IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN *POSIDONIA OCEANICA* MEDIANTE EL EMPLEO DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN

M. Astudillo†, I. Domínguez‡, A. Garrido Frenich‡ y P. A. Aguilera†

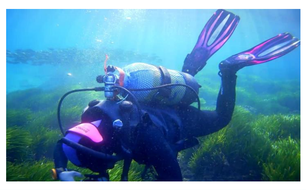
†Departamento de Biología y Geología, Campus de Excelencia Internacional en Ciencias del Mar (CEIMAR).
‡ Departamento de Química y Física, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario, ceiA3.
Universidad de Almería, E-04120 Almería (España); m.astudillo@ual.es

INTRODUCCIÓN

Posidonia oceanica Delile (*P. oceanica*) es una planta marina considerada bioindicador de la calidad de las aguas costeras en el Mar Mediterráneo [1]. Se ha observado que la síntesis y acumulación de los compuestos fenólicos en *P. oceanica* responde a ciertos factores que pueden llegar a generarle estrés a la planta (ej. sobre enriquecimiento de nutrientes por acuicultura) [2]. Por ello, estos compuestos han sido propuestos como alertas tempranas de perturbaciones en el medio marino [2]. Estudios previos han llevado a cabo la determinación de fenoles en los tejidos foliares, sin contemplar la presencia de éstos en rizomas o raíces. Adicionalmente, estos estudios basaron su detección en cromatografía de líquidos (LC) o cromatografía de gases (GC) acoplada a analizadores de espectrometría de masas de baja resolución (LRMS) [4,5].

En el presente estudio se ha abordado (1) la determinación de los compuestos fenólicos utilizando, por primera vez, el potencial de la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) en *P. oceánica,* lo que ha permitido llevar a cabo análisis retrospectivos y (2) una evaluación del contenido fenólico en los diferentes tejidos (hoja, rizoma y raíz) obtenidos en distintos puntos de muestreo.

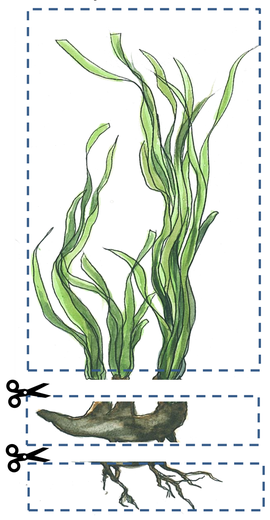
MUESTREO



1. El Ejido (EE3)
2. Almería (AL2x)
3. Costacabana (AL3)
4. Alquián (FAN7)
5. Cabo de Gata (CG4)

PRETRATAMIENTO

1. **Limpieza (H_2O destilada)**
2. Separación de tejidos



Hojas → 5:5 *v/v*

3. Congelación 48 h
4. Liofilización 48 h
5. Molienda

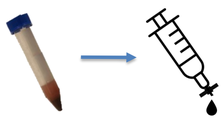
Rizoma → 8:2 *v/v*

Raíz → 8:2 *v/v*

EXTRACCIÓN

6. Extracciones específicas con MeOH:H_2O

7. Sonicación
8. Centrifugación
9. Filtración



ANÁLISIS

CONDICIONES UHPLC-HRMS

- LC: Thermo Scientific Transcend™ 600 LC (Thermo Scientific)
- Columna: Hypersil GOLD™
- Fase móvil: ácido fórmico (A) , metanol (B).
- Tª Columna: 25 °C
- Flujo: 0.2 ml/min
- Volumen de muestra: 10 µl
- Analizador: Exactive Orbitrap (Thermo Scientific)
- Modo de ionización: ESI +/-
- Energía de colisión: 30 eV
- Resolución: 25000 FWHM
- Tiempo de barrido: 0.25 s
- Tª línea de transferencia: 250 °C
- Full Scan

IDENTIFICACIÓN

ANÁLISIS TARGET

¿qué es? Búsqueda de 93 compuestos encontrados en una base de datos desarrollada usando patrones de compuestos fenólicos comúnmente detectados en productos agroalimentarios

¿fuente? Desarrollada previamente en el grupo de investigación

ANÁLISIS DE SOSPECHOSOS

¿qué es? Búsqueda de 38 compuestos previamente detectados en *P. oceanica* y otras plantas marinas del Mediterráneo

¿fuente? Revistas científicas y bases de datos (PubChem, ChemSpider y Human Metabolomics)

Softwares empleados: Trace Finder™ 4.0 y Xcalibur™ 2.2.1 (Thermo Fisher Scientific) en modo Qual browser

Requisitos para confirmación
- Fragmentos de confirmación presentes ✓
- Error de masas inferior o igual a ±5 ppm ✓

RESULTADOS

- **ANÁLISIS TARGET**

Se detectaron 22 compuestos, de los cuales 13 no habían sido detectados previamente en *P. oceanica*. Los ácidos cinámicos y sus derivados (predominantes en las hojas) representan junto a los flavonoles los compuestos fenólicos más comúnmente detectados en este studio, seguidos de flavonas y flavononas.

Flavonas	Flavonoles	Isoflavonas	Flavononas/Flavanonas	Chalconas	Otros Flavonoides
Apigenina	Galangina	Biocanina A*	Eriodictyol	Naringenina chalcona	Kaempferol-3-O-glucósido/luteolina-4'-O-glucósido**
Baicaleína		Genisteína	Naringenina		
Luteolina		Gliciteína*	Pinocembrina		
			Isosakuraina/sakuranetina**		

*Compuestos encontrados únicamente en rizoma y raíz; **Isómeros contabilizados conjuntamente

- **ANÁLISIS DE SOSPECHOSOS**

Se identificaron tentativamente 8 compuestos: aldehído protocatechuico, ácido caftárico, ácido chicórico, ácido p-asínico, ácido fertárico, quercetina-3-O.molinglucósido, isohamnetina-3-O-malonilglucósido y ácido zostérico.

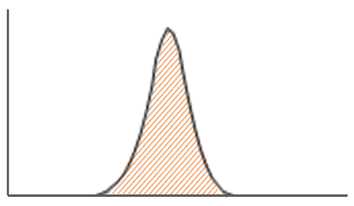
- **ANÁLISIS ESTADÍSTICOS (Kruskal-Wallis test)**

Área del pico cromatográfico

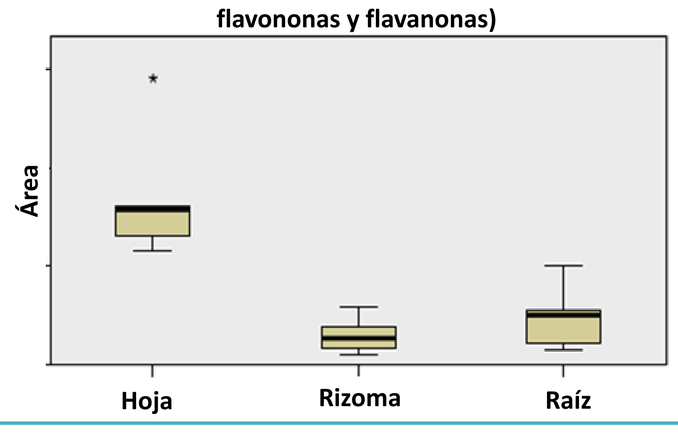
El test de Kruskal-Wallis mostró la existencia de diferencias significativas en 6 de las 8 familas fenólicas detectadas en *P. oceanica* (p-value < 0.05) dependiendo del tipo de tejido.

Catequinas, flavonas, flavonoles e isoflavonas presentaron mayores valores de área en los rizomas mientras que los ácidos cinámicos, junto a flavononas y flavanonas dieron lugar a señales de mayor en las hojas.

Cálculo de áreas de los picos cromatográficos



Estudio estadístico por familias (ejemplo de flavononas y flavanonas)



CONCLUSIONES

- **Se han detectado 30 compuestos fenólicos, de los cuales 13 no habían sido reportados previamente en esta matriz.**
- **Se han observado diferencias significativas entre los tejidos, en términos de áreas de los picos cromatográficos, en todas las familias fenólicas, excepto en el caso de los ácidos benzoicos y de los flavonoles.**
- **Este studio mejora la información acerca de los compuestos bioactivos presentes en los tejidos de *P. oceanica*. Los 30 compuestos fenólicos que constituyen la huella dactilar fenólica de *P. oceanica* podrían ser considerados en futuras investigaciones para el estudio de su comportamiento bajo distintas condiciones medioambientales y evaluar su potencial como marcadores bioquímicos específicos.**

Referencias

[1] Campagne, C.S., Salles, J.M., Boissery, P., Deter, J., 2014. Mar. Pollut. Bull. 97, 391–400.
[2] Cannac, M., Ferrat, L., Pergent-Martini, C., Pergent, G., Pasqualini, V., 2006. Sci. Total Environ. 370, 91–98
[3] Dumay, O., Costa, J., Desjobert, J., Pergent, G., 2004. Phytochemistry 65, 3211–3220.
[4] Haznedaroglu, M.Z., Zeybek, U., 2007. Pharm. Biol. 45, 745–748.
[5] Giambanelli, E., Filippo D'Antuono, L., Romero-González, R., Garrido Frenich, A., 2018. J. Sci. Food Agric. 98, 945–954.