

**OBTENCIÓN DE POLIFENOLES DE
PLANTAS SUPERIORES.
EVALUACIÓN ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

**OBTAINING POLYPHENOLS FROM
HIGHER PLANTS.
EVALUATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY**

Tutor: González Díaz, Jesús Manuel

Alumna: Modino Chico, Aránzazu

Facultad de Ciencias, Grado de Biología

Septiembre, 2020

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	2
2. ABSTRACT	2
3. ABREVIATURAS	3
4. INTRODUCCIÓN.....	3
4.1. GÉNERO HYPERICUM	8
4.1.1. <i>Hypericum coadunatum</i> C. Sm. ex Link	11
5. OBJETIVOS	13
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
6.1. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES GENERALES.....	13
6.2. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS EMPLEADAS	14
6.2.1. Espectrometría de absorción infrarroja (IR).....	14
6.2.2. Espectrometría de masas	15
6.2.3. Resonancia magnética nuclear (RMN).....	16
6.2.4. Cromatografía en placa fina (TLC)	16
6.2.5. Cromatografía en columna de fase reversa (RPC)	17
6.3. MATERIAL VEGETAL.....	18
6.4. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN	18
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
8. ACTIVIDAD BIOLÓGICA	24
9. CONCLUSIONES	26
10. CONCLUSION	27
11. BIBLIOGRAFÍA.....	27
12. ANEXO: GALERÍA DE ESPECTROS	30

1. RESUMEN

El reino vegetal destaca por innumerables aspectos, entre ellos se hace especial mención a su producción de metabolitos secundarios que, a día de hoy, empleamos de diversas formas para mejorar nuestra calidad de vida. Muchos de estos los ingerimos en nuestra dieta de manera inconsciente y son extremadamente beneficiosos para la salud. A lo largo de esta memoria estudiaremos uno de estos metabolitos, el ácido clorogénico, ingerido a través del café. Los ácidos clorogénicos son muy abundantes en las especies del género *Hypericum*, en concreto, desarrollaremos la especie *Hypericum coadunatum*, endémica de la isla de Gran Canaria, de la cual se aíslan los compuestos ácido clorogénico y ácido clorogénico metil éster gracias a las técnicas de separación cromatográficas y a las técnicas de resonancia magnética y espectrometría de masas para su identificación.

Palabras claves: *Hypericum coadunatum*, polifenoles, ácido cafeico, ácido clorogénico

2. ABSTRACT

The plant kingdom stands out for countless aspects, among them it's possible to highlight the production of secondary metabolites, that nowadays are being used to improve the quality of our life. We ingest most of them through our diet unconsciously with them being extremely beneficial to our health. Throughout this memory we'll be getting into detail about one of these metabolites, the chlorogenic acid, ingest mostly through coffee. The chlorogenic acids are very abundant in the *Hypericum* species, we'll be focusing in the *Hypericum coadunatum*, endemic of the Gran Canaria Island, from which we can isolate the compounds chlorogenic acid and methyl ester chlorogenic acid thanks to the chromatographic separation technique and the techniques of magnetic resonance and mass spectrometry for identification.

Key words: *Hypericum coadunatum*, polyphenols, caffeic acid, chlorogenic acid

3. ABREVIATURAS

CC: cromatografía en columna	m: metros
CCF: cromatografía en capa fina	ml: mililitros
CGA: ácidos clorogénicos	mm: milímetros
CQA: ácido cafeoilquínico	nm: nanómetros
diCQA: ácido dicaoilquínico	ppm: partes por millón
FQA: ácido feruloilquínico	RMN: resonancia magnética nuclear
H.: Hypericum	RPC: cromatografía de fase reversa
HPLC: cromatografía líquida de alta resolución	TLC: cromatografía en capa fina
Hz: hertzios	TMS: tetrametilsilano
IR: espectrometría de absorción infrarroja	T2DM: diabetes mellitus de tipo 2
J: constante de acoplamiento	UV: ultravioleta
kg: kilogramos	5-CQA: 5-cafoleoilquínico
	δ: desplazamiento químico

4. INTRODUCCIÓN

Bien es sabido que la ciencia ha avanzado mucho en las últimas décadas, especialmente en el campo de la salud para así prevenir o curar las distintas enfermedades que afectan a nuestra especie, *Homo sapiens*. Es por ello que la Biología y la Química se combinan para hallar los procedimientos más adecuados para detectarlas y afrontarlas del mejor modo posible sin que el paciente sufra mayor daño. Gracias a esta colaboración se ha logrado descubrir distintos tratamientos con los que mejorar su calidad de vida.

Cierto es que los seres vivos se pueden estudiar desde muchos puntos de vista como son el filosófico, histórico, religioso, político, biológico, físico, químico.... De entre estas ciencias destacamos la Biología por hacer un uso

riguroso del método científico, el cual consiste en observar el problema para proponer las distintas hipótesis sobre la solución del mismo. Todas estas hipótesis deben poder corroborarse experimentalmente para así predecir unos resultados fiables que den una solución válida. De esta manera, los seres vivos pueden ser expuestos a análisis biológicos y físico-químicos con total fiabilidad. Es en este punto en donde confluyen las dos ciencias, la Biología y la Química, dando origen a una nueva ciencia, la Bioquímica. Con esta se pretende hacer un estudio de los componentes de los seres vivos mediante un análisis químico para así poder explicar sus funciones biológicas, es decir, su propósito es la Biología pero su medio de trabajo es la Química. Otras ramas de la Química, como pueden ser la Química Orgánica, la Inorgánica, la Analítica o la Ingeniería Química, también se combinan con el factor biológico debido a que muchas veces sus objetos de estudio son productos naturales o derivados de los mismos.

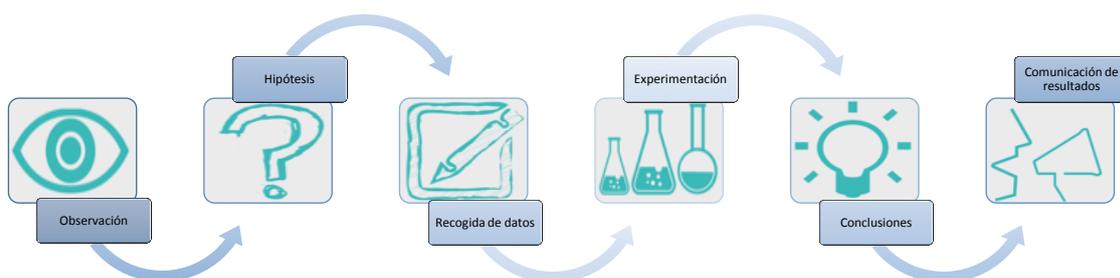


Figura 1.- Esquema del método científico

Las interacciones existentes entre las distintas ciencias se pueden ver reflejadas actualmente en múltiples áreas de trabajo, destacando entre ellas el sector sanitario, el alimenticio y el medioambiental. A pesar de la presencia de la Química en todos ellos, destaca la necesidad y la alta demanda de conocimientos biológicos, tanto conceptuales como de procesos. (Universidad de Sevilla)

Teniendo en cuenta las sinergias mencionadas, nos centraremos en la existente entre la Química Orgánica y la Biología, la cual ha estado presente en el desarrollo de este trabajo. La Química Orgánica tiene sus fundamentos en el estudio de sustancias y compuestos orgánicos, los cuales combinan el carbono y el hidrógeno. Especialmente, se centra en el estudio de las mismas en cuanto

a su estructura, comportamiento, propiedades, usos y origen. Cabe destacar que dichos compuestos orgánicos son esenciales para la vida y para el avance que generó esta rama tanto en la industria farmacéutica como textil, plástica e incluso en la industria energética y petroquímica durante el siglo XX, permitiendo así que fueran posibles los nuevos métodos de investigación de las sustancias de origen animal y vegetal.

Es importante darle protagonismo al desarrollo de la industria farmacéutica porque, gracias a la Química Orgánica, hubo posibilidad de fabricar medicamentos. Además, este avance se relaciona estrechamente con la Biología debido a que permitió comprender las bases moleculares de las enfermedades, inclusive, identificar las dianas terapéuticas para así encontrar los medicamentos adecuados que interaccionaran con ellas. (Avendaño, 2011)

Uno de los grandes hándicaps que presenta nuestra sociedad actualmente es el origen de esos fármacos. Durante la segunda mitad del siglo XX la composición de los mismos no era de gran relevancia para la población pero, teniendo en cuenta la educación de la sociedad actual, la clientela busca fármacos cada vez más naturales, alejándose de los hasta ahora conocidos fármacos sintéticos. Es por ello que la industria farmacéutica, a la que las tendencias socio-culturales impactan en gran medida, ha tenido que adaptar sus productos a la demanda de los compradores.

Actualmente, la búsqueda se centra en obtener compuestos orgánicos de origen natural. Muchos de estos compuestos, objetos de estudio, son metabolitos secundarios producidos por las plantas como resultado del metabolismo secundario. Aparentemente los metabolitos secundarios no tenían ninguna función directa en el crecimiento y desarrollo de la planta. Sin embargo, con los nuevos estudios, se ha descubierto que muchos de ellos tienen importantes funciones ecológicas sobre sí mismas. Algunas de estas funciones son protegerlas de la ingestión por parte de los herbívoros y de la infección por parte de los patógenos microbianos, además de servirles a las plantas para atraer a los polinizadores y así dispersar sus semillas.

Dichos metabolitos secundarios se pueden dividir en cuatro clases principales, diferenciados por sus características químicas. Estos son los

terpenos, los compuestos fenólicos, los alcaloides y los glucósidos. (Martín Gordo, 2018)

Concretamente, los compuestos fenólicos son productos formados por un grupo fenol, el cual se define como un grupo funcional hidroxilo en un anillo aromático. Los compuestos fenólicos se caracterizan por ser muy heterogéneos, formados tanto por compuestos solubles como insolubles, que presentan funciones muy diversas en las plantas. Además, desde el punto de vista metabólico, son compuestos biosintetizados a partir de diferentes rutas, lo que también aumenta su diversidad.

Principalmente, los polifenoles surgen de dos rutas, las llamadas ruta del ácido siquímico y la ruta del ácido malónico, siendo de la primera de la que surgen la mayoría de los fenoles en las plantas. Por el contrario, la segunda ruta es importante en las bacterias y en los hongos. Centrándonos en la ruta del ácido siquímico, esta es importante porque tiene como finalidad formar los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano). Especialmente, la fenilalanina es la precursora de la mayoría de los compuestos fenólicos gracias a que ésta pierde una molécula de amonio, dando lugar al ácido cinámico, antecesor de dichos compuestos. Esta reacción está llevada a cabo por la enzima fenilalanina amonio liasa, una de las enzimas más estudiadas del metabolismo secundario. (Taiz, y otros, 2006). A partir de esta reacción surgen diferentes clases de polifenoles, entre las que destacamos los ácidos fenólicos, los estilbenos, los lignanos, los alcoholes fenólicos y los flavonoides, entre otros.

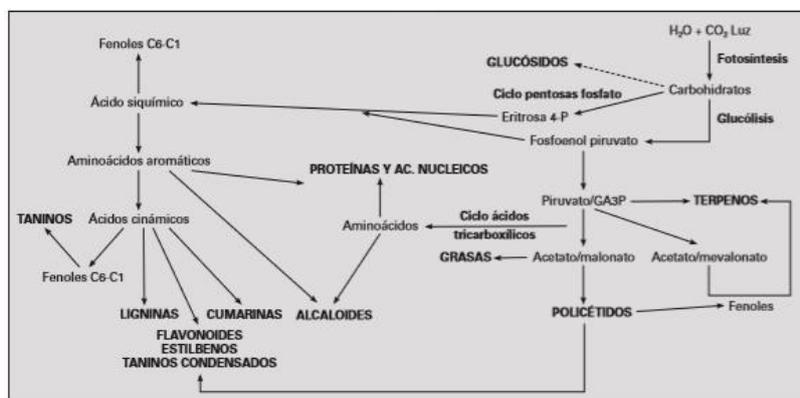


Figura 2.- Relación entre el metabolismo primario y secundario de las plantas, en la que destacamos la ruta del ácido siquímico. (Azcón-Bieto, y otros, 2008)

Cabe destacar que el ácido cinámico presenta una serie de derivados entre los que hacemos especial mención al ácido hidroxicinámico, que se caracteriza por la sustitución del grupo hidroxilo en el anillo aromático, además de estar formado por un grupo alifático y un ácido carboxílico en el extremo. De este derivan compuestos como son el ácido cafeico, el ácido ferúlico y el ácido p-curámico, los cuales suelen encontrarse en forma de derivados. Un claro ejemplo de esto es el caso del ácido cafeico que se encuentra esterificado con el ácido quínico dando lugar al ácido clorogénico. (Porras, y otros, 2009)

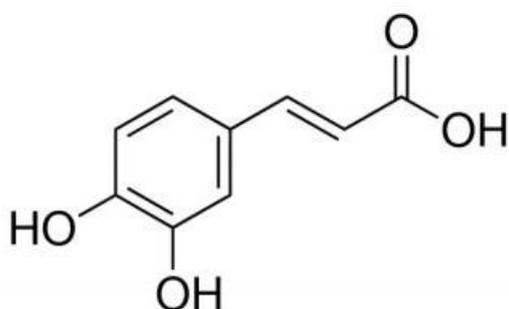


Figura 3.- Ácido cafeico

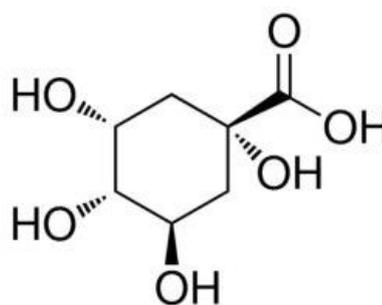


Figura 4.- Ácido quínico

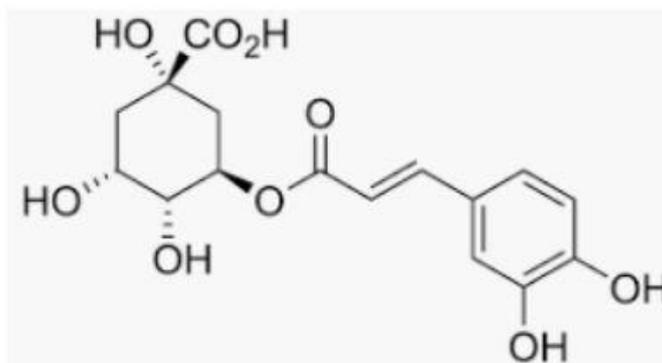


Figura 5.- Ácido clorogénico
(tomadas de: es.wikipedia.org)

El ácido clorogénico, definida con la fórmula $C_{16}H_{18}O_9$, está presente en una gran cantidad de alimentos comunes en la dieta, especialmente en tubérculos, frutas y verduras. Uno de estos alimentos es el café verde, el cual contiene en su grano mayor proporción de ácido clorogénico antes de que pase por el proceso de tostado. Es por ello que es uno de los alimentos más

importantes cuando se habla de la propiedad adelgazante de la molécula. Otros alimentos que lo contienen son las semillas de girasol, las alcachofas, las peras o las berenjenas. (Varela González, 2017).

La molécula de ácido clorogénico presenta beneficios para la salud, lo que la ha hecho especialmente relevante para la sociedad actual. Algunos de estos beneficios repercuten positivamente sobre enfermedades como la obesidad, la diabetes, la presión arterial alta, la enfermedad de Alzheimer y las infecciones bacterianas. (MedlinePlus, 2019)

En el presente estudio se lleva a cabo el análisis del ácido clorogénico en una especie vegetal endémica de la isla de Gran Canaria, *Hypericum coadunatum*, en el que estudiamos y desarrollamos su actividad biológica.

4.1. GÉNERO HYPERICUM

El género *Hypericum* comprende una colección de plantas dicotiledóneas englobadas dentro de la subfamilia Hypericoideae, que a su vez pertenecen a la familia Clusiaceae. De manera errónea se ha considerado a esta subfamilia como una familia distinta, la llamada familia Hypericaceae. (Sánchez de Lorenzo-Cáceres)



Figura 6.- Ilustración del género *Hypericum*
(tomada de: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Hypericum>)

La familia Clusiaceae se caracteriza por estar formada principalmente por árboles y arbustos que contienen jugos resinosos o glándulas oleosas amarillentas o verdosas. Esta familia se distingue por tener hojas opuestas o verticiladas, normalmente enteras, además de ser simples, engrosadas y no presentar estípulas. En lo relativo a sus flores, generalmente son terminales y regulares, combinando flores hermafroditas y unisexuales, ubicadas en pies de plantas distintos, es decir, son dioicas. Las flores pueden encontrarse como solitarias o formando inflorescencias cimosas. En cuanto a la morfología de dichas flores, estas están formadas por cinco sépalos libres y por cinco pétalos, además de contener numerosos estambres libres o connatos en haces y un ovario súpero. Por otro lado, como resultado de la fructificación, se originan frutos capsulares o drupáceos, que a menudo contienen semillas aladas. (Sánchez de Lorenzo-Cáceres) (Bramwell, y otros, 2001)



Figura 7.- Fruto del género Hypericum
(tomada de: <http://www.virginfarms.com/flower-fact-friday-hypericum/>)

En concreto, el género *Hypericum* está formado por arbustos con hojas opuestas y simples, que a menudo presentan algunas glándulas. Sus flores son de color amarillo, solitarias o en inflorescencias cimosas, presentando las características morfológicas que se han indicado en el párrafo anterior. El fruto generalmente es una cápsula, a veces carnosa, que contiene un gran número

de semillas de color marrón. Este género está compuesto por unas 400 especies de plantas, de las cuales ocho están presentes en las Islas Canarias. Estas son *Hypericum canariense* L., *H. coadunatum* C. Sm. ex Link, *H. glandulosum* Aiton, *H. grandifolium* Choisy, *H. humifusum* L., *H. perfoliatum* L., *H. perforatum* L. y *H. reflexum* L.f.. Casi con total seguridad se puede afirmar que estas ocho especies son nativas del archipiélago canario y confirmar que dos de ellas son endémicas de las islas, *Hypericum coadunatum* C. Sm. ex Link (presente únicamente en Gran Canaria) e *Hypericum reflexum* L.f. (presente en todas las islas excepto en Lanzarote). (Arechavaleta, y otros, 2009)



Figura 8.- *Hypericum canariense*

(tomada de: http://www.colorfulnature.com/plantInfo.jsp?lang=en_US&category=flowers&picGroupId=Hypericum_Canariense&displayNames=true&viewType=INFO)

El género *Hypericum* destaca por las grandes virtudes que tiene como plantas medicinales, tal y como indican los vocablos griegos de los que deriva: “por encima de todo lo imaginable”. Se sabe que, desde épocas pasadas, el Granadillo canario (*H. canariense* L.) ha sido usado para beneficio humano. Concretamente, está documentado que los aborígenes canarios lo usaban para la momificación de los cadáveres. (Cruz, 2008). Algunos de los usos medicinales que tienen las especies de este género son antidepresivos, ansiolíticos, antiinflamatorios en gastritis o en úlceras gastroduodenales y diuréticos.

Adicionalmente, la maceración de sus flores con aceite de oliva se usaba para favorecer la cicatrización de las heridas y quemaduras e, incluso, para las venas varicosas y hemorroides. (Pérez de Paz, 1999)

4.1.1. *Hypericum coadunatum* C. Sm. ex Link

La especie objeto de nuestro estudio es *Hypericum coadunatum*, conocida vulgarmente como ``malfurada de manantial``.



Figura 9.- *Hypericum coadunatum* ``malfurada de manantial``
(tomada de: <https://www.biodiversidadcanarias.es/biota/especie/F00857>)

Hypericum coadunatum C. Sm. ex Link. es una pequeña mata arbustiva leñosa, ramificada en la base con ramas simples. Sus hojas son perfoliadas y ampliamente ovadas. Tanto sus ramas como sus hojas son vellosas, presentando pelos erectos. Las hojas son especialmente vellosas en el envés. Sus flores se presentan agrupadas en densas inflorescencias cimosas, las cuales están formadas por pequeñas flores amarillas pálidas de aproximadamente un centímetro de diámetro. (Bramwell, y otros, 2001) (Jardín Botánico Canario ``Viera y Clavijo``, 2007)



Figura 10.- Flor de Hypericum coadunatum
(tomada de: <https://www.biodiversidadcanarias.es/biota/especie/F00857>)

Esta especie se localiza en la isla de Gran Canaria, de donde es endémica. Esta pequeña mata se adapta fácilmente a vivir en paredes y riscos húmedos tanto de sombra como de sol. Además, muestra gran adaptación a la variación de la temperatura pero una estrecha relación con la humedad del sustrato por lo que es bastante dependiente de los rezumaderos más o menos permanentes. Concretamente, en la isla, se localiza en la región central como es en San Mateo, Artenara o Presa de los Pérez, entre otros lugares.

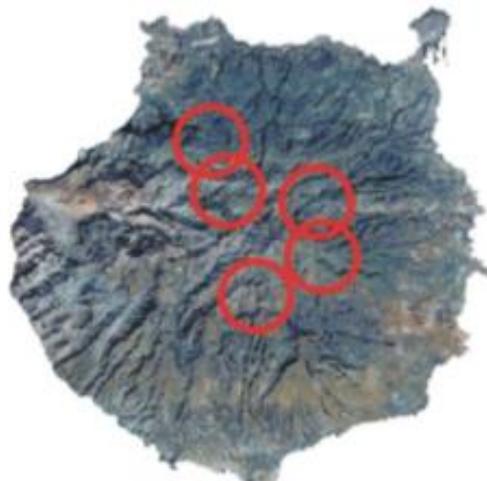


Figura 11.- Localización de Hypericum coadunatum en Gran Canaria
(tomada de:(Jardín Botánico Canario ``Viera y Clavijo´´, 2007))

5. OBJETIVOS

Durante la realización de este trabajo se han tenido en cuenta varios objetivos a alcanzar:

- El estudio fitoquímico del endemismo canario *Hypericum coadunatum*, del cual se intentan aislar e identificar compuestos polifenólicos de interés.
- Caracterizar los extractos obtenidos mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas para determinar la presencia de dichos compuestos polifenólicos.
- Estudiar la actividad biológica de los compuestos polifenólicos caracterizados.

Como consecuencia de la realización de los objetivos anteriores se logra el aumento de las destrezas y habilidades en el laboratorio, en la realización de las técnicas de aislamiento y purificación, así como en la caracterización de los compuestos activos de los organismos vegetales mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES GENERALES

La obtención de los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN son mediante los espectrómetros Bruker Advance II 500 y Bruker Advance III 600. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en hertzios (Hz). Como patrón interno se utilizó tetrametilsilano (TMS). Los espectros de infrarrojo (IR) fueron recogidos en un espectro polarímetro Bruker TSF-55. Las cromatografías en columna (CC) de exclusión molecular se realizaron sobre Sephadex LH-20 Pharmacia (ref. 17-0090-01), Lipophilic Sephadex LH-20 Sigma (ref. 9041-37-6), sílica gel (Merck 2300-400 mesh). Las cromatografías en capa fina (CCF) se realizaron utilizando cromatofolios de sílica gel (35-70 mesh ASTH, Merck art. 10185) con un grosor de 0,2 mm. Los cromatogramas fueron visualizados bajo luz ultravioleta (UV) a 255 y 366 nm. Estos se revelaron rociando óleum (80% ácido acético, 16% agua destilada y 4% ácido sulfúrico) o ácido fosfomolítico y

exponiéndolos a continuación a calor. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) fue realizada por un sistema de bombeo JASCO Pu-980 equipado con un detector JASCO UV-975 y con una columna Waters Kromasil Si 5mm (10 x 250 mm).

6.2. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS EMPLEADAS

Existen diferentes técnicas mediante las cuales se puede llegar a caracterizar un compuesto desconocido. Entre las técnicas existentes hemos empleado para la identificación de nuestros compuestos la espectrometría de absorción infrarroja, la espectrometría de masas, la resonancia magnética nuclear, la cromatografía en placa fina y la cromatografía en columna de fase reversa, las cuales comentamos a continuación.

6.2.1. Espectrometría de absorción infrarroja (IR)

La espectrometría de absorción infrarroja (IR) es una de las técnicas que se emplean para identificar compuestos orgánicos e inorgánicos puros de manera cualitativa, ya que las moléculas en vibración absorben radiación IR. Este método se basa en que, cuando a una molécula se le suministra una determinada energía mediante luz infrarroja, en el momento que comienza a vibrar se puede concluir que absorbe la energía del haz de luz. Debido a esta absorción la técnica es fiable para identificar diferentes estructuras moleculares porque cada una de ellas absorbe la energía del haz de luz infrarroja a una determinada longitud de onda. Así, podemos concluir que cada una de las estructuras tiene su *huella dactilar* ya que se puede conocer la composición de una molécula con esta técnica. (Universidad del País Vasco, 2006)

Esta es una técnica que se usa mucho tanto en industria como en investigación científica debido a que es rápida y fiable para medidas, control de calidad y análisis dinámicos. (Universidad del País Vasco, 2006) Especialmente se utiliza porque ofrece unos espectros con muy buenos resultados cuando se trata de una muestra de una sola sustancia de gran pureza y, habitualmente, se usa para identificar la composición de mezclas complejas. (Pérez, 2018)

Para llevar a cabo la prueba se coloca la muestra objeto de estudio y una muestra pura del disolvente como referencia en sus lugares correspondientes en el espectrofotómetro y se hace pasar un haz de luz infrarroja que se divide en dos rayos a través de ambas cubetas. Una vez que atraviesa las muestras, el haz de luz pasa a través del separador y luego vuelve al detector.

La razón por la que se usa una muestra de referencia es para evitar las fluctuaciones de la energía y que así los resultados finales no se vean condicionados por ellas. A su vez, permite anular el efecto del disolvente ya que la muestra de referencia es la forma pura del mismo. (Pérez, 2018)

Mediante esta técnica se obtiene un espectro electromagnético con longitudes de onda del infrarrojo englobadas entre los 4000 y los 1300 cm^{-1} . Esta región se corresponde con el infrarrojo lejano por lo que, en el espectro resulta complicado asignar las bandas de absorción a cada una de las vibraciones moleculares. Esto se debe a que cada una de las bandas está formada por la suma de las absorciones individuales, es decir, se representa la multiplicidad de las bandas. De esta forma, las pequeñas diferencias en las estructuras de las moléculas originan variaciones muy importantes en los máximos de absorción, pudiendo diferenciar cada una de las mismas. (Universidad del País Vasco, 2006)

6.2.2. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica analítica que ofrece resultados cualitativos y cuantitativos al llevar a cabo la determinación de estructuras orgánicas, inorgánicas y/o biológicas. (Carrera Aguado, 2016). Mediante esta técnica se identifican compuestos desconocidos, se cuantifica compuestos conocidos y se establece la estructura y propiedades químicas de las moléculas en cuestión. (SCAI, 2016)

Para poder llevar a cabo la técnica, en primer lugar, las muestras tienen que ser compuestos puros o ser muestras sencillas purificadas, no pueden contener residuos contaminantes. Al igual que, para obtener resultados fiables es conveniente que la muestra no esté diluida y no supere 1 mg de peso. (Carrera Aguado, 2016) A continuación, la muestra tiene que ser ionizada mediante diversos procedimientos. Normalmente se emplea la técnica de Impacto

Electrónico mediante la cual la muestra es bombardeada con una corriente de electrones a alta velocidad. De esta forma la muestra se fragmenta, perdiendo algunos electrones, y los iones se conducen a un tubo analizador curvado en donde existe un fuerte campo magnético. En esta parte se recogen los impactos de los iones en función de la relación carga/masa de los mismos.

Gracias a que cada compuesto es único, ionizándose y fragmentándose de una manera determinada, cada uno podrá ser identificado independientemente. Finalmente, de cada compuesto podemos obtener su composición elemental, la composición cualitativa y cuantitativa en el caso de mezclas complejas, la estructura y composición en el caso de superficies sólidas y las relaciones isotópicas de los átomos en las muestras. (SCAI, 2016)

6.2.3. Resonancia magnética nuclear (RMN)

La resonancia magnética nuclear es una técnica relativamente moderna en comparación con las otras técnicas espectroscópicas. (Elguero e Ibon Alkorta, y otros). Esta consiste en el estudio del comportamiento de ciertos núcleos atómicos en presencia de un campo magnético externo. Cuando se aplica dicho campo magnético provoca efectos electrónicos que darán lugar a desplazamientos químicos y a constantes de acoplamiento, los cuales ofrecen la información suficiente para estudiar la estructura electrónica de la molécula. Es por esto que la intensidad, forma y posición de las señales en el espectro resultante de un determinado núcleo está íntimamente relacionada con su estructura molecular. Gracias a este tipo de resultados se la considera una de las técnicas más eficientes y útiles para el estudio de la estructura y la dinámica de las moléculas en disolución. (Gómez de Enterría, 2016)

6.2.4. Cromatografía en placa fina (TLC)

La cromatografía en capa fina destaca por ser una técnica analítica rápida y sencilla con la que, a grandes rasgos, se puede determinar el grado de pureza de un compuesto, comparar muestras para comprobar si se trata del mismo compuesto de una manera rápida y muy visual o, incluso, realizar el seguimiento de una reacción con el fin de poder señalar cuando desaparecen los reactivos y aparecen los productos finales.

Esta técnica consta de una fase estacionaria y de una fase móvil. La fase estacionaria suele ser una lámina de aluminio recubierta de una fina capa de adsorbente en la que se coloca la muestra en un extremo. Generalmente, los adsorbentes más utilizados son el gel de sílice (SiO_2) y la alúmina (Al_2O_3). En cambio, la fase móvil se conforma por uno o varios disolventes que ascienden por el fenómeno de capilaridad por la capa adsorbente, arrastrando consigo el producto de tal manera que se produce una separación diferencial del mismo. Los disolventes de esta fase móvil se clasifican por su grado de polaridad, destacando como el menos polar el hexano y como el más polar el agua.

En las cromatografías en capa fina se determina el R_f que establece una relación entre el soluto y la fase móvil. Este se calcula como el cociente de la distancia recorrida por el soluto y la distancia recorrida por el disolvente. Cuanto mayor sea este cociente menos polar será el soluto. (Universidad Autónoma de Madrid)

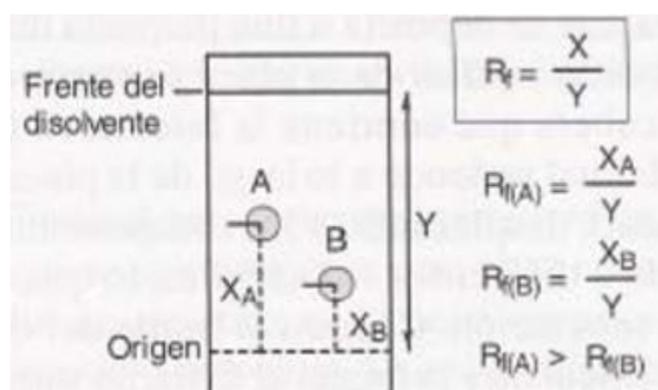


Figura 12.- Cálculo de R_f en cromatografía en capa fina (tomada de: (Universidad Autónoma de Madrid))

6.2.5. Cromatografía en columna de fase reversa (RPC)

La cromatografía de fase reversa (RPC) se diferencia de otros tipos de cromatografía en que su fase estacionaria es menos polar que su fase móvil. Esta técnica de purificación destaca por ser capaz de separar distintos componentes que presenten estructuras químicas muy similares. La fase estacionaria suele componerse de dos tipos de medios, por un lado se basa en una matriz hidrofílica de perlas de sílice cubiertas con una fase hidrofóbica que se unen mediante cadenas de carbono y, por otro lado, se basa en una matriz

de polímeros hidrofóbicos. En cambio, la fase móvil permite disminuir la retención hidrofóbica del soluto mediante la adición de un disolvente orgánico debido a que provoca una disminución de la polaridad de dicha fase y esto atrae al soluto hacia ella. Entre los disolventes más empleados para la fase móvil se encuentran el acetonitrilo y el metanol. (Mayolo-Deloisa, y otros, 2012)

6.3. MATERIAL VEGETAL

El material vegetal para el estudio fue recogido e identificado en julio de 2009 por Pedro L. Pérez de Paz, profesor del departamento de Botánica de La Universidad de La Laguna. Durante la recolección se recogieron 10 kg de material fresco, constituido por sumidades y tallos floridos o próximos a florecer. Estos se encontraron en la localidad de La Culata de Tejeda en Gran Canaria, concretamente en los acantilados sobre la carretera de la zona, a una altura de 1.550 m y con las coordenadas UTM: 441544-3094925. Una parte del material recolectado se almacenó bajo la referencia TFC: 49.191.

6.4. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN

Para la realización de este trabajo, se parte de la fracción HyCs cof 9-11, que contiene 850 mg y fue obtenida de un estudio previo de *Hypericum coadunatum*, disponible con anterioridad en el laboratorio. A partir de esta se lleva a cabo la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos activos biológicamente.

Antes de comenzar el aislamiento de los distintos compuestos que pueda contener la fracción, se realiza una cromatografía en placa fina de la misma para comprobar la viabilidad del aislamiento y purificación de los posibles compuestos polifenólicos contenidos en dicha fracción. Para llevar a cabo la cromatografía usamos un disolvente formado por la mezcla de N-butanol, agua destilada y ácido acético en las proporciones 60%, 25% y 15%, respectivamente. Esta placa se reveló con óleum y mostró la presencia de tres productos de colores anaranjados oscuros, los cuales presentan Rf de 0.36, 0.76 y 0.88.

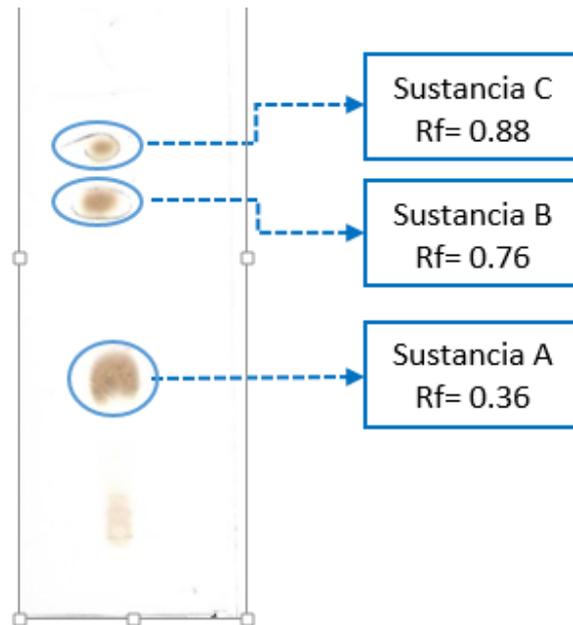


Figura 13.- Cromatografía en placa fina de la fracción HyCs cof 9-11, llevada a cabo con disolvente FICO, revelada con óleum, en la que se representa claramente tres productos con sus respectivos R_f .

Una vez comprobada la presencia de compuestos polifenólicos en la fracción procedemos a realizar la recolecta en pequeñas fracciones del extracto mediante una columna de Fase Reversa, beneficiándonos de su capacidad de permitir un recorrido más rápido a lo largo de la columna a los productos más polares. A medida que se van obteniendo las fracciones se va modificando la polaridad del disolvente para atraer a las moléculas menos polares, logrando así que recorran toda la columna hasta su extracción.

Para llevar a cabo dicha columna, en primer lugar se estabiliza con H_2O . A continuación se procede a colocar la muestra con el disolvente, en este primer momento únicamente es H_2O . Las fracciones se recogen en matraces de 100 ml, salvo las dos primeras que son de 50 ml. Progresivamente, a medida que se van recogiendo las fracciones, el disolvente va siendo modificado con la adición de MeOH de manera ascendente. En la siguiente tabla se representan las fracciones recogidas de la columna, con el disolvente correspondiente.

HyCs cof 9-11		
Fracción	ml por fracción	Disolvente
E1-E2	50 ml	H ₂ O
E3-E5	100 ml	H ₂ O/MeOH 1:0,05
E6-E7	100 ml	H ₂ O/MeOH 1:0,1
E8-E30	100 ml	H ₂ O/MeOH 1:0,05

Figura 14.- Tabla del contenido de las fracciones obtenidas en la columna cromatográfica

Una vez realizada la separación de los productos por polaridades en la columna se procede a realizar varias placas finas con el fin de localizar los compuestos fenólicos entre las distintas fracciones. Para la realización de las mismas usamos el mismo disolvente en todos los casos, el cual está formado por benceno, acetona, metanol y ácido acético, en las siguientes proporciones 60%, 32%, 7,6% y 0,4%, respectivamente.

Al realizar las diferentes placas finas observamos que se pueden diferenciar cuatro compuestos de interés concentrados en las primeras trece fracciones. La revelación de la placa fina se lleva a cabo con ácido fosfomolítico. Estos compuestos se reúnen por separado, obteniendo así las siguientes fracciones a estudiar con su correspondiente peso del contenido y valor de Rf:

- E2-E4 (220,4 mg) (Rf= 0.43 y 0.7)
- E5-E7 (28,9 mg) (Rf= 0.3)
- E8-E10 (46,8 mg) (Rf= 0.62 y 0.72)
- E11-E13 (19,3 mg) (Rf= 0.62)

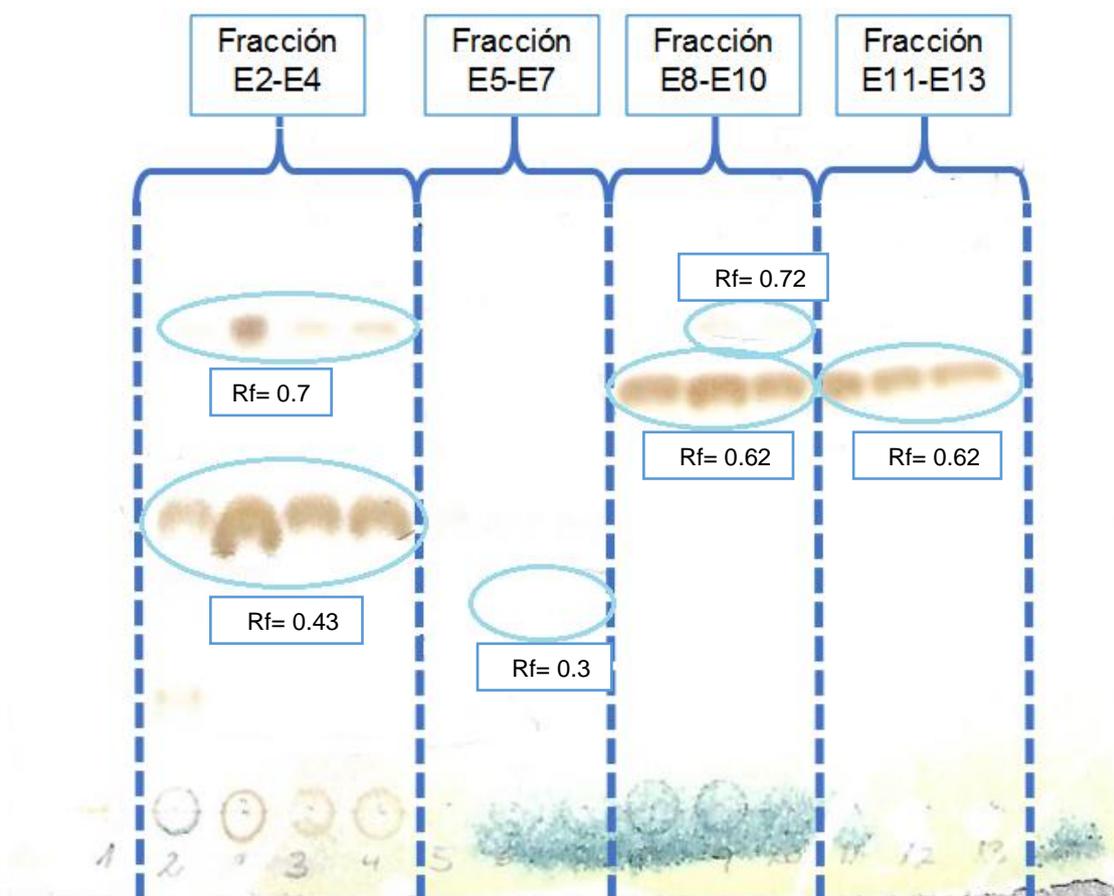
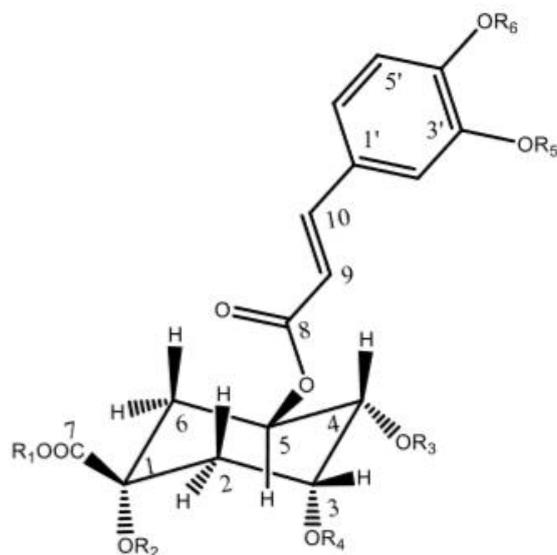


Figura 15.- Cromatografía en placa fina de columna cromatográfica de fase reversa llevada a cabo con disolvente FICO, revelada con ácido fosfomolítico, en la que se representa claramente las cuatro fracciones importantes de la columna en cuestión.

A continuación, estos productos se someten a RMN con el fin de identificar las moléculas. Para ello se disolvió una pequeña cantidad de cada una de las fracciones en acetona deuterada, observando que las fracciones de interés son E2-4 y E11-13, las cuales tratamos a continuación.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



1: $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = H$, ácido clorogénico

1a: $R_1 = H$; $R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = Ac$, ácido clorogénico pentaacetato

2: $R_1 = Me$; $R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = H$, ácido clorogénico metil éster

2a: $R_1 = Me$; $R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = Ac$, ácido clorogénico metil éster pentaacetato

Figura 16.- Estructuras moleculares de los compuestos obtenidos

El compuesto **1**, se aísla como un sólido cristalino blanco de punto de fusión 206-207°C, da positiva la reacción del $FeCl_3$, característica de fenoles y presenta una fórmula molecular $C_{16}H_{18}O_9$, determinada por espectrometría de masas de alta resolución HREIMS, que muestra el pico del ión molecular a m/z 354.0612 $[M]^+$ (14.15%). El espectro de 1H -RMN en acetona deuterada, presenta resonancias δ_H 7.58 y 6.26 ppm (cada uno 1H, d, $J = 16$ Hz), debidas a protones olefínicos en disposición *trans*, correlacionados con los carbonos δ_C 145.8 y 116.0 ppm, respectivamente. Las señales de protones aromáticos a δ_H 7.14, (1H, d, $J = 2.0$ Hz, δ_C 115.3; δ_H 7.02, 1H, dd, $J = 8.0$ y 2.0 Hz, δ_C 122.6 y a δ_H 6.85 1H, d, $J = 8.0$ Hz, δ_C 116.5) son características de un anillo bencénico 1, 2, 4-trisustituido. Las correlaciones observadas en el experimento HMBC entre los protones aromáticos a δ_H 7.14 y 7.02 ppm, H'-2 y H'-6, respectivamente y el carbono C'-10 a $\delta_C = 145.8$ ppm y entre H'-10 a δ_H 7.58 y el carbono carbonílico a δ_C 167.3 ppm, nos permite establecer la presencia del ácido cafeico en la molécula.

Los experimentos bidimensionales, COSY, HMBC, HSQC y ROESY, de las señales observadas en la región central del espectro nos permitieron identificar todos los sistemas de spin.

Los experimentos bidimensionales COSY y HSQC nos permitieron determinar los sistemas de spin H₂-2H (δ_{H} 2.15 (1H, dd, J = 14.5 y 3.1 Hz y δ_{H} 2.12, 1H ddd 14.5, 3.9, 3.1 Hz)/ δ_{C} 38.0); H-3 (δ_{H} 4.23/ δ_{C} 71.7); H-4 (δ_{H} 3.77, 1H dd, J = 9.1, 3.0)/ δ_{C} 76.6); H-5 (δ_{H} 5.37 ddd J = 10.5, 9.1, 4.7Hz/ δ_{C} 71.5) y H-6 (δ_{H} 2.23m ddd J = 13.5, 4.7, 2.5; 2.01 dd J = 13.0, 10.7/ δ_{C} 39.3). La señal de C-1 (δ_{C} 76.3) enlazado con el carbono carbonílico a (δ_{C} 175.2) y un grupo hidroxilo completan el anillo ciclohexánico tetraoxigenado [δ_{C} 71.7 (C-3); 71.5 (C-5); 76.6 (C-4); 76.3 (C-1)] típico del ácido quínico. El grupo caffeoil fue localizado en posición C-5, en base a la correlación observada en el experimento HMBC entre H-5 y C-8 a δ_{C} 167.3 ppm. Así nuestro compuesto **1** fue identificado como **5-caffeoilquinic acid** también conocido como **ácido clorogénico**.

La acetilación del compuesto **1** con anhídrido acético en piridina rinde el pentaacetato (compuesto **1a**) con una fórmula molecular C₂₆H₂₈O₁₄ cuyo espectro ¹H-RMN muestra las típicas señales de cinco grupos acetato, dos situados sobre carbonos aromáticos a δ_{H} 2.29 y 2.28 ppm (cada uno 3H, singulete) y tres sobre carbonos alifáticos a δ_{H} 2.12, 2.07 y 1.99 ppm (3H cada uno, singulete). Los desplazamientos paramagnéticos de los protones geminales a los grupos acetato está de acuerdo con la acetilación del compuesto **1**, confirmando así la estructura propuesta para el ácido clorogénico.

El compuesto **2** de fórmula molecular C₁₇H₂₀O₉, presenta unos datos espectrales muy similares a los del compuesto **1**, diferenciándose principalmente por la presencia en su espectro de ¹H-RMN de un singulete de intensidad tres protones a δ_{H} 3.71, δ_{C} 52.6 ppm, atribuible a un grupo metoxilo. La localización del metilo fue determinada por la correlación observada en el experimento HMBC entre los protones de dicho grupo y el carbono carbonílico a δ_{C} 175.5 ppm. Igualmente el grupo caffeoil, fue localizado en la posición C-5 del ácido quínico, en base a la correlación observada ente H-5 a δ_{H} 6.09 (1H, td, J = 7.8, 3.8 Hz), HSQC a δ_{C} 72.9 ppm y el carbono carbonílico del caffeoil a δ_{C} 167.4 ppm, así la estructura del compuesto **2** fue establecida como **ácido clorogénico metil éster**.

Con la finalidad de confirmar la estructura propuesta, una alícuota del compuesto **2** fue acetilada con anhídrido acético en piridina, rindiendo el ácido pentaacetilmetil-clorogénico (compuesto **2a**) con una fórmula molecular $C_{27}H_{30}O_{14}$ y un espectro de 1H -RMN donde se observan claramente la presencia de cinco grupos acetilo a δ_H 2.30, 2.29, 2.13, 2.07 y 1.99 ppm (cada uno 3H, singulete).

8. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Indudablemente, los principios activos o los metabolitos secundarios que presentan las plantas son de vital importancia para la ciencia ya que nos permiten mejorar nuestra calidad de vida. Entre esos metabolitos secundarios destacamos el ácido cafeico y el ácido clorogénico, este último derivado del primero, los cuales han resaltado por la amplia y variada actividad biológica que presentan. De las propiedades beneficiosas que presentan estos compuestos podemos destacar que son antioxidantes, antibacterianos, antivirales, anticarcinogénicos, antitumorales, hepatoprotectores y antiinflamatorios, entre otras. (Dueñas, y otros, 2009)

Entre muchos de los estudios en los que los polifenoles han sido los protagonistas destacamos uno de ellos en el que se confirma que el café es beneficioso para la salud. Este reduce el riesgo de una de las enfermedades más comunes entre la población, el síndrome metabólico, que se define como una combinación de factores que aumentan el riesgo de enfermedades cardiovasculares y diabetes, especialmente la diabetes mellitus de tipo 2 (T2DM). Entre los factores se encuentran la hipertensión arterial, la obesidad central, la glucosa plasmática elevada en ayunas y reducción de los niveles de colesterol HDL.

El café se caracteriza por presentar abundancia de ácidos clorogénicos, de los cuales el 98% de ellos están conformados por ésteres del ácido quínico y de los ácido cafeico o ácido ferúlico, teniendo como resultado los ácidos cafeoilquínicos (CQA), los ácidos dicaicoilquínicos (diCQA) y los ácidos feruloilquínicos (FQA), respectivamente. De estos el predominante es el ácido 5-cafoleoilquínico (5-CQA) ya que constituye hasta el 60% del total.

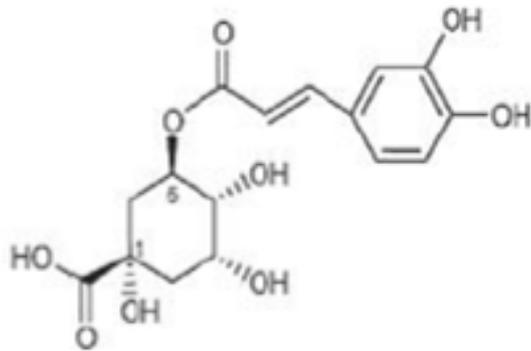


Figura 17.- Estructura química de ácido 5-cafoleoilquinico (5-CQA)
(tomada de: (Tunncliffe, y otros, 2014))

Durante el presente estudio se trató de identificar la zona del organismo en la que se absorben los ácidos clorogénicos y se llegó a la conclusión de que el lugar principal de absorción es el colon. Esta región del organismo se caracteriza por una amplia actividad digestiva por parte de la microbiota intestinal que se encarga de hidrolizar las moléculas de ácido clorogénico que llegan a esta región de la primera parte del tracto digestivo sin ser absorbidas. Además, en los extractos fecales se comprobó que contienen la enzima esterasa, necesaria para la hidrólisis de los ésteres del ácido ferúlico, dato que corrobora la afirmación de que el colon es el principal lugar de absorción del ácido clorogénico.

Una vez que se han hidrolizado en el colon, son absorbidos en el mismo y así es como se encuentran grandes cantidades de los metabolitos del ácido clorogénico en el plasma sanguíneo de los pacientes. De igual manera, también se encuentra, en menor cantidad, ácido clorogénico que ha sido absorbido antes de llegar al colon. Es así como el ácido clorogénico y sus metabolitos tienen efectos fisiológicos en el organismo ya que circulan por el torrente sanguíneo.

Tal y como se comentó, los ácidos clorogénicos son beneficiosos para la salud porque reducen el riesgo de padecer T2DM. Esto se debe a que el hígado desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre porque en él actúa la enzima glucosa-6-fosfatasa, encargada de convertir la glucosa-6-fosfato en glucosa, molécula que se libera al torrente sanguíneo. En este caso, los CGA actúan como inhibidores de la enzima

glucosa-6-fosfatasa, impidiendo así la liberación de glucosa al torrente sanguíneo por parte del hígado.

Cabe destacar que el Svetol, un extracto natural del café verde, presenta un alto contenido de CGA, casi un 50% del total, del cual, un tercio está compuesto por 5-CQA. Este extracto inhibe la enzima glucosa-6-fosfatasa que actúa en el hígado y, además favorece la pérdida de peso de los sujetos.

Con los datos que se obtuvieron de los distintos experimentos que se llevaron a cabo a lo largo de esta investigación, Bassoli y sus colaboradores confirmaron que los CGA tienen la capacidad de reducir significativamente la producción de glucosa en el hígado, lo que beneficia a aquellos pacientes que presenten T2DM, ya que se espera que esta reducción por el consumo de CGA retrase la aparición de los distintos estados de la enfermedad metabólica. (Tunncliffe, y otros, 2014)

9. CONCLUSIONES

Tal y como se ha comentado en todos los estudios que se han llevado a cabo sobre la molécula del ácido clorogénico, esta presenta grandes propiedades beneficiosas para la salud humana. Cabe destacar que la incorporación de la misma a nuestra dieta alimenticia habitual producirá beneficios referentes a algunas de las enfermedades que nos acortan la vida hoy en día.

Además, tras la realización de los experimentos podemos afirmar que tenemos una gran fuente de ácido clorogénico en nuestras islas, las Islas Canarias, ya que contamos con la presencia de varias especies vegetales del género *Hypericum*, característico por su contenido en dicha molécula.

Este no es un trabajo que finalizará aquí porque aún quedan muchas propiedades del ácido clorogénico por investigar y descubrir.

10. CONCLUSION

As it has been commented in all the studies about the molecule of chlorogenic acid, it has beneficial properties for the human health. Worth noting that the incorporation of it to our usual food diet will generate benefits relating to some of the diseases that shorten our life nowadays.

Also, after the experiments that were executed, we can affirm that we have a very good source of chlorogenic acid in our islands, the Canary Islands, thanks to the fact that we count with the presence of several vegetal species of the *Hypericum* genus, characterized by its content in that molecule.

This is not an assignment that will end here because there are a lot of properties of the chlorogenic acid that are yet to be research and discover.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Arechavaleta, M. , y otros. 2009.** *Lista de especies silvestres de Canarias. Hongos, plantas y animales terrestres. 2009.* Canarias : Gobierno de Canarias, 2009. pág. 142.
- Avendaño, Carmen. 2011.** Avances en química terapéutica. [En línea] 2011. [Citado el: 19 de Abril de 2018.] <http://www.revistaeidon.es/archivo/el-ano-de-la-quimica/plataforma-dedebate/117849-avances-en-quimica-terapeutica>.
- Azcón-Bieto, Joaquín y Talón, Manuel. 2008.** *Fundamentos de Fisiología Vegetal.* 2ª edición. Barcelona : McGraw Hill Education , 2008. pág. 324.
- Bramwell, David y Bramwell, Zoë. 2001.** *Flores Silvestres de las Islas Canarias.* 4ª. s.l. : Rueda, 2001. págs. 219-221.
- Carrera Aguado, Nora. 2016.** Laboratorio de Técnicas Instrumentales UVA. *Espectrometría de masas.* [En línea] 2016. [Citado el: 24 de Mayo de 2018.] <http://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/espectrometra-de-masas>.
- Cruz, Jorge. 2008.** ``Hipérico´´, Revista Bien Me Sabe nº 731. [En línea] 06 de Julio de 2008. [Citado el: 24 de Mayo de 2018.] <https://www.bienmesabe.org/noticia/2008/Julio/hiperico>.
- Dueñas, J., Naranjo, B. y Araujo, P. 2009.** Extracción y caracterización de principios activos de estructura fenólica con propiedades antioxidantes y antibacterianas, a partir de residuos del procesamiento de alcachofas. [En línea] 2009. [Citado el: 19 de Abril de 2020.] https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/34240263/alcachofa.pdf?1405767574=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3Delementos_activos_de_la_alcachofa.pdf&Expires=1596172835&Signature=IQ87ORzPoFWMoN1MyL~locXDydKAm5QR1s-07BfVCoQAJvXjWWbjRXICVSmtCez7d.

Elguero e Ibon Alkorta, José, y otros. Instituto de Química Médica. *Resonancia magnética nuclear de protón: aplicaciones en química orgánica*. [En línea] [Citado el: 24 de Mayo de 2018.] http://are.iqm.csic.es/cursos/rmn_parte1.pdf.

Gómez de Enterría, Ana Moral. 2016. Laboratorio de Técnicas Instrumentales UVA. *Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear*. [En línea] 2016. [Citado el: 24 de Mayo de 2018.] <http://laboratorioteccnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/espectroscopia-de-resonancia-magnética-nuclear>.

Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo". 2007. Flora Exclusiva de Gran Canaria en Peligro. Top 50. [En línea] 2007. [Citado el: 24 de Mayo de 2018.] http://www.jardincanario.org/buscador?p_p_id=3&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_pos=2&p_p_col_count=3&_3_struts_action=%2Fsearch%2Fsearch&_3_redirect=%2Fweb%2Fjardincanario%2Fforo&_3_keywords=hypericum.

Martín Gordo, Dario Alonso. 2018. Los compuestos fenólicos: un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. [En línea] 2018. [Citado el: 19 de Abril de 2019.] <https://doi.org/10.22490/21456453.1968>.

Mayolo-Deloisa, K., Martínez, L.M. y Rito-Palomares, M. . 2012. Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y replegamiento de proteínas. [En línea] diciembre de 2012. [Citado el: 9 de Junio de 2018.] http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382012000300006. 11.

MedlinePlus. 2019. Café verde. *MedlinePlus, Información de salud para usted*. [En línea] Natural Medicines, 29 de Marzo de 2019. [Citado el: 28 de Junio de 2019.] <https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/natural/1264.html>.

Pérez de Paz, Pedro. 1999. *Plantas medicinales o útiles en la flora canaria*. San Cristóbal de La Laguna : F. Lemus, 1999. pág. 115.

Pérez, Guillermo. 2018. Espectrometría.com. *Espectrometría infrarroja*. [En línea] Mayo de 2018. [Citado el: 11 de Abril de 2019.] https://www.espectrometria.com/espectrometra_infrarroja.

Porras, A. P. y López, A. 2009. Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. [En línea] 2009. [Citado el: 25 de Agosto de 2018.] [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Porras-Loaiza-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Porras-Loaiza-et-al-2009.pdf).

Quiñones, M., M., Miguel y A., Alexandre. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. [En línea] Enero de 2012. [Citado el: 26 de Febrero de 2019.] http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112012000100009.

Sánchez de Lorenzo-Cáceres, José Manuel. Arbolesornamentales.es. [En línea] [Citado el: 19 de Abril de 2018.] <http://www.arbolesornamentales.es/Clusiaceae.htm>.

SCAI. 2016. SCAI-Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación, Universidad de Málaga. *Espectrometría de Masas*. [En línea] 2016. [Citado el: 31 de Mayo de 2018.] <http://www.scai.uma.es/areas/aqcm/ems/ems.html>.

Skoog, Douglas A., y otros. 2010. *Fundamentos de Química Analítica*. Octava edición. México : Cengage Learning, 2010. págs. 822-829.

Taiz, Lincoln y Zeiger, Eduardo. 2006. *Fisiología Vegetal*. 3ª edición. Castelló de la Plana : Universitat Jaume I, 2006. págs. 533-550. Vol. Volumen 1.

Tunncliffe, Jasmine M., Cowan, Theresa y Shearer, Jane. 2014. Chlorogenic Acid in Whole Body and Tissue-Specific Glucosa Regulation. [En línea] 2014. [Citado el: 2 de Junio de 2020.] <https://ebookcentral-proquest-com.accedys2.bbtck.ull.es/lib/bull-ebooks/reader.action?docID=1826804&ppg=10.777-785>.

Universidad Autónoma de Madrid. Fundamentos de Cromatografía en placa fina. [En línea] [Citado el: 29 de Mayo de 2020.] <http://www.qfa.uam.es/qb/practicas/P6-guion.pdf>.

Universidad de Sevilla. *RODAS (Repositorio de objetos de aprendizaje de la Universidad de Sevilla)*. [En línea] [Citado el: 21 de Mayo de 2018.] [https://rodas5.us.es/file/02a90f92-0df3-8d50-ceff7039d3b8eb3f/2/cap_1_biomoleculas_i_SCORM.zip/pa ge_01.htm](https://rodas5.us.es/file/02a90f92-0df3-8d50-ceff7039d3b8eb3f/2/cap_1_biomoleculas_i_SCORM.zip/pa%20ge_01.htm).

Universidad del País Vasco. 2006. Técnicas - Espectroscopía Infrarroja. *Universidad del País Vasco*. [En línea] Universidad del País Vasco, 2006. [Citado el: 9 de Junio de 2018.] <http://www.ehu.eus/imacris/PIE06/web/IR.htm>.

Varela González, Francisco. 2017. Ácido clorogénico para adelgazar. *Revista Online AEDN: Nutrición, Dietas, Salud y Deportes*. [En línea] 2017. [Citado el: 2 de Octubre de 2018.] <https://www.aedn.es/acido-clorogenico/>.

12. ANEXO: GALERÍA DE ESPECTROS

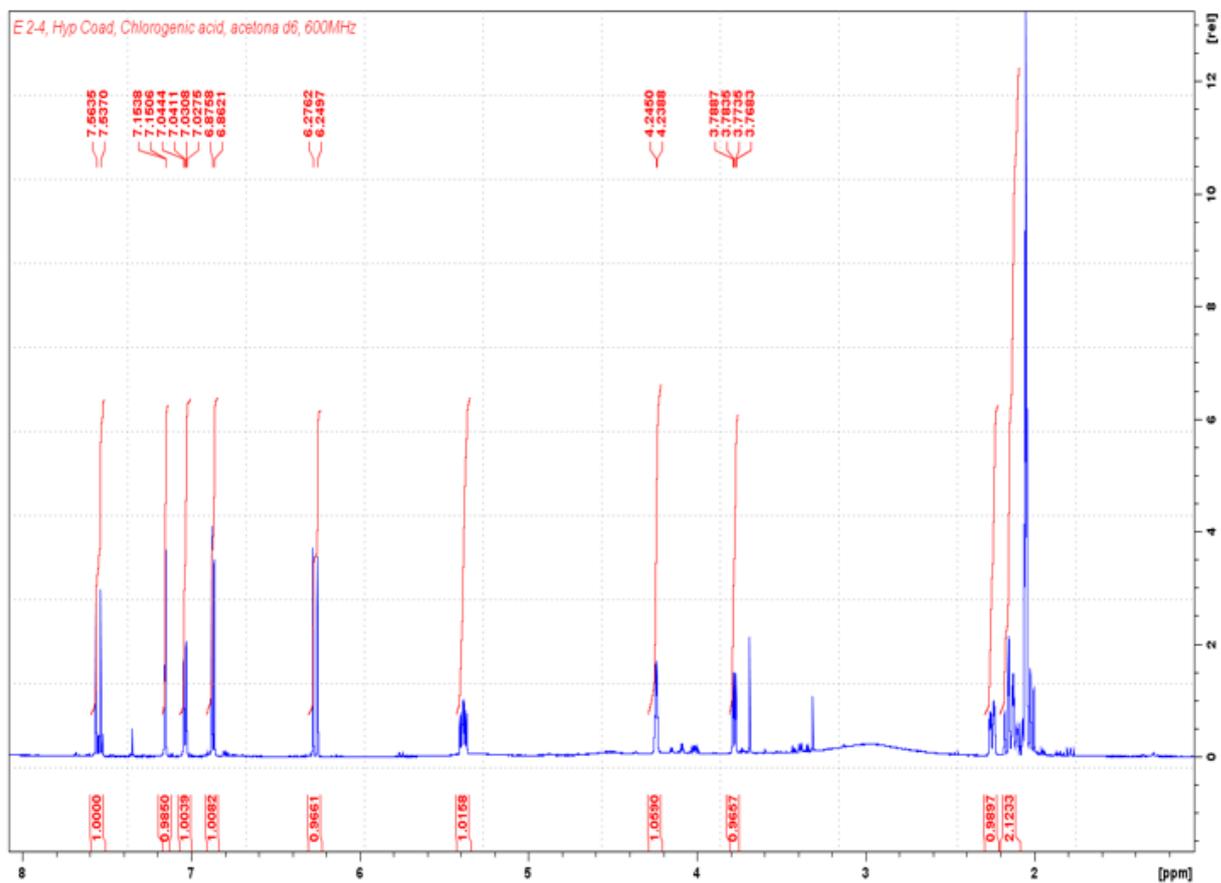


Figura 18.- Espectro de ^1H -RMN

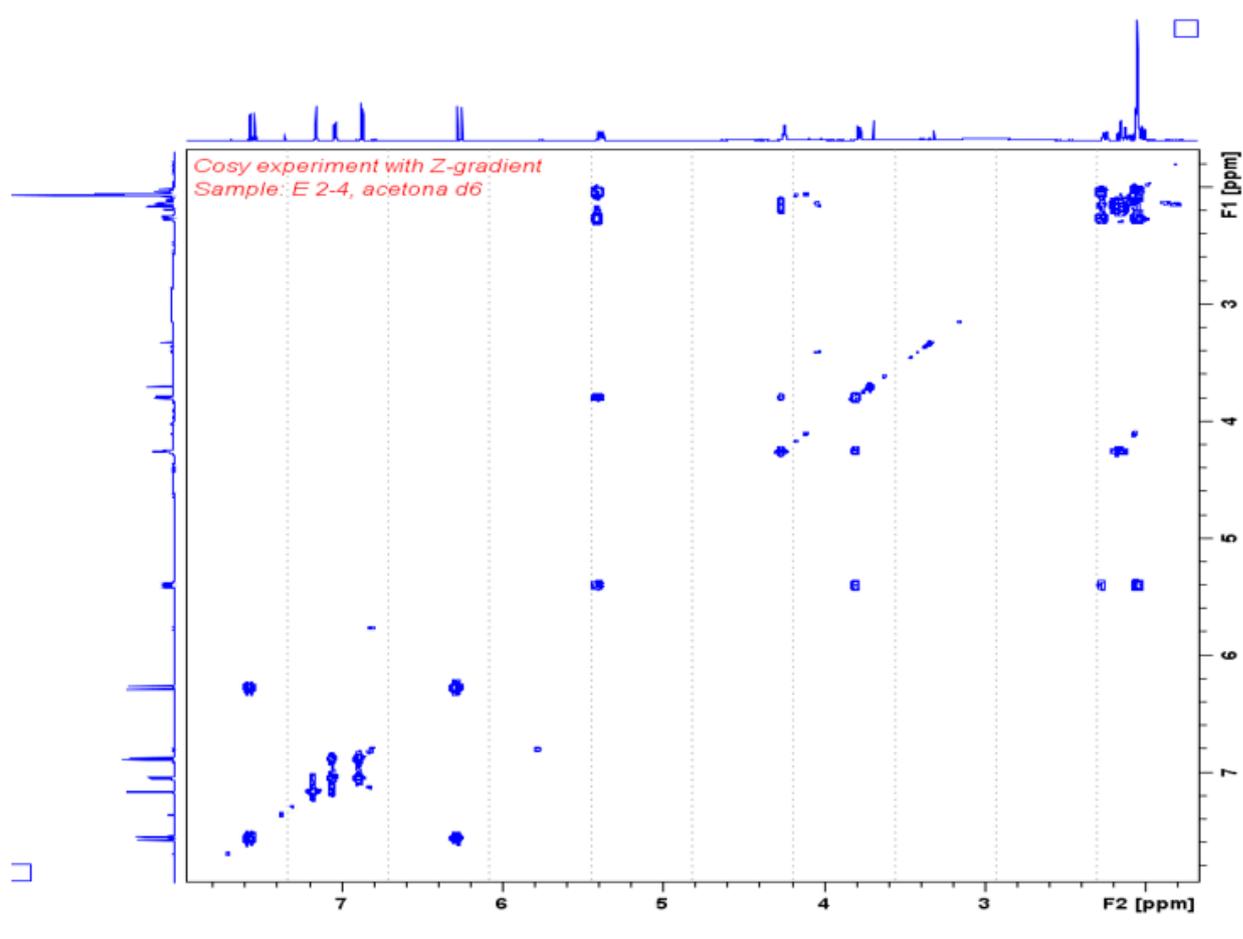


Figura 19.- Espectro de COSY

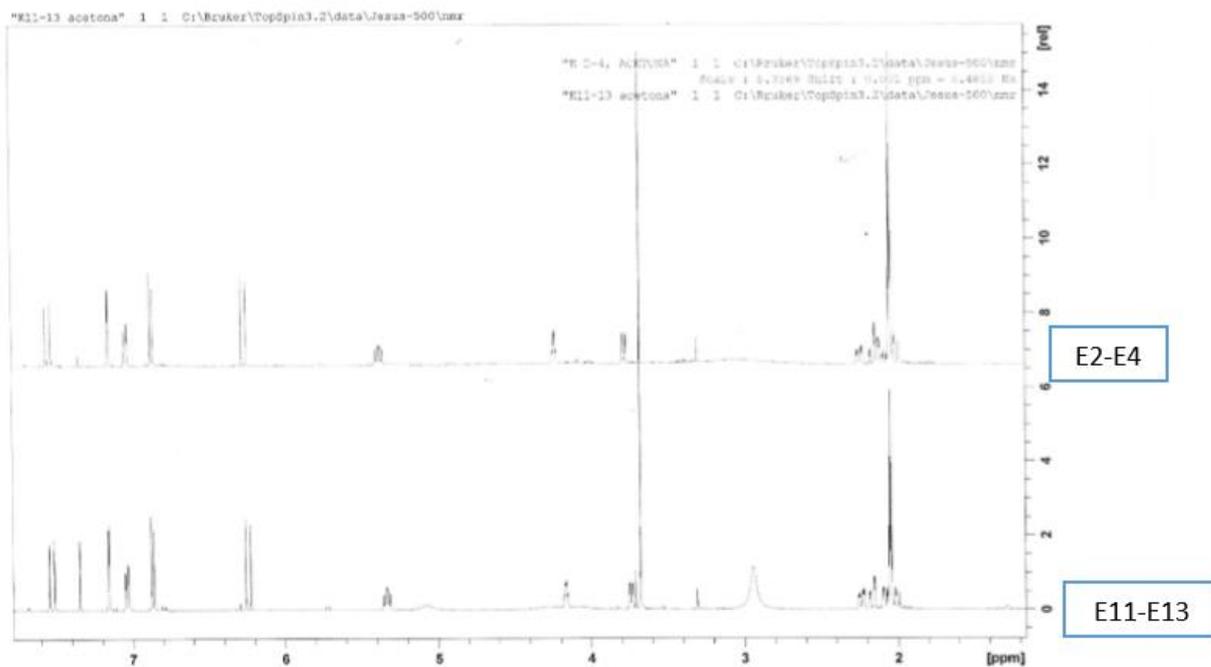


Figura 20.- Espectro de ¹H-RMN comparativo entre las fracciones E2-4 y E11-13