y las uridin-5-O-difosfato glucuroniltransferasas (UGTs), respectivamente. Otras enzimas que catalizan reacciones de acetilación (N-acetiltransferasas), y de conjugación con el glutatión (glutatión transferasas), no tienen demasiada importancia en el metabolismo de los compuestos fenólicos y su papel es minoritario (**Figura 12**). [161].



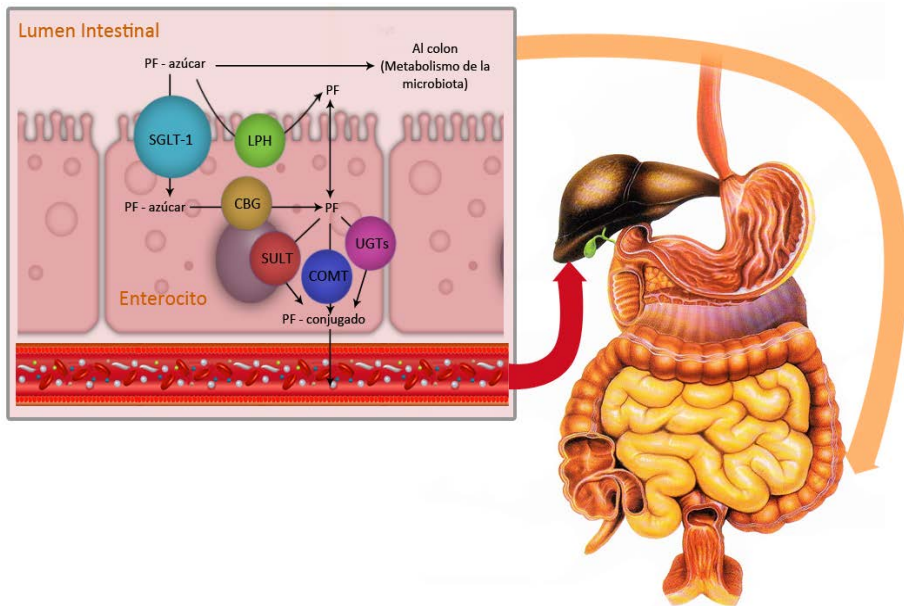


Figura 12. Esquema del proceso de absorción de los compuestos fenólicos glicosados y su transformación metabólica

110

Estos mecanismos de conjugación son altamente eficaces, y las agliconas están ausentes en el torrente sanguíneo o presentes en muy bajas concentraciones cuando se ingieren estos compuestos en dosis consideradas nutricionales. Bien es cierto, que pueden encontrarse a altas concentraciones cuando se saturan los mecanismos de conjugación por una dosis ingerida elevada, como es el caso de dosis farmacológicas. [162].



Los metabolitos formados en los enterocitos pueden en ocasiones volver al lumen del intestino delgado a través de los transportadores ABC (complejo de unión a ATP), o por lo general pasar al torrente sanguíneo, llegando al hígado junto con las agliconas absorbidas en el colon, donde pueden sufrir posteriores transformaciones metabólicas tanto de fase I como de fase II antes de ser excretadas.

4. Determinación de compuestos fenólicos.

Como ya se ha indicado, los compuestos fenólicos naturales constituyen un grupo de compuestos de gran complejidad, que abarca desde moléculas simples, como son los ácidos fenólicos, hasta compuestos altamente polimerizados, como es el caso de los taninos. A esta complejidad se suma el hecho de que en la naturaleza se presentan principalmente en forma conjugada, con uno o más residuos de azúcar unidos a los grupos hidroxilo. Además, los azúcares asociados pueden presentarse como monosacáridos, disacáridos e incluso oligosacáridos. Aunque la glucosa es el residuo de azúcar más común, también pueden unirse a galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa, así como a ácidos glucurónico y galacturónico, entre muchos otros. Son



comunes también las asociaciones con otros compuestos tales como ácidos carboxílicos y orgánicos, aminas y lípidos, así como las uniones con otros fenoles [163].

En consecuencia, la identificación de los compuestos fenólicos presentes en una matriz de origen vegetal o en una muestra de origen biológico, es una tarea sumamente compleja que requiere el empleo conjunto de técnicas analíticas sofisticadas que nos ofrezcan información complementaria. En general, un procedimiento analítico para caracterización de compuestos fenólicos implica tres etapas básicas: tratamiento de muestra, separación analítica y finalmente su detección e identificación. A continuación se detallan cada una de estas etapas del procedimiento analítico.

112

4.1 Tratamiento de muestra para la determinación de compuestos fenólicos.

La etapa de tratamiento de muestra es una de las más cruciales dentro del proceso analítico, de ella depende en gran medida la calidad y reproducibilidad de los resultados analíticos.

Para el caso concreto de la determinación de compuestos fenólicos, el tratamiento de muestra está



orientado a extraer dichos compuestos de la matriz en la que se encuentren, ya sea vegetal (donde suelen estar dentro de estructuras y células vegetales de donde debemos extraerlos) o de origen biológico (donde pueden estar unidos a diversos compuestos, como proteínas, que pueden interferir en la determinación). Durante esta etapa de tratamiento de muestra, es necesario eliminar todos los interferentes presentes en la matriz que puedan afectar en la determinación, así como asegurarse de que la muestra se convierta en un extracto compatible con la técnica analítica que se va a utilizar para la determinación. En el caso de muestras de origen biológico, como plasma, suero u orina, la concentración de compuestos fenólicos que se encuentran en estos fluidos biológicos es baja, por lo que es frecuente que en el tratamiento de muestra se incluya una etapa de preconcentración con el objetivo de que estos compuestos superen los límites de detección o cuantificación de la técnica analítica.

113

A continuación en la **Figura 13** se resumen los principales procedimientos y técnicas de tratamiento de muestra para la determinación de compuestos fenólicos en matrices de origen vegetal y biológico.





Figura 13. Diagrama de los principales sistemas de extracción.

4.1.1 Extracción de compuestos fenólicos en matrices vegetales.

Las matrices vegetales son por lo general muy complejas, por lo que normalmente no es posible abordar el análisis directo de la matriz en su conjunto y es necesario un paso previo de extracción de los componentes de interés, en este caso, los compuestos fenólicos. Un proceso de extracción



consiste en la separación de dichos compuestos de interés de una matriz sólida o líquida basándonos en la diferencias de solubilidades relativas de estos compuestos frente al resto de componentes de la matriz.

Este proceso de extracción es especialmente crítico cuando se realizan análisis cuantitativos. En el caso de los compuestos fenólicos es un paso de vital importancia ya que su distribución tisular en las plantas no es uniforme, encontrándose en niveles elevados en las partes externas. Además a nivel celular, estos compuestos se localizan fundamentalmente en las vacuolas en el caso de los polifenoles hidrofílicos o en las paredes celulares en el caso de los polifenoles insolubles [164].

115

Generalmente, antes de llevar a cabo el proceso de extracción de los compuestos fenólicos, se somete a las matrices vegetales a un proceso de homogenización, seguido de distintos procesos de secado, liofilización o congelación. Una vez que la muestra ha pasado por estas etapas previas está preparada para someterla al proceso de extracción. Existen numerosos factores que afectan a la etapa de extracción, siendo algunos de los más importantes el tipo de disolventes empleados, temperatura, presión, número de



ciclos de extracción, etc., aunque la influencia de estos factores dependerá del tipo de técnica seleccionada.

Actualmente han sido descritos en bibliografía numerosos procedimientos para la extracción de compuestos fenólicos en matrices vegetales, en su mayoría utilizando extracción líquido-líquido (LLE) y extracción sólido-líquido (SLE) [165]. En este tipo de extracciones juega un papel decisivo la solubilidad de los compuestos fenólicos en los disolventes utilizados. Esta solubilidad está condicionada por la naturaleza química del compuesto, que en el caso particular de los polifenoles puede variar según la familia a la que pertenezcan. También hay que tener en cuenta las posibles interacciones con otros componentes de la matriz, como azúcares o proteínas, lo cual puede dar lugar a complejos bastante insolubles. Los disolventes más utilizados suelen ser alcoholes (metanol, etanol, propanol), dimetilformamida, acetona, acetato de etilo y sus combinaciones. Sin embargo, para la extracción de compuestos más polares, como ácidos fenólicos que no suelen extraerse con disolventes orgánicos, a menudo se utilizan mezclas de estos disolventes con distintas proporciones de agua. Factores como la temperatura, el tiempo de extracción, el número de extracciones sucesivas, la



proporción entre volumen de disolvente y la cantidad de muestra o las características de la misma, son determinantes en la recuperación de los compuestos fenólicos en este tipo de extracciones. [166, 167].

En ocasiones durante estas extracciones otros compuestos no deseados, como azúcares, ácidos orgánicos o proteínas pueden co-extraerse junto a los compuestos fenólicos, por lo que estas etapas de extracción pueden ir seguidas de otra etapa adicional de purificación, como puede ser una extracción en fase sólida (SPE), que generalmente se suele realizar utilizando como fase sólida rellenos de fase reversa como C-8 o C-18 [168].

117

Estas técnicas de extracción convencionales presentan una serie de inconvenientes: tienen baja selectividad y porcentajes de recuperación, son muy laboriosas y requieren mucho tiempo, y además utilizan grandes cantidades de disolventes que en muchos casos pueden ser tóxicos. Debido a estos inconvenientes, en los últimos años estas técnicas convencionales se han ido sustituyendo por métodos de extracción más novedosos, que por lo general utilizan alguna fuente de energía para aumentar la transferencia de los analitos al disolvente. Además también se buscan técnicas que sean más cuidadosas con el medio ambiente y no utilicen



disolventes orgánicos. En el caso de los compuestos fenólicos la extracción con fluidos presurizados (PLE), la extracción con fluidos supercríticos (SFE), y la extracción asistida por microondas (MAE), se han utilizado para extraer este tipo de compuestos de matrices vegetales [169].

118 Se puede concluir que debido a la amplia variedad de estructuras y propiedades de los compuestos fenólicos, su distribución desigual en la planta y el hecho de que puedan encontrarse unidos a otros compuestos en las matrices vegetales, no es posible hablar de procedimientos de extracción generales, sino que la elección de un procedimiento concreto dependerá de la matriz de la que se trate, de los compuestos que se quieran determinar y del tipo de información que se desee obtener (cualitativa o cuantitativa) [170]. De todos los sistemas de extracción utilizados para este fin (**Figura 13**), cabe destacar la extracción con fluidos presurizados (PLE), la extracción con fluidos supercríticos (SFE), y la extracción asistida por microondas (MAE), tres técnicas muy novedosas que se detallan a continuación y que fueron utilizadas en esta memoria para obtener extractos de romero con diferente composición.



- *Extracción con Fluidos Presurizados (PLE).*

La PLE se basa en la extracción a temperatura y presión suficientemente elevadas para mantener el disolvente en estado líquido durante todo el proceso de extracción. Existen diferentes denominaciones para esta técnica: extracción acelerada con disolventes (ASE), extracción con fluidos presurizados (PLE), extracción con disolventes calientes presurizados (PHSE), extracción con disolventes a elevada presión (HPSE), extracción con disolventes a elevadas presiones y elevadas temperaturas (HHPSE) y extracción subcrítica con disolventes (SSE). También hay que destacar que cuando se emplea agua como disolvente de extracción, los autores tienden a usar una terminología diferente para resaltar el uso de este disolvente no agresivo con el medio ambiente, usando términos como extracción con agua subcrítica (SWE), extracción con agua caliente (HWE), extracción con agua caliente presurizada (PHWE) y extracción con agua a elevadas temperaturas (HTWE). El uso de tan variada terminología puede dar lugar a confusión, por lo que en esta tesis se usará la designación PLE que es la más ampliamente aceptada.



En la PLE la muestra se pone en contacto con el disolvente empleado para la extracción a elevadas presiones y temperaturas (por encima del punto de ebullición del disolvente). Al trabajar con temperaturas elevadas se mejora la solubilidad de los analitos en el disolvente y se aumenta la cinética de desorción de los mismos en la matriz donde se encuentran.

120 La PLE puede llevarse a cabo en dos modos: estático y dinámico. En el modo estático, la muestra y el disolvente se mantienen durante un tiempo programado por el usuario a una presión y temperatura constantes; mientras que en el modo dinámico el disolvente fluye a través de la muestra de una forma continua. En la mayoría de los casos el modo dinámico usa agua como disolvente de extracción. Algunos estudios han demostrado que la combinación de ambos modos puede mejorar la eficiencia de las extracciones.

El diagrama esquemático de un equipo de PLE se muestra en la siguiente **Figura 14**:



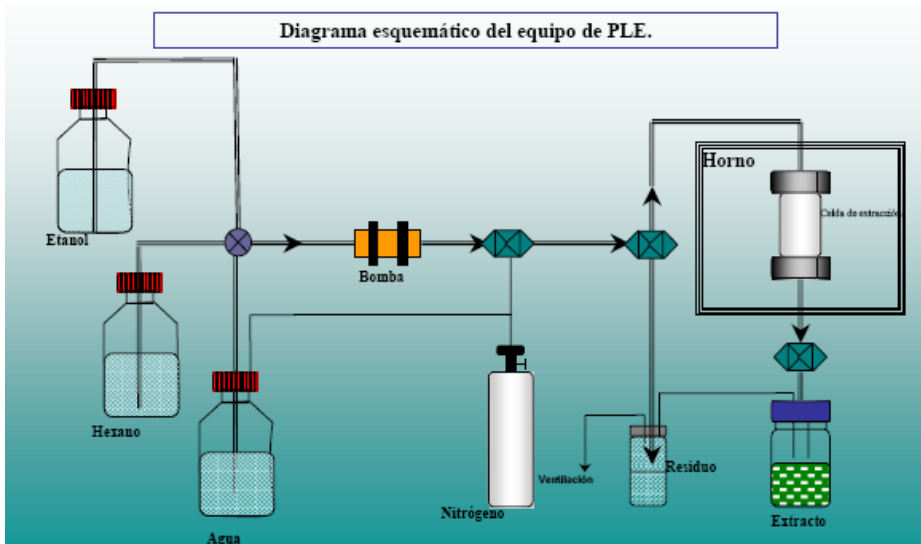


Figura 14. Diagrama esquemático de un equipo de PLE.

Antes de introducir la muestra en la celda de extracción es necesario llevar a cabo un pre-tratamiento. Este proceso generalmente consiste en una molienda y posterior tamizado, ya que la difusión de los analitos de la matriz al disolvente aumenta considerablemente al reducir el tamaño de partícula. El secado de la muestra también es un factor importante, ya que la humedad puede disminuir considerablemente la eficiencia del procedimiento de extracción, especialmente cuando se usan disolventes no polares. En estos casos es habitual incorporar algún agente desecante en la celda de muestra, los más comunes son el sulfato sódico, la tierra de diatomeas o la celulosa; aunque



también se suelen emplear hornos a presión o secado mediante congelación o liofilización, aunque éstas últimas no son recomendables en el caso de compuestos volátiles.

La optimización del procedimiento de extracción comienza con la elección del disolvente de extracción, que debe ser capaz de solubilizar los analitos de interés, minimizando la co-extracción de otros componentes de la matriz. En esta elección es muy importante tener en cuenta la volatilidad del disolvente y la compatibilidad con las siguientes etapas de tratamiento de muestra, como podrían ser limpieza, pre-concentración o la propia técnica analítica que se vaya a emplear. En cuanto a la polaridad del disolvente ésta debería ser parecida a la de los compuestos de interés, y en el caso de que los analitos abarcaran un amplio rango de polaridad las mezclas de disolventes de baja y alta polaridad suelen proporcionar extracciones eficaces, aunque también existe otra alternativa, que consiste en llevar a cabo dos extracciones PLE, una con un disolvente no polar y otra con un disolvente polar.

Algunos autores han logrado mejorar el proceso de extracción mediante la adición de modificadores al disolvente utilizado, como pueden ser tensioactivos, ácidos o bases, sobre todo en el caso de que se usen disolventes orgánicos.



Otras condiciones de extracción que pueden optimizarse son el tamaño de partícula de muestra, volumen, naturaleza y flujo del disolvente, temperatura, tiempo de extracción, número de ciclos y presión. De todas ellas la naturaleza del disolvente y la temperatura son generalmente las que ejercen una mayor influencia.

Algunas ventajas que presenta esta técnica de extracción son:

- ✓ Es más rápida que los procedimientos de extracción convencionales con líquidos, su duración suele ser menor de 15 minutos.
- ✓ Se realiza un mínimo empleo de disolventes orgánicos.
- ✓ Se obtienen mayores rendimientos que con técnicas de extracción tradicionales.
- ✓ La extracción se realiza en condiciones libres de oxígeno y luz, lo que lo hace especialmente útil para sustancias que se oxiden fácilmente o que sean fotosensibles.
- ✓ Permite extracciones eficaces independientemente de la matriz.
- ✓ Es automatizable y permite extraer muestras secuencialmente.



- ✓ Además al no requerir etapas adicionales de filtración, puesto que la matriz queda separada del disolvente usado en la extracción, es un punto a favor que nos permite el acoplamiento on-line con alguna técnica separativa.

Sin embargo, presenta una serie de inconvenientes como son:

- ✗ Extracciones poco selectivas.
- ✗ Requiere el empleo de temperaturas elevadas (más altas que en la extracción con fluidos supercríticos, SFE).
- ✗ El equipo tiene un precio elevado.

124

Desde su introducción en 1996 sus aplicaciones se han focalizado en la extracción de contaminantes ambientales, pero gracias a las ventajas que presenta, como la disminución en el volumen de disolvente consumido y en el tiempo de extracción, recientemente se está introduciendo en diferentes áreas, como la biología, el análisis farmacéutico y la industria alimentaria. En el caso de los compuestos fenólicos se ha utilizado la extracción con agua subcrítica para extraer antioxidantes del romero y la salvia, antocianinas de



la piel de uva y diversos frutos rojos, catequinas de las hojas de té y semillas de uvas, flavonas de la piel de naranja, o lignanos de las semillas de lino, entre otros. [171]

- *Extracción con Fluidos Supercríticos (SFE).*

A partir de estudios realizados esencialmente en los últimos cincuenta años, se sabe que la solubilidad de una sustancia depende críticamente de la densidad del disolvente, de forma que, la solubilidad de una sustancia aumenta cuando aumenta la densidad del disolvente a temperatura constante.

125

Este razonamiento indica que se podría controlar el poder disolvente del fluido si se pudiera variar a voluntad su densidad. Podría pensarse "a priori" que un modo de lograrlo sería modificar la presión del fluido. Sin embargo, basándonos en el diagrama de fases, cuando se intenta esta maniobra utilizando líquidos comunes y temperaturas cercanas a la del ambiente, se observa que al disminuir la presión se alcanza un valor de temperatura, propio de cada líquido, en que este cambia abruptamente de fase, pasando al estado gaseoso, proceso que está acompañado por un dramático cambio de



su densidad y, en consecuencia, de su capacidad de actuar como disolvente.

Los fluidos supercríticos representan la respuesta a este problema al poderse regular su capacidad como disolventes de manera sencilla mediante variaciones de presión y de temperatura, sin que ocurra la transición de fase. Esto sólo es factible cuando la temperatura del disolvente es superior a la llamada temperatura crítica (T_c), debido a que en estas condiciones el líquido se convierte en un fluido supercrítico.

126 Se entiende como **fluido supercrítico** (FSC) a aquella sustancia que se encuentra a unas condiciones operativas de presión y temperatura superiores a las de su punto crítico. Si partimos de una mezcla líquido-vapor en equilibrio y aumentamos simultáneamente su presión y temperatura, al aumentar la presión aumenta la densidad de la fase de vapor y al mismo tiempo al aumentar la temperatura disminuye la densidad de la fase líquida. Cuando se alcanza la temperatura crítica se adquieren valores de densidad y presión también llamados críticos, que son característicos de cada fluido, y en estas condiciones el fluido se encuentra en el llamado **punto crítico**. Al llegar a este punto desaparece la fase vapor y líquido, y tenemos una única fase denominada fase



supercrítica o fluido supercrítico, en la que las propiedades de la fase líquida y gaseosa se hacen tan similares como para ser indistinguibles.

En estas condiciones, los FSC presentan propiedades híbridas entre un líquido y un gas: presentan densidades similares a los líquidos, viscosidades similares a los gases, y difusividades intermedias entre los dos estados, propiedades que les hacen poseer buenas características como disolventes y adecuadas propiedades de transporte. Por tanto, gracias a su baja viscosidad y relativamente alta difusividad, los FSC poseen mejores propiedades de transporte que los líquidos, pueden penetrar más fácilmente a través de los materiales sólidos, y como consecuencia la velocidad de transferencia del soluto en el FSC es mayor permitiendo extracciones más rápidas. Además al ser compresibles, pequeños cambios de presión pueden originar importantes cambios de densidad y poder disolvente. [172].

127

Por tanto se puede decir que la naturaleza de un fluido supercrítico se encuentra a medio camino entre un gas y un líquido. En la **Figura 15**, se muestra el diagrama de fases de una sustancia pura: la región supercrítica no queda definida por línea continua porque no tiene lugar cambio de fase. Hay una transición continua desde el estado líquido a FSC por



aumento de la temperatura a presión constante, o desde el estado gaseoso a FSC por incremento de la presión a temperatura constante.

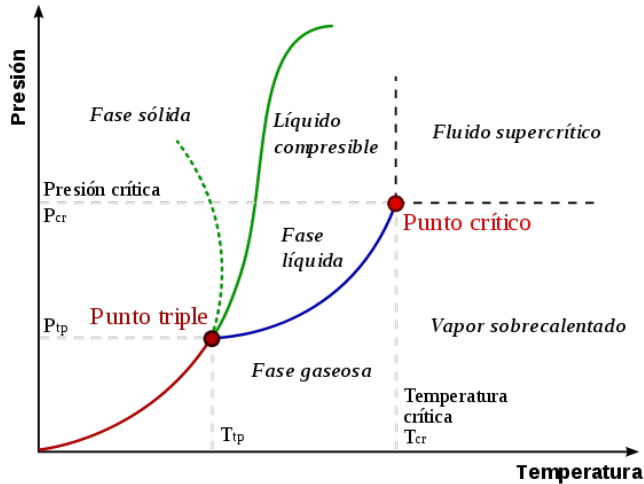


Figura 15. Diagrama de fases de una sustancia pura.

Un hecho importante a tener en cuenta es que cuando se emplean FSC, la separación de soluto y el disolvente se consigue eficientemente mediante un simple proceso de expansión. Esto evita tener que aumentar la temperatura para eliminar el disolvente por evaporación, como sucede con los disolventes tradicionales.

Para que la solubilización de las sustancias sea eficaz, muchas veces se hace necesario recurrir al agregado de co-solventes o modificadores. Estos habitualmente son sustancias volátiles con afinidad por el soluto que se agregan en una



concentración mucho mayor que la del soluto pero mucho menor que la del disolvente. Lo cual nos amplía la posibilidad de interacciones entre las moléculas de disolvente, soluto y cosolventes. A veces, las sustancias que se adicionan favorecen otras propiedades de interés para que los procesos sean industrialmente atractivos; por ejemplo, los granos de café se mojan con agua para acelerar el proceso de liberación de la cafeína antes de disolverse en el FSC.

La instrumentación necesaria para realizar una extracción con fluidos supercríticos puede ser relativamente simple o altamente compleja, dependiendo de si la instrumentación es para sistemas a escala analítica o sistemas preparativos (escala piloto o industrial). Básicamente, el sistema de extracción consiste en una bomba de alta presión, una celda de extracción, una zona en la que se produce la descompresión del fluido, y por último un sistema adecuado de colección de analitos. En general los sistemas comerciales están constituidos por bombas que permiten trabajar a presiones comprendidas entre 100 y 700 atm, siendo capaces de suministrar el fluido a presión y flujo constantes, y de mantener la presión seleccionada a lo largo de todo el sistema de extracción. El extractor propiamente dicho consta de una o varias celdas de extracción, donde se sitúa la



muestra, y de un sistema adecuado que permite fijar y mantener la temperatura del fluido durante toda la etapa de extracción. Las temperaturas usuales de trabajo oscilan entre 30 y 150 °C. El tamaño de las celdas de extracción puede variar ampliamente, aunque los volúmenes típicos de las mismas oscilan entre 0.5 y 10 ml. [171].

130 La parte del equipo donde se produce la descompresión del fluido se suele llamar restrictor. Puede ser de dos tipos, o bien consiste en un simple tubo capilar de pequeño diámetro interno, metálico o de sílice fundida, es el caso del llamado restrictor fijo; o bien en una serie de válvulas micrométricas que permiten controlar de forma mecánica el diámetro del orificio de salida del restrictor, caso conocido como restrictor variable. La temperatura de la zona del restrictor también suele estar controlada con el fin de evitar que los analitos extraídos precipiten dentro de él y lo obstruyan, ya que cuando se utilizan fluidos que son gases a presión ambiente (que es lo más usual), la expansión de éstos durante el proceso de descompresión produce un fuerte enfriamiento.

El diseño del sistema utilizado para recoger los analitos es un factor decisivo para conseguir que las extracciones sean efectivas. Este puede consistir en un simple vial o tubo de



- Tipo de extracción: dinámica, cuando el FSC se deja fluir de forma continua a través de la celda de extracción al mantener las válvulas de entrada y salida del extractor abiertas durante el proceso; o estática, cuando la celda de extracción es presurizada con el fluido manteniendo cerrada la válvula de salida del extractor.
 - Volumen y velocidad del fluido o tiempo de extracción.
 - Modificador: influyen el tipo y forma de adición.
 - Características de la muestra: tales como el tamaño de partícula, grado de humedad, etc.
 - Tipo de restrictor: fijo o variable.
- 132
- Sistema de colección: donde interviene el tipo y volumen de disolvente o material adsorbente, temperatura, etc.

Hay una amplia variedad de disolventes que pueden ser utilizados como FSC, los más habituales junto con sus constantes críticas se muestran en la **Tabla 1**:



Disolvente	Temperatura (°C)	Presión (atm)	Densidad (g/ml)	Solubilidad (cal ^{-1/2} cm ^{-3/2})
Eteno	10.1	50.5	0.200	5.8
H ₂ O	101.1	217.6	0.322	13.5
Metanol	-34.4	79.9	0.272	8.9
CO ₂	31.2	72.9	0.470	7.5
Etano	32.4	48.2	0.200	5.8
Óxido Nitroso	36.7	71.7	0.460	7.2
SF ₆	45.8	37.7	0.730	5.5
n-buteno	-139.9	36.0	0.221	5.2
n-pentano	-76.5	33.3	0.237	5.1

Tabla 1. FSC más habituales y sus constantes críticas ([172])

De todos ellos el CO₂ y el agua son los más empleados. En cuanto al uso del **agua** en este tipo de extracciones cabe destacar que:

133

- ✓ El agua líquida a temperatura ambiente disuelve muy bien las sustancias iónicas, porque poseen carga eléctrica, pero no es buen disolvente para gases, hidrocarburos y polímeros no polares.
- ✓ Cuando el agua está a temperaturas superiores a su temperatura crítica (T_c = 374°C), la solubilidad en ella de sustancias orgánicas poco polares es mucho mayor y la de las sustancias iónicas es mucho menor que la solubilidad típica



del agua a temperatura ambiente. Resulta pues evidente que, si se toma en cuenta todo el intervalo de las densidades que puede alcanzar, la potencialidad del agua como disolvente es formidable.

- ✓ Sin embargo, la aplicación en la práctica estará limitada a aquellos procesos que no se vean afectados por las temperaturas relativamente altas que hay que emplear debido al elevado valor de T_c del agua.

134

El **dióxido de carbono** presenta unas importantes ventajas prácticas que han hecho que sea, con diferencia, el fluido más ampliamente utilizado en las aplicaciones de la técnica. Algunas de ellas son:

- ✓ La temperatura crítica de $31,2\text{ °C}$ es cercana a la ambiente, lo que lo convierte en el disolvente apropiado para manejar sustancias termolábiles, como, por ejemplo, muchas esencias naturales y productos farmacéuticos. Además adquiere el estado supercrítico a una presión de fácil manejo, 73 atm .



- ✓ El CO₂ es un gas a presión atmosférica, por lo que se puede dejar escapar a la atmósfera tras la etapa de extracción, pudiéndose recoger los analitos en un pequeño volumen de disolvente, lo cual nos permite llevar a cabo extracciones sin utilizar prácticamente disolventes orgánicos, y obtener extractos finales listos para ser analizados sin necesidad de efectuar posteriores etapas de concentración.
- ✓ No deja residuos en la matriz a extraer, por lo que es un disolvente adecuado para su utilización en la industria agroalimentaria (incluido en la lista FDA de productos químicos reconocidos como inocuos para la salud).
- ✓ Presenta una baja viscosidad, alta difusividad, baja tensión superficial y elevada velocidad de transferencia de materia.
- ✓ Elevado poder de extracción de compuestos orgánicos, dependiente de la densidad, fácilmente modificable por variación de P y T. Además presenta una alta solubilidad para compuestos orgánicos volátiles de bajo peso molecular (cetonas, ésteres, alcoholes y



aldehídos). Esto lo convierte en un disolvente adecuado para la extracción de la fracción volátil responsable del aroma en diversas matrices.

- ✓ Permite obtener extractos de un elevado grado de pureza (el aroma, sabor, color y textura del producto extraído es similar al del producto original o "fresco").
- ✓ Además es inerte, no inflamable, no tóxico, barato y puede adquirirse con un alto grado de pureza.

136

Realmente la única desventaja que presenta el CO₂ frente a otros fluidos supercríticos es su carácter apolar, lo que hace que pueda no ser adecuado para extraer analitos de elevada polaridad, ya que son insolubles en CO₂, incluso a altas densidades. Para evitar este inconveniente suele añadirse en pequeñas cantidades modificadores o co-solventes, como ya se ha comentado previamente.

Cabe decir que en términos generales los procesos que emplean FSC son, en general, más caros que los convencionales debido al costo de la etapa de compresión de los fluidos. Esto está parcialmente compensado en el caso del CO₂, cuyo bajo costo resultante de su abundancia y facilidad



de obtención, junto con su posible recuperación tras la extracción, compensa en parte la inversión en el equipamiento que es necesario para comprimirlo y retenerlo en ese estado.

Hay un gran número de ventajas y algunos inconvenientes respecto al uso de FSC, todas ellos asociados a sus propiedades en estado supercrítico que se muestran a continuación en la **Tabla 2**.

VENTAJAS	INCONVENIENTES
Propiedad disolvente controlada por P y T	Elevadas presiones
FSC pueden ser fácilmente aislados	Gasto energético
FSC No tóxico	Inversión en equipamiento
Realizar separaciones no posibles por métodos clásicos	
Extracción de compuestos termolábiles	
Disolventes baratos y reutilizables	

Tabla 2. Ventajas e inconvenientes del uso de FSC.

Estas ventajas se traducen en beneficios medioambientales, incremento en seguridad e higiene y mejora de los procesos de extracción.



En cuanto a sus usos, el principal campo de aplicación de esta técnica se encuentra en el sector de la alimentación y la agricultura (32%), dentro del cual la obtención de compuestos naturales ocupa el primer lugar, seguido de la extracción de aceites y aromas esenciales [173]. En cuanto a los compuestos fenólicos, esta técnica se ha utilizado con éxito para la extracción de estos compuestos de semillas de uva, de naranjas, de hojas de romero y olivo, extractos de propolis, ginkgo biloba, etc. [174].

- *Extracción asistida con Microondas (MAE).*

138

La extracción asistida con microondas (MAE) es otra de las técnicas de extracción que se ha desarrollado recientemente. La MAE fue utilizada como técnica de extracción por primera vez en 1986, cuando se utilizó un microondas de uso doméstico para el tratamiento de muestras antes de su análisis mediante cromatografía [175].

Las microondas son ondas electromagnéticas de alta frecuencia (0.3-300 GHz) localizadas dentro del espectro electromagnético entre la radiofrecuencia y el infrarrojo. Debido a su naturaleza electromagnética las microondas poseen un campo eléctrico y otro magnético perpendiculares entre sí. El campo eléctrico interacciona con la materia



produciendo calentamiento mediante dos mecanismos simultáneos, rotación dipolar y conducción iónica. La rotación dipolar está relacionada con el alineamiento del campo eléctrico con las moléculas de disolvente o muestra que poseen un momento dipolar, ya sea permanente o inducido por el campo eléctrico de las microondas. Esta oscilación produce colisiones con las moléculas adyacentes liberándose de este modo energía térmica, lo que se traduce en un rápido calentamiento del medio. Por tanto, cuanto mayor es la constante dieléctrica del disolvente de extracción mayor es el calentamiento.

A diferencia de otros procesos de extracción en los que interviene una etapa de calentamiento, donde el calor penetra desde el exterior hacia el interior de la matriz, la energía microondas calienta la muestra de manera simultánea y homogénea. En el caso de la extracción utilizando energía microondas, la ventaja se encuentra en la ruptura de los débiles enlaces de hidrógeno producida por la rotación dipolar de las moléculas [176].

Debido a que el agua absorbe la energía microondas, ésta puede por tanto interaccionar con el agua presente en las células de matrices vegetales produciendo su calentamiento y causando la ruptura de la pared celular,



facilitando de esta manera la transferencia de las sustancias de interés al medio y la penetración del disolvente dentro de la matriz vegetal, mejorándose así el rendimiento de extracción. Por tanto, la energía microondas puede mejorar los rendimientos de extracción de compuestos bioactivos de muestras de origen vegetal, utilizando un menor volumen de disolvente y en un menor tiempo de extracción.

El rendimiento de la extracción en MAE está determinado por el tipo de disolvente a utilizar, la potencia y el tiempo de irradiación, y las características de la muestra, principalmente tamaño de partícula y distribución.

140

Dentro de los parámetros de control en MAE uno de los factores más determinantes para obtener un alto rendimiento de extracción es la elección adecuada del disolvente. La selección del mismo es clave para una extracción óptima, y en ella se deben considerar las interacciones del disolvente con la matriz, las propiedades de absorción de las microondas por el mismo, y su momento dipolar. Cuanto mayor sea el momento dipolar del disolvente más rápido ascenderá la temperatura en el mismo bajo la irradiación de las microondas. Sin embargo existe la teoría opuesta que sustenta que los disolventes que no absorben la energía microondas mejoran el proceso de extracción, ya que



gracias al contenido en humedad de la muestra, el calor es distribuido rápidamente a través de la misma y es transmitido al disolvente, el cual se encuentra a menor temperatura y enfría a la muestra [177]. En ocasiones para mejorar el rendimiento de extracción, se utilizan mezclas de disolventes con distinta capacidad para absorber la radiación microondas (como hexano, con bajo momento dipolar y metanol, con alto momento dipolar). Otros factores a tener en cuenta son la selectividad del disolvente y la compatibilidad con el método analítico usado para el análisis del extracto. Algunos de los disolventes más empleados, junto a sus constantes dieléctricas y momentos dipolares aparecen en la **Tabla 3**.

141

Disolvente	Constante Dieléctrica (20°C)	Momento Dipolar (20°C, Debye)
Hexano	1.89	0.10
Tolueno	2.40	0.36
Diclorometano	8.90	1.14
Acetona	20.70	2.69
Etanol	24.30	1.69
Metanol	32.60	2.87
Agua	78.50	1.87

Tabla 3. Disolventes más empleados en MAE.



Otro parámetro que influye el rendimiento de extracción por MAE es la potencia de la radiación microondas y el tiempo de irradiación, factores ambos muy dependientes entre sí. Generalmente para optimizar un método de MAE, se suele utilizar una combinación de potencias bajas o moderadas con tiempos de extracción altos [178]. Esto es debido a que el uso de potencias elevadas está asociado con una alta degradación de compuestos termolábiles, como es el caso de los compuestos fenólicos, de hecho experimentalmente se ha observado que un aumento de la potencia desde 500 a 1000 W no aumenta de manera significativa el rendimiento de extracción de flavonoides [179].

Las características de la matriz, como su naturaleza y el tamaño de partícula, afectan de manera considerable la eficiencia de la extracción. La extracción será tanto más eficaz cuanto menor es el tamaño de partícula, ya que el área superficial será mayor y de esta forma las microondas penetrarán mejor en la muestra a extraer [180]. En ocasiones para mejorar el rendimiento de extracción se realiza una etapa de lixiviación previa, agitando la muestra con un disolvente adecuado durante cierto tiempo [181].



Instrumentalmente hay dos tipos de sistemas MAE disponibles comercialmente, aquellos que poseen celdas de extracción selladas, lo que se denomina MAE presurizada (donde toda la cavidad y la muestra que contiene son irradiadas de manera aleatoria y uniforme con microondas); o abiertas, lo que se conoce como MAE atmosférica (en donde sólo una parte de la celda de extracción que contiene la muestra es irradiada con energía microondas) [182]. En la extracción MAE presurizada, la temperatura conseguida durante la extracción es de 2 a 3 veces mayor que el punto de ebullición, lo que facilita y mejora la eficacia de la extracción del analito de la muestra. Actualmente existen equipos MAE presurizados que permiten hacer la extracción simultánea de hasta 14 muestras. En la **Figura 17** se muestra un esquema de ambos sistemas. Sean de uno u otro tipo, estas celdas de extracción para microondas deben cumplir una serie de características, las más importantes son que no deben absorber energía microondas, ser inertes y resistentes.



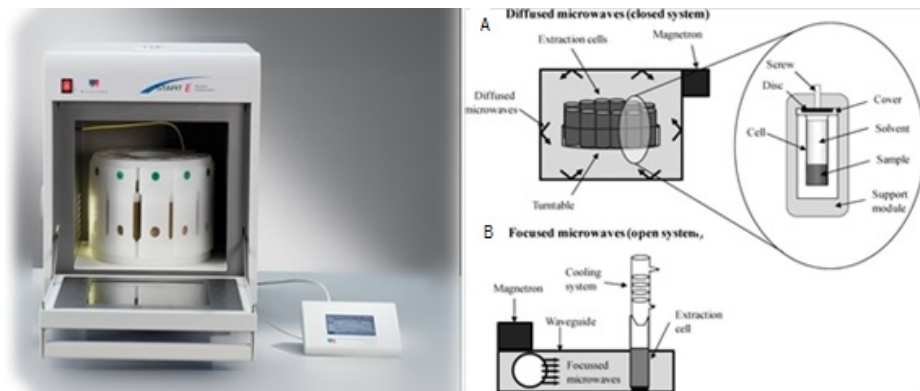


Figura 17. Modos y sistemas de MAE: (A) MAE presurizado, (B) MAE atmosférico

144

Podemos diferenciar 3 etapas en la MAE presurizada: la primera comienza con un calentamiento a temperaturas superiores al punto de ebullición del disolvente, esta etapa va seguida de un enfriamiento y despresurización, con guías de aire integradas en el rotor que ayudan a acelerar el proceso y reducir el sobrecalentamiento, para finalmente llevar a cabo una etapa de filtración y separación. Existen en la actualidad equipos que llevan integrados un dispositivo de filtración que se conecta directamente a la celda de extracción y que simplifica el proceso.

Esta técnica de extracción presenta una serie de ventajas e inconvenientes. Entre las ventajas que posee destacan: los tiempos de extracción cortos (oscilan entre 30 segundos a 10 minutos), elevada eficiencia, pequeña cantidad



de muestra y volumen de disolvente que utiliza, prácticamente no necesita tratamiento previo de la muestra antes de la extracción, y además permite extracciones de muestra múltiples. Entre las principales desventajas se encuentran la baja selectividad que presenta, la posible degradación térmica que pueden sufrir ciertos compuestos, la etapa de separación necesaria tras la extracción para obtener un extracto limpio, y finalmente la dificultad de automatización y de acoplamiento con las técnicas analíticas.

Este tipo de extracción se aplica a compuestos polares, pero no es viable para matrices secas o demasiado húmedas cuando se utilizan disolventes no polares. Fundamentalmente esta técnica de extracción se utiliza para obtener terpenos de la uva, carotenoides del pimiento, aceites esenciales de diversas plantas (romero, salvia, albahaca, menta, entre otras) y en el ámbito de los compuestos fenólicos es una técnica de reciente implantación para la extracción de dichos compuestos de hojas de olivo, de romero, de orégano, de soja, así como de otras plantas medicinales [177, 183-187].



4.1.2 Tratamiento de muestras para estudios metabolómicos.

146 Debido a la gran complejidad de los sistemas biológicos, las muestras para estudios metabolómicos deben someterse a una etapa de tratamiento previo a su análisis que elimine interferentes presentes en la matriz y puedan afectar a su determinación. Es común en este tipo de muestras que se produzca un efecto matriz originado por la co-elución de distintos componentes de la muestra cuando se realiza su análisis mediante técnicas separativas, siendo especialmente crucial cuando se utiliza la espectrometría de masas para su detección, ya que estas co-eluciones del analito junto a otros componentes de la muestra afectan a la ionización de los compuestos de interés, pudiendo producirse supresión iónica. Los procedimientos para el tratamiento de estas muestras utilizan técnicas de extracción que se muestran en la **Figura 13**, y que en algunos casos ya han sido mencionados previamente, como son LLE, SPE, SFE, PLE, MAE o ultrafiltración o diálisis.

En cuanto a la elección de la técnica de extracción a utilizar para el caso particular de los compuestos fenólicos presentes en muestras biológicas, ésta dependerá fundamentalmente de la naturaleza de la muestra, dada la



gran diversidad existente de fluidos biológicos, como son orina, citoplasma, plasma, o suero, entre otros.

En el caso de muestras de orina, el elevado contenido que este fluido presenta en sales puede interferir en los procesos de ionización cuando se utilizan analizadores de masas, por lo que es conveniente eliminar estos electrolitos, además de otros posibles interferentes de la muestra mediante técnicas de extracción. Aunque algunos investigadores no realizan tratamiento de extracción previo al análisis, sino simplemente diluyen la muestra y realizan una centrifugación para eliminar partículas en suspensión [188, 189], muchos otros sí consideran necesario una etapa de tratamiento. Básicamente para estas muestras suelen realizarse LLE, utilizando como disolvente generalmente acetato de etilo [190-194], o SPE, donde la fases estacionarias de sílice modificada C-18 son las más ampliamente usadas (**Figura 18**) [195-198].

147

Para el análisis de fluidos biológicos que poseen un elevado contenido proteico, como es el caso de muestras de plasma, suero o citoplasma, es vital realizar una precipitación de proteínas, ya que estos compuestos son grandes interferentes, especialmente cuando se utiliza como técnica separativa la cromatografía líquida, donde las proteínas



pueden quedar retenidas de manera irreversible en la columna. Para el análisis de compuestos fenólicos, la etapa de desproteinización es un paso aún más crítico debido al hecho de que estos compuestos se pueden encontrar unidos a proteínas, de hecho se cree que son transportados *in vivo* mediante su unión a proteínas plasmáticas [199]. Esta desproteinización o precipitación de proteínas puede realizarse a través de distintos procedimientos, bien mediante una desnaturalización por calentamiento o disminuyendo el pH con el uso de ácidos, o bien utilizando disolventes orgánicos como metanol, etanol, acetonitrilo y sus mezclas [196, 200-202]. El uso de uno u otro método dependerá del tipo de estudio a realizar. Así, en estudios de perfiles metabólicos, donde se pretende analizar el mayor número de metabolitos posibles, el uso de metanol para realizar la precipitación de proteínas ha dado buenos resultados [201, 202]. Sin embargo, cuando se pretende analizar la presencia de un compuesto fenólico o una familia de estos se deberá estudiar cuál de ellos proporciona mayor porcentaje de recuperación, lo cual dependerá de la interacción de dichos compuestos con las proteínas y su solubilidad en los disolventes utilizados.



Dada la complejidad de este tipo de fluidos biológicos, la precipitación de proteínas no es suficiente para evitar que se produzca efecto matriz, por lo que esta etapa de desproteinización suele ir seguida de una etapa de limpieza o extracción de los compuestos de interés.

Al igual que ocurre para el tratamiento de orina, en este tipo de muestras suele emplearse LLE con acetato de etilo u otros disolventes orgánicos [194, 196, 200, 203]. Sin embargo la técnica de extracción más usada para los compuestos fenólicos y sus metabolitos en estos fluidos biológicos es la SPE, utilizando principalmente como relleno fases de sílice alquilada C-18 o resinas poliméricas con grupos funcionales polares [198, 204, 205]. Recientemente se ha comenzado a usar este tipo de resinas en placas de microextracción en fase sólida (μ SPE), ya que posee la ventaja

149

de que además de ser un proceso rápido y utilizar menores cantidades de muestra que una SPE convencional (**Figura 18**), algo de vital importancia en estos estudios, al utilizarse pequeños



Figura 18. Cartuchos y estación para SPE (izquierda)



volúmenes de eluyente se elimina el paso posterior de pre-concentración de los analitos antes del análisis, algo que puede ser crucial para aumentar los porcentajes de recuperación de algunos compuestos fenólicos que son bastantes inestables [206].

4.2 Técnicas analíticas para la determinación de compuestos fenólicos

150 La Química Analítica dispone de un amplio abanico de técnicas que se fundamentan en las distintas propiedades físico-químicas que poseen los componentes de una muestra para lograr su separación y determinación. En el caso de mezclas complejas, como pueden ser los extractos vegetales o muestras biológicas, el uso de técnicas continuas u “on-line”, donde la detección o determinación de los analitos se realiza de manera continua a la separación, es el más extendido. Para el análisis de compuestos fenólicos, dentro de estas técnicas separativas continuas, entre las más utilizadas se encuentran técnicas cromatográficas como la cromatografía líquida (LC) o la cromatografía de gases (GC); y técnicas no cromatográficas como la electroforesis capilar (CE). Los sistemas de detección acoplados a estas técnicas separativas son de índole muy diversa, pero los más utilizados son la



detección espectrofotométrica UV-Vis y la espectrometría de masas (MS).

4.2.1 Técnicas separativas para el análisis de compuestos fenólicos: Cromatografía Líquida (LC).

Como ya se ha comentado anteriormente, el uso de técnicas separativas continuas es el más extendido a día de hoy para el análisis de compuestos fenólicos, especialmente la EC, CG, y LC.

La **electroforesis capilar** (EC) es una técnica separativa basada en la separación de los componentes de una muestra en función de la diferencia de velocidad de migración de los mismos a través de un tubo capilar al ser sometidos a la acción de un campo eléctrico. Es una técnica alternativa al uso de técnicas cromatográficas que está ganando popularidad gracias a su velocidad, resolución y relativo bajo coste. Esta técnica se ha utilizado para el análisis de compuestos fenólicos en aceite de oliva [207], vino [208], té [209], zumos [210], entre otros extractos de plantas [211, 212].

La **cromatografía de gases** (GC) es una técnica cromatográfica donde la separación de los componentes de una muestra se produce gracias al equilibrio de distribución



152 existente entre una fase móvil que es un gas y una fase estacionaria, que generalmente es un líquido. Es una técnica analítica que presenta ciertas desventajas en cuanto al análisis de compuestos fenólicos, ya que al ser compuestos caracterizados por la presencia de grupos hidroxilo con capacidad de formar enlaces de hidrógeno, esto se traduce en un aumento de su punto de ebullición y como consecuencia poseen una baja volatilidad. Además el tratamiento de muestra para el análisis de estos compuestos mediante GC es complejo, ya que además de incluir etapas de extracción o limpieza que se han comentado en apartados anteriores, hay que eliminar los lípidos presentes en la muestra, realizar una hidrólisis ácida, básica o enzimática para liberar los enlaces glicosídicos, y finalmente realizar un proceso de derivatización que transforme a los compuestos fenólicos en compuestos más volátiles [166]. A pesar de estas desventajas, la GC se ha utilizado para el análisis de compuestos fenólicos en matrices vegetales como vino [213-215], arándanos [216], zumos [217, 218], etc, así como en muestras biológicas como plasma [219] y orina [220].

Sin embargo, a pesar de las aplicaciones que tiene la cromatografía de gases para el análisis de compuestos fenólicos, es la **cromatografía de líquidos** (LC) la técnica



separativa por excelencia para el análisis de estos compuestos. Esta técnica separativa suele acoplarse a distintos sistemas de detección, fundamentalmente a la espectroscopía UV-Vis y a la espectrometría de masas (MS), aunque también se utilizan la detección electroquímica (ECD), fluorimétrica (FD) e incluso resonancia magnética nuclear (RMN). [198, 221]. Es gracias a esta versatilidad por lo que se ha seleccionado esta técnica separativa para los estudios realizados en esta memoria, y es por esto que se le dedica especial atención.

4.2.1.1 Fundamentos de la LC.

153

La **Cromatografía Líquida** (LC) es una técnica de separación donde los componentes de la muestra se distribuyen entre una fase móvil líquida (el disolvente) y una fase estacionaria (el relleno de la columna). El fenómeno de separación se basa en las distintas afinidades que presentan los constituyentes de la muestra hacia cada una de estas fases. La fase estacionaria puede ser un sólido poroso, generalmente particulado, o bien una sustancia líquida ligada a un soporte sólido formando una capa fina en su superficie. Estas fases estacionarias suelen estar contenidas en el interior de un tubo habitualmente metálico, que es lo que se conoce



con el nombre de columna cromatográfica. La fase móvil es un disolvente o mezcla de ellos a los que en algunas ocasiones se les modifica el pH mediante adición de ácidos, bases o disoluciones reguladoras.

En una separación llevada a cabo mediante esta técnica, la fase móvil líquida es impulsada con ayuda de una bomba a través del sistema hacia la columna cromatográfica donde se lleva a cabo la separación. Esta fase móvil es la encargada de transportar la muestra hacia la columna, donde sus componentes quedan retenidos en menor o mayor extensión en la fase estacionaria dependiendo de sus propiedades físico-químicas, eluyendo de la columna los compuestos menos retenidos por la fase estacionaria y que sienten más afinidad por la fase móvil, produciéndose de esta forma la separación de los analitos. Una vez que la separación de los componentes de la muestra ha tenido lugar en el lecho cromatográfico, los analitos ya separados eluyen progresivamente de la columna y deben ser detectados produciendo una señal medible. Las características de la señal, como la intensidad o duración, estarán relacionadas con la naturaleza o cantidad de analito que produce la señal. Generalmente esa señal es amplificada, registrada y



transformada en un cromatograma que nos permite identificar y cuantificar los analitos.

En cuanto a la instrumentación, comercialmente existen distintas configuraciones de equipos, sin embargo todo equipo de LC debe constar de una serie de componentes básicos que son comunes a todos los modelos: bomba, inyector, columna cromatográfica, horno termostatzado, detector y sistema de adquisición de datos. En la **Figura 19** se representa el esquema básico de un equipo de HPLC y se muestra el aspecto de uno comercial.

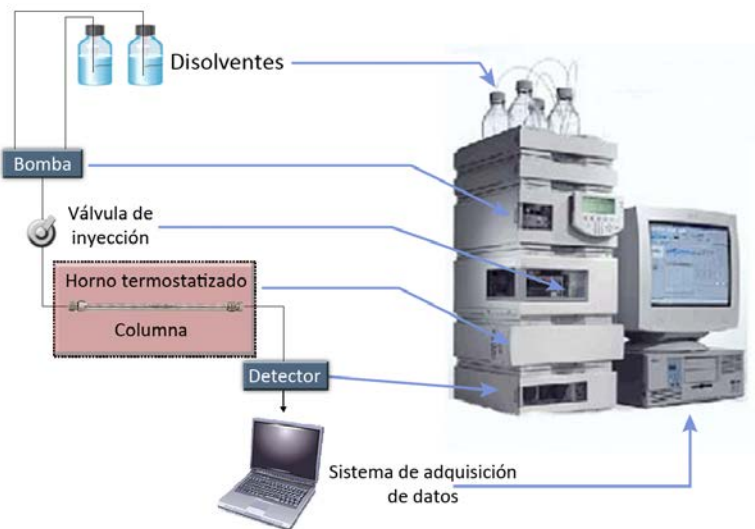


Figura 19. Esquema simplificado de un equipo de LC junto a uno comercial



De acuerdo a la naturaleza de la fase estacionaria se pueden diferenciar distintos modos de LC, que se recogen en la siguiente tabla.

MODO DE LC	FASE ESTACIONARIA
Cromatografía de partición	Líquido retenido en un soporte sólido
Cromatografía de adsorción	Sólido con propiedades superficiales
Cromatografía de cambio iónico	Sólido con propiedades cambiadoras de iones
Cromatografía de exclusión por tamaños	Sólido con porosidad controlada
Cromatografía de afinidad	Sólido con propiedades de retención bioespecíficas
Cromatografía quiral	Reactivo quiral unido a fase móvil o al soporte sólido

156

Tabla 4. Modos de LC en función de la fase estacionaria empleada.

De todos ellos, el más ampliamente utilizado es la cromatografía de partición, para la cual dependiendo de la polaridad de la fase móvil y estacionaria se distinguen dos modalidades:

- Cromatografía en fase normal, donde la fase estacionaria presenta una naturaleza polar y la fase móvil es apolar. En esta modalidad los analitos apolares son poco retenidos por la fase estacionaria y eluyen en primer lugar, mientras



que los analitos polares son fuertemente retenidos por la fase estacionaria y eluyen posteriormente.

- Cromatografía en fase reversa, donde la fase estacionaria es de naturaleza apolar y el disolvente de elución o fase móvil es polar. En este caso el proceso de separación es el inverso al que ocurre en fase normal, ya que los compuestos apolares serán retenidos durante más tiempo por la fase estacionaria y los analitos polares abandonarán la columna al comienzo de la separación.

157

No sólo podemos distinguir los modos de LC en función de las polaridades de fases móvil y estacionaria, sino que en función del flujo de fase móvil y las características de la columna donde se encuentra la fase estacionaria podemos diferenciar las técnicas de LC en diversas categorías conocidas como UPLC o RRLC, HPLC, micro-LC, LC capilar y nano-LC (**Tabla 5**).



	UPLC/RRLC	HPLC	Micro-LC	LC Capilar	Nano-LC
Diámetro interno (mm)	1.5 - 4.5	1.5 - 4.5	0.8	0.18 - 0.32	0.075 - 0.1
Longitud (mm)	3 - 15	3 - 30	5 - 25	5 - 25	5 - 15
Tamaño partícula (µm)	< 2	3 - 40	3 - 5	3 - 5	3 - 5
Flujo fase móvil	0.2 - 5 ml/min	0.2 - 2.5 ml/min	10 - 100 µl/min	1 - 10 µl/min	0.1 - 1 µl/min

Tabla 5. Principales diferencias entre los distintos tipos de LC.

158

Dependiendo del diámetro de la columna, se denomina nano-LC cuando las columnas empleadas poseen diámetros de entre 10 y 100 µm, LC capilar si los diámetros oscilan entre 100 y 500 µm, micro-LC cuando las columnas usadas tienen diámetros un poco superiores, alrededor de 800 µm y finalmente HPLC cuando se emplean columnas con diámetro interno de entre 1.5 a 4.5 mm.

Dentro de la categoría de HPLC, en función del tamaño de partícula de la fase estacionaria, podemos diferenciar entre HPLC convencional cuando el tamaño de partícula de los rellenos de las columnas oscila entre 3-40 µm, y la denominada cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC) o cromatografía líquida de resolución rápida (RRLC) cuando se utilizan fases estacionarias con tamaños de partícula inferiores a 2 µm. La ventaja del uso de estos



tamaños de partícula tan pequeños es que al utilizar flujos relativamente elevados y longitudes de columna menores, se puede mantener la eficacia de la separación en menor tiempo o conseguir mayor eficacia en el mismo tiempo de análisis. Gracias a las presiones tan elevadas a las que trabajan los equipos disponibles comercialmente, algunos de hasta 1.250 bares, y los diámetros de partícula tan pequeños que presentan las columnas, se consigue aumentar la eficacia de la separación de manera significativa, aumentando los platos teóricos desde los 15.000-25.000 que presenta la HPLC convencional hasta los 100.000 platos teóricos que consigue la UPLC/HPLC [222].

159

4.2.1.2 Análisis de compuestos fenólicos mediante HPLC/UPLC.

Los compuestos fenólicos son ácidos débiles que presentan cierta hidrofobicidad en su forma neutra, por lo que su análisis mediante LC suele realizarse mediante cromatografía de partición en fase reversa, aunque se han empleado métodos de cromatografía en fase normal para la separación de algunas familias de compuestos fenólicos, como las antocianinas [223].



160 Como se ha comentado previamente, en cromatografía en fase reversa se utilizan como fases móviles disolventes polares, generalmente mezclas binarias de disoluciones acuosas acidificadas con distintos ácidos (ácido acético, fórmico, fosfórico, etc) con disolventes orgánicos polares, fundamentalmente acetonitrilo o metanol. Aunque se han optimizado métodos para separar compuestos fenólicos de una misma familia utilizando gradientes isocráticos[194, 224, 225], la mayoría de aplicaciones emplean elución en gradiente. Los gradientes utilizados para los compuestos fenólicos comienzan con un bajo porcentaje de fase orgánica, entre un 0-10 % (v/v) si se utiliza acetonitrilo o 5-10 % en el caso del metanol, y terminan con porcentajes elevados, entre 40-100 % de metanol y entre 30-90 % de acetonitrilo. El tipo de ácido empleado para acidificar la fase móvil depende por un lado del tipo de detector empleado, y por otro de la naturaleza de los analitos. En cuanto al sistema de detección, cuando se utiliza espectroscopía de absorción UV-Vis se permite el uso de ácidos fuertes como el ácido fosfórico y ajustar el pH de la fase móvil a valores muy bajos, sin embargo si el detector usado es un espectrómetro de masas, la concentración de ácido debe ser mucho menor para no afectar a la detección. Por otro lado, dada la gran diversidad



de los compuestos fenólicos, para la separación de los más polares, como los ácidos fenólicos, se utilizan ácidos débiles ya que se mejora la separación al evitar que estos compuestos se ionicen en la columna. Sin embargo para compuestos fenólicos menos polares, como los flavonoides, al presentar menor tendencia a ionizarse no es necesario el uso de ácidos y se pueden separar con fases móviles neutras. Aunque la selección de fases móviles dependerá de cada problema analítico, se ha observado que cuando se utiliza acetonitrilo como disolvente orgánico el uso de ácido fórmico conseguía mayor sensibilidad, y cuando se emplea metanol el ácido acético es preferible [226].

161

La fase estacionaria en la cromatografía en fase reversa es de naturaleza apolar, las más empleadas en el caso del análisis de compuestos fenólicos son las que tienen rellenos de sílice modificada químicamente con cadenas de hidrocarburos, generalmente de n-octilo (C-8) o n-octadecilo (C-18). Respecto a dimensiones de columnas y tamaños de partícula, comercialmente hay disponibles una gran variedad de ellas. En el caso del análisis de polifenoles las columnas de HPLC convencional son las más usadas, con tamaños de partícula que oscilan entre 3 y 5 μm [189, 191, 192, 205], aunque recientemente el uso de UPLC O RRLC se ha



extendido ampliamente para el análisis de polifenoles en matrices vegetales y muestras biológicas [185, 202, 206, 227].

4.2.2 Sistemas de detección.

Una vez llevada a cabo la separación de los componentes de la muestra por alguna de las técnicas separativas, se requiere la presencia de un detector que produzca una señal medible cuando los analitos eluyan tras la separación. Sistemas de detección los hay muy diversos, pero todos ellos deberían cumplir una serie de requisitos que definen un detector ideal, y son los siguientes:

162

- ✓ Elevada sensibilidad.
- ✓ Alta relación señal ruido, es decir una elevada sensibilidad que nos asegure señales analíticas intensas en respuesta al analito combinado con una baja fluctuación de la señal de fondo o ruido. Idealmente la señal debería ser nula en ausencia de analito, sin embargo instrumentalmente no es factible. Para que la señal analítica no sea perturbada conviene que el ruido de fondo sea lo más pequeño y



constante posible. Esto se traduce en bajos límites de detección.

- ✓ Respuesta rápida ante pequeños cambios en la concentración del analito.
- ✓ Debe proporcionar señales reproducibles y estables, o lo que es lo mismo, señales que se traduzcan en resultados fiables.
- ✓ Debe poseer un amplio intervalo de respuesta lineal.
- ✓ Ser selectivo, aunque en algunas aplicaciones no es necesario una elevada selectividad.
- ✓ No debe afectar la eficacia de la separación alcanzada en la técnica separativa.

163

Los detectores disponibles comercialmente no cumplen todas estas características, pero cuanto mayor número de estos requisitos cumplan más se acercarán a ser un detector ideal. Como ya se ha comentado, detectores los hay muy diversos, la elección del detector idóneo para cada aplicación se hace en base a la naturaleza y propiedades de los analitos a determinar así como a la sensibilidad requerida y tipo de información que se desea obtener (estructural, cuantitativa, etc.). Los sistemas de detección más usuales se pueden englobar en tres grandes grupos: ópticos,



electroquímicos y de otro tipo. Los ejemplos más representativos de estos grupos se muestran en el diagrama de la **Figura 20**.



Figura 20. Diagrama de los principales sistemas de detección

En el caso de la determinación de compuestos fenólicos los más utilizados son la detección espectrofotométrica UV-Vis y la espectrometría de masas (MS), ambas utilizadas en esta memoria acopladas a la LC y



por lo que le dedicamos una especial atención. A pesar de que estos detectores son los más frecuentes, los detectores electroquímicos, de fluorescencia o la resonancia magnética nuclear también han encontrado su aplicación en el análisis de compuestos fenólicos [189, 190, 197, 198, 221].

4.2.2.1 Espectroscopía de absorción UV-Vis

La detección mediante la **espectroscopía de absorción UV-Vis** se fundamenta en la interacción que se produce entre la radiación UV-Vis y la materia, lo que origina fenómenos de absorción de determinadas longitudes de onda de dicha radiación por parte de los analitos. Los detectores de absorción UV-Vis pueden ser de longitud de onda fija, donde sólo se mide la radiación absorbida de una longitud de onda fijada; o de longitud de onda variable, también conocidos como detectores de diodos en fila o “diodo array” (DAD), los cuales adquieren los espectros completos de absorción UV-Vis de los analitos que pasan a través de la celda de detección. Estos últimos son los más usados para el acoplamiento a técnicas separativas, en especial a LC y CE.

165

Son muchas las moléculas que pueden absorber radiación de esta zona del espectro electromagnético, por lo



que este detector se puede considerar universal. Este comportamiento presenta la ventaja de que pueda emplearse para resolver una gran cantidad de problemas analíticos, pero también puede resultar un inconveniente en aquellos casos en los que se requiere selectividad. La detección UV-Vis es muy robusta, lo que lo convierte en uno de los detectores más usados en análisis cuantitativos. Para análisis cualitativos, dado que no proporciona información estructural, no permite identificar de manera inequívoca compuestos si no se dispone de patrones comerciales, lo cual es un inconveniente. Sin embargo su sencillez, rapidez y relativo bajo costo hacen que su uso esté ampliamente extendido.

166

En el caso de los compuestos fenólicos, los múltiples enlaces conjugados presentes en dichos compuestos los convierten en cromóforos que presentan bandas de absorción en la región UV e incluso en el visible, como es el caso de las antocianidinas y algunos flavonoles. En general los compuestos fenólicos presentan un espectro con dos bandas principales de absorción, comúnmente denominadas banda I (300-380 nm) y banda II (240-280 nm) [228]. A pesar de estas bandas de absorción comunes, cada familia de compuestos fenólicos posee unas bandas de absorción características que se muestran en la **Tabla 6**. Esta información, a pesar de no ser



estructural, nos puede ayudar en análisis cualitativos a acotar la búsqueda del compuesto al proporcionarnos información sobre la familia a la que pertenecen los analitos.

COMPUESTOS	BANDAS UV (nm)	
Ácidos Benzoicos	270 - 280	
Ácidos cinámicos	305 - 325	
Cumarinas	220 – 230	310 - 350
Chalconas	220 – 270	340 - 390
Dihidrochalconas	~220	~280
Auronas	240 – 270	340 - 370
Flavonas	250 – 270	330 - 350
Flavonoles	250 – 270	350 - 380
Flavanonas	270 - 295	
Flavanoles	270 - 280	
Antocianidinas	240 – 280	450 - 560
Isoflavonas	245 – 270	300 - 340
Proantocianidinas	~ 280	

167

Tabla 6. Bandas de absorción características de diversas familias de compuestos



4.2.2.2 Espectrometría de masas (MS).

La **espectrometría de masas** se basa en la separación a vacío de iones en fase gaseosa de acuerdo a su relación masa/carga (m/z). En los últimos años este sistema de detección ha experimentado un auge espectacular, lo cual se debe a las ventajas que posee, principalmente a su selectividad y al hecho de que es uno de los pocos sistemas de detección que proporciona información estructural (la RMN proporciona este tipo de información pero tiene la desventaja de su falta de sensibilidad). A esto se le suma el hecho de que cuando se acopla a una técnica separativa, como puede ser la LC, el uso de este detector proporciona una segunda dimensión de separación, ya que tras la separación de los analitos en la técnica separativa, se produce una segunda separación de los mismos en el espectrómetro de masas en función de su relación m/z .

Existen diversos tipos de espectrómetros de masas, pero todos incluyen los siguientes elementos básicos: un sistema de introducción de muestra, un sistema de ionización, un acelerador de iones a través de un campo eléctrico, un analizador que dispersa los iones en función de su relación masa/carga, un detector de iones y finalmente un sistema de



adquisición de datos que procesa la señal generada por el detector.

Existen distintos sistemas de ionización y analizadores de masas, los más utilizados, especialmente para el acoplamiento con LC, son los que se muestran en la **Tabla 7**.

SISTEMAS DE IONIZACIÓN	ANALIZADORES DE MASAS
Ionización química a presión atmosférica (APCI)	Cuadrupolo (Q)
Ionización por electrospray (ESI)	Triple Cuadrupolo (QqQ)
Desorción/ionización asistida por una matriz (MALDI)	Trampa de Iones (IT)
Flujo continuo y bombardeo con átomos rápidos (CF-FAB)	Tiempo de vuelo (TOF)
Plasma acoplado inductivamente (ICP)	Cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF)
Ionización por termonebulización (TS)	Transformada de Fourier-Resonancia ciclotrónica (FT-ICR)

169

Tabla 7. Sistemas de ionización y analizadores de masas más utilizados en el acoplamiento HPLC-MS

Para el trabajo experimental que se recoge en la presente memoria se ha utilizado como sistema de ionización la ionización por electrospray (ESI), y los analizadores de



masas tiempo de vuelo, cuadrupolo-tiempo de vuelo y cuadrupolo-tiempo de vuelo de ultra-alta resolución, a los cuales se les dedica un apartado.

- *Sistemas de ionización: Ionización por electrospray (ESI).*

170 Para llevar a cabo el acoplamiento de una técnica que trabaja en fase líquida, como es la LC, con un espectrómetro de masas, en el que las sustancias para ser analizadas deben entrar en fase gaseosa, es necesaria una interfase adecuada. Se han desarrollado diferentes tipos de interfases como puede observarse en la **Tabla 7**, siendo la más empleada la ionización por electrospray (ESI), especialmente en la determinación de compuestos fenólicos gracias a que es muy eficaz en el análisis de compuestos polares, lábiles y/o con bajo peso molecular, como lo son estos compuestos.

En el proceso de formación del electrospray, el cual se lleva a cabo a presión atmosférica, intervienen diversos mecanismos al mismo tiempo. La muestra en estado líquido, procedente de la técnica empleada para su separación, es conducida a través de un capilar de acero inoxidable de pequeño diámetro cuyo extremo se encuentra sometido a un



potencial eléctrico elevado (3-6 kV). Con la ayuda de un gas nebulizador, generalmente nitrógeno, que fluye a través de un tubo coaxial al capilar por donde es transportada la muestra, y gracias al campo eléctrico formado por la aplicación del potencial en el capilar principal, la muestra forma una serie de microgotas cargadas eléctricamente. El disolvente de las microgotas formadas se va evaporando en un proceso conocido como desolvatación, y éstas van aumentando su densidad de carga eléctrica. Como consecuencia, se reduce el área superficial de las gotas y los iones se ven forzados a aproximarse entre sí, aumentando la densidad de carga sobre la superficie. En cierto momento, las fuerzas de repulsión de los iones de signo contrario superan la tensión superficial que mantiene unidas las microgotas, alcanzando el denominado límite de Rayleigh, momento en el que las gotas se vuelven inestables y comienzan a sufrir el proceso conocido como “explosiones de Coulomb”. Este proceso se repite de manera sucesiva hasta que finalmente se forman iones cargados en fase gaseosa con una o más cargas, que son atraídos hacia la entrada del espectrómetro de masas debido al voltaje aplicado (**Figura 21**).

171

En el proceso de ionización se pueden formar iones mono- o multicargados, por lo que utilizando analizadores de



masas que trabajan con un rango de valores de m/z limitado es posible detectar compuestos con pesos moleculares elevados. La ionización se puede llevar a cabo en modo positivo o negativo. En el modo positivo, se podrán formar iones múltiplemente protonados $[M+nH]^{n+}$, donde n es el número de protones cargados positivamente en la molécula. Del mismo modo, es posible también la formación de aductos con iones sodio, litio, potasio, amonio, etc. En el modo negativo, se observa normalmente la desprotonación de las moléculas, pudiéndose formar también iones múltiplemente desprotonados $[M-nH]^{n-}$.

172

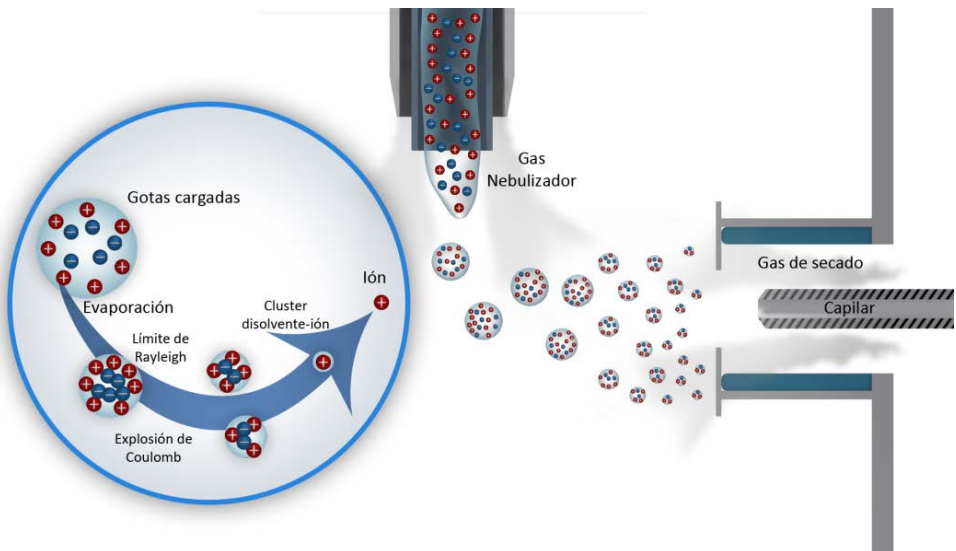


Figura 21. Esquema de proceso de formación del electro spray.



El diseño específico de la interfase ESI es distinto según la técnica separativa a la que se acople. En el caso del acoplamiento LC-MS, el principal problema que debe solventarse es que el flujo de fase móvil procedente del cromatógrafo es demasiado elevado y no puede introducirse en la mayoría de los casos directamente en el espectrómetro de masas. Generalmente los flujos de fase móvil en la separación cromatográfica oscilan entre 0.2-0.8 ml/min, pero en algunos casos pueden emplearse flujos mayores que alcanzan los 3 ml/min. A pesar de que las interfases ESI comerciales admiten flujos comprendidos entre 1 μ l/min y 1 ml/min, el flujo recomendado a la entrada del espectrómetro de masas es menor, oscila entre 0.2-0.5 ml/min, dependiendo del analizador. La solución a este problema radica en el empleo de divisores de flujo entre el cromatógrafo de líquidos y el espectrómetro de masas, donde sólo parte del eluyente es introducido en el analizador de masas. El principal inconveniente es que al desecharse parte de la muestra antes de entrar en el sistema de detección se produce una disminución de sensibilidad. Para evitar este inconveniente en algunas aplicaciones se utilizan flujos de fase móvil de 0.2 ml/min, los cuales se pueden introducir directamente en el analizador de masas sin que se vea mermada la ionización.



- *Analizadores de masas: Tiempo de vuelo (TOF), Cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF) y Cuadrupolo-tiempo de vuelo de ultra-alta resolución (UHR-Qq-TOF).*

Una vez que en la interfase se ha llevado a cabo la transformación de los iones procedentes de la técnica separativa desde la fase líquida a la fase gaseosa, los iones son dirigidos hacia el interior del analizador de masas. Estos analizadores de masas permiten la separación, detección y cuantificación de los analitos en estudio con un grado de sensibilidad y selectividad muy elevado, proporcionando información sobre su masa molecular.

174

Existen diversos tipos de analizadores: cuadrupolos, trampas de iones, sectores magnéticos, analizadores de tiempo de vuelo, etc. En el desarrollo experimental de esta memoria, se han utilizado los analizadores de tiempo de vuelo (TOF), cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF) y cuadrupolo-tiempo de vuelo de ultra-alta resolución (UHR-Qq-TOF).



○ Tiempo de vuelo (TOF)

El **analizador de tiempo de vuelo** (TOF) separa los iones según la distinta velocidad que adquieren en el interior del tubo de vuelo en función de su relación m/z . En primer lugar, los iones son extraídos de la cámara de ionización y dirigidos hacia el tubo de vuelo, lugar en el que se aceleran por aplicación de un campo electrostático que les aporta una elevada energía cinética. Los iones de mayor m/z “volarán” a menor velocidad que los de menor m/z a lo largo del tubo de vuelo, consiguiéndose su separación. La resolución entre los iones de diferente m/z será mayor cuanto mayor sea la longitud del tubo de vuelo del espectrómetro de masas (habrá una mayor separación de los iones en el tiempo) y cuanto menor sea la dispersión en energía cinética de los iones.

175

A continuación se muestra el esquema del interior de un espectrómetro de masas TOF.



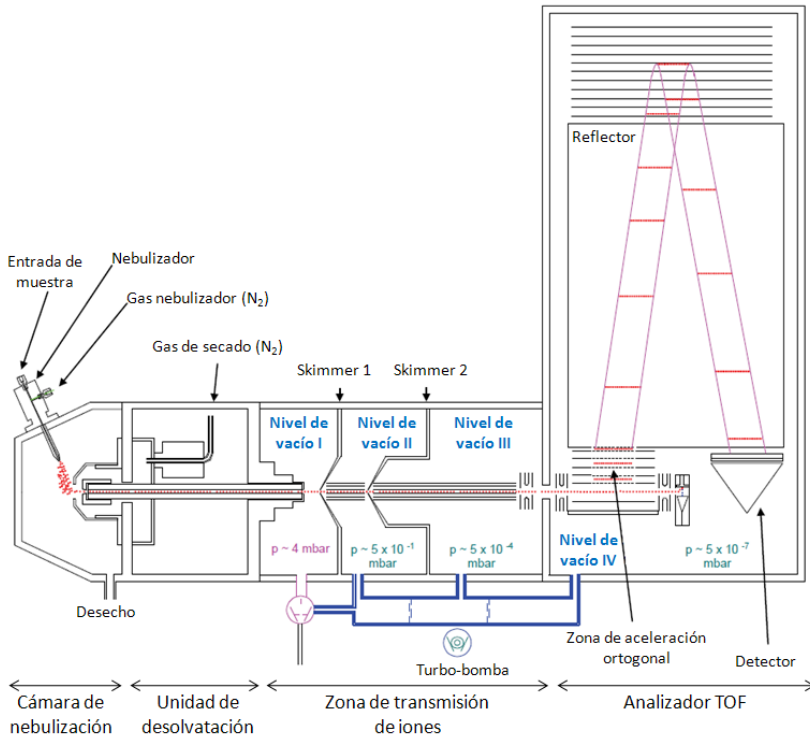


Figura 22. Esquema detallado de las partes de un espectrómetro de masas TOF

Los iones formados en la **cámara de nebulización** son atraídos hacia la unidad de desolvatación, y la atraviesan conducidos en el interior de un capilar de vidrio. Esta **unidad de desolvatación** consta además del capilar de vidrio de un calentador de gas de secado. Esta zona conecta la cámara de ionización, que se encuentra a presión atmosférica con la zona de transmisión de iones, que se encuentra a alto vacío. La **zona de transferencia óptica o transmisión de iones** está formada por tres zonas de alto vacío diferenciadas separadas



entre sí por dos skimmers. Los iones son transportados a lo largo de la zona de transferencia por dos hexapolos, y las lentes son las encargadas de focalizarlos y dirigirlos hacia el analizador TOF propiamente dicho.

El **analizador TOF** consta de tres zonas diferenciadas: la zona de aceleración ortogonal, el reflector y el detector. Una vez que los iones atraviesan la zona de transferencia óptica llegan a la zona de aceleración ortogonal, donde son acelerados por aplicación de un campo eléctrico intermitente hacia el tubo de vuelo. Los iones gracias a su energía cinética viajan por el tubo de vuelo hasta alcanzar el reflector, la segunda zona del analizador, que permite corregir la dispersión en la energía cinética de los iones, consiguiendo de esta manera un aumento de la resolución. Detrás del mismo existen unas zonas de tensión que repelen los iones que le llegan y los dirigen hacia el último componente del analizador, un detector de impacto eléctrico, que convierte el impacto de los iones que lo alcanzan en señales eléctricas. El detector consta de una serie de placas a alto voltaje que presentan una gran número de poros recubiertos de una capa semiconductor, de manera que cada uno de estos poros se convierte en un multiplicador de electrones independiente. También hay un detector de referencia, que nos indica la



existencia de algún problema en la transferencia de los iones, ya que una ausencia de señal en este detector indica que los iones no están llegando a la zona de aceleración ortogonal.

Las principales ventajas de este detector es que es un detector rápido, sensible, de gran resolución que proporciona valores de masa muy exactos. Además la combinación de los valores de masas exactas que proporciona junto con la de la distribución isotópica, permite la determinación de la fórmula molecular del analito, lo cual facilita en gran manera la identificación.

178 Algunas de las especificaciones de los analizadores TOF comerciales son un rango de masas de 50-3.000 m/z, una resolución de 10.000-15.000 FWHM, y una exactitud de 3 ppm en el caso de que se realice calibración interna o de 5 ppm cuando es una calibración externa.

○ **Cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF).**

El **analizador de masascuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF)** es muy parecido al analizador de masas tiempo de vuelo (TOF), la principal diferencia es que a los componentes básicos de un TOF se le suma un cuadrupolo y una celda de colisión. Los skimmers que separaban los distintos módulos



de la zona de transmisión en el TOF, se sustituyen por **funnels**, que son anillos concéntricos apilados en forma de embudo, que evitan la pérdida de iones, mejorando la transmisión óptica y como consecuencia la sensibilidad. El **cuadrupolo** tiene la misión de seleccionar determinados iones para posteriormente fragmentarlos en la **celda de colisión** con la ayuda de un gas de colisión, que generalmente es nitrógeno. Los iones fragmentados se separan de la misma manera que en un analizador TOF, en función de su relación m/z . En la **Figura 23** se muestra el esquema básico de un QTOF.

La ventaja principal de un analizador de masas QTOF es que añade un tercer nivel de información para la identificación de compuestos con la posibilidad de hacer análisis de MS/MS, lo que se suma a la exactitud de masas y a la distribución isotópica que ya proporcionaba el TOF.

179

Además gracias a las pequeñas modificaciones en su diseño mejora algunas de las especificaciones técnicas del TOF, como el rango de masas, que es más amplio (50-20.000 m/z), o la resolución que es más elevada (17.500-20.000 FWHM). A esto se le suma la posibilidad de llevar a cabo análisis de MS/MS para estudiar el patrón de fragmentación



de los compuestos, con una exactitud de 3 ppm en el caso de calibración interna o de 5 ppm para calibración externa tanto de iones precursores como de fragmentos.

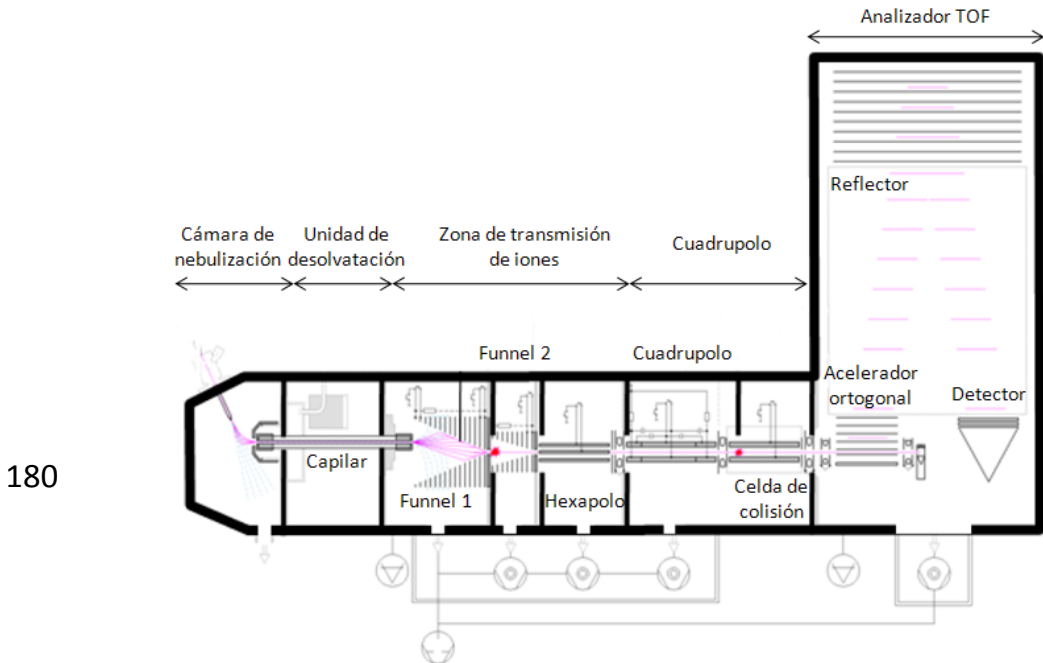


Figura 23. Esquema detallado de las partes de un espectrómetro de masas QTOF.

- **Cuadrupolo-tiempo de vuelo de ultra-alta resolución (UHR-Qq-TOF).**

El **analizador de masas cuadrupolo-tiempo de vuelo de ultra-alta resolución (UHR-Qq-TOF)** es muy parecido al analizador de masas cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF), las

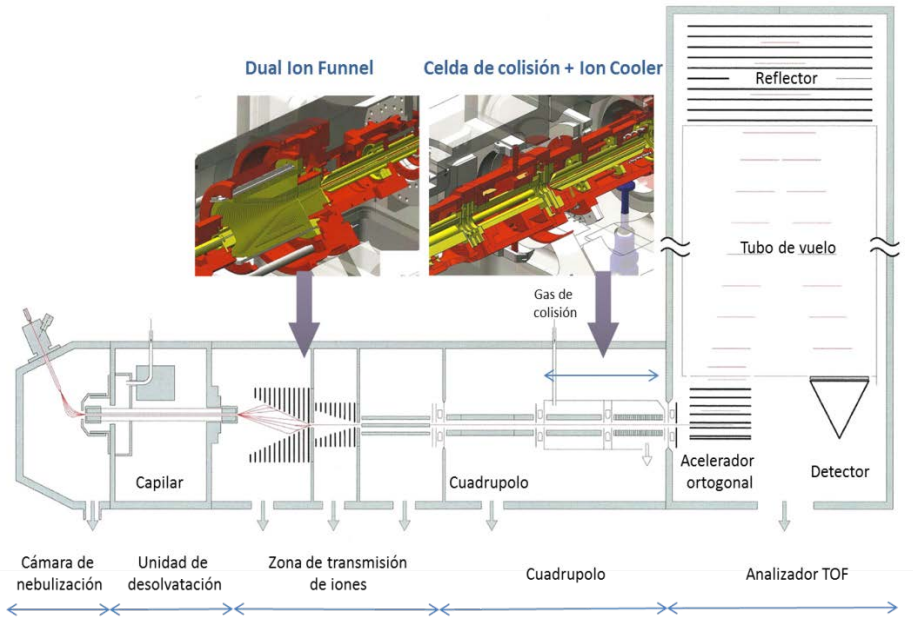


principales diferencias en base a los componentes básicos de un QTOF es la mayor longitud del tubo de vuelo, un nuevo diseño de los funnels, sustituyéndose éstos por un diseño dual, así como de la celda de colisión y un nuevo compartimento denominado “ion cooler”, situado tras la celda de colisión. Este nuevo diseño dual del funnel mejora la transmisión óptica y como consecuencia la sensibilidad. En nuevo diseño de la celda de colisión permite una mayor sensibilidad en los experimentos de MS/MS. Además el ion cooler situado tras la celda de colisión disminuye la dispersión de energía de los iones antes de ser acelerados ortogonalmente en el tubo de vuelo, lo que unido a la mayor longitud de éste en el diseño del UHR-Qq-TOF con respecto al QTOF, se traduce en una mejora de la resolución (**Figura 24**).

181

Gracias a las pequeñas modificaciones en su diseño mejora algunas de las especificaciones técnicas del QTOF, como una exactitud inferior a una ppm y una resolución mayor de 75.000 FWHM. A esto se le suma una extremada sensibilidad a lo largo de todo el rango de masas, abarcando desde moléculas muy pequeñas hasta proteínas completas, además de ser un sistema muy robusto y fácil de usar.





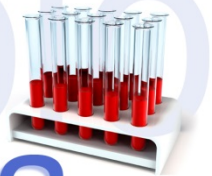
182

Figura 24. Esquema detallado de las partes de un espectrómetro de masas UHR-Qq-TOF, con detalle de las diferencias en el diseño respecto del QTOF.



Metodolo

Metodología



Bloque I

Bloque I

Rosmarinus Officinalis



METODOLOGÍA

Bloque I: *Rosmarinus officinalis*

1. Reactivos.

Todos los reactivos usados en esta memoria fueron de grado analítico. Para la extracción de los compuestos presentes en las hojas de romero se utilizó etanol suministrado por VWR BDH Prolabo (Madrid, España), agua Milli-Q obtenida de un equipo de purificación Millipore (Bedford, MA, USA), metanol proporcionado de Panreac Química (Barcelona, España) y CO₂ licuado a elevada presión (N-48) suministrado por Praxair (Madrid, España). Para la extracción con MAE se utilizaron distintos disolventes, metanol, etanol, acetona, acetato de etilo, así como ácido clorhídrico y ácido acético proporcionados por Centrohem (Vuka Karadzica bb, 22300 Stara PAzova, Serbia).

187

Para el aislamiento y purificación de los compuestos mediante cromatografía semipreparativa, así como para los análisis mediante HPLC-MS se utilizó ácido fórmico adquirido de Fluka, Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania), acetonitrilo de



calidad masas de Fisher Scientific (Madrid, España) y agua doblemente desionizada obtenida de un sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, USA). Finalmente para disolver las muestras se utilizaron etanol de Panreac (Barcelona, España), metanol y dimetilsulfóxido (DMSO), ambos procedentes de Fisher Scientific (Madrid, España).

188 Para la cuantificación de los extractos de romero de los Capítulos 2 y 3 se han utilizado como estándares luteolina, luteolina-7-O-glucósido, diosmetina, ácido rosmarínico, genkwanina, neohesperidina, epigallocatequina, y ácido ursólico de Extrasynthese (Genay, Francia); homoplantagenina proporcionada por Chengdu Biopurity Phytochemicals (Chengdu, Sichuan, China); ácido quínico de Acros Organics (Geel, Bélgica), y finalmente apigenina, ácido siríngico, carnosol y ácido carnósico adquiridos de Fluka, Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania). Las disoluciones de estos patrones se prepararon en DMSO y metanol proporcionados por Fisher Scientific (Madrid, España).

2. Muestras.

Las muestras para los capítulos 1 y 3 son hojas de *Rosmarinus officinalis* L. obtenidas de Herboristería Murciana



(Murcia). Estas hojas fueron secadas siguiendo un método tradicional, que consiste en que una vez recolectadas se airean para eliminar la humedad, se cubren con una blanqueta para evitar que le dé la luz del sol y se dejan secar en una habitación ventilada durante 20 o 30 días, dependiendo de la estación del año en la que nos encontremos. Posteriormente, una vez secadas las hojas, se procede a su molienda usando nitrógeno líquido y se realiza un tamizado de la muestra molida seleccionando un tamaño de partícula adecuado, que normalmente oscila entre 500 y 999 μm . Una vez hecho esto las muestras se almacenaron a -20 °C.

189

En cuanto a las muestras para el capítulo 2, éstas son hojas de *Rosmarinus officinalis* L. obtenidas mediante un muestreo al azar en diferentes zonas geográficas de Serbia (**Figura 25**), y cuyos datos se recogen en la **Tabla 8**. De cada punto de recolección se tomó una muestra compuesta que pesaba alrededor de unos 3 kg. Las hojas fueron separadas cuidadosamente del resto de materia vegetal, y secadas mediante un método tradicional, como en el caso de las muestras de los capítulos 1 y 3, durante dos semanas a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente las hojas secas fueron molturadas, homogeneizadas, y



finalmente tamizadas (tamaño de partícula entre 500 y 999 μm) formando muestras representativas de cada punto.

190

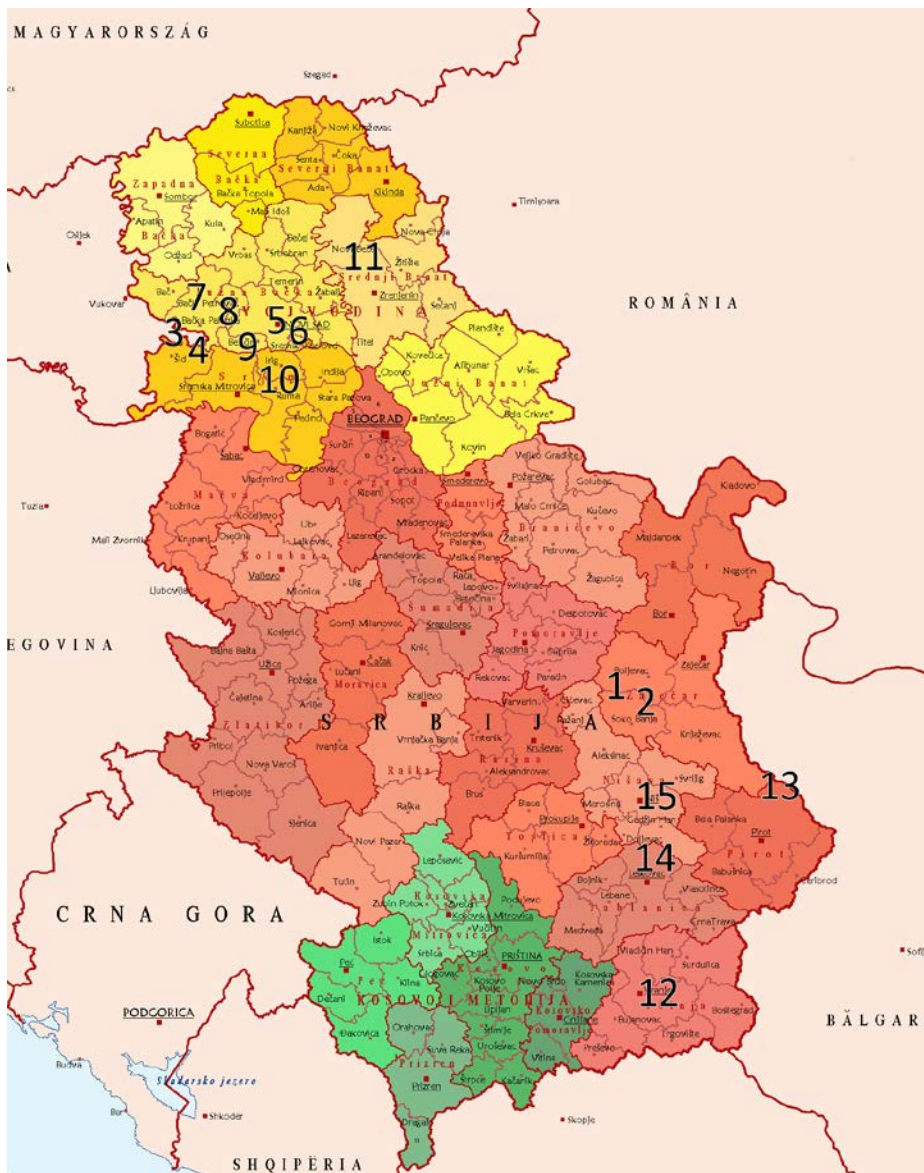


Figura 25. Mapa de Serbia mostrando las diferentes zonas de recolección de los extractos del Capítulo III .



Tabla 8. Codificación de los extractos de romero del Capítulo III, junto con origen geográfico, altitud y fecha de recolección.

Codificación muestra	Origen	Fecha recolección	Altitud (m)
1	Sokobanja 1 (sur de Serbia)	Enero 2012	400
2	Sokobanja 2 (sur de Serbia)	Enero 2012	415
3	Baćka Palanka (Vojvodina)	Diciembre 2011	80
4	Baćka Palanka (Vojvodina)	Diciembre 2011	80
5	Novi Sad 1 (Vojvodina)	Diciembre 2011	72
6	Novi Sad 2 (Vojvodina)	Diciembre 2011	80
7	Silbaš (Vojvodina)	Diciembre 2011	85
8	Gložan (Vojvodina)	Diciembre 2011	83
9	Čelarevo (Vojvodina)	Diciembre 2011	76
10	Fruška Gora (Vojvodina)	Diciembre 2011	539
11	Zrenjanin (Vojvodina)	Diciembre 2011	80
12	Vranje (sur de Serbia)	Diciembre 2011	487
13	Stara Planina (sur de Serbia)	Diciembre 2011	764
14	Leskovac (sur de Serbia)	Diciembre 2011	225
15	Niš (sur de Serbia)	Diciembre 2011	194



3. Procesos de extracción.

Los procesos de extracción utilizados para la obtención de extractos fenólicos a partir de hojas de romero fueron SFE, PLE y MAE. Para los capítulos 1 y 3 se utilizaron extractos obtenidos mediante SFE y PLE, mientras que para el capítulo 2 los extractos fueron obtenidos mediante MAE.

3.1 Extracción con Fluidos Supercríticos (SFE).

192

Las extracciones con fluidos supercríticos se llevaron a cabo en un extractor de fluidos supercríticos de escala piloto (modelo SF2000, Thar Technology, Pittsburg, PA, USA), formado por una celda de extracción cilíndrica de 2 L y dos separadores, cada uno de 0.5 L de capacidad, con un control independiente de presión y temperatura. El equipo posee un sistema de recirculación de CO₂, donde el CO₂ se condensa y se bombea a la presión deseada para la extracción. A continuación en la **Figura 26** se muestra una foto del equipo utilizado.





Figura 26.Extractor SFE modelo SF 2000, Thar Technology.

Para cada extracción se llenó la celda con 0.5 kg de romero seco y molturado como se describe en el apartado 2. Se llevaron a cabo dos experimentos de extracción, en ambos se fijó una temperatura de 40 °C en la celda de extracción así como en los dos separadores, un flujo de CO₂ de 60 g/min y un tiempo de extracción de 5 horas para asegurarnos elevados rendimientos de extracción. El parámetro que se varió en los dos experimentos fue la presión de extracción. Para el primero se fijó una presión de extracción de 400 bares, una presión de 100 bares en el primer separador y en el segundo separador se llevó a cabo una descompresión hasta alcanzar la presión de recirculación. En el segundo experimento la presión de extracción fue de 150 bares, y se



usó un 7 % de metanol como modificador orgánico y sólo un separador, llevando a cabo la descompresión hasta la presión de recirculación.

Para llevar a cabo la evaporación del disolvente en el caso en que se añadió etanol como modificador, se utilizó un Rotavapor (R-210, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza). Posteriormente ambos extractos se diluyeron en etanol y se mantuvieron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, protegidos de la luz hasta el análisis.

3.2 Extracción con Fluidos Presurizados (PLE).

194 La extracción de las muestras de romero mediante PLE se llevó a cabo usando un extractor de disolventes acelerados (ASE 200, Dionex, Sunnyvale, CA, USA), equipado con un controlador de disolvente (**Figura 27**).



Figura 27.Extractor de disolventes PLE modelo ASE 200, Dionex.



Con el objetivo de obtener extractos de distinta composición se usaron dos disolventes de diferente polaridad, etanol y agua. Ambos disolventes fueron sonicados durante 15 minutos para eliminar el oxígeno disuelto y así evitar cualquier posible degradación de compuestos mediante reacciones de oxidación.

Las extracciones fueron llevadas a cabo a tres temperaturas diferentes, 100, 150, y 200 °C, usando como disolvente de extracción agua, etanol y agua respectivamente. En todos los casos la extracción con fluidos presurizados se realizó en modo estático, con un tiempo de extracción de 20 minutos.

195

Antes de proceder al proceso de extracción se llevó a cabo una etapa previa de calentamiento de la celda de extracción, cuya duración varió en función de la temperatura deseada. Así, para la extracción realizada a 100 °C se calentó durante 5 minutos, 7 minutos fueron necesarios para alcanzar 150 °C y cuando la temperatura empleada era de 200 °C el tiempo transcurrido fueron 9 minutos.

La celda de extracción utilizada era de un volumen de 11 ml, en ella se puso un 1 g de muestra obtenida según se detalla en el apartado 2 de esta sección, que se encontraba almacenada a - 20 °C. En los casos donde el disolvente de



extracción usado fue agua (100 y 200 °C), se cubrió la parte superior de la muestra con una capa de arena, concretamente con 2 g, para prevenir un posible atasco del sistema.

El procedimiento de extracción empleado consta de los siguientes pasos: el primero es la colocación de la muestra en la celda, tras el cual se llena la misma con disolvente hasta alcanzar una presión de 1500 psi, y se procede a su calentamiento. Una vez alcanzada la temperatura deseada se lleva a cabo el proceso de extracción estática, que dura 20 minutos, durante el cual las válvulas del sistema se mantienen cerradas, y se lava la celda con disolvente de extracción hasta alcanzar un 60 % del volumen de la misma. Finalmente se purga el disolvente de la celda con ayuda de N₂ gaseoso y se produce la despresurización. Para evitar posibles “contaminaciones” o arrastre de componentes entre distintas extracciones se realiza una limpieza completa del sistema.

196

Los extractos obtenidos mediante esta técnica fueron tres: PLE 100 (100 °C, H₂O), PLE 150 (150 °C, EtOH) y PLE 200 (200 °C, H₂O). Estos extractos se protegieron de la luz y se almacenaron refrigerados hasta que se secaron. En el caso del extracto obtenido con etanol, se realizó la evaporación del disolvente en un Rotavapor (R-210 Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza), y en el caso de los extractos acuosos se llevó a



cabo en un liofilizador (Labcondo Corporation, Missouri, USA). Todos los extractos se mantuvieron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

3.3 Extracción asistida con Microondas (MAE).

Para la extracción asistida con microondas se utilizó un horno microondas doméstico modificado (marca LG), de manera que opera como un sistema MAE atmosférico y continuo. Las celdas de extracción son abiertas, formadas por un matraz de vidrio acoplado a un condensador de vapor de Allin, de manera que el disolvente es calentado junto con la muestra, se evapora y condensa, produciéndose un reflujo que mejora la eficiencia de la extracción.

197

En este proceso se optimizaron las condiciones de extracción para conseguir un rendimiento de extracción lo más elevado posible utilizando una de las muestras de romero descritas en el apartado anterior. Para ello se probaron diferentes disolventes, potencias y tiempos de extracción, manteniendo constante dos etapas de precalentamiento de la muestra a 160 W y a 320 W, ambas de un minuto de duración para evitar un sobrecalentamiento del sistema. Para seleccionar el disolvente de extracción óptimo se probaron diferentes mezclas de etanol, metanol, acetona y acetato de etilo con agua a distintas proporciones, así como



metanol acidificado con ácido clorhídrico y ácido acético, en ambos casos al 1 %. Los mejores rendimientos de extracción se obtuvieron con MeOH/H₂O (70:30, v/v), por lo que éste fue el disolvente usado para la extracción. También se llevó a cabo un estudio sobre la influencia de la potencia de la energía microondas en la extracción, variándose desde 160 hasta 800W. En este caso los mejores rendimientos se consiguieron aplicando la máxima potencia, 800 W. Para optimizar los tiempos de extracción, además de las dos etapas de precalentamiento, se realizaron dos etapas de extracción a 800 W, con una duración que osciló de 1 a 15 minutos. Los mayores rendimientos de extracción se consiguieron con etapas de extracción de 5 minutos de duración.

Por tanto, el método óptimo para la extracción de las muestras de romero consistió en la utilización de una mezcla de MeOH/H₂O (70:30, v/v), dos etapas de precalentamiento de 1 minuto de duración, la primera a 160 W y la segunda a 320 W, seguidas de dos etapas de extracción a 800 W de 5 minutos cada una. Entre estas etapas se dejaba reposar 15 segundos.

Para realizar el proceso de extracción se colocó 2 g de muestra en el matraz de extracción y se añadió 25 ml de MeOH/H₂O (70:30, v/v). Posteriormente se realizaron las dos



etapas de precalentamiento y la primera etapa de extracción a 800 W durante 5 minutos. En este paso se separó el disolvente de extracción de la matriz vegetal y se realizó una segunda extracción con 25 ml de disolvente fresco durante 5 minutos a 800 W. Ambos extractos se unieron, se filtraron a través de un filtro de pliegues y se evaporaron con la ayuda de un rotavapor (R-210 Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza). Estas muestras se conservaron a -80 °C hasta su análisis.

4. Aislamiento y purificación de compuestos de romero mediante Cromatografía Semi-preparativa.

199

La cromatografía semi-preparativa se utilizó en el capítulo 3 para el aislamiento y purificación de los compuestos de romero del extracto obtenido con SFE a 150 °C, como se describe en el apartado 2. Este extracto se preparó a una concentración de 50 mg/ml en etanol y seguidamente se filtró utilizando un filtro de acetato de celulosa de 0.45 µm.

Posteriormente dicho extracto se fraccionó utilizando un equipo de cromatografía semi-preparativa Gilson GX 281, equipado con sistema de bombeo (331/332 Gilson), un inyector automático, un detector DAD (modelo 171/172) y un



colector de fracciones (GX-281) (**Figura 28**). Para la separación se utilizó una columna Supelco Ascentis C-18, de tamaño de partícula 10 μm , y dimensiones 21.2 x 250 mm. El volumen de inyección fue de 1 ml, las fases móviles utilizadas fueron como fase móvil A agua acidificada con un 0.1 % de ácido fórmico, y como fase móvil B acetonitrilo. El gradiente se optimizó con la intención de conseguir la máxima eficacia y resolución en la separación, de manera que las fracciones recolectadas fueran lo más puras posible. Finalmente se consiguió esta separación utilizando un flujo de fase móvil de 15 ml/min y el siguiente gradiente: se comenzó con un porcentaje de fase móvil B del 5 %, el cual se fue incrementando progresivamente hasta alcanzar un 45 % en los primeros 10 minutos, un 55 % a los 20 minutos, un 60 % a los 26 minutos, un 73 % a los 46 minutos, a los 50 minutos un 80 %, y finalmente a los 55 minutos se alcanzó un 100 % de B que se mantuvo hasta los 60 minutos. Seguidamente se volvió a alcanzar un 5 % de fase móvil B y finalmente se acondicionó la columna durante 5 minutos más para el siguiente análisis.





Figura 28.Equipo de cromatografía semi-preparativa Gilson GX-281.

Las fracciones se colectaron en intervalos de tiempo de 1 minuto, recolectándose un total de 60 fracciones, que se secaron con ayuda de N_2 y en oscuridad para evitar la degradación de los compuestos de romero, algunos de ellos muy termolábiles y fotosensibles.

201

La pureza de las fracciones recolectadas se determinó mediante análisis por HPLC-MS como se describe en el siguiente apartado.

5. Análisis de extractos y fracciones de romero.

Los extractos de romero obtenidos mediante distintos sistemas de extracción, así como las fracciones de romero obtenidas mediante cromatografía semi-preparativa se



analizaron mediante HPLC-MS como se detalla a continuación.

5.1 Análisis mediante HPLC-DAD-ESI-TOF-MS.

202 Los extractos de *Rosmarinus officinalis* del capítulo 1 obtenidos mediante SFE y PLE se analizaron mediante HPLC-DAD-ESI-TOF. Los extractos obtenidos por PLE tenían un aspecto pulverulento, mientras que los obtenidos por SFE eran gelatinosos. En ambos casos, para llevar a cabo su análisis, se prepararon disoluciones a una concentración de 10 mg/ml, siendo los disolventes usados para cada extracto los siguientes: para los extractos obtenidos con PLE a 100 y 200 °C se utilizó agua, y para el extracto obtenido mediante PLE a 150 °C y los extractos obtenidos con SFE se utilizó etanol. Antes de inyectar estas muestras en el HPLC se filtraron con filtros de jeringa de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0.45 µm. Una vez disueltas y filtradas, las muestras se conservaron a -20 °C en recipientes de topacio para evitar la fotodegradación de los compuestos fenólicos.

Para el análisis de los extractos mediante HPLC-DAD-ESI-TOF, se empleó un cromatógrafo de líquidos Agilent de la serie 1200 de resolución rápida (Agilent Technologies, Palo



Alto, CA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas microTOF II de Bruker Daltonik (GmbH) con una interfase ESI de la misma casa comercial. El cromatógrafo de líquidos está compuesto por los siguientes módulos: un desgasificador de micro-vacío, una bomba binaria SL, un automuestreador estándar, un compartimento termostatzado de columna y un detector DAD, todos ellos de la serie 1200 de Agilent. En la **Figura 29** se muestran los equipos utilizados.



203

Figura 29. Equipo de RRLC 1200 de Agilent y microTOF II de Bruker Daltonik

Existen en bibliografía una amplia variedad de métodos para el análisis de compuestos fenólicos en extractos vegetales, y más concretamente en extractos de romero. En la mayoría de ellos se utilizan como fases móviles agua



acidificada con ácido fórmico o acético como fase móvil A, y metanol o acetonitrilo como fase móvil B.

Es por ello por lo que se probaron distintas combinaciones de estas fases móviles, seleccionando finalmente como óptimas agua con 0.1 % de ácido fórmico como fase móvil A y acetonitrilo como fase móvil B. Las condiciones del gradiente optimizado fueron las siguientes: de 0 a 45 minutos, se pasó de un 5 a un 100 % de B, de 45 a 55 minutos se volvió a condiciones iniciales con un 5 % B, y se mantuvo esta composición de fase móvil durante 5 minutos más. Entre cada inyección de muestra se hicieron inyecciones de fase móvil como blanco.

204

Para la separación se utilizó una columna analítica ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ con unas dimensiones de 4.6 x 150 mm y un tamaño de partícula de 1.8 µm. El flujo de fase móvil era de 0.80 ml/min, manteniendo una temperatura constante de separación de 20 °C, e inyectando 10 µl de muestra.

Como ya se ha indicado, uno de los detectores usados fue un DAD de la serie Agilent 1200, dotado con una lámpara de descarga de arco de deuterio para el rango de longitud de onda ultravioleta y una lámpara del wolframio para el rango visible, así como de una celda de flujo donde se realiza la detección. En este detector, la luz se dispersa sobre la matriz



de diodos mediante una red de difracción holográfica, lo que permite tener un acceso simultáneo a toda la información de las longitudes de onda, es decir, se recogen los espectros completos de absorción UV/visible durante todo el análisis.

En lo referente a la detección mediante TOF-MS, ésta se realizó en ambos modos de ionización, positivo y negativo, abarcando un rango de masas de 50 a 1000 m/z.

El flujo máximo de entrada al espectrómetro de masas es de unos 300 $\mu\text{l}/\text{min}$. A valores superiores el volumen de disolvente que llega a la entrada de la cámara de nebulización es excesivo, y la interfase no puede evaporar totalmente el disolvente. Esto provoca la formación de gotas y el paso de humedad a la zona de transferencia, empeorándose con ello la exactitud de masa. Además esta entrada de humedad hace que los valores de presión de vacío no se mantengan constantes. Para solventar este problema, en este caso dado que el flujo fue de 0.8 ml/min fue necesario el empleo de un divisor de flujo 1:3, de forma que a la entrada del espectrómetro de masas el flujo se redujo de a 0.2 ml/min.

Este flujo de entrada determinó los valores seleccionados como ópticos de la interfase ESI, como son la presión del gas nebulizador y el flujo y temperatura del gas de secado. Otros parámetros adicionales de la fuente de



ionización que deben controlarse son los voltajes en la cámara de nebulización (End Plate offset) y a la entrada del capilar (Capillary). También hay que establecer una serie de voltajes y radiofrecuencias que se aplican en la zona de transferencia iónica a los diferentes skimmers, hexapolos y lentes. Los valores de todos estos parámetros se recogen en la **Tabla 9**, indicando el signo + y – de dichos valores en función del modo de ionización aplicado, positivo o negativo respectivamente.

206

PARÁMETROS DEL DETECTOR TOF	
FUENTE DE IONIZACIÓN	TRANSFERENCIA
Presión Gas Nebulizador: 2 bar	Capillary exit: ± 150 V
Flujo Gas Secado: 7 l/min	Skimmer 1: ± 50 V
Temperatura: 190 °C	Hexapolo RF: 100 Vpp
End Plate offset: ± 500 V	Skimmer 2: ± 20 V
Capilar: 4.500 V	Transfer time: 52 μ s
	Pre-pulse storage: 5 μ s

Tabla 9. Parámetros de la fuente de ionización y de la zona de transferencia del método de MS utilizado para el detector TOF.



Para conseguir la exactitud de masas necesaria para la caracterización de los compuestos se utilizó una calibración externa. Debido al amplio rango de masas que se quería detectar, se utilizó como calibrante formiato sódico 10 mM, que cubre un rango de m/z de 50 a 1200. Este calibrante se preparó mezclando en una proporción 1:99 (v/v) una disolución 1 M de NaOH y otra de agua:isopropanol (50:50, v/v) con 0.1 % de ácido fórmico. Este calibrante se introdujo al principio de cada análisis con ayuda de una bomba de jeringa Cole Palmer 74900-00-05 (Vernon Hills, Illinois, USA).

Los datos de masas exactas de los iones analizados se procesaron con el software DataAnalysis 3.4 (Bruker Daltonik), el cual es capaz de ofrecer una lista de posibles fórmulas moleculares usando el editor GenerateMolecularFormula™. Este editor utiliza un algoritmo CHNO, que posee una serie de funcionalidades como el rango elemental mínimo/máximo, la configuración electrónica, equivalentes de dobles enlaces y anillos, así como una compleja comparación del patrón isotópico teórico y experimental (Valor Sigma) para conseguir una mayor seguridad en la fórmula molecular propuesta. El umbral de exactitud más ampliamente aceptado por la comunidad científica para la confirmación de la composición elemental se



estableció en 5ppm. Es importante remarcar que incluso con una exactitud de masas muy elevada (< 1 ppm) pueden obtenerse un gran número de fórmulas moleculares químicamente factibles, por lo que una elevada exactitud de masas por sí sola no es un criterio suficiente para excluir suficientes candidatos con composiciones elementales complejas. En este sentido, el uso de los patrones de abundancia isotópica supone una importante restricción, eliminando más del 95 % de falsos candidatos. Este filtro ortogonal es capaz de reducir varios miles de candidatos a un pequeño número de fórmulas moleculares.

208

5.2 Análisis mediante HPLC-ESI-QTOF-MS.

Las fracciones de romero aisladas mediante cromatografía semi-preparativa, el extracto de romero obtenido como fuente para la purificación de dichos compuestos del capítulo 3 y los extractos de romero extraídos mediante MAE del capítulo 2 se analizaron mediante HPLC-ESI-QTOF-MS.

El extracto de romero utilizado como fuente de compuestos bioactivos es el extracto obtenido mediante SFE a 150 bares del capítulo 1, de manera que para su análisis se



preparó como se ha descrito anteriormente, a una concentración de 800 y 5000 ppm. En cuanto a las fracciones de romero, una vez secadas con nitrógeno, se reconstituyeron para evitar posibles degradaciones inmediatamente antes de su análisis a una concentración de 100 ppm utilizando como disolvente DMSO. Finalmente todas las muestras se filtraron a través de filtros de jeringa de acetato de celulosa de 0.45 μm de tamaño de poro y se prepararon en viales para su análisis.

Por su parte los extractos de romero extraídos con MAE, se reconstituyeron hasta conseguir una concentración de 800 ppm utilizando una mezcla de MeOH:H₂O (50:50, v/v), y se filtraron igualmente con filtros de acetato de celulosa (0.45 μm). También en este caso, para evitar una posible degradación, estos extractos se prepararon justo antes de su análisis.

209

Para el análisis de estas colecciones de muestras se utilizó un cromatógrafo de líquidos UPLC Acquity (Waters, Millford, MA, USA) equipado con un compartimento de muestras termostaticado, una bomba binaria, un desgasificador y un compartimento de muestras termostaticado. La salida de la columna cromatográfica se acopló a través de un divisor de flujo a la interfase de un espectrómetro de masas microTOF Q-II (Bruker Daltonik,



Bremen, Alemania). La columna empleada para la separación tanto de los componentes de las fracciones como de los extractos de romero fue una Zorbax Eclipse Plus C-18, de dimensiones 4.6 x 150 mm y tamaño de partícula de 1.8 μm . En ambos casos las fases móviles fueron las optimizadas en el capítulo 1 de la presente memoria, agua acidificada con un 0.1 % de ácido fórmico como fase móvil A y acetonitrilo como fase móvil B, a un flujo de trabajo de 0.8 ml/min, e inyectando un volumen de muestra de 5 μl . En la **Figura 30** se muestran el cromatógrafo de líquidos y del espectrómetro de masas utilizado.

210



Figura 30. Equipo de UPLC Acquity Waters y microTOF Q-II de Bruker Daltonik



El gradiente cromatográfico empleado en el capítulo 1 se modificó ligeramente para ambos conjuntos de muestras, optimizándose un gradiente multipaso en cada caso. Para el análisis de las fracciones de romero el gradiente optimizado fue el siguiente: se comenzó con un 5 % B como condiciones iniciales, y se fue aumentado progresivamente el porcentaje de fase móvil B, hasta un 40 % B en 5 minutos, un 60 % a los 10 minutos, y un 95 % a los 30 minutos. Finalmente, se reestablecieron condiciones iniciales en dos minutos y medio, y éstas se mantuvieron para el siguiente análisis. En el caso de los extractos de romero extraídos con MAE, se consiguió reducir el tiempo de análisis de 35 a 30 minutos. El gradiente empleado en la separación fue el siguiente: en 12 minutos se pasó de un 5 a un 50 % de B, a los 17 minutos se alcanzó un 75 % de B, y a los 22 minutos un 95 %. Posteriormente en 3 minutos se volvió a condiciones iniciales y éstas se mantuvieron durante cinco minutos más para equilibrar la columna.

211

La detección mediante espectrometría de masas se realizó en modo de ionización negativo, con un rango de masas de 50-1100 m/z y utilizando formiato sódico como calibrante externo, de igual manera que en el apartado anterior. Debido a las pequeñas modificaciones en el diseño



del QTOF respecto del TOF, algunos parámetros de transferencia se modifican. Los valores óptimos para ellos son los que se muestran en la **Tabla 10**. En los análisis de masas/masas para la fragmentación de los iones de interés también se utilizó nitrógeno como gas de colisión. Las energías de colisión para estos análisis fueron ajustados de la siguiente manera: m/z 100, 20 eV; m/z 500, 35 eV; m/z 1000, 50 eV.

212

PARÁMETROS DEL DETECTOR QTOF	
FUENTE DE IONIZACIÓN	TRANSFERENCIA
Presión Gas Nebulizador: 2 bar	Capillary exit: - 170 V
Flujo Gas Nebulizador: 9 l/min	Funnel 1 RF: 150.0 Vpp
Temperatura: 210 °C	Funnel 2 RF: 200.0 Vpp
End Plate offset: - 500 V	Hexapolo RF: 100.0 Vpp
Capilar: 4.000 V	Transfer time: 70 μ s
	Pre-pulse storage: 7 μ s

Tabla 10. Parámetros de la fuente de ionización y de la zona de transferencia del método de MS utilizado para el detector QTOF.

Los datos obtenidos en estos análisis se procesaron con el software DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltonik), una versión más actualizada del software utilizado en el apartado



anterior, pero con la misma funcionalidad, ya que ofrece una lista de posibles fórmulas moleculares usando el editor GenerateMolecularFormula™.

6. Cultivos celulares.

Tanto las fracciones de romero obtenidas mediante cromatografía semipreparativa (capítulo 3) como el extracto obtenido con fluidos supercríticos a 150 bares (capítulo 1) se ensayaron en las líneas celulares HT-29, SW480 y HGUE-C-1 modelo de adenocarcinoma de colon, con el objetivo de estudiar la actividad antiproliferativa de los compuestos aislados de romero y ver si existen posibles efectos sinérgicos entre ellos. Dichas líneas celulares fueron conseguidas del IMIM (Instituto Municipal de Investigación Médica, Barcelona, España), del ATCC (American Type Culture Collection, LGC Protochem, UK) y del Hospital General Universitario (Elche, Alicante), respectivamente.

213

Estas células se dejaron crecer en DMEM con piruvato (Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco) suplementado con un 5 % de suero bovino fetal inactivado por calentamiento, 2mM de L-glutamina, 50 U/ml de penicilina G, y 50 µg/ml de estreptomina, a 37 °C en



atmósfera humidificada con un 5 % de CO₂. Cada tres días a las células se les añadió tripsina siguiendo las recomendaciones del proveedor, y fueron sembradas en placas de 96 pocillos, a una densidad de $5 \cdot 10^3$ células/pocillos. Seguidamente se dejaron incubando durante la noche a 37 °C para conseguir su adhesión, y finalmente fueron tratadas tanto con el extracto y como con las fracciones de romero objeto de estudio.

7. Ensayos de actividad antiproliferativa.

214 Para estudiar el efecto de las fracciones de romero y del extracto completo (SFE 150) sobre la proliferación celular de HT29, SW480 y HGUE-C-1, estas líneas celulares se cultivaron como se detalla en el apartado anterior y se trataron con el extracto de romero y las fracciones seleccionadas a unas concentraciones de 30 y 60 µg/ml durante 24 y 48 h.

Tras la incubación con el extracto de romero y las fracciones, la proliferación celular fue calculada mediante un ensayo MTT, un ensayo sencillo y fiable que se utiliza para determinar la funcionalidad mitocondrial de la célula. Tras el período de incubación, que en nuestro caso fue de 24 o 48 h,



las células se lavaron con PBS y se incubaron con el reactivo MTT durante 3 h a 37 °C en atmósfera humidificada con un 5 % de CO₂. Tras la incubación se aspiró el medio y se añadió 100 µL de DMSO a cada pocillo, agitando durante 15 minutos para disolver los cristales de formazán formados. Posteriormente se midió la absorbancia de este producto generado a una longitud de onda de 570 nm en un lector de placas (SPECTROstar Omega, BMG LabTech GmbH, Offenburg, Alemania).

8. PCA.

215

Los datos generados mediante HPLC-ESI-QTOF-MS del capítulo 2 fueron evaluados con el software ProfileAnalysis (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania) para llevar a cabo un análisis por PCA con un escalado Pareto. Los datos obtenidos mediante LC-MS se prepararon para el análisis por PCA usando el algoritmo FindMolecularFeature (FMF) así como un “bucketing” avanzado. El rango de m/z seleccionado fue de 100-800, y el tiempo de análisis entre 1.5 y 30 minutos.





Bloque II

Bloque II

Hibiscus Sabdariffa



Bloque II: *Hibiscus sabdariffa*

1. Reactivos.

Todos los reactivos usados en esta memoria fueron de grado analítico. En todos los capítulos de este bloque se utilizó para preparar las fases móviles usadas en los análisis mediante LC-MS ácido fórmico adquirido de Fluka, Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania), acetonitrilo de calidad masas de Fisher Scientific (Madrid, España), y agua doblemente desionizada obtenida de un sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, USA)

219

Para el capítulo 4 de la presente memoria para la preparación de extractos se utilizó etanol y ácido clorhídrico (Lab-Scan). Los estándares utilizados para la identificación de los compuestos detectados fueron ácido clorogénico, quercetina y quercetina-3-glucósido adquiridos de Fluka, Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania) y Extrasynthese (Genay Cedex, France). Las disoluciones de estos patrones fueron preparadas en metanol (Lab-Scan). Para la determinación de polifenoles totales, flavonoides, antocianinas, cianidina y delphinidina también se usaron reactivo de Folin, ácido gálico, carbonato sódico, cloruro de aluminio, acetato potásico,



quercetina, 2,2-difenil-picrilhidracil (DPPH), y ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (trolox) proporcionados por Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania), así como cloruro de cianidina y delphinidina de Extrasynthese (Lyon, Francia).

220 En el capítulo 5, para la preparación del extracto de *Hibiscus sabdariffa* enriquecido en compuestos fenólicos se utilizó una resina de Amberlita FPX66 (Rohm and Haas, Philadelphia, USA), etanol al 95 % y ácido trifluoroacético de Panreac. Para la preparación del extracto de *Hibiscus sabdariffa* liposomado además de lo anterior también se usó fosfatidilcolina de soja suministrada por Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania). Se utilizaron también quercetina, quercetina-3-glucósido, quercetina-3-glucurónido adquiridos de Fluka, Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania), y N-feruloiltiramina adquirido de Chem Faces (Wuhan, China). Para la disolución de los patrones se utilizó metanol y DMSO, ambos de Fisher Scientific (Madrid, España), así como medio de cultivo Hank's Balance (HBSS) de Gibco (Life Technologies, Madrid, España).

Para el capítulo 6 se utilizaron, naringenina como patrón interno, quercetina y quercetina-3-glucurónido adquiridos de Fluka, Sigma Aldrich (Steinheim,



Alemania). Estos patrones fueron disueltos en metanol de Fisher Scientific (Madrid, España) para la preparación de patrones utilizados en la cuantificación, y en DMSO a una concentración de 100 μM para la incubación con las células preadipocíticas.

En el capítulo 7 se utilizó el extracto enriquecido en compuestos fenólicos de *Hibiscus sabdariffa* preparado en el capítulo 5, encapsulado con ayuda de una encapsuladora Cap.M.Quik (Sanderson and Co, Berry Creek, California, EE.UU). Para la optimización de los protocolos de tratamiento de plasma y suero se utilizó suero bovino fetal de Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania), y orina recolectada de un voluntario sano justo antes del tratamiento de muestra. Para los tratamientos de suero y plasma se utilizó ácido fórmico de Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania), etanol, metanol y acetonitrilo de Fisher Scientific (Madrid, España). Para la optimización de los protocolos de tratamiento de orina se utilizó metanol, acetonitrilo, acetato de etilo, ácido clorhídrico, ácido trifluoroacético (TFA) y cloruro sódico suministrados por Fisher Scientific (Madrid, España), además de cartuchos de SFE Discovery DPA-6S y Supel-Select HLB SPE ambos de Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania), y Spe-ed Advanta RP 105 de Teknokroma (Barcelona, España).



2. Muestras.

En el capítulo 4 se recolectaron un total de 25 muestras de *Hibiscus sabdariffa* de distintas variedades procedentes de las principales zonas productoras de Méjico durante los años 2007-2010, siendo algunas de ellas proporcionadas por el INIFAP Campus de Tecomán, información que se detalla en la **Tabla 11** y **Figura 31**. Las 25 variedades recolectadas se establecieron en una zona controlada bajo las mismas condiciones pedoclimáticas hasta su maduración fisiológica, momento en el cual los cálices fueron recolectados y secados en un horno de convección de aire caliente. Dichos cálices, una vez secados se molturaron y se sometieron a un proceso de extracción, utilizando metanol acidificado (70 % de metanol con un 0.1 % de HCl) en una proporción disolvente-muestras de 10:1. Trascurridas 72 h de la extracción, el disolvente fue evaporado a 40 °C usando un rotavapor (R-210 Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza). Los extractos resultantes fueron utilizados posteriormente para el resto de determinaciones según se detalla a continuación.

Para el análisis cualitativo mediante HPLC-DAD-ESI-TOF-MS los extractos se diluyeron en agua ultrapura hasta alcanzar una concentración de 25 mg/ml, mediante agitacion



en un vortex. Previo a su análisis, las disoluciones de los extractos se filtraron con filtros de jeringa de acetato de celulosa de tamaño de poro 0.45 μm , tras lo cual fueron directamente analizadas en el cromatógrafo de líquidos.



Figura 31. Mapa de Méjico con las provincias resaltadas en donde se recolectaron los extractos del Capítulo IV.



Tabla 11. Codificación de los extractos de HS del Capítulo IV, junto con variedad, origen geográfico e imagen de los cálices.













Codificación	Variedad	Origen	Imagen	Codificación	Variedad	Origen	Imagen
HS 1	Americana	Jalisco		HS 7	Violenta	Jalisco	
HS 2	Tepalcatepec	Michoacán		HS 8	Quesería	Colima	
HS 3	Diamante	Jalisco		HS 9	Criolla Tala	Jalisco	
HS 4	Colima	Colima		HS 10	Tecomán	Colima	
HS 5	Tempranilla	Jalisco		HS 11	El Bordo	Colima	
HS 6	Talpa	Jalisco		HS 12	Tempranilla	Colima	



Tabla 11. Codificación de los extractos de HS del Capítulo IV, junto con variedad, origen geográfico e imagen de los cálices.

Codificación	Variedad	Origen	Imagen	Codificación	Variedad	Origen	Imagen
HS 13	Sudán	Colima		HS 20	JR 00001 C	Guerrero	
HS 14	Media Luna	Colima		HS 21	Americana	Colima	
HS 15	Pisilla	Colima		HS 22	Puerta de Anzar	Colima	
HS 16	JB 00001 SM	Guerrero		HS 23	Variedad Blanca	Jalisco	
HS 17	JCP 0001 T	Guerrero		HS 24	Real	Veracruz	
HS 18	Mutante Blanca	Guerrero		HS 25	Reyna	Navarrit	



Para los capítulos 5 y 7 se preparó un extracto primario acuoso de *Hibiscus sabdariffa* a partir de los cálices de flores de esta planta procedentes de Guerle (Senegal) secados de manera tradicional, mediante exposición solar. Estos cálices secos se molturaron, y de este material se tomaron 650 g, los cuales fueron calentados hasta ebullición en 5 l de agua destilada durante 5 minutos. La infusión obtenida fue filtrada, enfriada a temperatura ambiente y centrifugada. Seguidamente, el sobrenadante obtenido fue liofilizado y almacenado a 4 °C. El extracto de *Hibiscus sabdariffa* enriquecido en compuestos fenólicos (PEHS) se preparó a partir de este extracto primario eliminando la fibra y los polisacáridos presentes en su composición. Para ello, se realizó una precipitación con etanol al 85 % (v/v), y se realizó una purificación clásica en columna. Se cargó una concentración de 170 mg/ml en una columna cromatográfica de 1.5 x 25 cm que contenía la resina Amberlite FPX66. La fracción fenólica retenida en la columna se eluyó con etanol al 95 % acidificado con un 0.01 % de TFA, se evaporó en un rotavapor (R-210 Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza) y se congeló. Para el capítulo 5, a partir de la muestra de PEHS se preparó un extracto liposomado partiendo de PEHS a una concentración de 2.500 ppm y añadiendo 2 mM de



fosfatidilcolina de soja, etanol al 10 % para permeabilizar la membrana y HBSS para disolverlo, manteniéndose en agitación durante 10 minutos. Trascurrido este tiempo se filtró utilizando filtros de jeringa de 0.45 μm de tamaño de poro, repitiéndose esta operación dos veces más.

3. Cultivos celulares.

3.1 Cultivo de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

En el capítulo 4 de la presente memoria se ensayaron los extractos metanólicos de 25 variedades de *Hibiscus sabdariffa* frente a *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enteritidis* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Micrococcus luteus* (ATCC 9341) para determinar las actividades antibacterianas que presentaban dichos extractos frente a diferentes microorganismos. Para la determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos, se seleccionó una colonia de cada cepa bacteriana que se encontraba aislada en medio agar, y se dejó crecer en 5 ml de medio de cultivo durante 24 horas a 37 °C.

227



3.2 Cultivo de células Caco-2.

En el capítulo 5 se estudia la absorción de un extracto de *Hibiscus sabdariffa* enriquecido en compuestos fenólicos (PEHS) libre y liposomado, y de cuatro compuestos puros presentes en su composición, quercetina, quercetina-3-glucósido, quercetina-3-glucurónido y n-feruloiltiramina utilizando un modelo *in vitro* que simula la barrera intestinal. Para ello se cultivaron células de adenocarcinoma de colon Caco-2 adquiridas del ATCC en DMEM y se preparó una monocapa celular sembrando $4 \cdot 10^5$ células/pocillo en placas de 6 pocillos. El cultivo se realizó a 37 °C, en una atmósfera humidificada un 90 % y con un 5 % de CO₂. El cultivo se prolongó durante unos 19-22 días para asegurar la confluencia de la monocapa, y la integridad de la misma se comprobó antes y después del experimento mediante una medida de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) con un voltímetro epitelial (EVOM, World Precision Instrument, Sarasota, FL, USA).

La monocapa celular se cultivó sobre una membrana de policarbonato de un tamaño de poro de 0.4 μm y un área superficial de 4.7 cm². Ésta se dispone entre dos compartimentos, la cámara apical situada en la parte superior, y la cámara basolateral, situada en la parte inferior.



En esta investigación se estudió la permeabilidad en ambos sentidos, apical-basolateral y basolateral-apical, con el objetivo de determinar el tipo de transporte de estos compuestos. Para ello, tras lavar dos veces la monocapa de células Caco-2 con HBSS calentado previamente, se ensayaron tanto los extractos como los compuestos puros en ambas cámaras, tomándose muestras al inicio (tiempo 0 minutos) y al final del ensayo (tiempo 150 minutos) en la cámara donora (apical o basolateral según el ensayo), y a distintos tiempos (30, 60, 90, 120 minutos) en la cámara receptora para estudiar la evolución en el transporte de estos compuestos. Al final del ensayo la monocapa celular se recogió, y se realizó un lisado celular mediante ciclos de congelación-descongelación, recolectando tanto el citoplasma celular como las membranas, para de esta manera comprobar si estos compuestos pueden quedar retenidos en ellos. Todas las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su posterior análisis.

229

3.3 Cultivo de células pre-adipocíticas 3T3-L1.

En el capítulo 6 se estudió la absorción de quercetina y quercetina-3-glucurónido, dos compuestos relacionados con la composición de *Hibiscus sabdariffa*, por parte de células



pre-adipocíticas 3T3-L1. Éstas fueron adquiridas del ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA), cultivadas en medio DMEM, propagadas y diferenciadas de acuerdo a procedimientos previamente descritos en bibliografía [229].

Para llevar a cabo el estudio sobre la absorción de quercetina y quercetina-3-glucurónido, se añadieron estos patrones al medio de cultivo al principio del período de inducción, a una concentración de 100 μ M en DMSO, y se recolectaron muestras a distintos tiempos (3, 6, 12 y 18 horas) para estudiar la evolución de estos compuestos en el citoplasma.

230

4. Recolección de muestras de orina, suero y plasma.

Un voluntario adulto y sano, de 28 años de edad fue reclutado para participar en el estudio de biodisponibilidad y excreción urinaria de los compuestos fenólicos del extracto PEHS. El participante dio consentimiento por escrito para participar en el estudio, y el procedimiento fue aprobado y seguido por el Comité Ético del Hospital Universitario Sant Joan de Reus. El participante fue advertido para que evitase la ingesta de compuestos fenólicos, tanto de alimentos como de



bebidas, durante al menos dos días antes del ensayo, y de realizar ayuno desde la noche anterior al mismo. El voluntario ingirió una cápsula de 500 mg de PEHS, tras lo cual sólo ingirió agua las horas siguientes.

Posteriormente se le tomaron muestras de sangre a tiempo 0 y transcurridos 30 minutos, 1, 2, 3 y 6 horas tras la ingesta. Estas muestras se recolectaron en tubos con EDTA a partir de los cuales se obtuvieron mediante centrifugación las muestras de suero y plasma, que se almacenaron a -80 °C en alícuotas sin acidificar y acidificadas con 30 µL de ácido fórmico al 50 % (v/v) y 100 µL de ácido ascórbico 10 mM. Por otra parte, se tomaron muestras de orina a las 0, 2, 4, y 6 horas tras la ingesta del extracto, que se almacenaron hasta su análisis a -80 °C añadiendo 200 µL de ácido clorhídrico 6 M.

231

5. Protocolos de tratamiento de muestras biológicas.

5.1 Protocolos de tratamiento de medio de cultivo, citoplasma y membrana de células Caco-2.

Como se detalla en el apartado anterior, en el capítulo 5 se estudió la absorción de un extracto de *Hibiscus sabdariffa* enriquecido en compuestos fenólicos (PEHS) libre y



liposomado, así como de cuatro compuestos puros relacionados con su composición, quercetina, quercetina-3-glucósido, quercetina-3-glucurónido y n-feruloiltiramina. Para ello se recolectaron muestras de medio de cultivo a distintos tiempos, y muestras de citoplasma y membrana celular al final del ensayo.

232 Las muestras celulares de este ensayo fueron lisadas mediante tres ciclos consecutivos de congelación, en nitrógeno, y descongelación, durante un período de 10 minutos para cada etapa. Tras este proceso se realizó una centrifugación durante 15 minutos a 14.000 rpm, manteniendo la temperatura a 4 °C. Tanto el sobrenadante correspondiente al citosol, como el pellet correspondiente a la membrana se conservaron a -80 °C hasta su análisis.

Para las muestras de medio de cultivo, al ser bastante limpias, se optimizó un protocolo de tratamiento de muestra muy simple, que consistió en una centrifugación refrigerada a 4 °C, durante 15 minutos a 12.000 rpm. El sobrenadante obtenido se dopó con apigenina como patrón interno a una concentración de 10 ppm, y se almacenó a -80 °C en viales hasta el momento inmediatamente anterior a su análisis para evitar un posible degradación.



En el caso de las muestras de citoplasma y membrana celular, el tratamiento fue un poco más complejo puesto que estas muestras requieren de una precipitación previa de su contenido proteico. Así, haciendo uso de los resultados obtenidos en trabajos de investigación previos realizados por nuestro grupo de investigación [230], se llevó a cabo una precipitación de proteínas utilizando MeOH. Este disolvente se añadió en un volumen cinco veces superior al de muestra, y tras su agitación se dejó reposarla mezcla durante 2 horas a -20 °C. Posteriormente las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 12.000 rpm y 4 °C, y los sobrenadantes se evaporaron a vacío. Por último, las muestras se reconstituyeron en 100 µl de MeOH, se dopó con apigenina como patrón interno a una concentración de 10 ppm y se almacenaron a -80 °C hasta el momento inmediatamente anterior a su análisis para evitar degradación.

233

5.2 Protocolo de tratamiento de citoplasma de células pre-adipocíticas 3T3-L1.

En el capítulo 6 se estudió la absorción de quercetina y quercetina-3-glucurónido en células pre-adipocíticas 3T3-L1. Estas células fueron lisadas mediante tres ciclos consecutivos de sonicación-congelación a -80 °C, de 10 minutos de



duración cada etapa. Tras este proceso las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 14.000 rpm, manteniendo la temperatura a 4 °C. El sobrenadante correspondiente al citosol se liofilizó, y se conservó a -80 °C hasta su tratamiento.

234 Los citoplasmas recolectados tuvieron que someterse a una precipitación de proteínas. Para ello, basándonos en la estructura de estos compuestos y de la experiencia previa de nuestro grupo de investigación, se seleccionaron dos protocolos distintos basados en una precipitación en frío con ayuda de alcoholes, los cuales se ensayaron en suero bovino fetal para calcular el porcentaje de recuperación de ambos compuestos.

En el primer protocolo ensayado se añadió HCl 0.2 M disuelto en MeOH en una relación muestra-disolución 1:5 (v/v). Esta mezcla se agitó durante 10 segundos en un vortex y se dejó en reposo 2 h a -20 °C. Transcurrido este tiempo la muestra se centrifugó durante 10 minutos a 14.000 rpm y 4 °C, el sobrenadante se neutralizó hasta un pH 5.5 con amoníaco al 30 %, repitiéndose el proceso de centrifugación. Finalmente, el sobrenadante se evaporó a vacío, se reconstituyó con fase móvil A (H₂O-AcN (90:10) con 0.5 % de



ácido fórmico), se dopó con 50 ppm de naringenina como patrón interno, y se conservó refrigerado hasta su análisis.

El segundo protocolo consistió en una precipitación de proteínas añadiendo un volumen cinco veces superior al de la muestra de una mezcla MeOH:EtOH (50: 50, v/v). Los viales se agitaron 10 segundos en un vortex y se dejaron en reposo durante 2 h a -20°C . Seguidamente, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 14.000 rpm en una centrífuga refrigerada a 4°C , y el sobrenadante se evaporó a vacío. Una vez evaporadas las muestras, al igual que en el protocolo anterior, se reconstituyeron en fase móvil A, se doparon con la misma concentración de patrón interno, y se conservaron refrigerados hasta su análisis.

235

Finalmente, las muestras obtenidas mediante el tratamiento con estos dos protocolos se analizaron mediante HPLC-DAD-ESI-TOF-MS, y se calcularon los porcentajes de recuperación de ambos compuestos. Los resultados pusieron de manifiesto que el segundo protocolo proporcionaba mayores porcentajes de recuperación para los dos compuestos estudiados, por lo que fue el seleccionado para tratar las muestras citoplasmáticas de adipocitos.



5.3 Protocolos de tratamiento de suero y plasma.

Tras la ingesta de 500 mg de PEHS por un voluntario adulto y sano, se recolectaron muestras de suero y plasma, que se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, en alícuotas sin acidificar y acidificadas con $30\text{ }\mu\text{L}$ de ácido fórmico al 50 % (v/v) y $100\text{ }\mu\text{L}$ de ácido ascórbico 10 mM.

236 Para optimizar el protocolo de desproteinización para estas muestras, se realizó una prueba dopando suero bovino fetal con el extracto PEHS a una concentración de 2500 ppm antes y después del tratamiento. Seguidamente, en base a resultados previos de nuestro grupo de investigación, estas muestras se sometieron a una precipitación de proteínas con disolventes orgánicos. En concreto, se trataron alícuotas de $200\text{ }\mu\text{L}$ de suero con 1 ml de AcN, MeOH, EtOH y una mezcla 50:50 (v/v) de MeOH:EtOH. Se agitaron durante 10 segundos en el vortex y se dejaron en reposo 2 horas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Trascurrido este tiempo, durante el cual se consiguió la precipitación de proteínas, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 14.000 rpm en una centrífuga refrigerada a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalmente, se recolectaron los sobrenadantes y se evaporaron a vacío, se reconstituyeron en $100\text{ }\mu\text{L}$ de fase móvil A (H_2O -AcN 90: 10 v/v con 1 % de ácido



fórmico), se doparon con 30 ppm de naringenina como patrón interno, tras lo cual se conservaron refrigeradas hasta su análisis.

Las muestras se analizaron mediante HPLC-ESI-UHR-Qq-TOF-MS, y se calcularon los porcentajes de recuperación de los principales compuestos presentes en el extracto PEHS obtenidos con los distintos protocolos. Los resultados pusieron de manifiesto que el protocolo que utiliza MeOH proporciona mejores porcentajes de recuperación para la mayoría de los compuestos estudiados, por lo que fue éste el seleccionado para el tratamiento de las muestras de suero y plasma humano.

237

El uso de dos métodos de conservación de suero y plasma distintos, en alícuotas acidificadas y sin acidificar, se realizó en un intento por detectar el mayor número de compuestos posibles, ya que tanto la estructura como la naturaleza de los compuestos presentes en el extracto de PEHS son muy variadas.

5.4 Protocolos de tratamiento de orina.

En el caso de las muestras de orina, se decidió hacer una optimización previa de protocolos de tratamiento de muestra. Para ello, haciendo uso de la bibliografía y de la



información disponible, se seleccionaron distintos tratamientos que consistían en el uso de una extracción LLE y SPE. Para poder realizar estos tratamientos se recolectaron muestras de orina de un voluntario adulto y sano, y se doparon con el extracto PEHS objeto de estudio, con el fin de calcular el porcentaje de recuperación de los compuestos con los distintos protocolos.

238 En cuanto a la extracción LLE, se probaron cuatro protocolos distintos basados todos ellos en una extracción por duplicado con acetato de etilo, a la que se le realizaron pequeñas modificaciones. El protocolo base consistió en tratar 500 μ l de orina con un 1 ml de acetato de etilo al que se le añadieron distintos modificadores para intentar desplazar el equilibrio químico entre las dos fases y que los compuestos polares del extracto pasen al acetato de etilo. Los distintos modificadores añadidos es lo que diferenció un protocolo de otro. Así, en el primer protocolo se añadió 10 μ l de HCl 1M; en el segundo 10 μ l de HCl 1M y 10 μ l de NaCl 1M; en el tercero se añadió 10 μ l de TFA 1M; y finalmente en el cuarto 10 μ l de TFA 1M y 10 μ l de NaCl 1M. En todos los casos se agitó la mezcla en un vortex durante 2 minutos, y se centrifugó durante 10 minutos a 14.000 rpm. A continuación, se tomó la fase orgánica y a la fase acuosa se le repitió el



proceso de extracción con otro ml de acetato de etilo. Ambas fases orgánicas se unieron y se llevaron a sequedad en un evaporador a vacío. Por último, las muestras se reconstituyeron con 250 μ l de fase móvil A, (H_2O -AcN (90:10, v/v) con 0.5 % de ácido fórmico), y se conservaron refrigeradas hasta su análisis.

Para la extracción con SFE se utilizaron cartuchos con tres rellenos diferentes, Discovery DPA-6S, Supel-Select HLB SPE y Spe-ed Advanta RP 105, todos ellos diseñados para retener compuestos polares de matrices polares, como es el caso de los compuestos fenólicos en orina. Para los cartuchos Discovery DPA-6S se realizó un acondicionamiento con 2 ml de MeOH y 2 ml de H_2O . Posteriormente se cargaron los cartuchos con 2 ml de orina previamente centrifugada, y se lavaron con 2 ml de MeOH- H_2O (50:50, v/v). Finalmente se llevó a cabo la elución de los compuestos retenidos con 2 ml de acetato de etilo. Para los otros cartuchos utilizados, las etapas del protocolo de extracción fueron las mismas, a diferencia de que el lavado se realizó con un 5 % de AcN acuoso, y la elución con 2 ml de MeOH-AcN (50:50, v/v). Los eluidos de todos los protocolos se evaporaron a vacío y se reconstituyeron en 1 ml de fase móvil A, conservándose refrigerados hasta su análisis.



Una vez analizados todas las pruebas de protocolo se seleccionó como protocolo óptimo la LLE que utilizaba como modificador TFA y NaCl por proporcionar los porcentajes de recuperación de compuestos fenólicos más elevados.

6. Análisis de extractos y muestras biológicas.

Los extractos de PEHS libre y liposomado obtenidos y las diferentes muestras biológicas procedentes de los ensayos detallados en apartados anteriores se analizaron mediante HPLC-MS como se detalla a continuación.

240

6.1 Análisis mediante HPLC-DAD-ESI-TOF-MS.

Los extractos de *Hibiscus sabdariffa* procedentes de Méjico del capítulo 4 se analizaron mediante HPLC-DAD-ESI-TOF-MS. El cromatógrafo de líquidos usado de resolución rápida (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) se acopló a un espectrómetro de masas microTOF II (Bruker Daltonik, Bremen, Alemania) con una interfase ESI de la misma casa comercial. El cromatógrafo de líquidos estaba compuesto por los siguientes módulos: un desgasificador de micro-vacío, una bomba binaria SL, un automuestreador estándar, un compartimento termostatzado de columna y un detector



DAD, todos ellos de la serie 1200 de Agilent. El método cromatográfico se optimizó como se detalla en [60]. Las fases móviles utilizadas fueron H₂O-AcN (90:10, v/v) con 1 % de ácido fórmico (A) y acetonitrilo (B). En cuanto al gradiente cromatográfico seleccionado, éste fue el siguiente: de 0 a 20 minutos se pasó de un 5 a un 20 % de B, de 20 a 25 minutos se alcanzó un 40 % de B, de 25 a 30 minutos se volvió a condiciones iniciales hasta alcanzar un 5 % B, composición que se mantuvo durante 5 minutos más para el acondicionamiento de la columna para el siguiente análisis. Entre cada inyección de muestra se hicieron inyecciones de fase móvil como blanco para evitar contaminaciones de muestra. Para la separación se empleó una columna analítica ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ con unas dimensiones de 4.6 x 150 mm y un tamaño de partícula de 1.8 µm. El flujo de trabajo seleccionado fue de 0.50 ml/min, se mantuvo una temperatura constante de separación de 20 °C y se utilizó un volumen de muestra de 10 µl.

241

Como ya se ha indicado, uno de los detectores utilizados fue un DAD de la serie Agilent 1200 dotado con una lámpara de descarga de arco de deuterio para el rango de longitud de onda ultravioleta, y una lámpara de wolframio para el rango visible. En este detector, la luz se dispersa sobre



la matriz de diodos mediante una red de difracción holográfica, lo que permite tener un acceso simultáneo a la información de todas las longitudes de onda de absorción, es decir, se recogen los espectros completos de absorción UV/visible durante todo el análisis.

La detección mediante MS se realizó en modo de ionización negativo, en un rango de masas de 50 a 1000 m/z. Para evitar que el electrospray formado en la interfase fuese inestable, el flujo a la salida del cromatógrafo pasó por un divisor 1:3. Los valores óptimos de los principales parámetros tanto de la fuente como de la transferencia en el espectrómetro de muestras se muestran en la **Tabla 12**.

242

PARÁMETROS DEL DETECTOR TOF	
FUENTE DE IONIZACIÓN	TRANSFERENCIA
Presión Gas Nebulizador: 1.5 bar	Capillary exit: - 120 V
Flujo Gas Secado: 7 l/min	Skimmer 1: - 40 V
Temperatura: 200 °C	Hexapolo RF: 100 Vpp
End Plate offset: - 500 V	Skimmer 2: - 22.5 V
Capilar: 4.500 V	Transfer time: 50 μ s
	Pre-pulse storage: 3 μ s

Tabla 12. Parámetros de la fuente de ionización y de la zona de transferencia del método de ESI-TOF-MS.



Para conseguir la exactitud de masas necesaria para la identificación de los compuestos se utilizó una calibración externa. Debido al amplio rango de masas que se quería detectar se utilizó como calibrante formiato sódico 10 mM, que cubre un rango de m/z de 50 a 1200. Este calibrante se preparó mezclando en una proporción 1:99 (v/v) una disolución 1 M de NaOH y otra de agua:isopropanol (50:50, v/v) con 0.1 % de ácido fórmico. Esta disolución se introdujo al principio de cada análisis con ayuda de una bomba de jeringa Cole Palmer 74900-00-05 (Vernon Hills, Illinois, USA).

Los datos de las masas exactas de los iones analizados se procesaron con el software DataAnalysis 3.4 (Bruker Daltonik), que proporciona una lista de posibles fórmulas moleculares usando el editor GenerateMolecularFormula™.

243

Las muestras del capítulo 6 se analizaron mediante HPLC-DAD-ESI-TOF-MS utilizando la misma instrumentación que se detalló para las muestras del capítulo 4, salvo algunas modificaciones en el método analítico. Se modificó la composición de fase móvil A, pasando de un 1 % de ácido fórmico a un 0.5 %, y el flujo de fase móvil se disminuyó a 0.3 ml/min. El gradiente cromatográfico se también se modificó ligeramente y quedó como sigue: de 0 a 20 minutos se pasó de un 5 a un 20 % de B, de 20 a 25 minutos se alcanzó un 40



% de B, y de 25 a 40 minutos se volvió a condiciones iniciales con un 5 % B, manteniéndose esta composición de fase móvil durante 5 minutos más para el acondicionamiento de la columna. La detección mediante MS se realizó en modo de ionización negativo, modificando únicamente la presión del gas nebulizador, que se aumentó a 2 bares, y el flujo de gas de secado, que se aumentó a 9 l/min. El incremento de estos parámetros se realizó para conseguir un electrospray estable, ya que en este caso no se utilizó divisor de flujo. El volumen de inyección se mantuvo en 10 μ l, y la calibración y el tratamiento de datos se realizaron de igual manera.

244

6.2 Análisis mediante HPLC-ESI-QTOF-MS.

Para el análisis de parte de las muestras del capítulo 5, en concreto para aquellas en las que se estudió la permeabilidad de los compuestos puros, se utilizó el mismo cromatógrafo de líquidos de resolución rápida (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) descrito previamente. La salida de la columna cromatográfica se acopló a través de un divisor de flujo a un espectrómetro de masas microTOF Q-II (Bruker Daltonik, Bremen, Alemania). La columna utilizada para la separación fue una Zorbax Eclipse Plus C-18, de



dimensiones 4.6 x 150 mm y 1.8 μm de tamaño de partícula. Las fases móviles empleadas fueron H_2O -AcN (90:10, v/v) con 0.5 % de ácido fórmico como fase móvil A, y acetonitrilo como fase móvil B, a un flujo de trabajo de 0.5 ml/min, e inyectando un volumen de muestra de 5 μl . El gradiente cromatográfico utilizado para el análisis de las muestras del capítulo 6 descrito anteriormente se modificó ligeramente: se comenzó con un 5 % B como condiciones iniciales, se aumentó hasta un 35 % B en 10 minutos, un 75 % a los 32 minutos, y finalmente se reestablecieron condiciones iniciales a los 37 minutos, manteniéndose esta composición durante tres minutos más para acondicionar el sistema antes del siguiente análisis.

245

La detección mediante espectrometría de masas se realizó en modo de ionización negativo, seleccionando un rango de masas de 50-1000 m/z y utilizando formiato sódico como calibrante externo, de igual manera que en el apartado anterior. Debido a las pequeñas modificaciones en el diseño del analizador QTOF respecto del TOF, algunos parámetros de transferencia se modifican, los valores óptimos para ellos son los que se muestran en la **Tabla 13**.



PARÁMETROS DEL DETECTOR QTOF	
FUENTE DE IONIZACIÓN	TRANSFERENCIA
Presión Gas Nebulizador: 2 bar	Capillary exit: - 170 V
Flujo Gas Secado: 9 l/min	Funnel 1 RF: 200.0 Vpp
Temperatura: 200 °C	Funnel 2 RF: 150.0 Vpp
End Plate offset: - 500 V	Hexapolo RF: 100.0 Vpp
Capilar: 4.500 V	Transfer time: 70 μ s
	Pre-pulse storage: 6 μ s

Tabla 13. Parámetros de la fuente de ionización y de la zona de transferencia del método de ESI-QTOF-MS.

246

Los datos obtenidos en estos análisis se procesaron con el software DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltonik), una versión más actualizada del software utilizado en el apartado anterior, pero con la misma funcionalidad, ya que ofrece una lista de posibles fórmulas moleculares usando el editor GenerateMolecularFormula™.

6.3 Análisis mediante HPLC-ESI-UHR-Qq-TOF-MS.

Para estudiar la permeabilidad de los compuestos del extracto PEHS libre y liposomado del capítulo 5, así como las



muestras de suero, plasma y orina del capítulo 7 se utilizó un cromatógrafo de líquidos Dionex Ultimate 3000, acoplado a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo de ultra-alta resolución (UHR-Qq-TOF) maXis de la marca Bruker Daltonik (Bremen, Alemania) (**Figura 32**).



247

Figura 32. Equipo de UPLC Dionex Ultimate 3000 y UHR-QTOF maXis de Bruker Daltonik.

En la separación cromatográfica se utilizó, por un lado una columna Zorbax Eclipse Plus C-18, de 4.6 x 150 mm y tamaño de partícula de 1.8 μm para las muestras del capítulo 5, y por otro una columna Zorbax C-18 de 3x250 mm y un tamaño de partícula de 5 μm para las muestras de suero, plasma y orina. Las fases móviles usadas fueron H_2O -AcN (90:10, v/v) con 0.5 % de ácido fórmico como fase móvil A y



acetonitrilo como fase móvil B. El flujo de fase móvil fue 0.3 ml/min, y se acopló directamente la salida del cromatógrafo a la interfase del espectrómetro de masas. El volumen de inyección seleccionado fue de 5 μ l en todos los casos, y el gradiente usado fue el mismo que se describió para el análisis de las muestras del capítulo 5.

248 La detección mediante espectrometría de masas se realizó en modo de ionización negativo para las muestras del capítulo 5, y en modo de ionización positivo y negativo para las muestras del capítulo 7. El rango de masas analizado fue de 50-1000 m/z y se utilizó formiato sódico como calibrante externo, de igual manera que en los apartados anteriores. Debido a las pequeñas modificaciones en el diseño del analizador UHR-Qq-TOF, algunos parámetros de transferencia se modifican, los valores óptimos para los principales parámetros de la fuente y de transferencia se detallan en la **Tabla 14.**



PARÁMETROS DEL DETECTOR UHR-QTOF (maXis)	
FUENTE DE IONIZACIÓN	TRANSFERENCIA
Presión Gas Nebulizador: 2 bar	Ion Energy: 4.0 eV
Flujo Gas Secado: 8 l/min	Funnel RF: 300.0 Vpp
Temperatura: 200 °C	Collision Energy: 8.0 eV
End Plate offset: ±500 V	Collision RF: 400.0 Vpp
Capilar: 4.500 V	Transfer time: 65 µs
	Pre-pulse storage: 6 µs
	Ion Cooler: 40.0 Vpp

Tabla 14. Parámetros de la fuente de ionización y de la zona de transferencia del método ESI-UHR-Qq-TOF-MS.

Los datos obtenidos en estos análisis se procesaron con el software DataAnalysis 4.1 (Bruker Daltonik), una versión más actualizada del software utilizado en el apartado anterior, pero con la misma funcionalidad, ya que ofrece una lista de posibles fórmulas moleculares usando el editor GenerateMolecularFormula™.



7. Determinación de capacidad antioxidante mediante el método DPPH.

Para la determinación de la capacidad antioxidante de los extractos de *Hibiscus sabdariffa* del capítulo 4 se utilizó el método DPPH. Este método se basa en el uso del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil ($\text{DPPH}^{\cdot+}$), el cual presenta un color violeta oscuro. Este radical, cuando se pone en contacto con una sustancia capaz de donar un átomo de hidrógeno se reduce, produciéndose la pérdida de este color característico, lo que se traduce en un descenso de la absorbancia.

250

Para tal determinación los ensayos se realizaron tal y como se describe en [231]. Para llevar a cabo este ensayo se añadieron 50 μl de cada extracto en placas de 96 pocillos junto con 200 μl de una solución metanólica de $\text{DPPH}^{\cdot+}$ 0.1 mM, y se dejó reaccionar en oscuridad a temperatura ambiente durante 1 hora. El descenso de la absorbancia del radical $\text{DPPH}^{\cdot+}$ se midió durante 30 minutos utilizando un lector Multi-Modal de Microplacas basado en Monocromadores SynergyTM Mx de Bioteka una longitud de onda de 515 nm, hasta que la señal se estabilizó. Como blanco se utilizó 50 μl de metanol. Para determinar la actividad antioxidante de los extractos se utilizó una curva



patrón de trolox preparada utilizando concentraciones crecientes de dicho patrón (0, 25, 50, 75, 100, 125 y 500 $\mu\text{g/ml}$). Los resultados se expresaron como μmol equivalentes de trolox/g de extracto seco.

8. Determinación de polifenoles totales, contenido en flavonoides, antocianinas, cianidina y delphinidina.

El contenido en polifenoles totales de los extractos de *Hibiscus sabdariffa* del capítulo 4 fue determinado mediante el método de Folin-Ciocalteu, el cual se basa en la reducción de una mezcla de ácido fosfotúngstico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{10}$) y ácido fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) por los polifenoles presentes en la muestra, a una mezcla de óxidos de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}), que presentan color azul. Esta coloración azul puede determinarse midiendo la absorción de radiación a una longitud de onda de 765 nm, la cual se relaciona de manera directa con la cantidad de polifenoles presentes en la muestra.

251

Para llevar a cabo esta determinación se siguió el protocolo descrito en [232]. Se mezclaron 50 μl de los extractos, a diferentes concentraciones, con 450 μl de reactivo de Folin 1 N disuelto en agua (1:1, v/v) preparado



momentos antes del ensayo. Para la curva de calibrado se utilizaron diferentes concentraciones de ácido gálico, que oscilaban desde 20 hasta 180 $\mu\text{g/ml}$. Se dejó reaccionar el reactivo de Folin con los extractos o con las disoluciones patrón de ácido gálico durante 5 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente se añadió 500 μl de una disolución de carbonato sódico al 15 %, se agitó vigorosamente y se incubó durante una hora a temperatura ambiente y en oscuridad. La absorbancia se determinó a una longitud de onda de 765 nm en un lector de microplacas Synergy™ Mx de Biotek. Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/ g de extracto seco.

En lo referente a la determinación del contenido en flavonoides totales de las muestras del mismo capítulo, se utilizó un método colorimétrico según se detalla en [233]. Para ello se mezclaron 500 μl de cada extracto preparado a una concentración de 50 mg/ml con 1.5 ml de metanol, 0.1 ml de cloruro de aluminio al 10 %, 0.1 ml de acetato potásico 1 M y 2.8 ml de agua destilada. La mezcla se dejó reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente, y se midió la absorbancia a 415 nm con el lector de placas descrito anteriormente. Para el calibrado se utilizó una disolución



patrón de quercetina disuelta en metanol, en concentraciones que abarcan el rango 10-100 µg/ml. Los resultados obtenidos se expresaron como miligramos de equivalentes de quercetina/ g de extracto seco.

La determinación de antocianinas se realizó en los extractos de *Hibiscus sabdariffa* hidrolizados del capítulo 4, mediante un sistema HPLC acoplado a un detector UV-Vis de diodos en fila (Thermo Finigan), según se describe en [234]. Para realizar la hidrólisis de los componentes presentes en los extractos, se disolvieron 100 mg de extracto seco en una disolución 2 N de HCl en metanol-agua 50:50 (v/v), se filtraron con filtros de jeringa de nylon (Millipore) y se incubaron a 100 °C durante 60 minutos. Trascurrido este tiempo, los extractos se enfriaron inmediatamente a temperatura ambiente para su análisis. Estos análisis se llevaron a cabo empleando una columna Zorbax C-18 de 250 x 4.6 mm, con un tamaño de partícula de 5 µm. La separación de las antocianinas se realizó utilizando un gradiente isocrático de 20 minutos de duración en el que la fase móvil estaba compuesta por una mezcla de metanol-agua (50:50, v/v) acidificada con un 0.01 % de ácido trifluoroacético. La detección se realizó a 522 nm, siendo identificadas las antocianinas mediante comparación de los tiempos de retención y los espectros de absorción



registrados, en un rango de 490-590 nm, con los obtenidos de los estándares, cloruro de cianidina y delphinidina (Extrasynthese, Lyon, France). Las curvas de calibración se prepararon disolviendo los estándares en una disolución acuosa de HCl al 1 %, en concentraciones que oscilaron entre 0.2-100 mg/l. El cálculo del contenido en cianidina y delphinidina (mg/g) de las muestras se realizó por interpolación del área de pico en la correspondiente recta de calibrado (por triplicado). El contenido total en antocianinas se calculó de manera indirecta utilizando los factores de conversión 2.07 y 2.15 para el contenido en delphinidina-3-sambubiósido y cianidina-3-sambubiósido respectivamente, ya que el contenido de ambas antocianinas constituye más del 99 % del contenido en antocianinas totales.

9. Ensayos de actividad antimicrobiana.

Las actividades antimicrobianas de los extractos etanólicos de *Hibiscus sabdariffa* del capítulo 4 se realizaron mediante el método Kirby-Bauer de difusión en placas de agar de acuerdo a las directrices del “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2005). El medio de cultivo Müller-Hinton con agar (Bio Rad, México DF) se dejó solidificar en



placas petri asépticas. Las cepas bacterianas se prepararon por inoculación de los cultivos de 24 horas obtenidos según se detalla anteriormente mediante el método de siembra en césped a una densidad de 10^8 UFC/ml. Se humedecieron discos de papel estériles de 6 mm de diámetro con 20 μ l de disolución conteniendo 7.6 mg de cada extracto. Se utilizaron como controles positivos cinco antibióticos diferentes: gentamicina (10 μ g), eritromicina (15 μ g), vancomicina (30 μ g), tetraciclina (30 μ g) y clindamicina (2 μ g) (Sensi-Disc BBL, USA), mientras que los discos humedecidos con etanol fueron usados como controles negativos. Las placas de agar fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas, y la actividad antibacteriana se determinó midiendo los halos de inhibición en milímetros.

255

10. Análisis estadístico.

Para el capítulo 4, los datos obtenidos según se detalla en apartados anteriores, se analizaron usando el software Origin (versión Origin Pro 8 SR0, Northampton, MA) para realizar un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95 % ($p \leq 0.05$), con el fin de identificar diferencias significativas en el contenido de polifenoles,

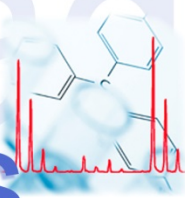


flavonoides y antocianinas totales, cianidina y delphinidina individuales, así como capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana de los extractos de *Hibiscus sabdariffa* de distintas variedades.



Resultado

Resultados



Bloque I

Bloque I

Rosmarinus Officinalis



RESULTADOS

Bloque I: *Rosmarinus officinalis*

Capítulo 1: Caracterización de compuestos fenólicos bioactivos en extractos de *Rosmarinus officinalis* obtenidos con distintos sistemas de extracción mediante RP-HPLC-DAD-ESI-TOF.

Los extractos de romero obtenidos mediante PLE y SFE como se describe en apartados anteriores fueron analizados mediante HPLC utilizando dos detectores, un DAD y un TOF acoplado a través de una interfase ESI. Para llevar a cabo una caracterización completa de los compuestos fenólicos bioactivos presentes en los extractos la detección se realizó utilizando modo de ionización positivo y negativo. La identificación se llevó a cabo en base a los tiempos de retención de los compuestos, sus bandas de absorción en el espectro UV-Vis, su espectro de masas proporcionado por el detector TOF-MS, y usando información disponible en bibliografía.

En la **Figura 1** se muestra como ejemplo representativo de ambos sistemas de extracción el cromatograma de pico base



(BPC) del extracto de romero obtenido bajo condiciones supercríticas a 150 bares usando etanol como co-solvente (extracto SFE 150), y el extracto obtenido mediante PLE usando agua como agente extractante a 200 °C (extracto PLE 200), en ambos modos de ionización. Los perfiles cromatográficos de los extractos de romero obtenidos mediante HPLC-DAD-ESI-TOF poseen numerosos picos correspondientes a compuestos fenólicos así como a otros compuestos polares, de los cuales 50 compuestos fueron tentativamente identificados. Dichos compuestos se recogen en la **Tabla 1**, donde se muestra su tiempo de retención, fórmula molecular, m/z experimental y calculado, error, bandas de absorción en el espectro UV-Vis, modo de ionización, así como los extractos en los que fueron encontrados.

En bibliografía pueden encontrarse algunas investigaciones que estudian la composición de extractos de romero mediante HPLC-MS, sin embargo en estos estudios sólo algunos compuestos mayoritarios han sido identificados, en concreto en un rango que abarca de tres a dieciséis [26, 235-238]. A pesar de que en un trabajo más reciente fueron identificados un mayor número de compuestos, en concreto treintaiséis, en un extracto de romero obtenido mediante SLE



(36), la mayoría de trabajos sólo identifican los compuestos mayoritarios de romero, omitiendo otros que forman parte de su composición en menor proporción, y que podrían ser responsables de parte de los efectos beneficiosos atribuidos a esta planta. Es por esto que en la presente memoria se ha llevado a cabo una caracterización pormenorizada de los compuestos fenólicos presentes en los extractos de romero objeto de estudio.

Los compuestos con mayor actividad antioxidante descritos previamente en esta planta pertenecen a diferentes familias, fundamentalmente diterpenos fenólicos y flavonoides, descritos en bibliografía como potentes secuestradores de radicales libre [239-241]. El principal compuesto antioxidante presente en el romero es el ácido carnósico, diterpeno fenólico a partir del cual se derivan el resto, como son el carnosol, rosmadial, rosmanol y sus isómeros, entre otros, todos ellos caracterizados por una estructura básica diterpénica tipo abietano. Otros compuestos fenólicos presentes en su composición son flavonoides como apigenina o scutelareína; flavonas metiladas como genkwanina, cirsimaritina o 4'-metoxitectocrisina; distintos flavonoides glicosilados como la homoplantagenina; así como compuestos pertenecientes a



distintas familias, como el ácido rosmarínico, un derivado de ácido hidroxicinámico. Las estructuras de dichos compuestos se muestran en la **Figura 2**.



Figura 1. BPC de los extractos de romero obtenidos mediante SFE a 150 bar (izquierda) y PLE a 200 °C (derecha) en modo de ionización positivo (arriba) y negativo (abajo)

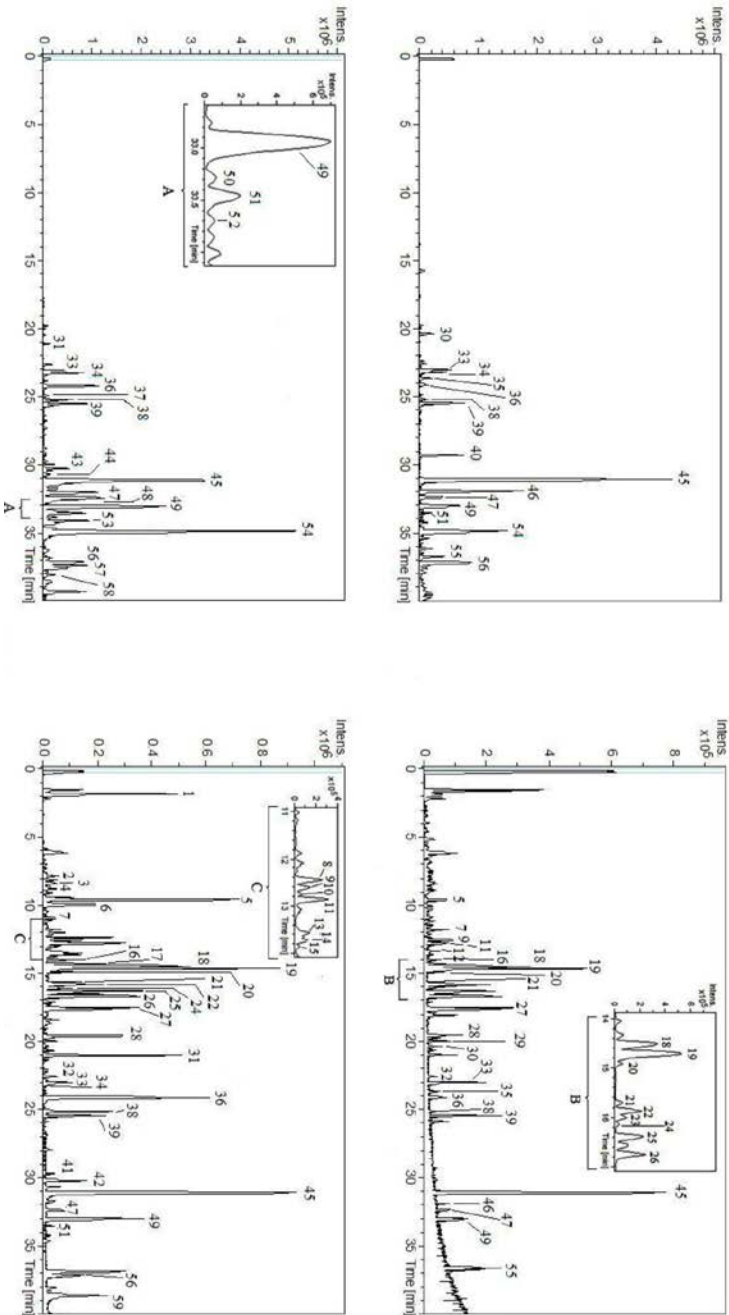


Tabla 1 Compuestos propuestos detectados en extractos de romero obtenidos mediante SFE y PLE analizados por HPLC-DAD-ESI-TOF-MS.

Pico	tr (min)	m/z exp	m/z calc	Error (ppm)	Fórmula Molecular	UV-Vis máximo (nm)	Modo Ionización	Extractos	Compuestos Propuestos	Ref
1	2,0	191,0574	191,0561	-6,1	C ₇ H ₁₂ O ₆	275	N	3, 5	Ácido Quínico	40
2	8,1	475,1469	475,1457	-2,5	C ₂₀ H ₂₈ O ₁₃	250	N	3, 5	Primaverina/ Primulaverina	47
3	8,3	503,1406	503,1406	0,9	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₄	260, 330 (sh)	N	3, 5	6-O-Cafeoil-β-D-fructofuranosil-(2→1)-α-D-glucopiranosido	41
4	8,9	459,1507	459,1508	0,2	C ₂₀ H ₂₈ O ₁₂	280	N	3, 5	NI	-
5	9,3	227,1277	227,1278	1,9	C ₁₂ H ₁₈ O ₄	285, 330	B	3, 4, 5	Ácido 12-Hidroxijsmónico	42
6	10,1	305,0696	305,0667	-8,4	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	275, 330 (sh)	N	3, 5	Galocatequina	19
7	11,9	593,1524	593,1512	-2,5	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₅	280, 330 (sh)	B	3, 5	Luteolina 7-O-rutinósido	33
8	12,5	597,1267	597,125	-2,4	C ₂₉ H ₂₆ O ₁₄	275, 330 (sh)	N	3, 5	Pterogynoside / kaempferide 3-O-(2''-O-galoi(r)hamnósido)	48 / 49
9	12,6	461,0749	461,0725	-4,9	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	280, 330 (sh)	B	3, 5	Luteolina 7-glucuronido / Scutelaireina 7-O-β-glucuronido	43 / 50
10	12,8	533,1675	533,1664	-1,8	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₂	275, 330 (sh)	N	3, 5	NI	-
11	12,9	477,1067	477,1038	-5,3	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	268, 335	B	3, 4, 5	6-metoxiluteolina 7-glucósido	34 / 35
12	13,5	609,1812	609,1814	0,8	C ₃₈ H ₃₂ O ₁₅	275, 330	P	3, 4, 5	NI	-
13	13,6	717,1479	717,1461	-2,5	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	280	N	3, 5	NI	-
14	13,7	609,186	609,1825	-4,2	C ₃₈ H ₃₄ O ₁₅	280, 330 (sh)	N	3, 4, 5	Hesperedina	43
15	13,8	431,1013	431,0984	-6,1	C ₃₁ H ₂₀ O ₁₀	280, 330 (sh)	N	3, 5	Apigenina 7-O-glucósido	33
16	14,1	461,1098	461,1089	-2,3	C ₃₂ H ₂₂ O ₁₁	275, 327 (sh)	B	3, 4, 5	Homoplantagena	31
17	14,4	549,1998	549,1978	-2,8	C ₃₇ H ₃₄ O ₁₂	275, 330	N	3, 4, 5	NI	-
18	14,5	461,0761	461,0725	-6,5	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	273, 335	B	3, 4, 5	Luteolina 7-glucuronido / Scutelaireina 7-O-β-glucuronido	43 / 50
19	14,7	359,0826	359,0772	-6,1	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	290 (sh), 328	B	3, 4, 5	Ácido rosmarínico	31



Tabla 1 Compuestos detectados en extractos de romero obtenidos mediante SFE y PLE analizados por HPLC-DAD-ESI-TOF-MS.

20	14,9	683,1652	683,1618	-3,8	C ₃₃ H ₃₂ O ₁₆	280	B	3, 4, 5	NI	-
21	15,7	653,1523	653,1512	-1,3	C ₃₂ H ₃₀ O ₁₅	275	B	3, 4, 5	Feruloliteptrina isómero 1	35
22	15,9	503,0844	503,0831	-2,2	C ₂₉ H ₂₆ O ₁₃	264, 338	B	3, 4, 5	Luteolina 3'-O-(O-acetil)-β-D-glucurónide isómero 1	55
23	16	477,1387	477,1391	1,2	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₁	280, 330 (sh)	P	3, 4, 5	Cirsimaritina 4'-glucósido	44
24	16,1	623,1414	623,1406	-1,8	C ₃₁ H ₂₈ O ₁₄	267, 335	B	3, 4, 5	Feruloliteptrina isómero 2	35
25	16,4	503,0856	503,0831	-4,1	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₃	265, 339	B	3, 4, 5	Luteolin 3'-O-(O-acetil)-β-D-glucurónido isómero 2	55
26	16,7	503,0856	503,0831	-4,1	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₃	267, 334	B	3, 4, 5	Luteolin 3'-O-(O-acetil)-β-D-glucurónido isómero 3	55
27	17,6	285,0409	285,0405	-1,4	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	240, 275 (sh)	B	4, 5	Scutelaraina	31
28	19,8	269,0434	269,0455	7,9	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	246, 325 (sh)	B	3, 4, 5	Apigenina	15
29	20	301,07	301,0707	2,5	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	266, 330	P	4, 5	Diosmetina / Hispidulina	51 / 52
30	20,4	151,112	151,1117	-1,8	C ₁₀ H ₁₄ O ₁	250, 325	P	1, 3, 5	Timol	33
31	21,1	287,2206	287,2228	7,8	C ₁₆ H ₃₂ O ₄	255, 329 (sh)	N	1, 2, 3, 5	NI	-
32	22,6	299,0557	299,0561	1,3	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	250, 325 (sh)	N	4, 5	Diosmetina / Hispidulina	51 / 52
33	23	313,0716	313,0718	0,6	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	279, 330	B	Todos	Cirsimaritina	16
34	23,2	345,1726	345,1707	5,4	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	282	B	Todos	Rosmanol	16
35	23,6	315,0853	315,0863	2,4	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	248, 334	P	1, 2, 4, 5	Ladanein	35
36	24,1	345,1712	345,1707	-1,3	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	271	B	Todos	Episorosmanol	31
37	24,9	299,1642	299,1653	2,7	C ₁₉ H ₂₄ O ₃	285	N	1, 2	Artepillin C / Miltipolone	48 / 49
38	25,1	345,1721	345,1707	-3,6	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	290, 335	B	Todos	Epirosmanol	31
39	25,4	283,0621	283,0612	-2,8	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	266, 342	B	Todos	Genkwanina	31
40	29,2	329,1043	329,102	-5,3	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	275, 331	P	1, 2	Sakvigenina	36
41	29,6	343,1554	343,1551	-0,3	C ₂₀ H ₂₄ O ₅	235, 289	N	3, 5	Rosmedial / Galdosol / Carnosol p-quinona / Safricinolide	32 / 38



Tabla 1 Compuestos propuestos detectados en extractos de romero obtenidos mediante SFE y PLE analizados por HPLC-DAD-ESI-TOF-MS.

42	30.1	299,1653	299,1653	0.1	C ₁₉ H ₂₄ O ₃	274	N	3, 4, 5	Artepillin C / Miltipolone	48 / 49
43	30.4	471,3473	471,348	1.7	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	-	N	1, 2	Anemosapogenina	37
44	30.6	457,3315	457,3323	2.5	C ₂₉ H ₄₆ O ₄	-	N	1, 2	Notohamosin B	45
45	31	329,1769	329,1758	-2.5	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	287	B	Todos	Carnosol	16
46	31.8	299,0896	299,0914	6	C ₁₇ H ₁₄ O ₅	270, 332	P	1, 2, 4, 5	4'-Metoxitocotriscina	15
47	32.3	373,2025	373,202	-0.9	C ₂₂ H ₃₀ O ₅	268, 330	B	Todos	7-Etoxirosmanol / Episorosmanoletiléer	14 / 54
48	32.5	343,1567	343,1551	-3.4	C ₂₀ H ₂₄ O ₅	240, 289	N	1, 2	Rosmadial / Galdosol / Carnosol p-quinona / Saffincolide	33 / 38
49	33	373,2033	373,202	-2.8	C ₂₂ H ₃₀ O ₅	285	B	Todos	7-Etoxirosmanol / Episorosmanoletiléer	14 / 54
50	33.2	471,348	471,348	0.9	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	238, 289	N	1, 2	Ácido Augústico / Ácido Bentámico	53
51	33.4	315,1954	315,1966	4	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	230, 289	B	1, 2, 4, 5	Rosmaridifenol	32
52	33.7	471,3472	471,348	2.2	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	278	N	1, 2	Ácido Augústico / Ácido Bentámico	53
53	34	301,1824	301,1809	-3.1	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	289	N	1, 2	2,3,4,4a,10,10a-hexahidro-5,6-dihidroxy-1,1-dimethyl-7-(1-methylethyl)-, (4aS,10aR)-9(1H)-Phenanthrenone	22
54	34.8	331,1925	333,1915	-3.0	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	285	B	1, 2	Ácido carnósico	15
55	36.6	383,2039	383,2064	6.6	C ₂₀ H ₃₀ O ₇	-	P	Todos	NI	-
56	37.1	301,2158	301,2173	5.7	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	281	B	Todos	Salviol	46
57	37.3	317,2158	317,2181	9.3	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	234, 251(sh)	N	1, 2	[9]-Shogaol	38
58	38	299,2012	299,2017	3.1	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	249, 275	N	1, 2	Hinokione	39
59	38.6	405,1931	405,1919	-3.2	C ₂₇ H ₃₀ O ₇	-	N	3, 5	NI	-

^a m/z experimental y calculado, y error del extracto obtenido mediante PLE 200 °C.

^b m/z experimental y calculado, y error del extracto obtenido mediante SFE 150 bares.

(sh) en la columna de máximos UV-Vis indica que es un hombro. Para algunos compuestos no se detalla ninguna longitud de



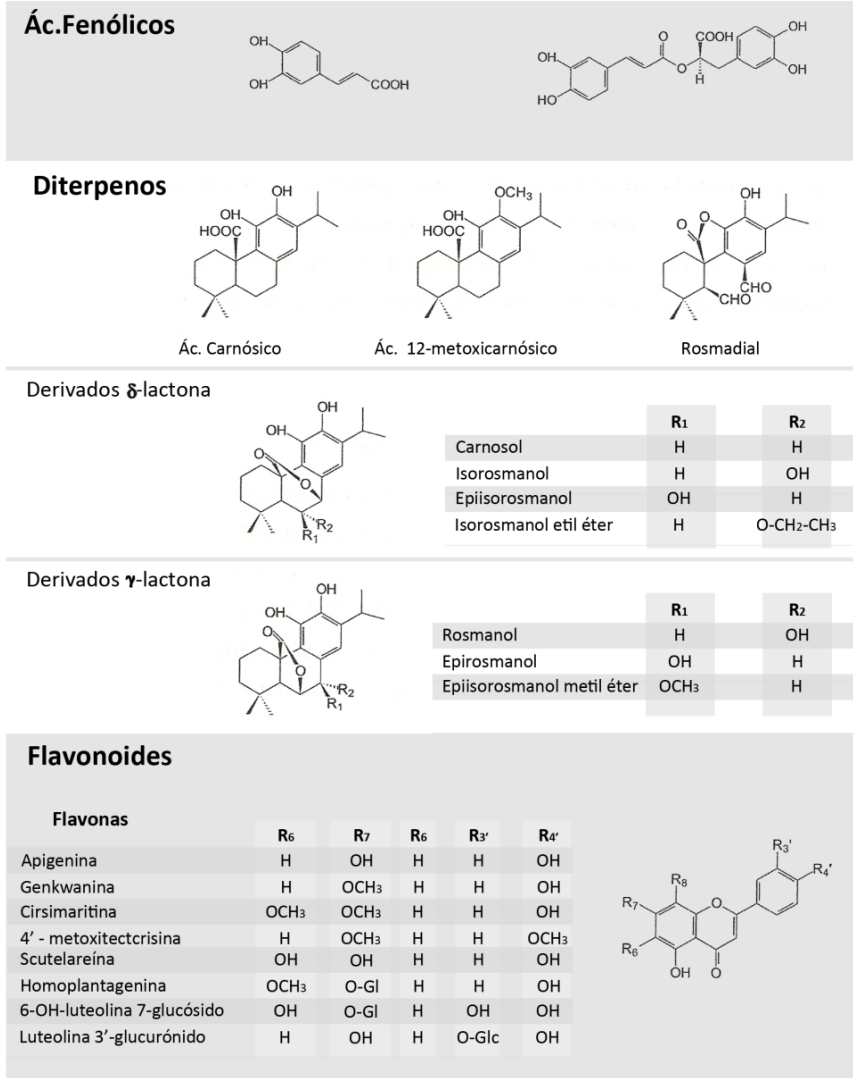


Figura 2. Estructuras de compuestos de romero.

Es conocido por tanto que el mayor compuesto antioxidante del romero es el ácido carnósico, un compuesto que ha demostrado una gran inestabilidad en presencia de



oxígeno. Esta inestabilidad es la responsable de la formación de nuevos compuestos resultantes de la degradación del ácido carnósico, como son el carnosol, rosmanol, epirosmanol, epiisorosmanol, rasmadial o ácido 12-metoxicarnósico [242].

En los extractos analizados, además de estos compuestos, se han detectado otros compuestos que ya se han descrito en esta planta, como son galocatequina, luteolina 7-O-rutinósido, nepitrina, apigenina, apigenina 7-O-glucósido, ladanein, salvigenina, anemosapogenina, rosmaridifenol, shogaol o hinokione.

270

La galocatequina ha sido descrita en diferentes fracciones de romero obtenidas por PLE usando agua subcrítica analizadas mediante CE-ESI-MS [243]. La luteolina 7-O-rutinósido y la apigenina 7-O-glucósido, dos flavonoides comunes, han sido identificadas en un extracto de romero obtenido mediante SLE analizado por LS-ESI-MS/MS [244]. Por su parte, la nepitrina, conocida como 6-metoxiluteolina 7-glucósido, encontrada por primera vez en los años setenta en extractos obtenidos mediante soxhlet de *Salvia tormentosa* (Labiatae) [39], también ha sido detectada posteriormente de hojas de *Rosmarinus officinalis* [245]. En este mismo estudio también se ha detectado un flavonoide conocido



como ladanein en hojas de romero [245]. La apigenina y 4'-metoxitectocrisina, un flavonoide derivado de la apigenina, fueron aisladas en un estudio sobre las plantas de romero silvestres e irrigadas, así como en subproductos resultantes de la destilación del aceite esencial de esta planta [26]. La 5-hidroxi-6,7,4'-trimetoxiflavona denominada salvigenina, también se ha identificado en extractos de romero obtenidos con agua caliente, donde se estudiaba la actividad antimutagénica de estos compuestos [246]. El triterpeno ácido 23-hidroxibetulínico, conocido comúnmente como anemosapogenin, también ha sido aislados de las partes aéreas de *Rosmarinus officinalis* [247]. El rosmaridifenol también ha sido encontrado en la fracción antioxidante de extractos de romero obtenidos mediante SFE con CO₂ a 35 MPa y 100 °C analizados mediante HPLC-DAD-ESI-TOF-MS [237]. También en nuestros extractos se ha encontrado un compuesto que ha sido descrito como procedente de la degradación del rosmanol y sus isómeros a partir de la ruptura del enlace intramolecular de sus estructuras en medio ácido, cuyo nombre es 2,3,4,4a,10,10a-hexahidro-5,6-dihidroxi-1,1-dimetil-7-(1-metiletil)-(4aS, 10aR)-9(1H)-phenanthrenone [242]. Adicionalmente, otros autores han descrito la presencia de [9]-shogaol en la fracción



antioxidante aislada a partir de hojas secas de romero extraídas mediante SFE con CO₂ supercrítico a 100 °C y 30 MPa [238]. Por otro lado, el compuesto hinokione ha sido identificado en extractos de hojas de romero obtenidos mediante SFE a distintas temperaturas (30, 40 y 50 °C) y presiones (100, 200 y 300 bares), así como en extracciones mediante soxhlet usando como disolventes etanol y hexano [248].

272 Los análisis llevados a cabo en los extractos objeto de estudio pusieron de manifiesto la presencia de otros compuestos previamente descritos en otras especies pertenecientes a la familia *Lamiaceae*, de la cual forma parte el romero. Estos compuestos fueron ácido quínico, 6-O-Cafeoil-β-D-fructofuranosil-(2→1)-α-D-glucopiranosido, ácido 12-hidroxijasmónico, hesperidina, cirsimaritina 4'-glucósido, timol, notohamosin B y salviol.

De estos compuestos, el ácido quínico ha sido identificado y cuantificado mediante HPLC-DAD en una infusión de *Ballora nigra* usada generalmente con fines medicinales, siendo este ácido orgánico uno de los principales componentes de esta infusión [249]. Por otro lado, en una investigación sobre *Salvia officinalis*, una especie de la familia *Lamiaceae* conocida como salvia, se descubrieron 3 nuevos



compuestos fenólicos glicosilados, entre los que se encontraba el denominado 6-O-Cafeoil- β -D-fructofuranosil-(2 \rightarrow 1)- α -D-glucopiranosido, un compuesto identificado tentativamente en esta memoria. En el caso del ácido 12-hidroxijasmónico, su presencia se ha detectado en *Origanum vulgare*, una especie culinaria usada comúnmente en la cuenca mediterránea, más concretamente en extracciones SLE usando como disolvente una mezcla MeOH-H₂O (5:1, v/v) [250]. Se han llevado a cabo distintos estudios para la caracterización cualitativa y cuantitativa de los componentes de distintos téis comerciales de hojas de menta (*Menthae piperitae folium*), hojas de melisa (*Melissae folium*), hojas de salvia (*Salviae officinalis folium*), y hojas de orégano (*Origanum vulgare folium*), en los que se han usado distintas técnicas analíticas. En ellos se ha detectado la presencia de hesperitina 7-O-rutinósido, conocida como hesperedina, en extractos realizados con una mezcla de acetona acuosa al 50 % en hojas de menta, y la cirsimaritina 4'-glucósido se ha encontrado que es uno de los constituyentes mayoritarios de las partes aéreas de orégano [251]. Por otro lado el timol se ha encontrado en tomillo en un estudio donde se identificaron un total de 38 compuestos fenólicos en extractos de cinco especies de la familia *Lamiaceae* obtenidos



mediante SLE: romero, orégano, salvia, albahaca y tomillo [244]. Por su parte, el notohamosin B fue uno de los tres nuevos triterpenoides aislados por primera vez en los extractos metanólicos de la planta *Notochaete hamosa Benth.* [252]. También se ha detectado en los extractos de romero salviol, un compuesto tipo abietatrieno con un grupo alcohol en su estructura, que ha sido encontrado en especies del género *Salvia*, concretamente en *Salvia aegyptiaca*, *Salvia lanígera*, *Salvia moorcroftiana* y *Salvia officinalis* [253].

274 En ocasiones con la metodología analítica utilizada no ha sido posible diferenciar entre dos o más compuestos propuestos para el mismo tiempo de retención, como ha sido el caso de primiverina/primulaverina, pterogynoside/kaempferide 3-O-(2'-O-galoilrhamnósido), luteolina 7-glucurónido/scutelareína 7-O- β -glucurónido, diosmetina/hispidulina, artepillin C/miltipolone, 7-etoxirosmanol/epiisorosmanoletiléter, ácido augústico/ácido bentámico, rosmadial/galdosol/carnosol p-quinona/safficinolide, dos isómeros de feruloilnepitrina y tres isómeros de luteolina 3'-O-(O-acetil)- β -D-glucurónido. En la **Figura 3** se muestra la estructura de algunos de estos isómeros tentativamente identificados en el estudio.



Los isómeros primiverina y primulaverina son compuestos característicos del género *Primula*, y no pudieron distinguirse usando la información proporcionada mediante DAD y TOF-MS [254]. Por otro lado pterogynoside, un derivado del kaempferol [255] y el flavonol glicosilado kaempferide 3-O-(2''-O-galoilrhamnósido) [256], poseen importantes similitudes en su estructura que descartan su identificación de manera inequívoca con la información disponible. La luteolina 7-glucurónido ha sido determinada en preparados herbales comerciales y especies de la familia *Lamiaceae* [257], mientras que la scutelareína 7-O- β -glucurónido, también conocida como scutelareína, fue encontrada en las partes aéreas de *Scutellaria baicalensis*, también de la familia del romero [258].



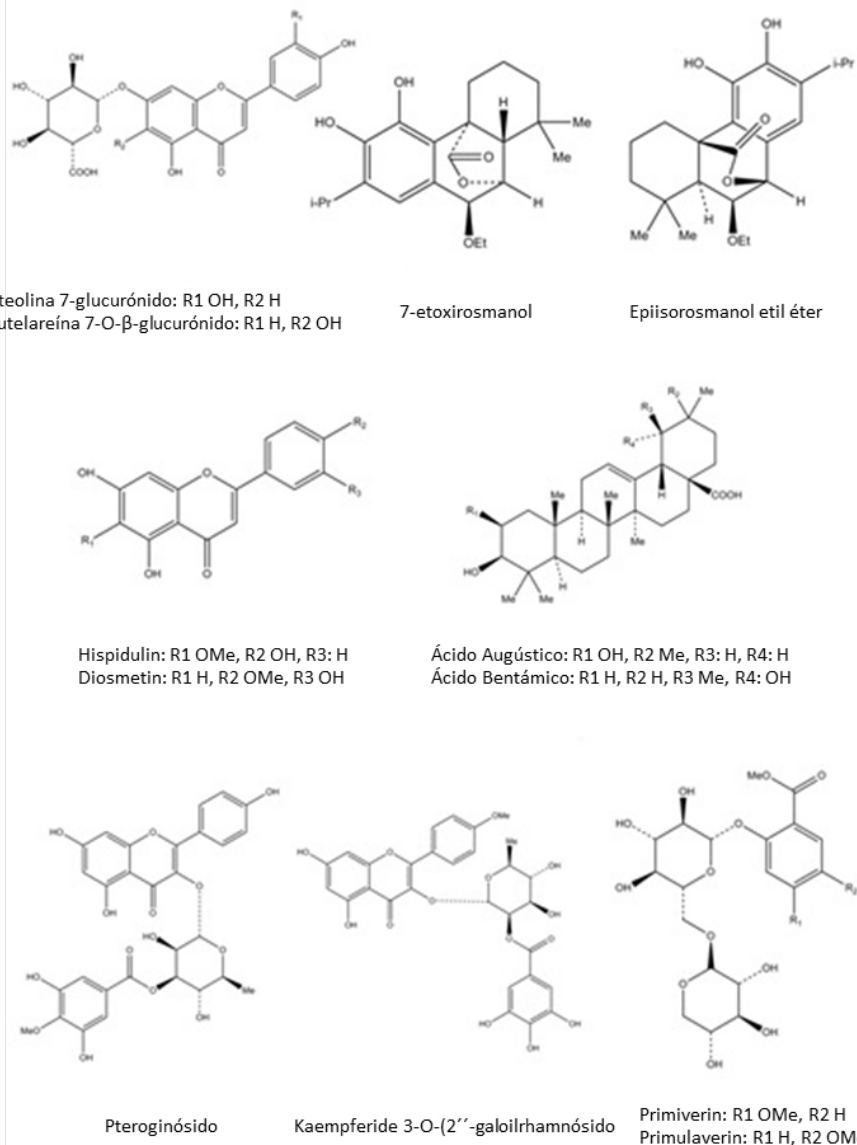


Figura 3. Estructuras de compuestos isoméricos encontrados en los extractos de romero



La diosmetina y la hispidulina son dos isómeros encontrados ambos en romero [210, 259]. Los ácidos triterpénicos ácido augústico, un oleanano, y el ácido bentámico, un ursano conocido también con el nombre de ácido pomólico, fueron identificados en extractos etanólicos de *Perilla frutescens* [260] y no pudieron diferenciarse en esta memoria. Asimismo no han podido distinguirse entre el 7-etoxirosmanol y el epiisosrosmanoletiléter, dos diastereoisómeros previamente descritos en romero [261, 262]. En los análisis de los extractos de romero también se han encontrado dos isómeros de la feruloilnepitrina, de ellos el isómero propuesto como 6''-O-(E)-feruloilnepitrina ha sido descrito en romero [245]. También se han propuesto tres isómeros de luteolina 3'-O-(O-acetil)- β -D-glucurónido, dos de ellos, en concreto la luteolina 3'-O-(3''-O-acetil)- β -D-glucurónido y la luteolina 3'-O-(4''-O-acetil)- β -D-glucurónido, han sido descritos en romero [263]. Artepillin C, un ácido fenólico presente en *Baccharis dracunculifolia*, y miltipolone, un diterpenoide encontrado en *Salvia miltiorrhiza*, también se han encontrado en los extractos de romero estudiados (49, 50). Finalmente también se ha detectado la presencia de rosmadial compuesto ya descrito en romero, junto con galdosol, carnosol p-quinona y safficinolide encontrados



todos en salvia (34, 35), los cuales no han podido diferenciarse con la información obtenida.

En la **Tabla 1** se encuentran todos los compuestos identificados tentativamente así como los extractos en donde todos estos compuestos fueron detectados. De acuerdo a los resultados encontrados, podemos concluir que el mejor procedimiento para extraer dichos compuestos va a depender de cada caso, y en concreto de la polaridad del compuesto de interés. En este sentido, los compuestos de mayor polaridad sólo se encontraron en los extractos obtenidos mediante PLE a 100 y 200 °C utilizando agua como disolvente de extracción.

278

Estos compuestos polares aparecen con tiempos de retención que oscilan en un rango entre 2 y 12.8 minutos. En el resto de extractos obtenidos mediante PLE usando bien agua o etanol se encontraron otros compuestos de polaridad menos elevada, los cuales poseen tiempos de retención que oscilan entre 13 y 20 minutos. Por otro lado, los compuestos de polaridad intermedia, encontrados a tiempos de retención de entre 23 y 33 minutos, fueron detectados en todos los extractos, independientemente de la técnica de extracción. Finalmente, los compuestos menos polares fueron fundamentalmente extraídos mediante SFE. Estos resultados están en concordancia con el comportamiento esperado para



estas técnicas de extracción, ya que mientras que el CO₂ es un disolvente de muy baja polaridad, el etanol o el agua empleada en PLE permiten extraer compuestos de mayor polaridad. Adicionalmente se ha observado que PLE es una técnica que proporciona mayores porcentajes de recuperación, mientras que SFE es una técnica de extracción más selectiva gracias al uso de co-solventes y más respetuosa con el medio ambiente.

Los compuestos mayoritarios del extracto de romero son como era de esperar el ácido carnósico, y sus derivados, principalmente carnosol, aunque también se encuentran cantidades significativas de rosmanol e isómeros, rosmadial, y genkwanina.



Capítulo 2: Caracterización de extractos obtenidos mediante extracción asistida con microondas de hojas de *Rosmarinus officinalis* recolectadas en diferentes zonas geográficas de Serbia.

2.1. Identificación y cuantificación de los extractos de hojas de romero.

280

Los extractos obtenidos mediante MAE como se describe en apartados anteriores fueron analizados mediante UPLC-QTOF. El análisis de estos extractos reveló la presencia de 34 compuestos, la mayoría de ellos flavonoides y diterpenos fenólicos, aunque también se encontraron algunos ácidos orgánicos y triterpenos tipo abietano. En la **Figura 1** se muestra el cromatograma de pico base de algunos extractos de romero representativos de las composiciones encontradas, donde los compuestos identificados se encuentran numerados según su tiempo de retención.

Los compuestos fueron identificados comparando sus tiempos de retención y espectros de MS/MS proporcionados por el analizador de masas Q-TOF en los casos en los que se disponían de estándares comerciales (carnosol, ácido carnósico, ácido rosmarínico, homoplantagenina, genkwanina, ácido quínico y ácido siríngico). Para el resto de compuestos la identificación se realizó en base a los espectros



de MS y MS/MS registrados y usando la información disponible en bibliografía y bases de datos. En la **Tabla 1** se recogen los compuestos identificados en los extractos de romero numerados según su orden de elución, junto con su tiempo de retención, m/z teórico, fórmula molecular y los principales fragmentos obtenidos en los análisis de MS/MS.

La mayoría de estos compuestos han sido previamente descritos en hojas de romero, como es el caso de los diterpenos fenólicos carnosol, ácido carnósico, rosmanol y sus isómeros, al igual que otros compuestos derivados como el metilcarnosato, el éter metílico del epirosmanol o un producto de degradación del ácido carnósico, el 5,6,7,10-tetrahidro-7-hidroxi-rosmariquinone.

281

El rosmanol y sus correspondientes isómeros (m/z 345) fueron identificados en base a sus tiempos de retención y a sus espectros de MS/MS, en los cuales se observaban los fragmentos m/z 301 (únicamente en el caso del rosmanol) y 283, correspondientes a los iones $[M-H-CO_2]^-$ y $[M-H-CO_2-H_2O]^-$, respectivamente, ya reportados en bibliografía [261, 264]. Por su parte el metilcarnosato también se identificó por su espectro de MS/MS, que proporciona dos fragmentos correspondientes a la pérdida de una molécula de dióxido de carbono (m/z 301), y una subsiguiente pérdida del grupo



metilo (m/z 286) [244]. También el patrón de fragmentación encontrado para el éter metílico del epirosmanol concuerda con los resultados publicados en bibliografía [26]. En cuanto al compuesto 5,6,7,10-tetrahidro-7-hidroxi-rosmariquinona, de m/z 301, su fragmentación origina iones de m/z 283 y 258, correspondientes a la pérdida de agua y el grupo isopropilo respectivamente, datos en concordancia con la trabajos publicados previamente [265].

282 Otros compuestos presentes comúnmente en romero como el ácido rosmarínico, el rosmadial, el rosmaridifenol, los flavonoides homoplantagenina, cirsimaritina, genkwanina, galocatequina, nepetrina, hesperidina, 6-hidroxiluteolina-7-glucósido, o los isómeros luteolina 3'-O-(3''-O-acetil)- β -D-glucurónido y la luteolina 3'-O-(4''-O-acetil)- β -D-glucurónido, también se han encontrado en estos extractos [25, 236, 242, 245, 261, 263].

El rosmadial mostró un patrón de fragmentación correspondiente a la pérdida de los grupos etileno y propilo, resultando en iones de m/z 315 y 299 [244]. La cirsimaritina mostró dos pérdidas sucesivas de grupos metilo, lo que resultó en fragmentos de m/z 298 y 283 [244]. De igual manera, la pérdida de dos grupos metilo fue observada para el rosmaridifenol, originando un fragmento de m/z 285. En



cuanto a la galocatequina, los fragmentos encontrados presentaban m/z de 97 y 225, lo que concuerda con los datos encontrados en bibliografía y bases de datos [244]. Los patrones de fragmentación de la nepetrina y la 6-hidroxluteolina-7-glucósido, se corresponden con un fragmento de m/z 315 y 301 respectivamente, debidos a la pérdida de glucosa; al igual que en el caso de la hesperidina, donde el principal fragmento posee un m/z de 301 debido a la pérdida en este caso de rutinosa [26, 266].

En cuanto a los isómeros de luteolina 3'-O-(O-acetil)- β -D-glucurónido se detectaron 2 de ellos a tiempos de retención 10.07 y 10.28 minutos. El primer isómero pudo identificarse como luteolina 3'-O-(2''-O-acetil)- β -D-glucurónido gracias al patrón de fragmentación que presentó, con rupturas de m/z 285 y 399 correspondientes a $[M-H-C_8H_{10}O_7]^-$ y $[M-H-C_3H_4O_4]^-$ (**Figura 2A**). Sin embargo para el segundo isómero no pudo dilucidarse si se trataba del isómero luteolina 3'-O-(3''-O-acetil)- β -D-glucurónido o de luteolina 3'-O-(4''-O-acetil)- β -D-glucurónido, ya que sus patrones de fragmentación son similares, generando fragmentos correspondientes a la pérdida de acetilglucurónido y acetilo (m/z 285 y 443); y además ambos compuestos han sido encontrados en romero.



Los triterpenos anemosapogenina, y los ácidos micromérico, betulínico y ursólico, previamente descritos en esta planta, también se han encontrado en estos extractos. [15, 17, 247, 267].



Tabla 1. Tabla de compuestos identificados en los extractos de romero obtenidos mediante MAE.

Pico	Tiempo retención	m/z	Fórmula Molecular	Fragmentos	Compuesto Propuesto
1	2.06	191.0561	C ₇ H ₁₂ O ₆	93.0338 (3.7), 127.0423 (10.2)	Ácido Quínico
2	2.45	197.0455	C ₉ H ₁₀ O ₅	135.0731 (100.0), 179.0516 (57.9)	Ácido Siríngico
3	7.48	305.0666	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	96.9595 (47.1), 225.1178 (100.0)	Galocatequina
4	8.43	463.0882	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	301.0414 (63.3)	6-Hidroxiluteolina 7-glucósido
5	8.85	521.1300	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₃	323.0774 (68.7), 359.0801 (53.3), 477.1052 (100.0)	Ácido Rosmarínico-3-O-glucósido
6	8.90	477.1038	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	315.0528 (36.5)	Nepetrina
7	9.20	609.1824	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	301.0732 (100.0)	Hesperidina
8	9.36	461.1089	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	161.0294 (32.8), 283.0258 (100.0), 297.0408 (14.3)	Homoplantagenina
9	9.53	461.0725	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	285.0417 (100.0)	Luteolina-7-glucurónido
10	9.79	359.0772	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	123.0445 (19.9), 161.0244 (100.0), 179.0357 (29.6), 197.0463 (12.7)	Ácido Rosmarínico
11	10.07	503.0831	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₃	285.0370 (29.1), 399.0737 (100.0)	Luteolina 3'-O-(2''-O-acetil)-β-D-glucurónido
12	10.28	503.0831	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₃	285.0418 (100.0), 443.0654 (20.0)	Luteolina 3'-O-(O-acetil)-β-D-glucurónido Isómero
13	13.81	313.0717	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	283.0272 (100.0), 298.0503 (85.4)	Cirsimaritina
14	13.92	345.1707	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	283.1718 (49.4), 301.1833 (100.0)	Rosmanol
15	14.40	345.1707	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	283.1713 (48.0)	Epilisorosmanol
16	15.00	345.1707	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	283.1712 (32.6)	Epirosmanol



Tabla 1. Tabla de compuestos identificados en los extractos de romero obtenidos mediante MAE.

17	15.14	283.0611	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	268.0401 (100.0)	Genkwanina
18	16.04	487.3428	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	-	Ácido Asiático
19	18.69	359.1863	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	283.1734 (35.2), 329.3651 (21.6)	Epirosmanol metiléter
20	19.15	329.1758	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	285.1885 (100.0)	Carnosol
21	20.00	329.1758	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	285.1887 (100.0)	Carnosol isómero
22	20.32	343.1550	C ₂₀ H ₂₄ O ₅	299.1644 (12.9), 315.1634 (24.1),	Rosmadial
23	21.04	471.3479	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	-	Anemosapogenina
24	21.35	315.1965	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	285.1877 (42.8)	Rosmaridifenol
25	21.83	301.1809	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	258.6483 (42.6), 283.6915 (25.7)	5,6,7,10-tetrahidro-7-hidroxi-rosmariquinona
26	21.91	471.3479	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	-	Ácido Bentámico
27	22.35	471.3479	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	-	Ácido Augústico
28	22.63	331.1914	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	287.2078 (100.0)	Ácido Carnósico
29	24.84	345.2071	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	286.1999 (76.1), 301.2239 (100.0)	Metilcarnosato
30	25.14	317.2122	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	179.8164 (23.8), 287.2076 (60.5)	[9]-Shogaol isómero
31	27.05	317.2122	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	179.78.12 (19.7), 287.2079 (54.8)	[9]-Shogaol
32	27.99	453.3374	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	-	Ácido Micromérico
33	29.05	455.3530	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	-	Ácido Betulínico
34	30.25	455.3530	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	-	Ácido Ursólico

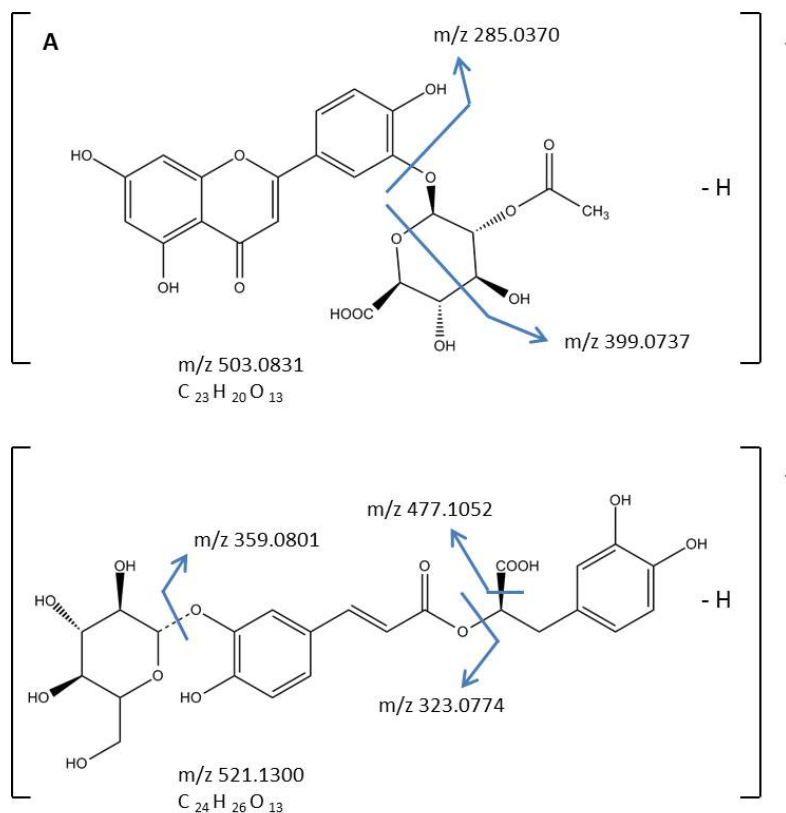


Otros compuestos encontrados en los extractos no han sido descritos para esta matriz vegetal pero sí en otras plantas de la misma familia que el romero. Estos compuestos son los ácidos quínico y siríngico, el ácido rosmarínico-3-O-glucósido, la luteolina-7-glucurónido, el [9]-shogaol y los ácidos triterpénicos asiático, bentámico y augústico [110, 237, 249, 257, 268-271].

En cuanto al patrón de fragmentación del ácido rosmarínico-3-O-glucósido, este mostró tres fragmentos mayoritarios, de m/z 477, 359 y 323, previamente descritos en bibliografía, correspondientes a las rupturas $[M-H-COO]^-$, $[M-H-C_9H_{10}O_5]^-$ y $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$ [272]. El patrón de fragmentación propuesto se muestra en la **Figura 2B**. Por otro lado, la luteolina-7-glucurónido presentó la ruptura correspondiente a la pérdida de ácido glucurónido, produciendo un fragmento de m/z 285. En cuanto al compuesto [9]-shogaol, se encontraron dos isómeros con idéntico patrón de fragmentación, con fragmentos de m/z 287 y 179 correspondientes a la pérdida de $[M-H-OCH_3]^-$ y $[M-H-C_{10}H_{19}]^-$ respectivamente, por lo que no pudieron diferenciarse entre ellos, apareciendo en la tabla como [9]-shogaol y [9]-shogaol isómero.



Figura 2. Patrón de fragmentación propuestos para la luteolina 3'-O-(2''-O-acetil)- β -D-glucurónico y el ácido rosmarínico-3-O-glucósido (B).



288

Dichos compuestos identificados fueron cuantificados utilizando para ello curvas patrón de estándares comerciales de ácido carnósico, carnosol, ácido ursólico, ácido rosmarínico, genkwanina, luteolina-7-O-glucósido, homoplantagenina, epigalocatequina, ácido quínico, ácido



siríngico y neohesperidina. Las curvas de calibración fueron preparadas usando luteolina en una concentración de 5 ppm como patrón interno. Todas mostraron buena linealidad en los distintos rangos de calibración para cada estándar. Los límites de detección (LODs) y los límites de cuantificación (LOQs) de los compuestos individuales fueron determinados utilizando disoluciones patrón, y considerando como $S/N = 3$ y $S/N = 10$, respectivamente, donde S/N es la relación señal/ruido. Todos estos datos se muestran en la **Tabla 2**.

La repetibilidad del método se calculó como desviación estándar relativa (% RSD) en términos de concentración. Uno de los extractos objeto de estudio fue analizado sucesivas veces ($n = 6$) el mismo día para el cálculo de la precisión intraday, y otras 3 veces en los dos días consecutivos ($n = 12$) para la precisión interday. El intervalo de precisión intraday oscila para todos los analitos desde 0.15 hasta 4.57 %, mientras que la precisión interday lo hace entre 0.23 y 4.69 %.



Tabla 2. Información de calibración, patrones, LOD, LOQ, Rango de calibración, curva de calibrado y r^2 .

Analito	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	Rango de calibración ($\mu\text{g/ml}$)	Curva de Calibrado	r^2
Ácido Carnósico	0.018	0.06	0.5 - 70	$y = 94.036 x + 0.0152$	0.9907
Carnosol	0.019	0.06	0.1 - 25	$y = 84.476 x + 0.3537$	0.989
Ácido Ursólico	0.07	0.22	0.5 - 50	$y = 10^6 x + 56483$	0.9763
Ácido Rosmarínico	0.035	0.09	0.5 - 15	$y = 40352 x - 0.0142$	0.9909
Genkwanina	0.014	0.04	0.1 - 15	$y = 147.37 x - 0.0399$	0.9803
Luteolina-7-O-glucósido	0.08	0.25	0.5 - 15	$y = 14.22 x + 0.088$	0.9818
Homoplantagenina	0.016	0.05	0.5 - 5	$y = 62.358 x + 0.0308$	0.9912
Epigallocatequina	0.08	0.26	0.5 - 15	$y = 12.584 x - 0.0429$	0.9887
Neohesperidina	0.03	0.1	0.5 - 15	$y = 17.158 x - 0.0018$	0.9882
Ácido Quínico	0.08	0.3	0.5 - 15	$y = 15.223 x - 0.0244$	0.9918
Ácido Siríngico	0.24	0.8	0.8 - 15	$y = 1.8012 x + 0.0022$	0.9909

290

La concentración de los compuestos identificados en los extractos de romero fue determinada usando el área corregida de cada compuesto individual (3 replicados) e



interpolando en la curva de calibración correspondiente. Los compuestos ácido carnósico, carnosol, ácido ursólico, ácido rosmarínico, genkwanina, homoplantagenina, ácido quínico y ácido siríngico fueron cuantificados con curvas de calibración obtenidas con sus correspondientes estándares. El resto de compuestos, para los que no existen patrones comerciales, fueron tentativamente cuantificados usando otros compuestos con estructuras similares. El patrón de ácido carnósico también se utilizó para cuantificar el metilcarnosato y el compuesto 5,6,7,10-tetrahidro-7-hidroxi-rosmariquinona. Por su parte el rosmanol, sus isómeros epiisorosmanol y epirosmanol, el éter metílico del epirosmanol, el rosmadial y el rosmaridifenol presentes en los extractos fueron cuantificados usando carnosol como estándar. El patrón de ácido ursólico se usó además para cuantificar tentativamente los ácidos asiático, augústico, bentámico, micromérico y betulínico, además de la anemosapogenina. El ácido rosmarínico también se utilizó para estimar el contenido en ácido rosmarínico-3-O-glucósido y los isómeros [9]-shogaol. La luteolina-7-O-glucósido fue el estándar usado para cuantificar varios compuestos, en concreto la 6-hidroxiluteolina-7-glucósido, nepetrina, luteolina-7-glucurónido y los isómeros de luteolina 3'-O-(O-acetil)- β -D-



glucurónido. Finalmente la genkwanina se utilizó como estándar para el flavonoide circimaritina, la epigalocatequina para la galocatequina y la neohesperidina para la hesperidina. Debido al hecho de que la respuesta de los estándares puede ser distinta de la de los analitos presentes en los extractos a pesar de su semejanza estructural, la cuantificación de estos compuestos para los que no existe patrón comercial es una estimación de su concentración real, aunque puede ser considerado como una aproximación útil para cuantificar estas muestras.

292 Los compuestos mayoritarios en los extractos fueron los ácidos quínico y sirínico para algunos extractos en los que estaban presentes, y para el resto como era de esperar los diterpenos ácido carnósico y carnosol, y los ácidos triterpénicos micromérico, betulínico y ursólico. El contenido en algunos flavonoides, como la nepetrina o galocatequina también es muy elevado en algunos extractos.

En cuanto al contenido en los ácidos quínico y sirínico, su presencia sólo se ha detectado en unos pocos extractos, en concreto en los extractos 1, 2, 8, 11, 13 y 14 en el caso del ácido quínico y en los extractos 2 y 14 para el ácido sirínico.

Los extractos 1 y 2, recolectados en la región de Sokobanja durante el mes de enero han mostrado los valores



de concentración más elevados para la mayoría de compuestos: flavonoides como homoplantagenina, galocatequina (junto con el extracto 12), 6-hidroxluteolina-7-glucósido, genkwanina, o los isómeros luteolina 3'-O-(2''-O-acetil)- β -D-glucurónido y la luteolina 3'-O-(O-acetil)- β -D-glucurónido; además de otros compuestos como el ácido quínico, ácido rosmarínico, rosmaridifenol, carnosol y rosmadial (para estos últimos junto con el extracto 15), ácido carnósico, metilcarnosato y [9]-shogaol. También el extracto número 1 presenta un contenido más elevado de ácido betulínico, mientras que el extracto 2 es el que presenta mayor contenido en ácido siríngico, luteolina-7-glucurónido, rosmanol, ácido asiático, 5,6,7,10-tetrahidro-7-hidroxi-rosmariquinona, y cirsimaritina.

293

Por el contrario otros compuestos se han encontrado en mayor concentración en el extracto número 8 procedente del norte de Serbia, de la provincia de Vojvodina, recolectado a finales de diciembre. Estos compuestos son la nepitrina y los triterpenoides anemosapogenina, ácido bentámico, ácido augústico, ácido betulínico (junto con el extracto 1), ácido micromérico y ácido ursólico. Es destacable el elevado contenido que presenta este extracto en derivados triterpénicos, compuestos para los que el resto de extractos



presentan contenidos bastante menores. Esto lo convierte en el candidato por excelencia de la colección de extractos para convertirse en la fuente de estos compuestos bioactivos, con demostrada capacidad antiinflamatoria y anticancerígena.

Asímismo, el extracto número 15, procedente Niš en el sur de Serbia, es el que presenta el contenido más elevado en hesperidina, en los isómeros epiisorosmanol y epirosmanol. Además en el caso del carnosol y rosmadial, el contenido en este extracto fue de los mayores, junto con los extractos procedentes de Sokobanja, como ya se ha comentado previamente.

294 Únicamente el contenido máximo de ácido rosmarínico-3-O-glucósido se encontró en otros extractos que no eran los procedentes de Sokobanja, Vojvodina o Niš, en concreto en los extractos 9 y 12 procedentes de Čelarevo y Vranje, provincias del norte y sur de Serbia, respectivamente.

Por tanto, podemos concluir que para este conjunto de muestras los extractos de la región de Sokobanja son muy ricos en flavonoides y compuestos típicos de romero como carnosol, rosmaridifenol, rosmadial y los ácidos rosmarínico y carnósico. Por el contrario los triterpenoides anemosapogenina, ácido bentámico, ácido augústico y ácido ursólico son más abundantes en el extracto 8 recolectado a



finales de diciembre en la región de Vojvodina, al norte de Serbia. Como se ha comentado en apartados anteriores el contenido en compuestos fenólicos puede verse afectado por diversos factores. Estos contenidos elevados en compuestos fenólicos pueden ser motivados por condiciones pedoclimáticas. En concreto las muestras recogidas en la región de Sokobanja provienen de un parque nacional protegido, alrededor del río Morava, caracterizado por un tipo de suelo muy fértil, una mezcla de Terra rosa y Vertisol. Las condiciones climáticas de esta región son más típicas de un clima mediterráneo, con menos precipitaciones que en el resto de regiones. Esta combinación de suelos y condiciones climáticas más propias del hábitat natural de la planta, la cuenca mediterránea, puede ser lo que justifique en parte los elevados contenidos en compuestos fenólicos que mostraron los extractos de esta región.



Figura 1a Cromatograma de pico base del extracto de romero de Serbia 2 (Sokobanja sur, enero).

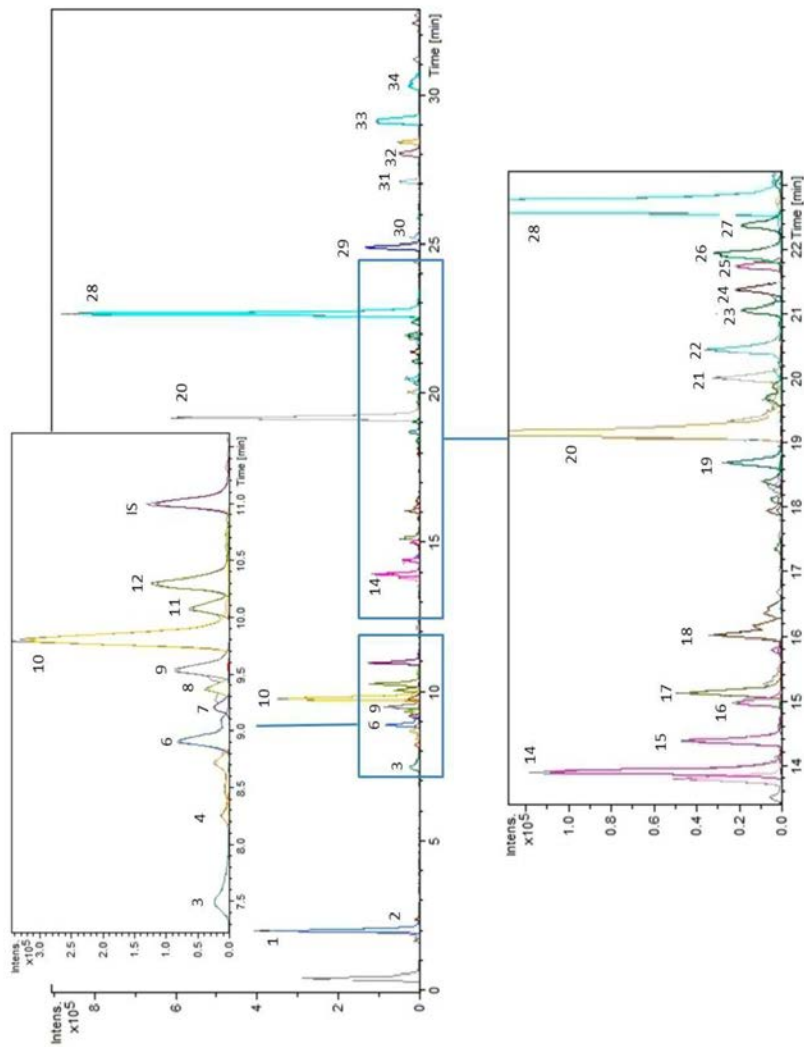


Figura 1b Cromatograma de pico base del extracto de romero de Serbia 8 (Glozan, Vojvodina, norte,

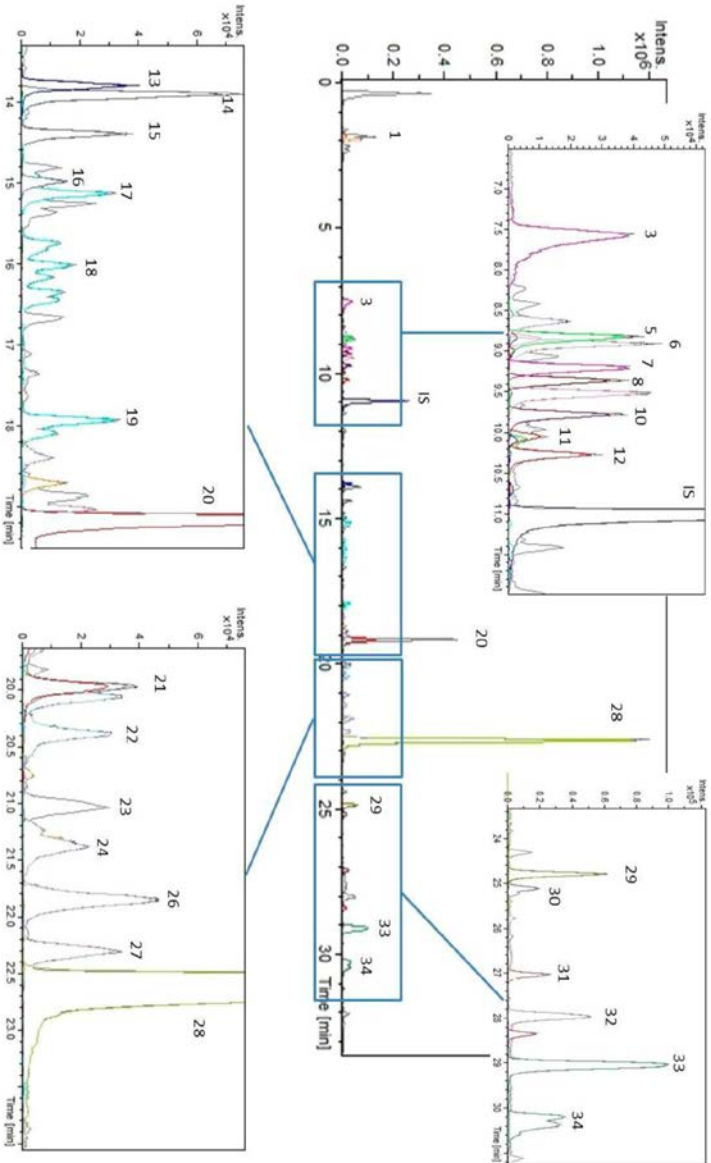


Tabla 3. Tabla de compuestos cuantificados en los extractos de romero obtenidos mediante MAE.

Pico	Tiempo retención	Compuesto	RS 1	RS 2	RS 3	RS 4	RS 5
1	2.06	Ácido Quínico	ND	12.97 ± 0.01	ND	ND	ND
2	4.45	Ácido Síringico	ND	ND	ND	ND	ND
3	7.48	Gallocatequina	4.0 ± 0.4	7.7 ± 0.5	15.7 ± 0.2	ND	5.1 ± 0.5
4	8.43	6-Hidroxiuteolina 7-glucósido	ND	ND	ND	ND	ND
5	8.85	Ácido Rosmarínico 3-O-glucósido	9.5 ± 0.5	0.99 ± 0.01	27 ± 1	1.10 ± 0.08	10.1 ± 0.6
6	8.90	Nepetrina	50 ± 1	57 ± 1	ND	0.2770 ± 0.0006	ND
7	9.20	Hesperidina	1.56 ± 0.09	2.15 ± 0.02	4.2 ± 0.1	ND	1.92 ± 0.07
8	9.36	Homoplantagenina	0.49 ± 0.03	0.71 ± 0.03	1.6 ± 0.2	0.45 ± 0.03	0.66 ± 0.06
9	9.53	Luteolina-7-glucurónido	0.44 ± 0.05	1.39 ± 0.08	5.29 ± 0.09	0.11 ± 0.03	1.31 ± 0.08
10	9.79	Ácido Rosmarínico	6.3 ± 0.4	0.855 ± 0.003	20.57 ± 0.04	5.4 ± 0.3	5.0 ± 0.6
11	10.07	Luteolina 3'-O-(2''-O-acetil)-β-D-glucurónido	ND	< LQ	ND	ND	ND
12	10.28	Luteolina 3'-O-(O-acetil)-β-D-glucurónido isómero	0.28 ± 0.08	0.33 ± 0.02	8.1 ± 0.8	ND	1.2 ± 0.2
13	13.81	Cirsimaritina	0.24 ± 0.01	0.2935 ± 0.0009	0.745 ± 0.009	ND	0.24 ± 0.02
14	13.92	Rosmanol	0.37 ± 0.03	0.65 ± 0.02	1.08 ± 0.03	0.110 ± 0.006	0.42 ± 0.02
15	14.40	Episorosmanol	0.97 ± 0.01	0.31 ± 0.02	2.41 ± 0.07	< LQ	0.57 ± 0.02
16	15.00	Epirosmanol	0.45 ± 0.02	0.106 ± 0.006	1.02 ± 0.01	ND	0.20 ± 0.02
17	15.14	Genkwanina	0.168 ± 0.006	0.275 ± 0.002	0.476 ± 0.005	ND	0.210 ± 0.007
18	16.04	Ácido Asiático	ND	1.4 ± 0.1	ND	ND	ND
19	18.69	Epirosmanol metiléster	0.385 ± 0.010	0.113 ± 0.003	1.00 ± 0.07	ND	0.59 ± 0.02
20	19.15	Carnosol	4.8 ± 0.1	5.5 ± 0.3	18.5 ± 0.4	1.8 ± 0.1	10 ± 2
21	20.00	Carnosol isómero	0.13 ± 0.02	0.39 ± 0.03	0.8 ± 0.2	ND	ND
22	20.32	Rosmadial	ND	0.116 ± 0.010	0.22 ± 0.02	ND	ND
23	21.04	Anemosapogenina	ND	4.60 ± 0.06	ND	ND	ND
24	21.35	Rosmaridifenol	ND	0.132 ± 0.001	0.3572 ± 0.0009	ND	ND
25	21.83	5,6,7,10-tetrahidro-7-hidroxi-rosmarquinona	0.27 ± 0.02	ND	0.16 ± 0.05	ND	ND
26	21.91	Ácido Bentámico	ND	8.3 ± 0.2	2.80 ± 0.04	ND	ND
27	22.35	Ácido Augústico	ND	4.8 ± 0.2	0.9 ± 0.1	ND	ND



28	22.63	Ácido Carnósico	3,4 ± 0,4	14 ± 1	17 ± 1	1,1 ± 0,1	2,6 ± 0,6
29	24.84	Metilcarnosato	0,287 ± 0,007	0,62 ± 0,02	1,12 ± 0,01	ND	0,30 ± 0,02
30	25.14	[9]-Shogaol isómero	ND	0,59 ± 0,02	1,21 ± 0,03	ND	ND
31	27.05	[9]-Shogaol	ND	0,779 ± 0,007	1,264 ± 0,008	ND	ND
32	27.99	Ácido Micromérico	ND	16,2 ± 0,9	6,8 ± 0,6	ND	1,7 ± 0,3
33	29.05	Ácido Betulinico	0,93 ± 0,05	76 ± 2	39 ± 2	ND	6,207 ± 0,001
34	30.25	Ácido Ursólico	0,11 ± 0,04	42 ± 1	18,7 ± 0,4	ND	3,0 ± 0,4

Valor: Media ± SD mg/ g extracto

ND: No detectado

< LQ: Detectado pero no cuantificado por encontrarse por debajo del límite de cuantificación.



Tabla 3. Tabla de compuestos cuantificados en los extractos de romero obtenidos mediante MAE.

Pico	Tiempo retención	Compuesto	RS 6	RS 7	RS 8	RS 9	RS 10
1	2.06	Ácido Quínico	ND	ND	12.97 ± 0.01	ND	ND
2	4.45	Ácido Siríngico	ND	ND	ND	ND	ND
3	7.48	Galocatequina	4.4 ± 0.4	4.0 ± 0.4	7.7 ± 0.5	10.2 ± 0.2	6.9 ± 0.5
4	8.43	6-Hidroxluteolina 7-glucósido	ND	ND	ND	ND	ND
5	8.85	Ácido Rosmarínico-3-O-glucósido	6.7 ± 0.5	9.5 ± 0.5	0.99 ± 0.01	17.4 ± 0.1	12.4 ± 0.8
6	8.90	Nepetrina	ND	50 ± 1	57 ± 1	ND	ND
7	9.20	Hesperidina	1.35 ± 0.10	1.56 ± 0.09	2.15 ± 0.02	2.7 ± 0.2	1.93 ± 0.05
8	9.36	Homoplantagenina	0.50 ± 0.03	0.49 ± 0.03	0.71 ± 0.03	0.71 ± 0.05	0.64 ± 0.04
9	9.53	Luteolina-7-glucurónido	1.79 ± 0.05	0.44 ± 0.05	1.39 ± 0.08	2.6 ± 0.2	1.6 ± 0.1
10	9.79	Ácido Rosmarínico	7.0 ± 0.6	6.3 ± 0.4	0.855 ± 0.003	12.5 ± 0.1	10.1 ± 0.5
11	10.07	Luteolina 3'-O-(2''-O-acetil)-β-D-glucurónido	ND	ND	< LQ	< LQ	ND
12	10.28	Luteolina 3'-O-(O-acetil)-β-D-glucurónido Isómero	0.7 ± 0.1	0.28 ± 0.08	0.33 ± 0.02	3.0 ± 0.2	0.74 ± 0.06
13	13.81	Cirsimaritina	0.27 ± 0.02	0.24 ± 0.01	0.2935 ± 0.0009	0.44 ± 0.02	0.27 ± 0.02
14	13.92	Rosmanol	0.308 ± 0.008	0.37 ± 0.03	0.65 ± 0.02	0.46 ± 0.01	0.32 ± 0.02
15	14.40	Episorosmanol	0.83 ± 0.02	0.97 ± 0.01	0.31 ± 0.02	0.57 ± 0.02	0.51 ± 0.05
16	15.00	Epirosmanol	0.257 ± 0.003	0.45 ± 0.02	0.106 ± 0.006	0.195 ± 0.003	0.177 ± 0.009
17	15.14	Genkwanina	0.26 ± 0.02	0.168 ± 0.006	0.275 ± 0.002	0.38 ± 0.02	ND
18	16.04	Ácido Asiático	ND	ND	1.4 ± 0.1	< LQ	ND
19	18.69	Epirosmanol metiléster	1.128 ± 0.001	0.385 ± 0.010	0.113 ± 0.003	0.57 ± 0.04	0.534 ± 0.009
20	19.15	Carnosol	11.7 ± 0.9	4.8 ± 0.1	5.5 ± 0.3	16.0 ± 0.2	17.977 ± 0.002
21	20.00	Carnosol isómero	ND	0.13 ± 0.02	0.39 ± 0.03	0.31 ± 0.02	0.41 ± 0.05
22	20.32	Rosmadiol	ND	ND	0.116 ± 0.010	ND	0.20 ± 0.03
23	21.04	Anemospogonina	ND	ND	4.60 ± 0.06	ND	ND
24	21.35	Rosmaridifenol	0.15 ± 0.01	ND	0.132 ± 0.001	0.20 ± 0.01	ND
25	21.83	5,6,7,10-tetrahidro-7-hidroxi-rosmariquinona	0.27 ± 0.03	0.27 ± 0.02	ND	0.15 ± 0.01	ND
26	21.91	Ácido Bentámico	1.2 ± 0.1	ND	8.3 ± 0.2	3.6 ± 0.2	1.0 ± 0.1
27	22.35	Ácido Augustico	0.235 ± 0.007	ND	4.8 ± 0.2	2.2 ± 0.1	< LQ



28	22.63	Acido Carnosico	2.11 ± 0.02	3.4 ± 0.4	14 ± 1	5.8 ± 0.8	8.5 ± 0.6
29	24.84	Metilcarbosato	0.40 ± 0.04	0.287 ± 0.007	0.62 ± 0.02	0.52 ± 0.03	0.52 ± 0.04
30	25.14	[9]-Shogaol Isomero	ND	ND	0.59 ± 0.02	0.63 ± 0.03	0.76 ± 0.05
31	27.05	[9]-Shogaol	ND	ND	0.779 ± 0.007	0.66 ± 0.07	0.85 ± 0.01
32	27.99	Acido Micronmico	2.5 ± 0.2	ND	16.2 ± 0.9	11 ± 1	4.47 ± 0.06
33	29.05	Acido Betulinico	7.2 ± 0.4	0.93 ± 0.05	76 ± 2	51.7 ± 0.3	26 ± 1
34	30.25	Acido Ursolico	4.35 ± 0.06	0.11 ± 0.04	42 ± 1	26 ± 1	5.2 ± 0.7

Valor: Media ± SD mg/ g extracto

ND: No detectado

< LQ: Detectado pero no cuantificado por encontrarse por debajo del limite de cuantificación.



Tabla 3. Tabla de compuestos cuantificados en los extractos de romero obtenidos mediante MAE.

Pico	Tiempo retención	Compuesto	RS 11	RS 12	RS 13	RS 14	RS 15
1	2.06	Ácido Quínico	14.2 ± 0.8	ND	46 ± 3	16.8 ± 0.5	ND
2	4.45	Ácido Siríngico	ND	ND	210 ± 10	ND	ND
3	7.48	Galocatequina	6.5 ± 0.5	12.2 ± 0.6	6.6 ± 0.2	3.7 ± 0.1	9.6 ± 0.7
4	8.43	6-Hidroxiluteolina 7-glucósido	ND	ND	0.19 ± 0.04	ND	ND
5	8.85	Ácido Rosmarínico-3-O-glucósido	ND	16 ± 1	ND	0.90 ± 0.02	10.4 ± 0.6
6	8.90	Nepetrina	2.3 ± 0.2	ND	9.7 ± 0.3	3.7 ± 0.3	ND
7	9.20	Hesperidina	1.3 ± 0.1	2.93 ± 0.06	2.29 ± 0.08	1.01 ± 0.05	4.4 ± 0.2
8	9.36	Homoplantagenina	0.59 ± 0.05	0.95 ± 0.09	1.4 ± 0.1	0.59 ± 0.03	1.10 ± 0.07
9	9.53	Luteolina-7-glucurónido	7.3 ± 0.8	5.5 ± 0.4	9.3 ± 0.9	3.34 ± 0.04	3.2 ± 0.3
10	9.79	Ácido Rosmarínico	7.5 ± 0.6	9.7 ± 0.4	23 ± 1	9.0 ± 0.6	5.6 ± 0.2
11	10.07	Luteolina 3'-O-(2''-O-acetil)-β-D-glucurónido	3.2 ± 0.2	0.367 ± 0.004	5.2 ± 0.3	1.46 ± 0.05	ND
12	10.28	Luteolina 3'-O-(O-acetil)-β-D-glucurónido isómero	10.1 ± 0.7	8.8 ± 0.9	16.6 ± 0.3	5.8 ± 0.3	0.89 ± 0.08
13	13.81	Cirsimaritina	0.31 ± 0.01	0.41 ± 0.05	0.51 ± 0.03	0.276 ± 0.009	0.53 ± 0.02
14	13.92	Rosmanol	0.69 ± 0.04	0.421 ± 0.008	1.44 ± 0.04	0.39 ± 0.01	0.78 ± 0.02
15	14.40	Episorosmanol	0.34 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.865 ± 0.004	0.492 ± 0.003	1.5 ± 0.1
16	15.00	Epirosmanol	0.126 ± 0.003	0.094 ± 0.007	0.41 ± 0.03	0.198 ± 0.008	0.636 ± 0.009
17	15.14	Genkwanina	0.42 ± 0.03	0.34 ± 0.04	0.56 ± 0.05	0.31 ± 0.02	0.531 ± 0.009
18	16.04	Ácido Asiático	ND	ND	2.4 ± 0.3	ND	ND
19	18.69	Epirosmanol metiléster	0.34 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.67 ± 0.03	0.67 ± 0.04	1.10 ± 0.04
20	19.15	Carnosol	11 ± 1	9.8 ± 0.3	18.2 ± 0.5	10 ± 1	22 ± 1
21	20.00	Carnosol isómero	0.281 ± 0.004	0.45 ± 0.01	0.57 ± 0.04	ND	0.34 ± 0.03
22	20.32	Rosmadiol	ND	ND	0.226 ± 0.009	ND	0.26 ± 0.01
23	21.04	Anemosepogénina	ND	ND	0.84 ± 0.01	ND	ND
24	21.35	Rosmaridifenol	0.206 ± 0.008	0.158 ± 0.007	0.383 ± 0.007	0.19 ± 0.01	0.37 ± 0.03
25	21.83	5,6,7,10-tetrahidro-7-hidroxi-rosmariquinona	ND	ND	ND	ND	ND



26	21.91	Acido Benámico	ND	1.3 ± 0.2	3.86 ± 0.07	ND	1.37 ± 0.07
27	22.35	Acido Augústico	ND	0.48 ± 0.04	1.10 ± 0.03	ND	< LQ
28	22.63	Acido Carnósico	6.5 ± 0.6	10.3 ± 0.6	13.7 ± 0.6	1.6 ± 0.1	4.8 ± 0.1
29	24.84	Metilcarnósico	4.05 ± 0.08	0.73 ± 0.09	3.15 ± 0.01	1.02 ± 0.03	1.06 ± 0.03
30	25.14	[9]-Shogaol isómero	ND	0.60 ± 0.03	1.14 ± 0.03	ND	1.11 ± 0.03
31	27.05	[9]-Shogaol	0.79 ± 0.05	0.88 ± 0.03	2.53 ± 0.08	0.51 ± 0.02	1.05 ± 0.04
32	27.99	Acido Micromérico	ND	15 ± 1	5.4 ± 0.7	ND	4.1 ± 0.4
33	29.05	Acido Betulinico	ND	58 ± 2	40 ± 1	ND	17 ± 1
34	30.25	Acido Ursólico	ND	27 ± 1	5.5 ± 0.7	ND	3.61 ± 0.05

Valor: Media ± SD mg/ g extracto

ND: No detectado

< LQ: Detectado pero no cuantificado por encontrarse por debajo del límite de cuantificación.



2.2 Análisis multivariante de los extractos de romero.

Con el fin de realizar una distribución de los extractos de romero recolectados en diferentes zonas geográficas de Serbia y estudiar la existencia de marcadores químicos que ayuden a esta clasificación se realizó un análisis estadístico de componentes principales (PCA).

304 Para ello el primer paso fue aplicar a los cromatogramas adquiridos de los distintos extractos de romero un algoritmo denominado “peak finder”, que combina los distintos iones correspondientes a un mismo compuesto, como pueden ser aductos, isótopos o iones de distintas cargas. Los cromatogramas adquiridos para estos extractos se prepararon para el análisis estadístico generando la tabla de variables o tabla de “buckets”. En ella se recogen, como su propio nombre indica, los denominados “buckets”, que son parejas de valores de tiempo de retención- m/z , y sus correspondientes intensidades para cada muestra, de manera que el análisis PCA se realiza basándose en los valores de dicha tabla.

La representación del análisis PCA de los 15 extractos de Serbia (con 3 réplicas de cada extracto) muestra una separación entre los extractos analizados en cuatro grupos,



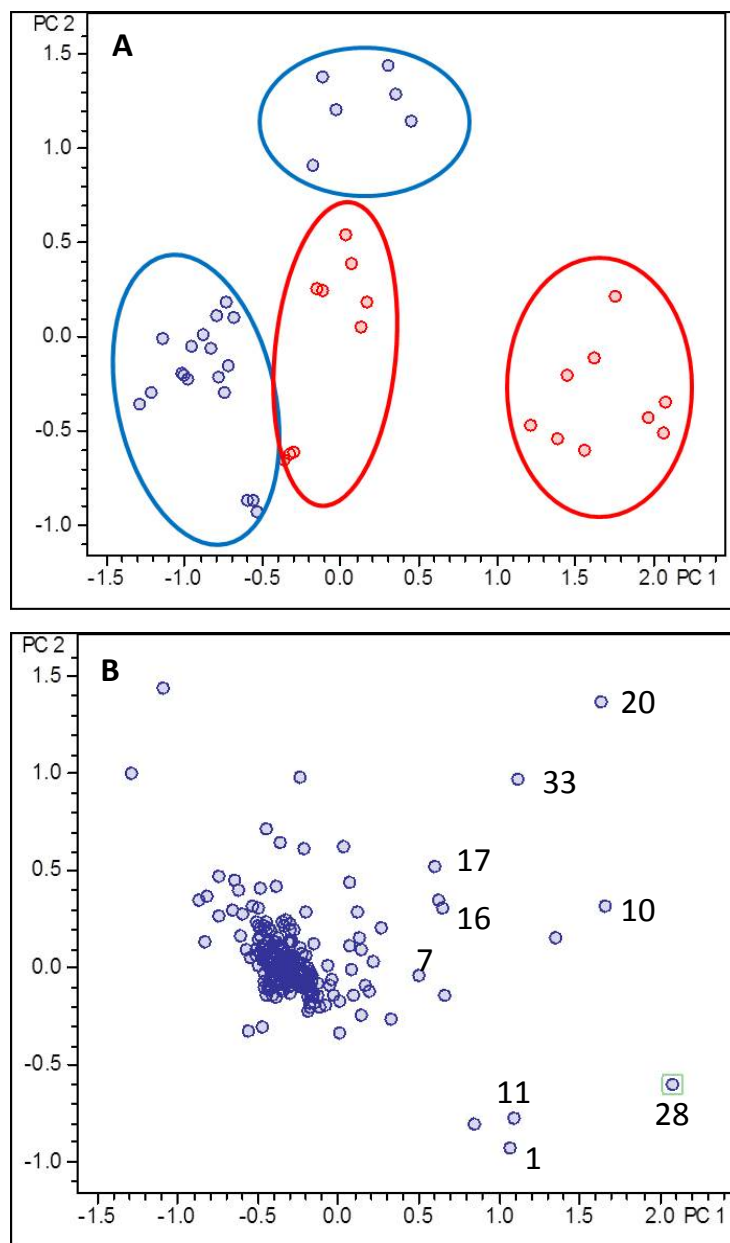
dos de ellos recolectados en el norte (de color azul) y otros dos en el sur de Serbia (de color rojo) (**Figura 2**).

La representación de la Figura 2 B nos muestra cómo las componentes principales están relacionadas con las parejas de valores de tiempo de retención- m/z , de manera que aquellas parejas de valores o “buckets” que se alejan de la nube de puntos central son los responsables de la varianza existente entre los datos. La posición de estos puntos dentro de la representación se corresponde con la distribución de los análisis en el “score plot” (Figura 2 A), por lo que esta representación nos permite la identificación de compuestos que pueden ser los principales responsables de las diferencias encontradas entre los extractos de distinto origen geográfico.

305

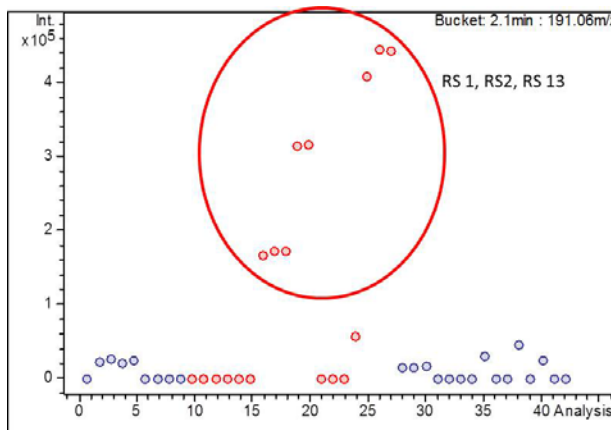


Figura 2 Análisis PCA de los extractos de romero. A) Representación de la componente 1 frente a la componente 2. B) PCA loading plot, los números se corresponden con los compuestos identificados en la Tabla 2.



De esta forma, los extractos de romero 1, 2 y 13, correspondientes al sur de Serbia (en la Figura 2A en la parte inferior derecha) se diferencian del resto principalmente por 4 compuestos, correspondientes al ácido quínico (1), ácido rosmarínico (10), al isómero luteolina 3'-O-(2''-O-acetil)- β -D-glucurónido (11) y al ácido carnósico (28). Como ejemplo se muestra la representación del bucket correspondiente al ácido quínico, donde puede observarse que la intensidad de este compuesto en los extractos 1, 2 y 13 es muy superior al resto (**Figura 3**). De igual manera los extractos 3, 8 y 9 (en la Figura 2A parte superior), correspondientes al norte de Serbia se diferencian del resto por su contenido en carnosol (20) y ácido betulínico (33).

Figura3. Representación “Bucket statistic” correspondiente al compuesto ácido quínico.



A pesar de que el resto de extractos, divididos en otros dos subgrupos, presentan menores diferencias con el resto, el que corresponde a los extractos 12, 14 y 15, recolectados en el sur se diferencia del resto por su contenido en genkwanina (17), hesperidina (7) y epirosmanol (16).

Como ya se ha comentado previamente, a pesar que de no se han podido diferenciar claramente en dos grupos, si se han observado diferencias entre los extractos recolectados en el norte y en el sur, y también entre extractos cercanos en cuanto a su proximidad geográfica, especialmente en los extractos procedentes del sur, ya que los del norte fueron recolectados en un área geográfica más reducida.



Capítulo 3: Aislamiento y purificación de compuestos bioactivos de romero con actividad anticancerígena frente a líneas celulares de cáncer de colon.

3.1 Caracterización cuantitativa del extracto de hoja de romero.

El extracto obtenido mediante SFE a 150 bares en el Capítulo 1 fue el seleccionado tras un “screening” previo como el de mayor bioactividad frente a líneas celulares de adenocarcinoma de colon. Dado que el principal objetivo del estudio es investigar el efecto del extracto y de sus compuestos aislados en líneas celulares de adenocarcinoma de colon, una vez conocida su composición cualitativa (Capítulo 1 de la presente memoria), se llevó a cabo la cuantificación de los compuestos mayoritarios presentes en el extracto con el fin de conocer la concentración exacta de compuestos bioactivos. En la **Figura 1** se muestra el cromatograma de pico base del extracto registrado mediante UPLC-ESI-QTOF donde los picos mayoritarios se encuentran numerados según su tiempo de retención.

309

Las curvas de calibración de carnosol, ácido carnósico, ácido ursólico, ácido rosmarínico, genkwanina, diosmetina y apigenina fueron preparadas usando luteolina en una concentración de 5 ppm como patrón interno. Las curvas de



calibración mostraron buena linealidad entre distintos rangos de concentración dependiendo del analito estudiado (**Tabla 1**). Se calcularon los límites de detección (LODs) y los límites de cuantificación (LOQs) de los compuestos individuales utilizando disoluciones patrón, calculándose como $S/N = 3$ y $S/N = 10$, respectivamente, donde S/N es la relación señal/ruido.

Tabla 1. Información de calibración, patrones, LOD, LOQ, Rango de calibración, curva de calibrado y r^2 .

310

Analito	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	Rango de calibración ($\mu\text{g/ml}$)	Curva de Calibrado	r^2
Carnosol	0.019	0.06	0.1 - 25	$y = 84.476 x + 0.3537$	0.989
Ácido Carnósico	0.018	0.06	0.5 - 70	$y = 94.036 x + 0.0152$	0.9907
Ácido Ursólico	0.07	0.22	0.5 - 50	$y = 10^6 x + 56483$	0.9763
Ácido Rosmarínico	0.035	0.09	0.5 - 15	$y = 40352 x - 0.0142$	0.9909
Genkwanina	0.014	0.04	0.1 - 15	$y = 147.37 x - 0.0399$	0.9803
Diosmetina	0.028	0.09	0.1 - 5	$y = 51.106 x - 0.0386$	0.9906
Apigenina	0.016	0.05	0.5 - 5	$y = 62.358 x + 0.0308$	0.9912

La repetibilidad del método se calculó como desviación estándar relativa (% RSD) en términos de concentración. El extracto objeto de estudio fue analizado sucesivas veces ($n =$



6) el mismo día para el cálculo de la precisión intraday, y otras 3 veces en los dos días consecutivos ($n = 12$) para la precisión interday. El intervalo de precisión intraday oscila para todos los analitos desde 0.09 hasta 3.67 %, mientras que la precisión interday lo hace entre 0.16 y 4.21 %.

La concentración de los compuestos fenólicos y de otros compuestos polares del extracto fue determinada usando el área corregida de cada compuesto individual (3 replicados) e interpolando en la curva de calibración correspondiente. Los compuestos apigenina, diosmetina, genkwanina, carnosol, ácido carnósico y ácido ursólico fueron cuantificados con curvas de calibración obtenidas con sus correspondientes patrones comerciales. El resto de compuestos, para los que no existen patrones comerciales, fueron tentativamente cuantificados usando otros compuestos con estructuras similares. El rosmanol, sus isómeros epiisorosmanol y epirosmanol, el miltipolone, el rosmadial, y el rosmaridifenol presentes en el extracto fueron cuantificados usando carnosol como estándar. Por su parte el ácido carnósico también se utilizó como patrón para cuantificar el ácido 12-metoxycarnósico e hinokione. El patrón de ácido ursólico se usó además para cuantificar tentativamente los ácidos augústico, bentámico, micromérico



y betulínico, además de la anemosapogenina. Finalmente la genkwanina se utilizó como estándar para el flavonoide cirsimaritina, el [9]-shogaol se expresó como ácido rosmarínico, y la diosmetina fue el patrón seleccionado para calcular la concentración de hispidulina y cirsilol. Debido al hecho de que la respuesta de los estándares puede ser distinta de la de los analitos presentes en el extracto a pesar de que su estructura sea parecida, la cuantificación de estos compuestos para los que no existe patrón comercial es una estimación de su concentración real, aunque puede ser considerado como una aproximación útil para cuantificar el extracto de romero.

312

En la **Tabla 2** se recogen los resultados cuantitativos de los compuestos mayoritarios presentes en el extracto de romero, junto con sus tiempos de retención, m/z experimental y teórico, error, mSigma y fórmula molecular.

Como es de esperar el compuesto mayoritario del extracto es el ácido carnósico, con una concentración que duplica a los siguientes compuestos presentes en mayor cantidad, el ácido micromérico, el ácido betulínico y el ácido ursólico, triterpenos descritos en el romero. A pesar de que el resto de compuestos están presentes en el extracto en una concentración muy inferior, destaca la presencia de carnosol,



el derivado δ -lactona del ácido carnósico. El rosmanol, la genkwanina, el rosmadial, la anemosapogenina, los ácidos augústico, bentámico y 12- metoxicarnósico y el [9]-shogaol se encuentran en concentraciones que oscilan entre 1.36-10.1 mg/g extracto. El resto de los compuestos se encuentran en muy baja concentración, presentando el extracto cantidades inferiores al mg/g extracto.



Figura 1 Cromatograma de pico base del extracto de romero obtenido mediante SFE analizado por UPLC-ESI-QTOF.

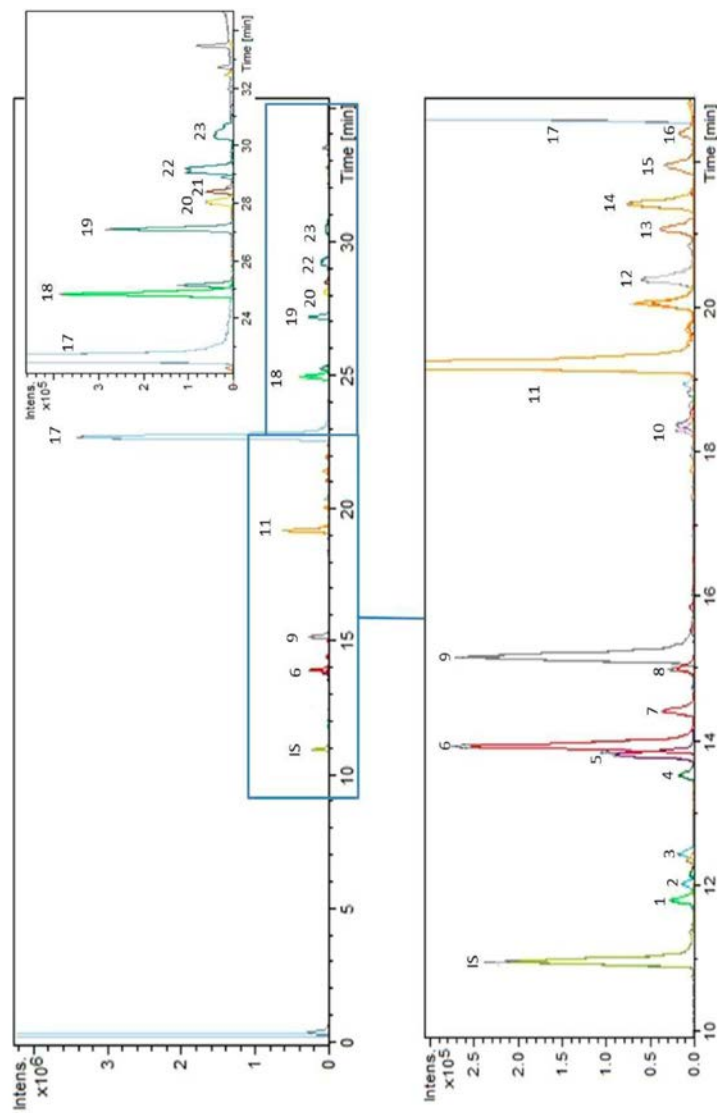


Tabla 2 Tabla de compuestos cuantificados en el extracto de romero obtenido mediante SFE analizado por UPLC-ESI-QTOF. Valor (X ± SD)

Rt (min)	UV λ_{max}	UV λ_{min}	UV λ_{cut}	(ppm)	MS/MS	Molecular	Compuesto	(mg/g)
1	11.84	269,0461	269,0455	2.2	17.7	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	Apigenina	0.50 ± 0.02
2	12.18	299,0565	299,0561	-1.2	36.8	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	Hispidulina	0.31 ± 0.01
3	12.40	329,0665	329,0667	0.6	7.2	C ₁₇ H ₁₃ O ₇	Cirsilol	0.34 ± 0.01
4	13.55	299,0553	299,0561	2.8	7.3	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	Diosmetina	0.62 ± 0.04
5	13.83	313,0721	313,0718	0.9	8.5	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	Cirsimaritina	0.78 ± 0.07
6	13.94	345,1714	345,1707	1.9	7.9	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	Rosmanol	4.4 ± 0.1
7	14.43	345,1709	345,1707	0.5	7.6	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	Episorosmanol	0.80 ± 0.05
8	15.01	345,1709	345,1707	0.5	7.6	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	Epirosmanol	0.38 ± 0.02
9	15.16	283,0620	283,0612	2.7	15.7	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	Genkwanina	2.61 ± 0.05
10	18.36	299,1652	299,1653	0.3	5.5	C ₁₉ H ₂₄ O ₃	Miltipolone	0.32 ± 0.04
11	19.18	329,1770	329,1758	3.5	1.0	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	Carnosol	10 ± 1
12	20.35	343,1548	343,1551	0.9	12.1	C ₂₀ H ₂₄ O ₅	Rosmadial	1.36 ± 0.06
13	21.04	471,3471	471,348	1.9	24.8	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	Anemosapogenina	6.5 ± 0.5
14	21.38	315,1960	315,1966	1.9	13.9	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	Rosmaridifenol	0.25 ± 0.05
15	21.91	471,3471	471,3480	1.8	34.4	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	Ácido Augústico	6.5 ± 0.5
16	22.35	471,3474	471,3480	1.3	25.1	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	Ácido Bentánico	2.1 ± 0.2
17	22.65	331,1935	331,1915	6.2	12.6	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	Ácido Carnósico	83 ± 4
18	24.89	345,2083	345,2071	3.3	13.6	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	Ácido 12-metoxicarnósico	7.20 ± 0.01
19	27.11	317,2128	317,2122	1.7	27.7	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	[9]-Shogaol	10.1 ± 0.3
20	28.04	453,3356	453,3374	4.0	10.5	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	Ácido Micromérico	47 ± 2
21	28.40	299,2015	299,2017	0.4	2.3	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	Hinokione	0.95 ± 0.08
22	29.19	455,3519	455,3531	2.5	18.6	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	Ácido Betulínico	38 ± 3
23	30.20	455,3519	455,3531	2.5	18.6	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	Ácido Ursólico	21.5 ± 0.6



El contenido en compuestos fenólicos en extractos vegetales depende en gran medida de las condiciones de cultivo de la planta y del procedimiento de extracción usado para obtener el extracto, como ya se ha comentado previamente. En el caso del romero es especialmente crítico el proceso de conservación, ya que muchos de sus compuestos, especialmente los diterpenos fenólicos, se degradan con facilidad en presencia de oxígeno, luz o calor [273]. En bibliografía las técnicas de extracción más usadas para los compuestos fenólicos de romero son SLE, PLE y SFE. En cuanto al contenido en ácido carnósico, el compuesto mayoritario de nuestro extracto, nuestro estudio puso de manifiesto la presencia de una concentración mayor que la encontrada en otros estudios en los que se realizaba extracciones mediante PLE o SFE [236, 237], aunque el contenido en este diterpeno es un poco inferior al encontrado por otros autores para extractos obtenidos mediante SFE [274]. El resto de diterpenos derivados del ácido carnósico se encuentran en contenidos menores a los reportados por otros autores [236, 264]. En cuanto al contenido de flavonoides, como genkwanina o hispidulina, la concentración en este extracto es también algo inferior a la encontrada en extractos obtenidos mediante extracción con disolventes [264].



3.2. Análisis de las fracciones aisladas.

El extracto obtenido mediante SFE a 150 bares en el Capítulo 1 fue el que se utilizó como fuente para el aislamiento y purificación de compuestos bioactivos de romero, en un intento por estudiar la bioactividad de los compuestos mayoritarios aislados y determinar si la actividad que presenta el extracto completo es debida a la presencia de uno o varios compuestos concretos, y si existen efectos sinérgicos entre ellos que le confieren una mayor bioactividad al extracto.

De las 60 fracciones recolectadas según se detalla en apartados anteriores, se seleccionaron 12 fracciones en función del cromatograma UV registrado, aquellas que corresponden a los compuestos mayoritarios del extracto. A continuación en la **Figura 2** se muestra dicho cromatograma registrado a una longitud de onda de 280 nm, donde se encuentran marcadas las fracciones recolectadas para los estudios de bioactividad.

317

Tras el secado de estas fracciones seleccionadas con N₂ para evitar su degradación se llevó a cabo su análisis mediante HPLC-QTOF como se detalla en apartados anteriores, con el fin de determinar la composición y pureza



de dichas fracciones obtenidas. Sus composiciones se muestran en la siguiente tabla (**Tabla 3**).



Figura 2. Cromatograma UV registrado a 280 nm del extracto de romero obtenido mediante SFE a 150 bar y fracciones seleccionadas para estudio de su bioactividad.

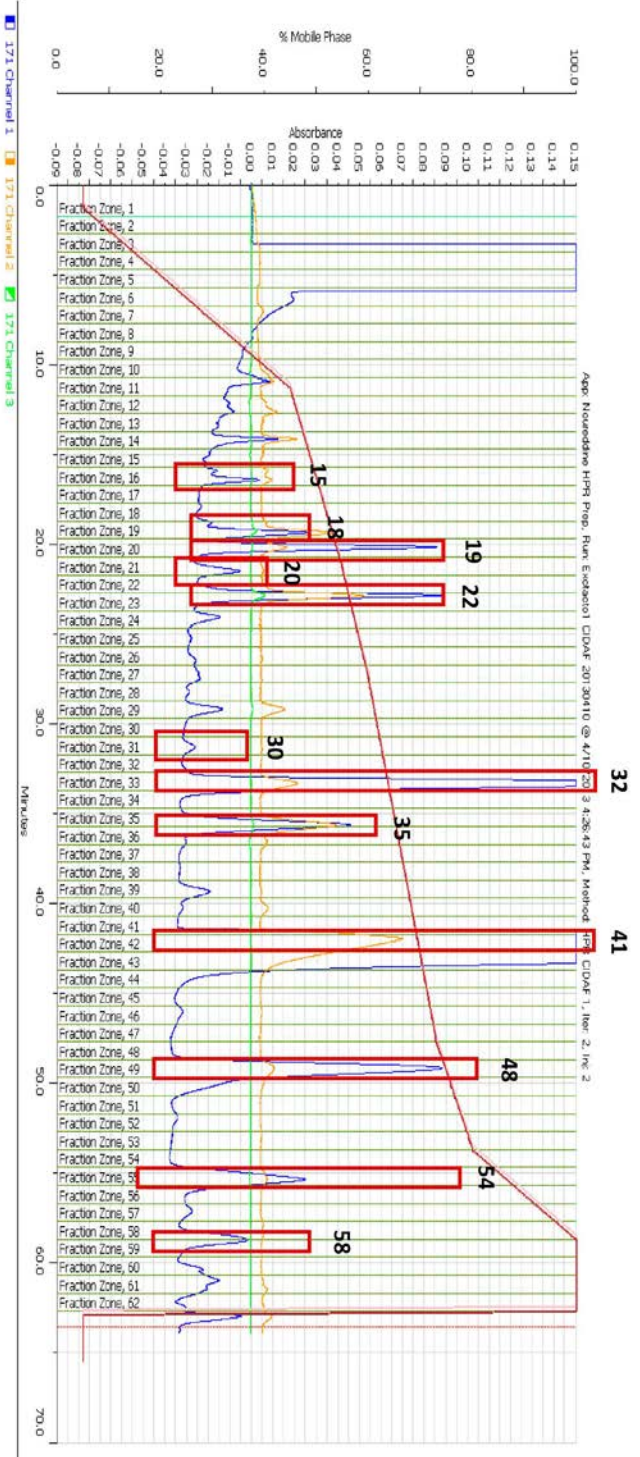


Tabla 3. Composición de las fracciones seleccionadas para ensayar bioactividad, junto con m/z experimental, error (ppm), mSigma, Fórmula molecular y compuesto propuesto en cada caso.

Fracción	m/z Experimental	Fórmula Molecular	Error (ppm)	mSigma	Compuesto Propuesto
F 15	269.0455	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	0.1	5.1	Apigenina
F 18	299.0569	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	-2.6	5.2	Diosmetina
F 19	313.0731	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	-4.2	0.6	Cirsimaritina
F 20	345.1715	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	-2.2	12.1	Rosmanol
F 20	345.1714	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	-1.7	5.6	Epiisorosmanol
F 22	283.0616	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	-1.3	12.2	Genkwanina
F 30	299.1655	C ₁₉ H ₂₄ O ₃	-0.7	21.7	Miltipolone
F 30	457.3325	C ₂₉ H ₄₆ O ₄	-0.4	20.9	Notohamosin B
F 32	471.3483	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	-0.7	31.8	Anemosapogenina
F 32	329.1755	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	1.1	15.7	Carnosol
F 35	343.1556	C ₂₀ H ₂₄ O ₅	-1.6	7.8	Rosmadial
F 41	331.1922	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	-2.1	25.8	Ácido Carnósico
F 48	345.2070	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	0.2	6.6	Ácido 12-metoxicarnósico
F 54	313.1819	C ₂₀ H ₂₆ O ₃	-3.0	7.5	Taxodione
F 54	317.2137	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	-4.6	19.3	[9]-Shogaol
F 58	299.2021	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	-1.5	1.5	Hinokione
F 58	455.3518	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	2.8	1.1	Ácido Betulinico



Los compuestos detectados en las fracciones han sido cuantificados en el extracto, a excepción del notohamosin B y taxodione, ya que se encontraban en pequeña cantidad en el extracto. Las fracciones 15, 19, 22, 32, 35, 41 y 48 presentan un único compuesto, apigenina, rosmanol, epiisorosmanol, genkwanina, carnosol, rosmadial, ácido carnósico, y ácido 12-methoxicarnósico respectivamente. Por el contrario la fracción 18 presenta 2 flavonoides en su composición, diosmetina y cirsimaritina. En el caso de la fracción 30 no se pudieron purificar aisladamente los compuestos miltipolone, notohamosin B y anemosapogenina. Por su parte, las fracciones 54 y 58 presentan dos compuestos cada una, taxodione y [9]-shogaol la primera, e hinokione y ácido betulínico la segunda. Tanto el taxodione como el hinokione presentan un esqueleto muy parecido al carnosol, por lo que podrían ser productos derivados del mismo.

321

3.3 Efectos del extracto de romero y de las fracciones aisladas en la proliferación celular.

Las fracciones seleccionadas y el extracto de romero se ensayaron en las líneas celulares de adenocarcinoma de colon como se describe en apartados anteriores.



En todas las líneas celulares se observó una mayor inhibición de la proliferación celular a la concentración ensayada más elevada, 60 $\mu\text{g/ml}$, y cuando el tiempo de incubación fue el más largo, 48 horas. En la **Tabla 4** se recogen los porcentajes de inhibición de la proliferación celular y en la **Figura 3** se muestran los porcentajes de viabilidad celular que mostraron el extracto y las fracciones de romero para las tres líneas de adenocarcinoma de colon.



Tabla 4. Inhibición de la proliferación celular del extracto y las fracciones de romero en las líneas celulares de adenocarcinoma de colon HT-29, SW480 y HGHE-C-1.

LINEA CELULAR	HT-29			
	24 horas		48 horas	
Tiempo de incubación				
Concentración	30 µg/ml	60 µg/ml	30 µg/ml	60 µg/ml
Extracto Romero	74.0±3.4	84.1±1.3	74.2±2.5	94.4±0.2
F 19	20.3±2.1	68.4±8.1	35.6±8.0	77.9±5.3
F 20	22.2±4.2	53.2±6.0	20.1±5.6	51.5±3.4
F 22	0.7±5.5	26.1±5.3	19.4 ±2.6	52.9±7.4
F 30	13.0±1.7	50.9±5.6	29.8±3.3	80.5±3.6
F 32	73.1±4.1	86.2±1.2	92.4±1.2	94.8±0.5
F 35	26.1±3.5	62.1±3.2	49.7±4.1	77.3±3.1
F 41	84.6±1.3	86.3±1.5	93.1±1.4	94.6±0.2
F 48	58.4±0.9	86.8±1.5	70.4±1.1	95.2±1.2
F 54	87.1±0.8	82.2±2.2	94.4±0.2	93.7±0.6
F 58	79.4±1.2	83.5±2.2	92.2±2.3	92.7±2.2



Tabla 4. Inhibición de la proliferación celular del extracto y las fracciones de romero en las líneas celulares de adenocarcinoma de colon HT-29, SW480 y HGHE-C-1 (Continuación).

LINEA CELULAR	SW 480				
	Tiempo de incubación	24 horas		48 horas	
		30 µg/ml	60 µg/ml	30 µg/ml	60 µg/ml
Extracto Romero	91.7±0.8	92.8±0.7	95.2±0.2	95.2±0.8	
F 19	41.8±8.7	88.2±1.8	65.0±6.2	96.0±0.5	
F 20	9.8±0.9	54.5±3.1	15.5±5.3	68.9±4.9	
F 22	43.4±4.9	71.9±0.7	40.1±1.8	76.3±6.4	
F 30	3.9±5.9	51.8±5.6	13.2±3.7	84.7±3.2	
F 32	91.4±1.5	92.8±0.9	95.2±0.2	94.9±0.4	
F 35	64.4±4.5	91.3±1.0	57.0±1.1	94.2±0.8	
F 41	93.6±0.2	93.9±0.6	95.6±0.3	95.2±0.6	
F 48	81.4±1.0	95.0±0.3	87.9±1.0	95.7±0.9	
F 54	94.4±0.8	92.5±0.4	95.7±0.3	94.6±0.5	
F 58	89.6±0.5	91.9±0.2	94.8±0.9	94.5±1.1	

324

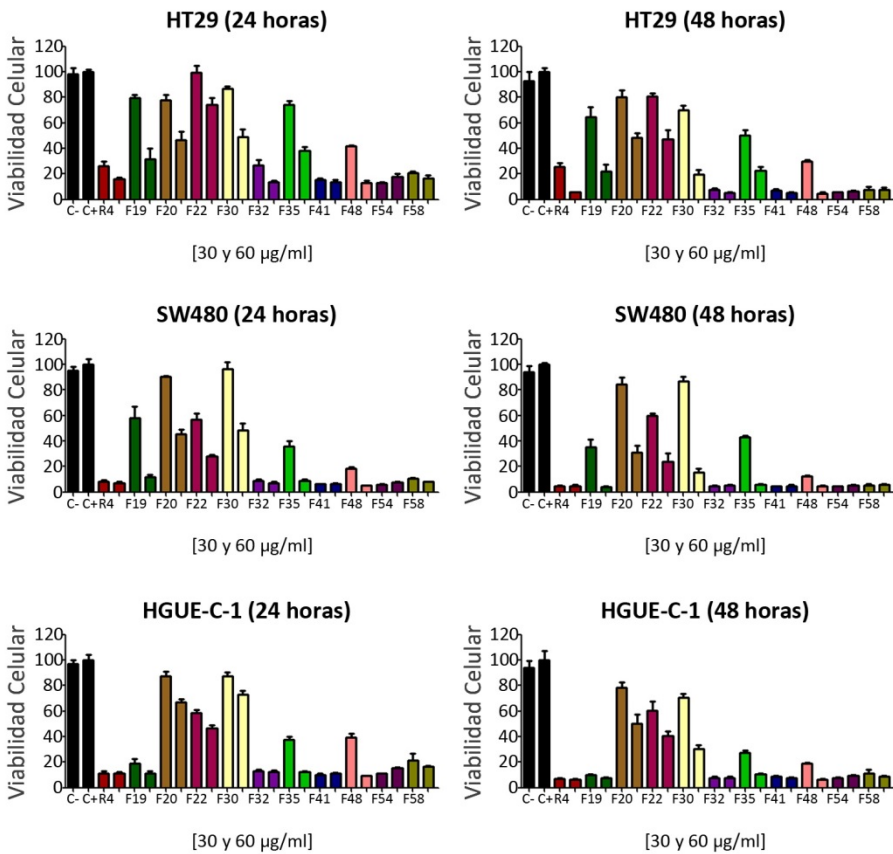


Tabla 4. Inhibición de la proliferación celular del extracto y las fracciones de romero en las líneas celulares de adenocarcinoma de colon HT-29, SW480 y HGHE-C-1 (Continuación).

LINEA CELULAR	HGUE-C-1			
	Tiempo de incubación	24 horas		48 horas
Concentración	30 µg/ml	60 µg/ml	30 µg/ml	60 µg/ml
Extracto Romero	88.0±1.5	89.1±1.3	93.2±0.7	93.4±0.4
F 19	81.3±3.6	89.0±1.7	90.1±0.7	92.6±0.5
F 20	12.9±3.6	33.1±2.6	21.9±4.2	49.9±7.5
F 22	41.6±2.7	53.7±2.5	39.5±6.9	59.7±4.0
F 30	12.6±2.9	26.8±2.5	29.5±2.8	69.9±3.4
F 32	86.8±1.0	87.4±0.8	92.5±1.3	92.3±1.3
F 35	62.4±2.5	84.9±0.7	72.5±1.9	89.6±0.7
F 41	89.8±1.0	88.8±0.5	91.2±0.7	92.2±0.2
F 48	60.5±2.6	90.8±0.2	81.1±0.6	93.2±0.3
F 54	88.9±0.2	84.3±0.4	92.5±0.6	90.5±0.7
F 58	78.6±5.2	83.4±0.5	88.8±2.9	91.3±0.5



Figura 3. Viabilidad celular tras el tratamiento con el extracto y las fracciones de romero en las líneas celulares de adenocarcinoma de colon HT-29, SW480 y HGHE-C-1.



Las fracciones 15 y 18 finalmente no se ensayaron en las líneas celulares por la pequeña cantidad recolectada durante el aislamiento de las fracciones, de ahí que no se muestren en la Tabla 4 y en la Figura 3.

En concreto, para la línea celular HT-29, las fracciones que mostraron mayor inhibición de la proliferación celular fueron la F32, F41, F48, F54 y F58. En el caso de la F48 ésta únicamente mostró una inhibición de la proliferación significativa cuando se incubó a la concentración más elevada. Como se observa en la Tabla 3 las tres primeras fracciones se corresponden al ácido carnósico y sus derivados carnosol y ácido 12-metoxicarnósico. En cuanto a la composición de las últimas fracciones corresponden a los compuestos taxodione y [9]-shogaol en la F54, y los compuestos hinokione y ácido betulínico para la F58. Además de las fracciones el extracto de romero ensayado mostró gran inhibición de la proliferación celular, con un valor muy similar a la fracción más bioactiva.

327

Para la línea celular SW480 además de las fracciones mencionadas para la línea celular HT-29 y del extracto de romero completo, también mostró una actividad destacable la F35, correspondiente al compuesto rosmadial, a la concentración ensayada de 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$.



Para la línea celular HGUE-C-1, las fracciones más bioactivas fueron las mencionadas para las líneas celulares anteriores más la fracción 19 correspondiente a rosmanol, otro diterpeno característico de romero derivado del ácido carnósico. También en este caso el extracto de romero obtenido con SFE mostró un porcentaje de inhibición de la proliferación celular similar al de las fracciones más bioactivas.

328 Por su parte, diferentes extractos de romero han sido estudiados por su potencial anticancerígeno frente distintos tipos de cáncer. Dichos estudios han puesto de manifiesto una significativa actividad antiproliferativa por parte de estos extractos frente a diferentes líneas de cáncer, destacando su bioactividad frente al cáncer de mama, leucemia, próstata, hígado, pulmón, ovario y colon [130, 131, 275-277]. Por su parte, los compuestos mayoritarios de romero, en especial el ácido carnósico, el carnosol y el ácido rosmarínico también han sido ensayados en diferentes líneas celulares de leucemia, cáncer de mama, de piel, y de colon [245, 278]. También los triterpenos ácido betulínico y ácido ursólico han demostrado poseer diferentes acciones frente al cáncer, que incluyen el sistema inmune y el entorno tumoral [279].



Es por esto que los resultados mostrados por las fracciones y por el extracto de romero están en concordancia con resultados previos encontrados en bibliografía. Queda por tanto justificado el hecho de que las fracciones de mayor bioactividad en las tres líneas celulares fueron aquellas que presentaban ácido carnósico, carnosol y ácido betulínico. Otros compuestos que presentan una estructura similar al ácido carnósico también se encuentran formando parte de estas fracciones, por lo que la actividad de las mismas puede estar justificada por la presencia de dichos compuestos con cierta similitud estructural, como son el taxodione, hinokione y el derivado ácido 12-metoxicarnósico. Otros compuestos que han mostrado cierta actividad anticancerígena frente a las líneas SW 480 y HGUE-C-1 han sido el rosmadial y el rosmanol en el caso de la última línea celular. Ambos compuestos, especialmente el rosmanol, presentan semejanzas estructurales al carnosol, por lo que su bioactividad podría estar sustentada en este hecho. Dichas estructuras se muestran en la **Figura 4**, donde puede observarse esa similitud.

329

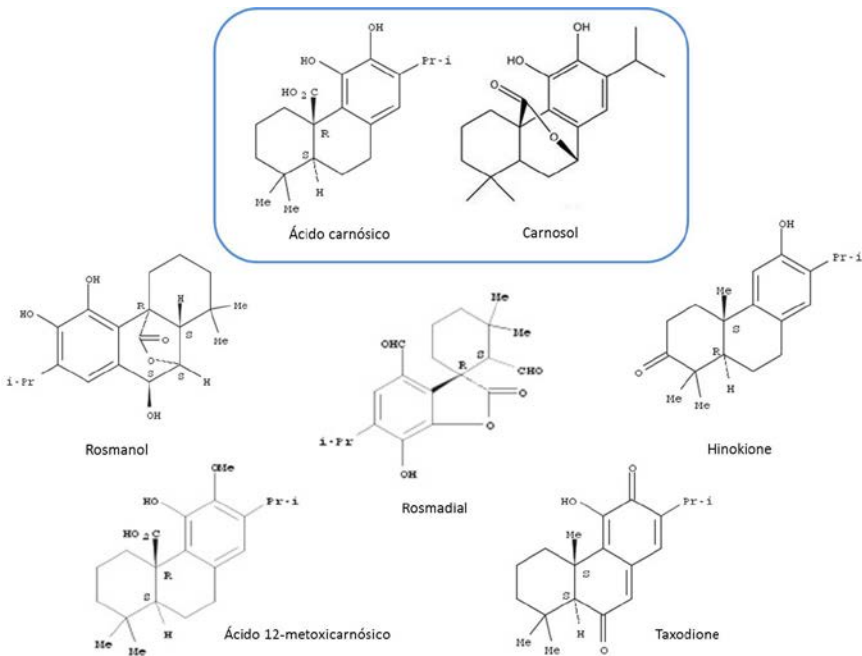
Queda patente el importante efecto antiproliferativo tanto del extracto de romero como de ciertos compuestos bioactivos presentes en su composición frente a las líneas



celulares de adenocarcinoma de colon, por lo que sería interesante continuar dichos estudios en modelos animales para ver si los resultados obtenidos son esperanzadores y se podrían extrapolar a ensayos clínicos, lo que nos haría pensar en un futuro uso de extractos de romero como componente de nutraceuticos o fármacos utilizados como terapia antitumoral, bien solos o administrados junto con otros agentes quimioterapéuticos.

Figura 4. Estructuras de los compuestos presentes en las fracciones más bioactivas.

330



Bloque II

Bloque II

Hibiscus Sabdariffa



Bloque II: *Hibiscus sabdariffa*

Capítulo 4: Caracterización de 25 extractos de *Hibiscus sabdariffa* de distintas variedades procedentes de Méjico con actividad antimicrobiana.

4.1 Caracterización de compuestos fenólicos en extractos de distintas variedades de *Hibiscus sabdariffa* mediante HPLC-DAD-ESI-TOF.

Los análisis de los extractos de *Hibiscus sabdariffa* (HS) preparados según se detalla en apartados anteriores fueron realizados mediante HPLC-DAD-ESI-TOF, y revelaron la presencia de una amplia variedad de polifenoles así como de otros compuestos polares. Los compuestos detectados fueron tentativamente identificados gracias a la fórmula molecular proporcionada por el software usado, al uso de estándares comerciales y la bibliografía disponible para esta matriz. En la **Tabla 1** se recogen el número de pico, el tiempo de retención, m/z observado y fórmula molecular de cada compuesto detectado, así como en qué extracto se encuentra presente. Como puede observarse el número de compuestos identificados en cada extracto varía desde 24 a 42 dependiendo de la variedad.



Tabla 1 Compuestos propuestos detectados en extractos de HS analizados por HPLC-DAD-ESI-TOF-MS.

Pico	RT (min)	m/z Teórico	Fórmula Molecular	Compuesto propuesto	Extractos HS
1	4.10	207.0146	C ₆ H ₈ O ₈	Ácido hidroxicitrico	1, 3-10, 12-15, 17-19, 21, 22, 24, 25
2	4.87	189.0041	C ₆ H ₆ O ₇	Ácido hibiscico	1-24
3	5.28	221.0303	C ₇ H ₁₀ O ₈	Ácido 3-Deoxi-D-lixo-heptulosárico	1, 3, 6, 8-13, 16-25
4	5.50	235.0459	C ₈ H ₁₇ O ₈	Ácido hibiscico hidroxietilester	1-25
5	6.13	353.0878	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Ácido Neoclorogénico (isómero 1)	3, 5, 12, 13, 19, 23, 24
6	6.36	249.0616	C ₉ H ₁₄ O ₈	Ácido Trimethylhidroxicitrico (isómero 1)	1-2, 6-11, 14-25
7	6.69	249.0616	C ₉ H ₁₄ O ₈	Ácido Trimethylhidroxicitrico (isómero 2)	1-2, 6-11, 14-19, 21, 22, 24, 25
8	7.35	217.0354	C ₈ H ₁₀ O ₇	Ácido hibiscico dimetilester	1-25
9	7.75	249.0616	C ₉ H ₁₄ O ₈	Ácido Trimethylhidroxicitrico (isómero 3)	6, 9, 10, 19, 21-23
10	7.85	353.0878	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Ácido Clorogénico	3-5, 13, 19, 20, 23, 24
11	8.31	353.0878	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Ácido Criptoclorogénico (isómero 3)	2-5, 8, 12, 13, 18, 19, 20, 23, 24
12	9.13	263.0772	C ₁₀ H ₁₆ O ₈	Ácido hibiscico hidroxietildimetilester	1-25
13	9.50	369.0463	C ₁₃ H ₁₄ O ₁₁	Ácido 2-O-trans-cafeoil-hidroxicitrico	1-3, 8, 13, 19, 22-25
14	9.70	367.1034	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	Metilclorogenato (isómero 1)	2, 6-12, 14, 16-25
15	11.07	337.0929	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	Ácido Cumaroilquinico	12
16	11.40	507.1144	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₃	Siringetina-3-O-glucósido	17, 21, 22
17	11.80	263.0772	C ₁₀ H ₁₆ O ₈	Kinsenosido	6-11, 14-18, 21-25
18	12.30	367.1034	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	Metilclorogenato (isómero 2)	1, 2, 6, 8, 11-13, 16-25
19	13.50	367.1034	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	Metilclorogenato (isómero 3)	11, 16-20, 22-25
20	13.77	381.1191	C ₁₈ H ₂₂ O ₉	Etilclorogenato (isómero 1)	1-25
21	14.00	335.0772	C ₁₆ H ₁₆ O ₈	Ácido 5-O-cafeoilshikimico	3, 5, 12, 19, 20-25
22	14.44	475.0882	C ₂₇ H ₂₀ O ₁₂	Ácido Kaempferol-3-O-glucurónico methyl ester (isómero 1)	21



Tabla 1 Compuestos propuestos detectados en extractos de HS analizados por HPLC-DAD-ESI-TOF-MS.

23	15.11	475.0882	C ₂₂ H ₃₀ O ₁₂	Ácido Kaempferol-3-O-glucurónico methyl ester (isómero 2)	21
24	15.46	461.0725	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	Kaempferol 3-O-β-glucurónico	1, 4-12, 14-24
25	15.50	463.0882	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₂	Quercetina-3-glucósido	2, 3, 13, 19
26	16.22	381.1191	C ₁₈ H ₂₂ O ₉	Etilclorogenato (isómero 2)	1-25
27	17.10	381.1191	C ₁₈ H ₂₂ O ₉	Etilclorogenato (isómero 3)	1-25
28	17.85	475.0882	C ₂₂ H ₃₀ O ₁₂	Luteolina-7-O-β-D-glucurónico methyl éster	10, 11, 15, 17, 21
29	18.00	319.0823	C ₁₆ H ₁₆ O ₇	Mentilpivalocatequina	3, 12
30	18.60	489.1038	C ₂₃ H ₃₂ O ₁₂	Kaempferol 3-O-(6"-O-acetil)glucósido	1-3, 12, 11, 13, 19, 24
31	21.75	317.0303	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	Mircetina	2, 3, 12, 13
32	21.90	489.1038	C ₂₃ H ₃₂ O ₁₂	4"-O-Acetilquercitrina	1, 4, 5, 15, 17
33	22.95	609.125	C ₃₀ H ₄₆ O ₁₄	Prodelphinidina B3	3, 23-25
34	24.70	385.0919	C ₂₀ H ₁₈ O ₈	Cleomiscosin (isómero 1)	2, 8, 18, 22-25
35	24.92	312.1241	C ₁₈ H ₁₆ NO ₄	N-ferulolitramina	1-25
36	26.40	385.0929	C ₂₀ H ₁₈ O ₈	Cleomiscosin (isómero 2)	1, 5-10, 12-25
37	27.70	301.0354	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Quercetina	1-5, 8, 11-13, 15, 18-20, 23-25



De la composición encontrada destaca la presencia en todos los extractos estudiados de distintos derivados del ácido hibísico, en concreto el hidroxietiléster, dimetiléster e hidroxietildimetiléster, además de un compuesto nitrogenado denominado N-feruloiltiramina.

336 El compuesto 1, identificado como ácido hidroxicítrico, ha sido detectado en todos los extractos exceptuando HS 2, 11, 16, 20, 23 y 25; sin embargo el ácido hibísico (compuesto 2) únicamente no fue detectado en el extracto 25. Además se detectaron 3 isómeros de otro derivado del ácido hibísico, el ácido trimetilhidroxicítrico, en la mayoría de los extracto. Los dos primeros isómeros fueron detectados a 6.39 y 6.69 minutos respectivamente en todos los extractos analizados excepto en HS 3, 4, 5, 12, 13 para ambos, y el segundo isómero se encontraba ausente además en el extracto 20 y 23. Por su parte el tercer isómero se detectó en los extractos HS 6, 9, 10, 19, 21, 22, 23.

También se detectó la presencia de ácido clorogénico y derivados de éste en los extractos de HS. El ácido clorogénico, o ácido 5-cafeoilquínico, es un compuesto de demostrada actividad antibacteriana que ha sido caracterizado en esta matriz vegetal junto con dos de sus isómeros, el ácido 3-



cafeoilclorogénico (conocido con el nombre de ácido neoclorogénico) y el ácido 4-cafeoilclorogénico (conocido como ácido criptoclorogénico). La identificación del ácido clorogénico fue confirmada por comparación con el estándar del tiempo de retención, 7.85 minutos, así como de los espectros de absorción UV-Vis y de MS. Sus isómeros, el ácido neoclorogénico (tiempo de retención 6.13 minutos) y el ácido criptoclorogénico (tiempo de retención 8.31 minutos), se diferenciaron en base a sus espectros de masas y a la bibliografía disponible [280]. El ácido criptoclorogénico presenta en su espectro de masas un pico de m/z 173 correspondiente a $[\text{ácido quínico-H-H}_2\text{O}]^-$ mientras que el ácido neoclorogénico no presenta esta pérdida. El primer isómero (ácido neoclorogénico) se encontró en los extractos 3, 5, 12, 13, 19, 23, 24; el ácido clorogénico se identificó en los extractos 3, 4, 5, 13, 19, 20, 23, 24; mientras que el ácido criptoclorogénico resultó ser el más abundante, estando presente en todos los extractos en los que se encuentran sus isómeros y además en los extractos 2, 8 y 18.

337

Además se han encontrado más compuestos relacionados estructuralmente con este agente antimicrobiano que es el ácido clorogénico, como son el ácido clorogénico metil éster y el etil éster, conocidos



comúnmente como metil y etil clorogenato. Es lógico pensar que si estos compuestos son los ésteres metílico y etílico del ácido clorogénico respectivamente, y en los extractos se han encontrado tres isómeros de ácidos clorogénico se pueda observar la presencia de tres isómeros de estos ésteres. Respecto al metilclorogenato se han detectado tres isómeros que eluyen a 9.70, 12.30 y 13.50 minutos. El primer isómero no fue detectado en los extractos 1, 3, 4, 5, 13 y 15; mientras que el segundo tampoco estaba presente en los extractos 3, 4, 5, 7, 9, 10, 14, 15; finalmente el tercer isómero no se encontró en los extractos 1-10, 12, 13, 14, 15 y 21. Por el contrario los tres isómeros de etilclorogenato fueron detectados en todos los extractos estudiados a los tiempos de retención 13.77, 16.22 y 17.10 minutos.

Asimismo, otros compuestos fenólicos descritos para esta matriz vegetal han sido detectados, como es el caso del ácido 2-O-trans-cafeoil-hidroxycítrico a 9.50 minutos (en extractos 1, 2, 3, 8, 13, 19, 22, 23, 24, 25), el ácido cumaroilquínico a 11.07 minutos (extracto 12), el ácido 5-O-cafeoilshikímico a 14.00 minutos (extractos 3, 5, 12, 19, 20, 21, 23, 24, 25), la quercetina-3-glucósido a 15.5 minutos (extractos 2, 3, 13, 19), la metilepigalocatequina a 18.00 minutos (extractos 3 y 12), miricetina a 21.75 minutos



(extractos 2, 3, 12 y 13), prodelfinidina B3 a 22.95 minutos (extractos 3, 23, 24, y 25); y por último quercetina a un tiempo de retención de 27.70 minutos (presente en todos los extractos excepto en 6, 7, 9, 10, 14, 16, 17, 21, 22).

Además de estos compuestos conocidos de HS, en los extractos analizados se han encontrado otros compuestos polares: ácido 3-Deoxi-D-lixo-heptulosárico (en todos los extractos a 5.28 minutos excepto en los extractos 2, 4, 5, 7, 14 y 15), siringetina-3-O-glucósido (en los extractos 17, 21, 22 a 11.40 minutos), kinsenósido (a 11.80 minutos en todos los extractos exceptuando 1-5, 12, 13, 19, 20), luteolina-7-O- β -D-glucurónido metil éster (en extractos 10, 11, 15, 17 y 21, donde eluye a 17.85 minutos), 4''-O-acetilquercitrina (en los extractos 1, 4, 5, 15 y 17 a un tiempo de retención de 21.90 minutos), así como dos isómeros de cleomiscosin, conocidos como cleomiscosin A y B (a 24.70 minutos en los extractos 2, 8, 18, 22, 23, 24, 25 en el primer caso, y a 26.40 minutos en todos los extractos exceptuando el 2, 3, 4 y 11 para el segundo isómero).

339

También se han encontrado en los extractos de HS diferentes compuestos derivados del kaempferol, en concreto se han detectado dos isómeros del ácido kaempferol-3-O-glucurónico metil éster, que aparecen a 14.44 y 15.11



minutos (únicamente en el extracto 21); keampferol 3-O- β -glucurónido a 15.46 minutos en todos los extractos excepto en el 2, 3, 13 y 25; así como kempferol 3-O-(6''-O-acetil)glucósido en los extractos 1, 2, 3, 11, 12, 13, 19 y 24 a un tiempo de retención de 18.60 minutos.

340 A pesar del esfuerzo puesto en la caracterización de los extractos de HS, con la información disponible, fue imposible identificar todos los compuestos detectados, y algunos siguen siendo desconocidos. En la **Tabla 2** se recoge la información proporcionada por el detector TOF-MS relacionada con estas iones, incluyendo su tiempo de retención, su m/z teórico y calculado, su fórmula molecular, error y valor mSigma, así como los extractos de HS en los que fueron detectados. En este sentido, se necesitaría llevar a cabo otros estudios para lograr la identificación de estos compuestos, como análisis de MS/MS.

Basándonos en esta caracterización cualitativa de los extractos de HS de diferentes zonas geográficas no puede concluirse que existan diferencias significativas de composición dependiendo del origen geográfico de los extractos, siendo en muchos casos bastante similar la composición de muchos extractos con diferente procedencia, como es el caso de los extractos HS 20 y 23 (de Guerrero y



Jalisco), como puede observarse en la **Figura 1**. Sin embargo si hay que destacar que la composición de algunos extractos es bastante más compleja que la de otros, véase el caso del extracto HS 2 (Michoacán), en comparación con otros extractos como el HS 20 o 23 (Guerrero y Jalisco).

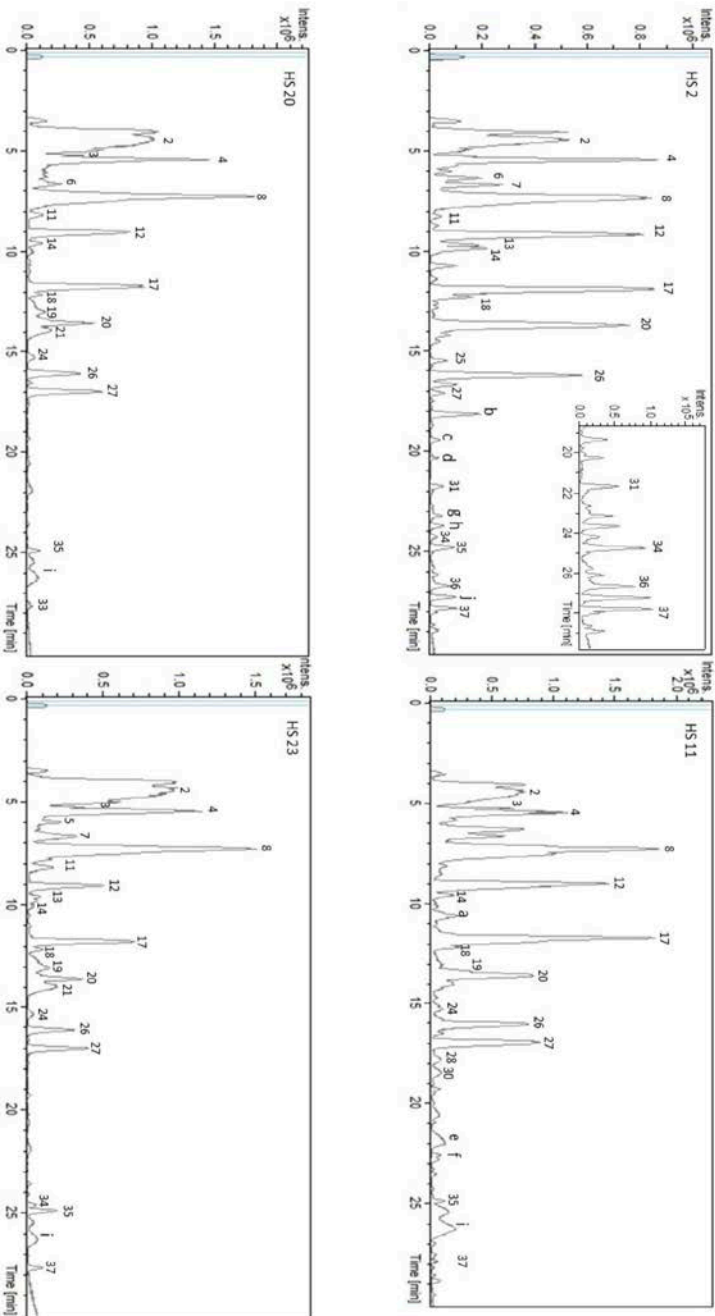


Tabla 2 Compuestos no identificados detectados en extractos de HS analizados por HPLC-DAD-ESI-TOF-MS.

Pico	RT (min)	m/z experimental	m/z teórico	Fórmula Molecular	Error (ppm)	mSigma	Extractos HS
a	10.76	217.0344	217.0354	C ₈ H ₁₀ O ₇	4.4	5.3	1, 2, 6, 7, 9, 10, 11, 14-17, 21, 22, 25
b	18.14	397.0787	397.0776	C ₁₇ H ₁₈ O ₁₁	-2.7	1.5	2, 8, 24, 25
c	19.40	365.1248	365.1242	C ₁₈ H ₂₂ O ₈	-1.8	19.9	2, 4, 5, 8, 9, 11, 12, 14-17, 20-22, 24, 25
d	20.29	357.1186	357.1191	C ₁₆ H ₂₂ O ₉	1.5	7.3	2
e	21.96	429.0478	429.0463	C ₂₀ H ₁₄ O ₁₁	-3.3	25.3	1, 4, 5, 6, 8-19, 21, 22, 24, 25
f	22.55	303.1074	303.1085	C ₁₃ H ₂₀ O ₈	3.6	12.4	1, 8, 11, 14-18, 21, 22, 25
g	23.15	411.0923	411.0933	C ₁₈ H ₂₀ O ₁₁	2.3	15.2	2
h	23.65	399.0925	399.0933	C ₁₇ H ₂₀ O ₁₁	2.1	14	2, 6, 8-12, 14-25
i	26.21	443.0673	443.0679	C ₁₄ H ₂₀ O ₁₆	1.2	13.5	1, 5-25
j	27.16	206.0213	206.0207	C ₈ H ₂ N ₃ O ₄	-2.9	16.4	2



Figura 1 BPC de extractos de HS analizados por HPLC-DAD-ESI-TOF-MS.



4.2 Contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides, antocianinas, delphinidina y cianidina en las distintas variedades de *Hibiscus sabdariffa*.

344 El contenido total de compuestos fenólicos de los extractos de HS determinado mediante el método de Folin-Ciocalteu se muestra en la **Tabla 3**. Como puede observarse dicho contenido de polifenoles totales mostró una gran variación entre los extractos, encontrándose un rango de entre 2.380 ± 30 hasta 9.793 ± 4 mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/ 100 g de extracto seco. El mayor nivel de polifenoles totales fue encontrado para el HS 24 procedente de Veracruz, seguido por el HS 3 de Jalisco. No se ha podido establecer ninguna correlación entre la procedencia de los extractos de HS y el contenido fenólico determinado debido al hecho de que uno de los extractos que presentó mayor contenido en polifenoles totales y el extracto con un nivel más bajo en compuestos fenólicos pertenecen a la misma área geográfica, sumado a que para el resto de extractos tampoco se observó que existiera ninguna tendencia en cuanto a relación entre origen geográfico y polifenoles totales.



Tabla 3 Extractos de HS analizados con variedad, origen, contenido en polifenoles totales, flavonoides, cianidinas, defnindina y cianidina, así como su capacidad antioxidante

Extracto HS	Variedad	Origen	Compuestos fenólicos totales (mg GAE/100 g extracto)	Flavonoides totales (mg Quercetina/100 g extracto)	Antocianinas totales (mg/100 g extracto)	Contenido Defnindina (mg/100 g extracto)	Contenido Cianidina (mg/100 g extracto)	Capacidad Antioxidante (µmol trolox/g extracto)
HS 1	Americana	Jalisco	2991 ± 6 ^{hi}	813 ± 5 ⁱ	969 ^m	444 ^k	525 ⁿ	104 ± 9 ^a
HS 2	Tepalcatepec	Michoacán	9200 ± 200 ^b	692 ± 8 ^{jk}	1673 ⁱ	1083 ^g	589 ^f	83.0 ± 0.6 ^{dc}
HS 3	Diamante	Jalisco	9790 ± 10 ^a	1695 ± 8 ^b	2967 ^d	2232 ^c	734 ^c	112 ± 8 ^a
HS 4	Collina	Collina	9380 ± 90 ^b	1310 ± 40 ^d	2306 ^f	1658 ^e	648 ^d	60 ± 1 ^{fe}
HS 5	Tempranilla	Jalisco	4130 ± 30 ^g	429 ± 5 ⁿ	4408 ^a	3535 ^a	873 ^a	40 ± 2 ^{jl}
HS 6	Talpa	Jalisco	3770 ± 50 ^g	419 ± 2 ⁿ	4085 ^c	3300 ^b	784 ^b	45 ± 8 ⁱ
HS 7	Violenta	Jalisco	6500 ± 100 ^e	720 ± 30 ^j	4246 ^b	3495 ^a	750 ^c	48.6 ± 0.4 ^l
HS 8	Quesería	Collina	5730 ± 90 ^{ef}	530 ± 20 ^l	1781 ^h	1223 ^f	558 ^e	105.8 ± 0.3 ^a
HS 9	Criolla Tala	Jalisco	6360 ± 20 ^e	890 ± 10 ^{hi}	1369 ^j	825 ^h	543 ^g	80 ± 2 ^{dc}
HS 10	Tecoman	Collina	4240 ± 40 ^g	470 ± 10 ⁿ	1013 ^m	511 ^k	501 ⁱ	37 ± 1 ^k
HS 11	El Bordo	Collina	3390 ± 30 ^h	1030 ± 70 ^{gh}	1308 ^k	783 ^h	525 ^h	76.6 ± 0.3 ^{ed}
HS 12	Tempranilla	Collina	4478 ± 9 ^{fg}	1140 ± 50 ^{fe}	2613 ^e	1956 ^d	657 ^d	84 ± 2 ^{bcd}
HS 13	Sudan	Collina	4330 ± 40 ^g	488.0 ± 0.6 ^m	929 ^m	436 ^k	492 ⁱ	36.3 ± 0.3 ^k
HS 14	Media Luna	Collina	6700 ± 100 ^d	681 ± 7 ^k	1500 ^j	940 ^h	560 ^g	38.5 ± 0.1 ^j
HS 15	Pisila/Collina	Collina	6800 ± 300 ^d	740 ± 20 ^{fl}	1361 ^k	791 ^h	569 ^g	56 ± 2 ^{figh}
HS 16	JB 00001 SM	Guerrero	8300 ± 100 ^c	1050 ± 30 ^g	0 ⁿ	0 ⁱ	0 ^j	84 ± 8 ^{bcd}
HS 17	JCP 0001 T	Guerrero	8880.8 ± 0.6 ^{cb}	950 ± 30 ^h	1058 ^l	552 ^j	505 ⁱ	56 ± 3 ^{fg}
HS 18	Mutante Blanca	Guerrero	8100 ± 100 ^c	1270 ± 10 ^d	0 ⁿ	0 ⁱ	0 ^j	49.2 ± 0 ⁱ
HS 19	JJ 00001 SM	Guerrero	8300 ± 100 ^c	810 ± 50 ⁱ	1216 ^l	663 ⁱ	553 ^g	48.6 ± 0.5 ^l
HS 20	JR 00001 C	Guerrero	3720 ± 50 ^{gh}	1070 ± 10 ^{fg}	1147 ⁱ	633 ⁱ	514 ^h	85.0 ± 0.9 ^{bcd}



Tabla 3 Extractos de HS analizados con variedad, origen, contenido en polifenoles totales, flavonoides, cianidinas, delphinidina y cianidina, así como su capacidad antioxidante

HS 21	Americana	Colima	5140 ± 70 ^f	504 ± 4 ^m	1815 ^h	1205 ^f	609 ^e	35.15 ± 0.07 ^{kl}
HS 22	Puerta de Anzar	Colima	2830 ± 40 ⁱ	632 ± 5 ^{kl}	1178 ⁱ	678 ⁱ	500 ⁱ	97 ± 8 ^{bc}
HS 23	Variedad Blanca	Jalisco	2380 ± 30 ^j	855 ± 8 ^{hi}	0 ⁿ	0 ⁱ	0 ^j	27.4 ± 0.3 ⁱ
HS 24	Real	Veracruz	9793 ± 4 ^a	1500 ± 70 ^c	1280 ^k	707 ⁱ	572 ^f	101 ± 6 ^b
HS 25	Reyna	Nayarit	6990 ± 10 ^d	2260 ± 70 ^a	ND	ND	ND	97 ± 4 ^{bc}



Con respecto al contenido en flavonoides (**Tabla 3**) se ha observado un comportamiento similar, encontrándose valores entre 419 ± 2 hasta 2.260 ± 70 mg quercetina / 100 g de extracto seco. El mayor contenido se encontró en el HS 25 de Nayarit, seguido por el HS 3 de Jalisco con un valor bastante más inferior (2.260 ± 70 y 1.695 ± 8 mg quercetina / 100 g de extracto seco respectivamente). El contenido más bajo en flavonoides se encontró para el HS 6 de Jalisco, seguido por el HS 5 y el HS 10, aunque no presentan diferencias significativas entre ellos. Respecto al contenido en flavonoides y el origen geográfico podemos concluir que no se observó correlación en este caso.

347

En la determinación del contenido en antocianinas (**Tabla 3**) el mayor valor lo presentó el HS 5, así como para el contenido individual de cianidina y delphinidina, con valores de 4.408, 3.535 y 873 mg / 100 g de extracto seco. Otros extractos de la misma región, Jalisco, mostraron elevados niveles de estos compuestos, en particular los extractos HS 6 y HS 7. Por el contrario, en los extractos 16 y 18 de Guerrero, 23 de Jalisco y 25 de Nayarit no se detectaron cianidina, delphinidina ni antocianinas. Estos extractos, a excepción del HS 25 fueron obtenidos a partir de variedades de HS blancas, debido a que es por todos conocido que las antocianinas son



responsables del color rojo de esta planta, es de esperar que no se detecten este tipo de compuestos en estos extractos. Al contrario de lo que ocurría para el contenido total de polifenoles y flavonoides, se ha encontrado que existe una correlación entre la región geográfica de Méjico de donde proceden los extractos y el contenido individual de cianidina, delphinidina y de antocianinas totales. Las mayores concentraciones de estos compuestos las mostraron extractos recolectados en Jalisco, específicamente los extractos HS 3, 5, 6 y 7, seguidos de los extractos HS 4, 8, 12 y 21 de Colima. Los niveles más bajos de estos compuestos fueron encontrados como ya se ha comentado previamente en las variedades blancas, independientemente de la región geográfica, excepto para el HS 28.

4.3 Capacidad antioxidante de las distintas variedades de *Hibiscus sabdariffa*.

La capacidad antioxidante de los extractos de HS (**Tabla 3**) fue determinada mediante el método DPPH. Los valores obtenidos oscilan en un rango entre 27.4 ± 0.3 y 112 ± 8 μmol de trolox / g extracto seco. La menos capacidad antioxidante la mostró el extracto HS 23, una variedad blanca de Jalisco, seguida por el extracto HS 21 de Colima. Por el contrario, las



mayores actividades antioxidantes las mostró el extracto HS 3 de Jalisco, seguido de los extractos HS 8 de Colima e HS 1 de Jalisco, a pesar de que entre ellos no muestran diferencias significativas. Al igual que ocurre con el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides, el origen geográfico de los extractos parece no afectar a la capacidad antioxidante mostrada por los extractos.

4.4 Actividad antimicrobiana de las distintas variedades de *Hibiscus sabdariffa*.

Los resultados de los ensayos de actividad antimicrobiana pusieron de manifiesto que todos los extractos etanólicos de *Hibiscus sabdariffa* presentan un gran potencial como agentes antimicrobianos frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas. Algunos de estos extractos presentan una actividad antimicrobiana similar a la de algunos los antibióticos, usados como control positivo (**Tabla 4**). A pesar de estos resultados, la respuesta a los extractos de algunos de los microorganismos patógenos estudiados fue diferente. Los extractos de esta planta mostraron poseer una mayor actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* y *M. Luteus* que frente a *E. coli* y *S. enteritidis* (**Figura 2**). Estos resultados están en concordancia con otros estudios



RESULTADOS

disponibles en bibliografía en los que se ha puesto de manifiesto que los efectos inhibitorios de los compuestos fenólicos de extractos naturales son más potentes frente a bacterias Gram positivas que Gram negativas.



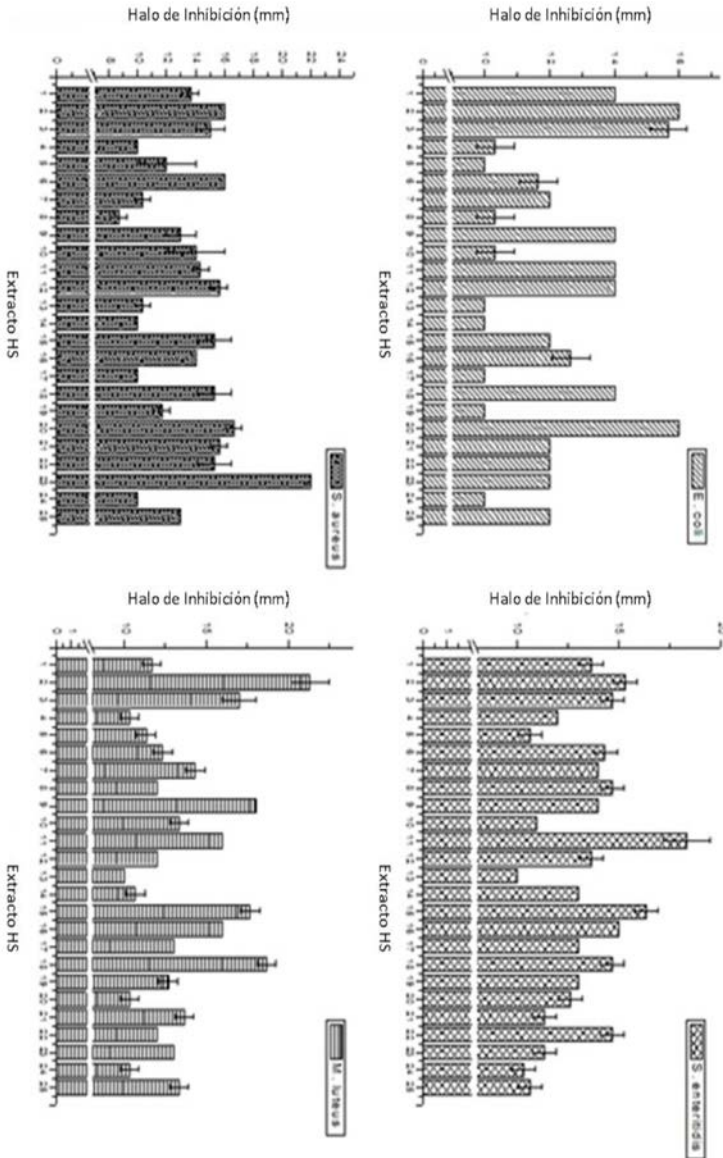


Fig. 2 Halos de inhibición de los distintos extractos de HS frente a *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. aureus* y *M. luteus*



Tabla 4 Actividad antibacteriana de los extractos de HS frente a *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. aureus* y *M. luteus*.

Extracto HS	Variedad	Origen	Halo de inhibición (mm)			
			<i>E. coli</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>
HS 1	Americana	Jalisco	14 ± 0 ^b	13.7 ± 0.6 ^{def}	13.7 ± 0.6 ^{cdef}	12.7 ± 0.6 ^{ghi}
HS 2	Tepecatepec	Michoacán	16 ± 0 ^a	15.3 ± 0.6 ^{bc}	16.0 ± 0 ^{bc}	21 ± 1 ^a
HS 3	Diamante	Jalisco	15.7 ± 0.6 ^a	14.7 ± 0.6 ^{cd}	15 ± 1 ^{bcd}	17 ± 1 ^{bc}
HS 4	Colima	Colima	10.3 ± 0.6 ^e	12 ± 0 ^{ghi}	10 ± 0 ^{gh}	10.3 ± 0.6 ⁱ
HS 5	Tempranilla	Jalisco	10 ± 0 ^e	10.7 ± 0.6 ^{ij}	12 ± 2 ^e	11.3 ± 0.6 ^{ghi}
HS 6	Talpa	Jalisco	11.7 ± 0.6 ^d	14.3 ± 0.6 ^{cde}	16 ± 0 ^{bc}	12.3 ± 0.6 ^{fgh}
HS 7	Violenta	Jalisco	12 ± 0 ^{cd}	14 ± 0 ^{cdef}	10.3 ± 0.6 ^{gh}	14.3 ± 0.6 ^{de}
HS 8	Quesería	Colima	10.3 ± 0.6 ^e	14.7 ± 0.6 ^{cd}	8.7 ± 0.6 ^h	12 ± 0 ^{fghi}
HS 9	Criolla Tala	Jalisco	14 ± 0 ^b	14 ± 0 ^{cdef}	13 ± 1 ^{cdef}	18 ± 0 ^b
HS 10	Tecoman	Colima	10.3 ± 0.6 ^e	11 ± 0 ^{ij}	14 ± 2 ^{cdef}	13.3 ± 0.6 ^{ef}
HS 11	El Bordo	Colima	14 ± 0 ^b	18.0 ± 1 ^a	14.3 ± 0.6 ^{bcde}	16 ± 0 ^{cd}
HS 12	Tempranilla	Colima	14 ± 0 ^b	13.7 ± 0.6 ^{def}	15.7 ± 0.6 ^{bc}	12 ± 0 ^{fghi}
HS 13	Sudan	Colima	10 ± 0 ^e	10 ± 0 ^j	10.3 ± 0.6 ^{gh}	10 ± 0 ⁱ
HS 14	Media Luna	Colima	10 ± 0 ^e	13 ± 0 ^{efg}	10 ± 0 ^{gh}	10.7 ± 0.6 ^{hi}
HS 15	Pisila/Colima	Colima	12 ± 0 ^{cd}	16.3 ± 0.6 ^b	15 ± 1 ^{bcd}	17.7 ± 0.6 ^{bc}
HS 16	JB 00001 SM	Guerrero	12.7 ± 0.6 ^c	15 ± 0 ^{bc}	14 ± 0 ^{cdef}	16 ± 0 ^{cd}
HS 17	JCP 0001 T	Guerrero	10 ± 0 ^e	13 ± 0 ^{efg}	10 ± 0 ^{gh}	13 ± 0 ^{efg}
HS 18	Mutante Blanca	Guerrero	14 ± 0 ^b	14.7 ± 0.6 ^c	15 ± 1 ^{bcd}	18.7 ± 0.6 ^b
HS 19	JJ 00001 SM	Guerrero	10 ± 0 ^e	13 ± 0 ^{efg}	11.7 ± 0.6 ^{fg}	12.7 ± 0.6 ^{fg}
HS 20	JR 00001 C	Guerrero	16 ± 0 ^a	12.7 ± 0.6 ^{fgh}	16.7 ± 0.6 ^b	10.3 ± 0.6 ⁱ
HS 21	Americana	Colima	12 ± 0 ^{cd}	11.3 ± 0.6 ^{hij}	15.7 ± 0.6 ^{bc}	13.7 ± 0.6 ^e
HS 22	Puerta de Anzar	Colima	12 ± 0 ^{cd}	14.7 ± 0.6 ^c	15 ± 1 ^{bcd}	12 ± 0 ^{fghi}



Tabla 4 Actividad antibacteriana de los extractos de HS frente a *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. aureus* y *M. luteus*.

HS 23	Variedad Blanca	Jalisco	12 ± 0 ^{cd}	11.3 ± 0.6 ^{hij}	22 ± 0 ^a	13 ± 0 ^{efg}
HS 24	Real	Veracruz	10 ± 0 ^e	10.3 ± 0.6 ^j	10 ± 0 ^{gh}	10.3 ± 0.6 ⁱ
HS 25	Reyna	Nayarit	12 ± 0 ^{cd}	10.7 ± 0.6 ^{ij}	13 ± 0 ^{def}	13.3 ± 0.6 ^{ef}
		Clindamicina	0	22	0	33
		Eritromicina	0	24	0	35
Antibiótico		Gentamicina	20	16	14	23
		Tetraciclina	24	28	13	28
		Vancomicina	2	18	0	21



354 Como puede observarse en la **Figura 2** y en la **Tabla 4**, la bacteria *S. aureus* fue la que se vio más afectada por los extractos, presentando halos de inhibición de entre 16-22 mm, seguido por las otras bacterias, *S. enteritidis* y *M. luteus*, con zonas de inhibición que oscilan entre 10 a 18 mm y de 10 a 21 mm respectivamente, y finalmente por *E. coli*, que fue la bacteria menos sensible con halos de inhibición de entre 10-16 mm. Es importante destacar que algunos de los extractos etanólicos presentaron una capacidad antibacteriana similar a la que mostraron antibióticos de amplio espectro como la gentamicina. Por tanto estos resultados sugieren que dichos extractos de *Hibiscus sabdariffa* podrían ser usados como antibióticos de origen natural frente a una amplia variedad de microorganismos.

Por otro lado, también podemos concluir que estos extractos etanólicos de *Hibiscus sabdariffa* presentan una mayor acción antimicrobiana que otras plantas, como por ejemplo *E. officinalis*, la cual presenta halos de inhibición que oscilan entre 11-16 mm frente a cinco bacterias diferentes, aunque para algunas de ellas no presentó ningún efecto [281]. De igual manera, estos extractos también han mostrado un mayor poder antibacteriano comparado con extractos etanólicos de *P. emblica* y *A. sativum*, de acuerdo a



los resultados obtenidos por [282], quienes ensayaron esta actividad frente a ocho bacterias Gram positivas y Gram negativas. Otros estudios han mostrado que los extractos de las hojas de *M. arvensis* presentan una actividad similar a la que presentan los extractos de *Hibiscus sabdariffa*, aunque la concentración de *M. arvensis* era mucho mayor [283].

Puede observarse que uno de los extractos etanólicos de HS presentan una gran efecto frente a todas las bacterias estudiadas, dicho extracto es de la variedad Tepalcatepec. Los ensayos pusieron de manifiesto que esta variedad poseía un elevado contenido de compuestos fenólicos (**Tabla 3**), a pesar de que no presentaba un elevado valor de capacidad antioxidante ni de antocianinas. Es presumible que este elevado contenido en polifenoles sea responsable de la actividad exhibida por este extracto [284].

355

A la luz de estos resultados, podemos decir que los extractos más potentes en la inhibición del crecimiento bacteriano fueron HS 2 y HS 20 para *E. coli*, HS 11 para *S. enteritidis*, HS 23 para *S. aureus*, y finalmente HS 2 para *M. luteus*. Tres de estos extractos con mayor capacidad antimicrobiana pertenecen a variedades rojas de la planta, mientras que sólo el HS 23 es una variedad blanca. Si nos centramos en el origen geográfico de los extractos, los cuatro



RESULTADOS

pertencen a diferentes zonas geográficas de Méjico, HS 2 fue recolectado en Michoacán, HS 11 en Colima, HS 20 en Guerrero e HS 23 en Jalisco.

Para *E. coli*, los extractos HS 2, 20 y 3 son significativamente más efectivos frente al crecimiento bacteriano, presentando halos de inhibición de 16 mm en los dos primeros extractos y de 15.7 mm para el último; seguidos de los extractos 1, 9, 11, 12 y 18, con halos de inhibición de 16 mm en todos los casos. Estos resultados son similares a los encontrados por [285] para la bacteria Gram negativa *H. pylori* usando un extracto etanólico de *Terminalia chebula*.

356 Por otro lado nos encontramos que el HS 11 inhibe en gran extensión el crecimiento de *S. enteritidis*, presentando un halo de inhibición de 18 mm. El resto de extractos mostraron un actividad antimicrobiana significativamente menor frente a este microorganismo con respecto al HS 11, siendo los extractos HS 15, 2 y 16 con halos de inhibición de 16.3, 15.3 y 16 mm respectivamente los que siguen al extracto HS 11 en cuanto a poder antibacteriano.

En el caso de los microorganismos Gram positivos, concretamente para *S. aureus*, el HS 23 demostró una significativa actividad inhibitoria del crecimiento con halos de 22 mm, seguido de HS 20 (con halo de inhibición de 16.7



mm), e HS 2 y 6 (ambos con halos de inhibición de 16 mm). Estos extractos fueron cultivados en Jalisco, Guerrero y Michoacán. En el estudio de la inhibición de *M. luteus*, el HS 2 procedente de Michoacán fue el que mostró mayor capacidad antibacteriana (halo de inhibición de 21 mm). Los extractos HS 18 de Guerrero (halo de inhibición 18.7 mm), HS 9 de Jalisco (halos de inhibición de 18 mm) e HS 15 de Colima (con 17.7 mm de halo de inhibición) también poseen una significativa actividad antimicrobiana frente a esta bacteria.

Como ocurría en el caso del contenido en polifenoles y flavonoides totales y en actividad antioxidante, la capacidad antimicrobiana no está relacionada con el origen geográfico de las plantas de HS. A pesar de esto ciertos extractos mostraron una potente actividad antimicrobiana frente a todas las bacterias estudiadas, como es el caso de HS 2 de Michoacán e HS 3 de Jalisco. Por el contrario, otros extractos sólo inhibieron el crecimiento bacteriano de algunos tipos de microorganismos, ejemplo de ello es el HS 23, una variedad blanca procedente de Jalisco que sólo mostró una actividad antibacteriana significativa frente a *S. aureus*. De la misma manera, el extracto HS 11 sólo mostró una potente actividad antibacteriana frente a *S. enteritidis*, aunque frente a *E. coli* y *M. luteus* mostró una inhibición del crecimiento algo menor.



RESULTADOS

Asimismo el extracto HS 20 sólo mostró una destacada actividad frente a la inhibición de *E. coli* y *S. aureus*; mientras que el extracto HS 15 sólo la mostró para *S. enteritidis* y el HS 18 frente a *M. luteus*.



Capítulo 5: Estudio de permeabilidad de un extracto enriquecido en compuestos fenólicos de *Hibiscus sabdariffa* libre y liposomado, y de distintos compuestos presentes en su composición.

5.1 Permeabilidad del extracto de *Hibiscus sabdariffa* enriquecido en compuestos fenólicos libre y liposomado.

Para el estudio de la permeabilidad del extracto de *Hibiscus sabdariffa* enriquecido en compuestos fenólicos, el primer paso fue realizar un análisis para estudiar su composición. Este extracto ya había sido caracterizado previamente por nuestro grupo de investigación [61], pero se necesitaba un nuevo perfil del mismo adquirido con la nueva instrumentación más sensible que iba a utilizarse para analizar las muestras recolectadas en el estudio.

359

El análisis del extracto de PEHS con esta nueva instrumentación reveló la presencia de 7 nuevos compuestos no identificados previamente, lo que sumó un total de 32 compuestos. El cromatograma de pico base del extracto se muestra en la **Figura 1**, y los compuestos identificados tentativamente se muestran en la **Tabla 1**.

Algunos de los nuevos compuestos identificados ya fueron detectados anteriormente, pero no pudieron identificarse. Gracias al uso de un analizador de masas UHR-



Qq-TOF, han podido identificarse los compuestos con tiempo de retención de 4.30 y 15.50 minutos. El primero corresponde a un m/z de 235, y fue identificado como ácido hibísico hidroxietiléster, y el segundo es un compuesto de m/z 381 y se corresponde con etilclorogenato. Ambos compuestos fueron identificados en los extractos de esta misma planta procedentes de Méjico analizados en el capítulo 4.

Además de estos compuestos otros cinco nuevos fueron detectados por primera vez en el extracto. Pudieron identificarse tentativamente como la quinona del ácido clorogénico (tiempo de retención 4.80 minutos), un nuevo isómero de ácido clorogénico (tiempo de retención 8.20 minutos), ácido hibísico hidroxietildimetiléster (tiempo de retención 9.70 minutos), ácido 2-O-trans-feruloilhidroxicítrico (tiempo de retención 12 minutos) y finalmente kaempferol (tiempo de retención 29.10 minutos).

El resto de compuestos ya fueron descritos previamente para el extracto. Se identificaron ácidos orgánicos como el ácido hidroxicítrico y el ácido hibísico y derivados como son el ácido 2-O-transcafeoilhidroxicítrico, el ácido 2-O-transferuloilhidroxicítrico, los ésteres dimetílico, hidroxietílico e hidroxietildimetílico del ácido hibísico, o el ácido cumaroilquínico. También se identificaron gran



cantidad de ácidos fenólicos y derivados, como son el ácido clorogénico, sus isómeros y sus derivados quinona y etilclorogenato, así como el metildigalato. Otros compuestos detectados fueron flavonoides y sus derivados glicosilados, como la quercetina y sus derivados glucósido, rutinósido y sambubiósido, kaempferol y sus derivados glucósido y sambubiósido, la miricetina y su derivado arabinogalactósido, así como la metilepigallocatequina. Otros compuestos encontrados también son las antocianinas delfinidina-3-sambubiósido y la cianidina-3-sambubiósido, además del compuesto nitrogenado N-feruloiltiramina.

A pesar de los esfuerzos realizados para conseguir la identificación de todos los compuestos detectados, para tres de ellos fue imposible conseguir dilucidar su identidad. Estos compuestos aparecen en la **Tabla 1** como UK, y corresponden a los compuestos de m/z 236, 385 y 457 con tiempos de retención 9.2, 13.1 y 17.7 minutos respectivamente. En futuros estudios se intentará esclarecer la identidad de estos compuestos.

361



Figura 1. BPC del extracto PEHS analizado por UPLC-ESI-UHR-Qq-TOF.

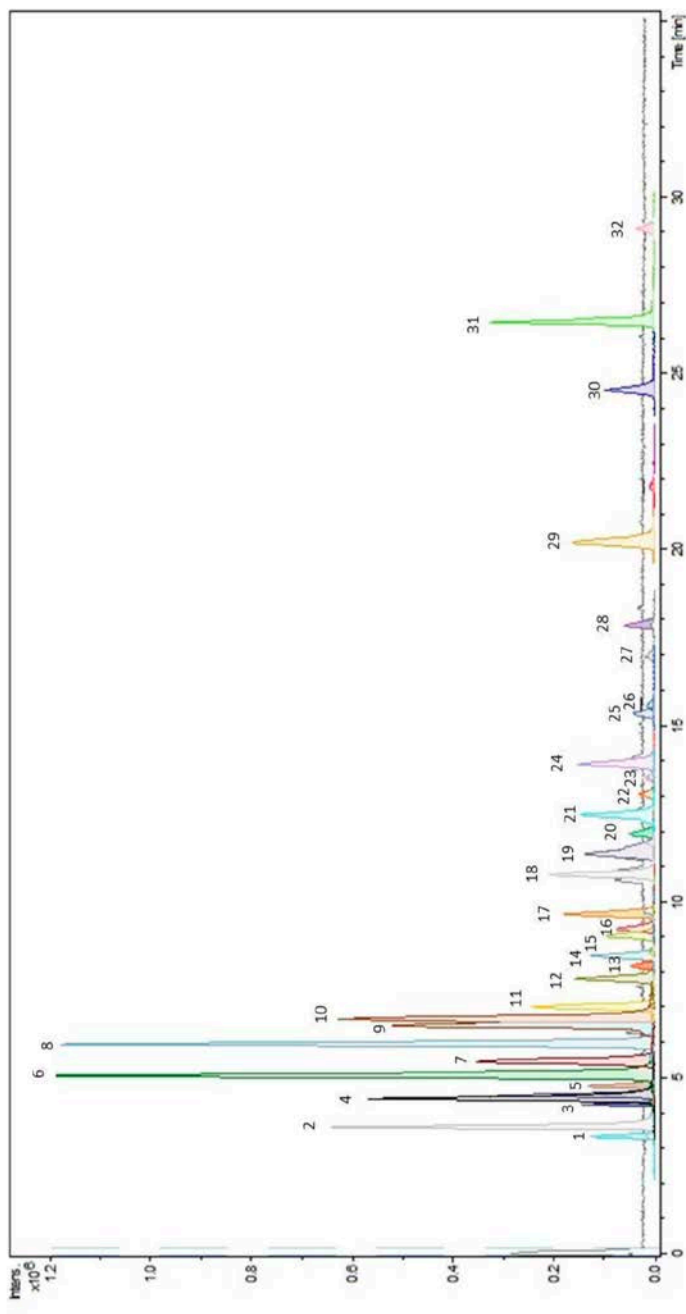


Tabla 1. Compuestos detectados en el extracto PEHS.

Pico	Tiempo retención	Fórmula Molecular	[M-H] ⁻	Compuesto
1	3.4	C ₆ H ₈ O ₈	207.0146	Ácido Hidroxicítrico
2	3.6	C ₆ H ₆ O ₇	189.0041	Ácido Hibísico
3	4.3	C ₈ H ₁₂ O ₈	235.0459	Ácido hibísico hidroxietilester
4	4.5	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₆	595.1305	Delfinidina-3-sambubiósido
5	4.8	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	315.0722	Ácido Clorogénico quinona
6	5.3	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0878	Ácido Neoclorogénico
7	5.5	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	579.1355	Cianidina-3-sambubiósido
8	6.0	C ₈ H ₁₀ O ₇	217.0354	Ácido hibísico dimetiléster
9	6.3	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0878	Ácido Clorogénico
10	6.7	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0878	Ácido Criptoclorogénico
11	7.1	C ₁₅ H ₁₂ O ₉	335.0409	Metildigalato
12	7.9	C ₁₅ H ₁₄ O ₁₁	369.0463	Ácido 2-O-transcafeoilhidroxicítrico
13	8.2	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0878	Ácido Clorogénico Isómero (ácido 1-O-cafeoilquinico)
14	8.5	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₇	611.1254	Miricetina-3-arabinogalactósido
15	9.0	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	337.0929	Ácido Cumaroilquinico
16	9.2	C ₁₁ H ₁₁ NO ₅	236.0564	UK
17	9.7	C ₁₀ H ₁₆ O ₈	263.0772	Ácido hibísico hidroxietildimetilester
18	10.7	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₆	595.1305	Quercetina-3-sambubiósido
19	11.3	C ₁₆ H ₁₆ O ₈	335.0772	Ácido 5-O-Cafeoilshikímico
20	12.0	C ₁₀ H ₁₆ O ₈	263.0772	Ácido 2-O-transferuloilhidroxicítrico
21	12.3	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.1461	Quercetina-3-rutinósido
22	13.1	C ₁₇ H ₂₂ O ₁₀	385.1140	UK
23	13.6	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	579.1355	Kaempferol-3-O-sambubiósido
24	14.0	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.0882	Quercetina-3-glucósido
25	15.3	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.1512	Kaempferol-3-O-rutinósido
26	15.5	C ₁₈ H ₂₂ O ₉	381.1191	Etilclorogenato
27	17.1	C ₁₆ H ₁₆ O ₇	319.0823	Metilepigalocatequina
28	17.7	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₁	457.1715	UK
29	20.3	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	317.0303	Miricetina
30	24.5	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	312.1241	N-feruloiltiramina
31	26.4	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.0354	Quercetina
32	29.1	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0404	Kaempferol



Una vez determinada la composición del extracto se llevaron a cabo los estudios de permeabilidad tal y como se detalla en apartados anteriores. Se estudió la permeabilidad del extracto libre y liposomado en un intento por esclarecer si la formulación liposomada aumentaba la permeabilidad de los compuestos polares del extracto PEHS a través de la monocapa de células Caco-2 que simulan la barrera intestinal.

364 Con ambos extractos, libre y liposomado, se detectaron todos los compuestos identificados previamente en la muestra tomada en la cámara donora (cámara apical o basolateral dependiendo del caso) al comienzo del ensayo. Sin embargo en las muestras tomadas en la cámara receptora tanto en el estudio de la permeabilidad en sentido apical-basolateral como basolateral-apical para ambos extractos sólo fuimos capaces de detectar unos pocos compuestos, y todos ellos se encontraban por debajo de los límites de cuantificación. Esto concuerda con los resultados de los análisis de las muestras tomadas al final del ensayo en la cámara donora, donde todos los compuestos del extracto seguían presentes. Los compuestos detectados en cada caso se resumen en la Tabla 2.

Estos compuestos detectados para el extracto PEHS libre en el sentido apical-basolateral fueron los ácidos



clorogénico, neoclorogénico, criptoclorogénico y 5-O-cafeoilshikímico, n-feruloiltiramina y quercetina. En el sentido basolateral-apical, además de estos compuestos también se detectaron metildigalato, ácido cumaroilquínico y metilepigalocatequina.

A pesar de que con la formulación de un extracto liposomado se perseguía aumentar la permeabilidad de los compuestos del extracto, los resultados pusieron de manifiesto que no sólo no se aumentaba el número y concentración de compuestos que traspasaban la monocapa celular, sino que se disminuía. En el sentido apical-basolateral sólo se detectaron los ácidos neo y criptoclorogénico, así como la n-feruloiltiramina. A pesar de que en el sentido basolateral-apical se detectaron algunos compuestos más, algo que ya ocurría con el extracto libre, el número de compuestos y la cantidad permeabilizada era menor con respecto al extracto libre, detectándose únicamente los ácido neoclorogénico, clorogénico, criptoclorogénico y 5-O-cafeoilshikímico, el metildigalato y la N-feruloiltiramina.

365

En cuanto a las muestras de la membrana de la monocapa celular recolectadas al final de los ensayos, únicamente se detectaron quercetina en el sentido apical-basolateral con el extracto libre, y el éster dimetílico del ácido



hibísico y el ácido cumaroilquínico cuando se estudiaba la permeabilidad del extracto liposomado, aunque este último sólo se detectó en el sentido basolateral-apical.

Por otro lado, el análisis del contenido citosólico de las células de la monacapa sólo reveló al igual que las membranas la presencia de una pequeña cantidad de quercetina cuando se estudió la permeabilidad del extracto libre en el sentido apical-basolateral, y de ácido criptoclorogénico en el caso del extracto liposomado en el sentido basolateral-apical. Sin embargo los compuestos detectados en el citoplasma celular para el estudio de la permeabilidad del extracto liposomado en sentido basolateral-apical fueron más numerosos, identificándose un total de siete compuestos: ácido hibísico y su éster dimetílico, los ácidos neoclorogénico, clorogénico y criptoclorogénico, metildigalato y quercetina.



Tabla 2. Compuestos detectados en el los ensayos de permeabilidad de los extractos PEHS libre y liposomado en la cámara receptora.

Extracto	PEHS Libre						PEHS Liposomado					
	Apical-Basolateral			Basolateral-Apical			Apical-Basolateral			Basolateral-Apical		
Permeabilidad	30	60	90	120	30	60	90	120	30	60	90	120
Tiempo (min)												
Ácido Hidroxicitrico												
Ácido Hibísico												
Ácido hibísico hidroxietiléster												
Definidina-3-sambubiosido												
Ácido Clorogénico quinona												
Ácido Neoclorogénico	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X
Cianidina-3-sambubiosido												
Ácido hibísico dimetiléster												
Ácido Clorogénico		X	X	X	X	X	X			X	X	X
Ácido Criptoclorogénico		X	X	X	X	X	X			X	X	X
Metilgalato											X	X
Ácido 2-O-transcafeoilhidroxicitrico												
Ácido Clorogénico Isómero (ácido 1-O-cafeoilquinico)												
Miricetina-3-arabinogalactosido												
Ácido Cumaroliquínico												
Ácido hibísico hidroxietildimetiléster						X		X				
Quercetina-3-sambubiosido												
Ácido 5-O-Cafeoilshikímico		X			X	X	X	X		X	X	X
Ácido 2-O-transferulilhidroxicitrico												
Quercetina-3-rutínosido												
Kaempferol-3-O-sambubiosido												
Quercetina-3-glucósido												



Tanto en el estudio del extracto libre como liposomado sólo unos pocos compuestos son capaces de traspasar la monocapa celular, pasando de la cámara donora a la receptora. Este hecho puede estar justificado en parte por la composición tan compleja del extracto y la presencia de muchos de estos compuestos en concentración elevada, lo que puede conducir a la saturación de los mecanismos de transporte de estos compuestos fenólicos a través de la monocapa celular.

Dado que los compuestos detectados en las muestras de la cámara receptora en todos los ensayos se encontraban por debajo de los límites de cuantificación no se pudieron estimar las concentraciones a las cuales se encontraban los compuestos a los distintos tiempos de recolección, siendo imposible por tanto calcular la permeabilidad en ambos sentidos y determinar así el tipo de transporte de cada compuesto (difusión pasiva, transporte mediante absorción activa o transporte por secreción).

369

Sin embargo, a pesar de que no se pudo determinar el tipo de transporte de los compuestos fenólicos presentes en el extracto, los resultados derivados de estos ensayos son útiles para conocer los compuestos presentes en esta matriz que son absorbidos por la monocapa celular, que simula la



barrera intestinal, algo que puede servirnos como una primera aproximación para conocer los compuestos que pueden ser metabolizados por el organismo y que son los que alcanzarán los tejidos diana y ejerzan la acción mostrada por el extracto. Además también se puso de manifiesto que la formulación del extracto liposomado no es exitosa en cuando al aumento de la permeabilidad de los compuestos polares, traspasando mayor número de compuestos y en mayor extensión cuando el extracto no se encontraba liposomado.

5.2 Permeabilidad de los compuestos puros de *Hibiscus sabdariffa*.

370

Dado que los resultados derivados del estudio de la permeabilidad del extracto completo de *Hibiscus sabdariffa* enriquecido en compuestos fenólicos nos hace pensar en la posibilidad de que los mecanismos de transporte podían encontrarse saturados debido a la presencia de un gran número de compuestos, algunos de ellos en gran cantidad, llegamos a la conclusión de que el siguiente paso en la investigación sería estudiar la permeabilidad de compuestos individuales. Debido a que el extracto presenta una composición bastante compleja, con más de 32 compuestos detectados, el estudio individual de la permeabilidad de cada



uno de ellos es una tarea ardua y laboriosa. Es por esto, que se decidió seleccionar sólo algunos de los compuestos presentes en su composición, con el fin de obtener una primera aproximación de la permeabilidad de los compuestos de esta matriz. La selección de los mismos se realizó en base a los resultados del estudio de la permeabilidad del extracto completo, así como de resultados obtenidos en otros estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación, algunos de ellos que forman parte de la presente memoria.

Se decidió por tanto seleccionar varios compuestos encontrados en los ensayos de permeabilidad que traspasaban la monocapa y de los que se disponían de patrones comerciales, en concreto la N-feruloiltiramina y la quercetina. Además de estos compuestos, se decidió estudiar la permeabilidad de dos derivados de la quercetina, la quercetina-3-glucósido, también presente en el extracto, y la quercetina-3-glucurónido, un compuesto identificado como uno de los metabolitos mayoritarios presentes en plasma de rata tras la ingesta forzada del mismo. La razón por la cual se seleccionó también el derivado glucosado de la quercetina, radica en el hecho de que otros estudios han puesto de manifiesto que este derivado presenta una mejor absorción que la quercetina aglicona, por lo que sería interesante



estudiar la permeabilidad de este compuesto individual sin la presencia de otros que podrían interferir en los mecanismos de absorción [286, 287]. También es interesante estudiar la permeabilidad de la quercetina-3-glucurónido, un compuesto derivado de la metabolización de fase II de quercetina y sus derivados glucosados, ya que se conoce que una vez que los metabolitos son generados en los enterocitos pueden pasar de vuelta al lumen del intestino delgado por acción de los transportadores ABC (complejo de unión a ATP), aunque lo más común es que pasen al torrente sanguíneo.

372 Las muestras de medio de cultivo de la cámara receptora, los contenidos citoplasmáticos y la membrana de la monocapa celular se analizaron según se detalla en los apartados anteriores. El contenido de quercetina, quercetina-3-glucósido, quercetina-3-glucurónido y n-feruloiltiramina de los distintos ensayos se cuantificaron mediante el uso de curvas de calibrado preparadas con los correspondientes patrones.

Las curvas de calibración de dichos patrones fueron preparadas usando apigenina en una concentración de 10 ppm como patrón interno. Las curvas de calibración mostraron buena linealidad entre distintos rangos de concentración dependiendo del analito estudiado (**Tabla 3**).



Se calcularon los límites de detección (LODs) y los límites de cuantificación (LOQs) de los compuestos individuales utilizando disoluciones patrón, calculándose como $S/N = 3$ y $S/N = 10$, respectivamente, donde S/N es la relación señal/ruido.

Tabla 3. Información de calibración, patrones, LOD, LOQ, Rango de calibración, curva de calibrado y r^2 .

Analito	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	Rango de calibración ($\mu\text{g/ml}$)	Curva de Calibrado	r^2
Quercetina	0.05	0.17	0.17-20	$y = 13.372 x - 0.0038$	0.998
Quercetina-3-glucósido	0.07	0.23	0.23-55	$y = 2.5235 x + 0.0113$	0.988
Quercetina-3-glucurónido	0.03	0.11	0.2-45	$y = 11.545 x + 0.0087$	0.992
N-feruloiltiramina	0.014	0.048	0.2-40	$y = 14.995 x + 0.1088$	0.990

La concentración de los compuestos identificados en las muestras fue determinada usando el área corregida de cada compuesto individual (3 replicados) e interpolando en la curva de calibración correspondiente. Los contenidos de los compuestos monitorizados encontrados en la cámara



receptora a los distintos tiempos en los que se recogieron muestras se detallan en la **Tabla 4**.

En algunas muestras no se detectaron los compuestos para los que se estudiaba la permeabilidad, como es el caso de las muestras de quercetina-3-glucurónido tomadas a los 30, 60 y 90 minutos cuando se ensayaba la permeabilidad en el sentido apical-basolateral. En otros casos si se detectaba la presencia de estos compuestos pero su contenido era inferior al límite de cuantificación encontrado para dicho compuesto.

La evolución encontrada para cada compuesto en sentido apical-basolateral y basolateral-apical se recoge en los gráficos de la **Figura 2**.



Tabla 4. Concentración (ppm) de los compuestos en los ensayos de permeabilidad en la cámara receptora.

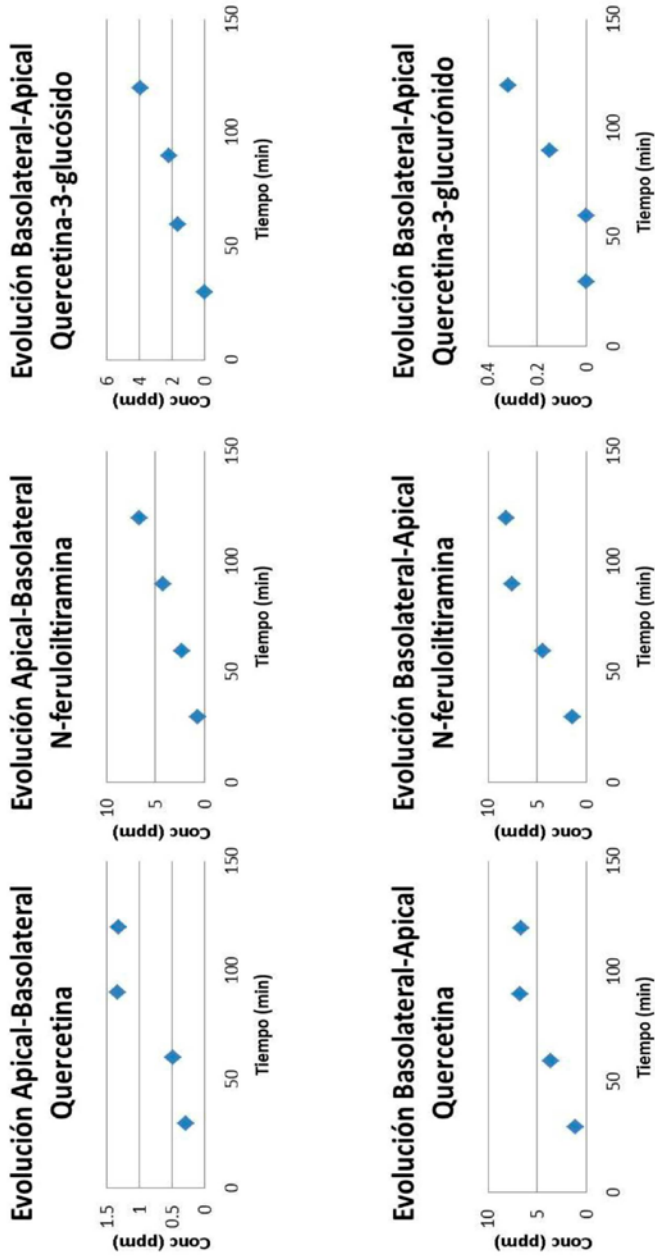
Permeabilidad	Apical-Basolateral				Basolateral-Apical			
	30	60	90	120	30	60	90	120
Quercetina	0.28 ± 0.02	0.49 ± 0.03	1.33 ± 0.02	1.32 ± 0.01	1.1 ± 0.4	3.6 ± 0.5	6.7 ± 0.2	6.6 ± 0.3
Quercetina-3-glucósido	< LQ	< LQ	< LQ	0.47 ± 0.03	< LQ	1.6 ± 0.2	2.2 ± 0.4	3.91 ± 0.05
Quercetina-3-glucurónido	ND	ND	ND	< LQ	< LQ	< LQ	0.150 ± 0.006	0.32 ± 0.06
N-Ferulolitramina	0.69 ± 0.02	2.3 ± 0.2	4.2 ± 0.5	6.6 ± 0.8	1.35 ± 0.04	4.4 ± 0.5	7.6 ± 0.4	8.2 ± 0.3

ND: No detectado.

< LQ: Detectado, pero inferior al límite de cuantificación.



Figura 2. Evolución de la concentración de los compuestos en los ensayos de permeabilidad en la cámara receptora.



Los resultados muestran que para todos los patrones la permeabilidad basolateral-apical es mayor que la permeabilidad apical-basolateral. En el caso de los compuestos quercetina-3-glucósido y quercetina-3-glucurónido, dicha permeabilidad se da en tan poca extensión, que la cantidad de compuesto es indetectable en la cámara basolateral en el caso del glucurónido o se encuentra por debajo del límite de cuantificación para el derivado glucosado.

Para la quercetina, el máximo de concentración se alcanza trascurridos 90 minutos del ensayo, tanto en el sentido apical-basolateral como basolateral-apical, aunque la permeabilidad basolateral-apical es cinco veces superior a la encontrada en el sentido inverso. Para el resto de compuestos, las concentraciones máximas se encontraron al final del ensayo, tras 120 minutos. Estos resultados ponen de manifiesto una absorción intestinal más rápida de la quercetina que de sus derivados glucurónido y glucosado.

377

En el caso de la quercetina y n-feruloiltiramina, los resultados encontrados sugieren la existencia de absorción de estos compuestos a través de la membrana intestinal mediante difusión pasiva. Sin embargo en el caso de la



quercetina-3-glucósido y glucurónido dicha absorción se da en pequeña extensión.

Por el contrario la mayor permeabilidad en el sentido basolateral-apical encontrada para todos los patrones, indica la existencia de un mecanismo de transporte por secreción hacia el lumen intestinal de dichos compuestos, lo que origina una reducción de la absorción neta de los mismos.

378 Estos resultados están en concordancia con datos publicados en bibliografía para la quercetina y distintos derivados glucosados, donde se observa que la permeabilidad de la quercetina es mayor que la de estos derivados. Además también se ha reportado previamente que la permeabilidad en el sentido basolateral-apical es mayor que en sentido inverso. [288, 289]. En cuanto al compuesto nitrogenado n-feruloiltiramina, este es el primer ensayo disponible que estudia la permeabilidad a través de una monocapa de células Caco-2.

A pesar de que existen evidencias que indican que la quercetina y la quercetina-3-glucósido es absorbida por células Caco-2, en los análisis de las muestras citoplasmáticas y de membrana, en ninguno de los ensayos, se detectaron los compuestos monitorizados, lo que indica que dichos compuestos no son absorbidos por dichas células [290].



Capítulo 6: Estudio de absorción de quercetina y quercetina-3-glucurónido en células pre-adipocíticas 3T3-L1.

En este capítulo se estudia la absorción en células pre-adipocíticas 3T3-L1 de quercetina y quercetina-3-glucurónido. En la actualidad el estudio de la absorción de compuestos fenólicos y sus correspondientes metabolitos por parte de distintas líneas celulares, así como sus posteriores transformaciones mediante interacciones celulares, es un campo de estudio en creciente expansión debido al reciente concepto de que los flavonoides así como otros compuestos fenólicos ejercen un importante papel como moduladores de cascadas de señalización vitales para la funcionalidad celular [291]. El interés que tiene el estudio de estos compuestos fenólicos en particular, quercetina y quercetina-3-glucurónido, radica en trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación sobre un extracto de *Hibiscus sabdariffa* enriquecido en compuestos fenólicos, entre los que se encuentra la quercetina, objeto de estudio de otros capítulos de la presente memoria.

379

En uno de estos trabajos se puso de manifiesto que dicho extracto inhibió sustancialmente la adipogénesis



disminuyendo la acumulación de triglicéridos en adipocitos maduros e hipertróficos resistentes a insulina [61]. El extracto también mostró una notable acción antioxidante y antiinflamatoria, ambos efectos destacables en el tratamiento de las alteraciones metabólicas relacionadas en este proceso de adipogénesis, ya que se conoce que la acumulación excesiva de triglicéridos en adipocitos produce un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) que desencadena el proceso inflamatorio [292]. Además este extracto resultó ser particularmente efectivo en la inhibición de la secreción de leptina y MCP-1, adipokinas importantes que regulan la migración de macrófagos al tejido adiposo y al metabolismo sistémico global [293]. Esta inhibición en la secreción de MCP-1 también se había observado previamente tras la administración de un extracto acuoso de esta planta en humanos [44].

En un intento por esclarecer qué compuestos o metabolitos derivados de este extracto eran responsables de los efectos beneficiosos que éste presenta, se llevó a cabo un estudio de biodisponibilidad tras la administración de este extracto en ratas. Presumiblemente, tras el metabolismo de los compuestos fenólicos por parte de la microbiota intestinal, serán los metabolitos generados presentes en el



torrente sanguíneo los que alcancen los tejidos diana y ejerzan su acción. En este estudio algunos de los principales metabolitos encontradas en el plasma tras la administración del extracto fueron la quercetina y sus derivados, entre los que destaca la quercetina-glucurónido.

Es por esto que es de especial interés estudiar si se produce por parte de los adipocitos la absorción de estos compuestos, en concreto de la quercetina y la quercetina-glucurónido, ambos metabolitos encontrados en plasma tras la ingesta del extracto de *Hibiscus sabdariffa*, y determinar el contenido intracelular de estos compuestos fenólicos presentes a diferentes tiempos de incubación (3, 6, 12, 18 h) en células adipocíticas. Si es así presumiblemente estos compuestos serán responsables de algunos de los efectos que ha mostrado el extracto de esta planta en adipocitos.

381

Para conseguir tal fin, las muestras de citoplasma recolectadas y tratadas como se describe en apartados anteriores, fueron analizadas mediante HPLC-ESI-TOF, ya que dado que el contenido de los analitos estudiados en estas muestras biológicas se presumía bajo se requería gran sensibilidad. Las curvas de calibración de quercetina y quercetina-3-glucurónido fueron preparadas usando naringenina en una concentración de 30 ppm como patrón



interno. Las curvas de calibración mostraron buena linealidad entre distintos rangos de concentración dependiendo del analito estudiado (**Tabla 1**). Se calcularon los límites de detección (LODs) y los límites de cuantificación (LOQs) de los compuestos individuales utilizando disoluciones patrón, calculándose como $S/N = 3$ y $S/N = 10$, respectivamente, donde S/N es la relación señal/ruido. La concentración de los compuestos en las muestras fue determinada utilizando el área corregida de cada compuesto individual (3 réplicas) e interpolando en la curva de calibración correspondiente.

Tabla 1. Información de calibración, patrones, LOD, LOQ, Rango de calibración, curva de calibrado y r^2 .

382

Analito	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	Rango de calibración ($\mu\text{g/ml}$)	Curva de Calibrado	r^2
Quercetina	0.004	0.012	0.1 - 45	$y = 3.5734 x + 0.0035$	0.997
Quercetina- 3- Glucurónido	0.004	0.012	0.05 - 40	$y = 4.2045 x + 0.0041$	0.996

Se analizaron las muestras de citosol, en las muestras control no se detectaron quercetina ni quercetina-3-glucurónido, mientras que en el resto de muestras en ambos ensayos se observó la absorción de quercetina y quercetina-3-glucurónido por parte de los adipocitos. Además también se



detectó la presencia de quercetina-3-glucurónido como metabolito cuando se monitorizaba la absorción de quercetina, y de quercetina cuando el compuesto estudiado era la quercetina-3-glucuronido. En la siguiente tabla se muestran los resultados cuantitativos de ambos ensayos, donde puede observarse no sólo la absorción de estos dos compuestos sino también su respectiva aparición como metabolito en el citoplasma de estas células adipocíticas.

Tabla 2. Información cuantitativa de la absorción de quercetina y quercetina-3-glucurónido en células adipocíticas 3T3-L1.

Compuesto ensayado		Quercetina		Quercetina-3-glucurónido	
Tiempo de incubación (h)	Quercetina (µg/ml)	Quercetina-3-glucurónido (µg/ml)	Quercetina-3-glucurónido (µg/ml)	Quercetina (µg/ml)	
	Control	ND	ND	ND	ND
3	38.4 ± 0.6	0.8 ± 0.1	0.54 ± 0.04	0.5 ± 0.1	
6	7.0 ± 0.2	1.63 ± 0.05	1.00 ± 0.10	0.28 ± 0.04	
12	3.6 ± 0.2	0.3 ± 0.1	2.0 ± 0.1	0.50 ± 0.02	
18	0.4 ± 0.1	0.11 ± 0.01	2.42 ± 0.03	0.52 ± 0.06	

En cuanto a la absorción de estos compuestos, en ambos casos puede observarse que presentan un comportamiento dependiente del tiempo, aunque ambos compuestos alcanzan su concentración máxima en el



citoplasma a distintos tiempos de incubación. Mientras que la quercetina alcanza su máximo trascurridas 3 horas de incubación ($38.4 \pm 0.6 \mu\text{g/ml}$), la absorción de quercetina-3-glucurónido es más lenta, y la concentración máxima es detectada al final del ensayo, tras 18 horas de incubación ($2.42 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$). Asimismo puede observarse que la absorción de quercetina se produce en mayor extensión que su respectiva forma glucuronizada, siendo su concentración máxima en el citoplasma casi veinte veces superior. Ambos comportamientos se han observado en otras líneas celulares, donde la absorción de derivados glucuronizados no se producía o lo hacía en menor extensión y más lentamente debido a la mayor polaridad que presentan estos derivados respecto a su aglicona, lo cual dificulta su absorción celular [291, 294].

De estos resultados puede concluirse que la eliminación de quercetina del citosol celular se produce rápidamente, reduciéndose a las 6 horas de ensayo más de 5 veces la concentración máxima observada a las 3 h horas de incubación. Esta rápida eliminación de quercetina ya ha sido observada en otras líneas celulares, en concreto en una línea celular humana de hepatocarcinoma, en donde se atribuía esta desaparición a su metabolismo/degradación oxidativa al



detectarse compuestos de degradación resultantes de este metabolismo [290]. En nuestro estudio no se han detectado estas o-quinonas resultantes del metabolismo oxidativo de quercetina, aunque sí se ha cuantificado quercetina-3-glucurónido, aunque en concentraciones pequeñas respecto a la absorción de la correspondiente aglicona. Esto podría indicarnos un transporte activo al exterior celular de estos metabolitos generados, en especial de la quercetina-3-glucurónido, algo ya observado en hepatocitos y en células del sistema nervioso central [295].

Por otro lado la aparición de quercetina y quercetina-3-glucurónido como metabolitos en el citoplasma de los adipocitos sigue la misma tendencia que el compuesto del que proceden. La quercetina-3-glucurónido alcanza su máximo a tiempos de incubación más cortos que la quercetina resultante de su respectiva forma glucuronizada, algo que va en concordancia con la cinética de absorción del compuesto del que proceden. Mientras que la forma glucuronizada alcanza su máximo tras 6 horas de incubación de las células con quercetina ($1.63 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$), por el contrario la quercetina alcanza su punto máximo al final del ensayo ($0.52 \pm 0.06 \mu\text{g/ml}$). Estas tendencias pueden verse claramente en la **Figura 1**. La aparición de metabolitos



resultado de la glucuronización de flavonoides ha sido observada previamente para otros flavonoides en otras líneas celulares, como por ejemplo en fibroblastos expuestos a hesperidina o naringenina [296]. Este hecho sugiere que la glucuronización puede ocurrir *in vivo* en tejidos distintos del intestino delgado y del hígado, de hecho la isoforma UGT2B11 de la UDP-glucuronosiltransferasa se ha encontrado en distintas líneas celulares del organismo [297-299].

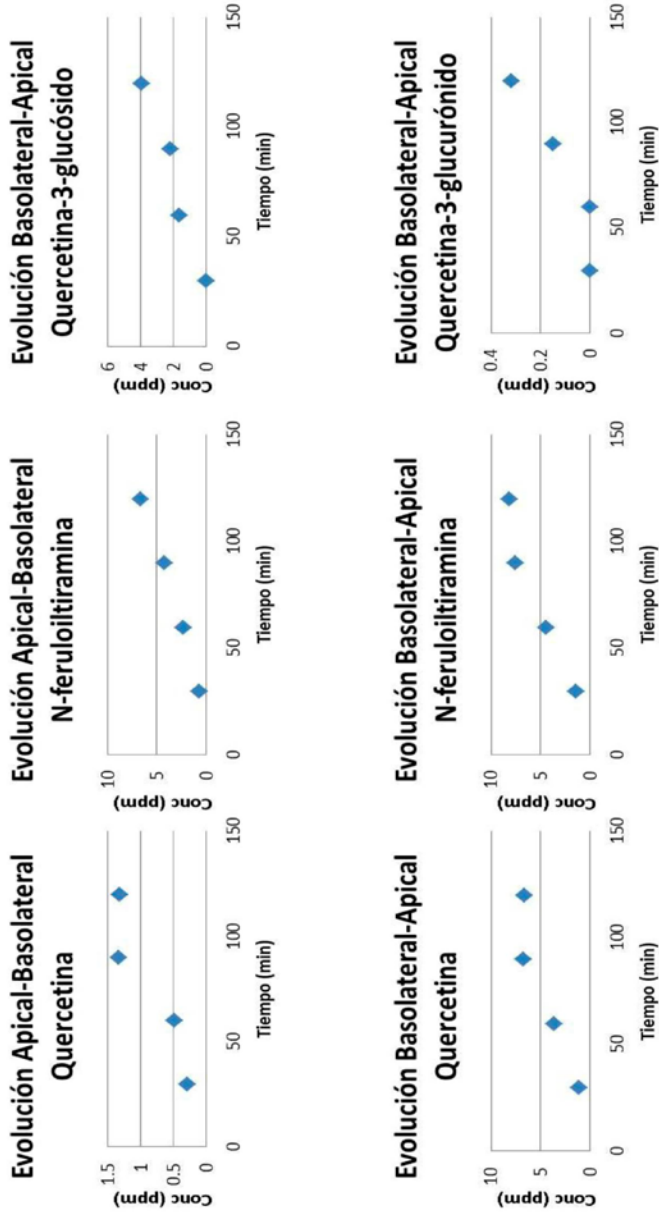
386 Queda confirmada por tanto la absorción de quercetina y de quercetina-3-glucurónido por parte de las células adipocíticas 3T3-L1, por lo que podría pensarse que estos compuestos podrían ser responsables en parte de los efectos que el extracto enriquecido en polifenoles de *Hibiscus sabdariffa* ha mostrado. Este hecho además se sustenta con otros estudios en donde también se ha observado una actividad anti-adipogénica de quercetina en adipocitos [300]. Sin embargo debe tenerse en consideración que la absorción celular de estos compuestos fenólicos en modelos celulares *in vitro* no refleja completamente su absorción *in vivo*. Esto es debido en parte al hecho de que las células durante el cultivo crecen como una monocapa celular, por lo que el compuesto estudiado generalmente se ve expuesto únicamente a una de las caras de la pared celular, con lo que su absorción es



subestimada. Además, en el medio de cultivo pueden producirse reacciones de oxidación o degradación de estos compuestos que pueden reducir la concentración efectiva del compuesto estudiado, algo que no ocurre *in vivo*, ya que la presencia de oxígeno está restringida en el entorno celular. A pesar de las limitaciones existentes estos estudios son muy útiles como una primera aproximación para obtener información sobre qué compuestos y sus metabolitos pueden penetrar al interior celular y ejercer su acción.



Figura 2 Cuantificación de quercetina y quercetina-3-glucurónido en el citoplasma de adipocitos.



Capítulo 7: Análisis de muestras de suero, plasma y orina tras la ingesta de un extracto enriquecido en compuestos fenólicos de *Hibiscus sabdariffa* en humanos.

7.1 Análisis de muestras de suero y plasma.

Dado que las muestras de suero y plasma se caracterizan por la presencia de una gran cantidad de proteínas que pueden interferir en su análisis mediante distintas técnicas analíticas, es necesaria una etapa de desproteínización previa. Esta etapa es crítica, ya que los compuestos fenólicos pueden estar unidos mediante enlaces no covalentes a las proteínas, por lo que la precipitación de dichas proteínas puede conllevar en ocasiones la pérdida de parte de nuestros analitos durante este proceso. Es por esto que el primer paso de nuestro estudio fue desarrollar un procedimiento de desproteínización eficiente que presentara porcentajes de recuperación aceptables para los compuestos presentes en esta matriz. Para ello se probaron distintos protocolos de desproteínización en suero bovino fetal dopado con el extracto utilizando distintos disolventes orgánicos como se detalla en apartados anteriores, en concreto AcN, EtOH, MeOH y una mezcla 50:50 (v/v) de EtOH-MeOH.



RESULTADOS

La composición del extracto de PEHS es la que se detalla en el capítulo 5 de la presente memoria, por lo que no vamos a profundizar en ella. Los porcentajes de recuperación obtenidos para los compuestos identificados del extracto con los distintos protocolos ensayados se muestran en la siguiente **Tabla 1**.

Tabla 1. Porcentajes de recuperación de los compuestos del extracto PEHS obtenidos con los diferentes protocolos ensayados.

Compuesto	AcN	EtOH	MeOH	EtOH-MeOH
Ácido Hidroxicítrico	0	0	0	0
Ácido Hibísico	0	0	0	0
Ácido hibísico hidroxietilester	0	0	0	0
Delfinidina-3-sambubiósido	0	0	0	0
Ácido Clorogénico quinona	0	0	0	0
Ácido Neoclorogénico	74.6	56.5	97.8	84.2
Cianidina-3-sambubiósido	0	9.4	0	0
Ácido hibísico dimetiléster	33.2	8.3	19.2	11.1
Ácido Clorogénico	60.0	68.6	92.6	95.0
Ácido Criptoclorogénico	75.2	74.8	98.9	97.0
Metildigalato	51.2	44.8	87.6	67.2
Ácido 2-O-transcafeoilhidroxicítrico	0	0	0	0
Ácido Clorogénico Isómero (ácido 1-O-cafeoilquinico)	0	0	0	0
Miricetina-3-arabinogalactósido	15.5	2.4	5.3	8.3



Ácido Cumaroilquínico	80.0	0	98.0	99.9
Ácido hibísico hidroxietildimetilester	0	0	0	0
Quercetina-3-sambubiósido	53.4	51.5	98.3	78.7
Ácido 5-O-Cafeoilshikímico	41.1	1.4	1.4	0
Ácido 2-O-transferuloilhidroxicítrico	0	0	0	0
Quercetina-3-rutinósido	46.9	60.9	74.8	79.6
Kaempferol-3-O-sambubiósido	0	0	0	0
Quercetina-3-glucósido	59.6	59.6	88.6	73.1
Kaempferol-3-O-rutinósido	52.5	68.0	74.1	66.4
Etilclorogenato	84.4	95.6	93.4	98.9
Metilepigalocatequina	0	0	0	0
Miricetina	0	0	0	0
N-feruloiltiramina	52.2	79.4	95.2	75.0
Quercetina	0	0	11.2	0.4
Kaempferol	0	0	0	0

391

De los compuestos identificados en el extracto PEHS, 16 fueron recuperados con alguno de los protocolos estudiados. Sin embargo el resto de compuestos, la mayoría muy minoritarios o muy polares no pudieron detectarse en ninguno de los protocolos estudiados.

De estos tratamientos el que mostró porcentajes de recuperación más elevados para la mayoría de los compuestos fue el que utilizaba MeOH para precipitar las proteínas. En concreto mostró los porcentajes más altos para los ácidos neo y criptoclorogénico, metildigalato, kaempferol-3-O-rutinósido, quercetina y sus derivados sambubiósido y



glucósico, así como para la N-feruloiltiramina. Para el resto de compuestos, a pesar de que no fue el protocolo que mostró las recuperaciones más elevadas los porcentajes siguen siendo aceptables. Es por esto que fue el tratamiento de muestra seleccionado para tratar las muestras de suero y plasma humano recolectadas tras la ingesta del extracto.

392 Las muestras de suero y plasma, recolectadas de un voluntario sano tras la ingesta del extracto de *Hibiscus sabdariffa* enriquecido en polifenoles, y almacenadas mediante dos procesos de conservación, acidificadas y sin acidificar, fueron tratadas utilizando MeOH para precipitar las proteínas. Dichas muestras, tras su desproteinización fueron analizadas mediante UPLC-UHR-qQ-TOF en modo de ionización negativo y positivo. El análisis de estas muestras conservadas sin acidificar reveló la presencia de cuatro compuestos intactos del extracto en plasma y suero, a los diferentes tiempos de recolección, excepto en las muestras control tomadas en el momento de la ingesta del extracto. Sin embargo en las muestras conservadas en presencia de ácido sólo se pudo detectar uno de estos compuestos presentes en las muestras sin acidificar, por lo que este método de conservación parece que afecta de manera negativa al contenido en compuestos fenólicos. En la siguiente figura se



observa el cromatograma de pico base de la muestra de plasma control y la muestra tomada dos horas tras la ingesta del extracto.



Figura 1 Cromatograma de pico base de la muestra de plasma control y la muestra tomada 2 horas tras la ingesta del extracto.

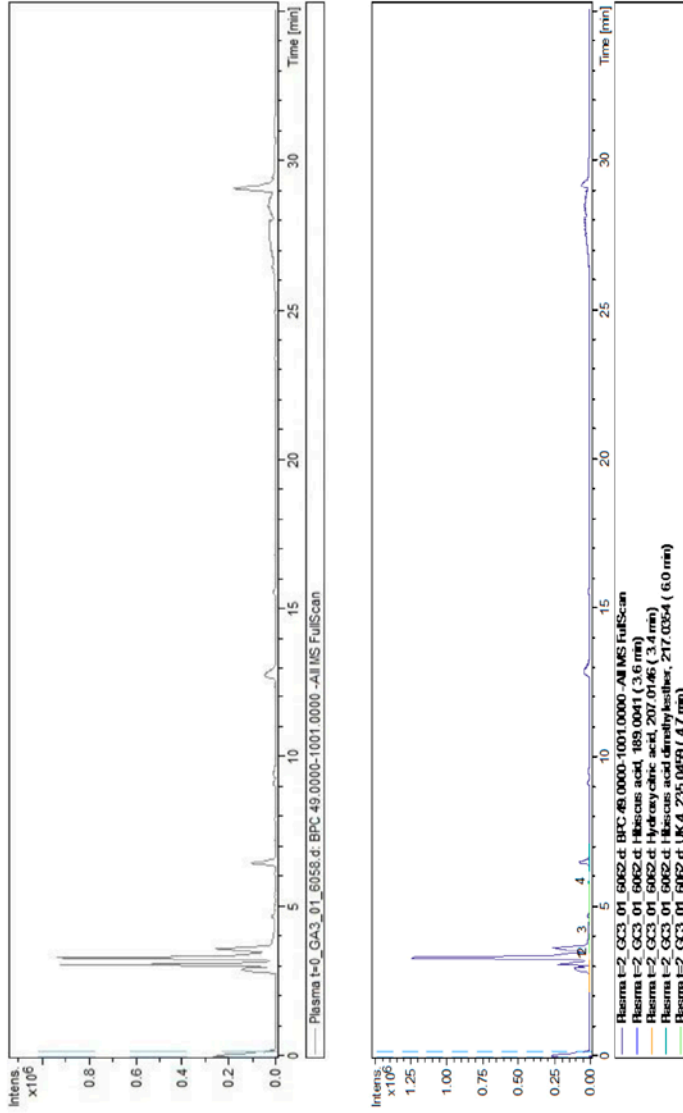
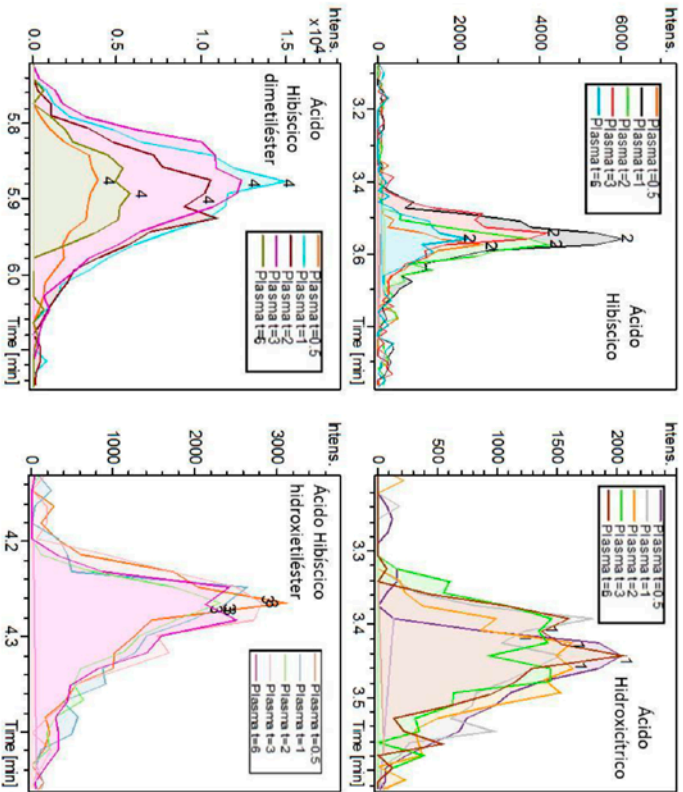


Figura 2. Cromatogramas de ión extraído de los compuestos del extracto PEHS detectados en las muestras de plasma a distintos tiempos.



Los compuestos identificados en las muestras de suero y plasma conservadas sin acidificar son los ácidos hidroxicítrico e hibíscico, así como los ésteres hidroxietílico y dimetílico de este último. A pesar de que se utilizó una instrumentación muy avanzada, con gran sensibilidad para la detección de analitos, los compuestos se encontraban en concentraciones inferiores al límite de cuantificación, por lo que no se pudo estimar su concentración. A pesar de esto, la concentración máxima para todos los compuestos tanto en las muestras de plasma como en las de suero se detectó 1 hora tras la ingesta del extracto, excepto para el éster hidroxietílico del ácido hibíscico, que se detectó trascurridas dos horas. En la **Figura 2** se muestran los cromatogramas de ión extraído de estos cuatro compuestos, para las muestras de plasma recolectadas a los distintos tiempos.

Estos resultados están en concordancia con el estudio de biodisponibilidad llevado a cabo con el mismo extracto en ratas, donde se encontraron entre otros metabolitos los ácidos hidroxicítrico, hibíscico y el éster dimetílico del ácido hibíscico en las muestras de plasma recolectadas tras la ingesta forzada del extracto. Estos metabolitos mostraron sus concentraciones máximas en las muestras recolectadas a los 120 minutos tras la ingesta del extracto, sin embargo en este



estudio en humanos la concentración máxima se alcanzó a tiempos más cortos, en concreto en las muestras de suero y plasma recolectadas trascurrida una hora la ingesta del extracto.

Considerando que en el estudio de biodisponibilidad en ratas la ingesta de PEHS fue de 1.200 mg/kg, y que en esta primera aproximación en humanos la dosis total fue de 500 mg de extracto, la detección de estos cuatro metabolitos en plasma es un gran logro que supone el primer paso de puesta a punto de protocolos de tratamiento de muestra y metodología analítica para la realización de un ensayo de biodisponibilidad en humanos, con más voluntarios, donde se monitorice la farmacocinética de los compuestos individuales del extracto a lo largo del tiempo.

397

7.2 Análisis de muestras de orina.

Como ya se ha comentado previamente la orina es una matriz biológica compleja que requiere en la mayoría de los casos un tratamiento de muestra previo. Es por esto que la primera etapa que se abordó en este estudio de la excreción urinaria de los compuestos del extracto de *Hibiscus sabdariffa* fue poner a punto un protocolo de tratamiento de muestra



que nos proporcionara los mayores porcentajes de recuperación de los compuestos objeto de estudio.

398 Se ensayaron un total de 7 protocolos de tratamiento de orina basados en extracciones LLE y SPE. Se probaron 4 protocolos de tratamiento con extracciones LLE usando acetato de etilo con distintos modificadores, y 3 protocolos de SPE con distintas fases sólidas, tal y como se describe en apartados anteriores. En cuanto a LLE los distintos modificadores añadidos es lo que diferencia un protocolo de otro, en el primer protocolo se añadió 10 μ l de HCl 1M; en el segundo 10 μ l de HCl 1M y 10 μ l de NaCl 1M; en el tercero se añadió 10 μ l de TFA 1M; y finalmente en el cuarto 10 μ l de TFA 1M y 10 μ l de NaCl 1M. Para la SFE se utilizaron cartuchos con tres rellenos diferentes, Discovery DPA-6S, Supel-Select HLB SPE y Spe-ed Advanta RP 105, todos ellos diseñados para retener compuestos polares de matrices polares, como es el caso de los compuestos fenólicos en orina.

Los porcentajes de recuperación de los compuestos del extracto PEHS con los distintos protocolos se recogen en las siguientes tablas.



Tabla 2. Porcentajes de recuperación de los compuestos del extracto PEHS obtenidos con los diferentes protocolos LLE ensayados.

Compuesto	HCl	HCl + NaCl	TFA	TFA + NaCl
Ácido Hidroxicítrico	3.7	4.8	10.4	10.7
Ácido Hibísico	11.0	14.3	32.6	34.6
Ácido hibísico hidroxietilester	0	0	0	0
Delfinidina-3-sambubiósido	0	0	0	0
Ácido Clorogénico quinona	0	0	0	0
Ácido Neoclorogénico	39.9	54.5	54.9	51.6
Cianidina-3-sambubiósido	0	0	0	0
Ácido hibísico dimetiléster	0	63.4	83.1	54.3
Ácido Clorogénico	59.6	70.5	74.8	86.5
Ácido Criptoclorogénico	65.3	65.3	72.3	80.4
Metildigalato	76.3	94.6	99.6	99.8
Ácido 2-O-transcafeoilhidroxicítrico	47.2	67.3	98.9	93.0
Ácido Clorogénico Isómero (ácido 1-O-cafeoilquinico)	0	0	0	0
Miricetina-3-arabinogalactósido	0	0	0	0
Ácido Cumaroilquinico	54.2	82.6	17.8	98.9
Ácido hibísico hidroxietildimetilester	0	0	0	0
Quercetina-3-sambubiósido	20.8	0	0	7.6
Ácido 5-O-Cafeoilshikímico	80.6	85.2	0	0
Ácido 2-O-transferuloilhidroxicítrico	0	0	0	0
Quercetina-3-rutinósido	0	0	21.5	0
Kaempferol-3-O-sambubiósido	0	0	0	0
Quercetina-3-glucósido	90.8	87.0	98.0	100
Kaempferol-3-O-rutinósido	0	0	0	73.3
Etilclorogenato	0	0	0	0
Metilepigalocatequina	90	0	0	0
Miricetina	58.3	78.3	71.0	67.0
N-feruloiltiramina	89.4	72.3	95.6	92.7



RESULTADOS

Quercetina	68.0	79.9	61.8	99.4
Kaempferol	99.2	91.2	86.3	98.5

Tabla 3. Porcentajes de recuperación de los compuestos del extracto PEHS obtenidos con los diferentes protocolos SPE ensayados.

Compuesto	Discovery	Supel- Select	Spe-ed Advanta
Ácido Hidroxicítrico	0	0	0
Ácido Hibísico	0	0	0
Ácido hibísico hidroxietilester	0	0	0
Delfinidina-3-sambubiósido	76.3	20.7	74.4
Ácido Clorogénico quinona	0	0	0
Ácido Neoclorogénico	59.9	39.2	0
Cianidina-3-sambubiósido	65.0	0	63.6
Ácido hibísico dimetiléster	91.8	0	28.2
Ácido Clorogénico	36.9	98.7	0
Ácido Criptoclorogénico	46.0	0	0
Metildigalato	81.9	0	0
Ácido 2-O-transcafeoilhidroxicítrico	98.4	0	0
Ácido Clorogénico Isómero (ácido 1-O-cafeoilquinico)	0	0	0
Miricetina-3-arabinogalactósido	0	0	0
Ácido Cumaroilquinico	0	0	0
Ácido hibísico hidroxietildimetilester	0	0	0
Quercetina-3-sambubiósido	16.2	0	0
Ácido 5-O-Cafeoilshikímico	0	0	0
Ácido 2-O-transferuloilhidroxicítrico	0	0	0
Quercetina-3-rutinósido	30.4	0	3.10
Kaempferol-3-O-sambubiósido	0	0	0

400



Quercetina-3-glucósido	81.8	0	24.2
Kaempferol-3-O-rutinósido	20.2	0	0
Etilclorogenato	0	0	0
Metilepigalocatequina	0	0	0
Miricetina	98.7	0	99.2
N-feruloiltiramina	57.5	64.1	0
Quercetina	99.3	18.6	97.3
Kaempferol	0	0	0

Al igual que ocurría con los protocolos de desproteinización de suero, con estos tratamientos de las muestras de orina se pierden compuestos del extracto, la mayoría muy minoritarios.

En cuanto a los protocolos de LLE, los que recuperaron mayor número de compuestos fueron los que usaban HCl y TFA más NaCl, con un total de 16 compuestos, frente a los 15 que se lograban recuperar con los otros protocolos. Sin embargo fue el protocolo número cuatro, el que usaba como modificadores TFA y NaCl, el que logró unos porcentajes de recuperación más elevados para un total de 9 compuestos, superando con creces al resto de protocolos para la mayoría de los compuestos del extracto.

Por otro lado, los protocolos que usaban SFE recuperaron un menor número de compuestos del *Hibiscus sabdariffa*, sólo se lograron recuperar 5 y 7 compuestos con



los cartuchos Supel-Select HLB SPE y Spe-ed Advanta RP 105 respectivamente. Únicamente los cartuchos de extracción en fase sólida Discovery DPA-6S recuperaron un número de compuestos comparable a los protocolos de LLE, en concreto 15 compuestos. Además, de estos 15 compuestos recuperados, esta fase sólida proporcionó los mayores porcentajes de recuperación para 12 de ellos, comparados con los otros cartuchos de distintos rellenos.

402 Sin embargo, si comparamos el mejor protocolo de LLE y de SFE, tenemos que el que utiliza LLE con acetato de etilo y como modificadores TFA y NaCl recuperó un total de 16 compuestos, frente a los 15 compuestos que se lograron recuperar con los cartuchos Discovery DPA-6S. En cuanto a los porcentajes de recuperación, el protocolo de LLE mostró mayores recuperaciones para un total de 11 compuestos, en concreto para los ácidos hidroxycítrico, hibiscico, clorogénico, criptoclorogénico y cumaroilquínico, además de para metildigalato, quercetina, quercetina-3-glucósido, kaempferol, kaempferol-3-O-rutinósido y N-feruloiltiramina. Además con este protocolo de LLE se consiguieron recuperar cuatro compuestos que no se encontraron en los análisis de las muestras de SFE, frente a los tres que se detectaron únicamente con este último protocolo. Es por esto que el



protocolo seleccionado para el tratamiento de las muestras de orina recolectadas de un voluntario a distintos tiempos tras la ingesta de 500 mg de PEHS consistió en una LLE con acetato de etilo usando HCl y NaCl como modificadores.

Por tanto, tras el tratamiento de las muestras de orina recolectadas tras la ingesta del extracto con este protocolo óptimo se llevó a cabo su análisis mediante UPLC-UHR-qQ-TOF con el método cromatográfico que se detalla en apartados anteriores, tanto en modo positivo como negativo. En las muestras tomadas tras la ingesta de la cápsula con el extracto consiguieron detectarse un total de 10 compuestos procedentes de *Hibiscus sabdariffa*, mientras que en la muestra control tomada momentos antes de la toma del mismo no se detectaron ninguno de estos analitos. En la **Figura 3** se muestran los cromatogramas de pico base de la orina control y la tomada 2 horas tras la ingesta del extracto.

403

Los compuestos identificados en las muestras tomadas a distintos tiempos fueron los ácidos hidroxycítrico, clorogénico y sus isómeros neoclorogénico y criptoclorogénico, el ácido hibísico y sus ésteres hidroxietílico y dimetílico, además de metildigalato, ácido cumaroilquínico y N-feruloiltiramina. Todos los compuestos pudieron detectarse en las muestras recolectadas trascurridas



RESULTADOS

2, 4 y 6 horas de la ingesta del extracto, excepto en el caso del metildigalato, donde a las 6 horas es indetectable en la orina.

En la siguiente tabla se detalla esta información.



Figura 3 Cromatograma de pico base de la muestra de orina control y la muestra tomada 2 horas tras la ingesta del extracto.

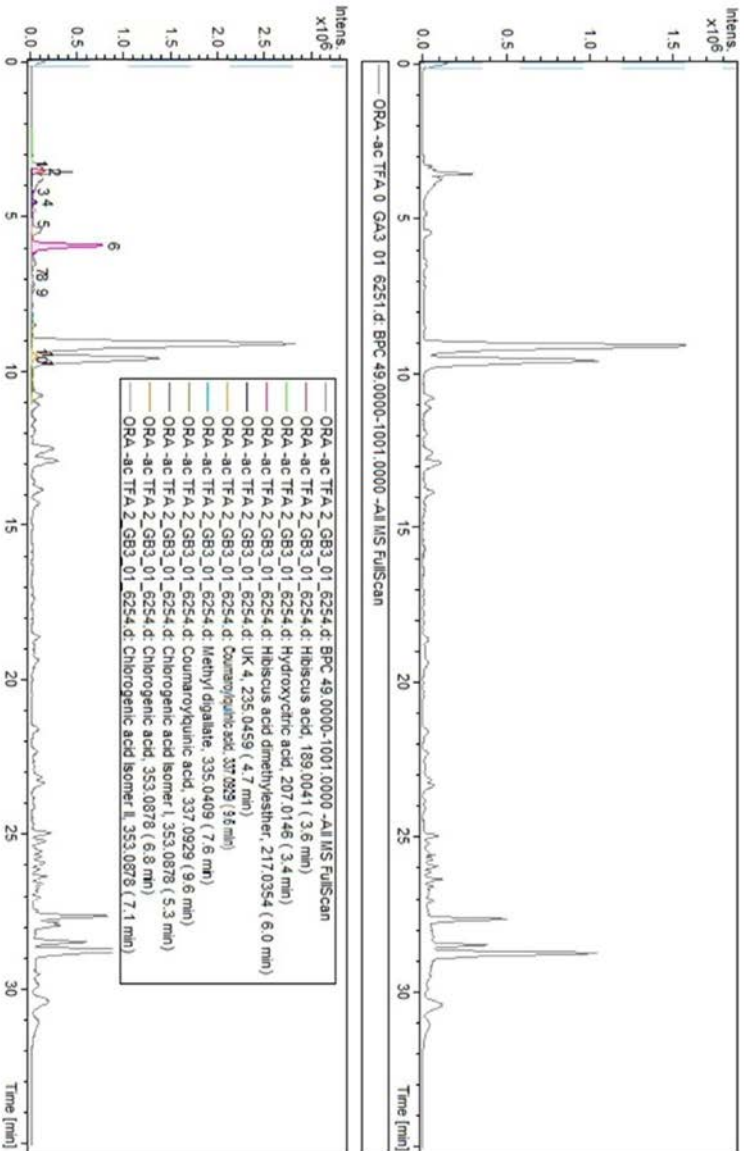


Figura 4. Cromatogramas de ión extraído de los compuestos del extracto PEHS detectados en las muestras de orina a distintos tiempos.

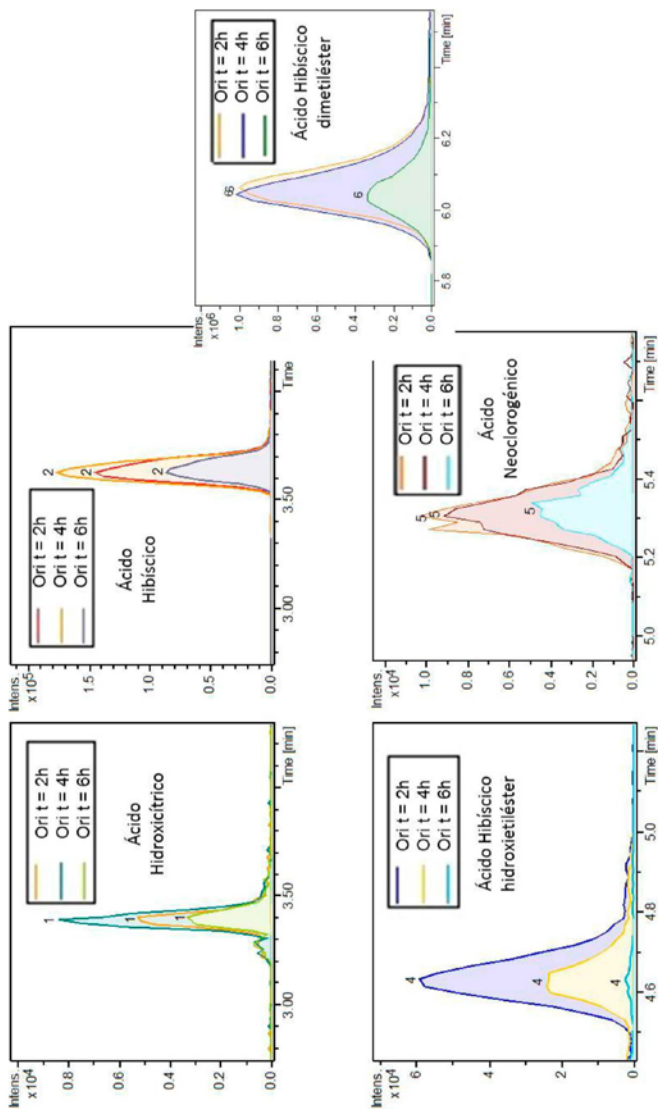


Figura 4. Cromatogramas de ión extraído de los compuestos del extracto PEHS detectados en las muestras de orina a distintos tiempos.

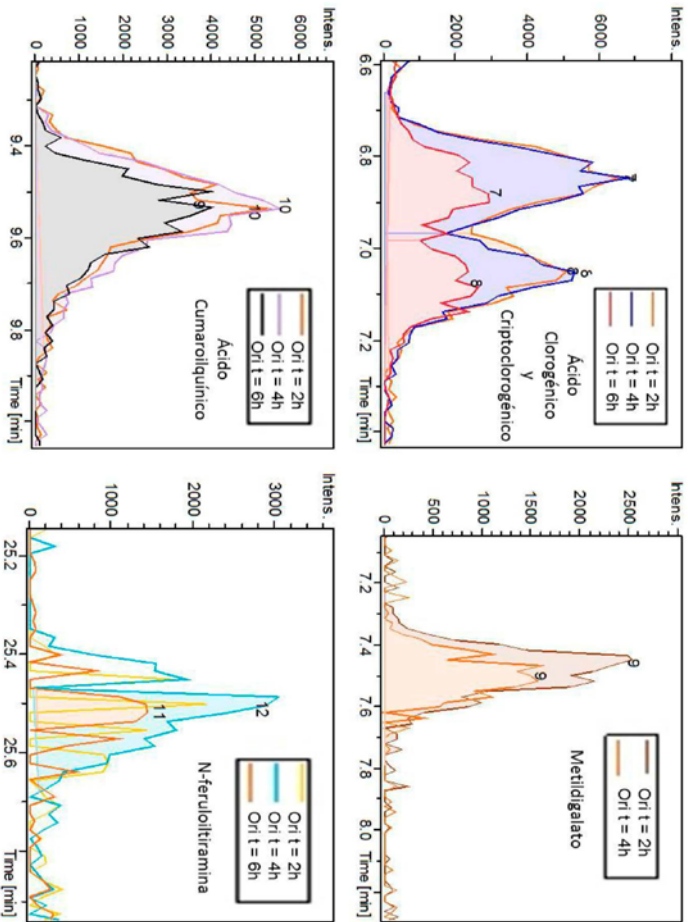


Tabla 4. Compuestos del extracto PEHS detectados en las muestras de orina.

Compuesto	Antes de la ingestión	Tras la ingestión		
		2 h	4 h	6 h
Ácido Hidroxicítrico	ND	X	X	X
Ácido Hibísico	ND	X	X	X
Ácido hibísico hidroxietilester	ND	X	X	X
Ácido Neoclorogénico	ND	X	X	X
Ácido hibísico dimetiléster	ND	X	X	X
Ácido Clorogénico	ND	X	X	X
Ácido Criptoclorogénico	ND	X	X	X
Metildigalato	ND	X	X	ND
Ácido Cumaroilquínico	ND	X	X	X
N-feruloiltiramina	ND	X	X	X

408

A pesar de que los compuestos detectados no se pudieron cuantificar por el mismo motivo que en el caso de las muestras de suero y plasma, el máximo de excreción urinaria se encontró en algunos casos en las muestras tomadas a las 2 horas de la ingesta (éster hidroxietílico del ácido hibísico, ácido neoclorogénico y metildigalato) y en otros tras 4 horas de la toma del extracto (ácidos hidroxicítrico, hibísico, éster dimetílico del ácido hibísico, ácidos clorogénico, criptoclorogénico, cumaroilquínico y N-feruloiltiramina).



Estos resultados ponen de manifiesto la potencialidad de la metodología analítica optimizada, que reveló la presencia de un total de 10 compuestos procedentes del extracto ingerido en las muestras de orina recolectadas tras 2, 4 y 6 horas de la toma del mismo. Al igual que en el apartado anterior, este es un paso previo de optimización necesario antes de llevar a cabo un estudio de excreción urinaria de compuestos fenólicos procedentes del extracto PEHS en humanos. Dado que a las 6 horas todos los compuestos, a excepción del metildigalato, se encontraban en cantidades detectables en las muestras de orina, en estos futuros estudios se monitorizará en varios voluntarios la excreción urinaria de estos compuestos prolongándose en el tiempo al menos 24 horas.



410



Conclusión

Conclusiones



CONCLUSIONES

1. Se han caracterizado de forma cualitativa los compuestos bioactivos de cinco extractos de *Rosmarinus officinalis* obtenidos utilizando SFE y PLE mediante HPLC-DAD-ESI-TOF-MS, demostrando la complementariedad de la información proporcionada por la espectroscopía UV-vis y la espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo para la identificación de compuestos fenólicos en esta matriz. El método empleado permitió la separación simultánea de una gran cantidad de compuestos fenólicos, entre los que destacan compuestos pertenecientes a las familias de diterpenos fenólicos, flavonoides, ácidos fenólicos, así como a otras clases de compuestos naturales, como triterpenoides. Es importante destacar que 21 de los compuestos identificados tentativamente en este estudio han sido encontrados por primera vez en esta matriz vegetal.

413

2. En la búsqueda de nuevas fuentes de compuestos bioactivos se obtuvieron 15 extractos de romero de diferentes zonas geográficas de Serbia mediante un



método optimizado previamente de MAE. Estos extractos se analizaron cualitativa y cuantitativamente mediante UPLC-QTOF, revelando la presencia de 34 compuestos, la mayoría de ellos flavonoides, diterpenos fenólicos y triterpenos tipo abietano. El analizador de masas QTOF ha demostrado ser un sistema de detección muy potente para la determinación de compuestos fenólicos, ya que proporciona exactitud de masas y distribución isotópica tanto en los espectros de masas como de masas/masas. Podemos concluir que los extractos de la región de Sokobanja son los más ricos en flavonoides y compuestos como carnosol, rosmaridifenol, rosmadial y los ácidos rosmarínico y carnósico. Por otro lado es destacable el elevado contenido que presenta el extracto procedente de Gložan (Vojvodina) en derivados triterpénicos.

3. Se han evaluado los efectos en la proliferación celular del extracto de romero obtenido con SFE a 150 bares caracterizado previamente y de algunos de sus compuestos aislados mediante cromatografía semi-preparativa en líneas celulares de adenocarcinoma de



colon HT-29, SW 480 y HGUE-C-1. Los compuestos de dicho extracto fueron cuantificados, resultando ser el ácido carnósico el compuesto mayoritario, con una concentración muy superior al resto, seguido por los ácidos micromérico, betulínico y ursólico. En cuanto al efecto en la viabilidad celular, en las tres líneas celulares, tanto el extracto de romero completo como las fracciones que presentan los compuestos carnosol, ácido carnósico, ácido 12-metoxicarnósico, taxodione, hinokione y ácido betulínico fueron las más bioactivas.

415

4. Se ha estudiado la composición de 25 extractos de *Hibiscus sabdariffa* de diferentes variedades procedentes de diferentes áreas geográficas de Méjico mediante HPLC-DAD-ESI-TOF. También se determinaron el contenido total de compuestos fenólicos, flavonoides, antocianinas, los contenidos individuales de cianidina y delphinidina, así como su actividad antioxidante. Se encontró una correlación entre el origen geográfico de la planta y el contenido total de antocianinas e individual de cianidina y delphinidina, siendo los extractos de HS procedentes de



Jalisco y Colima los que mayor contenido presentaban en estos compuestos, a excepción de las variedades blancas de esta planta. Se evaluó la actividad antibacteriana de dichos extractos frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas, los resultados pusieron de manifiesto que todos los extractos etanólicos de *Hibiscus sabdariffa* presentan un gran potencial como agentes antimicrobianos, presentando algunos de ellos una actividad similar a la de algunos antibióticos.

416

5. Se ha realizado un estudio de permeabilidad en un modelo celular de absorción intestinal de dos formulaciones de un extracto de *Hibiscus sabdariffa* enriquecido en polifenoles, libre y liposomado, y de 4 compuestos puros relacionados con su composición, n-feruloiltiramina, quercetina y sus derivados quercetina-3-glucurónido y quercetina-3-glucósido. El análisis de dicho extracto mediante la potente plataforma analítica UPLC-ESI-UHR-Qq-TOF reveló la presencia de 7 nuevos compuestos no identificados previamente. En cuanto a la permeabilidad de las dos formulaciones del extracto de *Hibiscus sabdariffa*, se



encontró que sólo algunos compuestos atravesaron la monocapa celular, y que la formulación liposomada presentaba una menor permeabilidad que el extracto libre. En cuanto a los compuestos puros, a pesar de que se observaron permeabilidades moderadas mediante absorción pasiva, en todos ellos la permeabilidad en sentido basolateral-apical fue mayor que en sentido inverso, lo cual indica la existencia de un mecanismo de transporte por secreción.

6. Se ha desarrollado un estudio de la absorción y metabolismo *in vitro* de quercetina y quercetina-3-glucurónido en células pre-adipocíticas 3T3-L1. El contenido intracelular de estos compuestos fenólicos presentes a diferentes tiempos de incubación (3, 6, 12, 18 h) se determinó mediante HPLC-ESI-TOF. El análisis de las muestras citosólicas reveló la presencia de ambos compuestos en el citoplasma celular, así como la presencia de quercetina cuando las células se exponían a quercetina-3-glucurónido, y viceversa cuando el compuesto estudiado era la correspondiente aglicona. La absorción de ambos

417



compuestos presenta una dependencia con el tiempo de incubación, aunque la absorción de la correspondiente aglicona alcanza su máximo a tiempos de incubación más cortos que la quercetina-3-glucurónido. También se puso de manifiesto una rápida eliminación de quercetina del citoplasma, bien gracias a reacciones de metabolización en el interior celular y/o a su posterior transporte al exterior celular.

418

7. Se han evaluado diferentes procedimientos de extracción para el análisis de compuestos fenólicos en suero, plasma y orina mediante UPLC-UHR-qQ-TOF. Los procedimientos examinados incluyeron diferentes agentes precipitantes de proteínas en el caso de suero y plasma, y extracciones LLE y SFE utilizando diferentes modificadores y resinas para el tratamiento de orina. Tras esta puesta a punto de la metodología analítica, se ensayó la misma en muestras reales de suero, plasma y orina humanas recolectadas de un voluntario tras la ingesta de 500 mg de PEHS, consiguiéndose detectar un total de 4 compuestos del extracto en las muestras de suero y



plasma (ácidos hidroxycítrico e hibísico, así como los ésteres hidroxietílico y dimetílico de este último), y 10 compuestos en las muestras de orina (ácidos hidroxycítrico, clorogénico y sus isómeros neoclorogénico y criptoclorogénico, el ácido hibísico y sus ésteres hidroxietílico y dimetílico, además de metildigalato, ácido cumaroilquínico y N-feruloiltiramina).



420



Final Conclusions



FINAL CONCLUSIONS

1. Bioactive compounds from five different rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extracts have been qualitatively characterized by HPLC-DAD-ESI-TOF-MS, showing the complementarity nature of the information provided by UV-Vis spectroscopy and mass spectrometry with time-of-flight analyser. The method used enabled the simultaneous separation of a wide range of phenolic diterpenes, flavonoids, and phenolic acids, as well as other types of natural compounds such as triterpenoids. The tentative identification of these extracts includes information regarding some compounds which have not previously been reported in this plant matrix.
2. Fifteen rosemary plants were harvested at different sites in Serbia, and the leaves were subsequently extracted by MAE using a previously optimized extraction method. These extracts were qualitatively and quantitatively characterized by UPLC-ESI-QTOF-MS. The QTOF mass analyser has proven to be a valuable detection system for identifying phenolic

423



compounds, since it provides mass accuracy and true isotopic pattern in both MS and MS/MS spectra. This coupling has enabled the tentative characterization of more than 30 different phenolic compounds, including flavonoids, phenolic diterpenes and abietan-type triterpenes. Extracts from Sokobanja presented the highest levels in flavonoids and other compounds such as carnosol, rosmaridiphenol, rosmadial, rosmarinic acid and carnosic acid. On the other hand, higher contents in triterpenes were found in the extract from Gložan (Vojvodina).

424

3. An initial approach was used for determining which compound or compounds might be responsible for the cytotoxic activity of the rosemary extract obtained by SFE (150 bar). For this, the rosemary-leaf extract under study was firstly quantitatively characterized by HPLC-ESI-QTOF-MS, whereupon carnosic acid proved the most abundant compound, followed by micromeric, betulinic and ursolic acids. Then, different fractions were obtained by semi-preparative chromatography and assayed together with the complete extract in order to study their effects on cell



proliferation in HT-29, SW 480 and HGUE-C-1 colon-cancer cells. These findings suggest that the main agents responsible for the cytotoxic activity of the rosemary-leaf extract are carnosic acid, carnosol, 12-methoxycarnosic acid, taxodione, hinokione and betulinic acid.

4. A study was focussed on the composition of different extracts obtained from 25 varieties of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) collected in different places of Mexico. The qualitative characterization was performed by HPLC-ESI-TOF-MS. The total content of phenolics, flavonoids, anthocyanins, as well as the individual contents of delphinidin and cyanidin were subsequently determined. The total content in anthocyanins and the individual contents of delphinidin and cyanidin proved to be correlated with the origin of the plant, showing higher levels for extracts harvested in Jalisco. Furthermore, the antioxidant capacity and the antibacterial activity of the extracts was assayed against Gram-negative and Gram-positive microorganisms, demonstrating that all the extracts were effective against all the test



bacterial strains, showing similar antibacterial capacity to broad-spectrum antibiotic.

5. A study was conducted to examine the intestinal epithelial-membrane permeability of a phenolic-enriched *Hibiscus sabdariffa* extract, free and liposomed, and four pure compounds related to its composition, using the Caco-2 human colon-cell line, in a model of human intestinal absorption. Initially the phenolic-enriched *Hibiscus sabdariffa* extract was analysed by UPLC-ESI-UHR-Qq-TOF, a powerful analytical platform, which enabled the identification of 7 new compounds for the first time in this extract. In the permeability study of the free and liposomed extracts, only a few compounds crossed the cell monolayer, and this permeability was lower when the liposomed extract was assayed. With respect to the pure compounds (quercetin, quercetin-3-glucoside, quercetin-3-glucuronide and n-feruloyltyramine), a moderate absorption was found in all cases. However, all the assays showed a higher basolateral-apical permeability than in the other direction, suggesting



the existence of a transport efflux mechanism of these compounds.

6. A study of *in vitro* uptake and metabolism of quercetin and quercetin-3-glucuronide by 3T3-L1 preadipocytes was performed. The intracellular concentration of these phenolic compounds at different incubation times (3, 6, 12 and 18 h) was determined by HPLC-ESI-TOF. The analysis of the cytoplasm revealed the presence of these compounds and their metabolites (quercetin when quercetin-3-glucuronide was incubated and vice versa). The absorption of these compounds by the adipocytes proved time-dependent, although the quercetin showed a maximum concentration in a shorter time than did quercetin-3-glucuronide. Quercetin was more rapidly eliminated from the cytoplasm, apparently by metabolization inside the cells and/or transport outside the cells.

427

7. Different extraction procedures were assessed to analyse phenolic compounds in serum, plasma and urine by UPLC-UHR-qQ-TOF. The procedures tested



included different protein-precipitation agents for serum and plasma treatments, together with LLE and SPE using different solid phases in the case of urine. After the optimisation of these procedures, the best treatments were verified for extracting phenolic compounds from human serum, plasma and urine after oral administration of an encapsulated rose extract. The subsequent analysis of those samples by UPLC-UHR-qQ-TOF allowed the identification of four intact compounds previously found in the administered extract in serum and plasma samples, and ten of these compounds in urine samples. The compounds detected in serum and plasma samples were hydroxycitric acid, hibiscus acid, hibiscus acid hydroxyethyl ester, and hibiscus acid dimethyl ester. In the case of urine, the compounds found were hydroxycitric acid, hibiscus acid, hibiscus acid hydroxyethyl ester, hibiscus acid dimethyl ester, chlorogenic acid, neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, methyl gallate, coumaroylquinic acid and N-feruloyltyramine.



Bibliografía



BIBLIOGRAFÍA

[1] I.S. Arvanitoyannis, M. Van Houwelingen-Koukaliaroglou, Functional foods: A survey of health claims, pros and cons, and current legislation, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45 (2005) 385-404.

[2] A. Gurib-Fakim, Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow, *Mol. Aspects Med.* 27 (2006) 1-93.

[3] Robert E. C. Wildman, Mike Kelley. *Nutraceuticals and Functional Food.* Taylor & Francis Group. 2007.

[4] A.T. Diplock, P.J. Aggett, M. Ashwell, F. Bornet, E.B. Fern, M.B. Roberfroid, Scientific Concepts of Functional Foods in Europe: Consensus document, *Br. J. Nutr.* 81 (1999) I-S27.

431

[5] S.L. DeFelice, The nutraceutical revolution: its impact on food industry R&D, *Trends in Food Science and Technology.* 6 (1995) 59-61.

[6] I. Raskin, D.M. Ribnicky, S. Komarnytsky, N. Ilic, A. Poulev, N. Borisjuk, A. Brinker, D.A. Moreno, C. Ripoll, N. Yakoby, J.M. O'Neal, T. Cornwell, I. Pastor, B. Fridlender, Plants and human health in the twenty-first century, *Trends Biotechnol.* 20 (2002) 522-531.

[7] M.J. Balunas, A.D. Kinghorn. Drug discovery from medicinal plants, *Life Sci.* 78 (2005) 431-441.

[8] B. Schmidt, D.M. Ribnicky, A. Poulev, S. Logendra, W.T. Cefalu, I. Raskin, A natural history of botanical therapeutics, *Metabolism: Clinical and Experimental.* 57 (2008) S3-S9.



- [9] J.I. Sotelo-Félix, D. Martinez-Fong, P. Muriel, R.L. Santillán, D. Castillo, P. Yahuaca, Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat, *J. Ethnopharmacol.* 81 (2002) 145-154.
- [10] J. Del Campo, M. Amiot, C. Nguyen, The Antimicrobial effect of rosemary extracts, *J. Food Prot.* 63 (2000) 1359-1368.
- [11] B. Bozin, N. Mimica-Dukic, I. Samojlik, E. Jovin, Antimicrobial and antioxidant properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 7879-7885.
- 432 [12] J. Yamamoto, K. Yamada, A. Naemura, T. Yamashita, R. Arai, Testing various herbs for antithrombotic effect, *Nutrition.* 21 (2005) 580-587.
- [13] M. Haloui, L. Louedec, J. Michel, B. Lyoussi, Experimental diuretic effects of *Rosmarinus officinalis* and *Centaurium erythraea*, *J. Ethnopharmacol.* 71 (2000) 465-472.
- [14] T. Bakirel, U. Bakirel, O.U. Keleş, S.G. Ülgen, H. Yardibi, In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits, *J. Ethnopharmacol.* 116 (2008) 64-73.
- [15] D.G. Machado, L.E.B. Bettio, M.P. Cunha, J.C. Capra, J.B. Dalmarco, M.G. Pizzolatti, A.L.S. Rodrigues, Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: Involvement of the monoaminergic system, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 33 (2009) 642-650.



[16] M.E. González-Trujano, E.I. Peña, A.L. Martínez, J. Moreno, P. Guevara-Fefer, M. Déciga-Campos, F.J. López-Muñoz, Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents, *J. Ethnopharmacol.* 111 (2007) 476-482.

[17] G. Altinier, S. Sosa, R.P. Aquino, T. Mencherini, R.D. Loggia, A. Tubaro, Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L., *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 1718-1723.

[18] Perez-Fons L., M. Garzon T., Micol V., Relationship between the Antioxidant Capacity and Effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Polyphenols on Membrane Phospholipid Order.

[19] A.-. Lo, Y. Liang, S. Lin-Shiau, C. Ho, J.-. Lin, Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor- κ B in mouse macrophages, *Carcinogenesis.* 23 (2002) 983-991.

433

[20] J. Dörrie, K. Sapala, S.J. Zunino, Carnosol-induced apoptosis and downregulation of Bcl-2 in β -lineage leukemia cells, *Cancer Lett.* 170 (2001) 33-39.

[21] S. Huang, C. Ho, S. Lin-Shiau, J. Lin, Carnosol inhibits the invasion of B16/F10 mouse melanoma cells by suppressing metalloproteinase-9 through down-regulating nuclear factor- κ B and c-Jun, *Biochem. Pharmacol.* 69 (2005) 221-232.

[22] H. Sharabani, E. Izumchenko, Q. Wang, R. Kreinin, M. Steiner, Z. Barvish, M. Kafka, Y. Sharoni, J. Levy, M. Uskokovic, G.P. Studzinski, M. Danilenko, Cooperative antitumor effects of vitamin D3 derivatives and rosemary preparations in a



mouse model of myeloid leukemia, *International Journal of Cancer*. 118 (2006) 3012-3021.

[23] J.M. Visanji, D.G. Thompson, P.J. Padfield, Induction of G2/M phase cell cycle arrest by carnosol and carnosic acid is associated with alteration of cyclin A and cyclin B1 levels, *Cancer Lett.* 237 (2006) 130-136.

[24] M.J. Del Baño, J. Lorente, J. Castillo, O. Benavente-García, J. A. Del Río, A. Ortuño, K. Quirin, D. Gerard, Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 4247-4253.

434 [25] M.J. Del Baño, J. Lorente, J. Castillo, O. Benavente-García, M.P. Marín, J.A. Del Río, A. Ortuño, I. Ibarra, Flavonoid distribution during the development of leaves, Flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Postulation of a biosynthetic pathway, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 4987-4992.

[26] L. Almela, B. Sánchez-Muñoz, J.A. Fernández-López, M.J. Roca, V. Rabe, Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material, *Journal of Chromatography A*. 1120 (2006) 221-229.

[27] N.V. Yanishlieva, E. Marinova, J. Pokorný, Natural antioxidants from herbs and spices, *European Journal of Lipid Science and Technology*. 108 (2006) 776-793.

[28] V. Calabrese, G. Scapagnini, C. Catalano, F. Dinotta, D. Geraci, P. Morganti, Biochemical studies of a natural



antioxidant isolated from rosemary and its application in cosmetic dermatology, *Int. J. Tissue React.* 22 (2000) 5-13.

[29] M. Huang, C. Ho, Z.Y. Wang, T. Ferraro, Y.-. Lou, K. Stauber, W. Ma, C. Georgiadis, J.D. Laskin, A.H. Conney, Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid, *Cancer Res.* 54 (1994) 701-708.

[30] B. Aishah, M. Nursabrina, A. Noriham, A.R. Norizzah, H. Mohamad Shahrimi, Anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*, melastoma Malabathricum and Ipomoea batatas and its color properties, *International Food Research Journal.* 20 (2013) 827-834.

[31] K. Duangmal, B. Saicheua, S. Sueeprasan, Colour evaluation of freeze-dried roselle extract as a natural food colorant in a model system of a drink, *LWT - Food Science and Technology.* 41 (2008) 1437-1445.

435

[32] M.L. Wang, B. Morris, B. Tonnis, J. Davis, G.A. Pederson, Assessment of oil content and fatty acid composition variability in two economically important Hibiscus species, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 6620-6626.

[33] M. Ajay, H.J. Chai, A.M. Mustafa, A.H. Gilani, M.R. Mustafa, Mechanisms of the anti-hypertensive effect of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces, *J. Ethnopharmacol.* 109 (2007) 388-393.

[34] H. Mozaffari-Khosravi, B. Jalali-Khanabadi, M. Afkhami-Ardekani, F. Fatehi, Effects of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on lipid profile and lipoproteins in patients with type II diabetes, *Journal of Alternative and Complementary Medicine.* 15 (2009) 899-903.



- [35] D.L. McKay, C.-O. Chen, E. Saltzman, J.B. Blumberg, *Hibiscus Sabdariffa* L. tea (tisane) lowers blood pressure in prehypertensive and mildly hypertensive adults, *J. Nutr.* 140 (2010) 298-303.
- [36] J.-. Liu, C.-. Chen, W.-. Wang, J.-. Hsu, M.-. Yang, C.-. Wang, The protective effects of *Hibiscus sabdariffa* extract on CCl 4-induced liver fibrosis in rats, *Food and Chemical Toxicology.* 44 (2006) 336-343.
- [37] M. Yang, C. Peng, K. Chan, Y.I. Yang, C. Huang, C. Wang, The hypolipidemic effect of *Hibiscus sabdariffa* polyphenols via inhibiting lipogenesis and promoting hepatic lipid clearance, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 850-859.
- [38] G. Yin, L. Cao, P. Xu, G. Jeney, M. Nakao, Hepatoprotective and antioxidant effects of *Hibiscus sabdariffa* extract against carbon tetrachloride-induced hepatocyte damage in *Cyprinus carpio*, *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal.* 47 (2011) 10-15.
- [39] A. Ulubelen, M. Miski, P. Neuman, T.J. Mabry, Flavonoids of *Salvia tomentosa* (labiatae), *J. Nat. Prod.* 42 (1979) 261-263.
- [40] G. Oboh, J.B.T. Rocha, Antioxidant and neuroprotective properties of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*, calyx) and green tea (*Camellia sinensis*) on some pro-oxidant-induced lipid peroxidation in brain in vitro, *Food Biophysics.* 3 (2008) 382-389.
- [41] S. Amos, L. Binda, B.A. Chindo, A. Tseja, A.A. Odotola, C. Wambebe, K. Gamaniel, Neuropharmacological effects of *Hibiscus sabdariffa* aqueous extract, *Pharm. Biol.* 41 (2003) 325-329.



[42] V.M. Mounnissamy, V. Gopal, R. Gunasegaran, A. Saraswathy, Antiinflammatory activity of gossypetin isolated from *Hibiscus sabdariffa*, Indian Journal of Heterocyclic Chemistry. 12 (2002) 85-86.

[43] T.O. Fakeye, A. Pal, D.U. Bawankule, S.P.S. Khanuja, Immunomodulatory effect of extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. (family malvaceae) in a mouse model, Phytotherapy Research. 22 (2008) 664-668.

[44] R. Beltrán-Debón, C. Alonso-Villaverde, G. Aragonès, I. Rodríguez-Medina, A. Rull, V. Micol, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, J. Camps, J. Joven, The aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* calices modulates the production of monocyte chemoattractant protein-1 in humans, Phytomedicine. 17 (2010) 186-191.

[45] H. Lin, H. Huang, C. Huang, J. Chen, C. Wang, Hibiscus polyphenol-rich extract induces apoptosis in human gastric carcinoma cells via p53 phosphorylation and p38 MAPK/FasL cascade pathway, Mol. Carcinog. 43 (2005) 86-99.

437

[46] H.-. Lin, J. Chen, W. Kuo, C. Wang, Chemopreventive properties of *Hibiscus sabdariffa* L. on human gastric carcinoma cells through apoptosis induction and JNK/p38 MAPK signaling activation, Chem. Biol. Interact. 165 (2007) 59-75.

[47] E.O. Farombi, A. Fakoya, Free radical scavenging and antigenotoxic activities of natural phenolic compounds in dried flowers of *Hibiscus sabdariffa* L, Molecular Nutrition and Food Research. 49 (2005) 1120-1128.

[48] K.R. Christian, M.G. Nair, J.C. Jackson, Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory activity of sorrel (*Hibiscus*



sabdariffa), Journal of Food Composition and Analysis. 19 (2006) 778-783.

[49] N. Mohd-Esa, F.S. Hern, A. Ismail, C.L. Yee, Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts and potential exploitation of the seeds, Food Chem. 122 (2010) 1055-1060.

[50] T.O. Ajiboye, N.A. Salawu, M.T. Yakubu, A.T. Oladiji, M.A. Akanji, J.I. Okogun, Antioxidant and drug detoxification potentials of *Hibiscus sabdariffa* anthocyanin extract, Drug Chem. Toxicol. 34 (2011) 109-115.

[51] J. Delgado-Adámez, M.F. Fernández-León, B. Velardo-Micharet, D. González-Gómez, In vitro assays of the antibacterial and antioxidant activity of aqueous leaf extracts from different *Prunus salicina* Lindl. cultivars, Food and Chemical Toxicology. 50 (2012) 2481-2486.

438

[52] D. Jaroni, S. Ravishankar, Bactericidal effects of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) against foodborne pathogens in vitro and on romaine lettuce and alfalfa sprouts, Quality Assurance and Safety of Crops and Foods. 4 (2012) 33-40.

[53] M. Fullerton, J. Khatiwada, J.U. Johnson, S. Davis, L.L. Williams, Determination of antimicrobial activity of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) on esherichia coli O157:H7 isolated from food, veterinary, and clinical samples, Journal of Medicinal Food. 14 (2011) 950-956.

[54] P. Kang, J. Seok, Y. Kim, J. Eun, S. Oh, Antimicrobial and antioxidative effects of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) flower extract and its fractions on skin microorganisms and oxidation, Food Science and Biotechnology. 16 (2007) 409-414.



[55] L. Olatunji, J. Adebayo, A. Adesokan, V. Olatunji, A. Soladoye, Chronic administration of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* enhances Na⁺-K⁺-ATPase and Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase activities of rat heart, *Pharm. Biol.* 44 (2006) 213-216.

[56] C.M. Gurrola-Díaz, P.M. García-López, S. Sánchez-Enríquez, R. Troyo-Sanromán, I. Andrade-González, J.F. Gómez-Leyva, Effects of *Hibiscus sabdariffa* extract powder and preventive treatment (diet) on the lipid profiles of patients with metabolic syndrome (MeSy), *Phytomedicine.* 17 (2010) 500-505.

[57] O. Carvajal-Zarrabal, P.M. Hayward-Jones, Z. Orta-Flores, C. Nolasco-Hipólito, D.M. Barradas-Dermitz, M.G. Aguilar-Uscanga, M.F. Pedroza-Hernández, Effect of *Hibiscus sabdariffa* L. dried calyx ethanol extract on fat absorption-excretion, and body weight implication in rats, *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* (2009).

439

[58] F.J. Alarcon-Aguilar, A. Zamilpa, M.D. Perez-Garcia, J.C. Almanza-Perez, E. Romero-Nuñez, E.A. Campos-Sepulveda, L.I. Vazquez-Carrillo, R. Roman-Ramos, Effect of *Hibiscus sabdariffa* on obesity in MSG mice, *J. Ethnopharmacol.* 114 (2007) 66-71.

[59] S. Fernández-Arroyo, M. Herranz-López, R. Beltrán-Debón, I. Borrás-Linares, E. Barrajon-Catalán, J. Joven, A. Fernández-Gutiérrez, A. Segura-Carretero, V. Micol, Bioavailability study of a polyphenol-enriched extract from *Hibiscus sabdariffa* in rats and associated antioxidant status, *Molecular Nutrition and Food Research.* 56 (2012) 1590-1595.

[60] S. Fernández-Arroyo, I.C. Rodríguez-Medina, R. Beltrán-Debón, F. Pasini, J. Joven, V. Micol, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, Quantification of the polyphenolic



fraction and in vitro antioxidant and in vivo anti-hyperlipemic activities of *Hibiscus sabdariffa* aqueous extract, Food Res. Int. 44 (2011) 1490-1495.

[61] M. Herranz-López, S. Fernández-Arroyo, A. Pérez-Sanchez, E. Barrajón-Catalán, R. Beltrán-Debón, J.A. Menéndez, C. Alonso-Villaverde, A. Segura-Carretero, J. Joven, V. Micol, Synergism of plant-derived polyphenols in adipogenesis: Perspectives and implications, Phytomedicine. 19 (2012) 253-261.

[62] A.L. Hopkins, M.G. Lamm, J.L. Funk, C. Ritenbaugh, *Hibiscus sabdariffa* L. in the treatment of hypertension and hyperlipidemia: A comprehensive review of animal and human studies, Fitoterapia. 85 (2013) 84-94.

440

[63] D. Del Rio, A. Rodriguez-Mateos, J.P.E. Spencer, M. Tognolini, G. Borges, A. Crozier, Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases, Antioxidants and Redox Signaling. 18 (2013) 1818-1892.

[64] X. Han, T. Shen, H. Lou, Dietary polyphenols and their biological significance, International Journal of Molecular Sciences. 8 (2007) 950-988.

[65] K. Robards, P.D. Prenzler, G. Tucker, P. Swatsitang, W. Glover, Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits, Food Chem. 66 (1999) 401-436.

[66] C. La Vecchia, L. Chatenoud, S. Franceschi, M. Soler, F. Parazzini, E. Negri, Vegetables and fruit and human cancer: Update of an italian study, International Journal of Cancer. 82 (1999) 151-152.



[67] F.R. Pérez-López, P. Chedraui, J. Haya, J.L. Cuadros, Effects of the Mediterranean diet on longevity and age-related morbid conditions, *Maturitas*. 64 (2009) 67-79.

[68] P. Knekt, J. Kumpulainen, R. Järvinen, H. Rissanen, M. Heliövaara, A. Reunanen, T. Hakulinen, A. Aromaa, Flavonoid intake and risk of chronic diseases, *Am. J. Clin. Nutr.* 76 (2002) 560-568.

[69] M.G.L. Hertog, D. Kromhout, C. Aravanis, H. Blackburn, R. Buzina, F. Fidanza, S. Giampaoli, A. Jansen, A. Menotti, S. Nedeljkovic, M. Pekkarinen, B.S. Simic, H. Toshima, E.J.M. Feskens, P.C.H. Hollman, M.B. Katan, Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study, *Arch. Intern. Med.* 155 (1995) 381-386.

[70] M.G.L. Hertog, E.J.M. Feskens, P.C.H. Hollman, M.B. Katan, D. Kromhout, Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen Elderly Study, *Lancet*. 342 (1993) 1007-1011.

441

[71] P. Knekt, R. Järvinen, A. Reunanen, J. Maatela, Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: A cohort study, *Br. Med. J.* 312 (1996) 478-481.

[72] Q. Dai, A.R. Borenstein, Y. Wu, J.C. Jackson, E.B. Larson, Fruit and Vegetable Juices and Alzheimer's Disease: The Kame Project, *Am. J. Med.* 119 (2006) 751-759.

[73] N.A. Kelsey, H.M. Wilkins, D.A. Linseman, Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents, *Molecules*. 15 (2010) 7792-7814.



- [74] L. Letenneur, C. Proust-Lima, A. Le Gouge, J.F. Dartigues, P. Barberger-Gateau, Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period, *Am. J. Epidemiol.* 165 (2007) 1364-1371.
- [75] M. Singh, M. Arseneault, T. Sanderson, V. Murthy, C. Ramassamy, Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: Bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 4855-4873.
- [76] S. Franceschi, M. Parpinel, C. La Vecchia, A. Favero, R. Talamini, E. Negri, Role of different types of vegetables and fruit in the prevention of cancer the colon, rectum, and breast, *Epidemiology.* 9 (1998) 338-341.
- 442 [77] M. Pan, C. Lai, J. Wu, C. Ho, Molecular mechanisms for chemoprevention of colorectal cancer by natural dietary compounds, *Molecular Nutrition and Food Research.* 55 (2011) 32-45.
- [78] E.K.J. Pauwels, The protective effect of the mediterranean diet: Focus on cancer and cardiovascular risk, *Medical Principles and Practice.* 20 (2011) 103-111.
- [79] D.A. Evans, J.B. Hirsch, S. Dushenkov, Phenolics, inflammation and nutrigenomics, *J. Sci. Food Agric.* 86 (2006) 2503-2509.
- [80] R.M. Van Dam, F.B. Hu, Coffee consumption and risk of type 2 diabetes: A systematic review, *J. Am. Med. Assoc.* 294 (2005) 97-104.
- [81] L.H. Hartwell, M.B. Kastan, Cell cycle control and cancer, *Science.* 266 (1994) 1821-1828.



- [82] M.L. Smith, I. Chen, Q. Zhan, I. Bae, C. Chen, T.M. Gilmer, M.B. Kastan, P.M. O'Connor, A.J. Fornace Jr., Interaction of the p53-regulated protein gadd45 with proliferating cell nuclear antigen, *Science*. 266 (1994) 1376-1380.
- [83] A.J. Levine, C.A. Finlay, P.W. Hinds, P53 is a tumor suppressor gene, *Cell*. 116 (2004) 67-69.
- [84] A.T. Willingham, Q.L. Deveraux, G.M. Hampton, P. Aza-Blanc, RNAi and HTS: Exploring cancer by systematic loss-of-function, *Oncogene*. 23 (2004) 8392-8400.
- [85] J. Flórez, *Farmacología Humana*, 5ª ed., Elsevier-Maason S. A., Barcelona, 2008.
- [86] P. Rubin, *Oncología Clínica*, 8ª ed., Elsevier S. A., Madrid, 2003.
- [87] D. Feskanich, R.G. Ziegler, D.S. Michaud, E.L. Giovannucci, F.E. Speizer, W.C. Willett, G.A. Colditz, Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women, *J. Natl. Cancer Inst.* 92 (2000) 1812-1823.
- [88] E. Middleton Jr., C. Kandaswami, T.C. Theoharides, The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer, *Pharmacol. Rev.* 52 (2000) 673-751.
- [89] S.J. Duthie, V.L. Dobson, Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro, *Eur. J. Nutr.* 38 (1999) 28-34.



[90] M. Calomme, L. Pieters, A. Vlietinck, D.V. Berghe, Inhibition of bacterial mutagenesis by Citrus flavonoids, *Planta Med.* 62 (1996) 222-226.

[91] B. Plaumann, M. Pritsche, H. Rimpler, G. Brandner, R.D. Hess, Flavonoids activate wild-type p53, *Oncogene.* 13 (1996) 1605-1614.

[92] M.J. Van Erk, P. Roepman, T.R. Van Der Lende, R.H. Stierum, J.M.M.J.G. Aarts, P.J. Van Bladeren, B. Van Ommen, Integrated assessment by multiple gene expression analysis of quercetin bioactivity on anticancer-related mechanisms in colon cancer cells in vitro, *Eur. J. Nutr.* 44 (2005) 143-156.

[93] M. Takada, Y. Ku, K. Habara, T. Ajiki, Y. Suzuki, Y. Kuroda, Inhibitory effect of epigallocatechin-3-gallate on growth and invasion in human biliary tract carcinoma cells, *World J. Surg.* 26 (2002) 683-686.

444

[94] M. Takada, Y. Nakamura, T. Koizumi, H. Toyama, T. Kamigaki, Y. Suzuki, Y. Takeyama, Y. Kuroda, Suppression of human pancreatic carcinoma cell growth and invasion by epigallocatechin-3-gallate, *Pancreas.* 25 (2002) 45-48.

[95] N. Khan, F. Afaq, M. Saleem, N. Ahmad, H. Mukhtar, Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate, *Cancer Res.* 66 (2006) 2500-2505.

[96] C. Oliveras-Ferraro, S. Fernández-Arroyo, A. Vázquez-Martin, J. Lozano-Sánchez, S. Cufí, J. Joven, V. Micol, A. Fernández-Gutiérrez, A. Segura-Carretero, J.A. Menendez, Crude phenolic extracts from extra virgin olive oil circumvent de novo breast cancer resistance to HER1/HER2-targeting drugs by inducing GADD45-sensed cellular stress, G2/M arrest



and hyperacetylation of Histone H3, *Int. J. Oncol.* 38 (2011) 1533-1547.

[97] J. Han, T.P.N. Talorete, P. Yamada, H. Isoda, Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells, *Cytotechnology.* 59 (2009) 45-53.

[98] V. Goulas, V. Exarchou, A.N. Troganis, E. Psomiadou, T. Fotsis, E. Briasoulis, I.P. Gerothanassis, Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells, *Molecular Nutrition and Food Research.* 53 (2009) 600-608.

[99] Z. Bouallagui, J. Han, H. Isoda, S. Sayadi, Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells, *Food and Chemical Toxicology.* 49 (2011) 179-184.

445

[100] S. Fernández-Arroyo, A. Gómez-Martínez, L. Rocamora-Reverte, R. Quirantes-Piné, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, J.A. Ferragut, Application of nanoLC-ESI-TOF-MS for the metabolomic analysis of phenolic compounds from extra-virgin olive oil in treated colon-cancer cells, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 63 (2012) 128-134.

[101] R. Fabiani, A. De Bartolomeo, P. Rosignoli, M. Servili, R. Selvaggini, G.F. Montedoro, C. Di Saverio, G. Morozzi, Virgin olive oil phenols inhibit proliferation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by inducing apoptosis and differentiation, *J. Nutr.* 136 (2006) 614-619.

[102] R. Fabiani, P. Rosignoli, A. De Bartolomeo, R. Fuccelli, M. Servili, G.F. Montedoro, G. Morozzi, Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other



olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells, *J. Nutr.* 138 (2008) 1411-1416.

[103] A. Scalbert, C. Manach, C. Morand, C. Rémésy, L. Jiménez, Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45 (2005) 287-306.

[104] W.A. Khan, Z.Y. Wang, M. Athar, D.R. Bickers, H. Mukhtar, Inhibition of the skin tumorigenicity of (\pm)-7 β ,8 α -dihydroxy-9 α ,10 α -epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[α]pyrene by tannic acid, green tea polyphenols and quercetin in Sencar mice, *Cancer Lett.* 42 (1988) 7-12.

446 [105] M. Inoue, K. Tajima, M. Mizutani, H. Iwata, T. Iwase, S. Miura, K. Hirose, N. Hamajima, S. Tominaga, Regular consumption of green tea and the risk of breast cancer recurrence: Follow-up study from the Hospital-based Epidemiologic Research Program at Aichi Cancer Center (HERPACC), Japan, *Cancer Lett.* 167 (2001) 175-182.

[106] H. Leong, P.S. Mathur, G.L. Greene, Inhibition of mammary tumorigenesis in the C3(1)/SV40 mouse model by green tea, *Breast Cancer Res. Treat.* 107 (2008) 359-369.

[107] C.A. Larsen, R.H. Dashwood, Suppression of Met activation in human colon cancer cells treated with (-)-epigallocatechin-3-gallate: Minor role of hydrogen peroxide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 389 (2009) 527-530.

[108] K.M. Rieger-Christ, R. Hanley, C. Lodowsky, T. Bernier, P. Vemulapalli, M. Roth, J. Kim, A.S. Yee, S.M. Le, P.J. Marie, J.A. Libertino, I.C. Summerhayes, The green tea compound, (-)-epigallocatechin-3-gallate downregulates N-cadherin and suppresses migration of bladder carcinoma cells, *J. Cell. Biochem.* 102 (2007) 377-388.



[109] A. Tavani, C.L. Vecchia, Coffee, decaffeinated coffee, tea and cancer of the colon and rectum: A review of epidemiological studies, 1990-2003, *Cancer Causes and Control*. 15 (2004) 743-757.

[110] A. De Felice, A. Bader, A. Leone, S. Sosa, R. Della Loggia, A. Tubaro, N. De Tommasi, New polyhydroxylated triterpenes and anti-inflammatory activity of *Salvia hierosolymitana*, *Planta Med.* 72 (2006) 643-649.

[111] S.A. Bingham, N.E. Day, R. Luben, P. Ferrari, N. Slimani, T. Norat, F. Clavel-Chapelon, E. Kesse, A. Nieters, H. Boeing, A. Tjønneland, K. Overvad, C. Martinez, M. Dorronsoro, C.A. Gonzalez, T.J. Key, A. Trichopoulou, A. Naska, P. Vineis, R. Tumino, V. Krogh, H.B. Bueno-De-Mesquita, P.H.M. Peeters, G. Berglund, G. Hallmans, E. Lund, G. Skeie, R. Kaaks, E. Riboli, Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): An observational study, *Lancet*. 361 (2003) 1496-1501.

447

[112] M. Konishi, R. Kikuchi-Yanoshita, K. Tanaka, M. Muraoka, A. Onda, Y. Okumura, N. Kishi, T. Iwama, T. Mori, M. Koike, K. Ushio, M. Chiba, S. Nomizu, F. Konishi, J. Utsunomiya, M. Miyaki, Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer, *Gastroenterology*. 111 (1996) 307-317.

[113] L.A. Aaltonen, P. Peltomaki, F.S. Leach, P. Sistonen, L. Pylkkanen, J.-. Mecklin, H. Jarvinen, S.M. Powell, J. Jen, S.R. Hamilton, G.M. Petersen, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, A. De La Chapelle, Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer, *Science*. 260 (1993) 812-816.



- [114] L.A. Aaltonen, R. Salovaara, P. Kristo, F. Canzian, A. Hemminki, P. Peltomäki, R.B. Chadwick, H. Kääriäinen, M. Eskelinen, H. Järvinen, J.-. Mecklin, A. De La Chapelle, A. Percesepe, H. Ahtola, N. Härkönen, R. Julkunen, E. Kangas, S. Ojala, J. Tulikoura, E. Valkamo, Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease, *N. Engl. J. Med.* 338 (1998) 1481-1487.
- [115] K.W. Kinzler, B. Vogelstein, Lessons from hereditary colorectal cancer, *Cell.* 87 (1996) 159-170.
- [116] T.P. Pretlow, T.A. Brasitus, N.C. Fulton, C. Cheyer, E.L. Kaplan, K-ras mutations in putative preneoplastic lesions in human colon, *J. Natl. Cancer Inst.* 85 (1993) 2004-2007.
- 448 [117] S. Ekelund, N. Papadogiannakis, H. Olivecrona, U. Lindfors, Tissue sampling for mutation analysis in colorectal cancer: K-ras is homogeneously distributed throughout the tumor tissue, *Oncol. Rep.* 25 (2011) 253-258.
- [118] M. Hollstein, D. Sidransky, B. Vogelstein, C.C. Harris, p53 Mutations in human cancers, *Science.* 253 (1991) 49-53.
- [119] P. Shaw, R. Bovey, S. Tardy, R. Sahli, B. Sordat, J. Costa, Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 4495-4499.
- [120] N. Hosokawa, Y. Hosokawa, T. Sakai, M. Yoshida, N. Marui, H. Nishino, K. Kawai, A. Aoike, Inhibitory effect of quercetin on the synthesis of a possibly cell-cycle-related 17-kDa protein, in human colon cancer cells, *International Journal of Cancer.* 45 (1990) 1119-1124.



[121] G. Pahlke, Y. Ngiewih, M. Kern, S. Jakobs, D. Marko, G. Eisenbrand, Impact of quercetin and EGCG on key elements of the Wnt pathway in human colon carcinoma cells, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 7075-7082.

[122] B. Shan, M. Wang, R. Li, Quercetin inhibit human SW480 colon cancer growth in association with inhibition of cyclin D1 and survivin expression through Wnt/ β -catenin signaling pathway, *Cancer Invest.* 27 (2009) 604-612.

[123] C.P.R. Xavier, C.F. Lima, A. Preto, R. Seruca, M. Fernandes-Ferreira, C. Pereira-Wilson, Luteolin, quercetin and ursolic acid are potent inhibitors of proliferation and inducers of apoptosis in both KRAS and BRAF mutated human colorectal cancer cells, *Cancer Lett.* 281 (2009) 162-170.

[124] H. Kim, S. Kim, B. Kim, S. Lee, Y. Park, B. Park, S. Kim, J. Kim, C. Choi, J. Kim, S. Cho, J. Jung, K. Roh, K. Kang, J. Jung, Apoptotic effect of quercetin on HT-29 colon cancer cells via the AMPK signaling pathway, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 8643-8650.

449

[125] E.A. Offord, K. Macé, C. Ruffieux, A. Malnoë, A.M.A. Pfeifer, Rosemary components inhibit benzo[a]pyrene-induced genotoxicity in human bronchial cells, *Carcinogenesis.* 16 (1995) 2057-2062.

[126] E.A. Offord, K. Macé, O. Avanti, A.M.A. Pfeifer, Mechanisms involved in the chemoprotective effects of rosemary extract studied in human liver and bronchial cells, *Cancer Lett.* 114 (1997) 275-281.

[127] K. Singletary, C. MacDonald, M. Wallig, Inhibition by rosemary and carnosol of 7,12-dimethylbenz[a] anthracene



(DMBA)-induced rat mammary tumorigenesis and in vivo DMBA-DNA adduct formation, *Cancer Lett.* 104 (1996) 43-48.

[128] P. Debersac, J. Heydel, M. Amiot, H. Goudonnet, Y. Artur, M. Suschetet, M.-. Siess, Induction of cytochrome P450 and/or detoxication enzymes by various extracts of rosemary: Description of specific patterns, *Food and Chemical Toxicology.* 39 (2001) 907-918.

[129] P. Debersac, M. Vernevaut, M. Amiot, M. Suschetet, M. Siess, Effects of a water-soluble extract of rosemary and its purified component rosmarinic acid on xenobiotic-metabolizing enzymes in rat liver, *Food and Chemical Toxicology.* 39 (2001) 109-117.

450 [130] A. Valdés, V. García-Cañas, L. Rocamora-Reverte, Á. Gómez-Martínez, J.A. Ferragut, A. Cifuentes, Effect of rosemary polyphenols on human colon cancer cells: Transcriptomic profiling and functional enrichment analysis, *Genes and Nutrition.* 8 (2013) 43-60.

[131] A. Valdés, C. Simó, C. Ibáñez, L. Rocamora-Reverte, J.A. Ferragut, V. García-Cañas, A. Cifuentes, Effect of dietary polyphenols on K562 leukemia cells: A Foodomics approach, *Electrophoresis.* 33 (2012) 2314-2327.

[132] I. Castillo-Juárez, V. González, H. Jaime-Aguilar, G. Martínez, E. Linares, R. Bye, I. Romero, Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders, *J. Ethnopharmacol.* 122 (2009) 402-405.

[133] J.M.T. Hamilton-Miller, Antimicrobial properties of tea (*Camellia sinensis* L.), *Antimicrob. Agents Chemother.* 39 (1995) 2375-2377.



- [134] T. Taguri, T. Tanaka, I. Kouno, Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 27 (2004) 1965-1969.
- [135] R. Puupponen-Pimiä, L. Nohynek, H. Alakomi, K. Oksman-Caldentey, Bioactive berry compounds - Novel tools against human pathogens, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67 (2005) 8-18.
- [136] S. Moreno, T. Scheyer, C.S. Romano, A.A. Vojnov, Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition, *Free Radic. Res.* 40 (2006) 223-231.
- [137] H. Arima, H. Ashida, G.-. Danno, Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 66 (2002) 1009-1014.
- [138] A.A.P. Almeida, A. Farah, D.A.M. Silva, E.A. Nunan, M.B.A. Glória, Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 8738-8743.
- [139] J. Salas-Salvadó, M. Granada, M. Bulló, A. Corominas, P. Casas, M. Foz, Plasma adiponectin distribution in a Mediterranean population and its association with cardiovascular risk factors and metabolic syndrome, *Metabolism: Clinical and Experimental*. 56 (2007) 1486-1492.
- [140] N. Friedman, E.L. Fanning, Overweight and obesity: An overview of prevalence, clinical impact, and economic impact, *Disease Management*. 7 (2004) 1-6.



- [141] Y. Lin, C. Cheng, Y. Lin, Y. Lau, I. Juan, J. Lin, Hypolipidemic Effect of Green Tea Leaves through Induction of Antioxidant and Phase II Enzymes Including Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione S-Transferase in Rats, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 1893-1899.
- [142] S. Klaus, S. Pültz, C. Thöne-Reineke, S. Wolfram, Epigallocatechin gallate attenuates diet-induced obesity in mice by decreasing energy absorption and increasing fat oxidation, *Int. J. Obes.* 29 (2005) 615-623.
- [143] P. Hung, B. Wu, H. Chen, Y. Chen, C. Chen, M. Wu, H. Liu, M. Lee, Y. Kao, Antimitogenic effect of green tea (-)-epigallocatechin gallate on 3T3-L1 preadipocytes depends on the ERK and Cdk2 pathways, *American Journal of Physiology - Cell Physiology.* 288 (2005) 1094-1108.
- 452 [144] H. Ashida, T. Furuyashiki, H. Nagayasu, H. Bessho, H. Sakakibara, T. Hashimoto, K. Kanazawa, Anti-obesity actions of green tea: possible involvements in modulation of the glucose uptake system and suppression of the adipogenesis-related transcription factors., *Biofactors.* 22 (2004) 135-140.
- [145] R.B. Birari, K.K. Bhutani, Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential, *Drug Discov. Today.* 12 (2007) 879-889.
- [146] P. Slanc, B. Doljak, S. Kreft, M. Lunder, D. Janeš, B. Štrukelj, Screening of selected food and medicinal plant extracts for pancreatic lipase inhibition, *Phytotherapy Research.* 23 (2009) 874-877.
- [147] K. Kawaguchi, T. Mizuno, K. Aida, K. Uchino, Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and



Pseudomonas, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 61 (1997) 102-104.

[148] H. Quesada, J.M. Del Bas, D. Pajuelo, S. Díaz, J. Fernandez-Larrea, M. Pinent, L. Arola, M.J. Salvadó, C. Bladé, Grape seed proanthocyanidins correct dyslipidemia associated with a high-fat diet in rats and repress genes controlling lipogenesis and VLDL assembling in liver, *Int. J. Obes.* 33 (2009) 1007-1012.

[149] H. Sugiyama, Y. Akazome, T. Shoji, A. Yamaguchi, M. Yasue, T. Kanda, Y. Ohtake, Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 4604-4609.

[150] X. Terra, G. Montagut, M. Bustos, N. Llopiz, A. Ardèvol, C. Bladé, J. Fernández-Larrea, G. Pujadas, J. Salvadó, L. Arola, M. Blay, Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet, *J. Nutr. Biochem.* 20 (2009) 210-218.

453

[151] C. Chuang, M.K. McIntosh, Potential mechanisms by which polyphenol-rich grapes prevent obesity-mediated inflammation and metabolic diseases, *Annual Review of Nutrition.* 31 (2011) 155-176.

[152] K. Charradi, H. Sebai, S. Elkahoui, F. Ben Hassine, F. Limam, E. Aouani, Grape seed extract alleviates high-fat diet-induced obesity and heart dysfunction by preventing cardiac siderosis, *Cardiovascular Toxicology.* 11 (2011) 28-37.

[153] H.J. Park, J. Lee, M. Chung, Y. Park, A.M. Bower, S.I. Koo, C. Giardina, R.S. Bruno, Green tea extract suppresses NFκB activation and inflammatory responses in diet-induced obese



rats with nonalcoholic steatohepatitis, *Journal of Nutrition*. 142 (2012) 57-63.

[154] J. Ahn, H. Lee, S. Kim, T. Ha, Curcumin-induced suppression of adipogenic differentiation is accompanied by activation of Wnt/ β -catenin signaling, *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 298 (2010) 1510-1516.

[155] A. Ejaz, D. Wu, P. Kwan, M. Meydani, Curcumin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and angiogenesis and obesity in C57/BL mice, *J. Nutr.* 139 (2009) 919-925.

[156] C. Chen, J. Hsu, S. Wang, H. Chiang, M. Yang, E. Kao, Y. Ho, C. Wang, *Hibiscus sabdariffa* extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 5472-5477.

454 [157] T. Lin, H. Lin, C. Chen, M. Lin, M. Chou, C. Wang, *Hibiscus sabdariffa* extract reduces serum cholesterol in men and women, *Nutr. Res.* 27 (2007) 140-145.

[158] G.C. Shayne, Alternatives to in vivo studies in toxicology, *General and applied toxicology*. 1 (1999) 178-182.

[159] G. Eisenbrand, B. Pool-Zobel, V. Baker, M. Balls, B.J. Blaauboer, A. Boobis, A. Carere, S. Kevekordes, J. Lhuguenot, R. Pieters, J. Kleiner, Methods of in vitro toxicology, *Food and Chemical Toxicology*. 40 (2002) 193-236.

[160] A. Crozier, D. Del Rio, M.N. Clifford, Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds, *Mol. Aspects Med.* 31 (2010) 446-467.

[161] L.W. Wormhoudt, J.N.M. Commandeur, N.P.E. Vermeulen, Genetic polymorphisms of human N-



acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione-S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: Relevance to xenobiotic metabolism and toxicity, *Crit. Rev. Toxicol.* 29 (1999) 59-124.

[162] A. Scalbert, C. Morand, C. Manach, C. Rémésy, Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health, *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 56 (2002) 276-282.

[163] L. Bravo, Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, *Nutr. Rev.* 56 (1998) 317-333.

[164] M. Naczki, F. Shahidi, Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1523-1542.

[165] J.M. Harnly, S. Bhagwat, L. Lin, Profiling methods for the determination of phenolic compounds in foods and dietary supplements, *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 389 (2007) 47-61.

[166] C.D. Stalikas, Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids, *Journal of Separation Science.* 30 (2007) 3268-3295.

[167] K. Robards, Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables, *Journal of Chromatography A.* 1000 (2003) 657-691.

[168] A. Castañeda-Ovando, M.d.L. Pacheco-Hernández, M.E. Páez-Hernández, J.A. Rodríguez, C.A. Galán-Vidal, Chemical studies of anthocyanins: A review, *Food Chem.* 113 (2009) 859-871.



[169] I. Ignat, I. Volf, V.I. Popa, A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables, *Food Chem.* 126 (2011) 1821-1835.

[170] D.L. Luthria, Significance of sample preparation in developing analytical methodologies for accurate estimation of bioactive compounds in functional foods, *J. Sci. Food Agric.* 86 (2006) 2266-2272.

[171] J. Shi, L. Kassama, Supercritical Fluid Technology for Extraction of Bioactive Components, in: John Shi (Ed.), Taylor and Francis, Londres, 2007, pp. 3-43.

[172] M. Herrero, A. Cifuentes, E. Ibañez, Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae - A review, *Food Chem.* 98 (2006) 136-148.

456

[173] N.L. Rozzi, R.K. Singh, Supercritical fluids and the food industry, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 1 (2002) 33-44.

[174] B. Díaz-Reinoso, A. Moure, H. Domínguez, J.C. Parajó, Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 2441-2469.

[175] K. Ganzler, A. Salgó, K. Valkó, Microwave extraction. A novel sample preparation method for chromatography, *Journal of Chromatography A.* 371 (1986) 299-306.

[176] S. Rodríguez-Rojo, A. Visentin, D. Maestri, M.J. Cocero, Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents, *J. Food Eng.* 109 (2012) 98-103.



- [177] C. Proestos, M. Komaitis, Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds, *LWT - Food Science and Technology*. 41 (2008) 652-659.
- [178] P. Tatke, Y. Jaiswal, An overview of microwave assisted extraction and its applications in herbal drug research, *Research Journal of Medicinal Plant*. 5 (2011) 21-31.
- [179] K.D. Raner, C.R. Strauss, F. Vyskoc, L. Mokbel, A comparison of reaction kinetics observed under microwave irradiation and conventional heating, *J. Org. Chem*. 58 (1993) 950-953.
- [180] C.W. Huie, A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 373 (2002) 23-30.
- [181] X. Pan, G. Niu, H. Liu, Microwave-assisted extraction of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* bunge with analysis by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*. 922 (2001) 371-375.
- [182] V. Mandal, Y. Mohan, S. Hemalatha, Microwave assisted extraction of curcumin by sample-solvent dual heating mechanism using Taguchi L9 orthogonal design, *J. Pharm. Biomed. Anal*. 46 (2008) 322-327.
- [183] M. Careri, C. Corradini, L. Elviri, A. Mangia, Optimization of a rapid microwave assisted extraction method for the liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry determination of isoflavonoid aglycones in soybeans, *Journal of Chromatography A*. 1152 (2007) 274-279.



[184] F. Du, X. Xiao, X. Luo, G. Li, Application of ionic liquids in the microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds from medicinal plants, *Talanta*. 78 (2009) 1177-1184.

[185] G. Du, H.Y. Zhao, Q.W. Zhang, G.H. Li, F.Q. Yang, Y. Wang, Y.C. Li, Y.T. Wang, A rapid method for simultaneous determination of 14 phenolic compounds in *Radix puerariae* using microwave-assisted extraction and ultra high performance liquid chromatography coupled with diode array detection and time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*. 1217 (2010) 705-714.

[186] O.O. Okoh, A.P. Sadimenko, A.J. Afolayan, Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods, *Food Chem.* 120 (2010) 308-312.

458

[187] T. Liu, X. Sui, R. Zhang, L. Yang, Y. Zu, L. Zhang, Y. Zhang, Z. Zhang, Application of ionic liquids based microwave-assisted simultaneous extraction of carnosic acid, rosmarinic acid and essential oil from *Rosmarinus officinalis*, *Journal of Chromatography A*. 1218 (2011) 8480-8489.

[188] L.Y. Rios, M.P. Gonthier, C. Rémésy, I. Mila, C. Lapierre, S.A. Lazarus, G. Williamson, A. Scalbert, Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects., *Am. J. Clin. Nutr.* 77 (2003) 912-918.

[189] W. Mullen, G. Borges, M.E.J. Lean, S.A. Roberts, A. Crozier, Identification of metabolites in human plasma and urine after consumption of a Polyphenol-Rich juice drink, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 2586-2595.



[190] M.-. Gonthier, L.Y. Rios, M.-. Verny, C. Rémésy, A. Scalbert, Novel liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry method for the quantification in human urine of microbial aromatic acid metabolites derived from dietary polyphenols, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 789 (2003) 247-255.

[191] L.I. Mennen, D. Sapinho, H. Ito, P. Galan, S. Hercberg, A. Scalbert, Urinary excretion of 13 dietary flavonoids and phenolic acids in free-living healthy subjects - Variability and possible use as biomarkers of polyphenol intake, *Eur. J. Clin. Nutr.* 62 (2008) 519-525.

[192] M.T. Díez, P.G. del Moral, J.A. Resines, M.J. Arn, Determination of phenolic compounds derived from hydrolysable tannins in biological matrices by RP-HPLC, *Journal of Separation Science*. 31 (2008) 2797-2803.

459

[193] R. García-Villalba, A. Carrasco-Pancorbo, E. Nevedomskaya, O.A. Mayboroda, A.M. Deelder, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, Exploratory analysis of human urine by LC-ESI-TOF MS after high intake of olive oil: Understanding the metabolism of polyphenols, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 398 (2010) 463-475.

[194] S. Shahrzad, I. Bitsch, Determination of gallic acid and its metabolites in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*. 705 (1998) 87-95.

[195] R.L. Prior, T.R. Rogers, R.C. Khanal, S.E. Wilkes, X. Wu, L.R. Howard, Urinary excretion of Phenolic acids in rats fed cranberry, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 3940-3949.



- [196] E. Azzini, P. Vitaglione, F. Intorre, A. Napolitano, A. Durazzo, M.S. Foddai, A. Fumagalli, G. Catasta, L. Rossi, E. Venneria, A. Raguzzini, L. Palomba, V. Fogliano, G. Maiani, Bioavailability of strawberry antioxidants in human subjects, *Br. J. Nutr.* 104 (2010) 1165-1173.
- [197] K. Hosoda, T. Furuta, K. Ishii, Metabolism and disposition of isoflavone conjugated metabolites in humans after ingestion of kinako, *Drug Metab. Disposition.* 39 (2011) 1762-1767.
- [198] J. Linseisen, S. Rohrmann, Biomarkers of dietary intake of flavonoids and phenolic acids for studying diet-cancer relationship in humans, *Eur. J. Nutr.* 47 (2008) 60-68.
- [199] A. Papadopoulou, R.A. Frazier, Characterization of protein-polyphenol interactions, *Trends in Food Science and Technology.* 15 (2004) 186-190.
- 460 [200] Y. Liu, X. Li, Y. Li, L. Wang, M. Xue, Simultaneous determination of danshensu, rosmarinic acid, cryptotanshinone, tanshinone IIA, tanshinone I and dihydrotanshinone I by liquid chromatographic-mass spectrometry and the application to pharmacokinetics in rats, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53 (2010) 698-704.
- [201] E.J. Want, G. O'Maille, C.A. Smith, T.R. Brandon, W. Uritboonthai, C. Qin, S.A. Trauger, G. Siuzdak, Solvent-dependent metabolite distribution, clustering, and protein extraction for serum profiling with mass spectrometry, *Anal. Chem.* 78 (2006) 743-752.
- [202] S.J. Bruce, P. Jonsson, H. Antti, O. Cloarec, J. Trygg, S.L. Marklund, T. Moritz, Evaluation of a protocol for metabolic profiling studies on human blood plasma by combined ultra-



performance liquid chromatography/mass spectrometry: From extraction to data analysis, *Anal. Biochem.* 372 (2008) 237-249.

[203] A. Tsarbopoulos, E. Gikas, N. Papadopoulos, N. Aligiannis, A. Kafatos, Simultaneous determination of oleuropein and its metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences.* 785 (2003) 157-164.

[204] V. Ruiz-Gutierrez, M.E. Juan, A. Cert, J.M. Planas, Determination of hydroxytyrosol in plasma by HPLC, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4458-4461.

[205] K. Hosoda, T. Furuta, A. Yokokawa, K. Ogura, A. Hiratsuka, K. Ishii, Plasma profiling of intact isoflavone metabolites by high-performance liquid chromatography and mass spectrometric identification of flavone glycosides daidzin and genistin in human plasma after administration of kinako, *Drug Metab. Disposition.* 36 (2008) 1485-1495.

461

[206] M. Suárez, M.-. Romero, A. Macià, R.M. Valls, S. Fernández, R. Solà, M.-. Motilva, Improved method for identifying and quantifying olive oil phenolic compounds and their metabolites in human plasma by microelution solid-phase extraction plate and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences.* 877 (2009) 4097-4106.

[207] A. Carrasco-Pancorbo, C. Neusüß, M. Pelsing, A. Segura-Carretero, A. Fernandez Gutiérrez, CE- and HPLC-TOF-MS for the characterization of phenolic compounds in olive oil, *Electrophoresis.* 28 (2007) 806-821.



[208] L. Arce, M. Teresa Tena, A. Ríos, M. Valcárcel, Determination of trans-resveratrol and other polyphenols in wines by a continuous flow sample clean-up system followed by capillary electrophoresis separation, *Anal. Chim. Acta.* 359 (1998) 27-38.

[209] L. Arce, A. Ríos, M. Valcárcel, Determination of anti-carcinogenic polyphenols present in green tea using capillary electrophoresis coupled to a flow injection system, *Journal of Chromatography A.* 827 (1998) 113-120.

[210] Y. Peng, F. Liu, Y. Peng, J. Ye, Determination of polyphenols in apple juice and cider by capillary electrophoresis with electrochemical detection, *Food Chem.* 92 (2005) 169-175.

462

[211] J. Chen, S.-. Li, P. Li, Y. Song, X.-. Chai, D.-. Ma, Qualitative and quantitative analysis of active flavonoids in *Flos Ionicerae* by capillary zone electrophoresis coupled with solid-phase extraction, *Journal of Separation Science.* 28 (2005) 365-372.

[212] R. Quirantes-Piné, D. Arráez-Román, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, Characterization of phenolic and other polar compounds in a lemon verbena extract by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry, *Journal of Separation Science.* 33 (2010) 2818-2827.

[213] S. Gabriella, A. Veronica, C. Virginia, D. Leontin, M. Zaharie, Determination of phenolic compounds from wine samples by GC/MS system, *Rev. Chim.* 63 (2012) 855-858.

[214] F. de Souza Dias, M.F. Silva, J.M. David, Determination of Quercetin, Gallic Acid, Resveratrol, Catechin and Malvidin



in Brazilian Wines Elaborated in the Vale do São Francisco Using Liquid-Liquid Extraction Assisted by Ultrasound and GC-MS, *Food Analytical Methods*. 6 (2013) 963-968.

[215] L. Cai, J.A. Koziel, M. Dharmadhikari, J. (Hans) van Leeuwen, Rapid determination of trans-resveratrol in red wine by solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and multidimensional gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*. 1216 (2009) 281-287.

[216] Y. Zuo, C. Wang, J. Zhan, Separation, characterization, and quantitation of benzoic and phenolic antioxidants in American cranberry fruit by GC-MS, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 3789-3794.

[217] M. Saraji, F. Mousavinia, Single-drop microextraction followed by in-syringe derivatization and gas chromatography-mass spectrometric detection for determination of organic acids in fruits and fruit juices, *Journal of Separation Science*. 29 (2006) 1223-1229.

463

[218] Z. Füzfai, I. Molnár-Perl, Gas chromatographic-mass spectrometric fragmentation study of flavonoids as their trimethylsilyl derivatives: Analysis of flavonoids, sugars, carboxylic and amino acids in model systems and in citrus fruits, *Journal of Chromatography A*. 1149 (2007) 88-101.

[219] S. Peters, E. Kaal, I. Horsting, H. Janssen, An automated method for the analysis of phenolic acids in plasma based on ion-pairing micro-extraction coupled on-line to gas chromatography/mass spectrometry with in-liner derivatisation, *Journal of Chromatography A*. 1226 (2012) 71-76.



- [220] D.G. Watson, E.J. Oliveira, Solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry determination of kaempferol and quercetin in human urine after consumption of *Ginkgo biloba* tablets, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 723 (1999) 203-210.
- [221] J. Vacek, B. Klejdus, L. Lojtková, V. Kubán, Current trends in isolation, separation, determination and identification of isoflavones: A review, *Journal of Separation Science*. 31 (2008) 2054-2067.
- [222] G. Desmet, D. Cabooter, P. Gzil, H. Verelst, D. Mangelings, Y.V. Heyden, D. Clicq, Future of high pressure liquid chromatography: Do we need porosity or do we need pressure?, *Journal of Chromatography A*. 1130 (2006) 158-166.
- 464 [223] R.L. Prior, L. Gu, Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet, *Phytochemistry*. 66 (2005) 2264-2280.
- [224] N. Vanbeneden, F. Delvaux, F.R. Delvaux, Determination of hydroxycinnamic acids and volatile phenols in wort and beer by isocratic high-performance liquid chromatography using electrochemical detection, *Journal of Chromatography A*. 1136 (2006) 237-242.
- [225] M. Iranshahi, Y. Amanzadeh, Rapid isocratic HPLC analysis of caffeic acid derivatives from *Echinacea purpurea* cultivated in Iran, *Chemistry of Natural Compounds*. 44 (2008) 190-193.
- [226] F. Cuyckens, M. Claeys, Optimization of a liquid chromatography method based on simultaneous electrospray ionization mass spectrometric and ultraviolet photodiode



array detection for analysis of flavonoid glycosides, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 16 (2002) 2341-2348.

[227] C. Cavaliere, P. Foglia, R. Gubbiotti, P. Sacchetti, R. Samperi, A. Laganà, Rapid-resolution liquid chromatography/mass spectrometry for determination and quantitation of polyphenols in grape berries, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 22 (2008) 3089-3099.

[228] B. Abad-García, L.A. Berrueta, S. Garmón-Lobato, B. Gallo, F. Vicente, A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*. 1216 (2009) 5398-5415.

[229] H. Green, O. Kehinde, An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion, *Cell*. 5 (1975) 19-27.

465

[230] R. Quirantes-Piné, V. Verardo, D. Arráez-Román, S. Fernández-Arroyo, V. Micol, M.F. Caboni, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, Evaluation of different extraction approaches for the determination of phenolic compounds and their metabolites in plasma by nanoLC-ESI-TOF-MS, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 404 (2012) 3081-3090.

[231] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology and Medicine*. 26 (1999) 1231-1237.

[232] M. Kosar, H.J.D. Dorman, R. Hiltunen, Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant



characteristics of extracts from selected Lamiaceae species, *Food Chem.* 91 (2005) 525-533.

[233] C. Chang, M. Yang, H. Wen, J. Chern, Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods, *J. Food Drug Anal.* 10 (2002) 178-182.

[234] Z. Zhang, X. Kou, K. Fugal, J. McLaughlin, Comparison of HPLC Methods for Determination of Anthocyanins and Anthocyanidins in Bilberry Extracts, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 688-691.

[235] F. Senorans J., Ibanez E., Cavero S., Tabera J., Reglero G., Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of supercritical-fluid extracts of rosemary plants.

466 [236] Herrero M., Plaza M., Cifuentes A., Ibanez E., Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in-vitro assays.

[237] N. Babovic, S. Djilas, M. Jadranin, V. Vajs, J. Ivanovic, S. Petrovic, I. Zizovic, Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant fractions from selected Lamiaceae herbs and their antioxidant capacity, *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* 11 (2010) 98-107.

[238] J. Ivanović, S. Dilas, M. Jadranin, V. Vajs, N. Babović, S. Petrović, I. Žižović, Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.), *Journal of the Serbian Chemical Society.* 74 (2009) 717-732.



- [239] M. Kivilompolo, T. Hyötyläinen, On-line coupled dynamic sonication-assisted extraction-liquid chromatography for the determination of phenolic acids in Lamiaceae herbs, *Journal of Chromatography A*. 1216 (2009) 892-896.
- [240] A. Crozier, I.B. Jaganath, M.N. Clifford, Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health, *Nat. Prod. Rep.* 26 (2009) 1001-1043.
- [241] N. Nakatani, Phenolic antioxidants from herbs and spices, *Biofactors*. 13 (2000) 141-146.
- [242] E.H.A. Doolaege, K. Raes, K. Smet, M. Andjelkovic, C. Van Poucke, S. De Smet, R. Verhé, Characterization of two unknown compounds in methanol extracts of rosemary oil, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 7283-7287.
- [243] Herrero M., Garcia-Canas V., Simo C., Cifuentes A., Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis and Foodomics.
- [244] M.B. Hossain, D.K. Rai, N.P. Brunton, A.B. Martin-Diana, A.C. Barry-Ryan, Characterization of phenolic composition in lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 10576-10581.
- [245] N. Bai, K. He, M. Roller, C.-. Lai, X. Shao, M.-. Pan, C.-. Ho, Flavonoids and phenolic compounds from *rosmarinus officinalis*, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 5363-5367.
- [246] T. Nakasugi, Antimutagens involving in the leaves of *Rosmarinus officinalis* L., *Natural Medicines*. 50 (1996) 354-357.



- [247] A.A. Mahmoud, S.S. Al-Shihry, B.W. Son, Diterpenoid quinones from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), *Phytochemistry*. 66 (2005) 1685-1690.
- [248] A.K. Genena, H. Hense, A. Smânia Jr., S.M. De Souza, Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) - A study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide, *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*. 28 (2008) 463-469.
- [249] V. Vrchovská, J. Spilková, P. Valentão, C. Sousa, P.B. Andrade, R.M. Seabra, Antioxidative properties and phytochemical composition of *Ballota nigra* infusion, *Food Chem*. 105 (2007) 1396-1403.
- [250] C. Koukoulitsa, A. Karioti, M.C. Bergonzi, G. Pescitelli, L. Di Bari, H. Skaltsa, Polar constituents from the aerial parts of *Origanum vulgare* L. Ssp. *hirtum* growing wild in Greece, *J. Agric. Food Chem*. 54 (2006) 5388-5392.
- 468 [251] U.W. Hawas, S.K. El-Desoky, S.A. Kawashty, M. Sharaf, Two new flavonoids from *Origanum vulgare*, *Natural Product Research*. 22 (2008) 1540-1543.
- [252] T. Fujita, Y. Takeda, S. Han-dong, Y. Minami, T. Marunaka, S. Takeda, Y. Yamada, T. Togo, Cytotoxic and antitumor activities of Rabdosia diterpenoids, *Planta Med*. 54 (1988) 414-417.
- [253] A.G. González, T. Abad, I.A. Jiménez, A.G. Ravelo, J.G. Luis Zahira Aguiar, L. San Andrés, M. Plasencia, J.R. Herrera, L. Moujir, A first study of antibacterial activity of diterpenes isolated from some *Salvia species* (Lamiaceae), *Biochem. Syst. Ecol*. 17 (1989) 293-296.



[254] A. Müller, M. Ganzera, H. Stuppner, Analysis of phenolic glycosides and saponins in *Primula elatior* and *Primula veris* (primula root) by liquid chromatography, evaporative light scattering detection and mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*. 1112 (2006) 218-223.

[255] L.O. Regasini, J.C.R. Velloso, D.H.S. Silva, M. Furlan, O.M.M. de Oliveira, N.M. Khalil, I.L. Brunetti, M.C.M. Young, E.J. Barreiro, V.S. Bolzani, Flavonols from *Pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors, *Phytochemistry*. 69 (2008) 1739-1744.

[256] L.O.A. Manguro, P. Lemmen, Phenolics of *Moringa oleifera* leaves, *Natural Product Research*. 21 (2007) 56-68.

[257] I. Fecka, S. Turek, Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques, *Food Chem*. 108 (2008) 1039-1053.

469

[258] N.K. Chirikova, D.N. Olennikov, L.M. Tankhaeva, Quantitative determination of flavonoid content in the aerial part of *Baical scullcap* (*Scutellaria baicalensis* Georgi), *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 36 (2010) 915-922.

[259] J.C. Luis, R. Martín, I. Frías, F. Valdés, Enhanced carnosic acid levels in two rosemary accessions exposed to cold stress conditions, *J. Agric. Food Chem*. 55 (2007) 8062-8066.

[260] T. Akihisa, S. Kamo, T. Uchiyama, H. Akazawa, N. Banno, Y. Taguchi, K. Yasukawa, Cytotoxic activity of *Perilla frutescens* var. japonica leaf extract is due to high concentrations of oleanolic and ursolic acids, *Journal of Natural Medicines*. 60 (2006) 331-333.



[261] M.-. Cuvelier, H. Richard, C. Berset, Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary, *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*. 73 (1996) 645-652.

[262] M. Arisawa, T. Hayashi, K. Ohmura, K. Nagayama, M. Shimizu, N. Morita, L.H. Berganza, Chemical and pharmaceutical studies on medicinal plants in Paraguay: Studies on "Romero," part 2, *J. Nat. Prod.* 50 (1987) 1164-1166.

[263] N. Okamura, H. Haraguchi, K. Hashimoto, A. Yagi, Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves, *Phytochemistry*. 37 (1994) 1463-1466.

470 [264] V.G. Kontogianni, G. Tomic, I. Nikolic, A.A. Nerantzaki, N. Sayyad, S. Stosic-Grujicic, I. Stojanovic, I.P. Gerothanassis, A.G. Tzakos, Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity, *Food Chem.* 136 (2013) 120-129.

[265] Y. Zhang, J.P. Smuts, E. Dodbiba, R. Rangarajan, J.C. Lang, D.W. Armstrong, Degradation study of carnosic acid, carnosol, rosmarinic acid, and rosemary extract (*rosmarinus officinalis* L.) assessed using HPLC, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 9305-9314.

[266] M. Gómez-Romero, G. Zurek, B. Schneider, C. Baessmann, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, Automated identification of phenolics in plant-derived foods by using library search approach, *Food Chem.* 124 (2011) 379-386.



[267] M.A. Collins, H.P. Charles, Antimicrobial activity of Carnosol and Ursolic acid: Two anti-oxidant constituents of *Rosmarinus officinalis* L., *Food Microbiol.* 4 (1987) 311-315.

[268] G. Zgórka, K. Glowniak, Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26 (2001) 79-87.

[269] R. Kasimu, K. Tanaka, Y. Tezuka, Z.-. Gong, J.-. Li, P. Basnet, T. Namba, S. Kadota, Comparative study of seventeen *Salvia* plants: Aldose reductase inhibitory activity of water and MeOH extracts and liquid chromatography- mass spectrometry (LC-MS) analysis of water extracts, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.* 46 (1998) 500-504.

[270] M. Yoshida, M. Fuchigami, T. Nagao, H. Okabe, K. Matsunaga, J. Takata, Y. Karube, R. Tsuchihashi, J. Kinjo, K. Mihashi, T. Fujioka, Antiproliferative constituents from umbelliferae plants VII. Active triterpenes and rosmarinic acid from *Centella asiatica*, *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 28 (2005) 173-175.

471

[271] N. Banno, T. Akihisa, H. Tokuda, K. Yasukawa, H. Higashihara, M. Ukiya, K. Watanabe, Y. Kimura, J. Hasegawa, H. Nishino, Triterpene acids from the leaves of *Perilla frutescens* and their anti-inflammatory and antitumor-promoting effects, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.* 68 (2004) 85-90.

[272] X. Chen, L. Hu, X. Su, L. Kong, M. Ye, H. Zou, Separation and detection of compounds in Honeysuckle by integration of ion-exchange chromatography fractionation with reversed-phase liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometer and matrix-assisted laser



desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 559-570.

[273] Schwarz K., Ternes W., antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*.1. Determination of phenolic diterpenes with antioxidative activity amongst tocochromanols using HPLC.

[274] Yesil-Celiktas O., Girgin G., Orhan H., H. Wichers J., Bedir E., Vardar-Sukan F., Screening of free radical scavenging capacity and antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts with focus on location and harvesting times.

[275] O. Yesil-Celiktas, C. Sevimli, E. Bedir, F. Vardar-Sukan, Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines, *Plant Foods for Human Nutrition.* 65 (2010) 158-163.

472

[276] G. Vicente, S. Molina, M. González-Vallinas, M.R. García-Risco, T. Fornari, G. Reglero, A.R. de Molina, Supercritical rosemary extracts, their antioxidant activity and effect on hepatic tumor progression, *Journal of Supercritical Fluids* (2012).

[277] J. Tai, S. Cheung, M. Wu, D. Hasman, Antiproliferation effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on human ovarian cancer cells in vitro, *Phytomedicine.* 19 (2012) 436-443.

[278] J.J. Johnson, Carnosol: A promising anti-cancer and anti-inflammatory agent, *Cancer Lett.* 305 (2011) 1-7.

[279] M.N. Laszczyk, Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy, *Planta Med.* 75 (2009) 1549-1560.



[280] A. Vallverdú-Queralt, O. Jáuregui, A. Medina-Remón, C. Andrés-Lacueva, R.M. Lamuela-Raventós, Improved characterization of tomato polyphenols using liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap quadrupole Orbitrap mass spectrometry and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 24 (2010) 2986-2992.

[281] M. Kanthimathi, R. Soranam, Antibacterial effects of *Emblica officinalis* and *Phyllanthus niruri* crude extracts against bacterial pathogens., *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Science*. 3 (2013) 20-23.

[282] D.A. Khan, F. Hassan, H. Ullah, S. Karim, A. Baseer, M.A. Abid, M. Ubaidi, S.A. Khan, G. Murtaza, Antibacterial activity of *Phyllanthus emblica*, *Coriandrum sativum*, *Culinaris medic*, *Lawsonia alba* and *Cucumis sativus*., *Acta Pol. Pharm.* 70 (2013) 855-859.

473

[283] M. Johnson, E.G. Wesely, M.S. Kavitha, V. Uma, Antibacterial activity of leaves and inter-nodal callus extracts of *Mentha arvensis* L, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 4 (2011) 196-200.

[284] T.M. Bincy, K. Khan, S.K. Sharma, L. Singh, M.K. Upadhy, In-vitro evaluation of anti-microbial and anti-oxidant activity of *Emblica officinalis* juice powder. , *Advances in Pharmacology and Pharmacy*. 1 (2013) 9-12.

[285] F. Malekzadeh, H. Ehsanifar, M. Shahamat, M. Levin, R.R. Colwell, Antibacterial activity of black myrobalan (*Terminalia chebula* Retz) against *Helicobacter pylori*, *Int. J. Antimicrob. Agents*. 18 (2001) 85-88.



[286] C. Morand, C. Manach, V. Crespy, C. Remesy, Respective bioavailability of quercetin aglycone and its glycosides in a rat model, *Biofactors*. 12 (2000) 169-174.

[287] C. Morand, C. Manach, V. Crespy, C. Remesy, Quercetin 3-o- β -glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma, *Free Radic. Res.* 33 (2000) 667-676.

[288] R.A. Walgren, U.K. Walle, T. Walle, Transport of Quercetin and Its Glucosides across Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cells, *Biochem. Pharmacol.* 55 (1998) 1721-1727.

[289] M.N. Chabane, A. Al Ahmad, J. Peluso, C.D. Muller, G. Ubeaud, Quercetin and naringenin transport across human intestinal Caco-2 cells, *J. Pharm. Pharmacol.* 61 (2009) 1473-1483.

474

[290] J. Boyer, D. Brown, H.L. Rui, Uptake of quercetin and quercetin 3-glucoside from whole onion and apple peel extracts by Caco-2 cell monolayers, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 7172-7179.

[291] J.P.E. Spencer, G.G.C. Kuhnle, R.J. Williams, C. Rice-Evans, Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites, *Biochem. J.* 372 (2003) 173-181.

[292] C.Y. Han, A.Y. Kargi, M. Omer, C.K. Chan, M. Wabitsch, K.D. O'Brien, T.N. Wight, A. Chait, Differential effect of saturated and unsaturated free fatty acids on the generation of monocyte adhesion and chemotactic factors by adipocytes: Dissociation of adipocyte hypertrophy from inflammation, *Diabetes*. 59 (2010) 386-396.



[293] S. Furukawa, T. Fujita, M. Shimabukuro, M. Iwaki, Y. Yamada, Y. Nakajima, O. Nakayama, M. Makishima, M. Matsuda, I. Shimomura, Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome, *J. Clin. Invest.* 114 (2004) 1752-1761.

[294] K.A. Youdim, M.S. Dobbie, G. Kuhnle, A.R. Proteggente, N.J. Abbott, C. Rice-Evans, Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: *In vitro* studies, *J. Neurochem.* 85 (2003) 180-192.

[295] J.H. Hooijberg, H.J. Broxterman, M. Heijn, D.L.A. Fles, J. Lankelma, H.M. Pinedo, Modulation by (iso)flavonoids of the ATPase activity of the multidrug resistance protein, *FEBS Lett.* 413 (1997) 344-348.

[296] A.R. Proteggente, S. Basu-Modak, G. Kuhnle, M.J. Gordon, K. Youdim, R. Tyrrel, C.A. Rice-Evans, Hesperetin glucuronide, a photoprotective agent arising from flavonoid metabolism in human skin fibroblasts, *Photochem. Photobiol.* 78 (2003) 256-261.

475

[297] M. Beaulieu, E. Lévesque, D.W. Hum, A. Bélanger, Isolation and characterization of a human orphan UDP-Glucuronosyltransferase, UGT2B11, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248 (1998) 44-50.

[298] D.S. Vienneau, U. DeBoni, P.G. Wells, Potential genoprotective role for UDP-glucuronosyltransferases in chemical carcinogenesis: Initiation of micronuclei by benzo(α)pyrene and benzo(α)pyrene in UDP-glucuronosyltransferase-deficient cultured rat skin fibroblasts, *Cancer Res.* 55 (1995) 1045-1051.



[299] W.H.M. Peters, W.A. Allebes, P.L.M. Jansen, L.G. Poels, P.J.A. Capel, Characterization and tissue specificity of a monoclonal antibody against human uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransferase, *Gastroenterology*. 93 (1987) 162-169.

[300] J. Yang, M.A. Della-Fera, S. Rayalam, S. Ambati, D.L. Hartzell, H.J. Park, C.A. Baile, Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercetin, *Life Sci*. 82 (2008) 1032-1039.

