



FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA Y ANALÍTICA

**CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO DE COMPUESTOS
BIOACTIVOS EN ESPECIES VEGETALES**

TESIS DOCTORAL

MARÍA DEL PILAR FERNÁNDEZ POYATOS

DIRIGIDA POR
DR. D. ANTONIO RUIZ MEDINA
DR. D. EULOGIO JOSÉ LLORENT MARTÍNEZ

CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN ESPECIES VEGETALES

Directores:

Fdo. Dr. Antonio Ruiz Medina
Catedrático
Universidad de Jaén

Fdo. Dr. Eulogio J. Llorent Martínez
Profesor Ayudante Doctor
Universidad de Jaén

Fdo. M^a Pilar Fernández Poyatos
Jaén, 2020

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría aprovechar estas líneas para agradecer a todas aquellas personas que de alguna u otra forma han participado y contribuido en la realización de esta Tesis Doctoral, dedicando su tiempo y recursos de manera desinteresada y en pro de mi propio beneficio.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores de tesis Antonio Ruiz Medina y Eulogio J. Llorent Martínez. Agradezco la confianza que depositasteis en mí, ofreciéndome la oportunidad de poder realizar mis estudios de doctorado con vosotros. Gracias por darme el empujoncito que necesitaba para atreverme a ello, por vuestra dedicación y calidez humana. Muchas gracias a los dos, si hoy estoy aquí, a las puertas de esta oportunidad, es gracias a vosotros.

Muchas gracias al departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Jaén por poner a mi disposición lo que he necesitado para la realización de esta Tesis Doctoral. En especial, quiero dar las gracias a M^a Luisa, Pilar, M^a José, Ana, Marina, Cecilia, Paco y los compañeros del área de Química Física. Entre todos formáis un gran equipo humano, siempre dispuestos a ayudar. He aprendido mucho con vosotros.

Indudablemente, este camino no hubiese sido igual sin mis chicas “del plátano”: Alba, Mada y Sara. En vosotras encontré un gran apoyo en este complicado camino. Muchas gracias. Nunca olvidaré nuestras risas, complicidades, locuras y agobios. Gracias Mamen por formar parte también de todo esto. Sé que me llevo grandes amigas. Gracias Juan Ortega por los inicios, siempre tan atento y generoso, me ayudaste muchísimo. Y gracias Julio por los ratitos de desconexión en la pasarela.

Gracias a todos los compañeros de laboratorio que en algún momento han formado parte del departamento. A todos los amigos y compañeros que he ido dejando atrás durante las diferentes etapas recorridas hasta llegar aquí. Cada

persona es un mundo, sólo hay que atreverse a descubrirlo, y yo en este camino he descubierto mundos maravillosos.

También quiero dar las gracias a mis compañeros del CICT. Sois todos grandes profesionales y excelentísimas personas. Mención especial a mis amigos Mercedes, Felipe, Balta, Óscar y Juan. Con vosotros he pasado muy buenos momentos y cada uno ha sabido ganarse un pedacito de mí.

En lo personal, tengo que dar las gracias a mis padres Antonio y Pilar. Papá, eres la fuerza, el coraje, la sabiduría, el mejor guerrero. Mamá, eres la alegría, el apoyo, la energía, el timón del barco. Gracias a los dos por educarme, por inculcarme unos valores y hacerme la persona que soy. Gracias a mi hermana Eva. Eres la creatividad, una soñadora. Siempre has creído en mí y me has apoyado en todos los pasos que he dado. Gracias a mi familia. Estoy realmente orgullosa de vosotros.

Y por supuesto dar las gracias a Juanjo. Mi principal apoyo, mi confidente, mi vía de escape. Siempre que te necesito estás ahí. Has sido comprensivo conmigo durante todo este tiempo. No son momentos fáciles pero todo saldrá bien. Tenemos un proyecto adelante. Gracias por estar a mi lado.

Gracias a todos. Conocerlos me ha hecho llegar a dónde estoy. Os quiero.

A mi padre

A mi madre

A mi hermana

Índice

ÍNDICE

1. RESUMEN	17
2. OBJETIVOS	25
3. INTRODUCCIÓN	29
3.1. Características y propiedades de los compuestos fenólicos	29
3.2. Clasificación de los compuestos fenólicos	34
3.2.1. Flavonoides.....	35
3.2.2. Ácidos fenólicos.....	40
3.2.3. Secoiridoides	42
3.3. Rutas biosintéticas y biodisponibilidad de los compuestos fenólicos	43
3.3.1. Rutas biosintéticas.....	43
3.3.1.1. Flavonoides.....	44
3.3.1.2. Ácidos fenólicos.....	46
3.3.1.3. Secoiridoides	48
3.3.2. Biodisponibilidad	49
3.4. Análisis de muestras vegetales	52
3.4.1. Caracterización y cuantificación de compuestos fenólicos.....	52
3.4.1.1. Tratamiento de muestra	53
3.4.1.2. Análisis de compuestos fenólicos.....	57
3.4.2. Determinación del contenido mineral	69
3.5. Evaluación de la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos mediante ensayos <i>in vitro</i>	73
3.5.1. ABTS ⁺	77
3.5.2. DPPH.....	78
3.5.3. FRAP.....	80
3.5.4. CUPRAC.....	81

3.5.5. Fosfomolibdeno.....	82
3.5.6. Capacidad quelante de metales	83
3.6. Inhibición enzimática.....	84
3.6.1. Colinesterasas.....	86
3.6.2. Tirosinasa.....	88
3.6.3. α -amilasa	90
3.6.4. α -glucosidasa.....	92
3.6.5. Lipasa.....	93
3.7. Plantas y frutos de estudio.....	95
3.7.1. <i>Berberis</i>	95
3.7.1.1. <i>Berberis thunbergii</i>	96
3.7.1.2. <i>Berberis hispanica</i>	97
3.7.2. <i>Sarcocapnos</i>	98
3.7.2.1. <i>Sarcocapnos enneaphylla</i>	99
3.7.2.2. <i>Sarcocapnos pulcherrima</i>	99
3.7.2.3. <i>Sarcocapnos saetabensis</i>	100
3.7.3. <i>Portulaca oleracea</i> L.	101
3.7.4. <i>Olea europaea</i> L.....	102
3.7.4.1. <i>Olea europaea</i> L. cv. Cornezuelo	103
3.7.4.2. <i>Olea europaea</i> L. cv. Cornicabra.....	104
3.7.4.3. <i>Olea europaea</i> L. cv. Picual.....	105
3.7.4.4. <i>Olea europaea</i> L. cv. Royal	105
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	109
PARTE I. Desarrollo de metodologías analíticas para el análisis y la caracterización de compuestos bioactivos en distintas especies de plantas ...	111
4.1. Caracterización fenólica, actividad antioxidante y propiedades de inhibición enzimática de las hojas de <i>Berberis thunbergii</i> DC.: una fuente valiosa de ácidos fenólicos	113

4.2. Determinación espectrofotométrica de las propiedades antioxidantes y caracterización del contenido fenólico mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección diodo array y espectrometría de masas en tándem (HPLC-DAD-MS/MS) de las hojas de <i>Berberis hispanica</i> Boiss. & Reut.	116
4.3. Estudio de tres especies de <i>Sarcocapnos</i> como posibles fuentes de compuestos bioactivos: relación entre contenido fenólico y bioactividad mediante análisis multivariante	119
4.4. Composición fitoquímica y actividad antioxidante de <i>Portulaca oleracea</i> : influencia del proceso de cocinado al vapor	122
PARTE II. Desarrollo de metodologías analíticas para el análisis y la caracterización de compuestos bioactivos en frutos de <i>Olea europaea</i> L.	125
4.5. Perfil fitoquímico, contenido mineral y actividad antioxidante de la aceituna de mesa <i>Olea europaea</i> L. cv. Cornezuelo. Influencia de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> simulada	127
4.6. Perfil fitoquímico y contenido mineral de aceitunas de la variedad Royal. Influencia del estado de maduración	130
4.7. Efecto de la maduración sobre la composición fenólica y el contenido mineral de tres variedades de aceitunas	132
5. CONCLUSIONES	137
6. BIBLIOGRAFÍA	143
ANEXOS	165
A) Contribuciones científicas derivadas de esta memoria	165
1. Publicaciones científicas	165
2. Comunicaciones a congresos	166
3. Divulgación científica	166

Índice

B) Otras contribuciones científicas.....	167
1. Publicaciones científicas.....	167
2. Comunicaciones a congresos	167
C) Acrónimos y abreviaturas	168
D) Índice de tablas.....	171
E) Índice de figuras	172

Resumen

1. RESUMEN

En los últimos años, el aumento de las enfermedades crónicas y degenerativas se ha convertido en un importante problema de salud en los países desarrollados. En base a esto, las especies vegetales han despertado un gran interés por ser fuente de compuestos biológicamente activos, con efectos beneficiosos para el organismo.

El objeto principal de esta Memoria se enfoca en el estudio de la composición fenólica, así como de la capacidad antioxidante y actividad de inhibición enzimática de especies vegetales cuya composición química y bioactividad no se conocen en detalle, bien por no haber sido estudiadas en profundidad o por no haber sido analizadas hasta la fecha, pudiendo ser fuentes potenciales de compuestos de interés para la industria farmacéutica o alimentaria. Asimismo, la Memoria aborda el análisis del fruto de diferentes variedades de *Olea europaea* L. (aceituna), analizando también el contenido mineral y la influencia de su digestión mediante la simulación de una digestión gastrointestinal *in vitro*.

Las especies vegetales y frutos seleccionados fueron recogidos en diferentes localizaciones de la provincia de Jaén. Entre ellas se encuentran:

- dos especies del género *Berberis*: *B. thunbergii* y *B. hispanica*
- tres especies del género *Sarcocapnos*: *S. enneaphylla*, *S. pulcherrima* y *S. saetabensis*
- *Portulaca oleracea* L.
- cuatro variedades de *Olea europaea* L.: Cornezuelo, Cornicabra, Picual y Royal.

La determinación del perfil fitoquímico se realizó en todas las especies vegetales y aceituna en estudio, empleando para ello la cromatografía líquida de alta resolución con espectrometría de masas (HPLC-MS). Previo a esto, se llevaron a cabo diferentes tratamientos de muestra en función de la matriz de cada una de las muestras.

Para el análisis de la capacidad antioxidante, se han estudiado los extractos de todas las especies de plantas mencionadas anteriormente y de la aceituna de mesa de la variedad Cornezuelo. Para la medida del potencial antioxidante se emplearon diferentes ensayos espectrofotométricos, obteniendo así una visión más general de la capacidad antioxidante que presenta cada una de las muestras.

Para determinar la actividad de inhibición enzimática de las especies e identificar su potencial farmacológico se han realizado diferentes ensayos enfocados a evaluar la efectividad de los extractos en el tratamiento de enfermedades comunes. Estos ensayos han sido llevados a cabo en las plantas de la especie *Berberis thunbergii* y en las tres especies de *Sarcocapnos* estudiadas.

Por otro lado, el estudio de la biodisponibilidad de los polifenoles mediante la simulación de digestiones gastrointestinales *in vitro* se realizó exclusivamente a la aceituna de la variedad Cornezuelo, la cual previamente había sido tratada para convertirse en un producto apto para ser consumido por el ser humano (aceituna de mesa).

Finalmente, la composición inorgánica fue determinada en todas las variedades de *Olea europaea* L. presentes en este estudio mediante la técnica de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), requiriendo inicialmente una previa digestión de las muestras en un sistema de digestión por microondas.

Los trabajos desarrollados, fruto de las determinaciones realizadas a las especies vegetales de estudio, han dado lugar a siete artículos de investigación divididos en dos bloques. La primera parte engloba los trabajos realizados a las diferentes especies de plantas analizadas y la segunda parte acoge los estudios llevados a cabo sobre los frutos de diversas variedades de *Olea europaea* L.

Parte I. Desarrollo de metodologías analíticas para el análisis y la caracterización de compuestos bioactivos en distintas especies de plantas.

1. El artículo 1 trata acerca de la caracterización fenólica, la actividad antioxidante y las propiedades de inhibición enzimática de las hojas de *Berberis thunbergii* DC. en dos medios de extracción diferentes: metanol y agua. En su estudio, se ha podido observar que esta especie es una fuente valiosa de ácidos fenólicos. Además, se han llevado a cabo diferentes ensayos antioxidantes (ABTS, DPPH, FRAP, CUPRAC, ensayo del fosfomolibdeno y ensayo de la capacidad quelante de metales) que han reportado datos de una elevada capacidad antioxidante en las hojas de *B. thunbergii*. Los estudios de inhibición enzimática realizados para las enzimas colinesterasas, tirosinasa, amilasa, glucosidasa y lipasa mostraron que el extracto metanólico era más activo frente a estas enzimas que el extracto acuoso, debido a la mayor concentración de compuestos fenólicos.
2. En el artículo 2 se estudian las propiedades antioxidantes en las hojas de otra especie de *Berberis*, *Berberis hispanica* Boiss. & Reut., mediante los ensayos de ABTS y DPPH. Los test se realizaron en medio metanólico y acuoso, observándose una capacidad antioxidante mayor en los extractos en metanol. Además, se llevó a cabo la caracterización de su perfil fenólico mediante cromatografía líquida de alta resolución con diodo array y detección con espectrómetro de masas (HPLC-DAD-MS/MS), indicando que los ácidos fenólicos son los compuestos más abundantes en la composición de las hojas de *B. hispanica*.
3. El artículo 3 abarca el estudio de la bioactividad y el perfil fenólico de las tres especies de *Sarcocapnos* seleccionadas en dos medios de extracción diferentes (metanol y agua). Los compuestos más abundantes que

presentaron estas especies fueron en su mayoría flavonoides y ácidos fenólicos. Los ensayos antioxidantes (ABTS, DPPH, FRAP, CUPRAC, ensayo del fosfomolibdeno y ensayo de la capacidad quelante de metales) y los estudios de inhibición enzimática realizados (enzimas colinesterasas, tirosinasa, amilasa y glucosidasa) mostraron que el extracto metanólico de cada especie era el más activo, siendo *S. enneaphylla* la especie que presentó un mayor contenido fenólico y una mayor bioactividad.

4. El artículo 4 recoge un estudio comparativo del perfil fenólico y de las propiedades antioxidantes de una especie comestible, la *Portulaca oleracea* L., en su estado crudo y cocinada al vapor. Se identificaron dos nuevos alcaloides, las oleraceínas X e Y. En cuanto a las propiedades antioxidantes, se llevaron a cabo los ensayos ABTS y DPPH. Se observó que el proceso de cocinado disminuía tanto la composición fenólica como la actividad antioxidante.

Parte II. Desarrollo de metodologías analíticas para el análisis y la caracterización de compuestos bioactivos en frutos de *Olea europaea* L.

5. El artículo 5 se centra en el estudio del perfil fitoquímico, el contenido mineral y la actividad antioxidante de la aceituna de mesa de la variedad Cornezuelo. En él se determina que la composición está formada mayoritariamente por secoiridoides. Además, se estudió la influencia de la digestión de estas aceitunas de mesa mediante la simulación de una digestión gastrointestinal *in vitro*, observándose que aproximadamente la mitad de los compuestos fenólicos se pierden durante el proceso de la digestión, aunque sigue permaneciendo aún importante actividad antioxidante en los extractos digeridos.

6. En el artículo 6 se estudia el perfil fitoquímico y el contenido mineral en la variedad de aceituna Royal, evaluando la influencia del estado de maduración del fruto durante cuatro meses consecutivos (de octubre a enero). La oleuropeína fue el compuesto mayoritario en cada una de las etapas, obteniéndose un mayor valor de este compuesto y de la suma de todos los fenoles individuales en el último mes. No se observó una correlación entre los valores obtenidos del contenido inorgánico y el contenido fenólico.

7. El artículo 7 recoge el estudio del efecto de la maduración en la composición fenólica de tres variedades de aceitunas: Cornezuelo, Cornicabra y Picual. El trabajo abarca dos temporadas consecutivas, en donde se ha ido realizando la determinación del perfil fenólico, además de la composición mineral. Se puede observar que la variedad Cornezuelo presenta la mayor concentración de fenoles, con una tendencia generalizada al alza en las tres variedades conforme el transcurso de la temporada, en la mayoría de los casos. Por otro lado, no se observó una tendencia clara en los valores obtenidos de contenido inorgánico.

Objetivos

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente Memoria es el análisis de la composición química y de la actividad biológica de especies vegetales y frutos poco o nada estudiados hasta la fecha, centrándonos especialmente en la composición fenólica de los mismos.

El gran interés existente en la actualidad respecto al empleo de productos vegetales para su incorporación en la dieta (actuando como medicina preventiva), o para disponer de nuevas fuentes naturales de compuestos biológicamente activos que sustituyan a los compuestos sintéticos en el campo de la farmacología, hacen necesario su estudio para su posible revalorización en base a potenciales aplicaciones en las industrias alimentaria, farmacológica y cosmética.

Los objetivos específicos que se han propuesto son los siguientes:

- 1) Desarrollar métodos analíticos eficaces para la extracción de compuestos fenólicos en las muestras vegetales, considerando aspectos referentes a la preparación de la muestra, posibles interferencias, efecto del disolvente, así como el desarrollo de metodologías para el análisis de dichos compuestos fenólicos mediante HPLC-MS.
- 2) Identificar y cuantificar los principales compuestos fenólicos en las especies vegetales y frutos seleccionados.
- 3) Analizar la capacidad antioxidante de los extractos previamente analizados. Se estudiará el potencial antioxidante empleando diferentes ensayos. De esta manera se conseguirá obtener una visión global de la capacidad antioxidante dependiendo del mecanismo de acción en el que se basa cada ensayo.

Objetivos

- 4) Identificar el potencial farmacológico de los extractos analizados mediante la realización de ensayos de inhibición enzimática, un enfoque habitualmente recomendado para evaluar la efectividad de los extractos en el tratamiento de enfermedades concretas y muy comunes en la sociedad, tales como el Alzheimer o la diabetes.
- 5) Estudiar la biodisponibilidad de los polifenoles mediante la simulación de digestiones gastrointestinales *in vitro*.
- 6) Identificar y cuantificar el contenido inorgánico en las especies seleccionadas mediante ICP-MS.

Introducción

3. INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas de salud que comparten los países desarrollados es el incremento de las enfermedades crónicas y neurodegenerativas que padecen sus habitantes. Este hecho ha provocado en la comunidad científica un interés general por encontrar factores que prevengan su aparición.

Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que una dieta rica en frutas y verduras puede prevenir o ralentizar la aparición de estas enfermedades, debido a la presencia de compuestos bioactivos en dichos alimentos. Los compuestos bioactivos o también llamados fitoquímicos, son compuestos beneficiosos para la salud, que aunque no son esenciales para nuestro organismo, potencian la acción de otros nutrientes [1].

Entre estos compuestos bioactivos se encuentran los compuestos fenólicos o polifenoles, un amplio grupo de compuestos con un elevado poder antioxidante, capaz de prevenir los procesos degenerativos ocurridos en el organismo debido a un exceso de radicales libres.

3.1. Características y propiedades de los compuestos fenólicos

Existen aproximadamente más de 200.000 compuestos químicos identificados procedentes de plantas de todo el planeta. Este gran número de compuestos producidos por las plantas se divide en dos grupos principales: los metabolitos primarios y los metabolitos secundarios.

Los metabolitos primarios son compuestos que poseen papeles fundamentales en el desarrollo de la planta, como son la fotosíntesis, la respiración y el crecimiento. Están constituidos por ácidos grasos, aminoácidos, carbohidratos, esteroides, nucleótidos y lípidos [2].

Por otro lado, están los metabolitos secundarios. Éstos no participan directamente en los procesos respiratorios de las plantas, pero son esenciales para su supervivencia ya que son sintetizados en respuesta a condiciones de estrés, siendo los responsables de la defensa de las plantas, además de estar asociados a la morfología y a la absorción de nutrientes. También se relacionan los metabolitos secundarios con la reproducción de las plantas; los colores que les proporcionan actúan atrayendo a polinizadores y animales para dispersar las semillas [3–5].

Estos metabolitos secundarios son estructuralmente diversos y muchos de ellos se distribuyen entre un número muy limitado de especies de plantas, lo que conlleva a la individualidad de las especies, aunque en algunos casos pueden encontrarse en altas concentraciones.

Los metabolitos secundarios pueden clasificarse en función de sus rutas biosintéticas en tres grandes grupos: los terpenoides, los metabolitos que contienen nitrógeno y los compuestos fenólicos [2]. Este último grupo, el de los compuestos fenólicos o polifenoles, con origen en el mundo vegetal, son una clase de metabolitos secundarios de bajo y medio peso molecular sintetizados durante el desarrollo de la planta [6,7]. Desempeñan un papel importante en el crecimiento y reproducción de las plantas, involucrados principalmente en la protección contra patógenos, depredadores y otros factores, como la radiación ultravioleta del sol [8,9]. Además, contribuyen al color y a las características sensoriales de los vegetales, proporcionándoles diferentes sabores, aromas e incluso toques astringentes [3,10,11].

Los polifenoles son los principales antioxidantes que forman parte de nuestra dieta [12]. Se encuentran en casi todos los alimentos de origen vegetal, como el té, el vino tinto, el aceite de oliva virgen, el cacao, la fresa, etc., constituyendo el grupo más extenso de sustancias no energéticas presentes en los alimentos vegetales [6]. Algunos polifenoles son pigmentos naturales, que además de actuar como antioxidantes, aportan color y dan sabor a los alimentos, influyendo

en la calidad, estabilidad y aceptabilidad de los mismos. En la **Tabla 1** se muestran las cantidades de fenoles totales presentes en algunas especies vegetales [13].

Tabla 1. Fenoles totales en diferentes muestras vegetales.

Vegetal	Fenoles totales (mg/100 g)	Vegetal	Fenoles totales (mg/100 g)
Ajo	81.2	Espárrago	64.0
Alcachofa	330.4	Espinaca	89.4
Apio	13.5	Pepino	18.9
Brócoli	109.5	Pimiento rojo	76.5
Calabacín	26.4	Pimiento verde	44.6
Chile rojo	158.1	Repollo	105.2
Coliflor	62.3	Zanahoria	14.6

Generalmente, los alimentos contienen una mezcla compleja de polifenoles, con concentraciones muy variables para un mismo alimento. Se estima que la ingesta promedio de polifenoles es de 1 gramo al día, lo que es 10 veces mayor que la de vitamina C y 100 veces mayor que la de vitamina E. Factores medioambientales como la luz y el grado de maduración, el clima o factores agronómicos como la variedad o el cultivo, pueden afectar al contenido total de polifenoles. Además, el grado de conservación, los hábitos culinarios y la biodisponibilidad en el organismo influirán también en su contenido final [6,12,14,15]. En la **Tabla 2** se comparan hábitos alimentarios de los consumidores en la ingesta diaria de 5 raciones de frutas y hortalizas, obteniendo cantidades finales de polifenoles muy diferentes [15].

Tabla 2. Diferencias en los hábitos alimentarios del consumidor en la ingesta de polifenoles de 5 raciones de frutas y hortalizas.

Fruta/Verdura	Variedad Procedimiento	Cantidad polifenoles (mg)	Variedad Procedimiento	Cantidad polifenoles (mg)
Melocotón (una pieza)	<i>Snow king</i> Sin pelar	110	<i>Flavor Crest</i> Pelado	14
Uva (100 g)	<i>Napoleón</i> Sin pelar/con pepitas	50	<i>Napoleón</i> Pelada/sin pepitas	5
Naranja (una pieza)	<i>Navel</i> Pelada/con albedo	400	<i>Navel</i> Pelada/sin albedo	100
Lechuga (100 g)	<i>Lollo rosso</i>	300	<i>Iceberg</i> blanca	10
Espinaca (100 g)	Cocinada microondas	120	Hervida	50
5 raciones al día	Total polifenoles	960 mg	Total polifenoles	179 mg

El creciente interés de los últimos tiempos hacia los polifenoles radica principalmente en las diversas actividades biológicas y los efectos positivos que presentan para la salud. Algunas de las características que muestran estos compuestos incluyen propiedades antioxidantes, antialérgicas, antiinflamatorias, antivíricas y antibacterianas [12,16,17].

Los polifenoles centran su acción en la neutralización de especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS) causantes de la oxidación celular y el estrés oxidativo, tales como el peróxido de hidrógeno o el radical anión superóxido. La oxidación celular es un mecanismo esencial en los procesos metabólicos celulares, producida por la generación de radicales libres al metabolizar el oxígeno necesario para nuestra supervivencia. Un nivel equilibrado de radicales libres en el organismo es normal. La problemática surge cuando estos radicales libres no se

neutralizan de forma adecuada y aparece un desequilibrio, produciéndose una excesiva exposición a especies oxidantes frente a una capacidad antioxidante disminuida. Es aquí cuando aparece el estrés oxidativo, causante de enfermedades crónicas [18].

Los polifenoles actúan capturando radicales libres para generar radicales menos reactivos, en donde los electrones desapareados están más deslocalizados. Además, algunos polifenoles pueden quelar iones metálicos de transición, como el hierro o el cobre, evitando así la formación de las ROS [6].

Los investigadores han avalado las propiedades biológicas de los polifenoles, justificando sus efectos beneficiosos en la salud humana por el elevado potencial antioxidante que presentan. Además, estudios epidemiológicos aportan cada vez más evidencias y sugieren que la ingesta moderada a largo plazo de compuestos fenólicos de origen vegetal puede mejorar la salud. Una dieta rica en polifenoles está relacionada con un menor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y respiratorias, arteriosclerosis, hipertensión, inflamaciones y diabetes, donde están involucradas especies reactivas de oxígeno [6,15,19–23].

Como consecuencia de la acción antioxidante, los polifenoles evitan o retrasan la aparición de muchas enfermedades crónicas. En el ámbito de las enfermedades neurodegenerativas, los compuestos fenólicos están relacionados con la prevención de dolencias como el Alzheimer o la esclerosis múltiple [24,25]. También se relaciona la actividad biológica de los polifenoles con la prevención de algunos tipos de cáncer (colon, mama, pulmón o próstata) [26,27]. Existen compuestos fenólicos con actividad estrogénica (fitoestrógenos) y otros son capaces de fijar metales y proteínas, afectando a su biodisponibilidad, produciendo efectos diversos, como antimicrobianos [15].

Debido a todo este conjunto de propiedades, los extractos naturales ricos en polifenoles se perfilan como posibles candidatos para ser utilizados en el

desarrollo de nuevos productos en las industrias farmacéutica, alimentaria y cosmética [12].

3.2. Clasificación de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se caracterizan por tener al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo unidos, variando desde moléculas fenólicas simples hasta compuestos altamente polimerizados [10,28]. Su clasificación depende del número y la disposición de los átomos de carbono de la estructura básica y se pueden encontrar en forma libre (agliconas) o unidos con moléculas de azúcar y ácidos orgánicos [29]. En la **Tabla 3** se muestra la clasificación de los compuestos fenólicos en función de su estructura básica [30].

Tabla 3. Clasificación de los compuestos fenólicos.

Número de carbonos	Estructura	Clasificación
6	C6	Fenoles simples
7	C6-C1	Ácidos fenólicos
8	C6-C2	Acetofenonas
8	C6-C2	Ácidos fenilacéticos
9	C6-C3	Ácidos hidroxicinámicos
9	C6-C3	Cumarinas
10	C6-C4	Naftoquinonas
13	C6-C1-C6	Xantonas
14	C6-C2-C6	Estilbenos
15	C6-C3-C6	Flavonoides

Existen más de 8.000 compuestos fenólicos identificados [31], pero en este trabajo nos centraremos principalmente en los flavonoides y los ácidos fenólicos, ya que son los grupos de fenoles más relevantes en las plantas de estudio. Además, se prestará especial interés a los secoiridoides, una familia de compuestos fenólicos presentes en plantas pertenecientes a la familia *Oleaceae*, a la cual pertenece la *Olea europaea* L.

3.2.1. Flavonoides

Los flavonoides constituyen el mayor grupo de compuestos fenólicos, englobando más de 4.000 compuestos encontrados en alimentos vegetales [7,16]. La mayoría son pigmentos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, cuyo nombre deriva del latín “*flavus*” que significa amarillo [6]. Los flavonoides tienen bajo peso molecular; se caracterizan por tener un esqueleto de 15 átomos de carbono, distribuidos en una composición C₆-C₃-C₆ (fenilbenzopirano), constituidos de dos anillos aromáticos (A y B) unidos por un puente de tres carbonos, normalmente en forma de un anillo heterocíclico oxigenado (C). Los átomos de carbono individuales de los anillos A, B y C se numeran mediante un sistema que utiliza números ordinarios para los anillos A y C, y mediante números primos para el anillo B (Figura 1) [6,32,33].

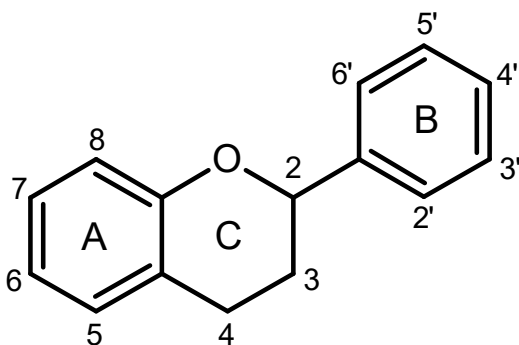


Figura 1. Estructura de una molécula flavonoide.

Dependiendo de la posición del enlace entre el anillo aromático (B) y el benzopirano (A+C), este grupo puede ser dividido en tres clases: (1) los flavonoides (2-fenilbenzopiranos), (2) los isoflavonoides (3-fenilbenzopiranos) y (3) los neoflavonoides (4-fenilbenzopiranos). En la **Figura 2** se muestran sus estructuras básicas [34]. Estos grupos generalmente comparten un precursor común de chalcona, por lo que están relacionados biogénicamente y estructuralmente.

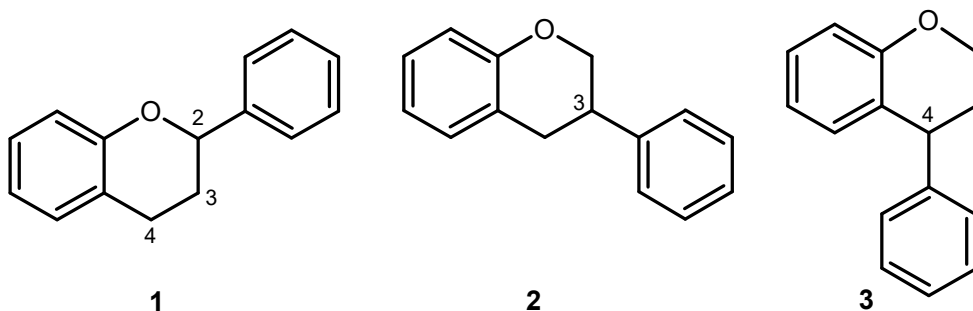


Figura 2. Clases de flavonoides.

El anillo heterocíclico de tres carbonos (C) es el principal responsable de las diferentes clases de flavonoides. Las variaciones en sus patrones de sustitución proporcionan las principales clases de flavonoides: flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavan-3-oles y antocianidinas [10]. Las variaciones en los anillos aromáticos (A y B) dan lugar a los diferentes compuestos dentro de la clase de flavonoides, debiéndose a sustituciones de oxigenación, alquilación, glicosilación y acilación [6,10]. En la **Figura 3** se muestran las estructuras básicas de las principales clases de flavonoides.

Los flavonoides suelen almacenarse en las plantas unidos a una o más moléculas de azúcar (denominándose glucósidos), generando una estructura más estable que en su forma libre (denominada aglicona). Estos glucósidos pueden presentar enlaces *O*-glucósidos con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno, o como *C*-glucósidos con los carbohidratos ligados a través de enlaces carbono-carbono, siendo los enlaces *O*-glucósidos los mayoritarios. En los enlaces

O-glucósidos, los residuos de azúcar normalmente están unidos a grupos 3, 7 o 4-hidroxilo, mientras que para los C-glucósidos, están unidos a C-6 o C-8 [6,35].

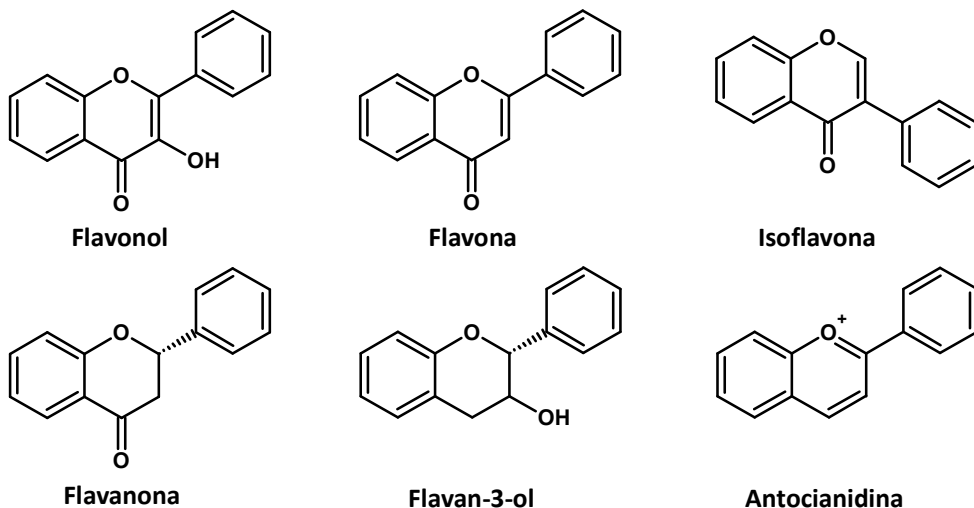


Figura 3. Estructura básica de las principales clases de flavonoides.

El número de flavonoides presentes en las plantas, verduras y frutas depende de muchos factores. Algunos de estos factores son la variedad de las especies, las condiciones climáticas, parte de la planta, el cultivo y el grado de madurez. Además su posterior cocinado o almacenamiento también pueden provocar alteraciones en su cantidad [30].

La mayoría de los flavonoides presenta una coloración entre amarilla y roja. Este hecho se debe a la presencia de cromóforos conjugados presentes en las moléculas, siendo los responsables de la gama de colores que presentan flores, frutas y semillas. Pero no solo son responsables del color, sino que también participan en el sabor de los alimentos [30].

A continuación se detallan las principales clases de flavonoides existentes.

3.2.1.1. Flavonoles

Los flavonoles son los flavonoides más abundantes, encontrados en un rango amplio de plantas, frutas, vegetales y tés. Se caracterizan por tener una cadena insaturada de 3 carbonos con un doble enlace entre C-2 y C-3 y por la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 3 (**Figura 3**). La conjugación ocurre principalmente en las posiciones 5 y 7 del anillo aromático A, aunque también pueden darse en las posiciones 3', 4' y 5'.

Los flavonoles generalmente suelen mostrar coloración rojiza. Están muy presentes en la dieta, siendo los principales compuestos la quercetina, la miricetina, la isorhamnetina y el kaempferol, presentes en verduras, semillas, especias y productos lácteos [7,30].

3.2.1.2. Flavonas

Las flavonas son muy similares estructuralmente a los flavonoles con un doble enlace entre C-2 y C-3, pero carecen del grupo hidroxilo en la posición 3 (**Figura 3**). Las flavonas presentan una gran variedad de sustituciones como la hidroxilación, *O*- y *C*-alquilación, metilación y glicosilación [36]. Las conjugaciones más comunes son la *O*-glicosilación en la posición C-7 y las posiciones C-6 y C-8 para la *C*-glicosilación [37].

En general, presentan coloración rojiza, siendo la apigenina y la luteolina las principales flavonas que se encuentran en la dieta, procedentes principalmente de fuentes comestibles como el perejil y el apio, cereales y pastas [30,36].

3.2.1.3. Isoflavonas

Las isoflavonas tiene el anillo aromático B unido por la posición C-3 en lugar de la posición C-2, como en el caso de las flavonas (**Figura 3**). La *O*-glicosilación ocurre con grupos de azúcar unidos preferentemente a la posición 7 del anillo

aromático A. Con respecto al tipo de sustitución en los carbonos C-5 y C-6, se conocen tres agliconas de isoflavona principales: la daidzeína, la genisteína y la gliciteína [16,38].

Las isoflavonas están ampliamente distribuidas en el reino vegetal, pero se encuentran en niveles más elevados solo en las plantas de la familia *Leguminosae*, como la soja [39].

3.2.1.4. Flavanonas

Este tipo de flavonoide es caracterizado por la ausencia del doble enlace entre los carbonos C-2 y C-3 del anillo C, dando un carbono asimétrico (C-2) como centro quiral (**Figura 3**). La hidroxilación, glicosilación y metilación son tipos normales de sustitución en la posición 7 de las agliconas de flavanona.

Las flavanonas tienden a ser incoloras, blancas o grisáceas. Se encuentran principalmente en frutas del género *Citrus*, donde pueden alcanzar altas concentraciones. Las principales flavanonas (ambas en forma glucósida) son la naringina, muy presente en el pomelo, y la hesperidina en la naranja dulce, el limón y la lima [30,40,41].

3.2.1.5. Flavan-3-oles

Es el tipo más complejo de flavonoides, variando desde simple monómeros como la (+)-catequina y su isómero la (-)-epicatequina con grupos hidroxilo en los carbonos C-3, C-5, C-7, C-4' y C-5', hasta las proantocianidinas oligoméricas y poliméricas, formadas por polímeros de flavan-3-oles. En la **Figura 3** puede observarse la estructura básica de esta clase de flavonoides.

Los flavan-3-oles y las flavanonas son moléculas de baja polaridad debido al enlace saturado entre los carbonos C-2 y C-3 del anillo C. Estos dos carbonos asimétricos producen cuatro isómeros para cada hidroxilación del anillo B.

Estos compuestos no presentan formas glicosiladas en los alimentos pero pueden ser hidroxiladas, formando galocatequinas, compuestos con un grupo hidroxilo más que las catequinas en la posición C-3'. Las fuentes principales de flavan-3-oles son el té verde, así como algunas frutas, vegetales, el vino tinto y el chocolate [30,36].

3.2.1.6. Antocianidinas

Las antocianidinas son los pigmentos más importantes que presentan los alimentos vegetales. Son los responsables de los colores rojo, morado y azul, ampliamente distribuidos en frutas rojas, como las bayas, uvas y cerezas [42].

Las antocianidinas presentan siempre un azúcar en la posición C-3 y frecuentemente en las posiciones C-5 y C-7, C-3' y C-5' (**Figura 3**). Cuando la aglicona se conjuga con una o más unidades de azúcar, se denominan antocianinas [7].

Las antocianidinas más importantes encontradas en plantas son la cianidina (con colores que van del rojo al magenta), la pelargonidina (entre el naranja y el rojo) y la delfinidina (entre el magenta y el púrpura), presentes en frutas, verduras, semillas, legumbres, cereales y pastas [30,43].

3.2.2. Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos son compuestos no flavonoides formados por un solo anillo fenólico. Su clasificación viene determinada por dos grupos: los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos, que se derivan de moléculas no fenólicas de ácido benzoico y ácido cinámico, respectivamente. En la **Figura 4** se muestran las estructuras básicas de estos dos grupos. Los ácidos fenólicos constituyen aproximadamente un tercio de los compuestos fenólicos en la dieta [16].

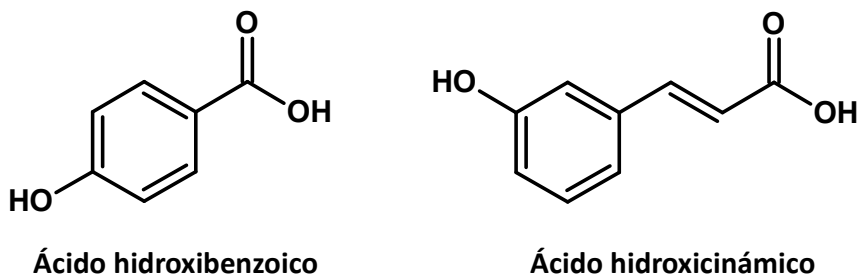


Figura 4. Estructura básica de los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos.

3.2.2.1. Ácidos hidroxibenzoicos

La estructura básica de los ácidos hidroxibenzoicos es C6-C1 (**Figura 4**). Incluyen ácidos importantes como el gálico, gentísico, salicílico, vanílico, siríngico y *p*-hidroxibenzoico [30,44].

El principal compuesto de este grupo es el ácido gálico, presente en una gran variedad de tés, el cual puede ser convertido en ácido elágico, convirtiéndose así en la estructura básica de los taninos hidrolizables. Estos taninos (galotaninos y elagitaninos) son comunes en frutas como la fresa, frambuesa y mora [45]. Las principales fuentes alimenticias de ácidos hidroxibenzoicos son las frutas, verduras, tés y cereales, aunque generalmente su contenido suele ser muy bajo [30,36]. Ejemplos de ello son el ácido gentísico, presente en los cítricos, las uvas, el tomate, la berenjena, el melón y el pepino, y el ácido salicílico, encontrado en el albaricoque y el arándano.

3.2.2.2. Ácidos hidroxicinámicos

La estructura general de los ácidos hidroxicinámicos es C6-C3, con un doble enlace en la cadena lateral, pudiendo ofrecer configuración *cis* o *trans* (**Figura 4**). Los ácidos más comunes de este grupo son el cafeico, *p*-cumárico, ferúlico y sinápico, representando los dos primeros entre el 75% y el 100% del contenido total de ácidos hidroxicinámicos encontrados en las frutas. El ácido cafeico está presente

principalmente en café, arándano, pera, manzana y naranja. El ácido *p*-cumárico aparece en bayas, cerezas y uvas, mientras que el grano de trigo es rico en ácido ferúlico [16,30].

Los ácidos hidroxicinámicos se encuentran en la naturaleza en mayor cantidad y diversidad que los ácidos hidroxibenzoicos, estando presentes en una amplia variedad de alimentos como las legumbres, los cereales, el café y las frutas [16,30,46].

3.2.3. Secoiridoides

Los iridoides son un grupo de metabolitos secundarios pertenecientes al grupo de los monoterpenos. Están formados por una estructura de 10 carbonos denominada iridano, donde su fusión con un heterociclo de oxígeno recibe el nombre de iridoide. Estos compuestos pueden encontrarse en la naturaleza en estructuras cerradas (iridoides) o en estructuras abiertas (secoiridoides), formadas por la rotura del enlace entre los carbonos C-7 y C-8 del metilciclopentano [47,48]. En la **Figura 5** pueden observarse las estructuras citadas.

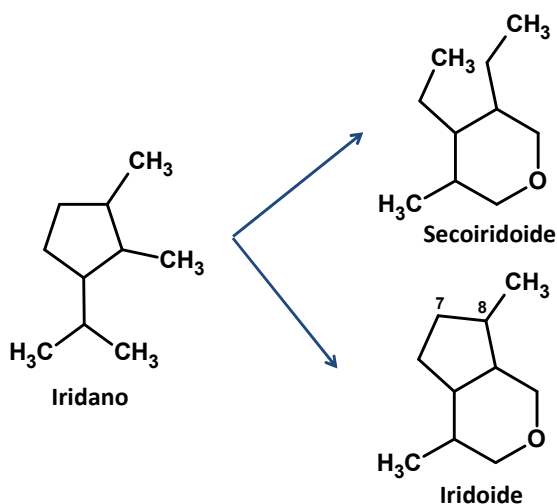


Figura 5. Estructura básica de los iridoides y secoiridoides.

Los secoiridoides son uno de los grupos de fenoles más habitualmente encontrados en los frutos de las distintas variedades de *Olea europaea* L. (aceituna). Se trata de compuestos fenólicos que suelen presentarse en forma glicosídica, es decir, unidos a azúcares como la glucosa o la ramnosa. La oleuropeína es el compuesto principal que presentan estos frutos. Es un compuesto amargo responsable en gran medida de la actividad antioxidante de las aceitunas. Procede del éster del ácido elenólico con el hidroxitirosol, un fitoquímico con importantes propiedades antioxidantes [48]. En la **Figura 6** se muestra la estructura de la oleuropeína y el origen de cada una de sus partes [49].

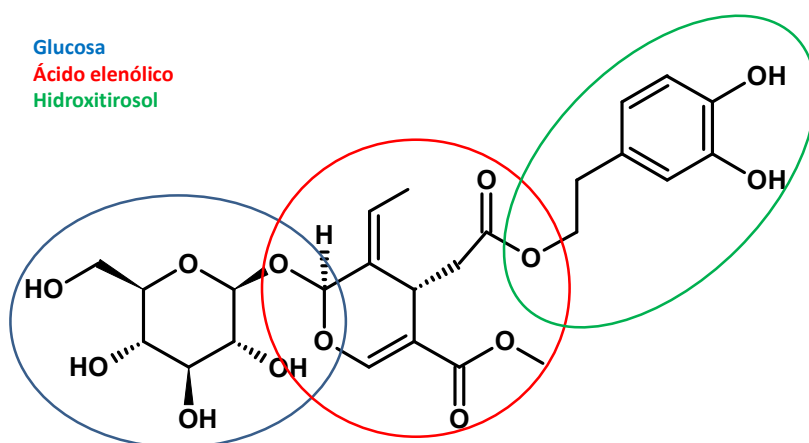


Figura 6. Estructura de la oleuropeína.

3.3. Rutas biosintéticas y biodisponibilidad de los compuestos fenólicos

3.3.1. Rutas biosintéticas

Los compuestos fenólicos derivan de una compleja red de rutas biosintéticas [50,51]. Veremos a continuación estas rutas para las tres clases de fenoles descritos anteriormente.

3.3.1.1. Flavonoides

Los precursores de la estructura de los flavonoides proceden por una parte de la ruta fenilpropanoide, con el 4-cumaroil coenzima A, y de otro lado de tres moléculas de malonil coenzima A. La reacción de ambas partes, catalizada por la enzima chalcona sintasa, da lugar a naringenina chalcona. La conversión de este compuesto a naringenina mediante la acción de la enzima chalcona isomerasa es considerado el eje central de la ruta biosintética de los flavonoides. De este punto, mediante diversas reacciones enzimáticas, surgen las diferentes clases de flavonoides existentes (flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavan-3-oles y antocianidinas) [30,51,52]. Un esquema general de la biosíntesis de los principales flavonoides se muestra en la **Figura 7** [51,53]. Las enzimas que participan en esta biosíntesis son: chalcona sintasa (CHS), chalcona isomerasa (CHI), flavanona 3-hidroxilasa (F3H), flavonoide 3'-hidroxilasa (F3'H), flavonoide 3'5'-hidroxilasa (F3'5'H), flavonol sintasa (FLS), dihidroflavonol 4-reductasa (DFR), leucoantocianidina reductasa (LAR), leucoantocianidina dioxigenasa (LDOX), UDP glucosa: flavonoide 3-O-glucosil transferasa (UFGT), O-metiltransferasa (OMT).

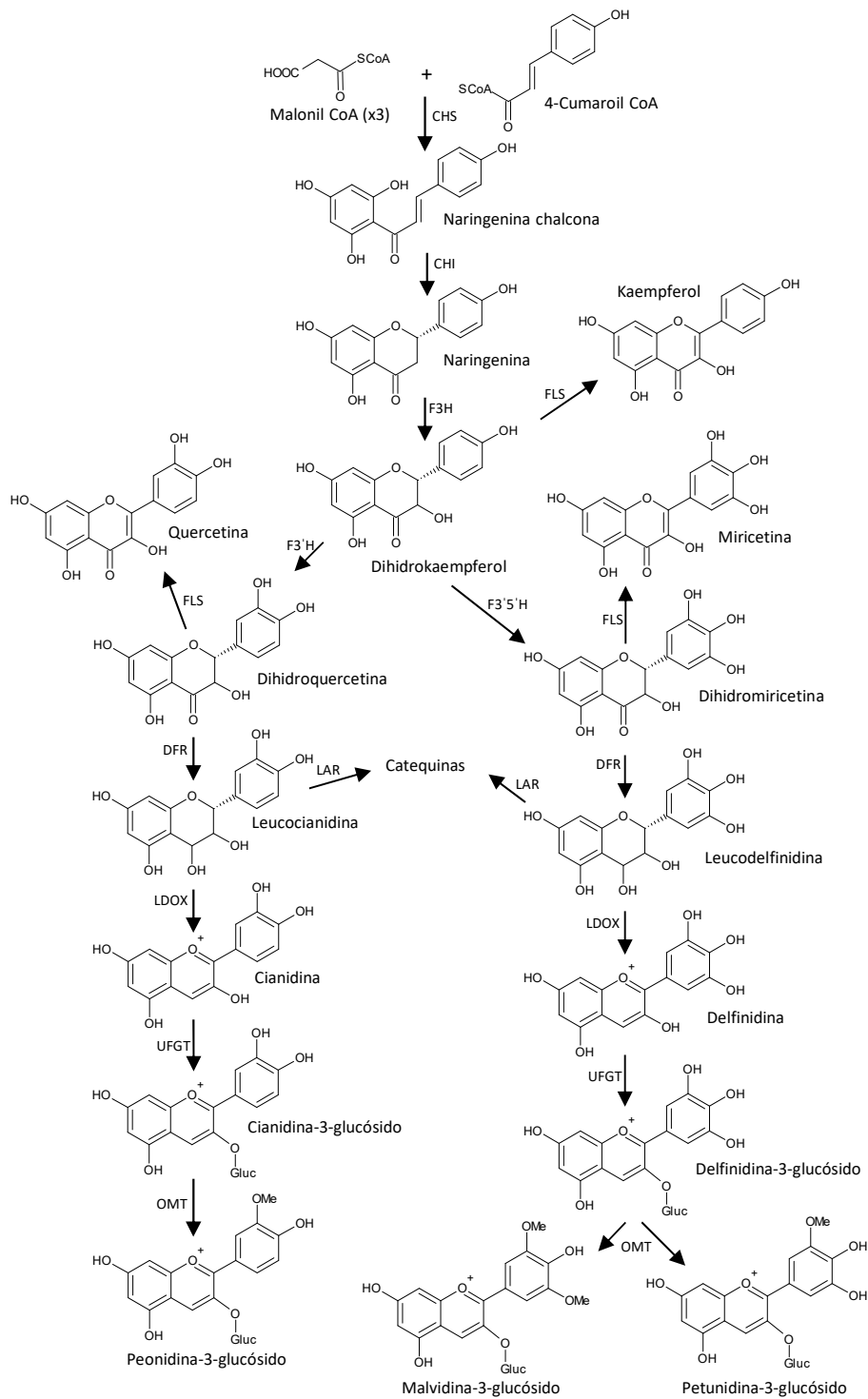


Figura 7. Esquema general de la biosíntesis de los flavonoides.

3.3.1.2. Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos son sintetizados a partir de la ruta del ácido shikímico mediante la L-fenilalanina. Este aminoácido, de vital importancia, es el precursor común para la mayoría de los compuestos fenólicos en las plantas. A partir de la L-fenilalanina da comienzo la vía de los fenilpropanoides. En ella, se producen reacciones enzimáticas consecutivas, en donde la desaminación, hidroxilación y metilación son los tres tipos de reacciones involucradas en la formación de los ácidos fenólicos. Se forman así el ácido cinámico, el ácido *p*-cumárico y el compuesto 4-cumaroil coenzima A. El ácido cinámico también se puede metabolizar a ácido benzoico, resultado de la degradación de su cadena lateral, y posteriormente a ácido *p*-hidroxibenzoico, entre otros. El ácido *p*-cumárico también se metaboliza a través de diferentes reacciones a ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido sinápico. El compuesto 4-cumaroil coenzima A es de gran importancia, ya que, como hemos visto en el anterior, es el encargado de dirigir la síntesis de los flavonoides [30,50]. En la **Figura 8** se muestra un esquema general de la biosíntesis de los ácidos fenólicos [50]. Las enzimas que participan en esta biosíntesis son: fenilalanina amonio liasa (PAL), oxidasa (Ox), ácido benzoico 4-hidroxilasa (B4H), ácido *p*-hidroxibenzoico 3-hidroxilasa (pHB3H), ácido protocatecuico 3-*O*-metiltransferasa (P3OMT), ácido vanílico 5-hidroxilasa y ácido vanílico 5-*O*-metiltransferasa (V5H/V5OMT), ácido protocatecuico 5-hidroxilasa (P5H), ácido cinámico 4-hidroxilasa (C4H), ácido *p*-cumárico 3-hidroxilasa (pC3H), ácido cafeico 3-*O*-metiltransferasa (COMT-1), ácido ferúlico 5-hidroxilasa y ácido cafeico/5-hidroxiferúlico *O*-metiltransferasa (F5H/COMT-1), 4-cumarato: CoA ligasa (4CL).

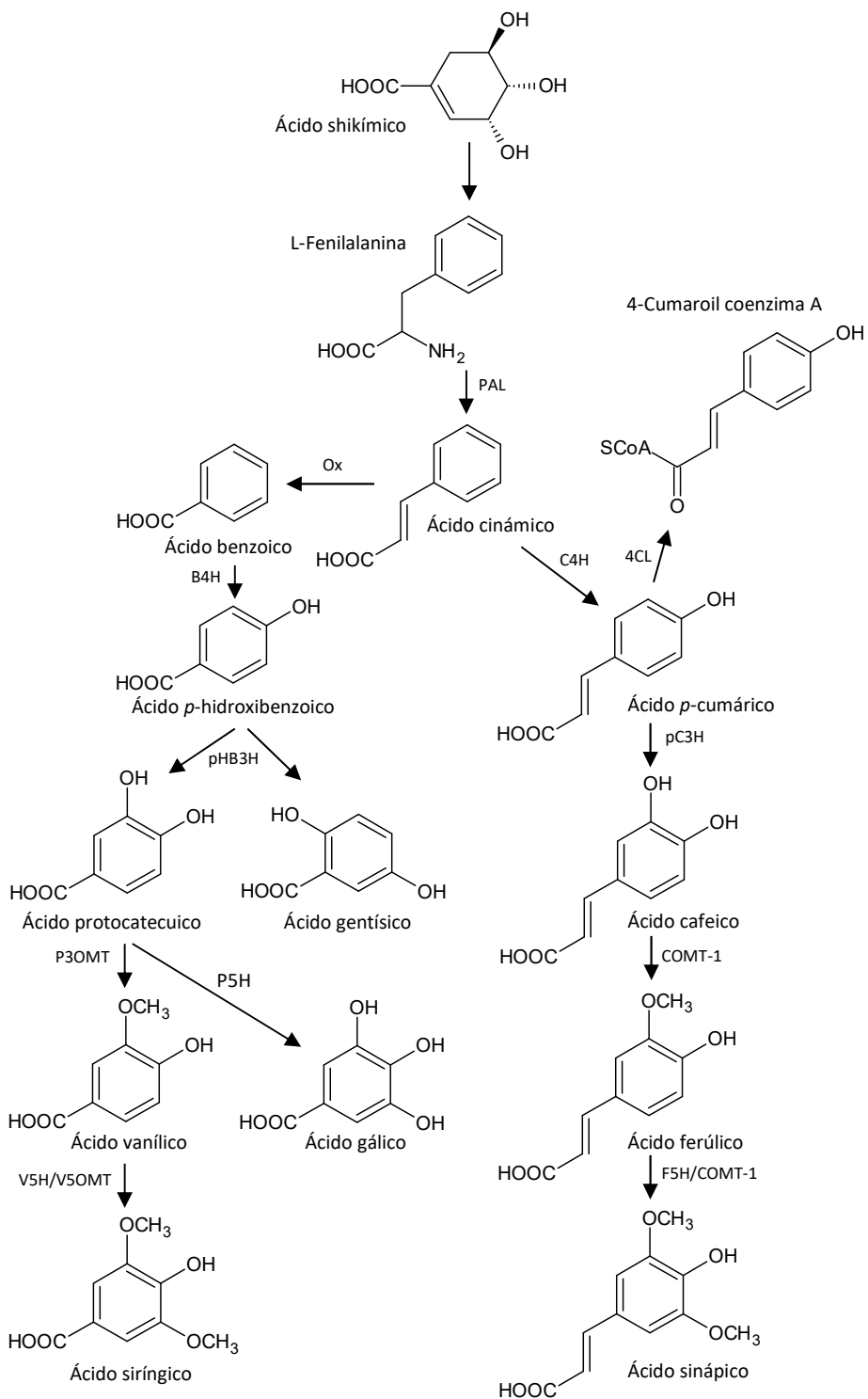


Figura 8. Esquema general de la biosíntesis de los ácidos fenólicos.

3.3.1.3. Secoiridoides

La biosíntesis de los iridoides comienza con el ácido mevalónico, conociéndose para la familia de las oleáceas la ruta que conduce desde el iridodial hasta el ácido deoxilogánico, el cual es el precursor de muchos iridoides y secoiridoides [54].

Inicialmente, el iridodial es generado con la formación de un anillo de pirano. El iridodial sufre oxidación, lo que conlleva su conversión a iridotrial. Ambos son intermediarios clave en la biosíntesis de numerosos iridoides. Los iridoides naturales suelen encontrarse glicosidados, por lo que la forma hemiacetal del iridotrial se transforma en acetal, originando la aparición del ácido deoxilogánico. Este paso es fundamental en la biosíntesis de los secoiridoides. Una nueva oxidación conduce a loganina, en donde la ruptura del enlace C7-C8 produce el compuesto secologanina, considerado el precursor en la obtención de los secoiridoides [55]. En la **Figura 9** se muestra un esquema simplificado de la ruta biosintética que tiene lugar en las oleáceas [47,54].

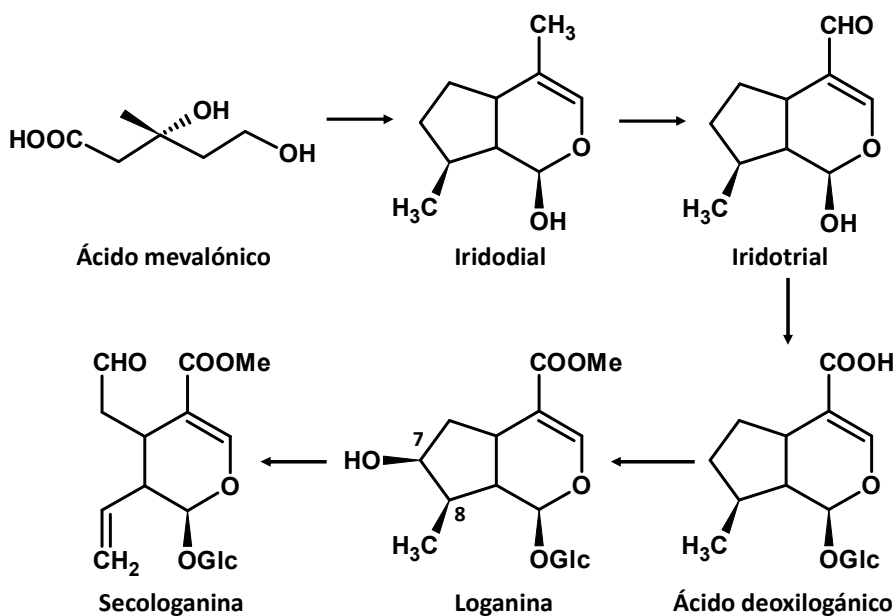


Figura 9. Ruta biosintética en oleáceas. Glc: glucosa.

3.3.2. Biodisponibilidad

Para que los compuestos fenólicos ejerzan sus propiedades beneficiosas en el organismo, deben alcanzar el tracto gastrointestinal, absorberse en él y ser transportados por el torrente sanguíneo para llegar hasta los órganos y los tejidos [56–58].

Durante la digestión, los compuestos fenólicos sufren diversas transformaciones que afectan a su biodisponibilidad [56,59]. La biodisponibilidad de un compuesto incluye su digestión gastrointestinal, absorción, metabolismo, distribución y bioactividad. La bioaccesibilidad y la bioactividad son los factores más importantes que determinan la biodisponibilidad de una sustancia. La bioaccesibilidad se refiere a la cantidad de un compuesto que se libera de la matriz alimentaria durante la digestión y está disponible para la absorción. La bioactividad es el efecto fisiológico específico que se experimenta (antioxidante, antiinflamatorio, etc.) tras la absorción de un compuesto [28,59].

Por tanto, la determinación del contenido fenólico directamente desde un alimento no es suficiente para predecir sus posibles efectos en el organismo, ya que los metabolitos formados a partir de los compuestos fenólicos serán diferentes de sus compuestos originales durante el proceso de digestión [28,56].

La digestión comienza en la boca, donde la masticación y la acción de la saliva liberan los componentes alimenticios. Esta fase es importante, puesto que la disminución del tamaño de partícula aumenta el área de contacto disponible para el ataque por enzimas digestivas, produciéndose una mejor digestión. Llegados al estómago, los compuestos fenólicos no se ven demasiado afectados. En cambio, al llegar al intestino delgado, éstos sufren modificaciones importantes (hidrólisis, oxidación, degradación, etc.) [57,59,60].

Existen diversos factores que determinan en gran medida la absorción de los compuestos fenólicos, como son la matriz alimentaria, el tamaño molecular, la solubilidad y la dosis ingerida, entre otros. Por esta razón, mientras que las

agliconas y algunos ácidos fenólicos simples se pueden absorber directamente en el intestino delgado, los compuestos fenólicos con estructuras grandes y polimerizadas no se absorben fácilmente. Atendiendo a este criterio, los compuestos fenólicos más abundantes en la dieta no tienen por qué ser necesariamente los que presenten una mayor biodisponibilidad [28,56].

La primera fase en el metabolismo de los compuestos fenólicos consta de la ruptura y liberación del resto de aglicona para su absorción. Sin embargo, solo entre el 5-10% de los compuestos fenólicos son absorbidos en el intestino delgado. La mayoría de los compuestos llegan al colon, y es aquí donde la microbiota los somete a un intenso metabolismo antes de la absorción [58,61].

Las moléculas absorbidas experimentan transformaciones en una segunda fase. Los nuevos procesos ocurren principalmente en el hígado (metilación, glucuronidación, etc.). Tras esto, los metabolitos se transfieren al torrente sanguíneo y llegan a los tejidos, donde pueden ejercer sus efectos beneficiosos. Finalmente, los compuestos fenólicos son expulsados a través de la orina y las heces [58,61]. En la **Figura 10** se puede observar un esquema del procesamiento de los compuestos fenólicos en la digestión [62].

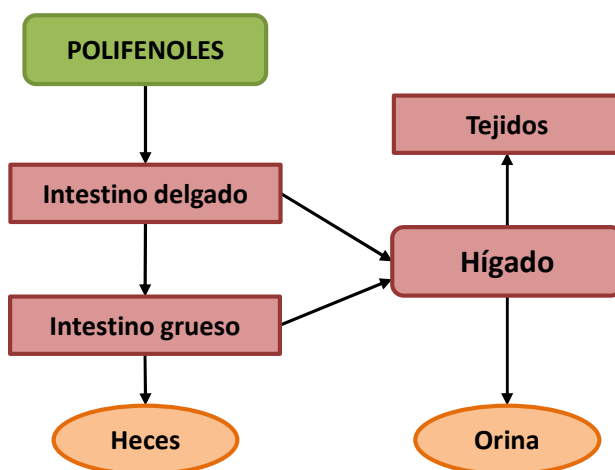


Figura 10. Metabolismo de los polifenoles en la digestión.

➤ **Modelos para la simulación de la digestión gastrointestinal**

Existen métodos para determinar la biodisponibilidad y la bioaccesibilidad de los componentes alimentarios que implican modelos *in vivo* (en animales y humanos) e *in vitro* [63]. Son modelos gastrointestinales que intentan reproducir las mismas condiciones fisiológicas producidas en la boca, el estómago y en el intestino delgado, y ocasionalmente en el intestino grueso [59]. La simulación de la digestión se realiza bajo condiciones controladas de temperatura, pH, tiempo y concentraciones de reactivos, entre otros, empleando enzimas digestivas comerciales, como la pepsina [57].

- Los modelos *in vivo* proporcionan resultados más precisos, pero son procesos largos y costosos; además conllevan restricciones éticas, por lo que su uso es limitado [57]. Por esta razón, se han desarrollado procedimientos *in vitro* que permitan predecir la actuación de los compuestos fenólicos durante la digestión [63].
- Los modelos de digestión *in vitro* simulan el comportamiento de los componentes de los alimentos durante una digestión gastrointestinal. Son ensayos rápidos, económicos y no están sujetos a restricciones éticas [64]. Estos métodos simulan un número limitado de parámetros de la digestión fisiológica y no imitan los procesos físicos tales como la hidratación, la mezcla o la peristalsis. A pesar de las limitaciones que presenta, se obtienen tendencias similares en la digestión de los compuestos fenólicos comparando los modelos *in vivo* e *in vitro* [65].

A su vez, los modelos *in vitro* pueden ser divididos en dos categorías: a) modelos estáticos, donde los productos de la digestión permanecen mayoritariamente inmóviles y no simulan procesos físicos, como el cizallamiento o la mezcla; b) modelos dinámicos, que introducen procesos físicos y mecánicos, además de cambios temporales para simular las condiciones reales. Sin embargo, los modelos dinámicos son más costosos y

complicados que los modelos estáticos, por ello éstos últimos son los más utilizados para estudiar la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos [57,59]. En la presente Memoria de investigación se ha utilizado un modelo de digestión gastrointestinal *in vitro* estático, conformado por un baño termostático con agitación constante y diferentes soluciones simuladas preparadas en el laboratorio de saliva y jugos gástrico, duodenal y biliar, para determinar la biodisponibilidad de los polifenoles en las muestras de estudio.

3.4. Análisis de muestras vegetales

En este apartado se describe cómo se lleva a cabo el análisis y caracterización de los compuestos fenólicos, así como el análisis del contenido inorgánico de las muestras vegetales que se han estudiado en los distintos trabajos de esta Memoria.

3.4.1. Caracterización y cuantificación de compuestos fenólicos

El análisis y la determinación de los compuestos fenólicos presentes en muestras vegetales generalmente se basa en un procedimiento que incluye diversas etapas. Tras llevar a cabo las etapas de pretratamiento necesarias, se procede a la extracción de los compuestos de las muestras. Tras esta fase, se preconcentran los compuestos fenólicos y se realiza la limpieza (*clean-up*) de los extractos para eliminar posibles interferencias. En un siguiente paso, el proceso se enfoca en la caracterización y cuantificación de los compuestos fenólicos, para finalmente determinar sus propiedades bioactivas (antioxidantes, antiinflamatorias, etc.) [66]. Para llevar a cabo todo este transcurso de etapas es necesario emplear diversas metodologías y equipamiento científico como veremos a continuación.

3.4.1.1. Tratamiento de muestra

La preparación y extracción de los compuestos fenólicos va a depender generalmente de la matriz de la muestra. Las muestras han de ser seleccionadas y recogidas cuidadosamente. Para evitar que los polifenoles se degraden, las muestras frescas deben llevarse a temperaturas muy bajas, con la posibilidad de realizar un secado (liofilización), molienda y homogeneización antes del proceso de extracción [67]. En la **Figura 11** se muestra una fotografía del liofilizador utilizado para llevar a cabo el secado de las muestras vegetales estudiadas para esta Memoria.



Figura 11. Liofilizador Lyoquest-55 ECO (Telstar).

Para separar los compuestos fenólicos de otras sustancias existentes en la matriz de las muestras se lleva a cabo una extracción. Los objetivos principales de esta etapa son obtener un elevado rendimiento en la extracción y evitar la destrucción o modificación de los compuestos. De esta manera se obtiene un extracto rico en polifenoles, disponibles para posibles aplicaciones farmacéuticas o nutraceuticas [7,17,68]. El método de extracción de compuestos fenólicos más utilizado es la extracción sólido-líquido, debido a su alta eficiencia, amplio rango de aplicación y fácil manipulación [5].

Los disolventes más empleados para la extracción de los compuestos fenólicos son el etanol, el metanol, el acetato de etilo y la acetona. También se utiliza la combinación de los anteriores disolventes con proporciones variables de agua, obteniendo una mayor eficacia en la extracción cuando se utilizan las mezclas alcohol-agua [17,67,69]. Durante el proceso de extracción existen algunos parámetros que han de ser tenidos en cuenta, ya que tienen influencia directa en el rendimiento de la extracción. Algunos de estos parámetros son la temperatura, el tiempo de extracción, la elección del disolvente, las repeticiones y el tamaño de partícula [67]. Un incremento de la temperatura y del tiempo de extracción generalmente producen extracciones con mayores rendimientos; sin embargo, en el caso de los compuestos fenólicos, el incremento de ambos parámetros puede producir la degradación de los polifenoles [67].

El principal inconveniente de algunos tipos de extracción sólido-líquido es la duración de la misma, alcanzándose tiempos muy largos, como ocurre por ejemplo en la maceración [17]. Es por ello que en la actualidad las extracciones se suelen llevar a cabo asistidas por ultrasonidos, por microondas, con fluidos supercríticos y con líquidos presurizados [10,17,67]. De esta forma, se disminuye la cantidad de disolventes requeridos y/o se minimiza el tiempo de extracción.

A continuación se detallan los tipos de extracción sólido-líquido más comunes, siendo la extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos la empleada en el desarrollo de esta Memoria.

➤ ***Extracción asistida por ultrasonidos***

Es un método sencillo, rápido, eficiente y relativamente económico. La radiación ultrasónica facilita la extracción de los compuestos orgánicos e inorgánicos del interior de matrices sólidas utilizando disolventes líquidos [67]. Las ondas ultrasónicas provocan la ruptura de la pared celular, liberando su contenido y facilitando la transferencia de masa desde la matriz al disolvente, resultando una

técnica muy eficiente [70]. En la **Figura 12** se observa el sonicador por sonda utilizado en el procedimiento de extracción de los compuestos fenólicos durante este trabajo.



Figura 12. Sonicador por sonda, Qsonica (Sonicator).

➤ ***Extracción asistida por microondas***

La extracción asistida por microondas es un método bastante utilizado para la extracción de compuestos fenólicos. Emplea tiempos de extracción muy cortos, pequeñas cantidades de disolventes y los rendimientos son elevados. Las radiaciones no ionizantes de las microondas inducen movimientos moleculares que provocan el calentamiento de la muestra. De este modo, las células vegetales pierden humedad por evaporación; el vapor generado hincha las células y produce su ruptura, liberando sus componentes activos al disolvente [67].

➤ ***Extracción con fluidos supercríticos***

Los métodos que emplean fluidos supercríticos son una alternativa a los métodos convencionales de extracción con disolventes bastante respetuosa con el

medio ambiente, ya que evitan el uso de grandes cantidades de disolventes tóxicos. Además, son extracciones rápidas y automatizables, en donde la ausencia de luz y aire durante la extracción reduce la posible degradación de los compuestos [10]. Emplean disolventes que, cerca de sus puntos críticos (alta presión y temperatura), cambian rápidamente sus propiedades con una ligera variación de la presión, lo que permite altas tasas de transferencia de masa [10]. El CO₂ es el fluido supercrítico más utilizado. Tiene una toxicidad baja, es químicamente estable, no es inflamable, es económico y no produce tensión superficial [71]. Al ser una molécula no polar, al CO₂ se le añaden pequeñas cantidades de modificadores orgánicos, como el metanol, para mejorar la extracción de los compuestos fenólicos [5]. La principal desventaja de la extracción con fluidos supercríticos es el alto precio del equipamiento [67].

➤ *Extracción con líquidos presurizados*

La extracción con líquidos presurizados es un método avanzado con respecto a los procesos de extracción convencionales. Emplea disolventes de extracción a altas presiones y temperaturas, aunque siempre por debajo de sus puntos críticos, de modo que el disolvente se mantiene en su estado líquido durante todo el proceso de extracción [66,72]. Con estas condiciones, las propiedades fisicoquímicas del disolvente varían, haciendo que su tensión superficial y viscosidad aumenten, a la vez que la solubilidad de los analitos aumenta. De esta manera, el disolvente se introduce más fácilmente en la matriz sólida de la muestra, obteniendo altos rendimientos de extracción. Además, al ser un método automatizado casi por completo, la reproducibilidad es mejorada en comparación con métodos convencionales [72].

Al finalizar la etapa de extracción, en la mayoría de las ocasiones es necesaria una etapa post-extracción. Es un paso importante en donde se emplean

técnicas sencillas para preconcentrar los compuestos fenólicos y eliminar interferencias en los extractos. Normalmente se emplean la centrifugación, la filtración, la evaporación, la hidrólisis y la derivatización, entre otras. Un ejemplo es el caso de las muestras oleaginosas. En ellas se utiliza la centrifugación para realizar sucesivos lavados del extracto con hexano, eliminando así los restos de aceite que aún puedan quedar retenidos [73]. Finalmente, el extracto se preconcentra y queda preparado para su posterior análisis. En la **Figura 13** se muestra el evaporador rotativo utilizado.



Figura 13. Evaporador rotativo, Hei-VAP (Heidolph).

3.4.1.2. Análisis de compuestos fenólicos

La caracterización de la composición fenólica de una muestra es llevada a cabo tras la separación y aislamiento de sus compuestos individuales. Existen varias técnicas desarrolladas para la cuantificación de compuestos fenólicos en plantas como son la resonancia magnética nuclear, la electroforesis capilar, la cromatografía, la espectrofotometría, entre otros [7].

En este trabajo nos centraremos en la espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis) y en las técnicas cromatográficas, por ser las técnicas que han sido utilizadas para la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos en las muestras de estudio de la presente Memoria.

❖ Espectrofotometría UV-Vis

Se trata de una de las técnicas analíticas más populares por su versatilidad y capacidad para detectar moléculas, ya que la mayoría de éstas tienen su máximo de absorción en el rango de longitud de onda del UV-Vis. La zona del espectro de la radiación UV se extiende desde 100 a 400 nm y para la zona del espectro visible desde 400 a 700 nm. En la **Figura 14** se puede observar el espectro electromagnético.

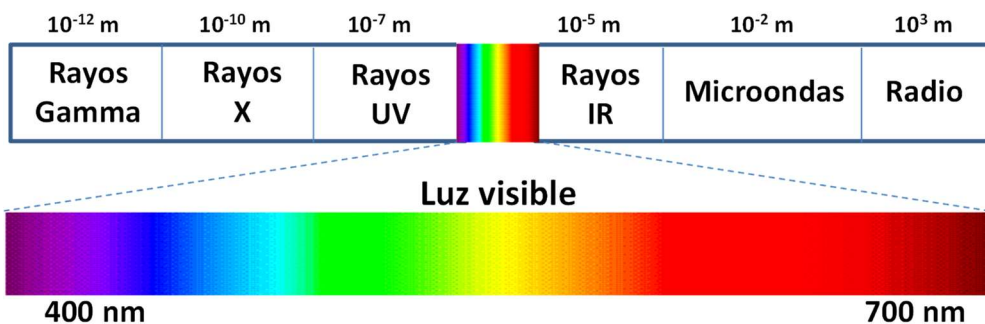


Figura 14. Espectro electromagnético.

Las moléculas pueden absorber energía luminosa y almacenarla en forma de energía interna. En base a esto, el principio de la técnica consiste en la promoción de electrones que se produce desde el orbital molecular ocupado más alto (HOMO) al menor orbital molecular desocupado (LUMO) cuando la luz es absorbida por una molécula. De esta manera, la molécula es promovida a un estado energético más excitado. La diferencia de energía entre el HOMO y el LUMO

coincide con la energía del fotón. Cada molécula tiene una serie de estados excitados que la distingue del resto de moléculas. Así, moléculas con estructuras químicas diferentes tienen energías y espectros de absorción diferentes.

Esta técnica permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y esta cantidad de luz absorbida va a depender de forma lineal de la concentración. Para realizar esta determinación, en el espectrofotómetro, que es el instrumento empleado en la espectrofotometría UV-Vis para medir la intensidad de luz que pasa a través de la muestra, se selecciona la longitud de onda para que pase por la solución. De esta manera puede medirse la cantidad de luz absorbida por la misma y conocer su concentración. La relación entre la absorbancia y la concentración de un cromóforo en solución viene expresada por la ley de Lambert-Beer:

$$A = \log \frac{I}{I_0} = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

En donde A es la absorbancia; I e I_0 son las intensidades saliente y entrante, respectivamente; ε es el coeficiente de extinción molar; b es la longitud de la celda; c es la concentración.

Las partes básicas de un espectrofotómetro UV-Vis son la fuente de luz, una rejilla de difracción o monocromador para separar las longitudes de onda de la luz, el soporte para la muestra y un detector. Estos equipos para abarcar todo el rango del espectro UV-Vis utilizan una lámpara de deuterio para la zona del ultravioleta y una lámpara de tungsteno para la zona del visible. Para el soporte de las muestras se emplean cubetas espectrofotométricas fabricadas en plástico, vidrio o cuarzo (transparente a la luz UV). Además, los espectrofotómetros pueden ser de un haz o de doble haz. Cuando son de haz único, toda la luz pasa a través de la celda de muestra. En cambio, si son de doble haz, la luz se divide en dos haces, en donde un haz pasa a través de la muestra y el otro se utiliza como referencia. En la **Figura 15** se muestra un esquema general con los componentes fundamentales de un espectrofotómetro UV-Vis.

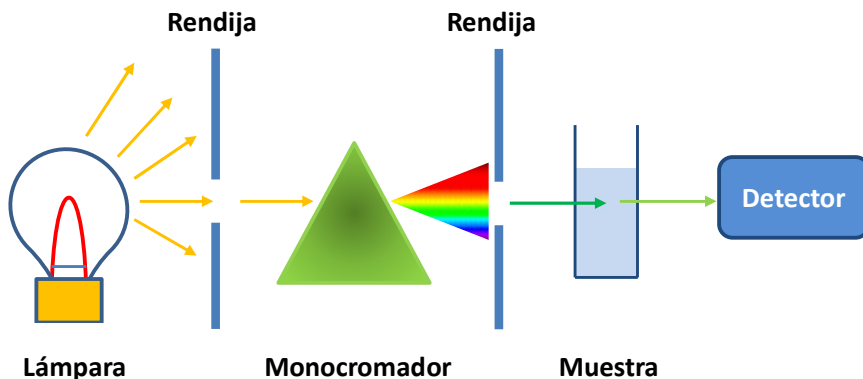


Figura 15. Esquema de un espectrofotómetro UV-Vis.

En la **Figura 16** se observa una imagen del espectrofotómetro UV-Vis empleado en el análisis de los diferentes ensayos espectrofotométricos en las muestras de estudio de este trabajo.



Figura 16. Espectrofotómetro UV-Vis 4201/50 (Zuzi Spectrophotometer).

Entre los métodos espectrofotométricos UV-Vis utilizados en el desarrollo de esta Memoria se encuentran: capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos mediante ensayos *in vitro* y ensayos para determinar la actividad de inhibición enzimática (desarrollados en los apartados 3.5. y 3.6., respectivamente), contenido total de fenoles y contenido total de flavonoides. Los dos últimos se explican a continuación. Ambos son métodos sencillos, económicos, reproducibles y

rápidos, empleados como ensayos espectrofotométricos de rutina para realizar una estimación de los compuestos fenólicos presentes en las muestras vegetales [67,68]. El inconveniente de estos métodos es que no son específicos y se ven afectados por otros compuestos, como azúcares y vitaminas, por lo que en el estudio de compuestos fenólicos podría producirse una sobreestimación en los valores obtenidos. Además, estos ensayos no cuantifican los compuestos fenólicos de manera individual [10,17].

➤ **Contenido total de fenoles (TPC)**

El ensayo TPC se basa en la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu por los compuestos fenólicos presentes en las muestras vegetales, solo bajo condiciones alcalinas, empleando para ello una solución de ajuste de carbonato sódico a pH 10 [68,74]. El reactivo de Folin-Ciocalteu está compuesto por una mezcla de tungstato de sodio, molibdato de sodio, ácido clorhídrico concentrado, ácido fosfórico y agua, al que se agrega sulfato de litio para dar el color amarillo intenso característico de este reactivo. La naturaleza química exacta del reactivo de Folin-Ciocalteu se desconoce, pero se cree que está compuesto por complejos de ácido fosfomolibdico y ácido fosfotúngstico, que en presencia de compuestos fenólicos, se reduce para formar un cromóforo de color azul con una absorción máxima alrededor de 760 nm [68,74]. Una simplificación de la reacción que tiene lugar se muestra en la **Figura 17** [75].

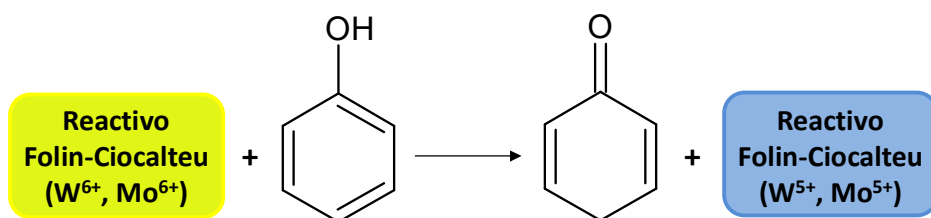


Figura 17. Reacción de reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu causado por la oxidación de compuestos fenólicos.

Normalmente, en este ensayo se usa el ácido gálico como estándar de referencia [17]. La **Figura 18** muestra el ensayo TPC con diferentes concentraciones de ácido gálico, donde se observa un aumento en la intensidad del color a medida que aumenta la concentración del patrón.



Figura 18. Recta de calibrado de ácido gálico (0-400 ppm) utilizada en un ensayo de TPC.

Este método no es específico para la determinación de compuestos fenólicos, ya que otros compuestos no fenólicos con propiedades reductoras también pueden reaccionar. A pesar de esto, existe una alta correlación entre los resultados obtenidos por TPC y los obtenidos por otros ensayos de capacidad antioxidante, lo que hace que el método de Folin-Ciocalteu sea un ensayo de rutina conveniente, además de fácil y reproducible [74,76].

➤ **Contenido total de flavonoides (TFC)**

El TFC consiste en un ensayo espectrofotométrico basado en la formación de complejos de aluminio con los flavonoides presentes en las muestras vegetales, en el rango de medición de 410-423 nm [67]. Se trata de uno de los procedimientos más utilizados en la determinación del contenido total de flavonoides. Para llevarlo a cabo es necesario agregar a la muestra una solución de $AlCl_3$ al 2-10% (p/v), en presencia de una solución de ácido o acetato y agua. En la reacción, el ion Al^{3+} forma un complejo con las moléculas flavonoides de la muestra, estableciéndose el

complejo estable flavonoide- Al^{3+} de color amarillo, cuya intensidad es proporcional a la concentración de flavonoides presentes en la muestra [77,78]. La reacción simplificada de la complejación de un flavonoide (quercetina) con AlCl_3 se muestra en la **Figura 19** [77].

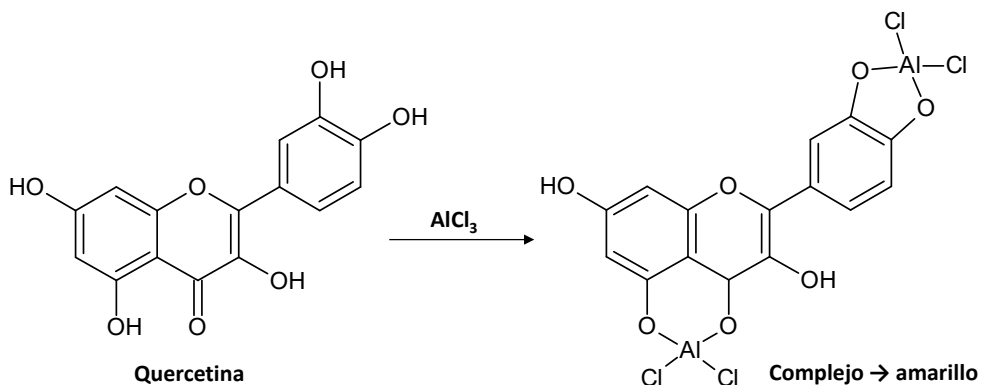


Figura 19. Reacción de complejación de la quercetina con AlCl_3 .

Normalmente, en este ensayo se usa la rutina como estándar de referencia, aunque también pueden emplearse otros flavonoles como la quercetina y la galangina [78,79]. En la **Figura 20** se muestra una recta de calibrado de quercetina empleada en un ensayo TFC.

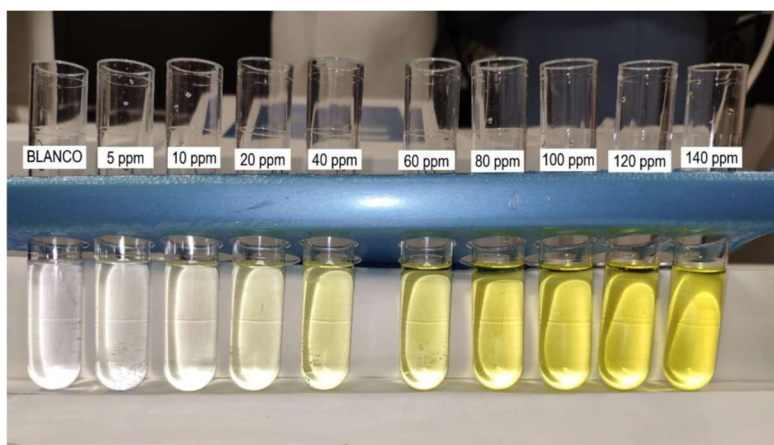


Figura 20. Recta de calibrado de quercetina (0-140 ppm) utilizada en un ensayo de TFC.

❖ Técnicas cromatográficas

Las técnicas cromatográficas más empleadas para el análisis de compuestos fenólicos son la cromatografía de capa fina, la cromatografía de gases, HPLC y la cromatografía de fluidos supercríticos [7,67]. Sin embargo, la técnica dominante para la separación y cuantificación de los compuestos fenólicos es la cromatografía HPLC, ya que ofrece una gran reproducibilidad, versatilidad y precisión [10,66]. En la presente Memoria, se ha utilizado HPLC con detección espectrofotométrica y espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos en las muestras analizadas. Será en esta técnica en la que nos centraremos a continuación.

En la **Figura 21** se representa un esquema general con los componentes principales de un HPLC.

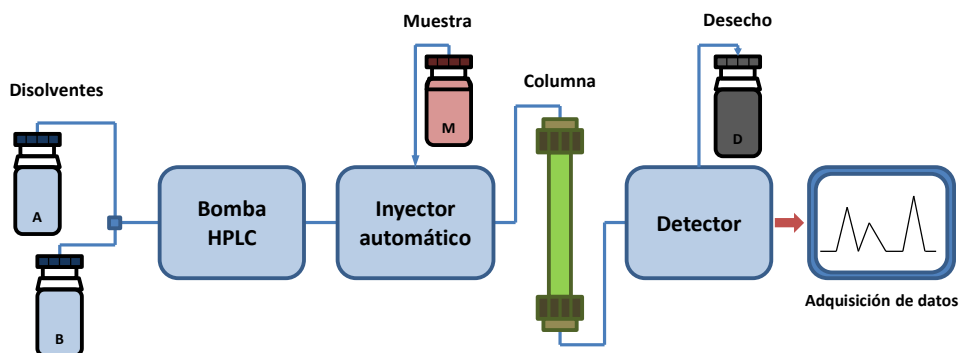


Figura 21. Esquema general de un HPLC.

Las columnas C18 de fase inversa (fase estacionaria apolar y fase móvil de polaridad moderada) son las más utilizadas junto a un sistema de fase móvil binario con un solvente que contiene agua acidificada (con ácido fórmico, ácido acético o ácido fosfórico) y un disolvente orgánico polar (como el metanol o el acetonitrilo), generalmente acidificado para evitar la ionización de los compuestos fenólicos durante el análisis [80], siendo el sistema de elución en gradiente más usado que el de modo isocrático [67].

En este tipo de técnica, la combinación de los tiempos de retención con los distintos detectores permite la identificación de los compuestos fenólicos. Generalmente, los detectores más empleados acoplados a un HPLC suelen ser el detector UV-Vis, el de diodo array, de fluorescencia y el detector de espectrometría de masa [7,67].

- ***Detección UV-Vis***

Los compuestos fenólicos, debido a sus dobles enlaces conjugados y a la presencia de al menos un anillo aromático en sus estructuras, muestran bandas de absorción en las regiones del UV o del UV-Vis. El detector UV-Vis permite la detección por única o múltiple longitud de onda al mismo tiempo, siendo muy útil cuando se conoce la longitud de onda de absorción del compuesto deseado.

Para cada grupo de compuestos fenólicos existen unas longitudes de onda específicas donde la absorción es máxima. Por ejemplo, los ácidos hidroxibenzoicos y los compuestos del grupo de los flavan-3-oles tienen su máximo de absorción a 280 nm; para los ácidos hidroxicinámicos, como el ácido cafeico o el ácido ferúlico, se utiliza 320 nm; para los flavonoles (quercetina), las flavonas (luteolina) y las flavanonas (hesperidina) suele emplearse una longitud de onda en torno a 350 nm; y las antocianinas (delfinidina) se miden a 520 nm [81,82].

- ***Detección con diodo array (DAD)***

Se trata de un modo de detección que emplea la zona UV-Vis del espectro, pero a diferencia del detector UV-Vis, DAD puede escanear un rango de longitud de ondas al mismo tiempo (190-800 nm). DAD es en realidad un detector UV-Vis con una gran variedad de diodos capaz de escanear todos los compuestos que puedan responder en el rango de longitud de onda seleccionado. Este detector es una buena opción en el desarrollo de métodos de HPLC por su amplia información espectral y rapidez.

- **Detección con fluorescencia (FD)**

El número de compuestos fenólicos que presentan fluorescencia nativa es limitado, lo que implica que este tipo de detección no sea tan frecuente. Es un sistema de detección muy sensible. El empleo de la derivatización haría que un mayor número de compuestos fenólicos emplearan la detección con fluorescencia. Un ejemplo sería la quercetina, que junto a cationes metálicos puede formar complejos que muestran una gran fluorescencia [5].

- **Detección por espectrometría de masas (MS)**

Para una completa identificación de los compuestos presentes en los extractos vegetales, el acople a un HPLC de los detectores UV-Vis, DAD y FD, no es suficiente [7,83]. El uso de detectores de espectrometría de masas acoplados a HPLC (HPLC-MS) se ha convertido en la herramienta analítica más empleada y efectiva en la caracterización de compuestos fenólicos [10,67]. En la **Figura 22** se muestra un esquema general de un espectrómetro de masas acoplado a un sistema cromatográfico, donde se detallan los tres componentes fundamentales de un espectrómetro de masas: la fuente de ionización, el analizador de masas y el detector de iones [84].

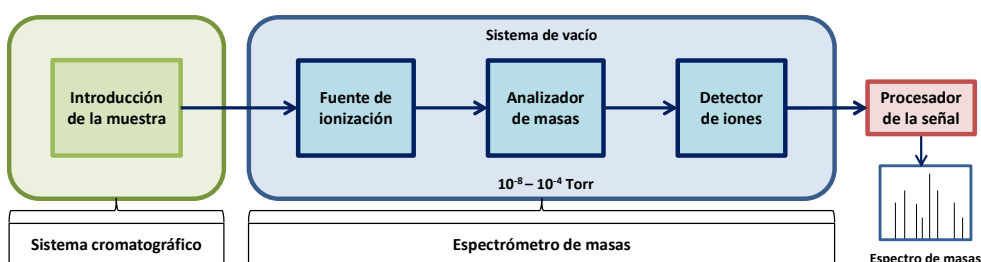


Figura 22. Esquema general de un espectrómetro de masas acoplado a cromatografía.

El principio de la espectrometría de masas consiste en la ionización de los compuestos químicos para generar moléculas cargadas o fragmentos de moléculas y medir sus relaciones de masa/carga (m/z). De esta manera, los espectrómetros de

masas utilizan la diferencia en la relación m/z de las moléculas ionizadas para diferenciarlas [10].

Las principales fuentes de ionización utilizadas para el análisis de los compuestos fenólicos son la ionización por electrospray (ESI), el bombardeo por átomos rápidos, la ionización a presión atmosférica, incluyendo la ionización química a presión atmosférica (APCI) y la fotoionización a presión atmosférica, la ionización por termospray y la ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI) [10]. El tipo de señales producidas por cada una de estas técnicas es muy diferente, lo que nos permite emplearlas en una amplia gama de usos. Por ejemplo, MALDI es muy utilizada en compuestos de elevados pesos moleculares, como proteínas y péptidos; ESI para ionizar moléculas antioxidantes polares, como las antocianinas; APCI para moléculas antioxidantes de menor polaridad, como los carotenoides [80].

En cuanto a los analizadores de masas, existen diferentes tipos de analizadores que se emplean en espectrometría de masas para el estudio de los compuestos fenólicos: el analizador de cuadrupolo, de sector magnético, la trampa iónica y el analizador de tiempo de vuelo. Una de las principales ventajas de utilizar el analizador de trampa iónica es la posibilidad de realizar análisis de MS^n para obtener información estructural de los compuestos fenólicos. Esta técnica de espectrometría de masas de múltiples pasos (MS/MS o MS^n) consiste en el aislamiento de iones específicos para su fragmentación en una primera etapa del análisis de masas, para posteriormente inducir su disociación por colisión con las moléculas de un gas inerte, como argón o helio, para analizar los nuevos fragmentos producidos en esta segunda etapa del análisis de masas [85]. Por tanto, en la presente Memoria se ha usado la trampa de iones para facilitar la caracterización de los azúcares unidos a los flavonoides, además de las agliconas. Sin embargo, la trampa de iones adolece de la alta resolución que proporcionan los analizadores de tiempo de vuelo (TOF), lo que permite obtener la masa exacta de los compuestos y obtener sus composiciones elementales como criterio de

identificación y/o confirmación. Es por ello que también se ha usado Q-TOF cuando se ha necesitado confirmar la caracterización de algún compuesto (por ejemplo, usando la base de datos METLIN).

Debido a que las intensidades de las corrientes iónicas que salen de los analizadores son muy pequeñas, en torno a 10^{-8} y 10^{-14} A, su detección debe ser muy rápida y precisa. Principalmente existen tres tipos de detectores: la caja de Faraday, el multiplicador de electrones y la placa fotográfica.

En la **Figuras 23 y 24** se muestran las imágenes del espectrómetro de masas de trampa de iones acoplado a un HPLC y del espectrómetro de masas de cuadrupolo-tiempo de vuelo acoplado a un HPLC. Ambos instrumentos, ubicados en el Centro de Investigación Científico Técnica (CICT) de la universidad de Jaén, han sido utilizados para la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos de las muestras estudiadas en esta Memoria.

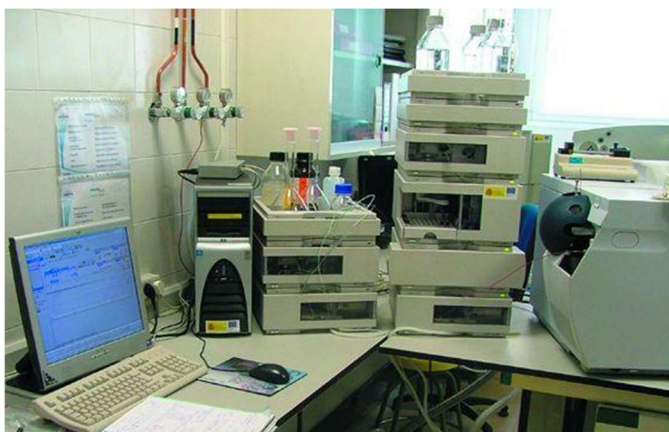


Figura 23. Espectrómetro de masas Esquire 6000 de Bruker unido a un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Agilent 1100.



Figura 24. Espectrómetro de masas Agilent 6530B unido a un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Agilent 1200.

3.4.2. Determinación del contenido mineral

El análisis del contenido mineral en los alimentos, así como de los metales pesados, es cada vez más imprescindible a la hora de evaluar los perjuicios o beneficios que nos puede aportar un alimento. La presencia de metales no tiene por qué ser perjudicial. Además, su ingesta es inevitable ya que se encuentran presentes de forma natural o artificial en los alimentos.

Podemos distinguir dos grupos de metales: los metales esenciales y los no esenciales. Los metales esenciales deben estar en la dieta en cantidades suficientes, como el calcio, el sodio, el potasio o el manganeso, de tal manera que si son insuficientes se podrían producir problemas de salud. Y por otro lado están los metales no esenciales, como el cadmio, el mercurio o el plomo. Un incremento en la concentración de estos metales no esenciales en los alimentos puede provocar intoxicaciones en el consumidor tras su ingesta. En la **Figura 25** se ha representado una tabla periódica con los elementos químicos que son necesarios para la vida [86]. A su vez, en la **Tabla 4** se muestran las cantidades de referencia (para un hombre adulto de 70 kg) de algunos elementos esenciales y los síntomas que

Introducción

aparecen en los individuos cuando existe deficiencia de estos elementos en el organismo [86].

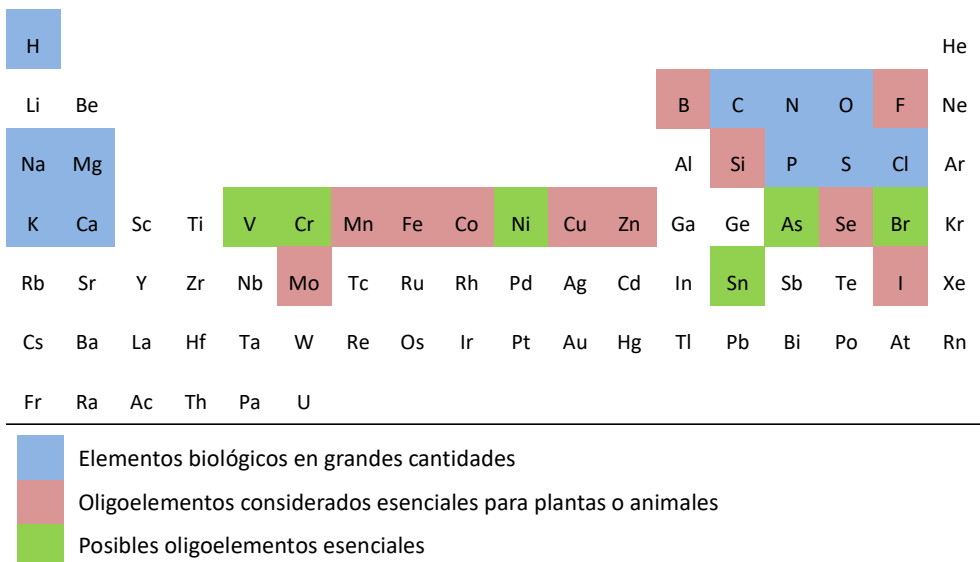


Figura 25. Tabla periódica de los elementos químicos requeridos para la vida.

Tabla 4. Elementos metálicos esenciales para el cuerpo humano (referidos a un hombre adulto de 70 kg) y los síntomas de deficiencia ante la falta de dichos metales esenciales.

Elemento	Cantidad media	Síntomas de deficiencia
Ca	1000 g	Retraso en el crecimiento óseo
Mg	30 g	Calambres musculares
Fe	5 g	Anemia, trastornos sistema inmunitario
Zn	2 g	Daño en la piel, retraso del crecimiento
Cu	100 mg	Debilidad arterial, trastorno hepático
Mn	16 mg	Infertilidad, deterioro óseo
Mo	5 mg	Retraso en el crecimiento celular, caries
Co	2 mg	Anemia perniciosa

Para llevar a cabo el análisis de minerales y elementos traza presente en los vegetales, las plantas, o cualquier alimento, existe una amplia variedad de métodos analíticos. Algunos de los métodos más frecuentemente utilizados son la espectrometría de absorción atómica de llama, con horno de grafito o por generación de hidruros, la espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente y la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) [87]. En todos ellos se utilizan equipos muy sofisticados que alcanzan límites de detección muy bajos, empleando la intensidad de la luz emitida por una llama, un plasma, un arco o chispa eléctricos en una longitud de onda particular para determinar la cantidad de un elemento en una muestra. En los trabajos desarrollados en esta Memoria se ha trabajado únicamente con el ICP-MS. Concretamente, el equipo utilizado se muestra en la **Figura 26** (ubicado en el CICT de la Universidad de Jaén).



Figura 26. Espectrómetro ICP-MS 7900 (Agilent).

El fundamento está basado en la generación de un plasma para producir iones que posteriormente se detectan y analizan con un espectrómetro de masas. El sistema produce un plasma a alta temperatura (alrededor de 10000 K) que consiste principalmente en átomos de argón. La muestra a analizar es nebulizada antes de introducirse al plasma, donde se vaporiza y se descompone en los átomos

que la constituyen. Aquí, una gran proporción de estos átomos son ionizados dentro del entorno de plasma a alta temperatura. Estos iones cargados se dirigen a través de una serie de conos y lentes en un espectrómetro de masas cuadrupolo, donde finalmente se separan en función de su relación m/z . El equipo permite el análisis químico cualitativo y cuantitativo de la mayoría de los elementos de la tabla periódica, alcanzando un amplio rango de concentraciones que van desde las partes por trillón (ppt) hasta las partes por millón (ppm) [88]. Un esquema de las partes de las que consta un ICP-MS se muestra en la **Figura 27**.

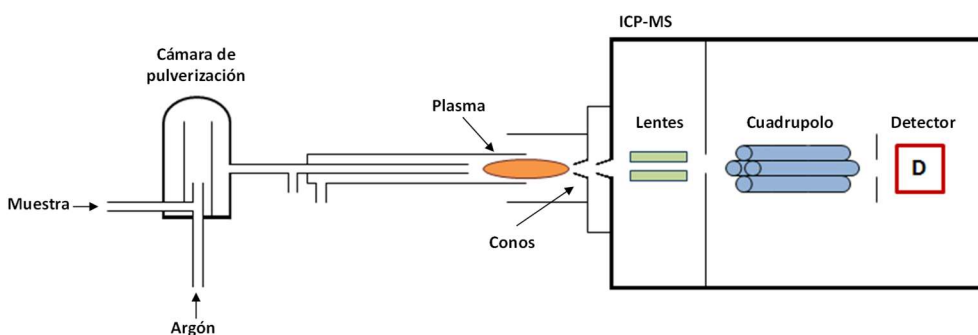


Figura 27. Esquema de un ICP-MS.

Previo al análisis del contenido inorgánico de la muestra, será necesario realizar su preparación para eliminar la materia orgánica de la misma; además, para que la muestra pueda ser introducida y analizada por el espectrómetro, ésta debe ser homogénea y permanecer en disolución. Para ello, se realiza una digestión por vía húmeda, empleando ácido nítrico y peróxido de hidrógeno, en un sistema de digestión por microondas. Se trata de un sistema cerrado de reacción acelerada de microondas, mediante el cual se utiliza la energía de microondas para exponer la muestra a un programa de calentamiento controlado, consiguiendo que ésta sea digerida correctamente y en poco tiempo [87]. En la **Figura 28** se muestra el sistema gestor utilizado durante los ensayos de la presente Memoria.



Figura 28. Sistema de digestión por microondas, Mars Xpress (CEM).

3.5. Evaluación de la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos mediante ensayos *in vitro*

El estrés oxidativo está estrechamente relacionado con el inicio de diversas patologías y desórdenes en la salud. Este hecho tan relevante ha llevado a científicos de todo el mundo a interesarse por esta temática.

Bajo condiciones de estrés, nuestro cuerpo produce más especies reactivas de oxígeno (como radicales hidroxilo, radicales anión superóxido y peróxido de hidrógeno) que especies antioxidantes enzimáticas (como la enzima glutatión peroxidasa, la enzima catalasa, la enzima superóxido dismutasa y la enzima glutatión reductasa) y especies antioxidantes no enzimáticas (como el tocoferol (vitamina E), el ácido ascórbico (vitamina C) y compuestos fenólicos), provocando daño celular debido al desequilibrio de especies [89].

Una especie antioxidante es aquella que se define como un compuesto capaz de interactuar con los radicales libres y consigue reducir, controlar o prevenir los procesos oxidativos en las células antes que sean dañadas, incluso si el compuesto está presente en una menor concentración que el sistema oxidado [90,91].

La falta de antioxidantes en el organismo facilita el desarrollo de enfermedades degenerativas. Una mayor ingesta de compuestos antioxidantes procedentes de fuentes naturales paliaría el estrés oxidativo producido en las células y serviría como medicina preventiva, eliminando o retardando la oxidación [92].

Los antioxidantes sintéticos como el butilhidroxitolueno y butilhidroxianisol fueron muy empleados como aditivos en algunos alimentos. Sin embargo, su uso ahora está restringido debido a su asociación con enfermedades hepáticas y la carcinogénesis [93,94]. Por esta causa, el interés de la comunidad científica en la búsqueda de antioxidantes naturales se ha visto incrementado, fundamentalmente para disminuir los efectos secundarios que pueden causar los antioxidantes sintéticos.

Los antioxidantes adquieren diferentes roles durante la defensa frente a la oxidación, aliviando el estrés oxidativo a través de varios mecanismos: (A) inhibición de las enzimas prooxidativas (óxido nítrico sintasa, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa), que se traduce en una disminución en la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (*reactive nitrogen species*, RNS), (B) mejora de la expresión de enzimas antioxidantes y desintoxicantes, y (C) neutralización y eliminación directa de ROS y RNS [90]. En la **Figura 29** se muestra un esquema de los diferentes mecanismos de acción de los compuestos fenólicos [90].

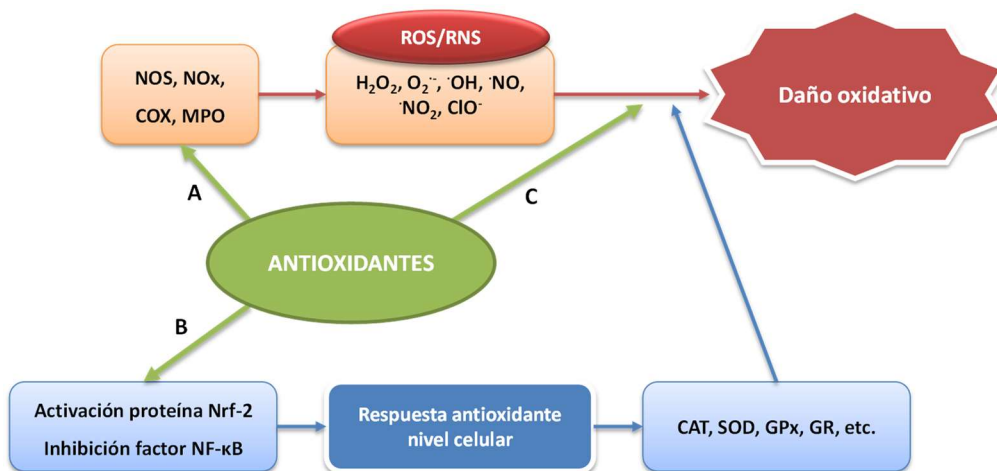
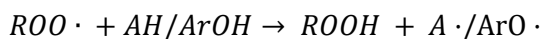


Figura 29. Mecanismos de acción de los antioxidantes.

NOS: óxido nítrico sintasa; NOx: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa; COX: ciclooxigenasa; MPO: mieloperoxidasa; CAT: enzima catalasa; SOD: enzima superóxido dismutasa; GPx: enzima glutatión peroxidasa; GR: enzima glutatión reductasa.

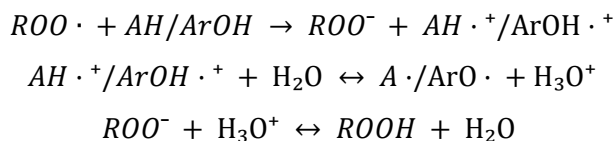
El interés por la determinación de la actividad antioxidante de compuestos fenólicos aislados o procedentes de extractos de plantas ha llevado al desarrollo de diferentes metodologías orientadas en este propósito. Estos ensayos enfocados en determinar la capacidad antioxidante de los vegetales se pueden dividir en dos grupos, en función de las reacciones químicas involucradas en el proceso antioxidante: transferencia de átomos de hidrógeno (*hydrogen atom transfer*, HAT) y transferencia de electrones individuales (*electron transfer*, ET) [95].

Los ensayos basados en las reacciones de tipo HAT determinan la capacidad de eliminación de radicales libres de un antioxidante mediante la transferencia de átomos de hidrógeno. La reacción que se lleva a cabo, en la cual un átomo de hidrógeno de un fenol es transferido a una especie radicalaria ($ROO\cdot$), es del siguiente tipo [96]:



El nuevo radical formado ($A\cdot/ArO\cdot$) es más estable que el inicial.

Por otro lado, los ensayos basados en las reacciones tipo ET miden la capacidad reductora de un antioxidante. En este caso el antioxidante transfiere un electrón para reducir un compuesto. Esto provoca cambios de color en la disolución. El aumento o disminución en la absorbancia a una determinada longitud de onda está relacionado con la concentración de antioxidantes en la muestra. Las reacciones en las que se basa la transferencia de electrones individuales son del tipo [96]:



Estas reacciones van a depender del disolvente y del pH.

En la determinación de la actividad antioxidante son muy empleados los ensayos *in vitro*. Son ensayos rápidos, sencillos, económicos y muy útiles en el estudio de la actividad antioxidante, pero carecen de relevancia biológica al estar diseñados para el uso de radicales sintéticos, por lo que no reflejan la situación *in vivo*. Por ello, otras metodologías han sido propuestas con el objetivo de evaluar la actividad de captación de las especies ROS y RNS formadas *in vivo*, como $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , ClO^{\cdot} , $ONOO^-$ y ClO^- [90].

En los ensayos *in vitro* se produce la reacción de los compuestos fenólicos con radicales libres, formando complejos coloreados que pueden detectarse con un espectrofotómetro UV-Vis, o casos donde se mide un decaimiento de la fluorescencia. Debido a toda la información que proporcionan estos ensayos, son considerados en las fases iniciales de estudios de antioxidantes, ya que ofrecen bastantes datos acerca de la capacidad de los compuestos fenólicos para neutralizar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno [68].

Los ensayos *in vitro* utilizados en esta Memoria para la evaluación de la actividad antioxidante en las diferentes muestras de estudio se explican a continuación.

3.5.1. ABTS^{•+}

Se trata de un ensayo ampliamente utilizado para determinar la capacidad antioxidante [90]. Se produce una reacción tipo ET, basada en la capacidad de los antioxidantes para capturar el radical catiónico ABTS^{•+}. El radical ABTS^{•+} es generado por vía química a partir del reactivo ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) en presencia de fuertes agentes oxidantes ($K_2S_2O_8$, MnO_2 o radical peroxilo) [90,97,98]. En la **Figura 30** se muestra la reacción que tiene lugar [98].

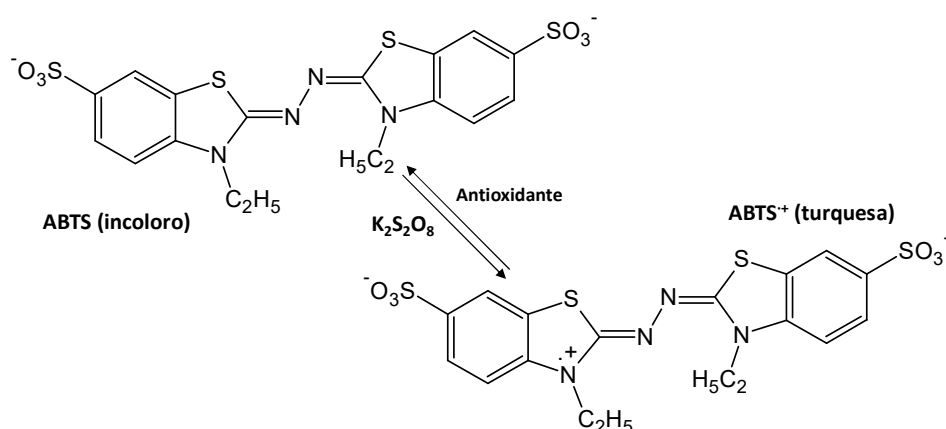


Figura 30. Reacción de generación de ABTS^{•+} y su reacción con una especie antioxidante.

El radical catiónico de ABTS generado es un cromóforo de color turquesa que presenta absorción máxima a las longitudes de onda de 414, 645, 734 y 815 nm [76].

En presencia de antioxidantes, la solución turquesa de ABTS^{•+} se decolora. De esta manera, la eficacia de eliminación de radicales se puede medir espectrofotométricamente por la disminución de la absorbancia que se produce [68]. La detección se realiza a 734 nm, donde las interferencias con otros componentes absorbentes es menor [99]. El estándar común más empleado es el Trolox, expresándose la capacidad antioxidante de la muestra en términos de equivalentes de Trolox (TE) [100]. La **Figura 31** muestra el ensayo ABTS en

diferentes concentraciones de Trolox, donde se observa una disminución en la intensidad del color a medida que aumenta la concentración del patrón.



Figura 31. Recta de calibrado de Trolox (0.01-0.4 mM) utilizada en un ensayo de ABTS.

3.5.2. DPPH

Es un ensayo frecuentemente utilizado en la metodología *in vitro* para la determinación de la capacidad antioxidante. El reactivo DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) se trata de un radical libre nitrogenado, de naturaleza orgánica, estable y color morado, el cual se encuentra disponible comercialmente [68,90,101].

Al inicio se asumió que el mecanismo de reacción se trataba únicamente de un proceso HAT, pero estudios posteriores descubrieron que el mecanismo fundamental es la reacción de transferencia de electrones, que ocurre más rápidamente que la extracción del átomo de hidrógeno. Se considera, por tanto, un ensayo basado en la neutralización del radical DPPH[•] por especies antioxidantes a través de la donación de electrones [17,68,102]. En la **Figura 32** se observa la reacción que tiene lugar [101].

Al entrar en contacto los antioxidantes con el radical DPPH[•], se produce una reducción que provoca la decoloración de la solución de DPPH a un color amarillo pálido, originando un descenso de la absorbancia. Este hecho puede ser medido

espectrofotométricamente en torno a 517 nm, actuando como un indicador de la eficacia antioxidante [68,76,103].

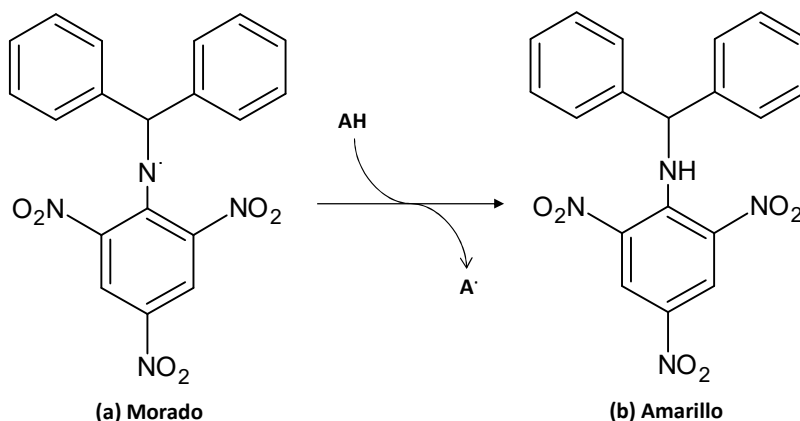


Figura 32. Reacción química entre el radical DPPH[•] (a) y el antioxidante (AH), para dar lugar a la estructura del radical reducido (b).

Los estándares comunes más empleados son el Trolox y el ácido ascórbico, expresándose la capacidad antioxidante de la muestra en términos de equivalentes de Trolox o ácido ascórbico. Otra manera de expresar los resultados es mediante el parámetro cinético EC₅₀, definido como la cantidad de antioxidante necesaria para reducir en un 50% la cantidad inicial de radical [76]. En la **Figura 33** se muestra el ensayo DPPH en diferentes concentraciones de Trolox, donde se observa una disminución en la intensidad del color a medida que aumenta la concentración del patrón.



Figura 33. Recta de calibrado de Trolox (0.025-0.8 mM) utilizada en un ensayo de DPPH.

3.5.3. FRAP

El ensayo FRAP (*Ferric ion Reducing Antioxidant Power*) o del poder antioxidante para reducir el ion férrico, mide el poder reductor de una muestra. Se trata de una reacción tipo ET basada en la reducción de un complejo formado por 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) y hierro férrico (Fe^{3+}) incoloro a un complejo ferroso (Fe^{2+}) de intenso color azul, en presencia de antioxidantes en medio ácido [76,104].

En la **Figura 34** se muestran las estructuras de los dos complejos [105].

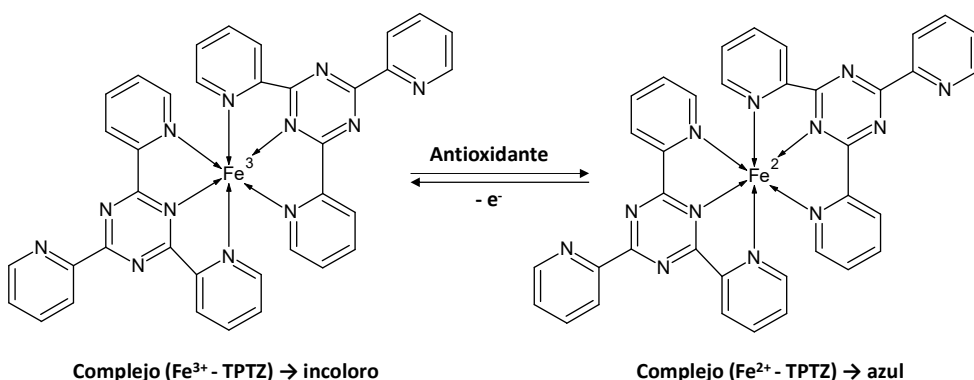


Figura 34. Estructura de los complejos y mecanismo de reacción en el método FRAP.

El cambio de color producido en la reacción se traduce en un incremento de la absorbancia, que es medida espectrofotométricamente en torno a 593 nm durante 30 min [76,106].

Algunos de los inconvenientes de este ensayo es que cualquier compuesto con un potencial redox menor que el del par $\text{Fe}(\text{III})/\text{Fe}(\text{II})$ (0.77 V) podría producir la reducción, induciendo un valor falso de FRAP [107], además de que existen compuestos antioxidantes que no son capaces de llevar a la cabo la reacción de reducción, falseando igualmente su valor [108]. Los resultados se expresan en equivalentes de Trolox.

3.5.4. CUPRAC

El ensayo CUPRAC (*Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity*) o de la capacidad antioxidante reductora del ion cúprico, se emplea en la medida de la capacidad antioxidante total de las muestras. Basado en un mecanismo de transferencia de electrones, se considera un ensayo sencillo y versátil utilizado para medir espectrofotométricamente la capacidad antioxidante de una amplia variedad de polifenoles [109].

El reactivo oxidante cromógeno utilizado es el catión bis(neocuproína) de cobre (II) (Cu(II)-Nc), el cual actúa como un agente de transferencia de electrones. Este reactivo incoloro, en presencia de antioxidantes se reduce y forma el cromóforo catiónico bis(neocuproína) de cobre (I) (Cu(I)-Nc) de color anaranjado [109,110]. En la **Figura 35** se puede observar la reacción que tiene lugar [109].

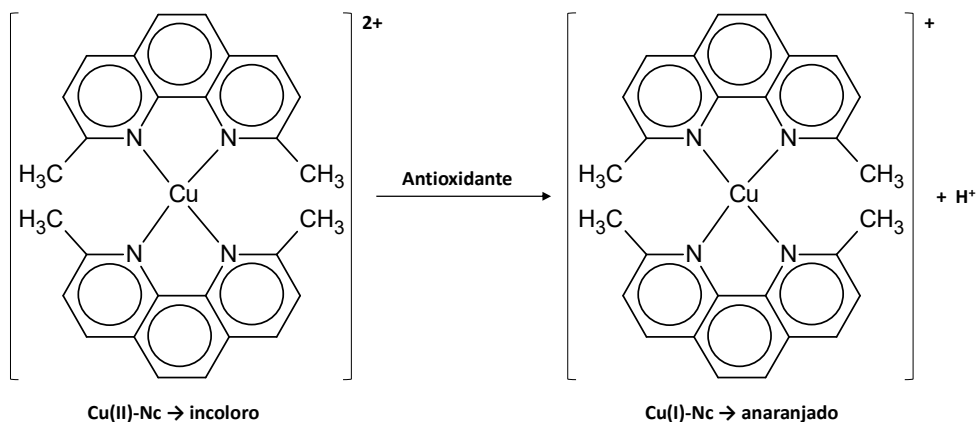
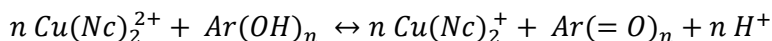


Figura 35. Mecanismo de reacción en el método CUPRAC.

A medida que el antioxidante va reaccionando con el reactivo cromógeno (Cu(II)-Nc), se produce un aumento en la absorbancia a una longitud de onda preespecificada.

La ecuación de la reacción que se produce se puede simplificar de la siguiente manera:



donde se observa que los polifenoles ($\text{Ar}(\text{OH})_n$) se oxidan a sus formas quinolónicas ($\text{Ar}(\text{=O})_n$) y el Cu^{2+} se reduce a la forma coloreada Cu^+ . Este producto de reducción ($\text{Cu}(\text{Nc})_2^+$) presenta un máximo de absorción a 450 nm, que es medido espectrofotométricamente para determinar así la capacidad antioxidante de las muestras [96]. Los resultados se expresan en equivalentes de Trolox.

3.5.5. Fosfomolibdeno

Es un ensayo que se utiliza para determinar la capacidad antioxidante de las muestras. Su mecanismo de reacción está basado en la transferencia de hidrógeno y electrones de las muestras antioxidantes a un complejo de Mo (VI) [111].

El complejo reactivo de Mo (VI) se reduce a Mo (V) en presencia de un antioxidante, con la consiguiente formación de un complejo verde de fosfato de Mo (V) a pH ácido [112]. En la **Figura 36** se muestra el mecanismo de reacción que tiene lugar entre un antioxidante (cianidina) y el Mo (VI) [113].

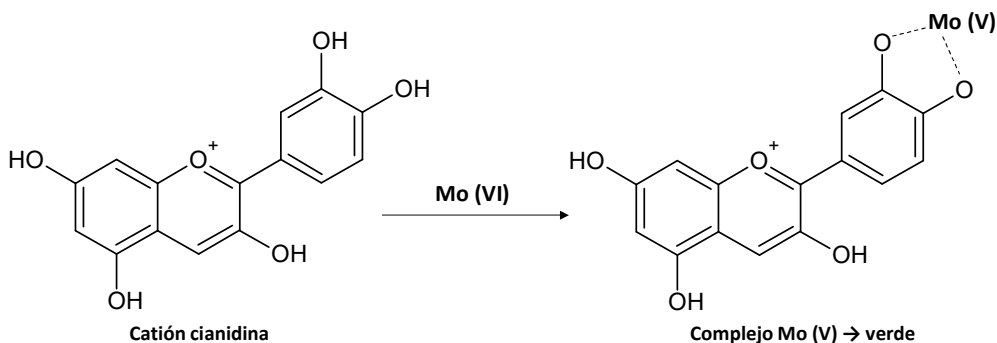


Figura 36. Mecanismo de reacción en el método del fosfomolibdeno.

El espectro UV/Visible del complejo de fosfomolibdeno formado tiene un máximo de absorción característico a 695 nm. Esta absorbancia máxima se emplea para las determinaciones espectrofotométricas. Un mayor valor de la absorbancia indica una mayor actividad antioxidante [114,115].

Algunos antioxidantes como el ácido ascórbico, el glutatión, la cisteína, los tocoferoles, los polifenoles y las aminas aromáticas tienen la capacidad de donar hidrógeno y electrones, por lo que pueden ser detectados mediante este ensayo [111]. Los resultados se expresan en equivalentes de Trolox [116].

3.5.6. Capacidad quelante de metales

Este ensayo permite caracterizar la actividad antioxidante de las muestras, empleando el hierro como uno de los metales más comúnmente utilizados para su determinación.

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se atribuye principalmente a sus propiedades redox, que les permiten actuar como agentes reductores. Pero además, también pueden poseer propiedades de quelación de metales [117]. Esta quelación de iones metálicos tiene un efecto antioxidante debido a que los metales de transición, como el hierro y el cobre, catalizan la generación de especies reactivas de oxígeno, incluidos el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y el radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) [118].

El principio del ensayo de la capacidad quelante de metales (método de la ferrocina) está basado en la actividad quelante de muestras antioxidantes frente al ion ferroso (Fe^{2+}) [119].

En un medio ligeramente ácido (pH 6) los compuestos fenólicos se unen a Fe^{2+} ; el Fe^{2+} restante reacciona con ferrocina. La ferrocina es un reactivo cromógeno empleado en el ensayo, que al reaccionar con el hierro divalente, forma una especie compleja estable de color azul (Fe^{2+} -ferrocina) que puede medirse espectrofotométricamente a 562 nm [119,120]. En la **Figura 37** pueden observarse las reacciones que tienen lugar [120].

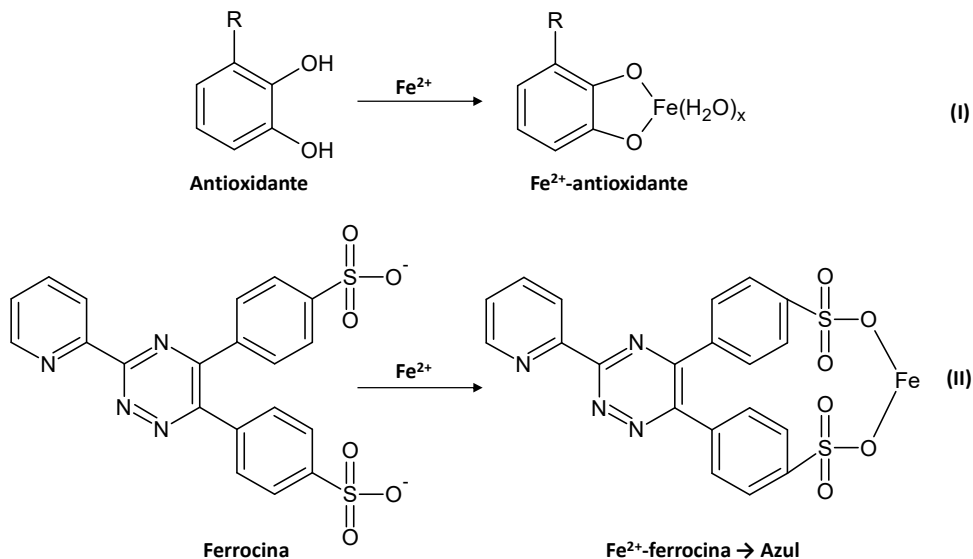


Figura 37. Reacción de (I) un antioxidante con Fe²⁺ y (II) ferrocina con Fe²⁺.

En presencia de compuestos fenólicos hay una interrupción en la formación del complejo metálico (Fe²⁺-ferrocina) debido a la unión de los antioxidantes con el Fe²⁺, lo que conduce a una disminución de la absorbancia. La medición de la reducción de color es una estimación de la capacidad de unión del extracto, por lo que cuanto menor sea la absorbancia medida a 562 nm, más fuerte será la capacidad de unión de los compuestos antioxidantes de la muestra al Fe²⁺, y por tanto presentará mayor actividad antioxidante [120]. Los resultados se expresan en equivalentes de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) [120,121].

3.6. Inhibición enzimática

Con el fin de aliviar la sintomatología que presentan algunas enfermedades, actualmente se producen, mediante procedimientos químicos, compuestos que actúan como inhibidores enzimáticos, pero la mayoría de ellos presentan efectos secundarios nocivos o no son totalmente efectivos. Por ello, en la comunidad

científica existe un interés creciente por encontrar inhibidores enzimáticos naturales, que sean eficientes y menos tóxicos, y puedan ser introducidos en el campo de la farmacología.

Las plantas son una de las fuentes más importantes en la búsqueda de compuestos con actividad inhibitoria frente a ciertas enzimas involucradas en enfermedades comunes en la población. Diferentes tipos de metabolitos presentes en los vegetales, tales como alcaloides, flavonoides y terpenos, presentan una importante actividad inhibitoria [122,123].

Según la teoría de la inhibición enzimática, la inhibición de las enzimas involucradas en algunos procesos fisiológicos (enzimas clave), se podría utilizar para aliviar los síntomas observados en ciertas enfermedades. Los inhibidores enzimáticos son mayoritariamente metabolitos secundarios de naturaleza bioactiva, que se unen a una enzima y disminuyen su bioactividad. Este bloqueo de la actividad enzimática puede provocar la muerte de patógenos o corregir desequilibrios metabólicos [124]. Muchas moléculas son inhibidores de enzimas. La unión de un inhibidor a una enzima puede impedir la entrada del sustrato al sitio activo de la enzima y dificultar que la enzima catalice su reacción correspondiente. En la **Figura 38** se muestra el esquema general de una reacción enzimática normal y una reacción con un inhibidor enzimático.

La validez de un inhibidor enzimático en medicina suele venir determinada por su potencia (concentración necesaria para inhibir una enzima) y por su especificidad (incapacidad de unirse a otras proteínas). Una elevada potencia y especificidad aseguran que el medicamento va a presentar una baja toxicidad y pocos efectos secundarios [124].

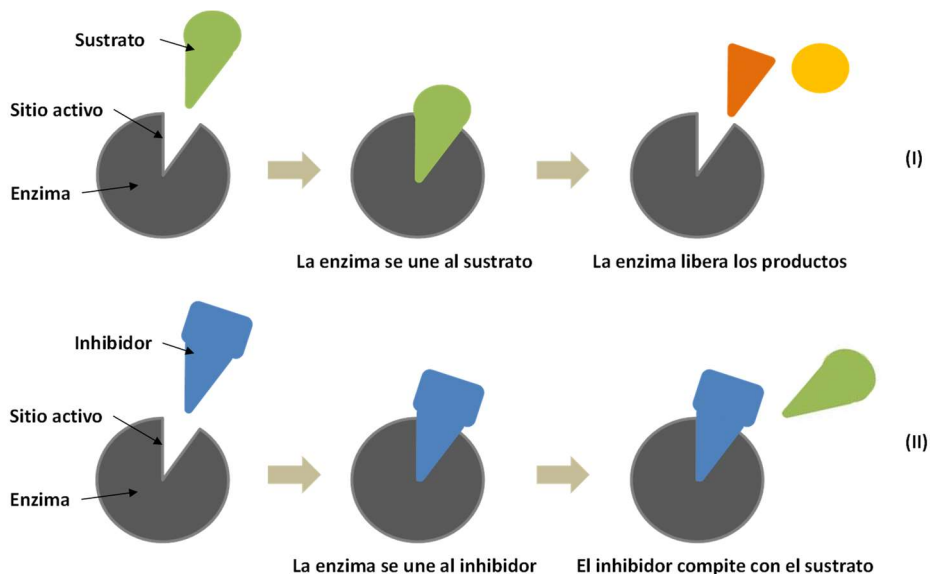


Figura 38. Esquema de (I) una reacción enzimática sin inhibidor y (II) con inhibidor enzimático.

Algunos de los estudios que se realizan en plantas sobre inhibición enzimática se realizan sobre las enzimas que participan en las enfermedades más comunes que afectan a la población (diabetes, Parkinson, obesidad, etc.) [125,126]. En los siguientes apartados se van a explicar los ensayos de inhibición enzimática que se han llevado a cabo en la presente Memoria sobre ciertas enzimas.

3.6.1. Colinesterasas

Las colinesterasas son un grupo de enzimas presentes en la mayoría de organismos vivos, las cuales pueden ser definidas como un grupo de esterasas de serina capaces de hidrolizar ésteres de colina, tales como la acetilcolina. La acetilcolina es un neurotransmisor que ejerce su acción en diferentes regiones del sistema nervioso central [127]. Su función es fundamental ya que la pérdida gradual de acetilcolina está asociada al deterioro cognitivo progresivo y a la función neuromuscular [128].

En los vertebrados, las colinesterasas se clasifican en dos grupos principales en función de sus características fisiológicas y bioquímicas: la colinesterasa verdadera o acetilcolinesterasa (AChE) y la pseudocolinesterasa o butirilcolinesterasa (BChE). Ambas enzimas son codificadas por dos genes diferentes que producen todas las formas moleculares de las dos enzimas y ambas están encargadas de hidrolizar la acetilcolina, es decir, son las responsables de la regulación de la concentración de acetilcolina en el organismo [128].

Se han descrito cambios en los niveles de las enzimas colinesterasas y sus propiedades en varias enfermedades neurodegenerativas. La inhibición de las colinesterasas AChE y BChE ha encontrado aplicaciones en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y neuromusculares. Las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y miastenia gravis son las tres neuropatologías más estudiadas en relación con alteraciones en la enzima AChE [128].

Los inhibidores de AChE y BChE funcionan impidiendo que estas enzimas hidrolicen la acetilcolina, incrementando así el nivel y la duración de la acción de este neurotransmisor, imposibilitando o retrasando la aparición de enfermedades.

El método de Ellman es el más usado para estudiar la actividad de las colinesterasas. Se trata de un ensayo de dos reacciones: en la primera reacción, la colinesterasa (AChE o BChE) hidroliza un tioéster (acetiltiocolina (ATCh)) en una tiocolina intermedia (TCh). En la segunda reacción, la TCh interactúa con el ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) dando un producto de color amarillo, el ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB). Este cambio en la coloración puede medirse espectrofotométricamente a una longitud de onda alrededor de 410 nm. La intensidad del color es proporcional a la actividad de la enzima [129,130]. En la **Figura 39** se observa la reacción catalizada por las enzimas colinesterasas [129].

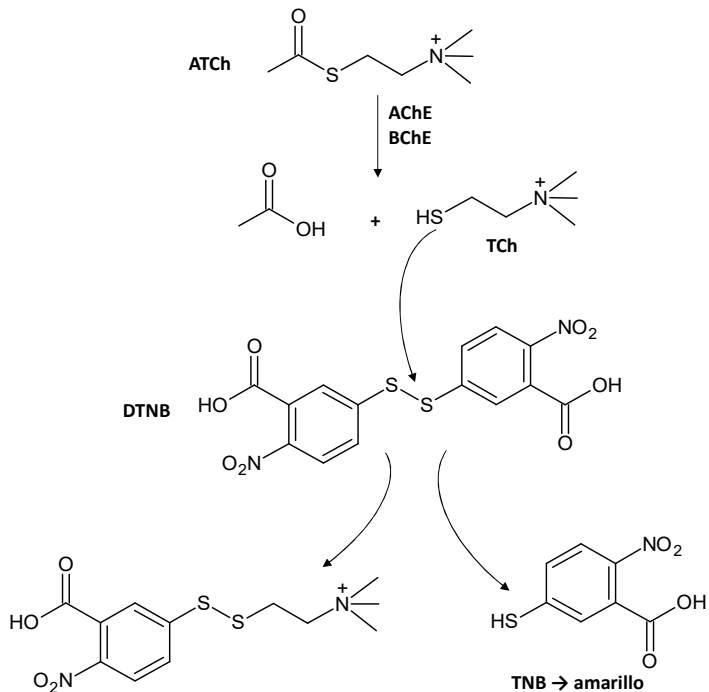


Figura 39. Reacción catalizada por las enzimas colinesterasas.

La galantamina es un medicamento inhibidor de la acetilcolinesterasa y se suele emplear como estándar en este ensayo [130].

3.6.2. Tirosinasa

La tirosinasa es una enzima cuprífica muy extendida en plantas y animales que juega un papel fundamental en la síntesis de la melanina. Su función consiste en regular directamente la cantidad de melanina producida por el organismo [131]. La tirosinasa participa en los primeros dos pasos de la biosíntesis de melanina, en la que la L-tirosina se hidroxila a L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) para posteriormente ser oxidada a dopaquinona [132].

Cuando una persona tiene un gen tirosina mutado padece albinismo; por el contrario, un nivel extremadamente alto de tirosinasa puede inducir a la aparición de melanoma.

La inhibición de la enzima tirosinasa es una de las técnicas más importantes para el desarrollo de nuevos agentes despigmentantes, alcanzando gran interés tanto en medicina como en cosmética [133,134].

La hidroquinona es un agente despigmentador utilizado como fármaco para el blanqueamiento de la piel, actuando como inhibidor de la tirosinasa a través de la interacción con el cobre del sitio activo. Sin embargo, debido a sus efectos secundarios, como hipomelanosis o amelanosis, y su elevada citotoxicidad, hacen que el uso de este medicamento esté limitado [135]. Existen otros fármacos despigmentantes utilizados como agentes blanqueadores de la piel, como son el ácido kójico, la arbutina y la aloesina, pero igualmente su uso se ha limitado debido a la aparición de efectos colaterales [136]. Así, una vez más, expertos recurren a fuentes naturales como las plantas para encontrar alternativa a estos agentes despigmentantes, ya que en la mayoría de los casos están libres de efectos adversos [137].

Los polifenoles, entre ellos el kaempferol o la quercetina, son inhibidores muy potentes encontrados en las plantas [138,139]. Estos flavonoides inhiben la enzima tirosinasa debido a su capacidad de quelar el cobre en el sitio activo.

En este ensayo se emplea el método del dopacromo. Se basa en la monitorización espectrofotométrica de la formación de dopacromo, de color naranja, a una longitud de onda de 475 nm, tras la ciclación oxidativa de dopaquinona producida por la oxidación inducida por tirosinasa del sustrato (L-DOPA), en presencia y en ausencia del inhibidor [140,141]. En otros casos se describe que la actividad inhibitoria de la tirosinasa se determina espectrofotométricamente controlando la formación de dopacromo a 492 nm. El inhibidor de la tirosinasa provoca una disminución en la absorción de dopacromo [142]. La reacción que tiene lugar se muestra en la **Figura 40** [140].

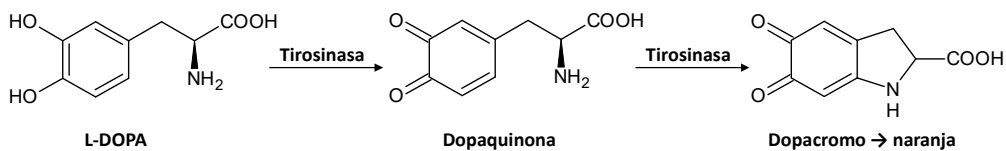


Figura 40. Formación de dopacromo por oxidación catalizada por tirosinasa de L-DOPA.

El ácido kójico es un potente inhibidor de la síntesis de melanina y suele emplearse como un inhibidor estándar en este ensayo [143].

3.6.3. α -amilasa

La α -amilasa es una enzima que presenta un rol fundamental en la digestión del almidón y del glucógeno, presente en microorganismos, plantas y organismos superiores [123,144].

La α -amilasa cataliza la hidrólisis inicial del almidón en oligosacáridos más cortos a través de la escisión de los enlaces glucosídicos [123,145].

Existen enfermedades relacionadas con la absorción de carbohidratos, como son la diabetes y la obesidad. Un enfoque terapéutico para tratar estos trastornos que afectan a gran parte de la población es disminuir los niveles de glucosa en sangre, para lo cual, una de las estrategias que se llevan a cabo con este propósito es la inhibición de la enzima α -amilasa. Mediante la inhibición de las enzimas hidrolizantes de carbohidratos, α -amilasa y α -glucosidasa, ambas presentes en el intestino delgado y responsables de la descomposición de los oligosacáridos y disacáridos en monosacáridos adecuados para la absorción, se retrasaría dicha absorción de glucosa por parte del organismo [123].

La acarbosa es un medicamento inhibidor de estas enzimas. Su función es retrasar la digestión de carbohidratos, prolongando el tiempo de la digestión; de esta manera la tasa de absorción de glucosa se reduce, reduciéndose así la cantidad de glucosa en sangre. Pero este tipo de fármacos presentan efectos secundarios no

deseables en los pacientes [146], por lo que se realizan investigaciones encaminadas en la búsqueda de inhibidores naturales procedentes de plantas, ya que estas son una fuente importante de componentes químicos con potencial para la inhibición de la α -amilasa y se pueden usar como fuentes alimenticias terapéuticas o funcionales [123].

El método que se lleva a cabo para determinar la actividad de la enzima α -amilasa es el método de Caraway Somogyi del almidón-yodo [147]. El método se basa en la medición del color al formarse el complejo almidón-yodo de coloración azul oscuro. La prueba consiste en la hidrólisis del almidón por la enzima α -amilasa a maltosa y otros fragmentos, y la formación de un complejo azul oscuro que aparece cuando reacciona el almidón con una solución de yodo-yoduro potásico. Realmente el ión triyoduro formado (I_3^-) es el responsable de dicha coloración al deslizarse dentro de la estructura del almidón. La absorbancia del complejo se mide espectrofotométricamente en torno a 660 nm. Esto proporciona una medida del grado de hidrólisis del almidón por la α -amilasa [147,148]. En la **Figura 41** se muestra un esquema simplificado de las reacciones que tienen lugar en este ensayo.

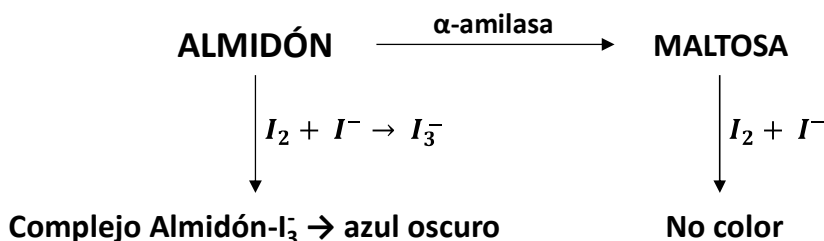


Figura 41. Reacción del almidón con la enzima α -amilasa y con el ión triyoduro (I_3^-).

La acarbosa suele emplearse como estándar por sus propiedades inhibitorias frente a la α -amilasa [149].

3.6.4. α -glucosidasa

La α -glucosidasa es la enzima clave que cataliza el paso final en el proceso digestivo de los carbohidratos; se encuentra ampliamente distribuida en microorganismos, plantas y animales [150]. Está relacionada con la α -amilasa, descrita anteriormente, por ser otra enzima hidrolizante clave de los carbohidratos. Así, de igual manera, la α -glucosidasa está estrechamente relacionada con las enfermedades de diabetes y obesidad. En la **Figura 42** se muestra de manera simplificada la hidrólisis del almidón a glucosa catalizada por ambas enzimas [151].

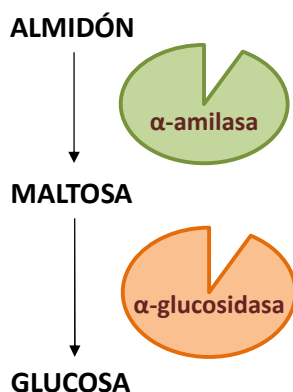


Figura 42. Hidrólisis del almidón a glucosa catalizada por las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa.

Los inhibidores de la α -glucosidasa pueden retrasar la liberación de moléculas de glucosa de los carbohidratos ingeridos en la dieta y retrasar la absorción de dicha glucosa, resultando en niveles bajos en el organismo.

La acarbosa, como se dijo anteriormente, es un medicamento inhibidor de las enzimas hidrolizantes de carbohidratos, pero presenta algunos efectos nocivos. Por ello, se realizan muchos esfuerzos para identificar inhibidores efectivos de la α -glucosidasa que procedan de fuentes naturales, con el fin de desarrollar un alimento funcional o fármaco para su uso contra estas enfermedades. Muchos de estos inhibidores son fitoconstituyentes (compuestos fenólicos, terpenos, etc.) procedentes de las plantas [150].

El método que se emplea para determinar la actividad de la enzima α -glucosidasa se lleva a cabo utilizando el compuesto 4-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (PNPG). La presencia de α -glucosidasa catalizará la conversión del sustrato PNPG en D-glucosa y *p*-nitrofenol (PNP). Este último compuesto presenta coloración amarilla que puede medirse espectrofotométricamente en torno a 405 nm. Durante la medición de PNP se adiciona carbonato sódico para aumentar la sensibilidad de su detección [152–154]. En la **Figura 43** se muestra el mecanismo de reacción que tiene lugar [155].

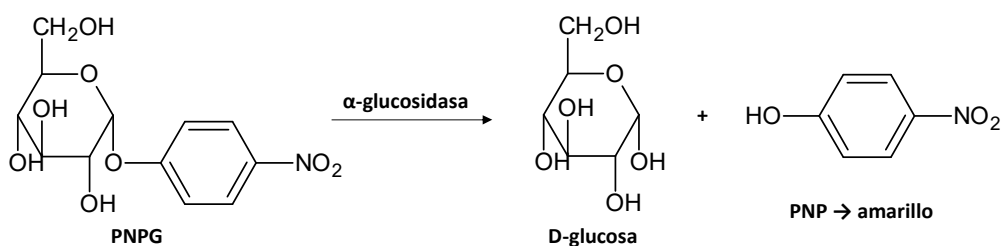


Figura 43. Mecanismo de hidrólisis de 4-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (PNPG) por α -glucosidasa.

La acarbosa, al igual que con la enzima α -amilasa, suele emplearse como estándar por sus propiedades inhibitorias frente a la α -glucosidasa [149].

3.6.5. Lipasa

La lipasa pancreática es una enzima que cataliza la ruptura de los enlaces de ésteres de los triglicéridos (grasas) de los alimentos para que puedan ser absorbidos por el organismo. Esta enzima está presente en la mayoría de los seres vivos y está directamente relacionada con la obesidad [156].

La obesidad es una enfermedad muy expandida en el mundo. Se caracteriza por un aumento de la grasa corporal, lo que es considerado un factor de riesgo para varias enfermedades asociadas. Si una persona presenta un mayor consumo de

grasas que de pérdida energética, los lípidos se acumularán como tejido adiposo, ocasionando obesidad. Una de las estrategias que se llevan a cabo contra esta enfermedad es la inhibición de la lipasa pancreática. Al ser inhibida, los triglicéridos no serán catalizados y el intestino no podrá absorber las grasas para su posterior almacenamiento en el organismo [156].

El orlistat es un fármaco que inhibe las lipasas gástrica y pancreática, que actúa reduciendo la absorción de grasa de la dieta y, por tanto, reduce el aporte energético total. Su uso se debe acompañar de restricción en el consumo de grasa. La contraindicación es que presenta efectos secundarios frecuentes [157]. Por ello, se buscan inhibidores alternativos naturales para combatir los trastornos relacionados con la obesidad.

El método empleado para determinar la actividad de la enzima lipasa utiliza como sustrato el compuesto *p*-nitrofenil butirato (PNPB). La lipasa catalizará la reacción convirtiendo el PNPB en ácido butírico y PNP. De igual modo que en el ensayo anterior con la enzima α -glucosidasa, el compuesto PNP presenta coloración amarilla que se mide con un espectrofotómetro en torno a 405 nm [158]. En la **Figura 44** se muestra el mecanismo de reacción que tiene lugar [159].

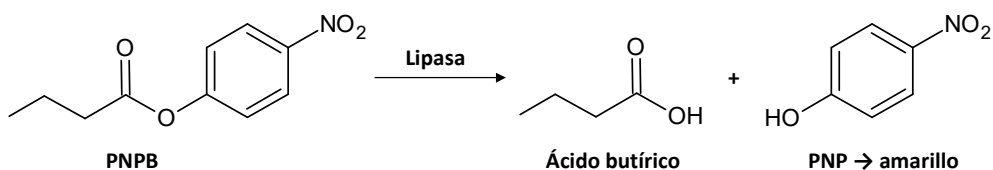


Figura 44. Reacción de hidrólisis enzimática de *p*-nitrofenil butirato (PNPB) por lipasa.

El orlistat, al ser un potente inhibidor de la enzima lipasa, suele emplearse como inhibidor estándar en este ensayo [160].

3.7. Plantas y frutos de estudio

España, por su situación geográfica, ofrece unas condiciones climáticas muy beneficiosas para el desarrollo de muchas especies vegetales. Andalucía, y concretamente la provincia de Jaén, debido a su climatología templada-cálida, de tipo mediterráneo continental y de montaña [161], presenta una flora muy diversa (Figura 45). En esta Memoria, todas las plantas y frutos estudiados fueron recogidos en diferentes localizaciones de la provincia de Jaén.

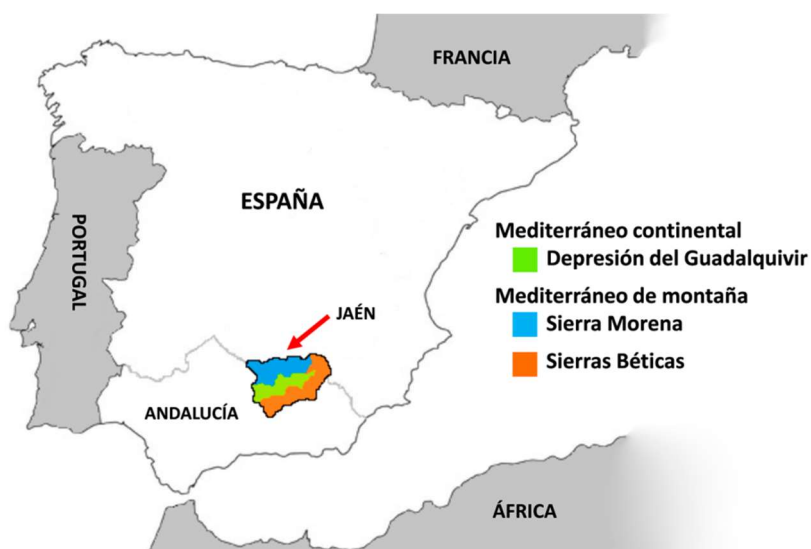


Figura 45. Mapa de localización y climatología de la provincia de Jaén.

3.7.1. *Berberis*

Berberis es un género de planta perteneciente a la familia *Berberidaceae*, ampliamente distribuido por todo el mundo con alrededor de 500 especies. La morfología de este género es de porte arbustivo espinoso. Sus hojas alcanzan entre 1-10 cm de largo, y se convierten en espinas en los brotes más largos. Las flores se tornan de un color amarillo a anaranjado y pueden aparecer aisladas o en racimos,

no superando los 6 mm de longitud. Sus frutos son bayas muy pequeñas de coloración roja azulada [162].

Desde hace más de 2.500 años, las propiedades medicinales y los efectos curativos de este género han sido muy apreciados y han desempeñado un papel muy importante en la medicina tradicional de plantas [163]. Algunas de las muchas propiedades que se han descrito son antibacteriana, antifúngica, antiinflamatoria, antiséptica y antidiabética, y sus infusiones han sido utilizadas para tratar enfermedades del corazón, dolencias digestivas, problemas urinarios y resfriados [162,164–168].

Muchas de estas cualidades medicinales que ofrecen las plantas del género *Berberis* se deben a la presencia de alcaloides, los cuales poseen diferentes actividades farmacológicas [169]. Uno de los alcaloides más activos es la berberina [170]. Además, sus hojas también son ricas en compuestos fenólicos, como la rutina y el ácido clorogénico [166].

Para esta Memoria se estudiaron dos especies de *Berberis*: *Berberis thunbergii* y *Berberis hispanica*.

3.7.1.1. *Berberis thunbergii*

Berberis thunbergii DC. es una especie conocida comúnmente como agracejo rojo o púrpura. Se trata de un arbusto denso de hoja caduca, de forma redondeada y muy espinoso, que puede llegar a alcanzar los dos metros de altura [170]. Sus hojas, pequeñas y ovaladas, presentan tonos rojizos brillantes, lo que le da un gran valor ornamental [171]. En la **Figura 46** se muestra la especie *B. thunbergii*. La floración ocurre en primavera, donde las flores muestran una coloración amarilla rojiza. En otoño aparecen sus frutos de color rojo. Es un arbusto muy resistente a cualquier tipo de suelo, con preferencia a los suelos calizos. Es una planta nativa de Asia, aunque se puede encontrar en América del Norte y en muchos países de Europa [170,172].



Figura 46. Fotografías de *Berberis thunbergii*.

La especie *B. thunbergii* es conocida en Asia como una planta curativa, debido a los beneficios que otorgan a la salud sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antifúngicas y antibacterianas [171,173–175].

3.7.1.2. *Berberis hispanica*

La planta *Berberis hispanica* Boiss. & Reut. se denomina comúnmente agracejo español. Se trata de un arbusto caducifolio espinoso que alcanza hasta los 3 m de altura [176,177]. Los tallos, de tonalidad rojiza, están ramificados desde la base y sus espinas son de color amarillo. Las hojas son verdes y están agrupadas en brotes. Por otra parte, sus flores amarillas se organizan en racimos, apareciendo durante la primavera y el principio del verano. Los frutos que desarrolla son bayas de entre 5 y 9 mm de largo, de un color negro azulado. En la **Figura 47** se puede observar su morfología.

La especie *Berberis hispanica* crece prácticamente en cualquier tipo de terreno entre los 600 y 2500 m de altitud. Es una planta que se localiza frecuentemente en el sur de España y el norte de África (Marruecos y Argelia) [178].



Figura 47. Fotografías de *Berberis hispanica*.

3.7.2. *Sarcocapnos*

Sarcocapnos DC. es un género de planta perteneciente a la subfamilia *Fumarioideae*, de la familia de las *Papaveraceae*. Las plantas de esta familia han sido muy utilizadas en la medicina tradicional popular como ansiolíticos, analgésicos, diuréticos, y como tratamiento en problemas gastrointestinales y trastornos de la piel [179–181].

El género *Sarcocapnos* aparece en la subregión del Mediterráneo occidental, comprendiendo el suroeste de Europa y el noroeste de África, del cual existe poca información. Se extiende principalmente por la Península Ibérica, donde ocho de los diez taxones que lo componen son endémicos de esta región [182–184]. La mayoría de las especies se encuentran en peligro de extinción [185]. Algunas de ellas se distribuyen por el sur de España, localizadas principalmente en el área oriental de Andalucía en zonas escarpadas [186]. Para esta Memoria se analizaron tres especies de *Sarcocapnos*: *Sarcocapnos enneaphylla*, *Sarcocapnos pulcherrima* y *Sarcocapnos saetabensis*.

3.7.2.1. *Sarcocapnos enneaphylla*

S. enneaphylla (L.) DC. es la especie que presenta un área de distribución más amplia, abarcando desde el sur de Francia hasta el norte de África, con gran cantidad de poblaciones en toda España [187]. Sus tallos son frágiles, de 5-30 cm de largo. Las hojas son algo carnosas y sus flores, de color blanco, alcanzan hasta 18 mm de largo. Se trata del género de *Sarcocapnos* con las hojas y flores más pequeñas. Suele crecer en las grietas de acantilados silíceos, en una altura comprendida entre el nivel del mar y 1600 m [186]. En la **Figura 48** se puede apreciar esta especie.



Figura 48. Fotografías de *Sarcocapnos enneaphylla*.

3.7.2.2. *Sarcocapnos pulcherrima*

S. pulcherrima C. Morales & Romero García es una especie endémica del sureste de España, con algunas poblaciones en Andalucía Oriental. Sus tallos son de 5-30 cm de largo. Presenta hojas muy carnosas y gruesas, y sus flores de color rosa alcanzan hasta los 26 mm de longitud [188]. Suele habitar en grietas de acantilados calcáreos comprendidos entre los 600 y 1700 m de altitud [186]. En la **Figura 49** se muestra esta especie.



Figura 49. Fotografías de *Sarcocapnos pulcherrima*.

3.7.2.3. *Sarcocapnos saetabensis*

S. saetabensis Mateo & Figuerola se trata de una especie endémica del este de España, desde Cataluña hasta el este de Andalucía. Parece tener un origen híbrido entre *S. enneaphylla* y *S. pulcherrima* [189]. Los tallos son frágiles y alcanzan longitudes que van desde los 5-25 cm. Las hojas son un poco gruesas y carnosas, y sus flores, de un color que va desde el rosa hasta el blanco, suelen medir entre 15-19 mm de largo. Normalmente crece en grietas silíceas de acantilados entre los 600 y 1800 m sobre el nivel del mar [186]. Se puede observar la morfología de la especie *S. saetabensis* en la **Figura 50**.



Figura 50. Fotografías de *Sarcocapnos saetabensis*.

3.7.3. *Portulaca oleracea* L.

Portulaca oleracea L. es una especie del género *Portulaca* perteneciente a la familia *Portulacaceae*, una familia pequeña con 21 géneros y alrededor de 580 especies [190]. Conocida vulgarmente con el nombre de verdolaga, la *Portulaca oleracea* es una planta anual comestible considerada una especie invasora, que crece en varias áreas del mundo debido a su fácil adaptabilidad a diversas condiciones climáticas [190–192].

Su morfología es de una planta herbácea postrada, con tallos carnosos muy ramificados de color verdoso o rojizo, de unos 30 cm de largo. Sus hojas son pequeñas, con forma ovalada y de color verde oscuro. Entre los meses de mayo y septiembre se produce la floración, con pequeñas flores amarillas en cuyo interior se encuentran diminutas semillas de color negro [190]. En la **Figura 51** se muestran imágenes de *Portulaca oleracea*.



Figura 51. Fotografías de *Portulaca oleracea*.

La *Portulaca oleracea* es una planta muy empleada en la medicina tradicional China. Sus beneficios sobre la salud humana son muchos, siendo utilizada como remedio de diversas dolencias, como dermatitis, inflamación, dolor abdominal, dolor de cabeza, fiebre, infecciones urinarias, debido a que posee un amplio abanico de propiedades farmacológicas (analgésico, antiinflamatorio, antioxidante, bactericida, etc.) [193–195].

Es un vegetal presente en las cocinas de muchos países. Sus tallos y hojas pueden consumirse crudos en ensalada, hervidos, añadirlos a sopas, tomárselos en un té o zumo natural, o simplemente como especia para cocinar [190,196–200]. Es fuente importante de ácidos grasos omega-3, además de contener elevados niveles de nutrientes, compuestos fenólicos, vitaminas y minerales [196,199,201,202].

3.7.4. *Olea europaea* L.

Olea europaea L., o conocido comúnmente como olivo, es una especie del género *Olea* perteneciente a la familia *Oleaceae*, la cual comprende aproximadamente 600 especies en unos 25 géneros [203]. Cultivado desde hace más de 5000 años, el olivo es un árbol de hoja perenne, típico de climas cálidos y secos, muy expandido por toda el área del Mediterráneo, siendo la provincia de Jaén la que posee la plantación de olivos más extensa. Sus hojas son de color verde oscuro por el haz y blanquecinas por el envés. Florece en primavera y su fruto es la aceituna; un fruto generalmente ovalado de color verde. La fotografía del árbol del olivo se muestra en la **Figura 52**.



Figura 52. Fotografía de un olivo (*Olea europaea*).

La aceituna es fuente de compuestos fenólicos en nuestra dieta, aportando al organismo importantes beneficios, ya que poseen propiedades antioxidantes, antitumorales y antiinflamatorias [204–206]. Pero la aceituna, debido a su amargor, no puede consumirse directamente, sino que necesita ser tratada mediante un procedimiento con sosa y/o salmuera que las hace aptas para el consumo humano, recibiendo el nombre de aceitunas de mesa [207,208]. Además, de la aceituna se extrae su aceite, normalmente mediante sistemas mecánicos, siendo un producto muy valorado dentro y fuera de nuestro país.

En esta Memoria se analizaron diferentes variedades de aceitunas: Cornezuelo, Cornicabra, Picual y Royal.

3.7.4.1. *Olea europaea* L. cv. Cornezuelo

La aceituna Cornezuelo de Jaén se encuentra fundamentalmente en las provincias de Jaén y Granada. Se trata de árboles aislados entre plantaciones de otras variedades, por lo que el cultivo de este árbol es bajo.

El fruto es de gran tamaño, asimétrico, con abultamientos, ápice apuntado y forma de cuerno, de ahí la procedencia de su nombre. El hueso, de gran tamaño, es de forma similar a la aceituna.

Es una variedad de productividad alta y rendimiento graso medio. La aceituna presenta una gran resistencia a *Verticillium dahliae* (verticilosis del olivo) y *Dacus oleae* (mosca de olivo), pero es muy vulnerable a *Spilocaea oleagina* (repilo) y especialmente al frío [209].

La aceituna Cornezuelo es utilizada tanto para la producción de aceite como para su elaboración como aceituna de mesa. Su aceite es de muy buena calidad, con tonos frutales; presenta un picante fresco no demasiado acusado en boca, y un amargor y picor en garganta poco intenso. Por otro lado, es un producto muy apreciado para mesa. Para que sean aceitunas aptas para su consumo pueden realizarse diferentes formas de elaboración, siendo una de las maneras más típicas

la llamada “aceitunas de mesa al estilo Jaén”. En este proceso las aceitunas son tratadas únicamente con agua y salmuera, y algunas especias como hinojo y tomillo [207]. En la **Figura 53** se muestra el aspecto de las aceitunas de mesa variedad Cornezuelo aliñadas al “estilo Jaén” y en la **Figura 54-A** se puede apreciar el porte de esta misma variedad aún en el árbol.



Figura 53. Aceitunas de mesa variedad Cornezuelo aliñadas al “estilo Jaén”.

3.7.4.2. *Olea europaea* L. cv. *Cornicabra*

Es la segunda variedad española en cuanto a superficie cultivada (cerca de 300.000 hectáreas), siendo su zona de influencia el centro de la península, principalmente Toledo, Ciudad Real y Madrid.

El fruto es de tamaño medio, asimétrico, con forma alargada y el ápice apuntado. El nombre de Cornicabra hace referencia a la forma curvada de la aceituna que recuerda al cuerno de la cabra. A medida que se produce la maduración, el color va cambiando de verde a negro (**Figura 54-B**). En su interior presenta un hueso, cuya forma es similar a la del fruto.

Su producción y rendimiento graso suelen ser elevados. Es una variedad vigorosa, de gran adaptación a suelos pobres y zonas de climas fríos, aunque es muy susceptible a *Pseudomonas savastanoi* (tuberculosis) y *Spilocaea oleagina* (repilo) [210].

La aceituna Cornicabra se utiliza para la obtención de aceite. Es un aceite de alta estabilidad, muy apreciado por sus características organolépticas. Presenta en

boca una sensación de densidad, suave, con valores medios de amargo y picante. Tiene un aroma equilibrado, con un toque final astringente.

3.7.4.3. *Olea europaea* L. cv. *Picual*

Con más de 900.000 hectáreas, es la principal variedad de aceituna en Andalucía, ocupando alrededor del 60% de la superficie plantada de olivar. Se extiende principalmente por la provincia de Jaén, donde supone casi la totalidad del olivar, y por las provincias de Granada y Córdoba.

La aceituna es de tamaño mediano, con forma elíptica y asimétrica y con el ápice apuntado. Durante la maduración, la coloración se torna de verde a negro, y en su interior presenta un hueso de igual forma que el fruto (**Figura 54-C**).

Es una variedad de fácil adaptabilidad a diversas condiciones de clima y suelo, de elevada productividad y de alto rendimiento graso. Es tolerante a *Spilocaea oleagina* (repilo), pero se ve afectado por *Pseudomonas savastanoi* (tuberculosis), *Verticillium dahliae* (verticilosis del olivo) y *Dacus oleae* (mosca de olivo) [211].

La aceituna de la variedad Picual se emplea para la fabricación de aceite. Son aceites de gran estabilidad, que presentan un frutado característico, aromático, con un sabor un poco picante y un ligero amargor.

3.7.4.4. *Olea europaea* L. cv. *Royal*

Conocida también como Royal de Cazorla, es en la comarca de la Sierra de Cazorla (Jaén) donde más abunda esta variedad, superando las 2.000 hectáreas cultivadas.

El fruto es de tamaño grande, alargado, con forma ovoidal y ligeramente asimétrico. El hueso de su interior es de similares características. De maduración tardía, la aceituna adquiere su característico color rojo una vez que se encuentra madura (**Figura 54-D**).

Introducción

Es una variedad muy rústica, resistente a la sequía e inviernos fríos. Vulnerable a *Spilocaea oleagina* (repilo) y especialmente a *Pseudomonas savastanoi* (tuberculosis) [212]. Presenta una producción más baja y menor contenido graso que la variedad Picual, lo que supondría que en la mitad del siglo XX la mayoría de los olivos Royal se sustituyeran por Picual, provocando la casi desaparición de esta variedad. Actualmente, conocedores de la gran calidad de sus aceites y sus excelentes propiedades organolépticas, el cultivo de la aceituna Royal es cada vez más conocido. El sabor de su aceite es suave, con escaso amargor y ligero picante frutal tardío, con regusto almendrado.



**Figura 54. Fotografías de las distintas variedades de aceitunas estudiadas.
A: Cornezuelo; B: Cornicabra; C: Picual; D: Royal**

Resultados y discusión

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los estudios desarrollados abarcan fundamentalmente dos ámbitos de aplicación:

- 1) Desarrollo de metodologías analíticas para el análisis y la caracterización de compuestos bioactivos en distintas especies de plantas.
- 2) Desarrollo de metodologías analíticas para el análisis y la caracterización de compuestos bioactivos en frutos de *Olea europaea* L.

Se discuten a continuación los estudios que se han llevado a cabo para la elaboración de esta Tesis Doctoral, estando todos ellos publicados o en proceso de publicación en revistas internacionales recogidas en el *Journal Citation Report (JCR)*. Se ha seguido en cada trabajo el formato indicado en cada una de las revistas.

PARTE I. DESARROLLO DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA EL ANÁLISIS Y LA CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN DISTINTAS ESPECIES DE PLANTAS.

1. Caracterización fenólica, actividad antioxidante y propiedades de inhibición enzimática de las hojas de *Berberis thunbergii* DC.: una fuente valiosa de ácidos fenólicos.
2. Determinación espectrofotométrica de las propiedades antioxidantes y caracterización del contenido fenólico mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección diodo array y espectrometría de masas en tándem (HPLC-DAD-MS/MS) de las hojas de *Berberis hispanica* Boiss. & Reut.

3. Estudio de tres especies de *Sarcocapnos* como posibles fuentes de compuestos bioactivos: relación entre contenido fenólico y bioactividad mediante análisis multivariante.

4. Composición fitoquímica y actividad antioxidante de *Portulaca oleracea*: influencia del proceso de cocinado al vapor.

PARTE II. DESARROLLO DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA EL ANÁLISIS Y LA CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN FRUTOS DE *OLEA EUROPAEA* L.

5. Perfil fitoquímico, contenido mineral y actividad antioxidante de la aceituna de mesa *Olea europaea* L. cv. Cornezuelo. Influencia de la digestión gastrointestinal *in vitro* simulada.

6. Perfil fitoquímico y contenido mineral de aceitunas de la variedad Royal. Influencia del estado de maduración.

7. Efecto de la maduración sobre la composición fenólica y el contenido mineral de tres variedades de aceitunas.

Parte I.

Desarrollo de metodologías analíticas para el análisis y la caracterización de compuestos bioactivos en distintas especies de plantas.



1. CARACTERIZACIÓN FENÓLICA, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y PROPIEDADES DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LAS HOJAS DE *BERBERIS THUNBERGII* DC.: UNA FUENTE VALIOSA DE ÁCIDOS FENÓLICOS

Phenolic characterization, antioxidant activity, and enzyme inhibitory properties of *Berberis thunbergii* DC. leaves: a valuable source of phenolic acids. *Molecules*, **24**, 4171. 2019. doi: [10.3390/molecules24224171](https://doi.org/10.3390/molecules24224171).

María del Pilar Fernández-Poyatos, Antonio Ruiz-Medina, Gokhan Zengin, Eulogio J. Llorent-Martínez

Resumen:

En este trabajo se estudió la composición fenólica y la bioactividad de los extractos metanólicos y acuosos de las hojas de *Berberis thunbergii* DC. Las especies de *Berberis* son conocidas por sus usos en medicina tradicional. El perfil fenólico y la cuantificación de los compuestos principales fueron realizados por HPLC-DAD-MS/MS. Los compuestos más abundantes en ambos extractos fueron los ácidos cafeoilquínicos (ácido clorogénico, con una concentración de 90.1-101.3 mg g⁻¹ de extracto seco), seguido por ácidos cafeoilglucáricos y glicósidos de la quercetina.

Los ensayos antioxidantes y de eliminación de radicales (fosfomolibdeno, DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP, actividad quelante de metales), al igual que los ensayos de inhibición enzimática (acetilcolinesterasa, butirilcolinesterasa, tirosinasa, amilasa, glucosidasa y lipasa), fueron llevados a cabo para evaluar el potencial bioactivo de *Berberis thunbergii*. El extracto metanólico presentó los valores más altos de antioxidantes y de eliminación de radicales, de acuerdo con su mayor contenido fenólico.

Con respecto al potencial de la inhibición enzimática, el extracto metanólico fue también más potente que el extracto acuoso. Por tanto, las hojas de *Berberis thunbergii* representan un candidato adecuado para la preparación de productos farmacéuticos o nutracéuticos.



2. DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES Y CARACTERIZACIÓN DEL CONTENIDO FENÓLICO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECCIÓN DIODO ARRAY Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM (HPLC-DAD-MS/MS) DE LAS HOJAS DE *BERBERIS HISPANICA* BOISS. & REUT.

Spectrophotometric determination of the antioxidant properties and characterization of the phenolic content by high-performance liquid chromatography-diode array detection-tandem mass spectrometry (HPLC-DAD-MS/MS) of *Berberis hispanica* Boiss. & Reut. leaves. *Analytical Letters*, 54, 4, 646-657. 2021. doi: 10.1080/00032719.2020.1775628.

**María del Pilar Fernández-Poyatos, Antonio Ruiz-Medina, Carlos Salazar-Mendías,
Eulogio J. Llorent-Martínez**

Resumen:

En este trabajo se muestra el perfil fenólico obtenido mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección diodo array y espectrometría de masas y la actividad antioxidante empleando los ensayos ABTS y DPPH en las hojas de *Berberis hispanica* Boiss. & Reut.

Los compuestos más abundantes fueron los ácidos cafeoilquínicos, en particular el ácido clorogénico con 19.3 mg g⁻¹ de extracto seco, los ácidos cafeoilglucáricos y los glicósidos de quercetina. Además, el compuesto dihidroroseósido es informado por primera vez en una especie *Berberis*.

El potencial antioxidante mostró el mismo comportamiento que el contenido fenólico: la fracción metanólica proporcionó la concentración más alta de los compuestos fenólicos y la mayor actividad antioxidante en ambos ensayos (ABTS y

DPPH), siendo sus valores de 648 y 547 μmol equivalentes de Trolox g^{-1} de extracto seco, respectivamente.

Estos resultados contribuyen en la limitada información bibliográfica que existe sobre esta especie de planta y representan un punto de partida para evaluar su potencial como una nueva fuente de compuestos bioactivos.



3. ESTUDIO DE TRES ESPECIES DE *SARCOCAPNOS* COMO POSIBLES FUENTES DE COMPUESTOS BIOACTIVOS: RELACIÓN ENTRE CONTENIDO FENÓLICO Y BIOACTIVIDAD MEDIANTE ANÁLISIS MULTIVARIANTE

Study on three *Sarcocapnos* species as potential sources of bioactive compounds: relation between phenolic content and bioactivity by multivariate analysis. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2020, ID 8885169. 2020. doi: 10.1155/2020/8885169.

María del Pilar Fernández-Poyatos, Gökhan Zengin, Carlos Salazar-Mendías, Antonio Ruiz-Medina, Kouadio Ibrahime Sinan, Eulogio J. Llorent-Martínez

Resumen:

Se realizó el estudio de la composición fenólica y la bioactividad de las partes aéreas de tres especies de *Sarcocapnos* (*S. enneaphylla*, *S. pulcherrima* y *S. saetabensis*). Las muestras fueron recogidas de diferentes localizaciones en la provincia de Jaén (sureste de España).

Los análisis cualitativos y cuantitativos de los compuestos fenólicos fueron llevados a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución con diodo array y detección con espectrómetro de masas. *Sarcocapnos enneaphylla* presentó la mayor concentración de compuestos fenólicos (58 mg g⁻¹ extracto seco). El compuesto más abundante en *S. enneaphylla* y *S. saetabensis* fue la rutina (35 mg g⁻¹ extracto seco y 11.7 mg g⁻¹ extracto seco, respectivamente), mientras que el isorhamnetin-*O*-rutinosido fue el mayoritario en *S. pulcherrima* (11.5 mg g⁻¹ extracto seco).

Se realizaron varios ensayos para evaluar el potencial bioactivo de las tres especies de *Sarcocapnos*. Estos ensayos incluyeron eliminación de radicales (ABTS y

DPPH), poder reductor (CUPRAC y FRAP), el ensayo del fosfomolibdeno y la quelación de metales, así como la actividad inhibidora de enzimas (acetilcolinesterasa, amilasa, butirilcolinesterasa, glucosidasa y tirosinasa).

En general, todos los extractos metanólicos presentaron los mayores contenidos de fenoles y flavonoides. Además, estos extractos, coincidiendo con lo anterior, presentaron las mayores propiedades antioxidantes e inhibitorias de enzimas. Esta relación fue confirmada por el análisis multivariante.

Con este estudio se pretendió revalorizar las especies de *Sarcocapnos* como posible fuente de compuestos bioactivos y contribuir a la conservación de estas especies de plantas.



4. COMPOSICIÓN FITOQUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE *PORTULACA OLERACEA*: INFLUENCIA DEL PROCESO DE COCINADO AL VAPOR

Phytochemical composition and antioxidant activity of *Portulaca oleracea*: influence of the steaming cooking process. *Foods*, 10, 94. 2021. doi: 10.3390/foods10010094.

María del Pilar Fernández-Poyatos, Eulogio J. Llorent-Martínez, Antonio Ruiz-Medina

Resumen:

En este trabajo se comparó la composición fenólica y la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de las partes aéreas crudas y cocinadas al vapor de la planta *Portulaca oleracea* L.

Se detectaron dos nuevos alcaloides, llamados oleraceínas X e Y, junto con otras seis conocidas oleraceínas (oleraceínas A, B, C, N, J y U). El perfil fitoquímico y la cuantificación de los principales compuestos fenólicos se realizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección diodo array y espectrometría de masas. Los compuestos más abundantes en ambos extractos correspondieron a alcaloides fenólicos (oleraceínas). Los principales compuestos cuantificados fueron el ácido isocítrico y el ácido cítrico, con concentraciones de 500-550 y 440-600 mg/100 g de extracto seco, respectivamente. Los extractos crudos mostraron una mayor cantidad de contenido fenólico individual total que los extractos cocinados al vapor.

Por otro lado, en el estudio de la influencia del cocinado al vapor de *Portulaca oleracea* L., también se realizaron ensayos de contenido fenólico total y de eliminación de radicales (ABTS⁺ y DPPH) mediante técnicas

espectrofotométricas, para medir su potencial antioxidante. Los extractos crudos presentaron los valores más altos de antioxidantes, de acuerdo con la mayor concentración de compuestos bioactivos en comparación con los extractos cocinados al vapor.

Parte II.

Desarrollo de metodologías analíticas para el análisis y la caracterización de compuestos bioactivos en frutos de *Olea europaea* L.



5. PERFIL FITOQUÍMICO, CONTENIDO MINERAL Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA ACEITUNA DE MESA *OLEA EUROPAEA* L. CV. CORNEZUELO. INFLUENCIA DE LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL *IN VITRO* SIMULADA

Phytochemical profile, mineral content, and antioxidant activity of *Olea europaea* L. cv. Cornezuelo table olives. Influence of *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 297, 124933. 2019. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.05.207.

M.P. Fernández-Poyatos, A. Ruiz-Medina, E.J. Llorent-Martínez

Resumen:

Los objetivos principales de este estudio fueron determinar la composición fenólica y la actividad antioxidante de aceitunas de mesa procedentes de *Olea europaea* L. cv. Cornezuelo, y el efecto causado por la simulación de una digestión *in vitro* para evaluar la biodisponibilidad de los compuestos.

Para evaluar el perfil fitoquímico se utilizó la cromatografía líquida de alta resolución con diodo-array y detección con espectrómetro de masas (HPLC-DAD-MSⁿ), mientras que para determinar la actividad antioxidante se emplearon métodos espectrofotométricos convencionales (ABTS⁺ y DPPH). El contenido mineral fue determinado mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

Se identificaron treinta compuestos, principalmente polifenoles, cuantificando los compuestos principales por HPLC-DAD.

Tras la digestión simulada, el contenido fenólico sufrió un importante descenso - más del 50% - alcanzando pérdidas de hasta un 75% en la oleuropeína y los isómeros del comselogosido. Esta disminución también resultó en una pérdida

en la actividad antioxidante, observando diferencias significativas en todos los parámetros. Sin embargo, los extractos analizados aún conservaban un considerable potencial antioxidante.



6. PERFIL FITOQUÍMICO Y CONTENIDO MINERAL DE ACEITUNAS DE LA VARIEDAD ROYAL. INFLUENCIA DEL ESTADO DE MADURACIÓN

Phytochemical profile and mineral content of Royal variety olive fruits. Influence of the ripening stage. *Journal of Food Composition and Analysis*, 95, 103671. 2021. doi: 10.1016/j.jfca.2020.103671.

**María del Pilar Fernández-Poyatos, Antonio Ruiz-Medina,
Eulogio J. Llorent-Martínez**

Resumen:

La composición fenólica y el contenido mineral de las aceitunas de la variedad Royal fueron estudiados durante su maduración, entre los meses de octubre de 2018 y enero de 2019.

El perfil fitoquímico fue evaluado mediante cromatografía líquida de alta resolución con diodo array y detección con espectrómetro de masas (HPLC-DAD-MSⁿ) mientras que el contenido inorgánico fue determinado mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

Se identificaron veintiún compuestos y los más abundantes fueron cuantificados. El compuesto más abundante fue la oleuropeína. El mayor contenido fenólico fue observado en enero de 2019, coincidiendo con la fecha habitual de recolección (madurez óptima de los frutos). Sin embargo, no se observó una tendencia clara con respecto al contenido mineral.



7. EFECTO DE LA MADURACIÓN SOBRE LA COMPOSICIÓN FENÓLICA Y EL CONTENIDO MINERAL DE TRES VARIEDADES DE ACEITUNAS

Effect of ripening on the phenolic composition and mineral content of three varieties of olive fruits. *Foods*, 10, 380. 2021. doi: 10.3390/foods10020380.

María del Pilar Fernández-Poyatos, Eulogio J. Llorent-Martínez, Antonio Ruiz-Medina

Resumen:

La composición fenólica y el contenido mineral de los frutos de aceituna de las variedades Cornezuelo, Cornicabra y Picual se investigaron durante la maduración de las aceitunas en dos temporadas de cosecha diferentes (2017/2018 y 2018/2019).

Los perfiles fitoquímicos se evaluaron mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección de diodo array y espectrometría de masas. El contenido mineral se determinó mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente.

Se caracterizaron veinticinco compuestos y se cuantificaron los más abundantes. Estos compuestos correspondieron en su mayoría con secoiridoides, siendo los principales la oleuropeína, oleosido/secologanosido, oleosido-11-metiléster y los isómeros de oleuropeína y de comselogosido. El contenido fenólico individual total alcanzó los valores más altos entre los meses de diciembre y enero, coincidiendo con la fecha de cosecha habitual. Esta tendencia se observó en ambas temporadas. La mayor concentración de compuestos fenólicos se observó en la variedad Cornezuelo (840 mg/100 g) en la temporada 2018/2019. Las variedades Picual y Cornicabra alcanzaron concentraciones de 670 mg/100 g y 530 mg/100 g,

respectivamente, también durante la misma temporada. No se observó una tendencia clara con respecto al contenido inorgánico.

Conclusiones

5. CONCLUSIONES

En esta Memoria se han estudiado la composición química y la actividad antioxidante de dos especies del género *Berberis* (*B. thunbergii* y *B. hispanica*), tres especies del género *Sarcocapnos* (*S. enneaphylla*, *S. pulcherrima* y *S. saetabensis*), la especie *Portulaca oleracea* L. y cuatro variedades de *Olea europaea* L. (Cornezuelo, Cornicabra, Picual y Royal). De forma general, se ha comprobado que el empleo de HPLC acoplado a detección UV y espectrometría de masas proporciona la información necesaria, tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo, para identificar el perfil fenólico de las muestras estudiadas. De igual forma, los distintos ensayos antioxidantes y de inhibición enzimática proporcionaron información muy útil para poder identificar posibles nuevas fuentes de compuestos bioactivos para la industria alimentaria o farmacéutica. De forma específica, se pudieron extraer las siguientes conclusiones para las distintas especies vegetales analizadas:

1. Los principales compuestos presentes en hojas de *B. thunbergii* DC. fueron el ácido clorogénico (101.3 mg g⁻¹ extracto seco) y otros ácidos cafeoilquínicos y cafeoilglucáricos. Estos resultados eran similares a los observados en otras especies de *Berberis*. El disolvente más adecuado fue el metanol, observando tanto una mejor extracción de los compuestos fenólicos en comparación con el empleo de agua, como una mayor capacidad antioxidante y de inhibición enzimática. La bioactividad observada se atribuyó principalmente a la presencia del ácido clorogénico.

2. Se estudió por primera vez el perfil fitoquímico de las hojas de *Berberis hispanica* Boiss. & Reut., observando que los compuestos más abundantes fueron ácidos fenólicos, destacando el ácido clorogénico (19.3 mg g⁻¹ extracto seco). Sin embargo, la concentración de compuestos fenólicos en esta planta fue muy inferior a la encontrada en *B. thunbergii*. La mayor capacidad antioxidante fue encontrada

cuando se empleó metanol como disolvente, al igual que en *B. thunbergii*. Se describió por primera vez la presencia del compuesto dihidro-roseosido en el género *Berberis*.

3. Se realizó el primer estudio de la composición fenólica de tres especies de *Sarcocapnos* (*S. enneaphylla*, *S. pulcherrima* y *S. saetabensis*) y su relación con las propiedades bioactivas que presentan. El disolvente más adecuado fue el metanol en comparación con el agua, obteniéndose una mejor extracción de los compuestos fenólicos y una mayor capacidad antioxidante y de inhibición enzimática. Las especies fueron activas en todos los ensayos, siendo en *S. enneaphylla* donde se obtuvo el mayor contenido fenólico (58 mg g⁻¹ extracto seco) y mayor bioactividad, seguida de *S. pulcherrima* (33.7 mg g⁻¹ extracto seco) y *S. saetabensis* (30.5 mg g⁻¹ extracto seco). Los compuestos más abundantes fueron flavonoides y ácidos fenólicos, a los que se les atribuyó la bioactividad de las especies, confirmando esta relación mediante análisis multivariante.

4. Las partes aéreas de la *Portulaca oleracea* L. cruda presentaron mayor cantidad de contenido fenólico y valores más altos de antioxidantes que la cocinada al vapor. Los compuestos más abundantes fueron alcaloides fenólicos (oleraceínas), el ácido cítrico (600 mg/100 g extracto seco) y el ácido isocítrico (550 mg/100 g extracto seco). Se identificaron dos nuevas oleraceínas, X e Y, cuyas estructuras fueron confirmadas mediante HPLC-Q-TOF.

5. Se presentó el primer estudio de contenido inorgánico y contenido fenólico de aceituna de mesa de la variedad Cornezuelo, incluyendo el efecto producido por una digestión gastrointestinal simulada *in vitro*. La mayoría de los compuestos detectados fueron secoiridoides, siendo la oleuropeína (3.13 mg g⁻¹ extracto seco) y un isómero del comselogosido (3.4 mg g⁻¹ extracto seco) los más abundantes. Se observó que durante el proceso de la digestión se perdieron, aproximadamente, la mitad de los compuestos fenólicos. Aun así, los extractos

digeridos seguían presentando actividad antioxidante significativa. En el contenido inorgánico se obtuvieron concentraciones similares a las encontradas en otras variedades.

6. Se estudió el contenido fenólico de la variedad Royal entre los meses de octubre de 2018 y enero de 2019. El contenido fenólico más alto se observó en el mes de enero (837 mg/100 g de aceituna fresca), coincidiendo con la fecha habitual de recogida de esta variedad. Durante los meses de octubre, noviembre y diciembre se obtuvieron valores en el rango 128 - 147 mg/100 g de aceituna fresca. La oleuropeína fue el compuesto mayoritario (280 mg/100 g de aceituna fresca). No se observó una tendencia clara entre los valores de concentración de los elementos inorgánicos y las diferentes fechas de recolección de la aceituna.

7. Se estudió la variación del perfil fenólico de las aceitunas de las variedades Cornezuelo, Cornicabra y Pical entre los meses de octubre y enero de las temporadas 2017/2018 y 2018/2019. El mayor contenido fenólico individual total alcanzó los valores más altos entre los meses de diciembre y enero, coincidiendo con un índice de madurez próximo a 5 y con la fecha habitual de recolección. En ambas temporadas de estudio se observó esa tendencia, obteniéndose mejores resultados en la cosecha del 2018/2019. La variedad Cornezuelo fue la que presentó la mayor concentración de compuestos fenólicos (840 mg/100 g de aceituna fresca), similar a la obtenida en la variedad Royal, seguida de Picual (670 mg/100 g de aceituna fresca) y Cornicabra (530 mg/100 g de aceituna fresca). Los compuestos encontrados fueron en su mayoría secoiridoides, principalmente oleuropeína. En la composición del contenido mineral no se observó una tendencia clara.

Bibliografía

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Martínez-Navarrete, N.; Camacho Vidal, M.M.; Martínez Lahuerta, J.J. Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud. *Act. Dietética* **2008**, *12*, 64–68.
2. Singh, R. Medicinal plants: A review. *J. Plant Sci.* **2015**, *3*, 50–55.
3. Chikezie, P.C.; Ibegbulem, C.O.; Mbagwu, F.N. Bioactive principles from medicinal plants. *Res. J. Phytochem.* **2015**, *9*, 88–115.
4. Bennett, R.N.; Wallsgrave, R.M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytol.* **1994**, *127*, 617–633.
5. Stalikas, C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 3268–3295.
6. Quiñones, M.; Miguel, M.; Aleixandre, A. Revisión. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr. Hosp.* **2012**, *27*, 76–89.
7. Oroian, M.; Escriche, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Res. Int.* **2015**, *74*, 10–36.
8. Martínez-González, A.I.; Díaz-Sánchez, Á.G.; De La Rosa, L.A.; Vargas-Requena, C.L.; Bustos-Jaimes, I.; Álvarez-Parrilla, E. Polyphenolic compounds and digestive enzymes: *In vitro* non-covalent interactions. *Molecules* **2017**, *22*, 669.
9. Nile, S.H.; Park, S.W. Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition* **2014**, *30*, 134–144.
10. Ignat, I.; Volf, I.; Popa, V.I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* **2011**, *126*, 1821–1835.
11. Gimeno Creus, E. Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *Offarm* **2004**, *23*, 80–84.
12. Valencia-Avilés, E.; Ignacio-Figueroa, I.; Sosa-Martínez, E.; Bartolomé-Camacho, M.C.; Martínez-Flores, H.-E.; García-Pérez, M.-E. Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. *Rev. la Fac. Ciencias Químicas* **2017**, *16*, 15–29.
13. Charles, D.J. Sources of Natural Antioxidants and Their Activities. In *Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources*; Charles, D.J., Ed.; Springer: Norway, **2013**; pp. 65–138.

14. Van der Sluis, A.A.; Dekker, M.; De Jager, A.; Jongen, W.M.F. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: Effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3606–3613.
15. Tomás-Barberán, F.A. Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Aliment. Nutr. y Salud* **2003**, *10*, 41–53.
16. Bahadoran, Z.; Mirmiran, P.; Azizi, F. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: A review. *J. Diabetes Metab. Disord.* **2013**, *12*, 43.
17. Hidalgo, G.I.; Almajano, M.P. Red fruits: Extraction of antioxidants, phenolic content, and radical scavenging determination: A review. *Antioxidants* **2017**, *6*, 7.
18. Mayor Oxilia, R. Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante. *Rev. del Inst. Med. Trop.* **2010**, *5*, 23–29.
19. Harborne, J.B.; Williams, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 481–504.
20. Dykes, L.; Rooney, L.W. Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits. *Cereal Foods World* **2007**, *52*, 105–111.
21. Acosta-Estrada, B.A.; Gutiérrez-Urbe, J.A.; Serna-Saldívar, S.O. Bound phenolics in foods, a review. *Food Chem.* **2014**, *152*, 46–55.
22. Katalinić, V.; Možina, S.S.; Skroza, D.; Generalić, I.; Abramović, H.; Miloš, M.; Ljubenković, I.; Piskernik, S.; Pezo, I.; Terpinč, P.; et al. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chem.* **2010**, *119*, 715–723.
23. Castro Acosta, M.L. Polifenoles: Compuestos bioactivos con efectos benéficos en la prevención de diabetes tipo 2. *RED CieN Cienc. y Nutr.* **2019**, *1*, 13–18.
24. Sierra, L. Estrategias de investigación para el tratamiento de Alzheimer con antioxidantes polifenólicos. *Rev. la Acad. Colomb. Ciencias Exactas, Físicas y Nat.* **2016**, *40*, 608–620.
25. Harkous, A.Y. Efectos de los polifenoles en el tratamiento de la esclerosis múltiple. *Terapeia* **2016**, *11*, 121–154.
26. Sancho, M.; Mach, N. Efecto de los polifenoles del vino sobre la prevención del cáncer. *Nutr. Hosp.* **2015**, *31*, 535–551.
27. Romero Cagigal, I.; Ferruelo Alonso, A.; Berenguer Sánchez, A. Dieta y cáncer de próstata. *Actas Urológicas Españolas* **2003**, *27*, 399–409.

28. Carbonell-Capella, J.M.; Buniowska, M.; Barba, F.J.; Esteve, M.J.; Frígola, A. Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2014**, *13*, 155–171.
29. Tsao, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2010**, *2*, 1231–1246.
30. Vuolo, M.M.; Lima, V.S.; Maróstica Junior, M.R. Phenolic compounds: Structure, classification, and antioxidant power. In *Bioactive Compounds*; Segura Campo, M.R., Ed.; Elsevier: Netherlands, **2019**; pp. 33–50.
31. Tungmunnithum, D.; Thongboonyou, A.; Pholboon, A.; Yongsabai, A. Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: an overview. *Med.* **2018**, *5*, 93.
32. Teixeira, A.; Eiras-Dias, J.; Castellarin, S.D.; Gerós, H. Berry phenolics of grapevine under challenging environments. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 18711–18739.
33. Birt, D.F.; Jeffery, E. Flavonoids. *Adv. Nutr.* **2013**, *4*, 576–577.
34. Grotewold, E. *The science of flavonoids*; Springer: New York, **2006**.
35. Cook, N.C.; Samman, S. Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutr. Biochem.* **1996**, *7*, 66–76.
36. Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, 727–747.
37. Cuyckens, F.; Claeys, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J. Mass Spectrom.* **2004**, *39*, 1–15.
38. Luthria, D.L.; Biswas, R.; Natarajan, S. Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean. *Food Chem.* **2007**, *105*, 325–333.
39. Naczki, M.; Shahidi, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *41*, 1523–1542.
40. Peterson, J.J.; Dwyer, J.T.; Beecher, G.R.; Bhagwat, S.A.; Gebhardt, S.E.; Haytowitz, D.B.; Holden, J.M. Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. *J. Food Compos. Anal.* **2006**, *19*, S66–S73.
41. Peterson, J.J.; Beecher, G.R.; Bhagwat, S.A.; Dwyer, J.T.; Gebhardt, S.E.; Haytowitz,

- D.B.; Holden, J.M. Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature. *J. Food Compos. Anal.* **2006**, *19*, S74–S80.
42. Khoo, H.E.; Azlan, A.; Tang, S.T.; Lim, S.M. Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr. Res.* **2017**, *61*, 1361779.
43. Guzmán, R.; Santiago, C.; Sánchez, M. A density functional study of antioxidant properties on anthocyanidins. *J. Mol. Struct.* **2009**, *935*, 110–114.
44. Parveen, I.; Winters, A.; Threadgill, M.D.; Hauck, B.; Morris, P. Extraction, structural characterisation and evaluation of hydroxycinnamate esters of orchard grass (*Dactylis glomerata*) as substrates for polyphenol oxidase. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 2799–2806.
45. Manganaris, G.A.; Goulas, V.; Vicente, A.R.; Terry, L.A. Berry antioxidants: small fruits providing large benefits. *J. Sci. Food Agric.* **2014**, *94*, 825–833.
46. Shahidi, F.; Chandrasekara, A. Hydroxycinnamates and their *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities. *Phytochem. Rev.* **2010**, *9*, 147–170.
47. Boluda, C.J.; Terrero, J.D. Iridoides y secoiridoides (1): clasificación, biosíntesis, importancia ecológica, estrategias evolutivas y modificaciones semisintéticas. *Rev. Fitoter.* **2013**, *13*, 153–161.
48. López Carreras, N.; Miguel, M.; Alexandre, A. Beneficial health properties of iridoids terpenes. *Nutr. Clínica y Dietética Hosp.* **2012**, *32*, 81–91.
49. Carrero, I.; Herráez, Á. Compuestos fenólicos. Available online: <http://biomodel.uah.es/model2/lip/oo-fenoles.htm> (Creative Commons License; accessed on Mar 3, 2020).
50. Heleno, S.A.; Martins, A.; Queiroz, M.J.R.P.; Ferreira, I.C.F.R. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites *versus* parent compounds: A review. *Food Chem.* **2015**, *173*, 501–513.
51. Castellarin, S.D.; Pfeiffer, A.; Sivilotti, P.; Degan, M.; Peterlunger, E.; Di Gaspero, G. Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit. *Plant, Cell Environ.* **2007**, *30*, 1381–1399.
52. Falcone Ferreyra, M.L.; Rius, S.P.; Casati, P. Flavonoids: Biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front. Plant Sci.* **2012**, *3*, 222.

53. Azuma, A.; Yakushiji, H.; Koshita, Y.; Kobayashi, S. Flavonoid biosynthesis-related genes in grape skin are differentially regulated by temperature and light conditions. *Planta* **2012**, *236*, 1067–1080.
54. Jensen, S.R.; Franzyk, H.; Wallander, E. Chemotaxonomy of the *Oleaceae*: Iridoids as taxonomic markers. *Phytochemistry* **2002**, *60*, 213–231.
55. Rios, M.Y. Química y farmacología de iridoides. In *Temas Selectos de Química de Productos Naturales*; Delgado, G., Romo de Vivar, A., Eds.; Universidad Nacional Autónoma de México: Chamilpa, **2016**; pp. 95–133.
56. Karaś, M.; Jakubczyk, A.; Szymanowska, U.; Złotek, U.; Zielińska, E. Digestion and bioavailability of bioactive phytochemicals. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2017**, *52*, 291–305.
57. Parada, J.; Aguilera, J.M. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *J. Food Sci.* **2007**, *72*, R21–R32.
58. Bohn, T. Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutr. Rev.* **2014**, *72*, 429–452.
59. Alminger, M.; Aura, A.-M.; Bohn, T.; Dufour, C.; El, S.N.; Gomes, A.; Karakaya, S.; Martínez-Cuesta, M.C.; McDougall, G.J.; Requena, T.; et al. *In vitro* models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2014**, *13*, 413–436.
60. Bermúdez-Soto, M.J.; Tomás-Barberán, F.A.; García-Conesa, M.T. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. *Food Chem.* **2007**, *102*, 865–874.
61. Kim, Y.A.; Keogh, J.B.; Clifton, P.M. Polyphenols and glycemic control. *Nutrients* **2016**, *8*, 17.
62. Moreno Indias, I. Beneficios de los polifenoles contenidos en la cerveza sobre la microbiota intestinal. *Nutr. Hosp.* **2017**, *34*, 41–44.
63. Guerra, A.; Etienne-Mesmin, L.; Livrelli, V.; Denis, S.; Blanquet-Diot, S.; Alric, M. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends Biotechnol.* **2012**, *30*, 591–600.
64. Liang, L.; Wu, X.; Zhao, T.; Zhao, J.; Li, F.; Zou, Y.; Mao, G.; Yang, L. *In vitro* bioaccessibility and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) following simulated gastro-intestinal digestion. *Food Res. Int.* **2012**, *46*, 76–82.

65. Brown, E.M.; Nitecki, S.; Pereira-Caro, G.; McDougall, G.J.; Stewart, D.; Rowland, I.; Crozier, A.; Gill, C.I.R. Comparison of *in vivo* and *in vitro* digestion on polyphenol composition in lingonberries: Potential impact on colonic health. *BioFactors* **2014**, *40*, 611–623.
66. Vichapong, J.; Sookserm, M.; Srijesaruk, V.; Swatsitang, P.; Srijaranai, S. High performance liquid chromatographic analysis of phenolic compounds and their antioxidant activities in rice varieties. *LWT - Food Sci. Technol.* **2010**, *43*, 1325–1330.
67. Khoddami, A.; Wilkes, M.A.; Roberts, T.H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* **2013**, *18*, 2328–2375.
68. Shahidi, F.; Zhong, Y. Measurement of antioxidant activity. *J. Funct. Foods* **2015**, *18*, 757–781.
69. Castañeda-Ovando, A.; Pacheco-Hernández, M. de L.; Páez-Hernández, M.E.; Rodríguez, J.A.; Galán-Vidal, C.A. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.* **2009**, *113*, 859–871.
70. Oszmiański, J.; Nowicka, P.; Teleszko, M.; Wojdyło, A.; Cebulak, T.; Oklejewicz, K. Analysis of phenolic compounds and antioxidant Activity in wild blackberry fruits. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 14540–14553.
71. Khosravi Darani, K.; Mozafari, M.R. Supercritical fluids technology in bioprocess industries: A review. *J. Biochem. Technol.* **2009**, *2*, 144–152.
72. Alvarez-Rivera, G.; Bueno, M.; Ballesteros-Vivas, D.; Mendiola, J.A.; Ibañez, E. Pressurized liquid extraction. In *Liquid-Phase Extraction*; Poole, C.F., Ed.; Elsevier: Netherlands, **2020**; pp. 375–398.
73. Talhaoui, N.; Gómez-Caravaca, A.M.; León, L.; De La Rosa, R.; Fernández-Gutiérrez, A.; Segura-Carretero, A. Pattern of variation of fruit traits and phenol content in olive fruits from six different cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 10466–10476.
74. Huang, D.; Boxin, O.; Prior, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1841–1856.
75. Ford, L.; Theodoridou, K.; Sheldrake, G.N.; Walsh, P.J. A critical review of analytical methods used for the chemical characterisation and quantification of phlorotannin compounds in brown seaweeds. *Phytochem. Anal.* **2019**, *30*, 587–599.
76. Magalhães, L.M.; Segundo, M.A.; Reis, S.; Lima, J.L.F.C. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *613*, 1–19.

77. Peixoto Sobrinho, T.J.S.; Gomes, T.L.B.; Cardoso, K.C.M.; Albuquerque, U.P.; Amorim, E.L.C. Total flavonoid content in products containing "pata-de-vaca" (*Bauhinia* L.) sold in pharmacies in Recife/PE. *Rev. Bras. Plantas Med.* **2012**, *14*, 586–591.
78. Pękal, A.; Pyrzynska, K. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Anal. Methods* **2014**, *7*, 1776–1782.
79. Dantas Fernandes, A.J.; Assunção Ferreira, M.R.; Perrelli Randau, K.; Pereira de Souza, T.; Lira Soares, L.A. Total flavonoids content in the raw material and aqueous extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpiniaceae). *Sci. World J.* **2012**, *2012*.
80. Tsao, R.; Deng, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, *812*, 85–99.
81. Luis Aleixandre-Tudo, J.; du Toit, W. The Role of UV-Visible Spectroscopy for Phenolic Compounds Quantification in Winemaking. In *Frontiers and New Trends in the Science of Fermented Food and Beverages*; Solís-Oviedo, R.L., De La Cruz Pech-Canul, A., Eds.; IntechOpen: London, **2019**. doi: 10.5772/intechopen.79550.
82. Dabeek, W.M.; Kovicich, N.; Walsh, C.; Marra, M.V. Characterization and quantification of major flavonol glycosides in ramps (*Allium tricoccum*). *Molecules* **2019**, *24*, 3281.
83. Apak, R.; Özyürek, M.; Güçlü, K.; Çapanoğlu, E. Antioxidant activity/capacity measurement. Reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) scavenging assays, oxidative stress biomarkers, and chromatographic/chemometric assays. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 1046–1070.
84. Cela, R.; Lorenzo, R.A.; Casais, M. del C. *Técnicas de separación en química analítica*; 1ª ed.; Editorial Síntesis: Madrid, **2002**.
85. Fulcrand, H.; Mané, C.; Preys, S.; Mazerolles, G.; Bouchut, C.; Mazauric, J.P.; Souquet, J.M.; Meudec, E.; Li, Y.; Cole, R.B.; et al. Direct mass spectrometry approaches to characterize polyphenol composition of complex samples. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 3131–3138.
86. Zoroddu, M.A.; Aaseth, J.; Crisponi, G.; Medici, S.; Peana, M.; Nurchi, V.M. The essential metals for humans: a brief overview. *J. Inorg. Biochem.* **2019**, *195*, 120–129.
87. Kastenmayer, P. Análisis de minerales y elementos traza en alimentos. In *Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición*; Morón, C., Zacarías, I., de Pablo, S., Eds.; FAO. Dirección de Alimentación y Nutrición: Santiago de

- Chile, **1997**, cap. 20.
88. Ammann, A.A. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): a versatile tool. *J. Mass Spectrom.* **2007**, *42*, 419–427.
 89. Krishnaiah, D.; Sarbatly, R.; Nithyanandam, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod. Process.* **2011**, *89*, 217–233.
 90. López-Alarcón, C.; Denicola, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *763*, 1–10.
 91. Halliwell, B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *49*, 1341–1348.
 92. Knekt, P.; Järvinen, R.; Reunanen, A.; Maatela, J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: A cohort study. *Br. Med. J.* **1996**, *312*, 478–481.
 93. Witschi, H.P. Enhanced tumour development by butylated hydroxytoluene (BHT) in the liver, lung and gastro-intestinal tract. *Food Chem. Toxicol.* **1986**, *24*, 1127–1130.
 94. Grice, H.C. Safety evaluation of butylated hydroxyanisole from the perspective of effects on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food Chem. Toxicol.* **1988**, *26*, 717–723.
 95. Prior, R.L.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4290–4302.
 96. Apak, R.; Güçlü, K.; Demirata, B.; Özyürek, M.; Çelik, S.E.; Bektaşoğlu, B.; Berker, K.I.; Özyurt, D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules* **2007**, *12*, 1496–1547.
 97. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237.
 98. Lee, C.; Yoon, J. UV direct photolysis of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) in aqueous solution: Kinetics and mechanism. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2008**, *197*, 232–238.
 99. Labrinea, E.P.; Georgiou, C.A. Stopped-flow method for assessment of pH and timing effect on the ABTS total antioxidant capacity assay. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *526*, 63–68.
 100. Arnao, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case. *Trends Food Sci. Technol.* **2000**, *11*,

- 419–421.
101. Moon, J.K.; Shibamoto, T. Antioxidant assays for plant and food components. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1655–1666.
102. Foti, M.C.; Daquino, C.; Geraci, C. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH. Radical in alcoholic solutions. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2309–2314.
103. Dudonné, S.; Vitrac, X.; Coutière, P.; Woillez, M.; Mérillon, J.M. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1768–1774.
104. Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70–76.
105. Bhandari, K.; Singla, R.K.; De, B.; Ghosh, B.C.; Katakam, P.; Kumar Khushwaha, D.; Gundamaraju, R.; Sen, G.; Saha, G.; Mitra, A.; et al. Chemometrics based extraction of polyphenolics from fresh tea leaves and processed tea showing *in-silico* docking and anti-oxidative theronostic dietary adjuvant in Alzheimer. *Indo Glob. J. Pharm. Sci.* **2015**, *5*, 171–191.
106. Pulido, R.; Bravo, L.; Saura-Calixto, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3396–3402.
107. Ou, B.; Huang, D.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J.A.; Deemer, E.K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3122–3128.
108. Prior, R.L.; Cao, G. *In vivo* total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *27*, 1173–1181.
109. Özyürek, M.; Güçlü, K.; Tütem, E.; Baskan, K.S.; Erçağ, E.; Esin Çelik, S.; Baki, S.; Yildiz, L.; Karaman, Ş.; Apak, R. A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Anal. Methods* **2011**, *3*, 2439–2453.
110. Apak, R.; Çekiç, S.D.; Üzer, A.; Çelik, S.E.; Bener, M.; Bekdeşer, B.; Can, Z.; Sağlam, Ş.; Önem, A.N.; Erçağ, E. Novel spectroscopic and electrochemical sensors and nanoprobes for the characterization of food and biological antioxidants. *Sensors*

- (Switzerland) **2018**, *18*, 186.
111. Marwah, R.G.; Fatope, M.O.; Mahrooqi, R. Al; Varma, G.B.; Abadi, H. Al; Al-Burtamani, S.K.S. Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. *Food Chem.* **2007**, *101*, 465–470.
 112. Alam, M.N.; Bristi, N.J.; Rafiquzzaman, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm. J.* **2013**, *21*, 143–152.
 113. Fowsiya, J.; Madhumitha, G. Preliminary phitochemical analysis, antioxidant and cytotoxicity test of *Carissa edulis* Vahl dried fruits. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **2017**, *263*, 22018.
 114. Prieto, P.; Pineda, M.; Aguilar, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.* **1999**, *269*, 337–341.
 115. Wan, C.; Yu, Y.; Zhou, S.; Liu, W.; Tian, S.; Cao, S. Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of *Gynura divaricata* leaf extracts at different temperatures. *Pharmacogn. Mag.* **2011**, *7*, 40–45.
 116. Kasangana, P.B.; Haddad, P.S.; Stevanovic, T. Study of polyphenol content and antioxidant capacity of *Myrianthus arboreus* (Cecropiaceae) root bark extracts. *Antioxidants* **2015**, *4*, 410–426.
 117. Gülçin, I.; Huyut, Z.; Elmastaş, M.; Aboul-Enein, H.Y. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arab. J. Chem.* **2010**, *3*, 43–53.
 118. Carrasco-Castilla, J.; Hernández-Álvarez, A.J.; Jiménez-Martínez, C.; Jacinto-Hernández, C.; Alaiz, M.; Girón-Calle, J.; Vioque, J.; Dávila-Ortiz, G. Antioxidant and metal chelating activities of peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates. *Food Chem.* **2012**, *135*, 1789–1795.
 119. Loizzo, M.R.; Tundis, R.; Bonesi, M.; Menichini, F.; Mastellone, V.; Avallone, L.; Menichini, F. Radical scavenging, antioxidant and metal chelating activities of *Annona cherimola* Mill. (cherimoya) peel and pulp in relation to their total phenolic and total flavonoid contents. *J. Food Compos. Anal.* **2012**, *25*, 179–184.
 120. Santos, J.S.; Alvarenga Brizola, V.R.; Granato, D. High-throughput assay comparison and standardization for metal chelating capacity screening: A proposal and application. *Food Chem.* **2017**, *214*, 515–522.
 121. Canabady-Rochelle, L.L.S.; Harscoat-Schiavo, C.; Kessler, V.; Aymes, A.; Fournier, F.;

- Girardet, J.M. Determination of reducing power and metal chelating ability of antioxidant peptides: Revisited methods. *Food Chem.* **2015**, *183*, 129–135.
122. Nitola, L.Y.; Muñoz, D.R.; Patiño, O.J.; Prieto, J.A. Phytochemical characterization and evaluation of the inhibitory activity of *Piper pesaresanum* C. DC leaves against acetylcholinesterase. *Rev. Cuba. Plantas Med.* **2016**, *21*, 1–10.
123. de Sales, P.M.; de Souza, P.M.; Simeoni, L.A.; Magalhães, P. de O.; Silveira, D. α -amylase inhibitors: A review of raw material and isolated compounds from plant source. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2012**, *15*, 141–183.
124. Rauf, A.; Jehan, N. Natural Products as a Potential Enzyme Inhibitors from Medicinal Plants. In *Enzyme Inhibitors and Activators*; Şentürk, M., Ed.; IntechOpen: London, **2017**. doi: 10.5772/67376.
125. IDF Diabetes Atlas Eighth Edition, International Diabetes Federation. Available online: <https://www.idf.org/> (accessed on Apr 24, 2020).
126. WHO Obesity and overweight. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (accessed on Apr 7, 2020).
127. López-Valdés, H.E.; J., G.-C. La participación de los receptores de acetilcolina nicotínicos en trastornos del sistema nervioso central. *Salud Ment.* **2003**, *26*, 66–72.
128. Sánchez-Chávez, G.; Salceda, R. Enzimas polifuncionales: El caso de la acetilcolinesterasa. *Rev. Educ. Bioquímica* **2008**, *27*, 44–51.
129. Dingova, D.; Leroy, J.; Check, A.; Garaj, V.; Krejci, E.; Hrabovska, A. Optimal detection of cholinesterase activity in biological samples: Modifications to the standard Ellman's assay. *Anal. Biochem.* **2014**, *462*, 67–75.
130. Ali-Shtayeh, M.S.; Jamous, R.M.; Abuzaitoun, S.Y.; Qasem, I.B. *In-vitro* screening of acetylcholinesterase inhibitory activity of extracts from Palestinian indigenous flora in relation to the treatment of Alzheimer's disease. *Funct. Foods Heal. Dis.* **2014**, *4*, 381–400.
131. Ando, H.; Kondoh, H.; Ichihashi, M.; Hearing, V.J. Approaches to identify inhibitors of melanin biosynthesis via the quality control of tyrosinase. *J. Invest. Dermatol.* **2007**, *127*, 751–761.
132. Uchida, R.; Ishikawa, S.; Tomoda, H. Inhibition of tyrosinase activity and melanine pigmentation by 2-hydroxytyrosol. *Acta Pharm. Sin. B* **2014**, *4*, 141–145.
133. Briganti, S.; Camera, E.; Picardo, M. Chemical and instrumental approaches to treat

- hyperpigmentation. *Pigment Cell Res.* **2003**, *16*, 101–110.
134. Momtaz, S.; Lall, N.; Basson, A. Inhibitory activities of mushroom tyrosine and DOPA oxidation by plant extracts. *South African J. Bot.* **2008**, *74*, 577–582.
135. Casañola-Martín, G.; Marrero-Ponce, Y.; Le-Thi-Thu, H.; Khan, M.H.; Torrens, F.; Rescigno, A.; Abad, C. La enzima tirosinasa: 2. Inhibidores de origen natural y sintético. *Afinidad* **2013**, *70*, 564.
136. Seo, S.Y.; Sharma, V.K.; Sharma, N. Mushroom tyrosinase: Recent prospects. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2837–2853.
137. Lee, H.S. Tyrosinase inhibitors of *Pulsatilla cernua* root-derived materials. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1400–1403.
138. Kubo, I.; Kinoshita, I. Flavonols from saffron flower: Tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4121–4125.
139. Chen, Q.X.; Kubo, I. Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by quercetin. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4108–4112.
140. Micillo, R.; Pistorio, V.; Pizzo, E.; Panzella, L.; Napolitano, A.; D'Ischia, M. 2-S-Lipoylcaffeic acid, a natural product-based entry to tyrosinase inhibition via catechol manipulation. *Biomimetics* **2017**, *2*, 15.
141. Verma, N.; Kaur, G. Trends on biosensing systems for heavy metal detection. *Compr. Anal. Chem.* **2016**, *74*, 33–71.
142. Therdphapiyanak, N.; Jaturanpinyo, M.; Waranuch, N.; Kongkaneramt, L.; Sarisuta, N. Development and assessment of tyrosinase inhibitory activity of liposomes of *Asparagus racemosus* extracts. *Asian J. Pharm. Sci.* **2013**, *8*, 134–142.
143. Di Petrillo, A.; González-Paramás, A.M.; Era, B.; Medda, R.; Pintus, F.; Santos-Buelga, C.; Fais, A. Tyrosinase inhibition and antioxidant properties of *Asphodelus microcarpus* extracts. *BMC Complement. Altern. Med.* **2016**, *16*, 453.
144. Kandra, L. α -Amylases of medical and industrial importance. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **2003**, *666–667*, 487–498.
145. Brayer, G.D.; Luo, Y.; Withers, S.G. The structure of human pancreatic α -amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Sci.* **1995**, *4*, 1730–1742.
146. Yousuf, S.; Khan, K.M.; Salar, U.; Chigurupati, S.; Muhammad, M.T.; Wadood, A.; Aldubayan, M.; Vijayan, V.; Riaz, M.; Perveen, S. 2'-Aryl and 4'-arylidene substituted

- pyrazolones: As potential α -amylase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *159*, 47–58.
147. Cheesbrough, M. *District Laboratory Practice in Tropical Countries, Part 1*; 2^o ed.; Cambridge University Press: Cambridge, **2005**.
148. Sundarram, A.; Pandurangappa, T.; Murthy, K. α -Amylase production and applications: A review. *J. Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *2*, 166–175.
149. Mohamed, E.A.H.; Siddiqui, M.J.A.; Ang, L.F.; Sadikun, A.; Chan, S.H.; Tan, S.C.; Asmawi, M.Z.; Yam, M.F. Potent α -glucosidase and α -amylase inhibitory activities of standardized 50% ethanolic extracts and sinensetin from *Orthosiphon stamineus* Benth as anti-diabetic mechanism. *BMC Complement. Altern. Med.* **2012**, *12*, 176.
150. Kumar, S.; Narwal, S.; Kumar, V.; Prakash, O. α -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacogn. Rev.* **2011**, *5*, 19–29.
151. Yang, C.Y.; Yen, Y.Y.; Hung, K.C.; Hsu, S.W.; Lan, S.J.; Lin, H.C. Inhibitory effects of pu-erh tea on alpha glucosidase and alpha amylase: a systemic review. *Nutr. Diabetes* **2019**, *9*, 23.
152. Eertmans, F.; Bogaert, V.; Van Poecke, T.; Puype, B. An improved neutral α -glucosidase assay for assessment of epididymal function—validation and comparison to the WHO method. *Diagnostics* **2014**, *4*, 1–11.
153. Strahsburger, E.; Lopez de Lacey, A.M.; Marotti, I.; DiGioia, D.; Biavati, B.; Dinelli, G. *In vivo* assay to identify bacteria with β -glucosidase activity. *Electron. J. Biotechnol.* **2017**, *30*, 83–87.
154. Matsui, T.; Yoshimoto, C.; Osajima, K.; Oki, T.; Osajima, Y. *In vitro* survey of α -glucosidase inhibitory food components. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1996**, *60*, 2019–2022.
155. Qurrat-ul-Ain; Ashiq, U.; Jamal, R.A.; Saleem, M.; Mahroof-Tahir, M. Alpha-glucosidase and carbonic anhydrase inhibition studies of Pd(II)-hydrazide complexes. *Arab. J. Chem.* **2017**, *10*, 488–499.
156. Rojas Clavijo, B.K.; Castillo Celis, M.A.; Moscoso Gama, J.M. Inhibidores de la lipasa pancreática como alternativa de tratamiento frente a la obesidad. *Rev. Med. e Investig. UAEMéx* **2019**, *7*, 23–30.
157. López-Villalta Lozano, M.J.; Soto González, A. Actualización en obesidad. *Cad. Atención Primaria* **2010**, *17*, 101–107.
158. Pliego, J.; Mateos, J.C.; Rodriguez, J.; Valero, F.; Baeza, M.; Femat, R.; Camacho, R.;

- Sandoval, G.; Herrera-López, E.J. Monitoring lipase/esterase activity by stopped flow in a sequential injection analysis system using *p*-nitrophenyl butyrate. *Sensors* **2015**, *15*, 2798–2811.
159. Zaid, A.N.; Zohud, N.; E'layan, B.; Aburadi, T.; Jaradat, N.; Ali, I.; Hussein, F.; Ghanem, M.; Qaddoumi, A.; Abu Zaaror, Y. Pharmacodynamic testing and new validated HPLC method to assess the interchangeability between multi-source orlistat capsules. *Drug Des. Devel. Ther.* **2017**, *11*, 3291–3298.
160. Patil, S.G.; Patil, M.P.; Maheshwari, V.L.; Patil, R.H. *In vitro* lipase inhibitory effect and kinetic properties of di-terpenoid fraction from *Calotropis procera* (Aiton). *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2015**, *4*, 579–585.
161. Regiones climáticas de Andalucía. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio. Junta de Andalucía. Available online: <http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/portalweb/menuitem.7e1cf46ddf59bb227a9ebe205510e1ca/?vgnextoid=3beae207c1935310VgnVCM2000000624e50aRCRD&vgnnextchannel=871e4d0e54345310VgnVCM1000001325e50aRCRD> (accessed on Mar 3, 2020).
162. Mokhber-Dezfuli, N.; Saeidnia, S.; Gohari, A.R.; Kurepaz-Mahmoodabadi, M. Phytochemistry and pharmacology of *berberis* species. *Pharmacogn. Rev.* **2014**, *8*, 8–15.
163. Arayne, M.S.; Sultana, N.; Bahadur, S.S. The berberis story: *Berberis vulgaris* in therapeutics. *Pak. J. Pharm. Sci.* **2007**, *20*, 83–92.
164. Khan, I.; Najeebullah, S.; Ali, M.; Shinwari, Z.K. Phytopharmacological and ethnomedicinal uses of the Genus *Berberis* (Berberidaceae): A review. *Trop. J. Pharm. Res.* **2016**, *15*, 2047–2057.
165. Singh, M.; Srivastava, S.; Rawat, A. Antimicrobial activities of Indian *Berberis* species. *Fitoterapia* **2007**, *78*, 574–576.
166. Bober, Z.; Stępień, A.; Aebisher, D.; Oźóg, Ł.; Bartusik-Aebisher, D. Fundamentals of the use of *Berberis* as a medicinal plant. *Eur. J. Clin. Exp. Med.* **2018**, *16*, 41–46.
167. Fatehi-Hassanabad, Z.; Jafarzadeh, M.; Tarhini, A.; Fatehi, M. The antihypertensive and vasodilator effects of aqueous extract from *Berberis vulgaris* fruit on hypertensive rats. *Phyther. Res.* **2005**, *19*, 222–225.
168. Pitta-Alvarez, S.I.; Medina-Bolivar, F.; Alvarez, M.A.; Scambatto, A.A.; Marconi, P.L. *In*

- vitro* shoot culture and antimicrobial activity of *Berberis buxifolia* Lam. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* **2008**, *44*, 502–507.
169. Bhardwaj, D.; Kaushik, N. Phytochemical and pharmacological studies in genus *Berberis*. *Phytochem. Rev.* **2012**, *11*, 523–542.
170. Hussain, N.; Adhikari, A.; Ahmad, M.S.; Wahab, A.-; Ali, M.; Choudhary, M.I. Two new prenylated flavonoids from the roots of *Berberis thunbergii* DC. *Nat. Prod. Res.* **2017**, *31*, 785–790.
171. Villinski, J.; Dumas, E.; Chai, H.-B.; Pezzuto, J.; Angerhofer, C.; Gafner, S. Antibacterial activity and alkaloid content of *Berberis thunbergii*, *Berberis vulgaris* and *Hydrastis canadensis*. *Pharm. Biol.* **2003**, *41*, 551–557.
172. Gudzinškas, Z.; Petrulaitis, L.; Zalneravicius, E. New woody alien plant species recorded in Lithuania. *Bot. Lith.* **2017**, *23*, 153–168.
173. Li, A.-R.; Zhu, Y.; Li, X.-N.; Tian, X.-J. Antimicrobial activity of four species of Berberidaceae. *Fitoterapia* **2007**, *78*, 379–381.
174. Potdar, D.; Hirwani, R.R.; Dhulap, S. Phyto-chemical and pharmacological applications of *Berberis aristata*. *Fitoterapia* **2012**, *83*, 817–830.
175. Zhang, C.-R.; Schutzki, R.E.; Nair, M.G. Antioxidant and anti-inflammatory compounds in the popular landscape plant *Berberis thunbergii* var. *atropurpurea*. *Nat. Prod. Commun.* **2013**, *8*, 165–168.
176. López-González, G. *Berberis* L. In *Flora iberica*; Castroviejo, S., Aedo, C., Laínz, M., Muñoz Garmendia, F., Nieto Feliner, G., Paiva, J., Benedí, C., Eds.; Real Jardín Botánico de Madrid. CSIC: Madrid, **1986**; pp. 403–406.
177. Baena, L. Berberidaceae. In *Claves de la Flora vascular de Andalucía Oriental*; Blanca, G., Cabezudo, B., Cueto, M., Morales Torres, C., Salazar, C., Eds.; Universidades de Granada, Almería, Jaén y Málaga: Granada, **2011**; p. 449.
178. Harber, J.; von Raab-Straube, E. Berberidaceae. In *Euro+Med Plantbase - the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity*. [<http://www.emplantbase.org/home.html>].
179. Cahlíková, L.; Macakova, K.; Kunes, J.; Kurfüst, M.; Opletal, L.; Cvačka, J.; Chlebek, J.; Blundene, G. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Eschscholzia californica* (Papaveraceae). *Nat. Prod. Commun.* **2010**, *5*, 1035–1038.

Bibliografía

180. Orhan, I.; Şener, B.; Choudhary, M.I.; Khalid, A. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *91*, 57–60.
181. Habibi Tirtash, F.; Keshavarzi, M.; Fazeli, F. Antioxidant components of *Fumaria* species (Papaveraceae). *Int. J. Biomed. Biol. Eng.* **2011**, *5*, 57–60.
182. Chambouleyron, M.; Bidat, M.; Léger, J.-F. *Sarcocapnos crassifolia* subsp. *simplicifolia* (Papaveraceae, Fumarioideae), a new narrow-endemic taxon from Northeastern Morocco. *Ann. Bot. Fenn.* **2015**, *52*, 205–210.
183. Salinas, M.J.; Romero, A.T.; Blanca, G.; De La Herrán, R.; Garrido-Ramos, M.; Ruíz-Rejón, C.; Morales, C.; Ruíz-Rejón, M.; Suárez, V. Contribution to the taxonomy and phylogeny of *Sarcocapnos* DC. (Fumariaceae). *Plant Syst. Evol.* **2003**, *237*, 153–164.
184. Pérez-Gutiérrez, M.A.; Suárez-Santiago, V.N.; López-Flores, I.; Romero, A.T.; Garrido-Ramos, M.A. Concerted evolution of satellite DNA in *Sarcocapnos*: A matter of time. *Plant Mol. Biol.* **2012**, *78*, 19–29.
185. Cabezudo, B.; Talavera, S.; Blanca, G.; Salazar, C.; Cueto, M.; Valdés, B.; Hernández-Bermejo, J.; Herrera, C.; Rodríguez-Hiraldo, C.; Navas, D. *Lista roja de la Flora Vasculare de Andalucía*; Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía: Seville, **2005**.
186. Salinas, M.J. *Sarcocapnos* DC. In *Claves de la Flora Vasculare de Andalucía Oriental*; Blanca, G., Cabezudo, B., Cueto, M., Morales Torres, C., Salazar, C., Eds.; Servicios de Publicaciones de las Universidades de Granada, Almería, Jaén y Málaga: Granada, **2011**; pp. 461–462.
187. Lidén, M. *Sarcocapnos* DC. In *Flora iberica: Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares, vol. I*; Castroviejo, S., Ed.; Real Jardín Botánico de Madrid. CSIC: Madrid, **1986**; pp. 433–438.
188. Morales, C.; Romero-García, A.T. A new species of the genus *Sarcocapnos* (Fumariaceae) from eastern Andalusia (Spain). *Plant Syst. Evol.* **1991**, *177*, 1–10.
189. Mateo, G.; Figuerola, R. *Flora analítica de la provincia de Valencia*; Alfons el Magnànim, D.L.: Valencia, **1987**.
190. Uddin, M.K.; Juraimi, A.S.; Hossain, M.S.; Nahar, M.A.U.; Ali, M.E.; Rahman, M.M. Purslane weed (*Portulaca oleracea*): a prospective plant source of nutrition, omega-3 fatty acid, and antioxidant attributes. *Sci. World J.* **2014**, *2014*, 1–6.
191. Petropoulos, S.; Karkanis, A.; Martins, N.; Ferreira, I.C.F.R. Phytochemical composition

- and bioactive compounds of common purslane (*Portulaca oleracea* L.) as affected by crop management practices. *Trends Food Sci. Technol.* **2016**, *55*, 1–10.
192. Kamal, U.; Juraimi, A.S.; Anwar, F.; Hossain, A.; Alam, A. Effect of salinity on proximate mineral composition of purslane (*Portulca oleracea* L.). *Aust. J. Crop Sci.* **2012**, *6*, 1732–1736.
193. Chan, K.; Islam, M.W.; Kamil, M.; Radhakrishnan, R.; Zakaria, M.N.M.; Habibullah, M.; Attas, A. The analgesic and anti-inflammatory effects of *Portulaca oleracea* L. subsp. *sativa* (Haw.) Celak. *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *73*, 445–451.
194. Zidan, Y.; Bouderbala, S.; Djellouuli, F.; Lacaille-Dubois, M.A.; Bouchenak, M. *Portulaca oleracea* reduces triglyceridemia, cholesterolemia, and improves lecithin: cholesterol acyltransferase activity in rats fed enriched-cholesterol diet. *Phytomedicine* **2014**, *21*, 1504–1508.
195. Lee, A.S.; Kim, J.S.; Lee, Y.J.; Kang, D.G.; Lee, H.S. Anti-TNF- α activity of *Portulaca oleracea* in vascular endothelial cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 5628–5644.
196. Filannino, P.; Di Cagno, R.; Trani, A.; Cantatore, V.; Gambacorta, G.; Gobbetti, M. Lactic acid fermentation enriches the profile of biogenic compounds and enhances the functional features of common purslane (*Portulaca oleracea* L.). *J. Funct. Foods* **2017**, *39*, 175–185.
197. Wang, P.; Sun, H.; Liu, D.; Jiao, Z.; Yue, S.; He, X.; Xia, W.; Ji, J.; Xiang, L. Protective effect of a phenolic extract containing indoline amides from *Portulaca oleracea* against cognitive impairment in senescent mice induced by large dose of D-galactose//NaNO₂. *J. Ethnopharmacol.* **2017**, *203*, 252–259.
198. Farag, M.A.; Abdel Shakour, Z.T. Metabolomics driven analysis of 11 *Portulaca* leaf taxa as analysed via UPLC-ESI-MS/MS and chemometrics. *Phytochemistry* **2019**, *161*, 117–129.
199. Voynikov, Y.; Gevrenova, R.; Balabanova, V.; Doytchinova, I.; Nedialkov, P.; Zheleva-Dimitrova, D. LC-MS analysis of phenolic compounds and oleraceins in aerial parts of *Portulaca oleracea* L. *J. Appl. Bot. Food Qual.* **2019**, *92*, 298–312.
200. Tarkergari, S.; Waghray, K.; Gulla, S. Acceptability studies of value added products with purslane (*Portulaca oleracea*). *Pakistan J. Nutr.* **2013**, *12*, 93–96.
201. Sicari, V.; Loizzo, M.R.; Tundis, R.; Mincione, A.; Pellicano, T.M. *Portulaca oleracea* L. (Purslane) extracts display antioxidant and hypoglycaemic effects. *J. Appl. Bot. Food*

- Qual.* **2018**, *91*, 39–46.
202. Palaniswamy, U.R.; McAvoy, R.J.; Bible, B.B. Stage of harvest and polyunsaturated essential fatty acid concentrations in purslane (*Portulaca oleraceae*) leaves. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3490–3493.
203. Obied, H.K.; Prenzler, P.D.; Ryan, D.; Servili, M.; Taticchi, A.; Esposto, S.; Robards, K. Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from *Olea europaea* L. *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 1167–1179.
204. Ciriminna, R.; Meneguzzo, F.; Fidalgo, A.; Ilharco, L.M.; Pagliaro, M. Extraction, benefits and valorization of olive polyphenols. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2016**, *118*, 503–511.
205. D’Antuono, I.; Garbetta, A.; Ciasca, B.; Linsalata, V.; Minervini, F.; Lattanzio, V.M.T.; Logrieco, A.F.; Cardinali, A. Biophenols from table olive cv *Bella di Cerignola*: Chemical characterization, bioaccessibility, and intestinal absorption. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 5671–5678.
206. Corsetti, A.; Perpetuini, G.; Schirone, M.; Tofalo, R.; Suzzi, G. Application of starter cultures to table olive fermentation: an overview on the experimental studies. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 248.
207. Peragón, J. Time course of pentacyclic triterpenoids from fruits and leaves of olive tree (*Olea europaea* L.) cv. Picual and cv. Cornezuelo during ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 6671–6678.
208. de Castro, A.; Sánchez, A.H.; Cortés-Delgado, A.; López-López, A.; Montañó, A. Effect of Spanish-style processing steps and inoculation with *Lactobacillus pentosus* starter culture on the volatile composition of cv. Manzanilla green olives. *Food Chem.* **2019**, *271*, 543–549.
209. Variedad de planta de olivo CORNEZUELO DE JAÉN. Available online: http://www.variedadesdeolivo.com/vivero_planta_de_olivo/187/cornezuelo_de_jaén/ (accessed on Mar 9, 2020).
210. Variedad de planta de olivo CORNICABRA. Available online: http://www.variedadesdeolivo.com/vivero_planta_de_olivo/188/cornicabra/ (accessed on Mar 9, 2020).
211. Variedad de planta de olivo PICUAL. Available online: http://www.variedadesdeolivo.com/vivero_planta_de_olivo/277/picual/ (accessed on Mar 9, 2020).

212. Variedad de planta de olivo ROYAL DE CAZORLA. Available online:
http://www.variedadesdeolivo.com/vivero_planta_de_olivo/349/royal__de__cazorla/
(accessed on Mar 9, 2020).

Anexos

ANEXOS

A) CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DE ESTA MEMORIA

1. Publicaciones científicas

1. "Phytochemical profile, mineral content, and antioxidant activity of *Olea europaea* L. cv. Cornezuelo table olives. Influence of *in vitro* simulated gastrointestinal digestion". *Food Chemistry*, 297 (2019) 124933. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.05.207.
2. "Phenolic characterization, antioxidant activity, and enzyme inhibitory properties of *Berberis thunbergii* DC. leaves: A valuable source of phenolic acids". *Molecules*, 24 (2019) 4171. doi: 10.3390/molecules24224171.
3. "Spectrophotometric determination of the antioxidant properties and characterization of the phenolic content by high-performance liquid chromatography–diode array detection–tandem mass spectrometry (HPLC–DAD–MS/MS) of *Berberis hispanica* Boiss. & Reut. leaves". *Analytical Letters*, (2020). doi: 10.1080/00032719.2020.1775628.
4. "Study on three *Sarcocapnos* species as potential sources of bioactive compounds: relation between phenolic content and bioactivity by multivariate analysis". *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, (2020) ID 8885169. doi: 10.1155/2020/8885169.
5. "Phytochemical profile and mineral content of Royal variety olive fruits. Influence of the ripening stage". Enviado a "Journal of Food Composition and Analysis", Junio 2020.

6. "Effect of ripening on the phenolic composition of three varieties of Spanish olive fruits". Enviado a "Food Chemistry", Junio 2020.
7. "Phytochemical composition and antioxidant activity of *Portulaca oleracea*: Influence of the steaming cooking process". Enviado a "Food Chemistry", Julio 2020.

2. Comunicaciones a congresos

1. "Phytochemical analysis, antioxidant activity, and enzyme inhibitory properties of *Berberis thunbergii* DC. leaves: A valuable source of phenolic acids", XX EuroAnalysis, Istanbul, Turkey, 2019.
2. "Chemical profile and antioxidant activity of *Olea europaea* L. cv. Cornezuelo table olive. Influence of *in vitro* simulated gastrointestinal digestion", XX EuroAnalysis, Istanbul, Turkey, 2019.

3. Divulgación científica

Tras la publicación del artículo "Chemical profile and antioxidant activity of *Olea europaea* L. cv. Cornezuelo table olive. Influence of *in vitro* simulated gastrointestinal digestion (Food Chem. 297 (2019) 124933)", la editorial TechPress se puso en contacto con los autores del artículo para confeccionar un artículo divulgativo sobre el mismo. El 17 de enero de 2020, el artículo titulado "Aceituna de Cornezuelo: fuente de compuestos antioxidantes" fue publicado en la revista digital Tecnifood.

B) OTRAS CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS

A continuación, se relacionan otras contribuciones científicas adicionales que se han llevado a cabo durante la realización de la presente Memoria:

1. Publicaciones científicas

1. “Automated fluorimetric sensor for the determination of zearalenone mycotoxin in maize and cereals feedstuff”. *Talanta*, 191 (2019) 89-93. doi: 10.1016/j.talanta.2018.08.049.
2. “Determination of ascorbic acid in pharmaceuticals and biological fluids by the quenching of europium luminescence”. *Analytical Letters*, 53 (2020) 683-692. doi: 10.1080/00032719.2019.1668006.

2. Comunicaciones a congresos

1. “Automated fluorimetric sensor for the determination of zearalenone mycotoxin in maize and cereal feedstuffs”, XX EuroAnalysis, Istanbul, Turkey, 2019.

C) ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

Para la mayoría de los acrónimos se emplea la abreviatura o acrónimo anglosajón debido a su empleo más generalizado.

4CL	4-cumarato: CoA ligasa
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
AH	Antioxidante
AChE	Acetilcolinesterasa
APCI	Ionización química a presión atmosférica – <i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>
ATCh	Acetilcolina
B4H	Ácido benzoico 4-hidroxilasa
BChE	Butirilcolinesterasa
C4H	Ácido cinámico 4-hidroxilasa
CAT	Enzima catalasa
CHI	Chalcona isomerasa
CHS	Chalcona sintasa
COMT-1	Ácido cafeico 3-O-metiltransferasa
COX	Ciclooxigenasa
Cu(I)-Nc	Bis(neocuproína) de cobre (I)
Cu(II)-Nc	Bis(neocuproína) de cobre (II)
CUPRAC	Capacidad antioxidante reductora del ion cúprico – <i>Cupric ion reducing antioxidant capacity</i>
DAD	Detector diodo array
DFR	Dihidroflavonol 4-reductasa
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
DTNB	Ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ESI	Ionización por electrospray – <i>Electrospray ionization</i>
ET	Transferencia de electrones – <i>Electron transfer</i>
F3H	Flavanona 3-hidroxilasa
F3'H	Flavonoide 3'-hidroxilasa
F3'5'H	Flavonoide 3'5'-hidroxilasa

F5H/COMT-1	Ácido ferúlico 5-hidroxilasa y ácido cafeico/5-hidroxiferúlico <i>O</i> -metiltransferasa
FD	Detector de fluorescencia
FLS	Flavonol sintasa
FRAP	Poder antioxidante reductor del ion férrico – <i>Ferric ion reducing antioxidant power</i>
GPx	Enzima glutatión peroxidasa
GR	Enzima glutatión reductasa
HAT	Transferencia de átomos de hidrógeno – <i>Hydrogen atom transfer</i>
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución – <i>High performance liquid chromatography</i>
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta resolución con espectrometría de masas – <i>High performance liquid chromatography with mass spectrometry</i>
HPLC-DAD-MS/MS	Cromatografía líquida de alta resolución con detección diodo array y espectrometría de masas – <i>High-performance liquid chromatography with diode array detection and mass spectrometry</i>
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente – <i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
LAR	Leucoantocianidina reductasa
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina
LDOX	Leucoantocianidina dioxigenasa
MALDI	Desorción/ionización láser asistida por matriz – <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MPO	Mieloperoxidasa
MS	Espectrometría de masa – <i>Mass spectrometry</i>
MS/MS o MSⁿ	Espectrometría de masas en tándem
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
NOS	Óxido nítrico sintasa
NOx	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa
OMT	<i>O</i> -metiltransferasa
Ox	Oxidasa
P3OMT	Ácido protocatecuico 3- <i>O</i> -metiltransferasa
P5H	Ácido protocatecuico 5-hidroxilasa

PAL	Fenilalanina amonio liasa
pC3H	Ácido <i>p</i> -cumárico 3-hidroxilasa
pHB3H	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico 3-hidroxilasa
PNP	<i>p</i> -nitrofenol
PNPB	<i>p</i> -nitrofenil butirato
PNPG	4-nitrofenil- α -D-glucopiranosido
Q-TOF	Cuadrupolo-Tiempo de vuelo – <i>Quadrupole-Time of flight</i>
RNS	Especies reactivas de nitrógeno – <i>Reactive nitrogen species</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno – <i>Reactive oxygen species</i>
SOD	Enzima superóxido dismutasa
TCh	Tiocolina
TE	Equivalentes de Trolox – <i>Trolox equivalents</i>
TFC	Contenido total de flavonoides – <i>Total flavonoid content</i>
TNB	5-tio-2-nitrobenzoico
TPC	Contenido total de fenoles – <i>Total phenolic content</i>
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
UFGT	UDP glucosa: flavonoide 3- <i>O</i> -glucosil transferasa
UV-Vis	Ultravioleta-visible
V5H/V5OMT	Ácido vanílico 5-hidroxilasa y ácido vanílico 5- <i>O</i> -metiltransferasa

D) ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1** Fenoles totales en diferentes muestras vegetales.
- Tabla 2** Diferencias en los hábitos alimentarios del consumidor en la ingesta de polifenoles de 5 raciones de frutas y hortalizas.
- Tabla 3** Clasificación de los compuestos fenólicos.
- Tabla 4** Elementos metálicos esenciales para el cuerpo humano (referidos a un hombre adulto de 70 kg) y los síntomas de deficiencia ante la falta de dichos metales esenciales.

E) ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** Estructura de una molécula flavonoide.
- Figura 2** Clases de flavonoides.
- Figura 3** Estructura básica de las principales clases de flavonoides.
- Figura 4** Estructura básica de los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos.
- Figura 5** Estructura básica de los iridoides y secoiridoides.
- Figura 6** Estructura de la oleuropeína.
- Figura 7** Esquema general de la biosíntesis de los flavonoides.
- Figura 8** Esquema general de la biosíntesis de los ácidos fenólicos.
- Figura 9** Ruta biosintética en oleáceas. Glc: glucosa.
- Figura 10** Metabolismo de los polifenoles en la digestión.
- Figura 11** Liofilizador Lyoquest-55 ECO (Telstar).
- Figura 12** Sonicador por sonda, Qsonica (Sonicator).
- Figura 13** Evaporador rotativo, Hei-VAP (Heidolph).
- Figura 14** Espectro electromagnético.
- Figura 15** Esquema de un espectrofotómetro UV-Vis.
- Figura 16** Espectrofotómetro UV-Vis 4201/50 (Zuzi Spectrophotometer).
- Figura 17** Reacción de reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu causado por la oxidación de compuestos fenólicos.
- Figura 18** Recta de calibrado de ácido gálico (0-400 ppm) utilizada en un ensayo de TPC.
- Figura 19** Reacción de complejación de la quercetina con $AlCl_3$.
- Figura 20** Recta de calibrado de quercetina (0-140 ppm) utilizada en un ensayo de TFC.
- Figura 21** Esquema general de un HPLC.
- Figura 22** Esquema general de un espectrómetro de masas acoplado a cromatografía.

- Figura 23** Espectrómetro de masas Esquire 6000 de Bruker unido a un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Agilent 1100.
- Figura 24** Espectrómetro de masas Agilent 6530B unido a un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Agilent 1200.
- Figura 25** Tabla periódica de los elementos químicos requeridos para la vida.
- Figura 26** Espectrómetro ICP-MS 7900 (Agilent).
- Figura 27** Esquema de un ICP-MS.
- Figura 28** Sistema de digestión por microondas, Mars Xpresss (CEM).
- Figura 29** Mecanismos de acción de los antioxidantes. NOS: óxido nítrico sintasa; NOx: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa; COX: ciclooxigenasa; MPO: mieloperoxidasa; CAT: enzima catalasa; SOD: enzima superóxido dismutasa; GPx: enzima glutatión peroxidasa; GR: enzima glutatión reductasa.
- Figura 30** Reacción de generación de ABTS^{•+} y su reacción con una especie antioxidante.
- Figura 31** Recta de calibrado de Trolox (0.01-0.4 mM) utilizada en un ensayo de ABTS.
- Figura 32** Reacción química entre el radical DPPH[•] (a) y el antioxidante (AH), para dar lugar a la estructura del radical reducido (b).
- Figura 33** Recta de calibrado de Trolox (0.025-0.8 mM) utilizada en un ensayo de DPPH.
- Figura 34** Estructura de los complejos y mecanismo de reacción en el método FRAP.
- Figura 35** Mecanismo de reacción en el método CUPRAC.
- Figura 36** Mecanismo de reacción en el método del fosfomolibdeno.
- Figura 37** Reacción de (I) un antioxidante con Fe²⁺ y (II) ferrocina con Fe²⁺.
- Figura 38** Esquema de (I) una reacción enzimática sin inhibidor y (II) con inhibidor enzimático.
- Figura 39** Reacción catalizada por las enzimas colinesterasas.

- Figura 40** Formación de dopacromo por oxidación catalizada por tirosinasa de L-DOPA.
- Figura 41** Reacción del almidón con la enzima α -amilasa y con el ión triyoduro (I_3^-).
- Figura 42** Hidrólisis del almidón a glucosa catalizada por las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa.
- Figura 43** Mecanismo de hidrólisis de 4-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (PNPG) por α -glucosidasa.
- Figura 44** Reacción de hidrólisis enzimática de *p*-nitrofenil butirato (PNPB) por lipasa.
- Figura 45** Mapa de localización y climatología de la provincia de Jaén.
- Figura 46** Fotografías de *Berberis thunbergii*.
- Figura 47** Fotografías de *Berberis hispanica*.
- Figura 48** Fotografías de *Sarcocapnos enneaphylla*.
- Figura 49** Fotografías de *Sarcocapnos pulcherrima*.
- Figura 50** Fotografías de *Sarcocapnos saetabensis*.
- Figura 51** Fotografías de *Portulaca oleracea*.
- Figura 52** Fotografía de un olivo (*Olea europaea*).
- Figura 53** Aceitunas de mesa variedad Cornezuelo aliñadas al “estilo Jaén”.
- Figura 54** Fotografías de las distintas variedades de aceitunas estudiadas. A: Cornezuelo; B: Cornicabra; C: Picual; D: Royal.

