

TRABAJO FIN DE GRADO

UNIVERSIDAD DE ALMERIA

Facultad de Ciencias Experimentales

IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS
EN *POSIDONIA OCEANICA* MEDIANTE
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS ACOPLADA A
ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA
RESOLUCIÓN/

IDENTIFICATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN
POSIDONIA OCEANICA BY LIQUID
CHROMATOGRAPHY COUPLED TO HIGH
RESOLUTION MASS SPECTROMETRY

Convocatoria: Septiembre de 2021

Autor: Fernando Céspedes Návagos

Director: Pedro Aguilera Aguilera
Co-directora: Irene Domínguez Pérez

AGRADECIMIENTOS

Mi primera dedicatoria, como no debía ser de otra manera, va dirigida a mi familia, que sin su abnegado apoyo este trabajo jamás hubiera sido posible. De nada sirve llegar si no lo compartes con los que amas, gracias por estar ahí siempre.

Mi segunda dedicatoria en un plano más académico agradecer a mi director Pedro Aguilera Aguilera por la confianza vertida al ofrecerme un trabajo enfocado a mis intereses.

A mi codirectora Irene Domínguez Pérez mi gratitud por el tiempo y el esfuerzo empleado para que, a pesar de las dificultades que atravesamos, pudiera realizar los análisis y aprender un método tan complejo e innovador.

Y finalmente y no por ello menos importante a una persona imprescindible durante este proceso de aprendizaje la doctoranda Marina Astudillo. Su buen hacer y profesionalidad además de todo su trabajo previo han permitido que pueda seguir sus pasos y desarrollar este trabajo final de grado.

MEMORIA

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	1
3. INTRODUCCIÓN.....	2
3.1. <i>POSIDONIA OCEANICA</i>	2
3.1.1. <i>P. OCEANICA</i> COMO BIOINDICADOR.....	3
3.2. COMPUESTOS FENÓLICOS	4
3.2.1 COMPUESTOS FENÓLICOS IDENTIFICADOS EN ANGIOSPERMAS MARINAS.....	9
3.2.2. COMPUESTOS FENÓLICOS EN <i>P. OCEANICA</i>	10
3.3. METODOLOGÍA ANALÍTICA	11
3.3.1 MÉTODO DE EXTRACCIÓN.....	11
3.3.2. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS.....	12
3.3.3. ESPECTROMETRÍA DE MASAS	13
3.3.4. ANALIZADOR	13
4.OBJETIVOS	14
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
5.1. ÁREA DE ESTUDIO. MUESTREO	14
5.2. PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA.....	16
5.3. REACTIVOS Y DISOLVENTES.....	16
5.4. MÉTODO DE EXTRACCIÓN.....	16
5.5. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.....	16
5.6. CONDICIONES ESPECTROMÉTRICAS.....	17
6. RESULTADOS.....	17
7. DISCUSIÓN.....	23
8. CONCLUSIONES.....	26
9. BIBLIOGRAFÍA.....	27
10. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	33
11. ANEXOS.....	35

1. RESUMEN

Las praderas de *Posidonia oceanica* (*P. oceanica*) constituyen un hábitat prioritario protegido por la legislación europea de conservación, de gran importancia ecológica y que proporciona multitud de servicios ecosistémicos.

En el presente estudio, se realizó un muestreo de hojas de *P. oceanica* en la zona de la Algaida (Almería) a 3 distancias diferentes de la costa para estimar la posible influencia del estrés costero en su composición fenólica. El análisis de las muestras se llevó a cabo mediante cromatografía de líquidos de ultra alta eficacia acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC-HRMS). El empleo del analizador Exactive Q Orbitrap permitió la identificación tentativa, con un error de masa inferior a 5 ppm, de 26 compuestos fenólicos 14 de los cuales no se habían reportado anteriormente en *P. oceanica*. Entre los que se encuentran compuestos pertenecientes a la familia de las curcuminas, de los ácidos hidroxicinámicos y de los flavonoides y dentro de esta última a las siguientes subfamilias: flavonoles, flavanonas, isoflavonas, flavanoles y chalconas.

Se observó que los valores de área obtenidos en el caso de los ácidos hidroxicinámicos eran superiores en la muestras más cercanas a costa, pudiendo ser bioindicador de estrés de origen costero de posible influencia humana. Esta nueva información genera un avance en la evaluación y desarrollo de nuevos biomarcadores de estrés costero en el Mediterráneo. Al mismo tiempo la metodología analítica propuesta puede servir como protocolo en el estudio de compuestos fenólicos en angiospermas marinas.

Palabras clave: *Posidonia oceanica*; compuestos fenólicos; UHPLC-Orbitrap MS; estrés costero; Mediterráneo

2. ABSTRACT

Posidonia oceanica (*P. oceanica*) meadows are a priority habitat protected by European conservation legislation, of great ecological importance and providing a multitude of ecosystem services.

In the present study, a sampling of *P. oceanica* leaves was carried out in the area of La Algaida (Almeria) at 3 different distances from the coast to estimate the possible influence of coastal stress on their phenolic composition. The analysis of the samples was carried out by ultra-high performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS). The use of the Exactive Q Orbitrap analyzer allowed for the tentative identification, with an mass error less than 5 ppm, of 26 phenolic compounds, 14 of which had not been previously reported in *P. oceanica*. These include compounds belonging to the families of curcumin, hydroxycinnamic acids and flavonoids, and within the latter, the following subfamilies: flavonols, flavanones, isoflavones, flavanols and chalcones.

It was observed that the area values obtained for hydroxycinnamic acids were higher in samples closer to the coast, which could be a bioindicator of coastal stress as result of human influence.

This new information generates an advance in the evaluation and development of new biomarkers of coastal stress in the Mediterranean. At the same time, the proposed analytical methodology can serve as an optimal procedure for the monitoring of phenolic compounds in marine angiosperms.

Keywords: *Posidonia oceanica*, compounds, UHPLC-Orbitrap MS, stress, coast, Mediterranean.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. *POSIDONIA OCEANICA*

Posidonia oceanica Delile (*P. oceanica*) es una fanerógama marina endémica del mar Mediterráneo. La Directiva Hábitats de la Unión Europea (Directiva 92/43 CEE), considera las praderas marinas de *P. oceanica* como hábitat prioritario, hábitat 1120. Es una especie clímax de crecimiento muy lento (Ruipérez et al., 2012) quedando definido el concepto clímax como: “Estado estable o maduro de una sucesión de comunidades biológicas, cuando las especies dominantes están completamente adaptadas a las condiciones ambientales” (Luque y Templado, 2004). Vive en aguas entre 10-28 °C, con buena oxigenación, sin contaminación, transparentes, con un hidrodinamismo débil y sin grandes variaciones de salinidad (Ruipérez et al., 2012). Es una especie de aguas someras, pero puede llegar a alcanzar los 40-50 metros de profundidad en zonas de aguas más transparentes, coincidiendo con el límite inferior del piso bentónico infralitoral (García Raso et al., 1992). Se desarrolla en sustratos rocosos cuando las corrientes son mayores y también en sustratos arenosos, pero nunca en fango. Requiere que el sustrato este limpio y que permita una buena oxigenación además de poseer poca materia orgánica lábil. Se estima que ocupa el 25% del fondo somero Mediterráneo, entre 2.5 y 4.5 millones de hectáreas (Pasqualini, Pergent-Martini, Clabaut y Pergent, 1998) de los que 2.800 km² pertenecen a España (Mas, Franco y Barcala, 1993). Respecto a su distribución en las costas andaluzas, aproximadamente el 90% se encuentran en la provincia de Almería.

P. oceanica presenta tallo, hojas, raíz y rizomas. (Figura 1). El rizoma es un órgano lignificado y subterráneo que está interconectado con las raíces, aporta sostén y almacena nutrientes. Están fuertemente lignificados y de ellos parten verticalmente haces de 5 a 8 hojas envueltos en brácteas. Este haz constituye la unidad anatómica o vástago.

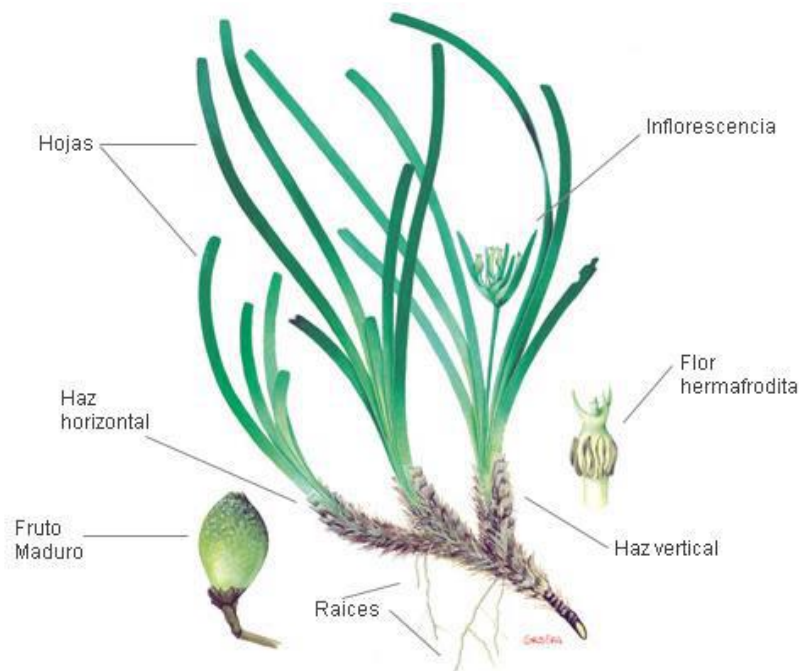


Figura 1. *P. oceanica*. Fuente: Juntadeandalucia.es (2021)

Mantiene una importante producción primaria en el sistema litoral, debido a la gran extensión de las praderas de *P. oceanica* junto a su continua producción de hojas. La gran cantidad de sustancias difícilmente metabolizables por los fitófagos determina que la producción primaria se transfiera en su mayoría a detritívoros y descomponedores.

Las praderas de *P. oceanica* suministran servicios ecosistémicos de gran importancia para el bienestar humano. Entre los principales servicios, se pueden destacar:

- Control de la erosión costera, formando un resto vegetal, arribazón, (Roig i Munar, 2001) que reduce la energía del oleaje y estabiliza los sedimentos costeros (Gómez-Pujol, Orfila, Álvarez-Ellacuría, Terrados and Tintor, 2013). La cuenca Mediterránea posee suelos muy erosionables que son fijados por las praderas de *P. oceanica*, estabilizando los sedimentos que las lluvias torrenciales arrastran cayendo a través de sus hojas al entramado de rizomas que los fijan (Tigny, Ozer, De Falco, Baroli and Djenidit, 2007).
- Control climático: un estudio sobre su contribución contra el cambio climático estima que las praderas de *P. oceanica* de Andalucía secuestran anualmente 31.531 toneladas de CO₂ y contienen un stock de carbono orgánico estimado en 24.730.185 toneladas de CO₂ (Díaz Almela, 2012). Según la cotización en el mercado de carbono europeo esta cantidad de CO₂ que secuestran, supondrían un valor anual de *P. oceanica* de 4'6 euros/m², es decir 25 veces más que los bosques tropicales (Díaz Almela, 2012).
- Hábitat para especies.: *P. oceanica* es considerada un punto de acceso costero a la biodiversidad (Myers, Mittermeier, Mittermeier, da Fonseca and Kent, 2000). Es un hábitat con alta biodiversidad, que sirve de refugio a múltiples especies. De hecho, las praderas de *P. oceanica* son el hábitat de más de 400 especies vegetales y 1000 animales (Bell and Harmelin-Vivien, 1982; Bellan-Santini, Lacaze et Poizat, 1994; Boudouresque et Meinesz, 1982; Boudouresque, 2004; Boudouresque et al., 2006; Boudouresque et al., 2012; Francour, Poulain, Bernard, Bonhomme et Charbonnel, 1997; Luque y Templado, 2004). El máximo de biodiversidad se encuentra entre los 5 y los 15 metros de profundidad (Díaz Almela y Marbà, 2009; Luque y Templado, 2004).
- Productor de biomasa: Las praderas de *P. oceanica* producen una media de 38 toneladas de biomasa en peso seco por hectárea, conformando el mayor productor de biomasa de todo el Mediterráneo. (Boudouresque, Meisnesz, Ledoyer et Vitiello, 1994).

A pesar de la importancia de *P. oceanica*, incluso para la mitigación del cambio climático (Duarte, Losada, Hendriks, Mazarra and Marbà, 2013) las praderas están sufriendo pérdidas de hábitat en todo el mar Mediterráneo. Estas pérdidas son causadas por sinergias de estresores multifactoriales, cuyo principal origen es de carácter antropogénico (Bonacorsi, Pergent-Martini, Breand and Pergent, 2013; Ceccherelli, et al., 2018; Micheli, et al., 2005).

3.1.1. POSIDONIA OCEANICA COMO BIOINDICADOR

Entre las distintas especies vegetales del Mediterráneo, *P. oceanica* es una de las especies más estudiadas desde el punto de vista fitoquímico (Zidorn, 2016). *P. oceanica* es un óptimo bioindicador de la calidad de las aguas (Pergent-Martini et al., 2005) y de la contaminación presente en las mismas a lo largo del tiempo debido a su carácter estenoico, por poseer un

largo ciclo vital, por extenderse por todo el Mediterráneo y por concentrar contaminantes en sus tejidos a distinto nivel temporal (Ruipérez et al., 2012). La Directiva marco sobre estrategia marina (2008/56/CE) ha determinado a *P. oceanica* como especie representativa de la calidad de las angiospermas en el medio marino del Mediterráneo.

P. oceanica es especialmente sensible a la influencia antropogénica (Boudouresque, Bernard, Pergent, Shili y Verlaque, 2009; Ruiz y Romero, 2003). Se han detectado alteraciones en la cantidad de compuestos fenólicos en *P. oceanica* como respuesta al estrés natural y antropogénico (Cannac, Ferrat, Pergent-Martini, Pergent y Pasqualini, 2006) tanto de carácter biótico como abiótico, debido a su carácter bioactivo frente a las presiones medioambientales. (Croteau, Kutchan and Lewis, 2000). Los compuestos fenólicos poseen diversas funciones como la defensa contra depredadores, patógenos, especies no autóctonas (Agostini, Desjobert and Pergent, 1998). La importancia de la detección de compuestos fenólicos en *P. oceanica* radica en su empleo como bioindicador de alerta temprana de factores estresantes de las costas Mediterráneas debido a que antes de que se produzca el daño, *P. oceanica*, activa mecanismos de autoprotección produciendo compuestos fenólicos (Boumaza, Boudefoua, Boumaza and Semroud, 2014; Migliore, Rotini, Randazzo, Albanese and Giallongo, 2007).

3.2. COMPUESTOS FENÓLICOS

Su estructura básica la conforma el fenol. (Figura 2) Se conocen más de 8.000 compuestos fenólicos en las plantas (de la Rosa, Moreno-Escamilla, Rodrigo-García and Alvarez-Parrilla, 2019), los cuales, poseen al menos un anillo fenólico con un grupo hidroxilo en su estructura. Los polifenoles son moléculas que presenta al menos dos anillos fenólicos y un grupo hidroxilo en su estructura.

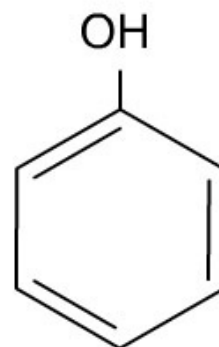


Figura 2. Estructura fenol

Los compuestos fenólicos presentan como propiedad más destacable su capacidad antioxidante, la cual aumenta con la distancia entre el fenol y el grupo carboxílico y con el número de grupos carboxílicos (Dziedzic and Hudson, 1984). Los compuestos fenólicos, a su vez, pueden actuar como quelantes y formar complejos con metales como hierro y aluminio (Creus, 2004).

Los compuestos fenólicos se encuentran de forma natural en las plantas, siendo el principal producto del metabolismo secundario de las mismas, resultando esenciales en su crecimiento (Santamaría, 2017). La biosíntesis de los compuestos fenólicos se produce mediante dos rutas primarias: la ruta del ácido siquímico y la ruta de los poliacetatos (Bravo, 1998). Los compuestos fenólicos pueden clasificarse de varias maneras, atendiendo a su estructura química los clasificamos de la siguiente manera (de la Rosa et al., 2019; Manach, Scalbert, Morand, Remesy and Jimenez, 2004; Peñarrieta, Tejada, Mollinedo, Vila and Bravo, 2014):

Fenoles Simples: poseen propiedades antioxidantes, antibióticas, antiparasitarias y citotóxicas (Kozubek and Tyman, 1999).

Ácidos Fenólicos: forman dos grupos: los ácidos hidroxicinámicos y los ácidos hidroxibenzoicos, teniendo una mayor capacidad antioxidante los primeros, por poseer más

grupos hidroxilo y una mayor separación del grupo carboxilo al fenol (Dziedzic and Hudson, 1984).

Flavonoides: agrupan a la mayoría de los compuestos fenólicos, actualmente se identificaron más de 4000 compuestos diferentes (Bravo, 1998). Son pigmentos que se encuentran principalmente en las partes aéreas de las angiospermas debido a que su biosíntesis es fotosintética, por lo que se encuentran en el tejido externo. Se emplean en su desarrollo fisiológico y las localizamos en la membrana del tilacoide de los cloroplastos (Quiñones, Miguel y Aleixandre, 2012). Los flavonoides se dividen en función del estado de oxidación del anillo pirano (C) y la posición del anillo B en las siguientes subclases: flavonoles, flavanonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavanoles, antocianidinas, flavan-3-oles, y chalconas (Manach et al., 2004).

Flavonoles: presentan actividad antioxidante, anti-inflamatoria, antígenotóxica y antihiper glucémica (Ani and Naidu, 2008; Benavente-García and Castillo, 2008; Singh et al., 2009).

Flavanonoles: son probablemente los flavonoles menos conocidos debido a que se encuentran en pequeñas cantidades en comparación con otros flavonoides y su carácter incoloro no interesa a la industria química.

Flavonas: son los flavonoides menos comunes en plantas. Presentan actividad anti-inflamatoria, antígenotóxica, antihiper glucémica y antioxidante (Ani and Naidu, 2008; Benavente-García and Castillo, 2008; Singh et al., 2009).

Flavanona: presentes casi exclusivamente en cítricos, las concentraciones más altas se encuentran en los tejidos sólidos de estos (Tomás-Barberán and Clifford, 2000) Generalmente se encuentran glicosiladas en la posición siete por un disacárido. Presentan carácter antimicrobiano (Selma, Espín and Tomás-Barberán, 2009; Cowan, 1999). Presentan propiedades anti-inflamatorias (Vafeiadou et al., 2009).

Isoflavonas: definidos como fitoestrógenos por su capacidad de unión a los receptores de los estrógenos, hormonas. Poseen a su vez capacidad antioxidante (Schwartz, Sontag and Plumb, 2009; Steiner, Arnould, Scalbert and Manach, 2008).

Flavan-3-oles (Flavanoles): este grupo lo conforman taninos condensados, catequinas y leucoantocianinas (Aron and Kennedy, 2008).

Chalconas: son pigmentos amarillos responsables en parte del color de las flores y frutas. Destacamos el xanthohumol por sus propiedades antibacterianas y antioxidantes (Yamaguchi, Satoh-Yamaguchi and Ono, 2008).

Antocianidinas: forma uno de los grupos más importantes de pigmentos vegetales azules, verdes y rojos, poseen carácter hidrosoluble y se localizan en las vacuolas de las células vegetales.

Fuera de la clasificación de los flavonoides encontramos:

Quinonas: poseen propiedades redox, destacando la coenzima Q10, considerada un potente antioxidante (Petillo and Hultin, 2008).

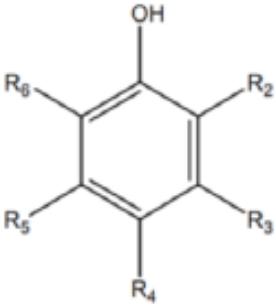
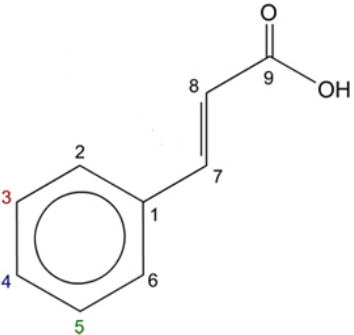
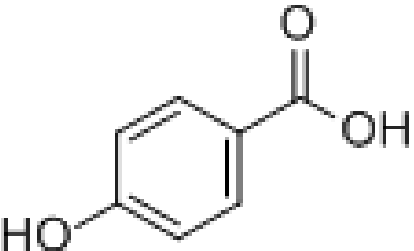
Ligninas: son polímeros fenólicos complejos considerada como el segundo bio-polímero más abundante en el reino vegetal después de la celulosa. Proporcionan apoyo estructural en las plantas sirviendo a su vez en el transporte del agua a través de sus tejidos (Vermerris and Nicholson, 2008).

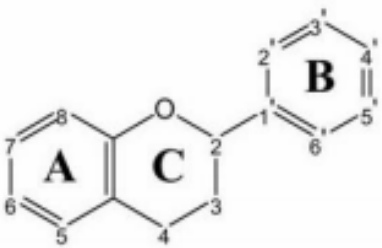
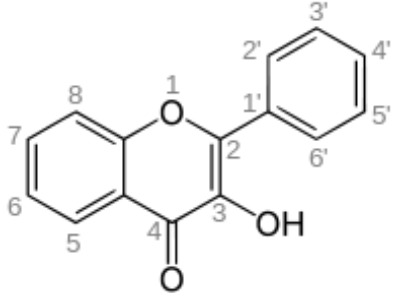
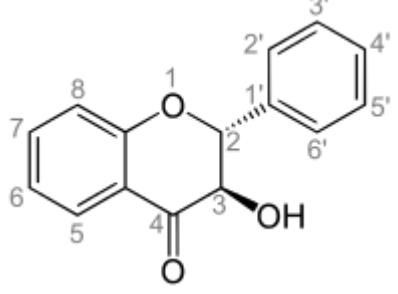
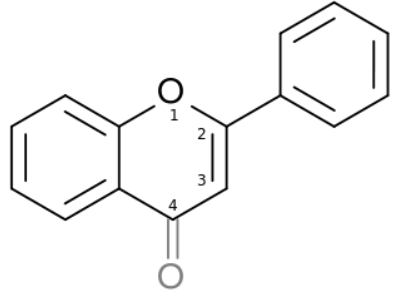
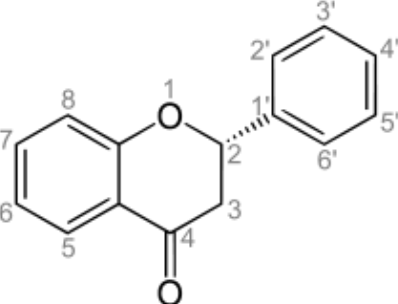
Estilbenos: es un disruptor endocrino. Poseen actividad antioxidante, neurológica, anticancerígena, cardiovascular, antifúngica e insecticida (Chaher, et al., 2014).

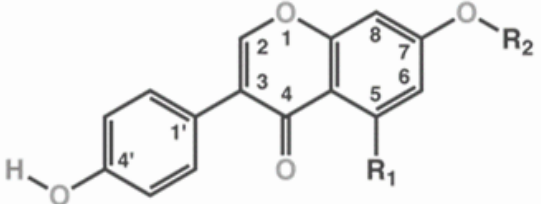
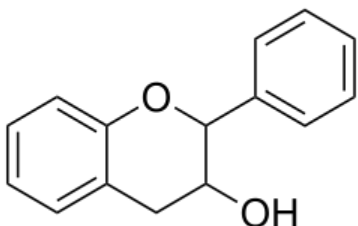
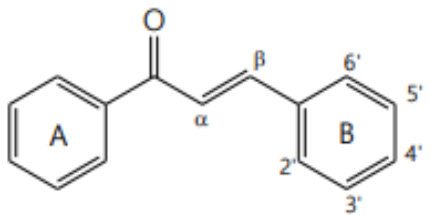
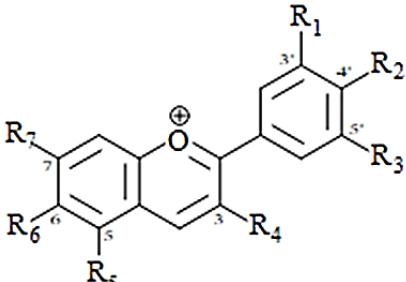
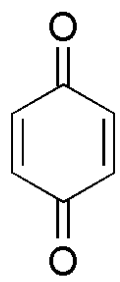
Curcuminoides: poseen funciones antioxidantes y antiinflamatorias (Pulido-Moran, Moreno-Fernandez and Ramirez-Tortosa, 2016).

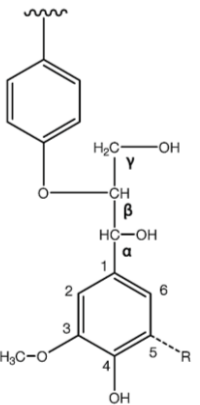
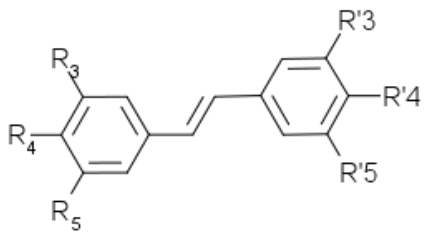
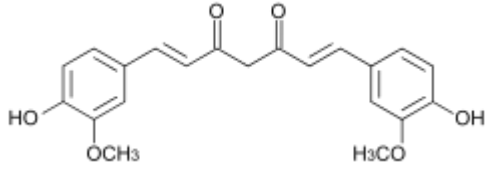
En la Tabla 1 se incluyen las estructuras moleculares de las distintas clases de compuestos fenólicos, así como el nombre de los compuestos más comúnmente encontrados en las distintas matrices vegetales.

Tabla 1. Clasificación compuestos fenólicos.

Nombre	Grupos funcionales	Comunes en vegetales
Fenoles Simples		
	<p>Poseen un único anillo aromático unido a dos o tres grupos hidroxilo.</p>	<p>Fenol, cresol, timol y resorcinol.</p>
Ácidos Fenólicos		
<p>Ácidos hidroxicinámicos</p> 	<p>Poseen un anillo aromático sin hidroxilo, un grupo alifático y un ácido carboxílico en el extremo.</p>	<p>Ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido cafeico y ácido tartárico.</p>
<p>Ácidos hidroxibenzóicos</p> 	<p>Estructura C6-C1. Contiene un anillo fenólico con un grupo carboxílico asociado.</p>	<p>Ácido Gálico, ácido vanílico y ácido siríngico.</p>

Flavonoides		
	<p>Su estructura química básica está formada por un esqueleto difenilpirano (C6-C3-C6) con dos anillos aromáticos (A y B) unidos mediante un anillo pirano (C).</p>	
<p>Flavonoles</p> 	<p>Grupo hidroxilo en C3, un grupo ceto en C4 e insaturación entre C2 y C3.</p>	<p>Quercetina, kaempferol y miricetina.</p>
<p>Flavanonoles</p> 	<p>Anillo heterocíclico saturado de oxígeno con un grupo cetona en C4 y un grupo hidroxilo en C3.</p>	<p>Taxifolia y aromadedrina.</p>
<p>Flavonas</p> 	<p>Insaturación entre C2 y C3 y un grupo ceto en C4.</p>	<p>Luteolina y apigenina.</p>
<p>Flavanonas</p> 	<p>Presenta un anillo (C) heterocíclico saturado de oxígeno de seis miembros, con un grupo cetona en C4.</p>	<p>Hesperidina eriodictiol, hesperetina, homoeriodictiol, isosakuranetina, naringenina, pinocembrina, sakuranetina y sakuranina</p>

<p>Isoflavonas</p> 	<p>Grupos hidroxilos en C7 y C4' y un anillo bencénico lateral en C3.</p>	<p>Genisteína, daidzeína y gliciteína.</p>
<p>Flavan-3-oles (Flavanoles)</p> 	<p>Grupo hidroxilo en C3 y el anillo C sin saturación</p>	<p>Epicatequina, catequina y galocatequina.</p>
<p>Chalconas</p> 	<p>Cetonas aromáticas α, β-insaturadas.</p>	<p>Buteína y xanthohumol.</p>
<p>Antocianidinas</p> 	<p>Generalmente heterósidos con la totalidad de sus anillos conjugados.</p>	<p>Aurantidinina, cianidina, luteolinidina, malvidina y peonidina.</p>
<p>Otros grupos:</p>		
<p>Quinonas</p> 	<p>Anillo diona completamente conjugado.</p>	<p>Lapachol.</p>

<p>Ligninas</p> 	<p>Compuestos fenólicos polimerizados con diversidad estructural.</p>	<p>Alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico.</p>
<p>Estilbenos</p> 	<p>Estructura C6-C2-C6 formados por 2 bencenos unidos por un puente eteno.</p>	<p>Resveratrol, piceido, piceatanol, δ-viniferina, α-viniferina y ϵ-viniferina.</p>
<p>Curcuminoides</p> 	<p>Esqueleto hidroxicarbonado dicetónico con varios grupos funcionales.</p>	<p>Curcumina, demetoxicurcumina.</p>

3.2.1 COMPUESTOS FENÓLICOS IDENTIFICADOS EN ANGIOSPERMAS MARINAS

La presencia de compuestos fenólicos en angiospermas marinas se estudia desde hace años. Inicialmente estas técnicas tan sólo cuantificaban contenidos totales de compuestos fenólicos, no siendo capaces de identificarlos de manera individual. El más destacable es el método Folin-Ciocalteu, que emplea el reactivo de Folin-Ciocalteu (tugstomolibdato y tugstofosfato) a pH básico, realizando una cuantificación del contenido total en compuestos fenólicos mediante una espectrofotométrica a 730 nm que emplea el ácido gálico en su calibración (Mennella et al., 2010; Zadra et al., 2012).

Los últimos avances en técnicas analíticas logran identificar, aislar y cuantificar compuestos fenólicos específicos presentes en matrices complejas como las de angiospermas marinas. Una de estas técnicas emplea la resonancia magnética nuclear, de hidrógeno y carbono (Rani and Devanand, 2013; Saigne, Richard, Mérillon and Monti, 2006) identificando el tipo de hidrógenos y de carbonos de la molécula para su elucidación estructural.

El uso de técnicas cromatográficas supone un gran avance en la selectividad y cuantificación de los diferentes compuestos fenólicos. La cromatografía de líquidos de baja eficiencia (*Liquid Chromatography*, LC) acoplada a espectrometría de masas (*Tandem mass spectrometry* MS/MS) ha permitido la cuantificación de compuestos fenólicos como el ácido cumárico y felúrico (Bursal, Köksal, Gülçin, Bilsel and Gören, 2013).

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) combinada con detectores Ultravioleta-visible sin arreglo de diodo (*High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet rays*, HPLC-UV) (Dragovic-Uzelac, Levaj, Mrkic, Bursac and Boras, 2007; Kozikowski, Tückmantel, Böttcher and Romanczyk, 2003) emplea tiempos de retención de estándares para identificar compuestos fenólicos. Mediante esta técnica se han cuantificado el ácido cumárico y felúrico (Dragovic-Uzelac et al., 2007; Kozikowski et al., 2003). La cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada a detectores ultravioleta visible de arreglo de diodo (*High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection*, HPLC-DAD) (Baño et al., 2003; Barros et al., 2012; Barros et al., 2013; Dragovic-Uzelac et al., 2007; Hale, Reddivari, Nzaramba, Bamberg and Miller Jr, 2008; Zadra et al., 2012) permite identificar compuestos fenólicos en matrices complejas mediante patrones o mediante el espectro UV-visible de compuestos que presenten multibandas de absorción características del mismo.

Mediante la combinación de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia con espectrometría de masas (*High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array in tandem electrospray ionisation mass spectrometry*, HPLC-DAD-ESI/MS) ha permitido la cuantificación del ácido rosmárico (Zadra et al., 2012), el ácido clorogénico (Hale et al., 2008; Muñoz Jáuregui et al., 2014), los ácidos cafeico, felurico y cumárico (Barros et al., 2012).

La cromatografía de gases combinada con espectrometría de masas (*Gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS) (Priyadharshini and Sujatha, 2013; Quideau, Deffieux, Douat, and Pouységu, 2011; Sagredo, Lorenzen, Casper and Lafta, 2011) permite mediante espectros de masa conocidos identificar compuestos. A su vez la espectrometría de masas informa del peso molecular y de sus patrones de fragmentación útiles para su identificación.

3.2.2. COMPUESTOS FENÓLICOS EN *P. OCEANICA*

Estudios previos han definido la huella fenólica de *P. oceanica* identificado como principal compuesto fenólico al ácido chicórico, y en un promedio muy inferior en concentración, en segundo lugar, el ácido caftárico (Grignon-Dubois and Rezzonico, 2015; Dumay, Costa, Desjobert and Pergent, 2004). En las hojas de *P. oceanica*, resultaron como componentes principales, ácido ferúlico (Agostini et al., 1998; Cuny, Serve, Jupin and Boudouresque, 1995) ácido p-hidroxibenzoico (Serve, Pioveti et Combout, 1984) y ácido gentísico (Haznedaroglu and Zeybek, 2007). A su vez presentan altos niveles en ácidos caftárico, chicórico y gentísico, así como aldehído vainillina y los ácidos p -cumárico, cafeico y cinámico, derivados fenólicos del ácido benzoico, chalconas y proantocianidinas (Cornara, et al., 2018; Zidorn, 2016). Estos estudios se realizaron mediante LC o cromatografía de gases (*Gas Chromatography*, GC) acoplada a espectrometría de masas de baja resolución (*Low Resolution Mass Spectrometry*, LRMS) (Dumay et al., 2004; Haznedaroglu and Zeybek, 2007; Kaal et al., 2016).

Las mejoras en las técnicas de extracción, en la espectrometría de masas, en la cromatografía y en los equipos de detección permiten la detección de un mayor número de compuestos fenólicos en *P. oceanica* gracias al análisis retrospectivo y a un mayor grado de selectividad que mejora la diferenciación entre las señales reales, del ruido producido por las señales no genuinas.

La aplicación de un equipo tan avanzado en la detección de compuestos fenólicos en *P. oceanica* realizada en este estudio lo cataloga de innovador, al ser el primero que estudia

compuestos fenólicos empleando un detector de masas de alta resolución en *P. oceanica* en un gradiente costero como posible indicador de estrés antropogénico.

A continuación, explicaremos la metodología analítica implicada en este sofisticado método.

3.3. METODOLOGÍA ANALÍTICA

3.3.1 MÉTODO DE EXTRACCIÓN

La extracción con disolventes es la técnica más utilizada en el laboratorio químico para la separación de compuestos de naturaleza orgánica. Esta técnica emplea disolventes orgánicos con los que el analito presenta afinidad y que resultan inmiscibles con la matriz. Son combinados con mecanismos físicos como ultrasonidos, centrifugación, etc. Esta técnica se fundamenta en el coeficiente de distribución, es decir, en la diferente solubilidad que presenta el analito deseado frente a los otros compuestos de la matriz en el disolvente de extracción. (Chen, Guo, Wang, and Qui, 2008). Mediante esta técnica conseguimos por tanto extraer el analito de la matriz al disolvente de extracción, obteniendo dos fases aisladas. (Nováková and Vlčková, 2009). El método de extracción dependerá tanto de los analitos objetivo de estudio como de la matriz. Para la elección del disolvente se empleará el que presente una polaridad similar a los analitos de interés. Los compuestos fenólicos son sensibles a la temperatura, al disolvente y al tiempo entre otros factores (Oniszczuk et al., 2014), no obstante, la conservación en frío no afecta al contenido de polifenoles. (Van der Sluis, Dekker, de Jager and Jongen, 2001). Existen multitud de técnicas de extracción que proporcionan altos grados de reproducibilidad y selectividad como la extracción con fluidos supercríticos (*Supercritical Fluid Extraction, SFE*), la extracción asistida por ultrasonidos (*Ultrasound-Assisted Extraction, UAE*), la extracción asistida por microondas (*Microwave-Assisted Extraction, MAE*) o la extracción con líquidos presurizados (*Pressurized Liquid Extraction, PLE*) (Wang and Weller, 2006).

Es común el uso de la técnica de extracción sólido-líquido (*Solid-Liquid Extraction, SLE*), para compuestos fenólicos en vegetales, (Figura 3) la cual se empleará en el caso de estudio en la extracción de compuestos fenólicos de *P. oceanica*.

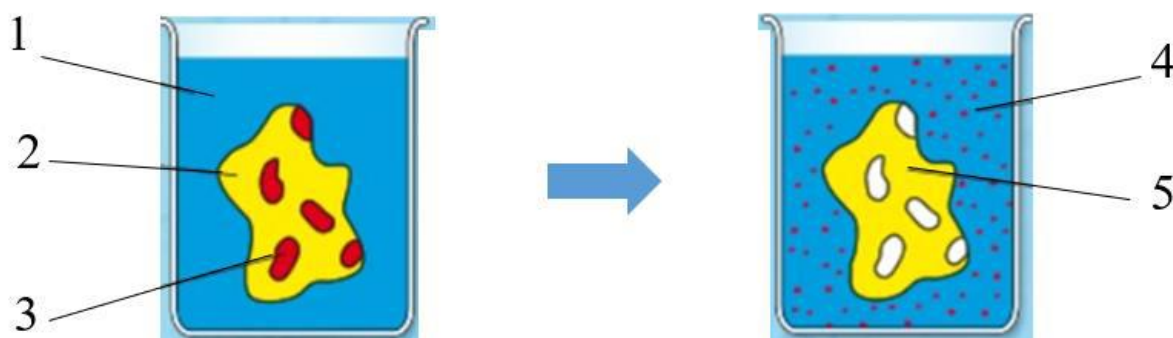


Figura 3. Proceso de Extracción Sólido-Líquido. 1: disolvente, 2: matriz objeto de estudio, 3: solutos, 4: matriz tras la extracción y 5: disolvente con los solutos.

En esta técnica se emplea como extractante una mezcla de agua destilada con un disolvente orgánico acompañada de mecanismos físicos que aumenten el contacto entre la muestra y el disolvente de extracción. Tras la separación de las fases, se extrae el solvente conteniendo el

analito de interés para ser filtrado y posteriormente analizado (Sytarová, Orsavová, Snopek, Miček and Byczyński, 2020). Los objetivos de la extracción consisten en la separación selectivamente los analitos de la matriz, la preconcentración de los analitos y la eliminación de interferencias.

Para el análisis de compuestos fenólicos en *P. oceanica* se empleará la técnica de cromatografía de líquidos de ultra alta eficacia (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC) acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (*High Resolution Mass Spectrometry*, HRMS) empleando un analizador Exactive Q Orbitrap. La cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas (UHPLC-HRMS) combina la capacidad de separación de la cromatografía de líquidos con la selectividad, sensibilidad y precisión en la determinación de la masa molecular de la espectrometría de masas.

3.3.2. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

Esta técnica analítica permite la separación de una mezcla de compuestos en función de su velocidad de desplazamiento diferencial mediante interacciones con dos fases: Fase móvil y fase estacionaria. La fase móvil compuesta por la muestra y una mezcla de disolventes se introduce en el puerto de inyección hacia la columna cromatográfica que constituye la fase estacionaria. Al atravesarla las interacciones entre los analitos de la fase móvil con la fase estacionaria separan los componentes de la mezcla. Los componentes con mayor interacción con la fase estacionaria quedarán retenidos por más tiempo que los componentes con menor interacción. La diferente velocidad de salida por la columna cromatográfica produce su separación. A su salida y mediante un detector la mezcla es detectada, caracterizada e incluso cuantificada. Se observa un esquema de su funcionamiento en la Figura 4.

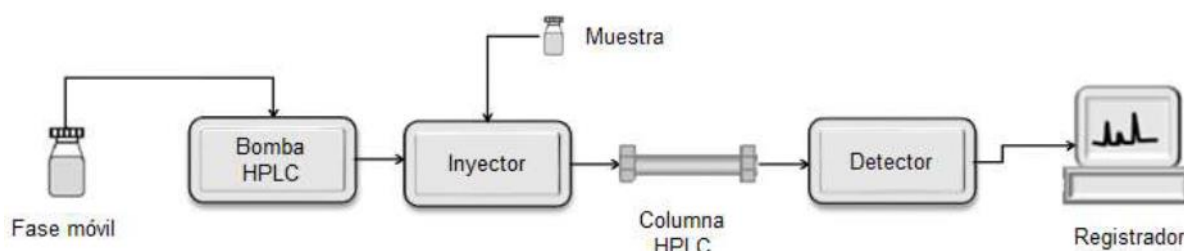


Figura 4. Esquema funcionamiento cromatografía de líquidos.

El empleo de UHPLC se caracteriza por poseer un tamaño de partícula de la fase estacionaria inferior a $2\ \mu\text{m}$ lo cual aporta una mayor eficacia frente a HPLC. Factores como la reducción del diámetro y longitud de la columna aumentan a su vez la eficacia de la separación (Fekete, Schappler, Veuthey and Guillarme, 2014; Guillarme and Veuthey, 2017).

La fase móvil permite la elución de los analitos retenidos, la cual dependerá de la naturaleza de los distintos compuestos, los disolventes más empleados son el metanol y el acetonitrilo (Moretti et al., 2015; Zhu et al., 2015). La adición a la fase móvil de ácido fórmico que se realiza en nuestro caso de estudio provoca la formación de iones protonados aumentando la sensibilidad en su detección (Zhou et al., 2018).

3.3.3. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Junto a la cromatografía de líquidos se emplea la espectrometría de masas. Esta técnica permite medir la relación masa/carga (m/z) de moléculas ionizadas en fase gaseosa.

“ m ”: peso molecular del ion en Daltons (doceava parte de la masa de un átomo, neutro y no enlazado, de carbono-12, en su estado fundamental eléctrico y nuclear).

“ z ”: número de cargas de la molécula.

Los componentes de la muestra separados en el UHPLC pasan al espectrómetro de masas a través de una interfaz donde son ionizados (fuente de ionización) que transforman los analitos del estado líquido al gaseoso. Los equipos de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (*Liquid Chromatography- Mass Spectrometry*, LC-MS) pueden tener distintos tipos de interfases que se incluyen dentro de la denominada ionización a presión atmosférica (*Atmospheric Pressure Ionization*, API): electrospray (*Electrospray Ionization*, ESI), ionización química a presión atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI) y la fotoionización a presión atmosférica (*Atmospheric Pressure Photoionization*, APPI).

El modo de ionización empleado más frecuentemente empleado es ESI (Holčapek, Jirásko and Lída, 2012) el cual permite ionizar en modo positivo o negativo. Para el presente estudio se empleó una sonda calefactada ESI (*Heated Electrospray Ionization*, HESI) que mejora la solvatación. Esta técnica de ionización se basa en la diferencia de potencial entre el capilar que contiene la fase móvil y el espectrómetro de masas. El analito disuelto se introduce a través de un capilar metálico estrecho y cargado. Se forman gotas de unos 10 μm altamente cargadas. El solvente se evapora, los analitos se aproximan, se repelen y finalmente cuando la repulsión de las cargas positivas vence la tensión superficial, estallan las gotas en un proceso denominado “explosión Coulómbica” El proceso se repite hasta eliminar el solvente de modo que solo queden iones. La repetición del proceso produce que el líquido salga en forma de aerosol. Los iones se mueven hacia el analizador de masas debido a la fuerza de atracción entre las partículas y el electrodo de carga opuesta y al diferencial de presión (Covey, Thomson and Schneider, 2009).

3.3.4. ANALIZADOR

Este elemento separa los iones generados en función a su relación m/z mediante la aplicación de campos eléctricos, magnéticos o mediante el tiempo de llegada. Los iones producen una señal eléctrica que es procesada y amplificada obteniendo su registro, el espectro de masas, el cual representa las abundancias iónicas en función de la relación m/z . Se clasifican en cuatro grupos: analizadores de sectores eléctricos o magnéticos, de tiempo de vuelo (Time of Flight, TOF), de cuadrupolo (Quadrupole, Q) y de confinamiento de iones Orbitrap, Trampa de iones (Ion Trap, IT). A su vez los clasificamos según su resolución: capacidad para diferenciar entre componentes de masa similar. Baja resolución $R < 5000$, incluyen los analizadores de IT y Q, los cuales sólo permiten informar de la masa nominal. Alta resolución $R > 5000$, que incluyen los analizadores de vuelo y Orbitrap, los cuales permiten obtener masas más exactas con cuatro o más decimales. Los espectrómetros de masas de alta resolución permiten llevar a cabo análisis retrospectivos trabajando en modo de barrido completo (*full scan*) lo cual registra todas las masas presentes de la muestra (Núñez, Gallart-Ayala, Ferrer, Moyano and Galceran, 2012). Conociendo la composición elemental del compuesto y empleando el perfil isotópico, este modo tiene la capacidad de identificar compuestos no objetivo (Thurman et al., 2005). La

espectrometría de masas en tándem o MS/MS, a su vez produce la fragmentación lo que permite la confirmación mediante las masas de sus fragmentos.

Para este trabajo se ha empleado el detector Thermo scientific Q Exactive Orbitrap. Es un sistema de cuadrupolo Orbitrap MS/MS de alta resolución con masa exacta. El analizador cuadrupolar emplea un cuadrupolo que genera un campo eléctrico variable. Consiste en una fuente que produce iones, un cuadrupolo que produce variaciones en las trayectorias de los iones dependiendo de su relación m/z y un detector que mide el número de iones (intensidad). Se emplean en la detección selectiva y el análisis de componentes de baja concentraciones en matrices complejas. Estos sistemas permiten seleccionar y caracterizar compuestos *target* y *non target*.

El software empleado, Xcalibur, permite el manejo de los espectros de masas con cálculos de masa exacta de hasta cinco decimales. A su vez, permite la identificación del compuesto conociendo la fórmula o conocer la fórmula empírica más cercana a una masa presente. Estos procesos proporcionan datos de error de masa, considerando como aptos los inferiores a 5 ppm para este estudio. Se realiza gracias a la capacidad del equipo unida al software Xcalibur, una triple confirmación del compuesto, en análisis retrospectivos, (1) cálculo de la masa del ion precursor, (2) de sus fragmentos característicos y (3) su conformidad de la relación isotópica del ion precursor teórico con el obtenido. La alta resolución, precisión de masa, calidad espectral y sensibilidad del método analítico ofrecen una gran certeza a nuestros resultados.

4. OBJETIVOS

El objetivo principal de este Trabajo Final de Grado fue llevar a cabo la identificación de los distintos compuestos fenólicos presentes en las hojas de *P. oceanica*, considerando un gradiente de profundidad.

Para su consecución se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Extracción de los compuestos fenólicos de las muestras de hojas liofilizadas.
- Análisis mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC-Orbitrap MS).
- Aplicación de una base de datos conteniendo 135 compuestos fenólicos.
- Análisis de los resultados a partir de software especializado (Xcalibur y TraceFinder)

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. ÁREA DE ESTUDIO. MUESTREO

Las muestras de hojas de la fanerógama *P. oceanica* fueron recogidas por buzos especializados, en octubre de 2019, en la zona de muestreo de la Algaida (Almería).

Se tomaron tres muestras de hoja a diferente distancia y en dirección perpendicular a la costa. Se identificaron como RM3.1 RM3.2 y RM3.3. En la Tabla 2 se muestran sus coordenadas geográficas según el Sistema Geodésico Mundial 1984 (WGS 84).

Identificación de compuestos fenólicos en *Posidonia oceanica* mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución.

Tabla 2. Denominación de las muestras, indicando coordenadas, profundidad y distancia a la costa.

Muestra	Coordenadas	Profundidad	Distancia a costa
RM3.1	36°47'2.95"N 2°35'31.59"W	1 m	25 m
RM3.2	36°47'2.59"N 2°35'31.10"W	2.1 m	40 m
RM3.3.	36°47'2.13"N 2°35'30.46"W	1 m	60 m

La zona de muestreo seleccionada puede observarse en las siguientes ortofotos (Figura 5):



Figura 5. Área de estudio. (A) Mapa de la bahía de Almería. (B) Puntos de muestreo respecto a la línea de Costa. Fuente: Google Earth.2021

5.2. PRETATAMIENTO DE LA MUESTRA

Tras la recolección de las muestras, éstas se mantuvieron a baja temperatura en refrigeradores portátiles en su trayecto al laboratorio. Se lavaron con agua destilada para eliminar la sal y la arena. Las muestras se conservaron en placas Petri debidamente etiquetadas y pesadas. Se eliminaron las hojas jóvenes y las vainas basales. Posteriormente, las muestras se almacenaron a -20 °C durante un 48 h. Tras ello se liofilizaron a -50 °C en un liofilizador Thermo Electron Corporation Heto PowerDry LL3000 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania) en dos procesos de 24 horas. Tras el primer liofilizado, las hojas se limpiaron de epifitos con un suave cepillo evitando la fricción ya que el estrés ejercido de este modo podría afectar al contenido de compuestos fenólicos. Tras el segundo liofilizado las muestras se homogeneizaron pulverizándolas en un Mixer Mill MM 200 (2 min a 25 rev/s) y se almacenaron hasta su análisis a 4 °C en viales ámbar.

5.3. REACTIVOS Y DISOLVENTES

Ácido fórmico: Fisher Scientific (Waltham, MA, EE. UU.)

Agua: Merck KGaA (Darmstadt, DE)

Metanol: Riedel-de-Haën™ (Seelze, Alemania)

Formiato: Sigma-Aldrich (St Louis, MA, EE. UU.)

5.4. MÉTODO DE EXTRACCIÓN

Para cada una de las muestras:

- Se pesaron 50 mg de la muestra liofilizada en tubos eppendorf de 1.5 mL.
- Se prepararon 40 mL de una disolución hidroalcohólica ajustada a pH 4 (metanol: agua 1:1)
- Se adicionó 1 mL de dicha disolución al eppendorf conteniendo la muestra y se homogeneizó la mezcla empleando un agitador vórtex durante 1 min.
- Se llevó a cabo una extracción asistida por ultrasonidos por lo que el tubo eppendorf se introdujo en un baño ultrasónico (Elmasonic S 80 H) durante 4 min a temperatura ambiente.
- A continuación, para facilitar la separación de las fases se empleó una centrifuga (J.P Selecta Centronic-BL-II) que operó a 5000 rpm durante 10 min.
- El sobrenadante se extrajo con una jeringuilla de 20 mL y fue filtrado, empleando para ello un filtro de Nylon de 45 µm, y se introdujo en un vial de cromatografía. Para su análisis el extracto fue diluido (1:1) empleando la disolución extractante previamente elaborada.
- La muestra resultante se analizó mediante UHPLC-Orbitrap-MS
- Junto al análisis de las muestras se pinchó la disolución extractante como blanco de muestra.

5.5. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Para el análisis de las muestras se empleó un cromatógrafo de líquidos Thermo Scientific Transcend TM 600 (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, EE. UU.) dotado de una columna

Hypersil GOLD TM C18 (2.1 mm × 100 mm, tamaño de partícula de 1.9 µm; Thermo Fisher, San Jose, CA, EE. UU.). El volumen de inyección fue de 10 µL. Se trabajó en modo gradiente (Tabla 3), empleando como fase acuosa (eluyente A) ácido fórmico (0.1%) y formiato amónico (4mM) a pH 3 y metanol como fase orgánica (eluyente B). La temperatura de la columna se mantuvo a 25 °C y el flujo de la fase móvil se fijó en 0.2 mL/min. El tiempo de análisis fue de 60 min. En la tabla 3 se muestra el gradiente empleado para la separación cromatográfica:

Tabla 3. Gradientes de elución por pasos

Tiempo (min)	% Eluyente A	% Eluyente B
0	95	5
8	70	30
13	50	50
23	40	60
33	20	80
47	0	100
53	90	10

Fase móvil: fórmico formiato: 0.1 % Fórmico, 4mM Formiato a pH 3.

5.6. CONDICIONES DEL ANALIZADOR DE MS

Para la identificación de los compuestos fenólicos se empleó un analizador de masas de alta resolución, concretamente un Exactive Q Orbitrap (Q Exactive™ UHMR Hybrid Quadrupole-Orbitrap™, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Las condiciones empleadas fueron las siguientes:

Temperatura capilar: 300 °C (HESI)

Voltaje del capilar: 4kV

Voltaje de entrada: -35 V

Rango de masas: 50-1000 uma

Se empleó una energía de colisión de 30 eV para la fragmentación en la celda por disociación inducida de mayor energía (*Higher energy Collision induced Dissociation*, HCD).

El modo de trabajo empleado fue *full scan* para el análisis de los iones y *All Ion Fragmentation* (AIF) para la fragmentación de los iones.

6. RESULTADOS

Para el análisis de compuestos fenólicos se empleó el software Xcalibur™ Versión 2.2.1 y Trace Finder Version™ 4.0, el cual permite determinar la masa exacta de los distintos analitos de interés y a continuación, llevar a cabo su búsqueda en las distintas muestras a partir de la monitorización de dichos valores.

Inicialmente se realizó una búsqueda de compuestos diana (*target*). Para ello se empleó una base de datos del grupo de investigación de Química Analítica de Contaminantes de la Universidad de Almería (Granados Povedano, 2020), que contiene 93 compuestos fenólicos característicos en muestras agroalimentarias. Esta base de datos incluye la fórmula elemental,

el modo de ionización y la masa molecular del ion precursor y de sus fragmentos característicos. (Tabla A1) Posteriormente, tras una revisión bibliográfica, se realizó una búsqueda de compuestos sospechosos (*suspected*) hallados previamente en la misma matriz o similares. En esta ocasión, la base de datos incluía un total de 42 compuestos fenólicos (Astudillo-Pascual, Domínguez, Aguilera and Garrido Frenich, 2021), 36 previamente detectados en *P. oceanica* y los 6 restantes en otros pastos marinos mediterráneos (*Cymodocea nodosa*, *Zostera marina* y *Zostera noltii*) (Tabla A2). Para todos los casos se realizó una triple confirmación identificativa: detección del ion precursor, de sus fragmentos característicos (Figura 6) y confirmación de similitud del perfil isotópico del ion precursor experimental con el teórico (Figura 7). Para la identificación tentativa de los compuestos se consideró como máximo error de masa 5 ppm.

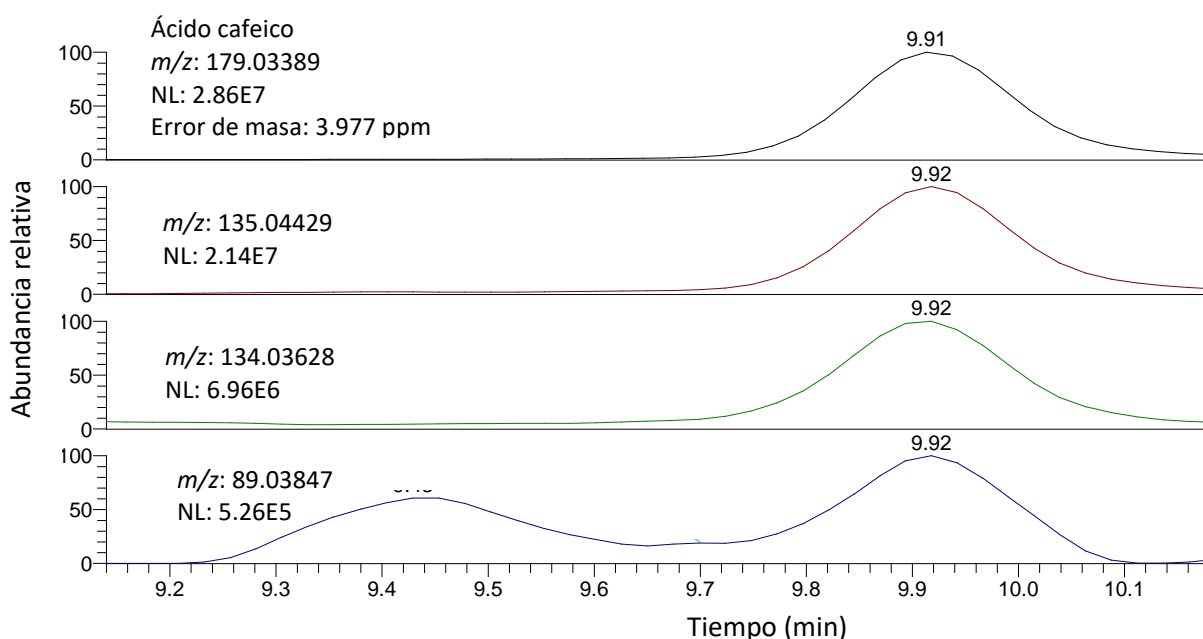


Figura 6. Cromatograma de iones extraídos (179.03389) correspondiente a cafeico detectado en hoja de *P. oceanica* de la muestra RM3.1. NL: intensidad

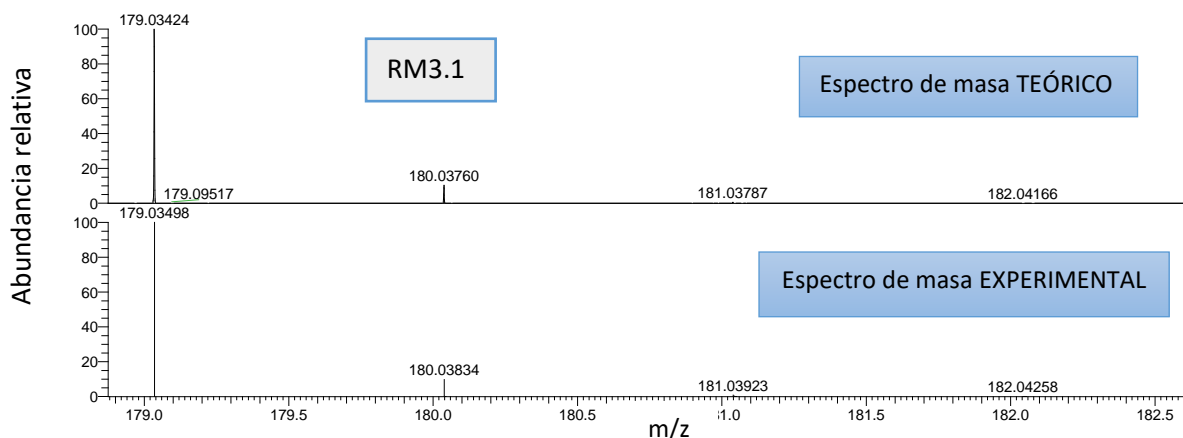


Figura 7. Comparación del perfil isotópico experimental y teórico correspondiente al ion precursor del ácido cafeico observado en la muestra (m/z : 179.03389) RM3.1.

Mediante este exhaustivo procedimiento se identificaron tentativamente un total de 26 compuestos fenólicos (Tabla 4). Dieciséis de estos compuestos pertenecen a la familia de los flavonoides, y a su vez a las siguientes subfamilias: flavonoles (catequina, isoquercetina, quercetin-3-O-malonylglucoside, kaempferol-3-O-glucoside + 4 luteolin-4'-O-glucoside e isorhamnetin-3-O-malonylglucoside), flavanonas (eriodictiol, naringenina, pinocembrin, sophoraflavanone B, isosakuranetin + sakuranetin), isoflavonas (glabridin), flavanoles (procianidina B1 y B2, epicatequina) y chalconas (naringenina chalcona y xanthohumol). Encontramos dos compuestos fenólicos dentro del grupo de los curcuminoides (tetrahydrocurcumina y demetoxicurcumina) y ocho ácidos hidroxicinámicos (mascarósido y los ácidos caftárico, chicórico, p-cumárico, ferúlico, diferuloyl tartárico, cafeico y fertárico). Por un lado, los flavonoles kaempferol-3-O-glucoside y 4 luteolin-4'-O-glucoside, y por el otro, las flavanonas, isosakuranetin y sakuranetin, presentan la misma masa exacta y fragmentación, 447.09328 y 285.07685 respectivamente, y eluyen al mismo tiempo de retención, por lo que no se pudo discernir si en la muestra estaban presentes ambos isómeros o solo uno de ellos.

En la Tabla 3 se incluye el tiempo de retención de cada compuesto, las masas de los iones precursores y de confirmación y a su vez se incluye el error medio obtenido de las 3 muestras para cada compuesto. Todos los compuestos tentativamente identificados se mantuvieron por debajo de un error de 5 ppm, con un rango entre 0.2 a 4.8 ppm, en el que la mayoría de los compuestos no superan las 0.5 ppm.

A su vez, se nombran los compuestos fenólicos tentativamente identificados según normativa IUPAC (Tabla A3).

Tabla 4. Lista compuestos fenólicos tentativamente detectados en *P. oceanica* con sus iones precursores y fragmentos de confirmación para las muestras RM3.1, RM3.2 y RM3.3.

Compuesto	TR (min)	Iones	Masa teórica (m/z)	RM3.1	RM3.2	RM3.3	Error masa (ppm)
Catequina	8.12	Precursor	291.08631	x	x	x	3.8
$C_{15}H_{14}O_6$ ESI+		Fragmento 1	139.03895	x	x	x	
		Fragmento 2	123.04502				
Ácido fertárico	8.21	Precursor	325.05651	x	x	x	0.2
$C_{14}H_{14}O_9$ ESI-		Fragmento 1	193.05010	x	x	x	
		Fragmento 2	130.99800	x	x	x	
		Fragmento 3	87.00820				
Procianidina B2	9.55	Precursor	577.13515	x	x	x	0.6
$C_{30}H_{26}O_{12}$ ESI-		Fragmento 1	425.08890	x	x	x	
		Fragmento 2	407.07890	x	x	x	
		Fragmento 3	289.07320				
Ácido cafeico	9.91	Precursor	179.03389	x	x	x	4.1
$C_9H_8O_4$ ESI-		Fragmento 1	135.04429	x	x	x	
		Fragmento 2	134.03628	x	x	x	
		Fragmento 3	89.03847	x	x	x	
Epicatequina	10.96	Precursor	289.07121	x	x	x	0.3
$C_{15}H_{14}O_6$ ESI-		Fragmento 1	139.03890	x	x	x	
		Fragmento 2	123.04491				
Procianidina B1	11.29	Precursor	577.13460	x	x	x	0.4
$C_{30}H_{26}O_{12}$		Fragmento 1	289.07154	x	x	x	

Identificación de compuestos fenólicos en *Posidonia oceanica* mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución.

ESI-		Fragmento 2	407.07669	x	x	x	
		Fragmento 3	125.02329			x	
Ácido caftárico	11.42	Precursor	311.04086	x	x	x	0.3
$C_{13}H_{12}O_9$ ESI-		Fragmento 1	130.99800	x	x	x	
		Fragmento 2	161.02390	x	x	x	
		Fragmento 3	267.05050	x	x	x	
Ácido chicórico	11.45	Precursor	473.07255	x	x	x	0.2
$C_{22}H_{18}O_{12}$ ESI-		Fragmento 1	311.04071	x	x	x	
		Fragmento 2	293.02844	x	x	x	
		Fragmento 3	149.00812	x	x	x	
Ácido p-cumárico	13.02	Precursor	163.03952	x	x	x	0.4
$C_9H_8O_3$ ESI-		Fragmento 1	119.04881	x	x	x	
		Fragmento 2	93.03316	x	x	x	
		Fragmento 3	163.03950	x	x	x	
Ácido ferúlico	13.58	Precursor	193.05008	x	x	x	3.3
$C_{10}H_{10}O_4$ ESI-		Fragmento 1	134.03643				
		Fragmento 2	149.06100	x	x	x	
		Fragmento 3	178.02640	x	x	x	
Mascarósido	13.7	Precursor	523.21849	x	x	x	0.4
$C_{26}H_{36}O_{11}$ ESI-		Fragmento 1	361.16510	x	x	x	
		Fragmento 2	331.15450				
Ácido diferuloil tartárico	14.73	Precursor	501.10385	x	x	x	0.3
$C_{24}H_{22}O_{12}$ ESI-		Fragmento 1	233.04526	x	x	x	
		Fragmento 2	307.04611	x	x	x	
		Fragmento 3	245.04530	x	x	x	
		Fragmento 4	471.06107				
Eriodictiol	14.95	Precursor	287.05556	x	x	x	0.1
$C_{15}H_{12}O_6$ ESI-		Fragmento 1	135.04382				
		Fragmento 2	151.00235	x	x	x	
		Fragmento 3	107.01253	x	x	x	
Quercetina 3-O-glucósido (Isoquercetina)	15.29	Precursor	463.08765	X	X	X	0.5
$C_{21}H_{20}O_{12}$ ESI-		Fragmento 1	300.02700	X	X	X	
		Fragmento 2	302.03696				
Quercetina-3-O-malonilglucósido	15.64	Precursor	549.08859	x	x	x	0.2
$C_{24}H_{22}O_{15}$ ESI-		Fragmento 1	505.10006	x	x	x	
		Fragmento 2	300.02737	x	x	x	
		Fragmento 3	301.03183				
Kaempferol-3-O-glucósido + 4 Luteolina-4'-O-glucósido	16.08	Precursor	447.09328	X	X	X	0.2
$C_{21}H_{20}O_{11}$ ESI-		Fragmento 1	284.03200	x	x	x	
		Fragmento 2	255.02924				
		Fragmento 3	285.03995	x	x	x	

Identificación de compuestos fenólicos en *Posidonia oceanica* mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución.

Isorhamnetina-3-O-malonilglucósido	17.04	Precursor	563.10424	x	x	x	0.1
$C_{25}H_{24}O_{15}$ ESI-		Fragmento 1	459.09270	x	x	x	
		Fragmento 2	315.05050	x	x	x	
		Fragmento 3	299.01920	x	x	x	
Naringenina	18.4	Precursor	271.06065	x	x	x	0.2
$C_{15}H_{12}O_5$ ESI-		Fragmento 1	119.04879	x	x	x	
		Fragmento 2	151.00226	x	x	x	
		Fragmento 3	107.01245	x	x	x	
Naringenina chalcona	21.6	Precursor	271.06012	x	x	x	0.2
$C_{15}H_{12}O_5$ ESI-		Fragmento 1	119.04879		x	x	
		Fragmento 2	151.00226	x		x	
		Fragmento 3	107.01245			x	
Pinocembrina	25.25	Precursor	255.06573	x	x	x	0.6
$C_{15}H_{12}O_4$ ESI-		Fragmento 1	151.00241	x	x	x	
		Fragmento 2	213.05467	x	x	x	
Glabridina	28.66	Precursor	323.12888	x	x	x	0.2
$C_{20}H_{20}O_4$ ESI-		Fragmento 1	187.07590	x	x		
		Fragmento 2	267.06570	x	x		
Isosakuranetina + Sakuranetina	29.22	Precursor	285.07685	x	x	x	0.2
$C_{16}H_{14}O_5$ ESI-		Fragmento 1	119.04883	x	x	x	
		Fragmento 2	221.15330		x		
		Fragmento 3	165.01802	x	x	x	
		Fragmento 4	164.01011	x	x	x	
rac 8-Prenilnaringenin (Sophoraflavanone B)	33	Precursor	339.12380	x	X	X	0.4
$C_{20}H_{20}O_5$ ESI-		Fragmento 1	219.06418				
		Fragmento 2	119.04871	x	x	x	
Tetrahidrocurcumina	34.94	Precursor	371.15001	x	x	x	0.2
$C_{21}H_{24}O_6$ ESI-		Fragmento 1	193.08650	x	x	x	
		Fragmento 2	219.06570			x	
Demethoxicurcumina	35.54	Precursor	337.10815	x	x	x	0.1
$C_{20}H_{18}O_5$ ESI-		Fragmento 1	119.04970	x	x	x	
		Fragmento 2	175.03950				
		Fragmento 3	217.05010	x	x	x	
Xanthohumol	37.42	Precursor	353.13945	x	x	x	0.3
$C_{21}H_{22}O_5$ ESI-		Fragmento 1	207.10210	x	x	x	
		Fragmento 2	119.04900	x	x	x	
		Fragmento 3	145.02900	x	x	x	

*El error de masa indicado está asociado al valor de masa del ion precursor siendo una media de las distintas muestras analizadas.

A continuación, se llevó a cabo la integración de los distintos picos cromatográficos observados. Los valores de área en cada caso pueden observar en la siguiente tabla.

Tabla 5. Área ion precursor de los compuestos de las muestras RM3.1, RM3.2 y RM3.3.

Nombre del compuesto	RM3.1	RM3.2	RM3.3
Catequina	1.23E+08	1.08E+08	1.51E+08
Ácido fertárico	1.42E+09	8.55E+08	5.48E+08
Procianidina B2	6.81E+06	6.13E+06	1.05E+07
Ácido cafeico	3.24E+08	1.75E+08	2.13E+08
Epicatequina	1.70E+07	1.40E+07	2.20E+07
Procianidina B1	3.22E+06	3.15E+06	5.74E+06
Ácido caftárico	5.36E+08	3.96E+08	4.39E+08
Ácido chicórico	8.94E+09	6.75E+09	7.42E+09
Ácido p-cumárico	1.25E+08	1.22E+08	7.23E+07
Ácido Ferúlico	1.67E+08	1.15E+08	6.02E+07
Mascarósido	9.93E+05	6.56E+05	3.78E+05
Ácido diferuloil tartárico	3.47E+08	1.86E+08	1.73E+08
Eriodictiol	1.90E+07	1.77E+07	1.63E+07
Quercetina 3-O-glucósido (Isoquercetina)	1.70E+08	1.43E+08	8.78E+07
Quercetina-3-O-malonilglucósido	2.14E+08	2.09E+08	1.45E+08
Kaempferol-3-O-glucósido + 4. Luteolina-4'-O-glucósido	4.95E+06	3.23E+06	2.96E+06
Isorhamnetina-3-O-malonilglucósido	1.55E+08	1.36E+08	8.79E+07
Naringenina	3.23E+07	3.60E+07	4.59E+07
Naringenina chalcona	7.09E+06	3.66E+06	1.40E+07
Pinocebrina	5.24E+07	3.36E+07	7.22E+07
Glabridina	4.69E+07	5.19E+07	1.97E+06
Isosakuranetina + Sakuranetina	7.22E+07	5.81E+07	8.44E+07
rac 8-Prenylnaringenin (Soporaflavanona B)	6.06E+07	3.46E+07	1.22E+08
Tetrahidrocurcumina	2.35E+06	1.07E+06	2.89E+06
Demetoxicurcumina	2.86E+08	1.95E+08	3.45E+08
Xanthohumol	2.51E+07	1.05E+07	4.74E+07

Al carecer de patrón para cada uno de los compuestos detectados no se llevó a cabo el cálculo de la concentración de estos, sin embargo, los valores de área obtenidos permitieron inferir diferencias en la composición fenólica de las diferentes muestras.

7. DISCUSIÓN

Gracias al uso de UHPLC-HRMS combinado con un analizador Exactive Q Orbitrap se han identificado tentativamente en este estudio 14 nuevos compuestos fenólicos en *P. oceanica*: Mascarósido, eriodictiol, kaempferol-3-O-glucoside + 4 luteolin-4'-O-glucoside, naringenina, naringenina chalcona, pinocembrina, glabridina, isosakuranetina + sakuranetina, sophoraflavanona B, tetrahidrocurcumina, demetoxicurcumina y xanthohumol. Estos compuestos fenólicos han sido previamente tentativamente identificados (Astudillo-Pascual et al., 2021) en un trabajo realizado de forma paralela a este estudio, pero con diferentes muestras de *P. oceanica*, confirmando la fiabilidad y robustez del método.

El ácido chicórico, compuesto fenólico principal de las hojas de *P. oceanica* (Grignon-Dubois and Rezzonico, 2015), se encuentra en las hojas jóvenes en una mayor cantidad, a pesar de que en nuestro estudio las hojas más jóvenes fueron retiradas, fue tentativamente detectado en todas las muestras. El ácido caftárico, el segundo compuesto por orden de concentración en hojas de *P. oceanica* (Grignon-Dubois and Rezzonico, 2015; Dumay et al., 2004) fue tentativamente identificado en este estudio. Los ácidos caftárico, p -cumarico, ferúlico, cafeico, abundantes en hojas de *P. oceanica* (Mehmet Zeki Haznedaroglu y Ulvi Zeybek, 2007), fueron tentativamente identificados en todas las muestras del presente estudio. Los principales flavonoles en *P. oceanica* kaempferol, quercetina, isorhamnetina y miricetina (Cannac et al., 2006), fueron a excepción de miricetina, tentativamente identificados en las muestras objeto de estudio. Identificar tentativamente los principales compuestos fenólicos incluyendo 14 nuevos compuestos fenólicos valida nuestra metodología.

El objetivo del estudio es conocer e identificar cambios en los compuestos fenólicos presentes en hojas de *P. oceanica* en función de un gradiente de cercanía a la costa y analizar la hipótesis de la influencia costera en *P. oceanica*. Por ello se tomaron 3 muestras, a diferente distancia de costa, para estimar la posible influencia del estrés costero en su composición fenólica y en sus valores de área del ion precursor como indicador de concentración. Se identificaron tentativamente 16 compuestos fenólicos pertenecientes a la familia de los flavonoides en las 3 muestras (RM3.1, RM3.2 y RM3.3). Los flavonoides actúan como sistema de defensa frente a las agresiones externas como señalizadores químicos y ejerciendo efectos sobre enzimas que afectan al metabolismo y fisiología de los vegetales (Quiñones et al., 2012). Se muestra una comparativa del área del ion precursor para los compuestos pertenecientes a la familia de los flavonoides entre las muestras RM3.1, RM3.2 y RM3.3, a excepción de los compuestos: Kaempferol 3-O- glucósido + 4. Luteolina-4'-O-glucósido, procianidina B1 y B2, por la diferencia de escala (Figura 8). No obstante, se incluirán en el análisis de datos.

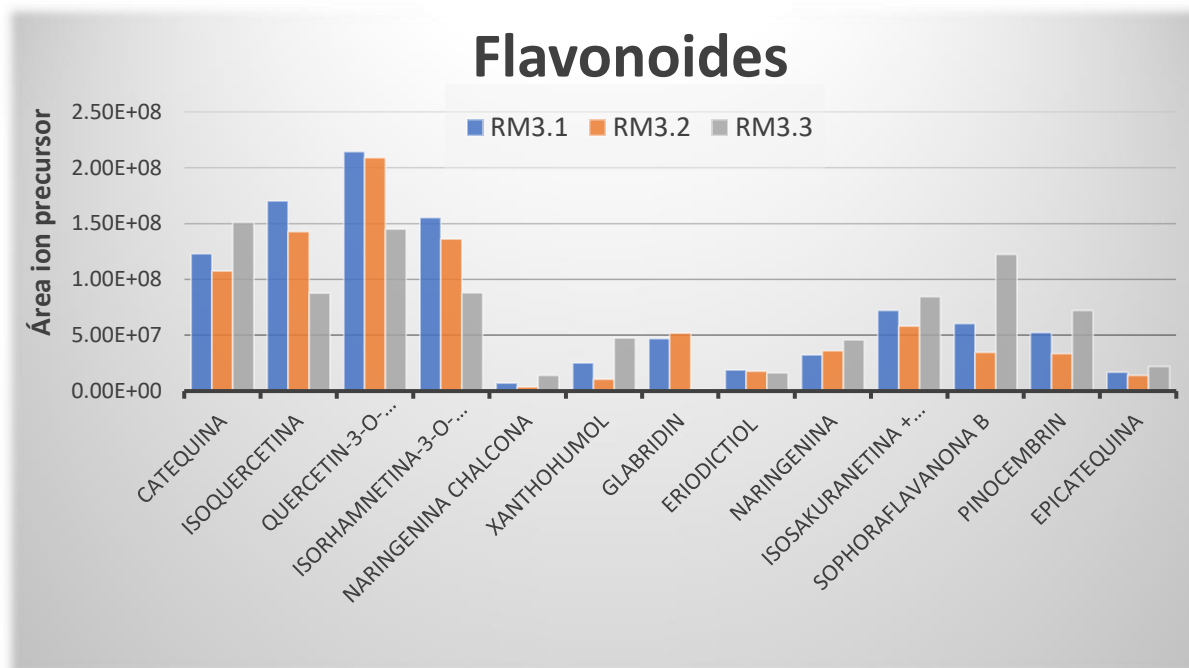


Figura 8. Área ion precursor de los flavonoides en las muestras RM3.1, RM3.2 Y RM3.3.

Se observa que comparando la muestra RM3.1 más cercana a costa (25 m), con la muestra RM3.2 (40 m), inmediatamente más alejada, los flavonoides presentes en la muestra más cercana (RM3.1), poseen un área mayor en su ion precursor para todos los casos a excepción de naringenina y glabridin. Estos datos indican la presencia de una mayor concentración de flavonoides en la muestra recolectada, según los valores de área obtenidos, a 25m de la costa (RM3.1) indicando un posible incremento de agresiones en un gradiente hacia la costa al comparar las muestras RM3.1 y RM3.2. Resultados que, a priori, confirman la hipótesis de que un factor estresante proveniente de costa de posible origen humano afecta a *P. oceanica*. Para refutar esta hipótesis debe mantenerse el gradiente de reducción del área del ion precursor alejándose de la costa en la muestra RM3.3 (60m), pero esta dinámica solo se produce en 5 de los 16 flavonoides: isoquercetina, quercetina-3-O-malonilglucósido, kaempferol-3-O-glucósido + 4. luteolina-4'- glucósido, isorhamnetina-3-O-malonilglucósido y eriodictiol. Un factor a tener en cuenta en el análisis de los datos es que las muestras no fueron tomadas a igual profundidad, por lo que puede ser determinante para refutar la hipótesis del estrés de origen costero, ya que uno de los principales condicionantes para determinar el contenido de la mayoría de los compuestos fenólicos es la exposición a la luz solar (Quiñones et al., 2012) variando la concentración total de compuestos fenólicos con la profundidad en las hojas de *P. oceanica* (Dumay et al., 2004).

Para eliminar el factor profundidad de la hipótesis del gradiente costero comparamos todos los flavonoides tentativamente identificados (Figura 9) en dos muestras a igual profundidad (1m) y diferente distancia a costa RM3.1 (25m) y RM3.3 (60m).

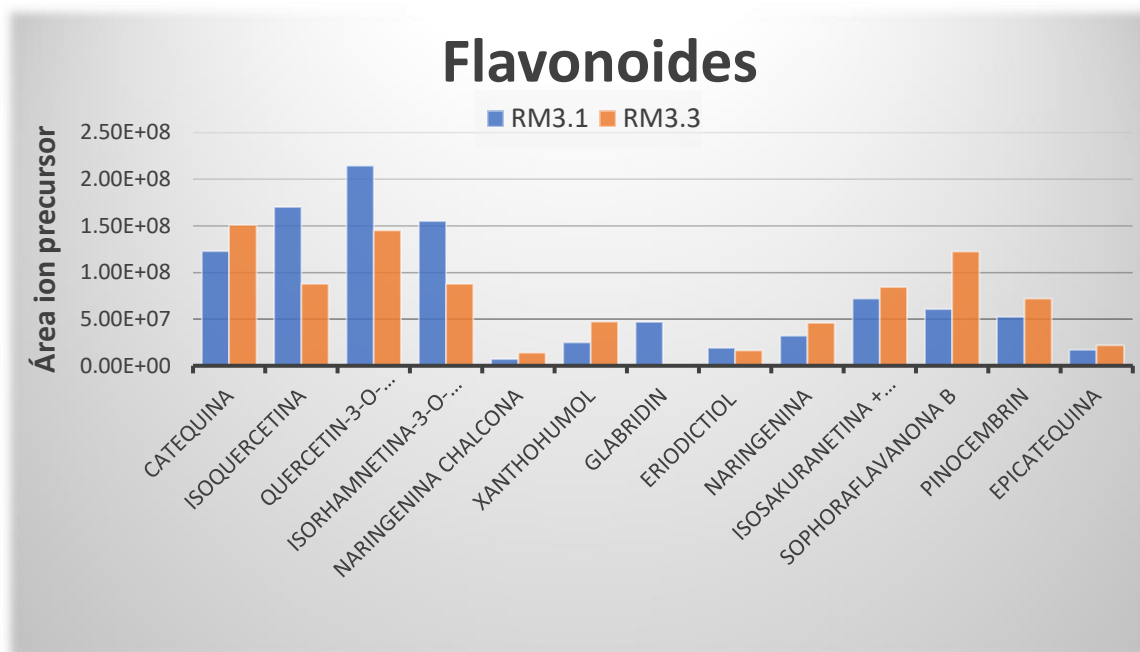


Figura 9. Área ion precursor de los flavonoides en las muestras RM3.1 y RM3.3.

Se observa que la tendencia a disminuir la concentración al alejarse de costa se produce en 6 de los 16 flavonoides no confirmando la hipótesis del estrés de origen costero (Figura 9). Los compuestos fenólicos presentes en hierbas marinas varían en respuesta a lesiones ambientales (Cozza et al., 2004) o diferentes condiciones ambientales (Papenbrock, 2012), lo que apoya la hipótesis de que un factor estresante proveniente de costa afectara los compuestos fenólicos de *P. oceanica*. Para confirmar si el estrés es de origen costero se analiza la familia tentativamente identificada de los ácidos hidroxicinámicos. Se muestran los ácidos hidroxicinámicos tentativamente identificados en todas las muestras, a excepción del ácido chicórico y mascarósido, por la gran diferencia de escala (Figura 10). No obstante, se incluyen en el análisis de los resultados.

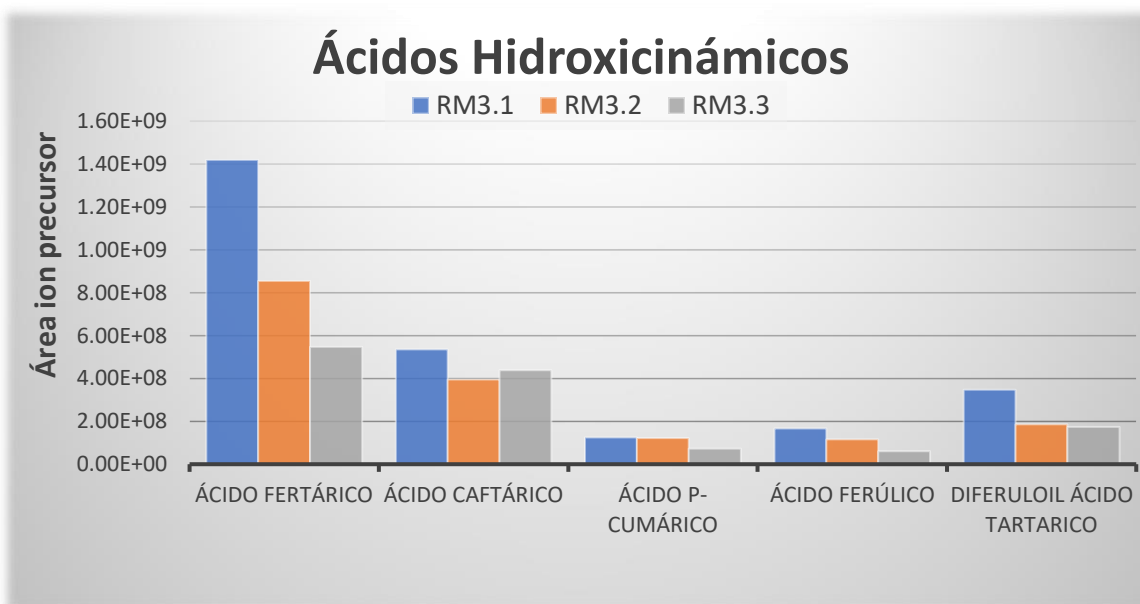


Figura 10. Área ion precursor de los ácidos hidroxicinámicos en las muestras RM3.1, RM3.2 Y RM3.3.

Para todas las muestras, la totalidad de los ácidos hidroxicinámicos tentativamente identificados, presentan una mayor área del ion precursor en la muestra más cercana a la costa, indicando una mayor concentración de ácidos hidroxicinámicos en la muestra recolectada a 25 m de la costa. En un gradiente alejándose de costa, el área del ion precursor sigue una tendencia a disminuir a excepción del ácido caftárico y chicórico. De manera análoga al caso de la familia de los flavonoides descartamos el factor profundidad comparando en las muestras RM3.1 y RM3.3 los compuestos fenólicos pertenecientes a la familia de los ácidos hidroxicinámicos (Figura 11). Eliminamos el ácido chicórico y mascarósido por la diferente escala, no obstante, se analizarán en los resultados.

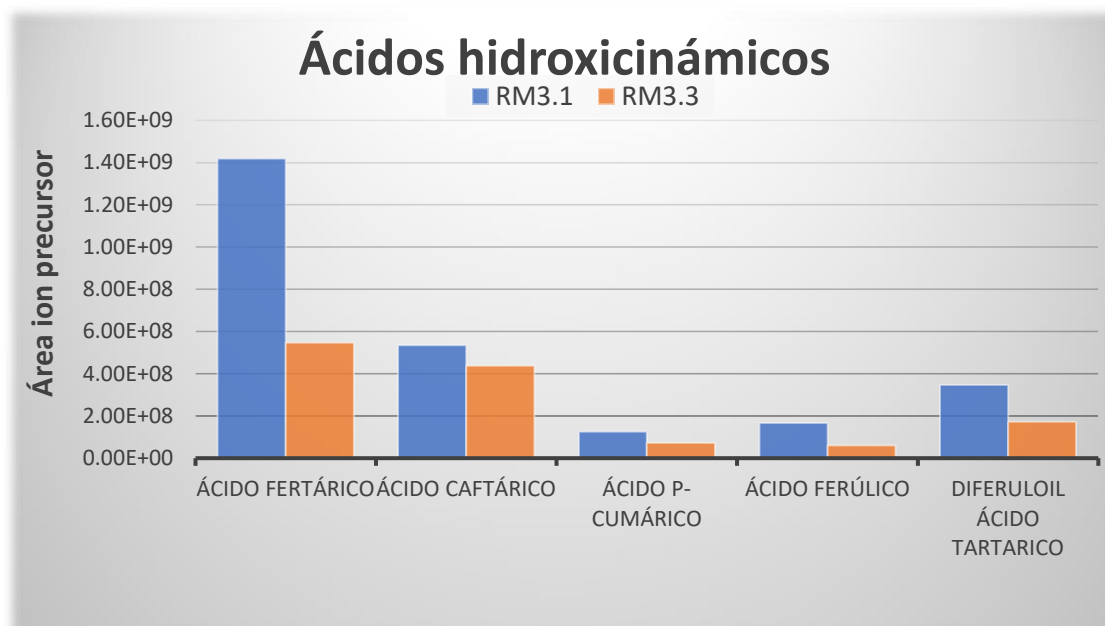


Figura 11. Área ion precursor de los ácidos hidroxicinámicos en las muestras RM3.1 y RM3.3.

Para todos los ácidos hidroxicinámicos se cumple la hipótesis del gradiente costero a igual profundidad.

8. CONCLUSIONES

El análisis de hojas de *P. oceanica* mediante UHPLC-Q Orbitrap MS permitió realizar análisis retrospectivos identificando tentativamente 26 compuestos fenólicos mediante sus fragmentos característicos y relación isotópica, encontrando 14 nuevos compuestos fenólicos en hojas de *P. oceanica*.

Los valores de área obtenidos en la totalidad de los ácidos hidroxicinámicos eran superiores en la muestras más cercanas a costa, pudiendo ser bioindicador de estrés de origen costero de posible influencia humana.

La metodología analítica empleada se propone como protocolo en el estudio de compuestos fenólicos en angiospermas marinas como bioindicador de alerta temprana.

Se recomienda la continuación de los estudios con la determinación individual de compuestos fenólicos en respuesta a los diferentes factores de estrés en *P. oceanica*.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Agostini, S., Desjobert, J.M. and Pergent, G. (1998). Distribution of phenolic compounds in the seagrass *Posidonia oceanica*. *Phytochemistry* 1998, 48, 611–617.
- Ani, V. and Naidu, K.A. (2008). Antihyperglycemic activity of polyphenolic components of black/bitter cumin *Centratherum*. *Eur Food Res Technol* (2008) 226:897–90.
- Aron, P.M. and Kennedy, J.A. (2008). Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2008, 52: 79-104.
- Astudillo-Pascual, M., Domínguez, I., Aguilera, P.A. and Garrido Frenich, A. (2021). New Phenolic Compounds in *Posidonia oceanica* Seagrass: A Comprehensive Array Using High Resolution Mass Spectrometry. *Plants* 2021, 10: 864.
- Barros, L., Dueñas, M., Alves, C. T., Silva, S., Henriques, M., Santos-Buelga, C. and Ferreira, I. C. (2013). Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus ladanifer* phenolic extracts. *Industrial Crops and Products*, 41, 41-45.
- Barros, L., Dueñas, M., Dias, M. I., Sousa, M. J., Santos-Buelga, C., and Ferreira, I. C. (2012). Phenolic profiles of in vivo and in vitro grown *Coriandrum sativum* L. *Food Chemistry*, 132(2), 841-848.
- Baño, M. J., Lorente, J., Castillo, J., Benavente, O., del Río, J. A., Ortuño, A., . . . Gerard, D. (2003). Phenolic Diterpenes, Flavones, and Rosmarinic Acid Distribution during the Development of Leaves, Flowers, Stems, and Roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4247-4253.
- Bell, J.D. and Harmelin-Vivien, M.L. (1982). Fish fauna of French Mediterranean *Posidonia oceanica* seagrass meadows.1. Community structure. *Téthys*, 10 (4): 337-347
- Bellan-Santini, D., Lacaze, J.C. et Poizat, C. (1994). Les biocénoses marines et littorales de Méditerranée, synthèse, menaces et perspectives. *Muséum National d'Histoire Naturelle publ.*, Paris: 1-246.
- Benavente-García, O. A. and Castillo, J. (2008). Update on uses and properties of citrus flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, 56: 6185- 6205.
- Bonacorsi, M., Pergent-Martini, C., Breand, N. and Pergent, G. (2013). Is *Posidonia oceanica* regression a general feature in the Mediterranean Sea. *Mediterr. Mar. Sci.* 2013, 14, 193–203.
- Boudouresque, C.F. et Meinesz, A. (1982). Découverte de le herbier de *Posidonia*. *Cach Parc Nation Port Cros, Fr.*, 4: 1-79
- Boudouresque, C.F., Meisnez, A., Ledoyer, M. et Vitiello, P. (1994). Les herbiers á Phanérogames marines. Les biocénoses marines litorales de Méditerranée. Synthèse, menaces et perspectives. Bellan-Santini D., Lacaze Poizat C. (Eds.). *Muséum National d'Histoire Naturelle publ.*, Fr.: 98-118.
- Boudouresque, C.F. (2004). Marine biodiversity in the Mediterranean: status os species, population and communities. *Sci Rep Port Cros nati Park* 20:97-146.
- Boudouresque, C.F., Bernard, G., Bonhomme, P., Charbonnel E., Diviacco G., Meinesz A., ... Tunesi L. (2006). Préservation et conservation des herbiers à *Posidonia oceanica*. *RAMOGE pub.*: 1-202.
- Boudouresque, C.F., Bernard G., Pergent G., Shili A. y Verlaque M. (2009). Regresión de pastos marinos mediterráneos causada por procesos naturales y perturbaciones antropogénicas y estrés: una revisión crítica. *Bot.* 52: 395–418.
- Boudouresque, C.F., Bernard, G. Bonhomme, P., Charbonnel E., Diviacco, G., Meinesz, A.,

- Tunesi, L. (2012). Protection and conservation of *Posidonia oceanica* meadows. RAMOGE and RAC/SPA publisher, Tunis:1-202.
- Boumaza, S., Boudefoua, N., Boumaza, R. and Semroud, R. (2014). Effects of urban effluents on spatial structure, morphology and total phenols of *Posidonia oceanica*: Comparison with a reference site. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2014, 457, 113–119.
- Bravo L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutrition reviews, 56(11): 317-333.
- Bursal, E., Köksal, E., Gülçin, İ., Bilsel, G. and Gören, A. C. (2013). Antioxidant activity and polyphenol content of cherry stem (*Cerasus avium* L.) determined by LC–MS/MS.
- Cannac, M., Ferrat, L., Pergent-Martini, C., Pergent, G. y Pasqualini, V. (2006). Efectos de la piscicultura sobre los flavonoides en *Posidonia oceanica*. *Sci. Entorno total*. 370: 91–98.
- Ceccherelli, G., Oliva, S., Pinna, S., Piazzini, L., Procaccini, G., Marin-Guirao, L. ... Bulleri, F. (2018). Seagrass collapse due to synergistic stressors is not anticipated by phenological changes. *Oecologia* 2018, 186, 1137–1152.
- Chaher, N., Arraki, K., Dillinseger, E., Tamsamani, H., Bernillon, S., Pedrot, E. . . . Richard, T. (2014). Bioactive stilbenes from vitis vinifera grapevine shoots extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(5), 951-954.
- Chen, Y., Guo, Z., Wang, X., and Qui, C. (2008). Sample preparation. *Journal of Chromatography A*, 1184, 191-219.
- Cornara, L., Pastorino, G., Borghesi, B., Salis, A., Clericuzio, M., Marchetti, C., ... Burlando, B. (2018). El extracto etanólico de *Posidonia oceanica* (L.) Delile modula las actividades celulares con aplicaciones para la salud de la piel. *Drogas marinas*, 16 (1): 21.
- Covey, T. R., Thomson, B. A., and Schneider, B. B. (2009). Atmospheric pressure ion sources. *Mass Spectrometry Reviews*, 28, 870–897.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999, 4, 564-582.
- Cozza, R., Chiappetta, A., Petrarulo, M., Salimonti, A., Rende, F., Bitonti, M., and Innocenti, A. (2004). Cytophysiological features of *Posidonia oceanica* as putative markers of environmental conditions. *Chemistry And Ecology*, 20(3), 215-223.
- Croteau, R., Kutchan, T.M. and Lewis, N.G. (2000) Natural Products (Secondary Metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 24, 1250-1319.
- Creus, E. G. (2004). Compuestos fenólicos. *Offarm*, 23(6), 81-84.
- Cuny, P., Serve, L., Jupin, H. and Boudouresque, C. (1995). Water soluble phenolic compounds of the marine phanerogam *Posidonia oceanica* in a Mediterranean area colonised by the introduced chlorophyte *Caulerpa taxifolia*. *Aquat. Bot.* 1995, 52, 237–242.
- de la Rosa, L. A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García and J. Alvarez-Parrilla, E. (2019). Phenolic Compounds. In *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*; Elsevier: 253–271.
- Díaz Almela, E. y Marbà, N., (2009). Bases ecológicas preliminares para la conservación de los tipos de hábitat de interés comunitario en España. Madrid. Edita: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. ISBN: 978-84-491-0911-9.
- Díaz Almela, E. (2012). Estudio del valor socioeconómico de las praderas de *Posidonia oceanica* de Andalucía como sumideros de carbono y oportunidades de financiar su conservación a través de fondos para la mitigación del cambio climático. E-TIS Andalucía. Granada.
- Dragovic-Uzelac, V., Levaj, B., Mrkic, V., Bursac, D. and Boras, M. (2007). The content of

- polyphenols and carotenoids in three apricot cultivars depending on stage of maturity and geographical region. *Food Chemistry*, 102(3), 966-975.
- Duarte, C.M., Losada, I.J., Hendriks, I.E., Mazarra, I. and Marbà, N. (2013). The role of coastal plant communities for climate change mitigation and adaptation. *Nat. Clim. Chang.* 2013, 3.
- Dumay, O., Costa, J., Desjobert, J. and Pergent, G. (2004). Variations in the concentration of phenolic compounds in the seagrass under conditions of competition. *Phytochemistry* 2004, 65, 3211–3220.
- Dziedzic, S.Z. and Hudson, B.J.F. (1984). Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils. *Food Chemistry*. 1984, 14: 45-5
- Fekete, S., Schappler, J., Veuthey, J.L. and Guillarme, D. (2014). Current and future trends in UHPLC. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 63, 2–13.
- Francour, P., Poulain, M., Bernard, G., Bonhomme, P. et Charbonnel, E. (1997). Impact des mouillages forains sur l'herbier á *Posidonia oceanica* dans le Parc national de Port-cros (Méditerranée Nord-occidentale). *Contract Parc national de Port-Cros & GIS Posidonie*, GIS Posidonie publ., Fr.: 1-51.
- García Raso, J. E., Luque, Á. A., Templado, J., Salas, C., Hergueta, E., Moreno, D. y Calvo, M. (1992). Fauna y flora marinas del Parque Natural de Cabo de Gata-Níjar. *Praderas de fanerógamas marinas* (pp. 140-163) Madrid. Edición: Conserjería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía. ISBN 84-604-3794-9.
- Gómez-Pujol, L., Orfila, A., Álvarez-Ellacuría, A., Terrados, J. and Tintor, J. (2013). *Posidonia oceanica* beach-cast litter in Mediterranean beaches: a coastal videomonitoring study. *Journal of Coastal Research*, SI 65(2): 1768-1773.
- Granados Povedano, M. (2020). Identificación de compuestos fenólicos en brotes y macrófitas comestibles mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (Exactive-Orbitrap) [Trabajo Fin de Máster]Universidad de Almería.
- Grignon-Dubois, M. and Rezzonico, B. (2015). Phenolic fingerprint of the seagrass *Posidonia oceanica* from four locations in the Mediterranean Sea: first evidence for the large predominance of chicoric acid. *Botanica Marina*, 58(5): 379-391.
- Guillarme, D., and Veuthey, J.L. (2017). Theory and Practice of UHPLC and UHPLC–MS. *Handbook of Advanced Chromatography/mass Spectrometry Techniques*, 1–38.
- Hale, A. L., Reddivari, L., Nzaramba, M. N., Bamberg, J. B. and Miller Jr, J. C. (2008). Interspecific variability for antioxidant activity and phenolic content among *Solanum* species. *American journal of potato research*, 85(5), 332-341.
- Haznedaroglu, M.Z. and Zeybek, U. (2007). HPLC determination of chicoric acid in leaves of *Posidonia oceanica*. *Pharm. Biol.* 2007, 45, 745–748.
- Holčapek, M., Jirásko, R. and Lída, M. (2012). Recent developments in liquid chromatography–mass spectrometry and related techniques. *Journal of Chromatography A*, 1259, 3–15.
- Kaal, J., Serrano, O., Nierop, K.G.J., Schellekens, J., Martínez Cortizas, A. and Mateo, M.Á. (2016). Molecular composition of plant parts and sediment organic matter in a Mediterranean seagrass (*Posidonia oceanica*) mat. *Aquat. Bot.* 2016, 133, 50–61.
- Kozikowski, A., Tückmantel, W., Böttcher, G. and Romanczyk, L. (2003). Studies in Polyphenol Chemistry and Bioactivity. 4.1 Synthesis of Trimeric, Tetrameric, Pentameric, and Higher Oligomeric Epicatechin-Derived Procyanidins Having All-4 β ,8-Interflavan Connectivity and Their Inhibition of Cancer Cell Growth through Cell Cycle Arrest1. *The Journal of Organic Chemistry*, 68(5), 1641-1658.
- Kozubek, A. and Tyman, J.H.P. (1999). Resorcinolic lipids, the natural non-isoprenoid phenolic

- amphiphiles and their biological activity, *Chemical Reviews*. 1999, 99: 1-26.
- Luque, Á.A. y Templado, J. (2004). Praderas y bosques marinos de Andalucía. Sevilla. Edición: Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. ISBN: 84-96329-22-4.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C and Jimenez L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*; 79: 727-747.
- Mas, J., Franco I. y Barcala, E. (1993). Primera aproximación a la cartografía de las praderas de *Posidonia oceanica* en las costas mediterráneas españolas. Factores de alteración y de regresión. *Legislación. Publicaciones Especiales del Instituto Español de oceanografía*, 11: 111-122.
- Mehmet Zeki Haznedaroglu y Ulvi Zeybek (2007). Determinación por HPLC de ácido chicórico en hojas de *Posidonia oceanica*. *Biología farmacéutica*, 45:10: 745-748.
- Mennella, G., Rotino, G. L., Fibiani, M., D'Alessandro, A., Francese, G., Toppino, L., . . . Lo Scalzo, R. (2010). Characterization of Health-Related Compounds in Eggplant (*Solanum melongena* L.) Lines Derived from Introgression of Allied Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(13), 7597-7603.
- Micheli, C., Paganin, P., Peirano, A., Caye, C., Meinesz, A. and Bianchi, C.N. (2005). Genetic variability of *Posidonia oceanica* (L.) Delile in relation to local factors and biogeographic patterns. *Aquat. Bot.* 2005, 82, 210–221.
- Migliore, L., Rotini, A., Randazzo, D., Albanese, N.N. and Giallongo, A. (2007). Phenol contents and 2D electrophoresis protein pattern: A promising tool to monitor *Posidonia* meadow health state. *BMC Ecol.* 2007, 7, 6.
- Moretti, S., Dusi, G., Giusepponi, D., Pellicciotti, S., Rossi, R., Saluti, G. ... Galarini, R. (2015). Screening and confirmatory method for multiclass determination of 62 antibiotics in meat. *Journal of Chromatography A*, 1429, 175–188.
- Muñoz Jáuregui, A. M., Alvarado-Ortiz Ureta, C., Blanco Blasco, T., Castañeda Castañeda, B., Ruiz Quiroz, J., and Alvarado Yarasca, Á. (2014). Determinación de compuestos fenólicos, flavonoides totales y capacidad antioxidante en mieles peruanas de diferentes fuentes florales. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 80(4), 287-297.
- Myers, N., Mittermeier, R., Mittermeier, C. da Fonseca, G. and Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853–858.
- Nováková, L., and Vlčková, H. (2009). A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Analytica Chimica Acta*, 656, 8-35.
- Núñez, O., Gallart-Ayala, H., Ferrer, I., Moyano, E. and Galceran, M. T. (2012). Strategies for the multi-residue analysis of 100 pesticides by liquid chromatography–triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1249, 164–180.
- Oniszczyk, A., Podgórski, R., Oniszczyk, T., Żukiewicz-Sobczak, W., Nowak, R. and Waksmundzka-Hajnos, M. (2014). Extraction Methods for the Determination of Phenolic Compounds from *Equisetum Arvense* L. *Herb. Ind. Crops Prod.* 2014, 61: 377–381.
- Papenbrock, J. (2012). Highlights in Seagrasses Phylogeny, Physiology, and Metabolism: What Makes Them Special? *ISRN Botany*, 2012, 1-15.
- Pasqualini, V., Pergent-Martini, C., Clabaut, P. and Pergent, G. (1998). Mapping of *Posidonia oceanica* Using Aerial Photographs and Side Scan Sonar: Application off the Island of Corsica (France). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 47, 359-367.
- Peñarrieta, J. M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., and Bravo, J. A. (2014). Phenolic compounds in food. *Revista boliviana de química*, 31(2), 68-81.

- Pergent-Martini, C., Leoni, V., Pasqualini, V., Ardizzone, G.D., Balestri, E., Bedini, R. ... Velimirov, B. (2005). Descriptors of *Posidonia oceanica* meadows: Use and application. *Ecol. Indic.* 2005, 5, 213–230.
- Petillo, D. and Hultin, H.O. (2008). Ubiquinone-10 as an antioxidant. *Journal of Food Biochemistry.* 2008, 32: 173-181.
- Priyadharshini, D. S. and Sujatha, V. (2013). Antioxidant profile and GC-MS analysis of *Solanum erianthum* leaves and stem. A comparison. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3), 652-658.
- Pulido-Moran, M., Moreno-Fernandez, J. and Ramirez-Tortosa, C. (2016). Ramirez-Tortosa, M. Curcumin and Health. *Molecules* 2016, 21, 264.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat, C. and Pouységu, L. (2011). Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(3), 586-621.
- Quiñones, M., Miguel, M. y Aleixandre, A. (2012) Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*, 27(1): 76-89.
- Rani, P. and Devanand, P. (2013). Bioactivities of caffeic acid methyl ester (methyl-(E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl) prop-2-enoate): a hydroxycinnamic acid derivative from *Solanum melongena* L. fruits. *Journal Of Pest Science*, 86(3), 579-589.
- Roig i Munar F.X. (2001). El conocimiento de la *Posidonia oceanica* y sus funciones ecológicas como herramienta de gestión litoral. *Papeles de Geografía*, 34: 271- 280.
- Ruipérez, M., Salazar, J.M., Alarcón, D., Verborgh, P., Meizoso, M.J. y de Stephanis, R. (2012). *Posidonia* en tus manos. Guía didáctica sobre las praderas de *Posidonia oceanica*. Proyecto LIFE09 NAT/ES/000534. Algeciras. Editorial CIRCE.SE: 1173-2012.
- Ruiz, J.M. y Romero, J. (2003). Efectos de las perturbaciones provocadas por las construcciones costeras sobre la estructura espacial, la dinámica de crecimiento y la fotosíntesis de la pradera marina *Posidonia oceanica*. *Mar. Pollut. Toro.* 46: 1523-1533.
- Saigne, C., Richard, T., Mérillon, J.-M. and Monti, J.-P. (2006). ¹³C NMR analysis of polyphenol biosynthesis in grape cells: Impact of various inducing factors. *Analytica Chimica Acta*, 563(1– 2), 137-144.
- Sagredo, B., Lorenzen, J., Casper, H. and Lafta, A. (2011). Linkage analysis of a rare alkaloid present in a tetraploid potato with *Solanum chacoense* background. *Theoretical and Applied Genetics*, 122(3), 471-478
- Santamaría, L. (2017). Identificación de reductasas de ácidos hidroxicinámicos y sus derivados en *Lactobacillus plantarum* WCFS1 (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, España.
- Schwartz, H., Sontag, G. and Plumb, J. (2009). Inventory of phytoestrogen databases. *Food Chemistry.* 2009, 113: 736-747.
- Selma, M.V, Espín, J.C. and Tomás-Barberán, F.A. (2009). Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2009, 57(15), 6485–6501.
- Serve, L., Piovetti, L. et Combout, G. (1984). Analyse des substances phenoliques des restes de *Posidonia oceanica*. (L.) Delile provenanton sediments holocenes et de deposits actuels. In *GIS Posidonia International Workshop* 137-144 (1984).
- Singh, B.N., Singh, B.R., Singh, R.L., Prakash, D., Singh, D.P. Sarma, B.K. ... Singh, H.B. (2009). Polyphenolics from various extracts/fractions of red onion (*Allium cepa*) peel with potent antioxidant and antimutagenic activities. *Food and Chemical Toxicology.* 2009,

- 47: 1161-1167.
- Steiner, C., Arnould, S., Scalbert, A. and Manach, C. (2008). Isoflavones and the prevention of breast and prostate cancer: new perspectives opened by nutrigenomics. *British Journal of Nutrition*. 2008, 99: ES78-ES108.
- Sytařová, I., Orsavová, J., Snopek, L., Mlček, J. and Byczyński, Ł. (2020). Mišurcová, L. Impact of Phenolic Compounds and Vitamins C and E on Antioxidant Activity of Sea Buckthorn (*Hippophaë Rhamnoides* L.) Berries and Leaves of Diverse Ripening Times. *Food Chem*. 2020, 310.
- Tigny, V., Ozer, A., De Falco, G., Baroli, M. and Djenidit, S. (2007). Relationship between the Evolution of the Shoreline and the *Posidonia oceanica* Meadow Limit in a Sardinian Coastal Zone. *Journal of Coastal Research*, 23(3): 787-793.
- Tomás-Barberán, F. A. and Clifford, M. N. (2000). Flavanones, chalcones and dihydrochalcones-nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric*. 2000, 80, 1073-1080.
- Thurman, E. M., Ferrer, I., Zweigenbaum, J. A., García-Reyes, J. F., Woodman, M., and Fernández-Alba, A. R. (2005). Discovering metabolites of post-harvest fungicides in citrus with liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry 46 and ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1082, 71–80.
- Vafeiadou, K., Vauzour, D., Lee, H.Y., Rodríguez-Mateos, A., Williams, R.J. and Spencer, J.P.E. (2009). The citrus flavanone naringenin inhibits inflammatory signalling in glial cells and protects against neuroinflammatory injury. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2009, 484: 100-109.
- Van der Sluis, A.A., Dekker, M., de Jager, A. and Jongen, W.M. (2001). Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *J Agric Food Chem*; 49: 3606-3613.
- Vermerris, W. and Nicholson, R. (2008). *Phenolic compound biochemistry*, Springer Science+Business Media B.V., Berlin. 2008.
- Wang, L. and Weller, C.L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Technol*, 17, 300-312.
- Yamaguchi, N., Satoh-Yamaguchi, K. and Ono, M. (2008). In vitro evaluation of antibacterial, anticollagenase, and antioxidant activities of hop components (*Humulus lupulus*) addressing acne vulgaris. *Phytomedicine*. 2008, 16: 369-376.
- Zadra, M., Piana, M., Brum, T. F. d., Boligon, A. A., Freitas, R. B. d., Machado, M. M., . . . Athayde, M.L. (2012). Antioxidant Activity and Phytochemical Composition of the Leaves of *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil. *Molecules*, 17(11), 12560-12574.
- Zhou, J., Xu, J. J., Cong, J. M., Cai, Z. X., Zhang, J. S., Wang, J. L., and Ren, Y.P. (2018). Optimization for quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe extraction of mycotoxins and veterinary drugs by response Surface methodology for application to egg and milk. *Journal of Chromatography A*, 1532, 20-29.
- Zhu, R., Zhao, Z., Wang, J., Bai, B., Wu, A., Yan, L. and Song, S. (2015). A simple sample pretreatment method for multi-mycotoxin determination in eggs by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1417, 1–7.
- Zidorn, C. (2016). Secondary metabolites of seagrasses (Alismatales and Potamogetonales; Alismatidae): Chemical diversity, bioactivity, and ecological function. *Phytochemistry* 2016, 124, 5–28.

Legislación

Comunidad Económica Europea. Directiva 92/43, de 21 de mayo de 1992, de conservación hábitats naturales y flora y fauna salvaje. Anexo I, Código CORINE 11.34. pp: 206/16.
European Commission. Directive 2008/56/EC of the European Parliament and of the Council of 17 June 2008 establishing a framework for Community actions in the field of marine environmental policy (Marine Strategy Framework Directive). Off. J. Eur. Communities 2008, 164, 19–40.

Contenido web

Google Earth. 2021. Consultado: 3 de junio de 2021. <https://earth.google.com/web>
Juntadeandalucia.es. (2021). Consultado: 15 de mayo de 2021. http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/portal_web/web/temas_ambientales/educacion_ambiental_y_formacion_nuevo/aldea/programas/cuidemos_costa/recursos/materialcorrelimos/posidonia.pdf.

10. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AIF: Fragmentación de todos los iones (*All Ion Fragmentation*).
APCI: Ionización química a presión atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*).
API: Ionización a presión atmosférica (*Atmospheric Pressure Ionization*).
APPI: Fotoionización a presión atmosférica (*Atmospheric Pressure Photoionization*).
ESI: Ionización por electrospray (*Electrospray ionization*).
Full scan: Barrido completo.
GC: Cromatografía de gases (*Gas Chromatography*).
GC-MS: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (*Gas chromatography–mass spectrometry*)
HCD: Disociación inducida por colisión de mayor energía (Higher energy Collision induced Dissociation).
HESI: Electrospray de alta temperatura (*Heated Electrospray Ionization*)
HPLC: Cromatografía de líquidos de alta eficacia (*High Performance Liquid Chromatography*).
HPLC-DAD: Cromatografía de líquidos de alta eficacia acoplada a un detector ultravioleta-visible de diodos (*High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection*).
HPLC-DAD-ESI/MS: Cromatografía de líquidos de alta eficacia acoplada a un detector Ultravioleta-Visible de diodos y un detector de masas con ionización mediante electrospray (*High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array detection coupled to electrospray mass spectrometry*).
HPLC-UV: Cromatografía de líquidos de alta eficacia acoplada a un detector Ultravioleta-Visible (*High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet detection*).
HRMS: Espectrometría de masas de alta resolución (*High Resolution Mass Spectrometry*).
IT: Trampa de iones (*Ion Trap*).
IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*.
LC: Cromatografía de líquidos (*Liquid Chromatography*).
LC-MS: Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (*Liquid Chromatography- Mass Spectrometry*).
LRMS: Espectrometría de masas de baja resolución (*Low Resolution Mass Spectrometry*)

MAE: Extracción asistida por microondas (*Microwave-Assisted Extraction*).

MS/MS: Espectrometría de masas en tándem (*Tandem mass spectrometry*).

(*m/z*): Relación masa/carga

Non target (compuestos): Compuestos desconocidos.

PLE: Extracción con líquidos presurizados (*Pressurized Liquid Extraction*).

P. oceanica: *Posidonia oceanica*.

ppm: Partes por millón (*parts per million*).

Q: Cuadrupolo (*Quadrupole*).

R: Resolución (*Resolution*).

SFE: Extracción con fluidos supercríticos (*Supercritical Fluid Extraction*).

SLE: Extracción sólido-líquido (*Solid-Liquid Extraction*).

Target (compuestos): *Compuestos diana u objetivo*.

TOF: Tiempo de vuelo (*Time Of Flight*).

UAE: Extracción asistida por ultrasonidos (*Ultrasound-Assisted Extraction*).

UHPLC: Cromatografía de líquidos de ultra alta eficacia (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*).

UHPLC-HMRS: Cromatografía de líquidos de ultra alta eficacia acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (*Ultra High Performance Liquid Chromatography - High Resolution Mass Spectrometry*).

WGS 84: Sistema Geodésico Mundial 1984 (*World Geodetic System 1984*).

11. ANEXOS

ANEXO I

Tabla A1. Lista de compuestos fenólicos incluyendo la masa exacta de los iones precursores y de sus fragmentos característicos.

Compuesto	Composición elemental	Polaridad	Masa teórica (m/z)	Frg1 (m/z)	Frg2 (m/z)	Frg3 (m/z)
Acacetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	ESI+	285.07575	270.05097	242.05613	
Apigenin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	ESI+	271.06065	153.01779		
Apigenin-6-C-glucoside (isovitexin)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	ESI-	431.09782	311.05586	283.06085	269.04518
Apigenin-7-O-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	ESI+	433.11292	271.05908	272.06213	153.01719
Apigenin-7-O-neohesperidoside (rhoifolin)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	ESI+	579.17083	271.05905		
Apigenin-7-O-rutinoside (Isorhoifolin)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	ESI+	579.17083	271.05913	433.11198	
Apigenin-8-C-glucoside (vitexin)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	ESI-	431.09782	311.05563	341.06793	
Baicalein	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	ESI+	271.06010	253.04950		
Bilobalide	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	ESI-	325.09179	163.11152	193.12216	251.09163
Biochanin A	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	ESI-	283.06010	268.03634	239.03364	168.98778
Caffeic acid	C ₉ H ₈ O ₄	ESI-	179.03389	135.04429	134.03628	89.03847
Catechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	ESI+	291.08631	139.03895	123.04502	
Chlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	ESI+	355.10236			

Chrysin	$C_{15}H_{10}O_4$	ESI+	255.06573	153.01764	147.04352	
Cianidin	$C_{15}H_{11}O_6$	ESI+	288.06284	269.04440		
Coumestrol	$C_{15}H_8O_5$	ESI-	267.02935	266.02127	239.03383	211.03881
Daidzein	$C_{15}H_{10}O_4$	ESI+	255.06518	199.07461	137.02277	
Daidzin	$C_{21}H_{20}O_9$	ESI+	417.11801	255.06510		
Delphin	$C_{27}H_{31}O_{17}$	ESI+	628.16340	465.10280		
Delphinidine	$C_{15}H_{11}O_7Cl$	ESI+	339.02660	257.04440		
Ellagic acid	$C_{14}H_6O_8$	ESI+	303.01354	255.00810		
Epicatechin	$C_{15}H_{14}O_6$	ESI-	289.07121	139.03890	123.04491	
Epicatechin gallate	$C_{22}H_{18}O_{10}$	ESI-	441.08162	169.01304	289.07125	125.02318
Epigallocatechin	$C_{15}H_{14}O_7$	ESI-	305.06667	125.02332	255.92270	
Eriocitrin	$C_{27}H_{32}O_{15}$	ESI-	595.16629	287.05505	151.00222	459.11307
Eriodictyol	$C_{15}H_{12}O_6$	ESI-	287.05556	135.04382	151.00235	107.01253
Ferulic acid	$C_{10}H_{10}O_4$	ESI-	193.05008	134.03643	149.06100	178.02640
Fisetin	$C_{15}H_{10}O_6$	ESI-	285.03991	135.00725	121.02799	230.98480
Formononetin	$C_{16}H_{12}O_4$	ESI+	269.08193	254.05581	213.08995	237.05345
Galangin	$C_{15}H_{10}O_5$	ESI-	269.04500	213.05450	223.04036	239.02873

Gallic acid	$C_7H_6O_5$	ESI-	169.01425	125.02319		
Gallocatechin	$C_{15}H_{14}O_7$	ESI+	307.08122	139.03884		
Gallocatechin gallate	$C_{22}H_{18}O_{11}$	ESI-	457.07653	169.01329	125.02340	
Genistein	$C_{15}H_{10}O_5$	ESI+	271.06119	153.01779	215.06962	243.06434
Genistin	$C_{21}H_{20}O_{10}$	ESI+	433.11347	271.06081	253.05010	
Ginkgolide A	$C_{20}H_{24}O_9$	ESI-	407.13365	351.14439	379.13930	363.14500
Ginkgolide B	$C_{20}H_{24}O_{10}$	ESI-	423.12967	367.13862	395.13355	
Ginkgolide C	$C_{20}H_{24}O_{11}$	ESI-	439.12458	383.13336	411.12829	
Ginkgolide J	$C_{20}H_{24}O_{10}$	ESI-	423.12967	130.94299	115.91950	209.04432
Glucoerucine	$C_{12}H_{23}NO_9S_3$	ESI-	420.04621	96.95900		
Glucoiberine	$C_{11}H_{21}NO_{10}S_3$	ESI-	422.02548	96.95900		
Gluconapine	$C_{11}H_{19}NO_9S_2$	ESI-	372.04284	96.95900		
Glucotropaeoline	$C_{14}H_{17}NO_{10}S_2$	ESI-	422.02211	96.95900		
Glunonasturtine	$C_{15}H_{21}NO_9S_2$	ESI-	422.05849	96.95900		
Gluroraphanine	$C_{12}H_{23}NO_{10}S_3$	ESI-	436.04113	96.95900		
Glycitein	$C_{16}H_{12}O_5$	ESI+	285.07575	270.05108	242.05624	225.05455
Glycitin	$C_{22}H_{22}O_{10}$	ESI+	447.12857	285.07575		

Hesperetin	$C_{16}H_{14}O_6$	ESI-	301.07121	164.01013	151.00230	196.00009
Hesperidin	$C_{28}H_{34}O_{15}$	ESI-	609.18194	301.07092	489.13961	343.08132
Hydroxybenzoic acid -4	$C_7H_6O_3$	ESI-	137.02441	93.03325	94.03658	
Isorhamnetin	$C_{16}H_{12}O_7$	ESI-	315.04992	300.02685	151.00245	
Isorhamnetin-3-O-glucoside	$C_{22}H_{22}O_{12}$	ESI+	479.11840	314.04263		
Isorhamnetin-3-O-rutinoside	$C_{28}H_{32}O_{16}$	ESI+	625.17631	315.05080	151.00268	137.02335
Isosakuranetin	$C_{16}H_{14}O_5$	ESI-	285.07575	164.01011		
K-7-O-glucoside	$C_{21}H_{20}O_{11}$	ESI-	447.09274	285.03955	151.00251	257.04496
Kaempferol	$C_{15}H_{10}O_6$	ESI+	287.05611	153.01760		
Kaempferol-3-O-glucoside	$C_{21}H_{20}O_{11}$	ESI-	447.09274	284.03200	255.02924	
Kaempferol-3-O-rutinoside	$C_{27}H_{30}O_{15}$	ESI-	593.1506	285.0397 3		
Luteolin	$C_{15}H_{10}O_6$	ESI-	285.03991	133.02834	151.00260	175.03898
Luteolin-4'-O-glucoside	$C_{21}H_{20}O_{11}$	ESI-	447.09218	285.03995		
Luteolin-6-C-glucoside (homoorientin)	$C_{21}H_{20}O_{11}$	ESI-	447.09274	327.05038	357.06072	299.05528
Luteolin-7-O-glucoside	$C_{21}H_{20}O_{11}$	ESI-	447.09274	133.99052	285.03974	
Luteolin-8-C-glucoside (orientin)	$C_{21}H_{20}O_{11}$	ESI-	447.09274	327.04947	357.06233	297.04014
Malvidine	$C_{17}H_{15}O_7$	ESI-	330.07340	315.04990		

Myricetin	$C_{15}H_{10}O_8$	ESI-	317.02919	151.00262		
Naringenin	$C_{15}H_{12}O_5$	ESI-	271.06065	119.04879	151.00226	107.01245
Naringenin-7-O-rutinosido (narirutin)	$C_{27}H_{32}O_{14}$	ESI-	579.17083	271.06211		
Neohesperidin	$C_{27}H_{32}O_{15}$	ESI-	595.16629	459.11342	151.00215	151.00215
Neohesperidin	$C_{28}H_{34}O_{15}$	ESI-	609.18194	301.07092	489.13961	343.08132
p-Coumaric acid	$C_9H_8O_3$	ESI-	163.03952	119.04881	93.03316	
Pelargonidine	$C_{27}H_{31}O_{15}$	ESI+	596.17357	271.06010		
Peonidine	$C_{16}H_{13}O_6$	ESI+	302.07848	286.04720		
Petunidine	$C_{16}H_{13}O_7$	ESI+	318.07340	302.04210		
Phloretin	$C_{15}H_{14}O_5$	ESI+	275.09140	167.03498		
Phloridzin	$C_{21}H_{24}O_{10}$	ESI-	435.12912	273.07598	167.03357	255.06570
Piceatannol	$C_{14}H_{12}O_4$	ESI-	243.06518	166.10703		
Pinocembrin	$C_{15}H_{12}O_4$	ESI-	255.06573	151.00241	213.05467	
Procyanidin B1	$C_{30}H_{26}O_{12}$	ESI-	577.13460	289.07154	407.07669	125.02329
Progotrine	$C_{11}H_{19}NO_{10}S_2$	ESI+	390.05231	96.95900		
Quercetin	$C_{15}H_{10}O_7$	ESI+	303.04993	201.05453	153.01834	165.01837
Quercetin 3-O-glucoside	$C_{21}H_{20}O_{12}$	ESI-	463.08765	300.02700	302.03696	

Quercetin-3-O-galactoside (hyperoside)	$C_{21}H_{20}O_{12}$	ESI-	463.08765	300.02737	271.02426	
Quercetin-3-O-glucopyranoside	$C_{21}H_{20}O_{12}$	ESI-	463.08765	300.02689		
Quercetin-3-O-rhamnoside (quercitrin)	$C_{21}H_{20}O_{11}$	ESI-	447.09274	230.98517	301.03390	178.99749
Quercetin-3-O-rutinoside (rutin)	$C_{27}H_{30}O_{16}$	ESI-	609.14556	301.03474		
Resveratrol	$C_{14}H_{12}O_3$	ESI+	229.08592	147.09125		
Sakuranetin	$C_{16}H_{14}O_5$	ESI-	285.07630	119.04883	221.15330	165.01802
Sinapic acid	$C_{11}H_{12}O_5$	ESI-	223.06065	121.02821	93.03322	
Sinigrine	$C_{10}H_{16}KNO_9S_2$	ESI-	395.98198	96.95900		
Sulforafane	$C_6H_{11}NOS_2$	ESI+	178.03548	114.03850		
Syringic acid	$C_9H_{10}O_5$	ESI-	197.04444	123.00734	95.01244	182.02067
Tamarixetin	$C_{16}H_{12}O_7$	ESI-	315.04992	302.04100	153.01775	
Vanillic acid	$C_8H_8O_4$	ESI-	167.03443	108.02023	91.01746	152.00996

Tabla A2. Lista de compuestos fenólicos, fuente: (Astudillo-Pascual et al. 2021), masa de iones precursores y de sus fragmentos característicos y polaridad para la matriz *P. oceanica* y otras praderas marinas* (*Cymodocea nodosa*, *Zostera marina* y *Zostera noltii*)

Compuesto	Composición elemental	Polaridad	Masa teórica (m/z)	Frg1 (m/z)	Frg2 (m/z)	Frg3 (m/z)	Frg4 (m/z)
Protocatechualdehy	C ₇ H ₆ O ₃	ESI-	137.02442	136.01660	108.02050	109.03050	
Gambiriin A1	C ₃₀ H ₂₈ O ₁₂	ESI-	579.15080	125.02390	289.07120	151.03950	
Zosteric acid	C ₉ H ₈ O ₆ S	ESI-	242.99688	163.04010	145.02950	117.03460	
p-Anisic acid	C ₈ H ₈ O ₃	ESI-	151.04007	133.02861	123.04398		
Caftaric Acid	C ₁₃ H ₁₂ O ₉	ESI-	311.04086	130.99800	161.02390	267.05050	
Chicoric acid	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₂	ESI-	473.07255	311.04071	293.02844	149.00812	
Fertaric acid	C ₁₄ H ₁₄ O ₉	ESI-	325.05651	193.05010	130.99800	87.00820	
Mascaroside	C ₂₆ H ₃₆ O ₁₁	ESI-	523.21849	361.16510	331.15450		
Astilbin	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	ESI-	449.10893	151.00322	150.03022	303.05050	
Cinnamic acid	C ₉ H ₈ O ₂	ESI-	147.04515	119.04916	117.03351	101.03851	
Tracheloside	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₂	ESI-	549.19775	387.14440	357.13380		
Quercetin-3-O-malonylglucoside	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₅	ESI-	549.08859	505.10006	300.02737	301.03183	
Kaempferol-3-O-glucoside + 4-Luteolin-4'-O-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	ESI-	447.09328	284.03200	255.02924		
Quercetin 3-O-sulfate	C ₁₅ H ₁₀ O ₁₀ S	ESI-	380.99219	301.03480	80.96460		
Isorhamnetin-3-O-malonylglucoside	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₅	ESI-	563.10424	459.09270	315.05050	299.01920	
Glabridin	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	ESI-	323.12888	187.07590	267.06570		
rac 8-Prenylnaringenin	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	ESI-	339.12380	219.06418	119.04871		
Isosakuranetin + Sakuranetin	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	ESI-	285.07685	119.04883	221.15330	165.01802	164.01011
Tetrahydrocurcumin	C ₂₁ H ₂₄ O ₆	ESI-	371.15001	193.08650	219.06570		

Demethoxycurcumin	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	ESI-	337.10815	119.04970	175.03950	217.05010	
Xanthohumol	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	ESI-	353.13945	207.10210	119.04900	145.02900	
*Apigenin 7-sulfate	C ₁₅ H ₁₀ O ₈ S	ESI-	349.00236				
Acetovallinone	C ₉ H ₁₀ O ₃	ESI-	165.05572				
Acetosyringone	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	ESI-	195.06628	180.04260	165.01940		
(Methyl2-) Acetoxyricinoleate	C ₂₁ H ₃₈ O ₅	ESI-	369.26465				
*Acacetin-7-sulfate	C ₁₆ H ₁₁ O ₉ S	ESI-	378.00510				
Campestanol	C ₂₈ H ₅₀ O	ESI-	401.37889				
*Diosmetin 7-sulfate	C ₁₆ H ₁₁ O ₉ S	ESI-	379.01293	299.05590			
Gentisic acid	C ₇ H ₆ O ₄	ESI-	153.01933	109.02822	108.02046		
4-Hydroxybenzaldehyde	C ₇ H ₆ O ₂	ESI-	121.02950	108.02045	91.01772	95.01252	
*Luteolin 7-sulfate	C ₁₅ H ₁₀ O ₉ S	ESI-	364.99728	285.03930			
Phloroglucinol	C ₆ H ₆ O ₃	ESI-	125.02442	57.03328			
Piccol	C ₈ H ₈ O ₂	ESI-	135.04406				
*Proanthocyanidin	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	ESI-	593.13006				
Procyanidin B2	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	ESI-	577.13515	425.08890	407.07890	289.07320	
Procyanidin C2	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	ESI-	865.19854				
Protocatechuic acid	C ₇ H ₆ O ₄	ESI-	153.01933	109.02816	108.02036		
Pyrocatechol	C ₆ H ₆ O ₂	ESI-	109.02950	108.02000	91.01760		
Pyrogallol	C ₆ H ₆ O ₃	ESI-	125.02442	124.01485	79.01740		
* Rosmarinic acid	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	ESI-	359.07724	163.03967	135.04425	343.08059	359.07724
Syringaldehyde	C ₉ H ₁₀ O ₄	ESI+	183.06519	123.04700	155.07300		
Vanillin	C ₈ H ₈ O ₃	ESI-	151.03897	136.01564	151.03922	108.02590	

Tabla A3. Listado de compuestos fenólicos tentativamente identificados y su nomenclatura según la IUPAC

Nombre del compuesto	IUPAC
Caffeic acid	(E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoic acid
Caftaric acid	(2R,3R)-2-[(E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoyl]oxy-3-hydroxybutanedioic acid
Chicoric acid	(2R,3R)-2,3-bis[[E]-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoyl]oxybutanedioic acid
Diferuloyl tartaric acid	2-hydroxy-3-{[3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acryloyl]oxy}butanedioic acid
Fertaric acid	2-hydroxy-3-[(E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-enoyl]oxybutanedioic acid
Ferulic acid	(E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-enoic acid
P-coumaric acid	(E)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoic acid
Catechin	(2R,3S)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol
Demethoxycurcumin	(1E,6E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-(4-hydroxyphenyl)hepta-1,6-diene-3,5-dione
Epicatechin	(2R,3R)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol
Eriodictyol	(2S)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-4-one
Glabridin	4-[(3R)-8,8-dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyrano[2,3-f]chromen-3-yl]benzene-1,3-diol
Isorhamnetin-3-O-malonylglucoside	3-[[[(2R,3S,6S)-6-[5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-oxochromen-3-yl]oxy-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl]methoxy]-3-oxopropanoic acid
Isosakuranetin	(2S)-5,7-dihydroxy-2-(4-methoxyphenyl)-2,3-dihydrochromen-4-one
Kaempferol-3-O-glucoside (Astragalina)	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-3-[[[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy]-4H-chromen-4-one
Luteolin-4'-O-glucoside	5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-[[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy]phenyl)-4H-chromen-4-one
Mascaroside	(1R,4S,12R,13S,14S,16S,17R,18R)-14,17,18-trihydroxy-12-methyl-17-[[[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxymethyl]-8-oxapentacyclo[14.2.1.01,13.04,12.05,9]nonadeca-5(9),6-dien-10-one
Naringenin	(2S)-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-4-one
Naringenin chalcone	3-(4-hydroxyphenyl)-1-(2,4,6-trihydroxyphenyl)prop-2-en-1-one
Pinocembrin	(2S)-5,7-dihydroxy-2-phenyl-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-4-one
Procyanidin B1	(2R,3S)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-8-[(2R,3R,4R)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-3,4-dihydro-2H-chromen-4-yl]-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol
Procyanidin B2	(2R,3R)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-8-[(2R,3R,4R)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-3,4-dihydro-2H-chromen-4-yl]-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol

Identificación de compuestos fenólicos en *Posidonia oceanica* mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución.

Quercetin 3-O-glucoside	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-4-one
Quercetin-3-O-malonylglucoside	3-[[[(2R,3S,4S,5R,6S)-6-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-4-oxochromen-3-yl]oxy-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl]methoxy]-3-oxopropanoic acid
rac 8-Prenilnaringenin (Sophoraflavanone B)	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-(3-methylbut-2-enyl)-2,3-dihydrochromen-4-one
Sakuranetin	(2S)-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-7-methoxy-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-4-one
Tetrahydrocurcumin	1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)heptane-3,5-dione
Xanthohumol	(E)-1-[2,4-dihydroxy-6-methoxy-3-(3-methylbut-2-enyl)phenyl]-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one