



Caracterización fenólica
de las especies *Bidens
aurea* (Aiton) Sherff
(*Compositae*) y *Daphne
gnidium* L.
(*Thymelaeaceae*).

Leticia Berlanga Sanz

Orientada por:

Ángel Amor Morales

Ana María González Paramás

Celestino Santos Buelga

Octubre 2018

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS	1
ÍNDICE DE TABLAS	4
LISTA DE ABREVIATURAS	4
RESUMEN.....	5
ABSTRACT	6
I. INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1. El género <i>Bidens</i>	8
1.1.1. Compuestos principales	9
1.2. <i>Bidens aurea</i> (Aiton) Sherff.....	10
1.2.1. Descripción botánica.....	10
1.2.1.1. Nombres vulgares	10
1.2.1.2. Clasificación taxonómica.....	11
1.2.2. Ecología y fenología	11
1.2.3. Composición química	12
1.2.4. Estudios fitoquímicos y actividad biológica	12
1.2.5. Conocimientos y usos tradicionales	12
1.3. El género <i>Daphne</i>	13
1.3.1. Compuestos principales	14
1.4. <i>Daphne gnidium</i> L.....	17
1.4.1. Descripción botánica.....	17
1.4.1.1. Nombres vulgares	18
1.4.1.2. Clasificación taxonómica.....	18
1.4.2. Ecología y fenología	18
1.4.3. Composición química	19
1.4.4. Estudios fitoquímicos y actividad biológica	20
1.4.5. Conocimientos y usos tradicionales	20
1.5. Compuestos fenólicos	24
1.5.1. Funciones de los flavonoides en plantas	29
1.5.2. Caracterización fenólica: antecedentes bibliográficos	30

2. OBJETIVOS	31
II. MUESTREO	32
1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE <i>BIDENS AUREA</i> (AITON) SHERFF Y <i>DAPHNE GNIDIUM</i> L. .	33
2. ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS	34
III. CARACTERIZACIÓN DE FLAVONOLES Y FLAVONAS PRESENTES EN LAS ESPECIES <i>BIDENS AUREA</i> (AITON) SHERFF Y <i>DAPHNE GNIDIUM</i> L.	35
1. MATERIAL Y MÉTODOS	36
1.1. Reactivos y soluciones de trabajo	36
1.2. Método de extracción y análisis	37
1.2.1. Extracción.	37
1.2.2. Detección e identificación.....	37
1.2.2.1. Análisis por HPLC-DAD-MS	38
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
2.1. Información preliminar	40
2.2. Resultados obtenidos.....	42
1.2.1. Resultados obtenidos para la muestra de <i>Bidens aurea</i> (Aiton) Sherff.....	43
1.2.2. Resultados obtenidos para la muestra de <i>Daphne gnidium</i> L.	60
3. CONCLUSIONES	75
IV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Muestra de un tallo con inflorescencias vivo y seco de la planta <i>Bidens aurea</i> (Aiton) Sherff.....	10
Figura 2: Distribución de <i>Bidens aurea</i> (Aiton) Sherff en España.	11
Figura 3: Áreas donde <i>Bidens aurea</i> (Aiton) Sherff es utilizada como infusión en España	13
Figura 4: Compuestos químicos encontrados en el género <i>Daphne</i>	15
Figura 5: Compuestos químicos encontrado en el género <i>Daphne</i> (continuación).....	16
Figura 6: Compuestos químicos encontrado en el género <i>Daphne</i> (continuación 2).....	17
Figura 7: Muestra de un tallo vivo y seco de la planta <i>Daphne gnidium</i> L.....	17
Figura 8: Sustancias fitoquímicas encontrados en <i>Daphne gnidium</i> L.	19
Figura 9: Estructura de fenol.....	24
Figura 10: Metabolismo primario del carbono: posibles rutas de síntesis para los compuestos fenólicos	24
Figura 11: Biosíntesis de compuestos fenólicos.....	25
Figura 12: Ácido cinámico y derivados.	26
Figura 13: Familias de compuestos derivados del ácido cinámico en la biosíntesis de plantas.....	26
Figura 14: Estructura de diferentes cumarinas	27
Figura 15: Estructuras de diferentes grupos de flavonoides.....	28
Figura 16: Mapa de la comarca donde fueron recogidas las muestras.	33
Figura 17: Esquema del perfil de absorción en UV- Vis para las bandas I y II en flavonoides.....	40
Figura 18: Comparación de los espectros de UV-Vis en diferentes tipos de flavonoides con el mismo patrón de oxigenación.	41
Figura 19: Cromatograma de los extractos fenólicos de las flores de <i>Bidens aurea</i> (Aiton) Sherff (BAF).	44
Figura 20: Espectro UV del pico 1.....	44
Figura 21: Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico.	45
Figura 22: Ácido 3- <i>O</i> -feruolquínico.	45
Figura 23: Estructura del ácido 3,4,5-tricafeoilquínico.....	46
Figura 24: Ácido 1,3- <i>O</i> -dicafeoilquinico.	46
Figura 25: Espectro UV del pico 8.....	46
Figura 26: Estructura del cinarósido (luteolina-7- <i>O</i> -glucósido).	47
Figura 27: Estructura de luteolina 7- <i>O</i> -rutinósido.	47
Figura 28: Estructura de la luteolina 7- <i>O</i> -rhamnósido.....	48
Figura 29: Espectro UV del pico 2.....	48
Figura 30: Estructura de taxifolina (dihidroquercetina).	49
Figura 31: Estructura de isookanina.....	49

Figura 32: Espectro UV del pico 10.....	50
Figura 33: Estructura de maritimetina-7- <i>O</i> -glucósido.	50
Figura 34: Espectro UV del pico 13.....	50
Figura 35: Estructura de 4- <i>O</i> -metilbuteína.....	51
Figura 36: Estructura de okanina-4-metiléter-3'- <i>O</i> -glucósido.....	51
Figura 37: Estructura de okanina 4'- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -acetil-β-D-glucopiranosido.....	52
Figura 38: Espectro UV del pico 22.....	52
Figura 39: Cromatograma de los extractos fenólicos de las hojas de <i>Bidens aurea</i> (Aiton) Sherff (BAH)	54
Figura 40: Estructura de rutina (quercetina-3- <i>O</i> -rutinosido).....	55
Figura 41: Cromatograma de los extractos fenólicos del tallo de <i>Bidens aurea</i> (Aiton) Sherff (BAT).....	57
Figura 42: Estructura de quercetina 3- <i>O</i> -neohesperidósido.....	58
Figura 43: Cromatograma de un extracto fenólico de las flores de <i>Daphne gnidium</i> L (DGF)....	60
Figura 44: Espectro UV del pico 4.....	61
Figura 45: Estructura de daphnetina.....	61
Figura 46: Estructura de daphnetina-8- <i>O</i> -glucósido.	62
Figura 47: Espectro UV del pico 5.....	62
Figura 48: Estructura de la daphnogitina.	62
Figura 49: Posibles estructuras para dihidroxi-biscumarinas.....	63
Figura 50: Posibles estructuras para tetrahidroxi-biscumarinas.....	63
Figura 51: Estructura de daphnoretina.	64
Figura 52: Estructura de desmetildaphnoretina-7- <i>O</i> -glucósido (edgeworthin glucósido).	64
Figura 53: Estructura de rutarensin.	65
Figura 54: Estructura de umbeliferona.....	65
Figura 55: Espectro UV del pico 2.....	66
Figura 56: Estructura de pinoresinol.	67
Figura 57: Estructura de secoisolariciresinol monoglucósido.....	67
Figura 58: Estructura de dihidrosesamina.	68
Figura 59: Estructura de apigenina-6,8- <i>C</i> -diglucósido.	68
Figura 60: Cromatograma de un extracto fenólico de las hojas de <i>Daphne gnidium</i> L (DGH)....	69
Figura 61: Posible estructura para el pico 9 de la muestra DGH.	70
Figura 62: Comparativa espectros UV del pico 7 vs luteolina-7- <i>O</i> -glucósido.....	71
Figura 63: Estructura de apigenina.....	72
Figura 64: Cromatograma de un extracto fenólico del tallo de <i>Daphne gnidium</i> L (DGT).....	73
Figura 65: Estructura del siringaresinol	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación taxonómica de <i>Bidens aurea</i> (Aiton) Sherff	11
Tabla 2: Clasificación taxonómica de <i>Daphne gnidium</i> L	18
Tabla 3: Información sobre la recogida de las plantas	33
Tabla 4: Códigos asignados a las distintas muestras analizadas.	34
Tabla 5: Gradiente de elución utilizado para el método en HPLC.....	39
Tabla 6: Distintos tipos de flavonoides y las longitudes de onda a las que aparecen sus bandas I y II.	41
Tabla 7: Resultados obtenidos para los picos de la muestra BAF.....	53
Tabla 8: Resultados obtenidos para los picos de la muestra BAH.....	57
Tabla 9: Resultados obtenidos para los picos de la muestra BAT	59
Tabla 10: Resultados obtenidos para los picos de la muestra DGF.	69
Tabla 11: Resultados obtenidos para los picos de la muestra DGH.....	72
Tabla 12: Resultados obtenidos para los picos de la muestra DGT.	74

LISTA DE ABREVIATURAS

- BAF: Inflorescencias de *Bidens aurea* (Aiton) Sherff
- BAH: Hojas de *Bidens aurea* (Aiton) Sherff
- BAT: Tallo de *Bidens aurea* (Aiton) Sherff
- DGF: Inflorescencias de *Daphne gnidium* L.
- DGH: Hojas de *Daphne gnidium* L.
- DGT: Tallo de *Daphne gnidium* L.
- HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
- UV-Vis: Ultravioleta- visible
- MS: Espectrometría de masas
- DAD: Detector de diodos

RESUMEN

Las plantas a lo largo de la historia han sido un recurso al alcance del ser humano utilizado para su alimentación y curación de sus enfermedades, considerándose así parte de la medicina natural. Producen diversos tipos de compuestos que se han clasificado en dos grandes grupos: metabolitos primarios (clorofila, aminoácidos, nucleótidos, carbohidratos simples y lípidos de membrana), encargados de los procesos de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, translocación, asimilación de nutrientes y diferenciación; y los metabolitos secundarios (terpenos, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados), los cuales no parecen tener una función directa en el crecimiento y desarrollo de la planta (Ávalos & Pérez; 2009). Sin embargo, muchos metabolitos secundarios no están aún bien caracterizados y entendidos. Estudios recientes han demostrado las actividades biológicas relevantes de compuestos fenólicos con actividad antioxidante (Muñoz et al., 2007). Esto lo relacionan con su estructura química ya que les confiere propiedades redox. Para ampliar esta información, en este trabajo nos centraremos en el análisis, identificación y caracterización de compuestos fenólicos de dos especies de plantas de interés medicinal.

El estudio se ha llevado a cabo partiendo de muestras de *Bidens aurea* (Aiton) Sherff y *Daphne gnidium* L. donde se analiza el contenido en ácidos fenólicos, flavonoides y otros compuestos fenólicos (cumarinas, lignanos) de las hojas, flores y tallo de ambas plantas. Para ello se ha desarrollado un método por HPLC para la separación de los distintos compuestos que combinado con espectrofotometría de diodos y espectrometría de masas, ha permitido la identificación de la mayor parte de los compuestos presentes en las muestras. Los resultados obtenidos mostraron que la composición fenólica de las muestras de *B. aurea* está fundamentalmente caracterizada por la presencia de derivados de ácidos hidroxicinámicos y flavonoides, mientras que las cumarinas son mayoritarias en las muestras de *D. gnidium* L. A su vez se puede destacar que los compuestos encontrados fueron diferentes entre las distintas partes de la misma planta. Las hojas mostraron mayor composición fenólica respecto a las otras muestras en ambas plantas.

ABSTRACT

Plants throughout history have been a human resource available to be used for food and feeding and treatment of diseases, thus being considered part of natural medicine. They produce various types of compounds that have been classified into two main groups: primary metabolites (chlorophylls, amino acids, nucleotides, simple carbohydrates and membrane lipids), responsible for the processes of photosynthesis, respiration, solute transport, translocation, nutrient assimilation and differentiation; and secondary metabolites (terpenes, phenolic compounds and nitrogen compounds), which do not seem to have a direct function in the growth and development of the plant. Furthermore, the secondary metabolites are not well characterized and understood. Recent studies have shown the relevant biological activities of phenolic compounds with antioxidant activity, which is related to their chemical structure that gives them redox properties. To expand this information, in this work we will focus on the analysis, identification and characterization of phenolic compounds of plant species of medicinal interest.

The study has been carried out starting from samples of *Bidens aurea* (Aiton) Sherff and *Daphne gnidium* L. They have been explored for their composition in phenolic acids, flavonoids and other phenolic compounds (coumarins, lignans) in flowers, leaves and stems of both plants. With this aim, an HPLC method for the separation of the different compounds has been developed, which combined with diode array spectrophotometry and mass spectrometry allowed the identification of most of the compounds present in the samples. The obtained results showed that the phenolic composition of *B. aurea* samples was mainly based on the presence of hydroxycinnamoyl derivatives and flavonoids, whereas coumarins predominated in the samples of *D. gnidium* L. It can be note that the compounds found were different between the different parts of the same plant. The leaves showed greater phenolic composition with respect to the other samples in both plants.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El género *Bidens*

Se trata de hierbas o arbustos perennes que pueden ser peludos o lampiños y erectos o trepadores. Los tallos son angulosos o cilíndricos, a veces acanalados. Las hojas son opuestas, enteras y dentadas, pueden ser simples o pinnadas. Las flores se agrupan en capítulos radiados que son heterógamos (presentan flores hermafroditas y también otras flores masculinas o femeninas). Las flores periféricas son femeninas, liguladas, zigomorfas, de color amarillo claro y con el ápice denticulado, mientras que las centrales son tubulosas, hermafroditas, actinomorfas, pentámeras y de color amarillo más oscuro. Tienen un involucreo acampanado formado por brácteas dispuestas en dos series: las exteriores foliáceas y las interiores iguales entre sí, blancas o amarillas. Los frutos son cipselas o aquenios, secos, indehiscentes, con el pericarpio no soldado a la semilla, de forma prismática; pueden ser glabros, peludos o aristados (Sherff, 1937; Paray, 1957).

Las características más significativas que sirven para distinguir las distintas especies de este género se resumen de la siguiente manera (Sherff, 1937; Paray, 1957):

- Hojas irregularmente biternadas, segmentos lineares, brácteas 3 o 4 → *B. lemmoni*.
- Hojas no irregularmente biternadas, segmentos no lineares, brácteas más de 4 → *B. pilosa*
- Hojas pinnadas, segmentos angostos → *B. pilosa* variedad *bimucronata*
- Cabezuelas de menos de 1 centímetro de ancho → *B. bigelovii* variedad *pueblensis*
- Cabezuelas de 1 a 1.5 cm de ancho → *B. pilosa* variedad *calcicola*
- Planta verde, lígulas blancas → *B. pilosa* variedad *radiata*
- Planta pálido-azulosa, lígulas rosadas → *B. pilosa* variedad *bimucronata*
- Hojas abrazadoras → *B. laevis*
- Planta sarmentosa de 10 a 25 cm de altura → *B. anthemoides*
- Planta no sarmentosa de 25 a 70 cm de altura → *B. triplinervia* variedad *maerantha*
- Hojas no pinnadas de 1.5 a 4 cm → *B. triplinervia*

- Hojas simples y pinnadas en la misma planta. Las simples de 4 a 15 cm de largo → *B. aurea*
- Segmentos de los foliolos de 1 a 3 mm de ancho → *B. ferulaefolia*
- Hojas tripartidas → *B. ostruthioides*
- Hojas no tripartidas pero si variadas → *B. serrulata*

1.1.1. Compuestos principales

Apenas se han encontrado estudios fitoquímicos realizados en el género *Bidens*. La información que se ha podido recopilar revela la posible presencia de fitoesteroles, taninos del tipo catecol, polisacáridos, carotenos y flavonoides, aminas, terpenos, azúcares reductores y compuestos poliacetilénicos (Ferdinand et al., 1983; González, 1993)

La especie más estudiada es *Bidens pilosa*, conocida como Amor seco (Wang et al., 1997). Se ha detectado la presencia de aminas, esteroides y esteroides, terpenos, flavonoides (0,60-2,31%), glicósidos de aurona y chalconas, cuyas geninas más comunes son okanina, lanceolina y buteína. Algunos compuestos concretos destacables son:

- Okanina-β-D-glucopiranosiloxi-3-hidroxi-6(E)-tetradecen-8,10,12-triino
- (Z)-7-O-β-D-glucopiranosil-6,7,3,4-tetrahidroxiaurona
- (Z)-6-O-(6-O-p-cumaroil-β-D-glucopiranosil)-6,7,3,4-tetrahidroxiaurona
- (Z)-6-O-(6-O-acetil-β-D-glucopiranosil)-6,7,3,4-tetrahidroxiaurona
- (Z)-6-O-(3'',4'',6''-triacetil-β-D-glucopiranosil)-6,7,3',4'-tetrahidroxiaurona
- (Z)-6-O-(2'',4'',6''-triacetil-β-D-glucopiranosil)-6,7,3',4'-tetrahidroxiaurona
- Okanin-4'-O-β-d-(4'',6''-diacetil)-glucopiranósido
- Isookanin 7-O-β-D-(2'',4'',6''-triacetil)-glucopiranósido
- Quercetin-3,4'-dimetiléter-7-O-rutinósido.

En cuanto a ácidos fenólicos, el ácido nicotínico, ácido tánico y ácido p-cumárico, son los más abundantes. También se han detectado compuestos poliacetilénicos benzoides (fenil heptatrina y α-tertienil), fitoesteroides (β-sitosterol, estigmasterol) fitosterina B, proteínas (albúmina); un alcohol alifático (hentrianocontanol) y algunos aceites esenciales (Gbashi et al., 2016).

1.2. *Bidens aurea* (Aiton) Sherff

1.2.1. Descripción botánica

Es una hierba erecta, anual o perenne, que presenta un tallo cuadrangular, verde y algo purpúreo de 0,5 a 1 m de alto. Las hojas son submembranáceas, a veces sencillas, lineares o lanceoladas, oblongas, aserradas tri o quinquepartidas o bipinnadas, pecioladas, con peciolo más o menos alados de 0,2 a 4 cm de largo. Los capítulos son radiados y tienen entre 2 y 5 cm de diámetro. Las flores periféricas, 5 o 6, son liguladas y de color amarillo claro y tienen forma ovada, con el apéndice entero o irregularmente dentado, de 1 a 3 cm de largo. Los frutos llamados cipselas son cuneados-lineares, algo cuadrangulares, negros y sedosos de 4 a 7 mm de largo, terminados en dos aristas amarillas de 1,5 a 3 mm de largo (Sherff, 1937).



Figura 1: Muestra de un tallo con inflorescencias vivo (a) y seco (b) de la planta *Bidens aurea* (Aiton) Sherff (imágenes propias).

1.2.1.1. Nombres vulgares

Té moruno, té de huerta, té americano, té de México, té de Canarias, té bravío, té de campo, té fino, té sembrado.

1.2.1.2. Clasificación taxonómica

Para *Bidens aurea* (Aiton) Sherff la clasificación taxonómica se muestra en la Tabla 1:

Tabla 1: Clasificación taxonómica de *Bidens aurea* (Aiton) Sherff

CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA	
REINO:	<i>PLANTAE</i>
DIVISIÓN	ANGIOSPERMAE
CLASE	EUDICOTYLEDONEAE
SUBCLASE:	<i>ASTERIDAE</i>
ORDEN:	<i>ASTERALES</i>
FAMILIA:	<i>ASTERACEAE</i>
SUBFAMILIA	<i>ASTEROIDEAE</i>
TRIBU	<i>HELIANTHEAE</i>
GÉNERO:	<i>BIDENS</i>
ESPECIE:	<i>B. AUREA</i>

1.2.2. Ecología y fenología

Es una planta de origen centroamericano, que se ha extendido como neófito por el sur de Europa. (D'Arcy, 1975). Vive en lugares húmedos en casi toda España (Figura 2). Se encuentra dispersa por diferentes provincias, en mayor proporción en las costas mediterránea y cantábrica y por el archipiélago canario, aunque también aparece en localidades continentales, alejadas del mar, como el oeste de Castilla y León, en Extremadura y en el interior de Andalucía, etc. Puede estar cultivada y asilvestrada.

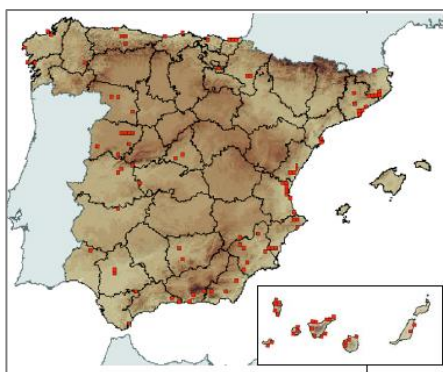


Figura 2: Distribución de *Bidens aurea* (Aiton) Sherff en España (tomado de Anthos.es).

Crece en lugares soleados y tiene preferencia por los suelos ricos en materia orgánica de zonas húmedas, bordes de zanjas y canales de riego, junto a cultivos así como en orillas de ríos y arroyos (Paray, 1957). Aunque suele florecer en octubre, a veces lo hace más tarde o incluso no florece. Las partes más útiles son las hojas, que se recogen en septiembre.

1.2.3. Composición química

No se conoce con exactitud la composición fenólica de *Bidens aurea* (Aiton) Sherff, aunque se ha reportado la presencia de flavonoides. (Alarcón et al., 1997).

1.2.4. Estudios fitoquímicos y actividad biológica

La mayoría de las especies conocidas como “té” poseen ingredientes activos con propiedades farmacológicas beneficiosas para el sistema digestivo. (González-Tejero, 1990; Mulet, 1991; San Miguel, 2004; Blanco & Cuadrado, 2000; Blanco, 2002). Se han realizado estudios con extractos de flavonoides de la misma, obteniendo resultados positivos en la curación de úlceras de rata (Alarcón et al., 1997).

1.2.5. Conocimientos y usos tradicionales

Pardo de Santayana et al. (2005) en la obra *Plants known as té in Spain: An ethnopharmaco-botanical review*, estudiaron esta especie desde un punto de vista etnobotánico y recopilaron los siguientes usos tradicionales de la misma.

➤ **Medicina humana**

❖ **Sistema respiratorio**

Se ha utilizado como anticatarral: para ello se preparaba una cocción, en agua o en vino, de una mezcla de orégano, hierbabuena, té, poleo, presta de burro (*Mentha suaveolens*) e higos secos. Se tomaba con miel o con manteca para suavizar.

❖ **Sistema digestivo**

En algunos lugares de España se utiliza como un té digestivo, sin excitantes, incluso como relajante.

Para su aprovechamiento, se secan las hojas y se cuecen para tomarlas posteriormente en infusión. Las zonas de España en las que predomina este uso, se muestran en la Figura 3.

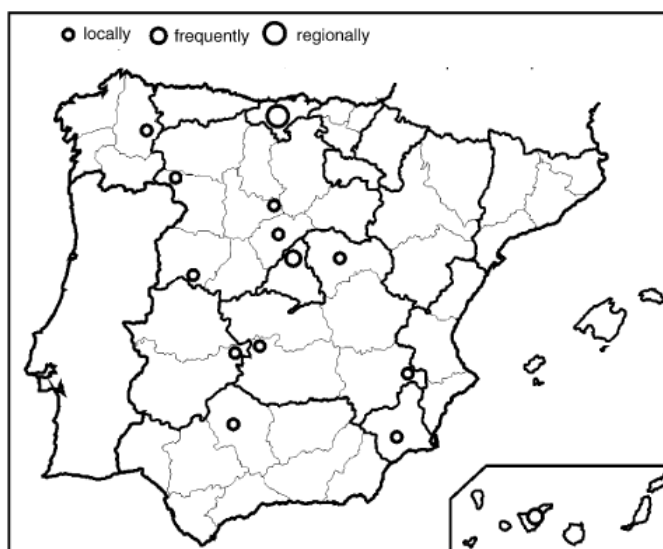


Figura 3: Áreas donde *Bidens aurea* (Aiton) Sherff es utilizada como infusión en España (tomada de Pardo de Santayana et al., 2005).

También se han encontrado casos de su uso para dolencias estomacales.

En otras zonas, se creía que ayudaba a adelgazar.

1.3. El género *Daphne*

Se trata de arbustos o subarbustos glabros o con pelos adpresos o patentes. Los tallos pueden variar de erectos a postrados, siendo más o menos ramificados, con cicatrices foliares. Las hojas son simples, enteras, persistentes y coriáceas, o caducas y más o menos tiernas, esparcidas a lo largo de los tallos y concentradas en los ápices. Las inflorescencias se presentan en fascículos más o menos capituliformes o formando racimos o panículas muy condensados. Las flores son vistosas, olorosas y hermafroditas. Presentan 4 sépalos petaloideos, de los cuales 2 son más estrechos, de colores blanco, crema, amarillento pálido, verdusco, rosa o púrpura y carecen de corola. Los estambres en número de 8 tienen filamentos muy cortos. El estilo es corto. El fruto es bacciforme, monospermo, con pericarpio carnoso, de color rojo, anaranjado, pardo/amarillento o negro. (Castroviejo et al., 1997).

Las características más significativas y que sirven para distinguir las distintas plantas de este género se resumen de la siguiente manera:

Con hojas caducas, más o menos tiernas:

- Planta que florece antes de que las hojas se hayan desarrollado, hojas glabras, sépalos obtusos de color rosa, fruto glabro → ***D. mezereum***
- Planta que florece cuando las hojas ya se han desarrollado, hojas uniformemente pubescentes en ambas caras, sépalos agudos y blancos, fruto peloso → ***D. alpina***

Con hojas persistentes, coriáceas:

→ Inflorescencia en racimo axilar o en panícula terminal

- Planta glabra, hojas grandes de ápice entre sub-agudo y redondeado, fruto maduro negro, inflorescencias en racimo axilar muy condensado con 3-7 flores → ***D. laureola***
- Planta con pelos adpresos en tallos jóvenes e hipanto, hojas pequeñas y acuminadas, fruto maduro rojo, inflorescencias en panícula terminal, 10-60 flores → ***D. gnidium***

→ Inflorescencia en fascículo terminal, más o menos capituliforme:

- Inflorescencias con 6-12 flores, tallos postrados o decumbentes, hipanto 7-12 mm, sépalos de color rosa o púrpura → ***D. cneorum***
- Hojas con pelos rectos en el margen, tallos con ramas laterales cortas y subpungentes, sépalos obtuso, inflorescencias en fascículos terminales → ***D. rodriguezii***
- Hojas glabras, tallos sin ramas laterales subpungentes, sépalos agudos o acuminados, inflorescencias en fascículos terminales → ***D. oleoides***

1.3.1. **Compuestos principales**

Más de 250 constituyentes químicos (Figura 4, Figura 5 y Figura 6) se han descrito en el género *Daphne* (Xu et al., 2011). Estos compuestos han sido clasificados en cinco grupos: cumarinas, flavonoides, lignanos, terpenoides y otros. Hasta ahora, al menos 19 cumarinas monoméricas, 22 biscumarinas y 4 cumarinas triméricas han sido aisladas y clasificadas en este género, así como hasta 70 flavonoides y casi 30 lignanos. Por su

parte, los terpenoides son los compuestos más predominantes con alrededor de 80 diferentes. El resto de compuestos encontrados se encuentran entre distintos derivados fenólicos, ésteres ácidos, ácidos grasos, y alcaloides.

Compound class and name	Source	Compound class and name	Source	
<i>Coumarins</i>		53	Apigenin 5- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	<i>D. genkwa</i>
1	Daphnetin	54	Apigenin 8- <i>O</i> -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-glucopyranoside	<i>D. tangutica</i>
2	Daphnoretin	55	Luteolin	<i>D. genkwa</i>
3	Daphneticin	56	Luteolin 7- <i>O</i> -glucoside	<i>D. gnidium</i>
4	7-Hydroxy-8-methoxycoumarin	57	Luteolin 7-methyl ether	<i>D. genkwa</i>
5	Umbelliferone	58	Luteolin 7-methyl ether 5- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	<i>D. koreana</i>
6	Daphnin	59	Velutin	<i>D. genkwa</i>
7	Daphnetin 8- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	60	Grantioidin	<i>D. oleoides</i>
8	8-Hydroxy-7-methoxycoumarin	61	7-Methoxyacetin	<i>D. genkwa</i>
9	7,8-Dimethoxycoumarin	62	Orientin	<i>D. gnidium</i>
10	Daphneside	63	Isoorientin	<i>D. gnidium</i>
11	Daphnetin 8- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside	64	Quercetin	<i>D. gnidium</i>
12	Acetylbulliferone	65	Isoquercitrin	<i>D. pedunculata</i>
13	Umbelliferone 7- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside (= skimmin)	66	Genkwanin	<i>D. genkwa</i>
14	7-Methoxycoumarin (= herniarin)	67	Genkwanin 5- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	<i>D. genkwa</i>
15	Cichoriin	68	Genkwanin 5- <i>O</i> - β -D-primveroside	<i>D. genkwa</i>
16	Virgatenol	69	Galuteolin	<i>D. pedunculata</i>
17	Virgatal	70	Luteolin 7,3'-dimethyl ether 5- <i>O</i> - β -D-glucoside	<i>D. pedunculata</i>
18	5-Hydroxy-7-methoxycoumarin 8- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	71	Yuanhuanin (= luteolin 7-methyl ether 5- <i>O</i> - β -D-glucoside)	<i>D. pedunculata</i>
19	Daphkoreanin	72	Kaempferol	<i>D. odora</i>
20	Ethyl 3-[2-hydroxy-4-[(7-hydroxy-6-methoxy-2-oxo-2 <i>H</i> -chromen-3-yl)oxy]phenyl]propanoate	73	Kaempferol 5- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	<i>D. pedunculata</i>
21	5-Demethoxydaphneticin	74	2,5,7,4'-Tetrahydroxyisoflavanol	<i>D. gnidium</i>
22	Isodaphneticin	75	4',5-Dihydroxy-3',7-dimethoxyflavone	<i>D. giraldoi</i>
23	Demethoxyisodaphneticin	76	Diosmetin 7- <i>O</i> - β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 6) β -D-glucopyranoside	<i>D. pseudo-mezereum</i>
24	Daphneticin 4'- <i>O</i> - α -D-glucopyranoside	77	Sakuranin	<i>D. giraldoi</i>
25	Daphgilin	78	(-)-Afzelechin	<i>D. holosericea</i>
26	Gulsamanin	79	5- <i>O</i> -Methylafzelechin	<i>D. giraldoi</i>
27	Giraldoid A	80	(-)-7- <i>O</i> - β -D-Glucopyranosylepifafzelechin	<i>D. giraldoi</i>
28	2'- <i>O</i> -Acetylgiraldoid A	81	(-)-5-Methoxy-7- β -D-glucopyranosylafzelechin	<i>D. giraldoi</i>
29	Edgeworoside C	82	8-(Ethoxycarbonyl)-5,7,4'-trihydroxyflavan	<i>D. odora</i>
30	Edgeworin	83	Daphneflavan B	<i>D. tangutica</i>
31	Edgeworthin	84	8-(Ethoxycarbonyl)-5,7,4'-trihydroxyflavanol	<i>D. genkwa</i>
32	Isodaphnoretin	85	Daphneflavan C	<i>D. tangutica</i>
33	7,7'-Dihydroxy-6,8'-bicumarin (= bicumol)	86	(-)-8-(Ethoxycarbonyl)-5-(4-hydroxybenzoyloxy)-7-hydroxy-afzelechin	<i>D. giraldoi</i>
34	Daphnoretin 7- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	87	(-)-8-(Ethoxycarbonyl)-5-(4-hydroxybenzoyloxy)-7-[(2,3,5-trihydroxybenzoyl)oxy]afzelechin	<i>D. giraldoi</i>
35	7- <i>O</i> -[β -D-Glucopyranosyl]-6-hydroxy-3-[(2-oxo-2 <i>H</i> -1-benzopyran-7-yl)-2 <i>H</i> -1-benzopyran-2-one	88	(-)-5-[(4-Hydroxybenzoyl)oxy]-8-(methoxycarbonyl)-7-[(2,3,5-trihydroxybenzoyl)oxy]afzelechin	<i>D. giraldoi</i>
36	Rutarensin	89	Neochamaejasmin B	<i>D. feddei</i>
37	6-(β -Glucopyranosyloxy)-7-[(2-oxo-2 <i>H</i> -1-benzopyran-7-yl)oxy]-2 <i>H</i> -1-benzopyran-2-one	90	Isonochamaejasmin A	<i>D. feddei</i>
38	Daphnogitin	91	Isochamaejasmin	<i>D. holosericea</i>
39	Daphnogirin	92	Daphnodorin A	<i>D. odora</i>
40	6- <i>O</i> - α -L-Rhamnopyranosyldaphnogirin	93	Daphnodorin B	<i>D. odora</i>
41	6- <i>O</i> - β -D-Apiofuranosyldaphnogirin	94	Daphnodorin C	<i>D. odora</i>
42	Daphjamilin	95	Genkwanol A	<i>D. genkwa</i>
43	Daphnolin	96	Daphnodorin D ₁	<i>D. odora</i>
44	Daphwazirin (= 7-hydroxy-8-[2-oxo-2 <i>H</i> -1-benzopyran-7-(<i>O</i> - α -L-rhamnosyl)-6-yl]-2 <i>H</i> -1-benzopyran-2-one)	97	Wikstrol A	<i>D. feddei</i>
45	3-[(6-[(β -D-Glucopyranosyl)oxy]-2-oxo-2 <i>H</i> -1-benzopyran-7-yl)oxy]-7-methoxy-2 <i>H</i> -1-benzopyran-2-one	98	Daphnodorin D ₂	<i>D. odora</i>
46	Feddeiticin	99	Wikstrol B	<i>D. feddei</i>
47	8-[7-[(α -D-Fucopyranosyl)oxy]-2-oxo-2 <i>H</i> -1-benzopyran-8-yl]-7-hydroxy-3-[(2-oxo-2 <i>H</i> -1-benzopyran-7-yl)oxy]-2 <i>H</i> -1-benzopyran-2-one	100	Daphnodorin E	<i>D. odora</i>
48	8-[7-[(α -D-Fucopyranosyl)oxy]-2-oxo-2 <i>H</i> -1-benzopyran-8-yl]-7-methoxy-3-[(2-oxo-2 <i>H</i> -1-benzopyran-7-yl)oxy]-2 <i>H</i> -1-benzopyran-2-one	101	Daphnodorin F	<i>D. odora</i>
49	Edgeworoside A	102	Daphnodorin G	<i>D. odora</i>
50	7-Hydroxy-2,2'-dioxo-3'-[(2-oxo-2 <i>H</i> -chromen-7-yl)oxy]-2 <i>H</i> ,2' <i>H</i> -8,8'-bichromen-7-yl β -D-glucopyranoside	103	Daphnodorin G 3'-methyl ether	<i>D. genkwa</i>
<i>Flavonoids</i>		104	Daphnodorin H	<i>D. odora</i>
51	Apigenin	105	Daphnodorin H 3-methyl ether	<i>D. genkwa</i>
52	Apigenin 7- <i>O</i> - β -D-glucuronide	106	Daphnodorin H 3'-methyl ether	<i>D. genkwa</i>
		107	Daphnodorin I	<i>D. odora</i>
		108	Daphnodorin J	<i>D. odora</i>
		109	Bihydrodaphnodorin B	<i>D. odora</i>
		110	Daphnodorin K	<i>D. odora</i>
		111	Daphnodorin L	<i>D. odora</i>
		112	Daphnodorin M	<i>D. acutiloba</i>
		113	Genkwanol B	<i>D. genkwa</i>
		114	Daphnodorin N	<i>D. acutiloba</i>

Figura 4: Compuestos químicos encontrados en el género *Daphne* (tomada de Xu et al., 2011).

Compound class and name		Source	Compound class and name		Source
115	Stelleranol	<i>D. holosericea</i>	175	Tanguticakin (= 1,2-dihydrodaphnetoxin)	<i>D. tangutica</i>
116	Genkwanol C	<i>D. genkwa</i>	176	Tanguticalin	<i>D. tangutica</i>
117	2'-Methoxydaphnodorin C	<i>D. feddei</i>	177	Tanguticamin	<i>D. tangutica</i>
118	2'-Methoxy-2-epidaphnodorin C	<i>D. feddei</i>	178	Daphnegiraldicin	<i>D. giraldii</i>
119	Daphnogirin A	<i>D. giraldii</i>	179	Daphnegiraldin (= 12-lauroyloxydaphnetoxin)	<i>D. giraldii</i>
120	Daphnogirin B	<i>D. giraldii</i>	180	Daphnegiraldifin	<i>D. giraldii</i>
<i>Lignans</i>			181	1,2-Dihydrodaphnegiraldifin	<i>D. tangutica</i>
121	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-6-(3-Ethyl-4-hydroxy-5-methoxyphenyl)-2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octane	<i>D. oleoides</i>	182	Mezerein	<i>D. mezereum</i>
122	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-2,6-Bis(3-ethyl-4-hydroxy-5-methoxyphenyl)-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octane	<i>D. oleoides</i>	183	12β-Acetoxy-5β-hydroxyresiniferonol-9,13,14-triyl ortho[(2 <i>E</i>)-dec-2-enoate]	<i>D. genkwa</i>
123	(+)-Pinoresinol 4- <i>O</i> -β-D-glucopyranoside	<i>D. oleoides</i>	184	Genkwanine A	<i>D. genkwa</i>
124	(+)-Medioresinol	<i>D. oleoides</i>	185	Genkwanine B	<i>D. genkwa</i>
125	(-)-Pinoresinol 4- <i>O</i> -β-D-glucopyranoside	<i>D. giraldii</i>	186	Genkwanine C	<i>D. genkwa</i>
126	Genkdaphin	<i>D. genkwa</i>	187	Genkwanine D	<i>D. genkwa</i>
127	(-)-Piperitol	<i>D. tangutica</i>	188	Genkwanine E	<i>D. genkwa</i>
128	Pinoresinol	<i>D. odora</i>	189	Genkwanine F	<i>D. genkwa</i>
129	(-)-Pinoresinol di- <i>O</i> -glucoside	<i>D. pseudo-mezereum</i>	190	Genkwanine G	<i>D. genkwa</i>
130	Syringaresinol	<i>D. tangutica</i>	191	Genkwanine H	<i>D. genkwa</i>
131	Syringaresinol 4'- <i>O</i> -β-D-glucopyranoside	<i>D. tangutica</i>	192	Genkwanine I	<i>D. genkwa</i>
132	(+)-Syringaresinol 4,4'- <i>O</i> -bis-β-D-glucopyranoside	<i>D. giraldii</i>	193	Genkwanine J	<i>D. genkwa</i>
133	(-)-Lariciresinol	<i>D. odora</i>	194	Genkwanine K	<i>D. genkwa</i>
134	(-)-Lariciresinol 4- <i>O</i> -β-D-glucopyranoside	<i>D. giraldii</i>	195	Genkwanine L	<i>D. genkwa</i>
135	Daphneligin	<i>D. oleoides</i>	196	1,2α-Dihydro-20-palmitoyldaphnetoxin	<i>D. tangutica</i>
136	4-(β-D-Glucopyranosyloxy)-9'-hydroxy-3,3',4'-trimethoxy-7,9-epoxylignan	<i>D. oleoides</i>	197	Genkwanine M	<i>D. genkwa</i>
137	(+)-Secoisolariciresinol	<i>D. odora</i>	198	Genkwanine N	<i>D. genkwa</i>
138	9-Butoxy-4,4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxy-9,9'-epoxylignan	<i>D. feddei</i>	199	Genkwanine O	<i>D. genkwa</i>
139	9-Ethoxy-4,4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxy-9,9'-epoxylignan	<i>D. feddei</i>	200	Yuanhuaoate A	<i>D. genkwa</i>
140	Isocubebin	<i>D. feddei</i>	201	Yuanhuaoate B	<i>D. genkwa</i>
141	(-)-Dihydrosesamin	<i>D. tangutica</i>	202	Yuanhuaoate C	<i>D. genkwa</i>
142	(+)-Taxiresinol	<i>D. oleoides</i>	203	1,2α-Dihydro-5β-hydroxy-6α,7α-epoxyresiniferonol-14-benzoate	<i>D. tangutica</i>
143	(+)-Matairesinol	<i>D. odora</i>	204	1,2β-Dihydro-5β-hydroxy-6α,7α-epoxyresiniferonol-14-benzoate	<i>D. tangutica</i>
144	(+)-Wikstromol	<i>D. odora</i>	205	Vesiculosin	<i>D. tangutica</i>
145	(-)-Epinortrachelogenin	<i>D. holosericea</i>	206	Isovesiculosin	<i>D. tangutica</i>
146	Isosalicifolin	<i>D. giraldii</i>	207	12- <i>O</i> -Benzoylphorbol-13-nonanoate	<i>D. aurantiaca</i>
147	Eudesmine	<i>D. oleoides</i>	208	12- <i>O</i> -Benzoylphorbol-13-octanoate	<i>D. aurantiaca</i>
<i>Terpenoids</i>			209	Oleodaphnal	<i>D. oleoides</i>
148	Anabsinthin	<i>D. oleoides</i>	210	Oleodaphnone	<i>D. oleoides</i>
149	Seamarin	<i>D. oleoides</i>	211	Guaia-4,11-dien-3-one	<i>D. aurantiaca</i>
150	Yuanhuacine (= gnidilatidin)	<i>D. genkwa</i>	212	Dauca-3,11-diene-2α,15-diol	<i>D. aurantiaca</i>
151	Yuanhuadine	<i>D. genkwa</i>	213	3-Oxoguai-4-ene-11,12-diol	<i>D. aurantiaca</i>
152	Yuanhuafine	<i>D. genkwa</i>	214	4α,5α,8α,11α <i>H</i> -7α-Hydroxy-3-oxoguai-1(10)-en-12,8-olide	<i>D. aurantiaca</i>
153	Yuanhuatine	<i>D. genkwa</i>	215	4α,5α,8α,11β <i>H</i> -7β-Hydroxy-3-oxoguai-1(10)-en-12,8-olide	<i>D. aurantiaca</i>
154	Yuanhuajine	<i>D. genkwa</i>	216	1α,8α-Dihydroxy-4α,5β <i>H</i> -guaia-9,7(11)-dien-12,8-olide	<i>D. aurantiaca</i>
155	Yuanhuagine	<i>D. genkwa</i>	217	4α,5α <i>H</i> -1α,8α-Dihydroxyguaia-9,7(11)-dien-12,8-olide	<i>D. aurantiaca</i>
156	Yuanhuahine	<i>D. genkwa</i>	218	Oleanolic acid	<i>D. oleoides</i>
157	Yuanhualine	<i>D. genkwa</i>	219	Acetyl α-amyryn	<i>D. tangutica</i>
158	Yuanhuapine (= 1,2-dihydroyuanhuafine)	<i>D. genkwa</i>	220	Lup-20(30)-ene-3α,29-diol	<i>D. oleoides</i>
159	Daphnetoxin	<i>D. tangutica</i>	221	Lup-20(30)-ene-3β,29-diol	<i>D. oleoides</i>
160	Genkwadaphnin (= 12-benzoyldaphnetoxin)	<i>D. oleoides</i>	222	Lupenone	<i>D. aurantiaca</i>
161	12-Hydroxydaphnetoxin	<i>D. giraldii</i>	223	Betulin	<i>D. oleoides</i>
162	Gniditrin	<i>D. tangutica</i>	224	Lup-20(28)-en-3-ol	<i>D. aurantiaca</i>
163	Gnidicin	<i>D. tangutica</i>	225	Lup-20(29)-enyl acetate	<i>D. aurantiaca</i>
164	Gnidicin-20-palmitate	<i>D. oleoides</i>	226	Stigmasterol glucoside	<i>D. oleoides</i>
165	Gnidilatidin-20-palmitate	<i>D. oleoides</i>	227	β-Sitosterol	<i>D. pedunculata</i>
166	Gnidilatin	<i>D. oleoides</i>	228	Daucosterol	<i>D. pedunculata</i>
167	Gnidilatin-20-palmitate	<i>D. oleoides</i>	<i>Others</i>		
168	Genkwadaphnin-20-palmitate	<i>D. oleoides</i>	229	Methyl 4-hydroxybenzoate	<i>D. tangutica</i>
169	Excoecariatoxin	<i>D. tangutica</i>	230	4-Ethoxybenzoic acid	<i>D. oleoides</i>
170	Tanguticacin	<i>D. tangutica</i>	231	4-Hydroxybenzoic acid	<i>D. oleoides</i>
171	Tanguticadin	<i>D. tangutica</i>	232	3,4,5-Trimethoxybenzoic acid	<i>D. tangutica</i>
172	Tanguticafin	<i>D. tangutica</i>	233	1-(4-Hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)propane-1,2-dione	<i>D. giraldii</i>
173	Tanguticagin	<i>D. tangutica</i>	234	Daphneolon	<i>D. tangutica</i>
174	Tanguticahin (= 15,16-dihydrodaphnetoxin)	<i>D. tangutica</i>	235	Daphnolon	<i>D. giraldii</i>
			236	Daphnolone	<i>D. odora</i>
			237	(+)-(S)-3-Hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-phenylpentan-1-one	<i>D. giraldii</i>
			238	(+)-(S)-3-Hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)-5-phenylpentan-1-one	<i>D. giraldii</i>
			239	Sinapaldehyde	<i>D. holosericea</i>

Figura 5: Compuestos químicos encontrado en el género *Daphne* (continuación).

Compound class and name	Source	Compound class and name	Source
222 Lupenone	<i>D. aurantiaca</i>	243 Syringin	<i>D. arisanensis</i>
223 Betulin	<i>D. oleoides</i>	244 Icariside H ₁	<i>D. tangutica</i>
224 Lup-20(28)-en-3-ol	<i>D. aurantiaca</i>	245 Coniferin	<i>D. oleoides</i>
225 Lup-20(29)-enyl acetate	<i>D. aurantiaca</i>	246 Conferinoside	<i>D. oleoides</i>
226 Stigmasterol glucoside	<i>D. oleoides</i>	247 Daphnenoside	<i>D. oleoides</i>
227 β -Sitosterol	<i>D. pedunculata</i>	248 Undecyl 3,4-dihydroxycinnamate	<i>D. oleoides</i>
228 Daucosterol	<i>D. pedunculata</i>	249 Tridecyl 3,4-dihydroxycinnamate	<i>D. oleoides</i>
<i>Others</i>		250 Caffeic acid octadecyl ester	<i>D. tangutica</i>
229 Methyl 4-hydroxybenzoate	<i>D. tangutica</i>		<i>D. giraldii</i>
230 4-Ethoxybenzoic acid	<i>D. oleoides</i>	251 Caffeic acid icosanyl ester	<i>D. tangutica</i>
231 4-Hydroxybenzoic acid	<i>D. oleoides</i>	252 Caffeic acid docosanyl ester	<i>D. odora</i>
232 3,4,5-Trimethoxybenzoic acid	<i>D. tangutica</i>	253 α -Tocopherol	<i>D. gnidium</i>
233 1-(4-Hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)propane-1,2-dione	<i>D. giraldii</i>	254 Armaosigenin	<i>D. feddei</i>
234 Daphneolon	<i>D. tangutica</i>	255 Daphneresinol	<i>D. feddei</i>
235 Daphnolon	<i>D. giraldii</i>	256 18-Hydroxylferruginol	<i>D. tangutica</i>
236 Daphnenone	<i>D. odora</i>	257 Physcion	<i>D. tangutica</i>
237 (+)-(S)-3-Hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-phenylpentan-1-one	<i>D. giraldii</i>	258 Loliolide	<i>D. aurantiaca</i>
238 (+)-(S)-3-Hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)-5-phenylpentan-1-one	<i>D. giraldii</i>	259 Glyceryl tristearate	<i>D. tangutica</i>
239 Sinapaldehyde	<i>D. holosericea</i>	260 Hexacosanoic acid	<i>D. odora</i>
240 (E)-Ferulic acid	<i>D. tangutica</i>	261 Octacosan-1-ol	<i>D. odora</i>
241 Isoferulic acid	<i>D. tangutica</i>	262 Octacosanoic acid	<i>D. tangutica</i>
242 Syringinocide	<i>D. arisanensis</i>	263 Tetratriacontan-1-ol	<i>D. tangutica</i>
		264 Pyrimidine-2,4-diol	<i>D. odora</i>
		265 Aurantiamide acetate	<i>D. genkwa</i>

Figura 6: Compuestos químicos encontrados en el género *Daphne* (continuación 2).

1.4. *Daphne gnidium* L.

1.4.1. Descripción botánica

Se trata de un arbusto de entre 0,5 y 2 m de altura, muy ramificado con tallos densamente foliosos y cubiertos en gran parte de pelos cortos y adpresos con la corteza de un color pardo/rojiza de jóvenes que se torna grisácea al envejecer. Las hojas de 20-30 x 3-7 mm son alternas, de linear a linear-oblongadas, acuminadas, atenuadas en la base, persistentes, coriáceas, glabras y punteadas por el envés. Las inflorescencias son terminales, paniculadas, multifloras, constituidas por un racimo apical y varios axilares. Con flores de unos 5-6,5 mm de longitud, hipanto de unos 3-4 mm, poco persistente, y con pelos adpresos y densos por el exterior. Tiene 4 sépalos de color crema, pubérulos por fuera. El fruto tiene un tamaño de unos 7 mm y es carnoso, globoso, de un rojo brillante y presenta una semilla ovoidea. (Nieto Feliner, 1997; Valdés et al., 1987).

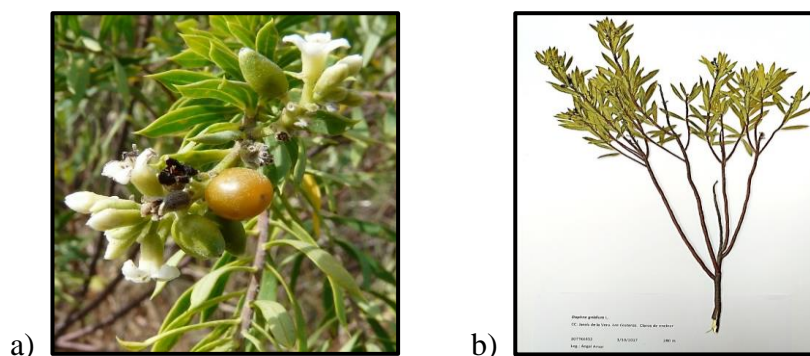


Figura 7: Muestra de un tallo vivo (a) y seco (b) de la planta *Daphne gnidium* L. (imágenes propias).

1.4.1.1. Nombres vulgares

Castellano: altrobisca, chorvisca, escriños, granilla, lentisco, mañusquera, matagallina, matapollero, matapollos, ojo pollo, taños, tobico, tolvihca, tolvisco, toña, torbisco, torbizca, torbizco, torobisco, torovisco, torovizco, torvihca, torvisca, torvisco, torvisco macho, torvisquera, torvizco, trobisca, trobisquera, trovisca, trovisco, trubisca, truvisca, truvisco, truvisquera, turbico, turbisco, uva de perro.

Catalán: baladre bord, herba pollera, laureola, matagallina, matapoll, matapollera, teàde mata, tei, tintorell, torvisco.

Gallego: chorovisco, churvisco, matapulgas, torvisca, trovisco, turvisco.

1.4.1.2. Clasificación taxonómica

Para *Daphne gnidium* L. la clasificación taxonómica se muestra en la Tabla 2

Tabla 2: Clasificación taxonómica de *Daphne gnidium* L.

CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA	
REINO:	<i>PLANTAE</i>
DIVISIÓN	<i>MAGNOLIOPHYTA</i>
CLASE	<i>MAGNOLIOPSIDA</i>
SUBCLASE:	<i>ROSIDAE</i>
ORDEN:	<i>MALVALES</i>
SUBORDEN	<i>MYRTALES</i>
FAMILIA:	<i>THYMELAEACEAE</i>
GÉNERO:	<i>DAPHNE</i>
ESPECIE:	<i>D. GNIDIUM</i>

1.4.2. Ecología y fenología

Esta especie crece en encinares, coscojales, alcornocales, pinares y en matorrales de sustitución (especialmente tras incendios). Se distribuye por la región mediterránea, desde la Península Ibérica, archipiélagos canario y balear hasta Grecia y norte de África. Se puede encontrar en alturas entre 0 y 1400 m. Florece de Junio a Noviembre. (Verdú y García-Fayos, 1998; Nieto Feliner, 1997).

1.4.3. Composición química

Se han realizado análisis fitoquímicos y de la actividad antioxidante de extractos de metanol con hojas y tallos de la planta *Daphne gnidium* L. (Cottiglia et al., 2001; Deiana et al., 2003; Nowik, 2005), describiéndose la presencia de cumarinas [daphnetina (Cabrera & García-Granados, 1981), daphnina (Cabrera & García-Granados, 1981), acetilumbeliferona (Ulubelen et al., 1986), daphnoretina (Cordell, 1984)], flavonoides [apigenina, luteolina (Cabrera & García-Granados, 1981; Harborne & Mabry, 1994), orientina (Cabrera & García-Granados, 1981; Harborne & Mabry, 1994), isoorientina (Cabrera & García-Granados, 1981; Harborne & Mabry, 1994), apigenina 7-O-glucósido (Cabrera & García-Granados, 1981; Harborne & Mabry, 1994), genkwanina (Wagner et al., 1976; Harborne & Mabry, 1994), 5-O-β-D-primeverosil genkwanina (Ragot et al., 1988; García-Granados & Sáenz de Buruaga, 1980)] y α-tocoferol. En otro estudio se menciona también el 2, 5, 7, 4'-tetrahidroxiisoflavanol (Wang et al., 1997). La estructura de estos compuestos, salvo el último mencionado, se recogen la Figura 8.

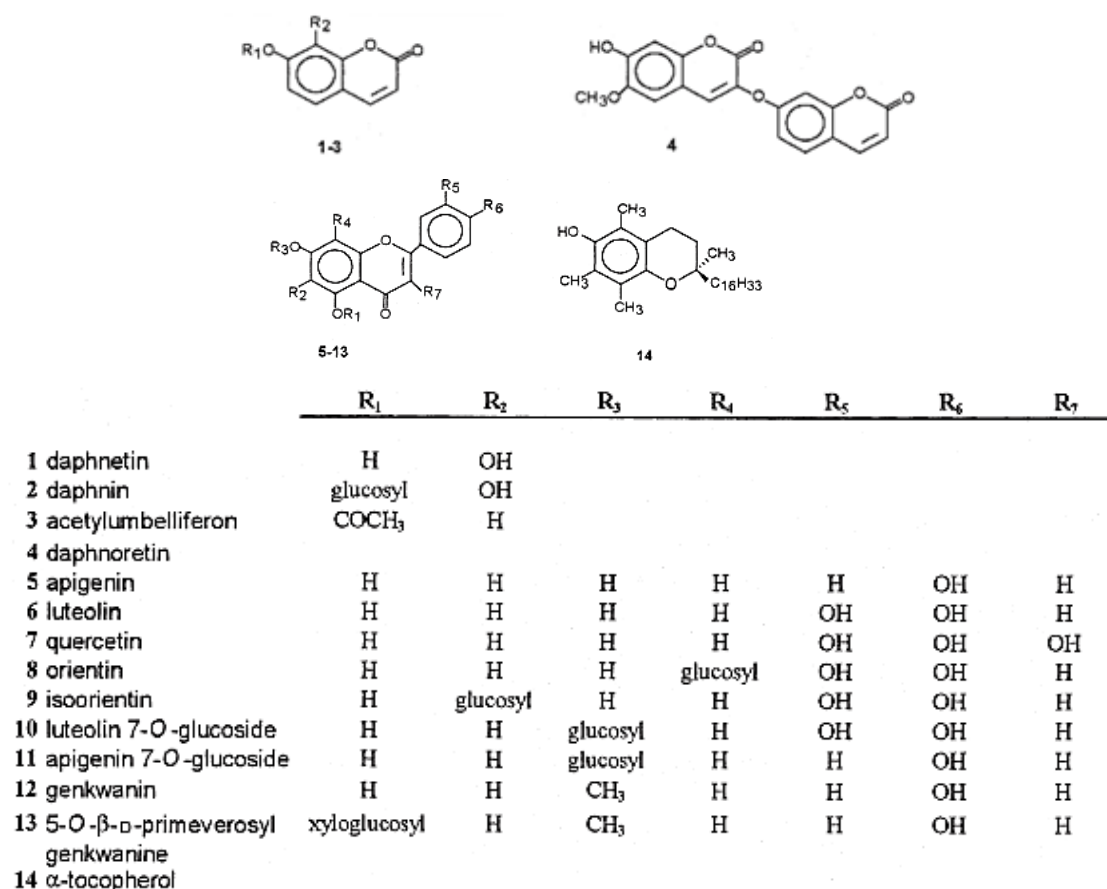


Figura 8: Sustancias fitoquímicas encontrados en *Daphne gnidium* L. (tomada de Deiana et al., 2003).

1.4.4. Estudios fitoquímicos y actividad biológica

En diversos estudios realizados con partes de esta planta y relacionados en el apartado bibliográfico, se ha demostrado su capacidad antioxidante (Deiana et al., 2003), así como antibacteriana y antimicótica. Para demostrar esta última se han realizado estudios con resultados positivos contra *Bacillus lentus* y *Escherichia coli*. (Cabrera & García-Granados, 1981; Ragot et al., 1988).

1.4.5. Conocimientos y usos tradicionales

Se han descrito numerosos usos de esta planta en medicina popular. Rodríguez Franco (2018) en la obra *Inventario español de los conocimientos tradicionales relativos a la biodiversidad*, estudia esta especie desde un punto de vista etnobotánico y recopila los siguientes usos tradicionales de la misma.

➤ **Alimentación animal**

El fruto se ha usado como alimento de pájaros, gallinas y perdices haciéndose una grana roja. También es apreciado por las cabras. Ha sido útil además como cebo en trampas para la caza de aves.

➤ **Medicina humana**

❖ **Sistema circulatorio**

Se ha utilizado como antihemorrágico aplicando la parte interior de la corteza sobre el corte a modo de torniquete. También para el tratamiento de hemorroides lavando la zona afectada con el caldo resultante de cocer la planta.

❖ **Sistema digestivo**

La infusión de hojas y tallos, aplicada en forma de enema, se ha usado como laxante.

Existe la creencia que atar la corteza a la cintura favorece un efecto astringente.

La parte de la planta resultante de separar la corteza del tallo, se utilizaba como remedio para dolores de vientre tras aplicarse externamente sobre el vientre. Para estos mismos síntomas otro remedio era comer el fruto crudo.

Se ha usado la planta cocida para combatir la inflamación del apéndice a modo de cataplasma.

Tuvo un uso muy extendido a lo largo de parte de España para el tratamiento de problemas de inflamaciones e infecciones de boca y dientes. Para ello se hacían enjuagues bucales o gargarismos con el cocimiento de la parte aérea o bien, masticando la parte externa del tallo o la raíz.

❖ **Sistema genito-urinario**

La planta tomada antes de las comidas ha servido de diurético y ha ayudado a prevenir las piedras en el riñón.

❖ **Concepción, embarazo y parto**

La corteza se ha usado puntualmente para favorecer la expulsión de la placenta atando una correa al cuello de las mujeres. Incluso se ha tratado con ella el cordón umbilical de los recién nacidos.

❖ **Sistema respiratorio**

En el tratamiento contra los ronquidos, se inhalaba el vapor generado tras hervir la planta. Para problemas asmáticos se han usado las plantas fumadas en forma de cigarrillo.

❖ **Musculatura y esqueleto**

Con la corteza reblandecida en agua durante un día y aplicada externamente, se conseguí aliviar los dolores musculares y atándola a una zona afectada, se trataban los desgarros musculares.

Otro remedio utilizado consistía en trenzar jirones del tronco y atarlos al cuerpo buscando un efecto antiinflamatorio o bien inmovilizar huesos y articulaciones.

❖ **Piel y tejido celular subcutáneo**

Su uso para el tratamiento de verrugas se extendió a varias zonas de España. Para ello, se restregaban las hojas, los frutos y/o un emplasto de los brotes tiernos sobre la verruga o bien aplicando la raíz hervida.

Otros usos dermatológicos asociados a la planta son como cicatrizante y desinfectante, tras hacer un torniquete con la parte interior de la corteza. O bien, como rubefaciente cociendo la planta en vinagre o en tisana. Los juanetes se trataban restregando las hojas.

❖ **Sistema nervioso y enfermedades mentales**

Se ha utilizado como calmante sin especificar el modo

❖ **Enfermedades infecciosas y parasitarias**

Se le atribuyen propiedades antisépticas. En algunos lugares el decocto de la corteza se ha utilizado como loción antiopjos. Otros usos asociados son el tratamiento de la sarna, la malaria, las fiebres tercianas y el herpes asociado al paludismo.

❖ **Intoxicaciones y envenenamientos**

Contra la picadura de animales venenosos como escorpiones, alacranes y víboras, se machacaban las hojas, ramas y corteza y se untaba el emplasto en la zona. Otra forma era atar la corteza.

➤ **Veterinaria**

❖ **Sistema circulatorio**

La corteza se ha utilizado para detener hemorragias en el ganado.

❖ **Sistema digestivo**

Su uso más conocido fue para cortar episodios de diarrea usando ramas enteras sin hojas o bien jirones de corteza atados a diferentes partes de los animales (cuello, rabo, patas, etc.)

❖ **Sistema genito-urinario**

La corteza se ha usado como ayuda a la hora de capar animales, atándola para evitar la bajada de los testículos y hemorragias.

También para evitar el celo atando una tira de corteza de los tallos jóvenes al cuello del animal.

❖ **Concepción, embarazo y parto**

Al igual que para los humanos, esta planta ayudaba en la expulsión de la placenta.

❖ **Sistema respiratorio**

Trenzas de la corteza atadas al cuello han servido para tratar infecciones de las vías respiratorias de animales domésticos. También se ha utilizado para controlar el moquillo en perros.

❖ **Musculatura y esqueleto**

Las fracturas óseas y las torceduras se trataban con las ramas o incluso la corteza de la planta.

❖ **Sentido de la vista**

Para curar los ojos infectados se ataba un collar de la planta al cuello.

❖ **Piel y tejido celular subcutáneo**

En el tratamiento de heridas, uñeros y granos, o se daba a beber el cocimiento de la planta, o se aplicaba tópicamente. También se podía aplicar la corteza machacada.

❖ **Enfermedades infecciosas y parasitarias**

Para actuar contra los parásitos, se servían de collares. Éstos también servían para eliminar las sanguijuelas que se agarraban a la garganta.

Con el agua de macerar la raíz, se lavaban las heridas infectadas con larvas de mosca.

❖ **Síntomas y estados de origen indefinido**

Un uso conocido del macerado de la raíz de esta planta ha sido como tónico estimulante cuando las gallinas estaban enfermas.

➤ **Efectos tóxicos y nocivos**

Un uso continuado de la corteza de la planta irrita la garganta y se ha de cortar seca para evitar dermatitis de contacto en ojos y boca.

Tiene cualidades venenosas aprovechadas como repelente de pulgas, ratas y topos.

Incluso se ha utilizado para pesca furtiva provocando la asfixia de los peces.

➤ **Otros usos no alimenticios**

Su madera ha servido como leña y la corteza para atar haces de romero que se utilizaban para ahumar el interior de las colmenas o bien para atar las distintas partes de la construcción de la casa de los pastores

Sumergiendo la ropa en su cocimiento, se conseguía teñir la tela.

Las tiras de su corteza también han servido en la fabricación de herramientas y utensilios como escobas, balayos, redes de pesca así como correas y cuerdas. Las ramas por su lado se usaban en la construcción de jaulas y cestos.

Otro uso popular fue como sustitutivo del tabaco.

1.5. Compuestos fenólicos

Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol (Figura 9). Los compuestos fenólicos son un grupo muy variado estructuralmente que abarcan desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos, hasta moléculas más complejas como los taninos.

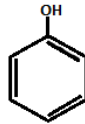


Figura 9: Estructura de fenol

Existen dos rutas de síntesis (Figura 10) para estos compuestos: la ruta del ácido shikímico y la ruta del ácido malónico. Esta última, importante para hongos y bacterias, es poco empleada en plantas. (García & Pérez, 2009)

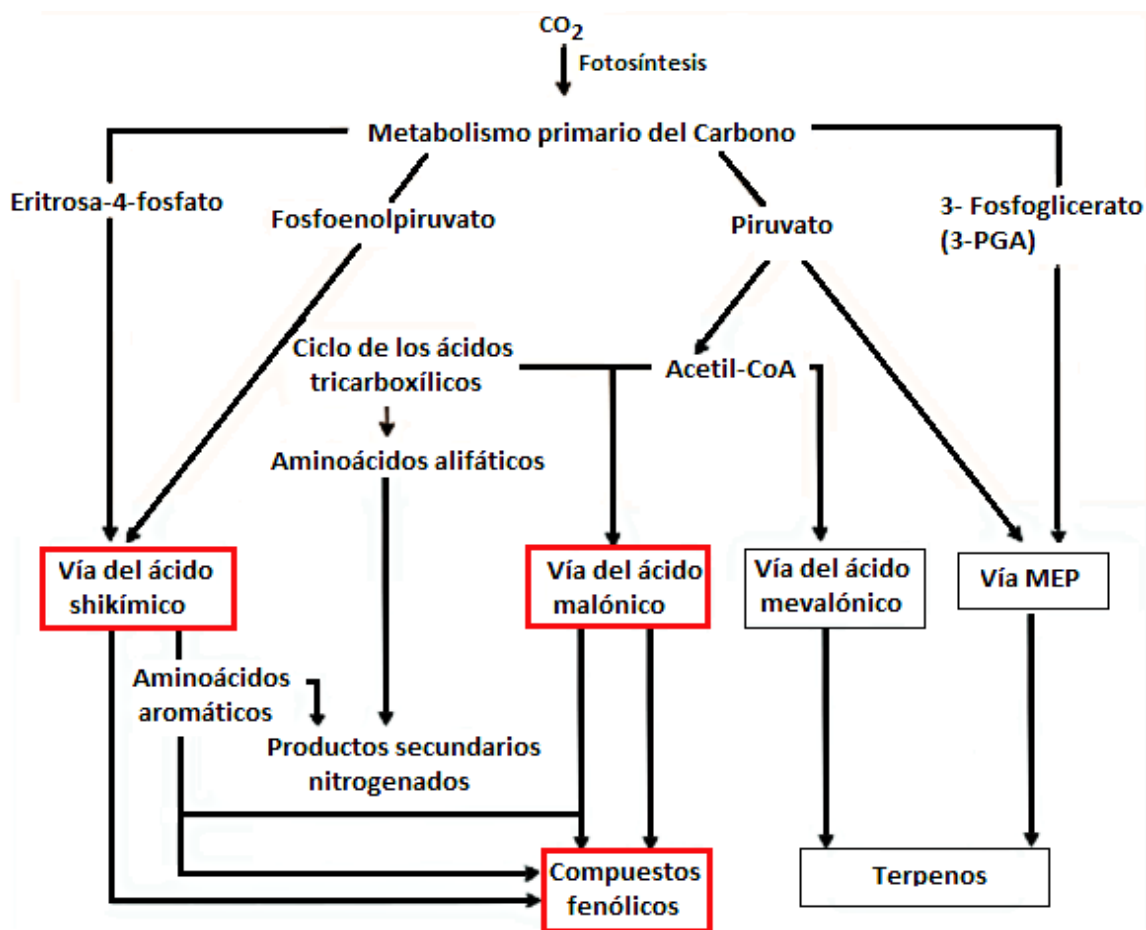


Figura 10: Metabolismo primario del carbono: posibles rutas de síntesis para los compuestos fenólicos (tomada de García y Pérez, 2009).

La ruta del ácido shikímico, que parte de eritrosa-4-fosfato y de ácido fosfoenolpirúvico hasta dar el esperado ácido, es la ruta responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos. Posteriormente, la fenilalanina, aminoácido derivado del ácido shikímico, sirve como precursor para el resto de compuestos fenólicos (Figura 11).

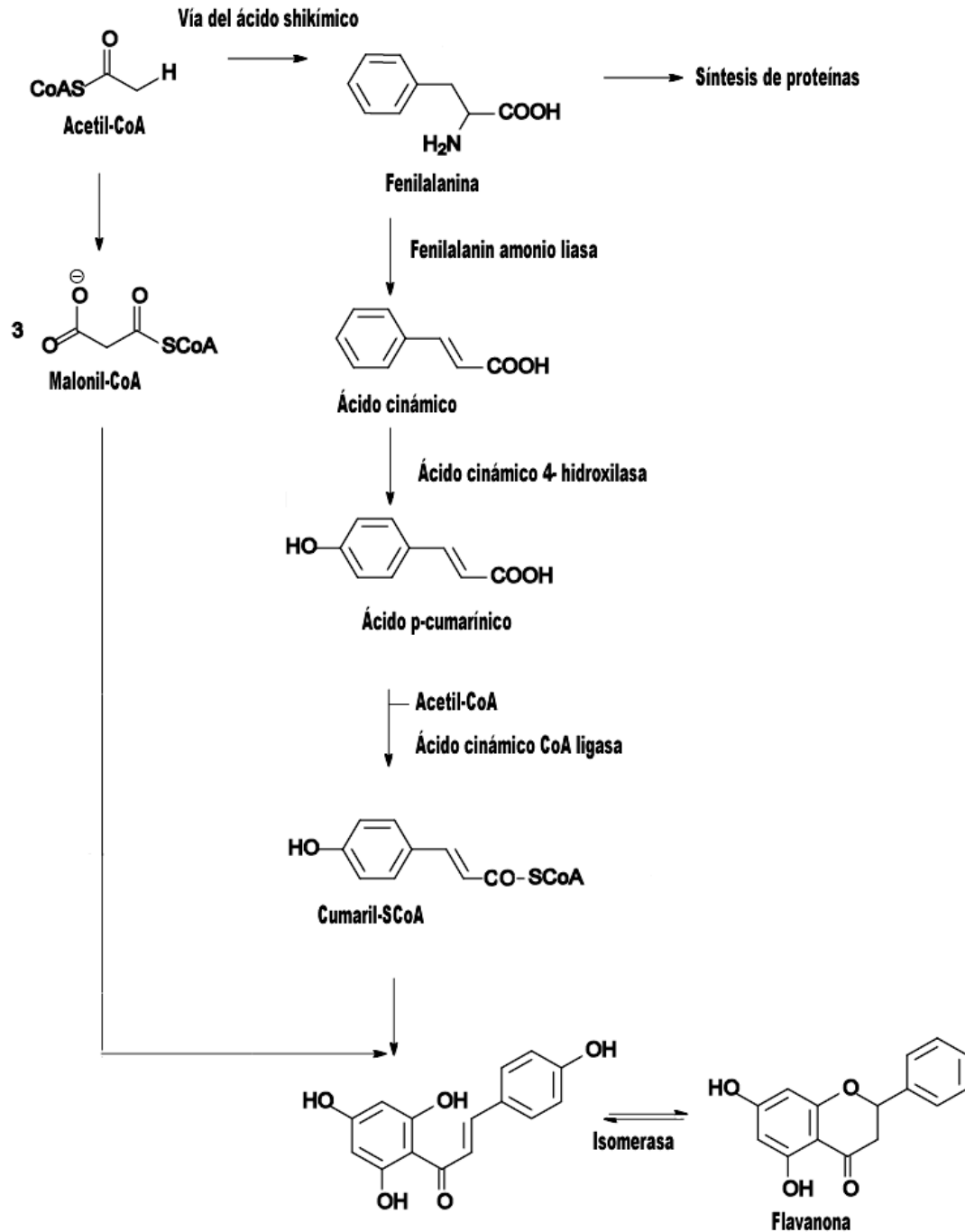


Figura 11: Biosíntesis de compuestos fenólicos (tomada de García & Pérez, 2009).

Los ácidos *trans*-cinámico y *p*-cumárico se metabolizan para formar otros dos ácidos (ferúlico y cafeico) precursores de otros derivados como cumarinas, lignina, taninos, flavonoides e isoflavonoides.

Para este trabajo resultan interesantes los derivados de ácidos cinámicos, las cumarinas y los flavonoides, ya que son los compuestos esperados para las plantas escogidas.

Los ácidos cinámicos son un grupo de fenoles caracterizados por una cadena insaturada de tres átomos de carbono (Figura 12). Ejemplos descritos de ellos son el ácido cafeico, el clorogénico (el más abundante en plantas) y sus isómeros.

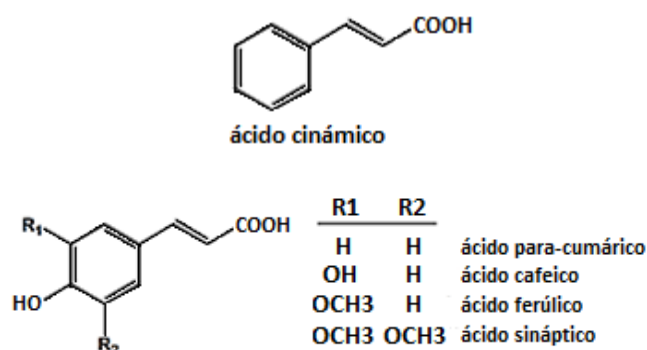


Figura 12: Ácido cinámico y derivados.

Como ya se había mencionado, a partir de estos se sintetizan otros derivados como las cumarinas y los flavonoides (Figura 13).

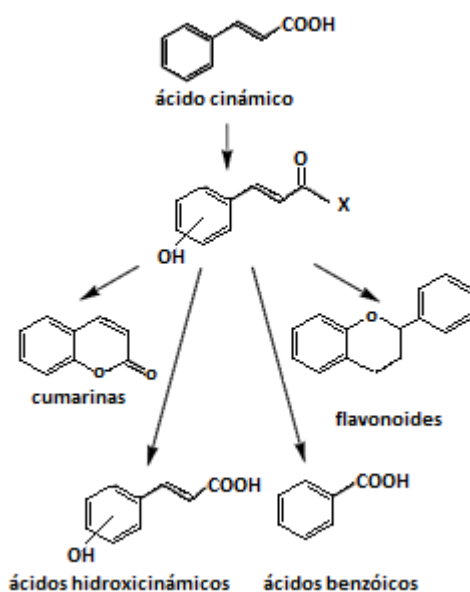


Figura 13: Familias de compuestos derivados del ácido cinámico en la biosíntesis de plantas.

Las cumarinas (Figura 14) son una amplia familia de lactonas fenilpropanoides (ésteres cíclicos) del ácido o-hidróxi-cinámico (2H-1-benzopiran-2-onas).

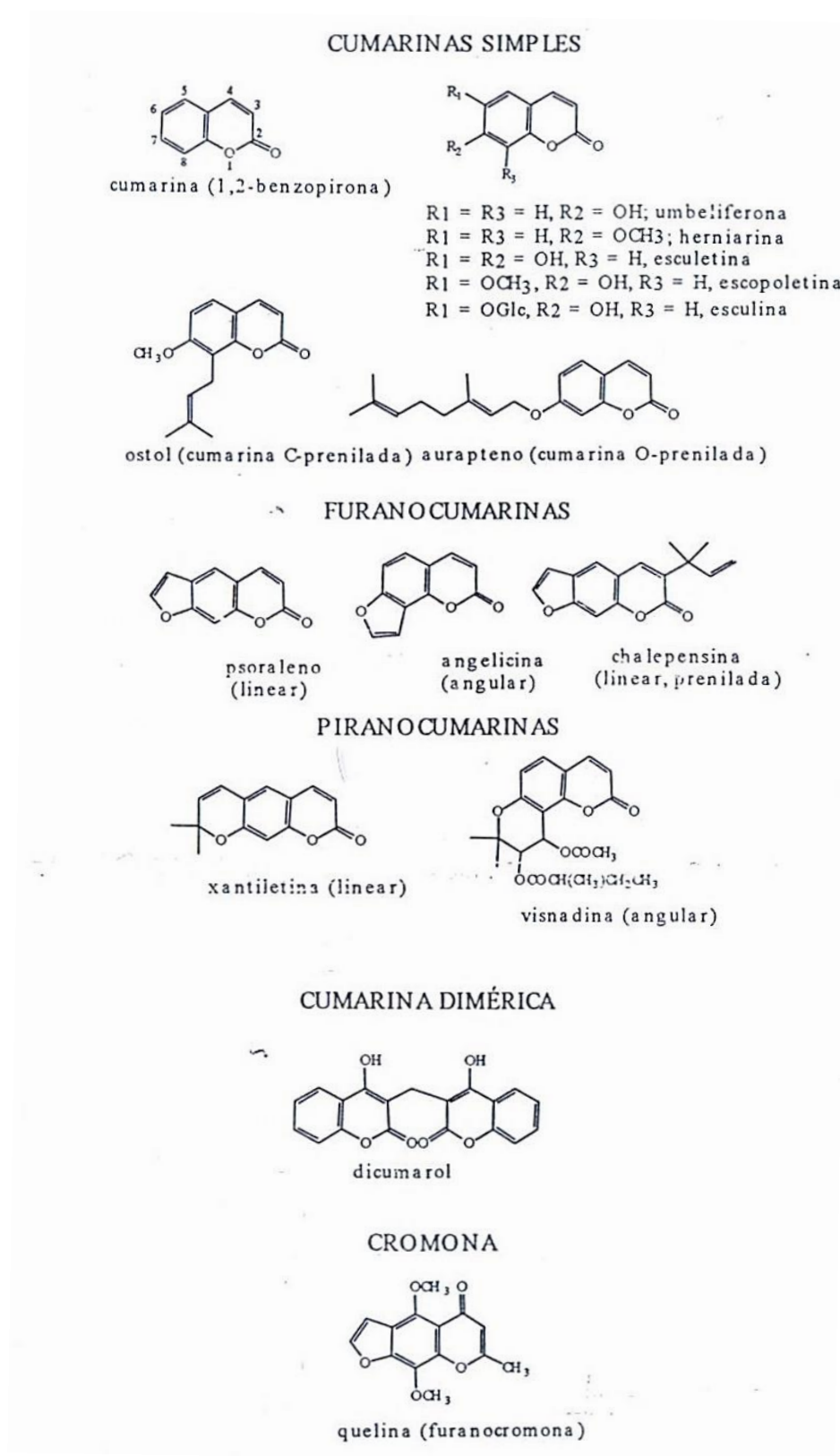


Figura 14: Estructura de diferentes cumarinas (tomada de la página web: quimica.laguia2000.com).

Por otro lado, los flavonoides son compuestos fenólicos importantes en las plantas (Março et al., 2008). Su esqueleto carbonatado contiene 15 carbonos dispuestos en un anillo bencénico unido a una cadena de 3 carbonos que hace de enlace con otro anillo bencénico. Los anillos son denominados A, B y C. Para nombrar a los átomos de carbono se utilizan números ordinarios para los anillos A y C y números primos para el anillo B.

Los flavonoides naturales más habituales suelen presentar al menos tres hidroxilos fenólicos y se encuentran generalmente combinados con azúcares en forma de glicósidos, aunque también se presentan con relativa frecuencia como agliconas libres. Se biosintetizan en todas las plantas terrestres o embriofitas, y pese a compartir la vía biosintética central, poseen una gran variabilidad en la composición química de sus productos finales, por lo que la composición y concentración de flavonoides es muy variable entre especies y en respuesta al ambiente.

Se clasifican en función del grado de oxidación de la cadena de 3 carbonos en diferentes grupos: las chalconas, las flavonas, los flavonoles, las isoflavonas, los flavanoles, las antocianinas, las flavanonas y los taninos condensados (Figura 15).

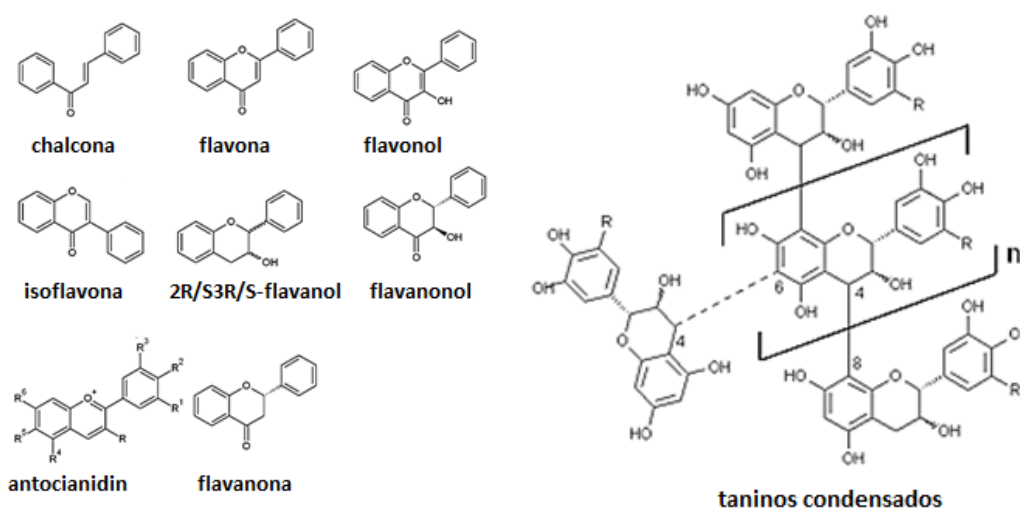


Figura 15: Estructuras de diferentes grupos de flavonoides (tomada de Março et al., 2008.).

La primera etapa de la ruta de biosíntesis de flavonoides consiste en la condensación de 3 moléculas de malonil-CoA con una de p-cumaril-CoA, catalizado por la enzima chalcona sintasa. Esto da lugar a naringerina chalcona, que es precursora de flavonoles y antocianinas.

Las antocianinas por su parte, son glicósidos que poseen resto de azúcar normalmente en posición 3, pero que también pueden tenerlo en otras posiciones. Si carecen de este azúcar se llaman antocianidinas.

En cuanto a los taninos condensados son polímeros de unidades flavan-3-ol unidas por enlaces carbono-carbono que pueden ser oxidados para dar antocianidinas, por lo que también se denominan proantocianidinas.

Las flavonas y flavonoles, están presentes en muchos vegetales y son los flavonoides más comunes. Están ampliamente distribuidos en las plantas siendo responsables del color amarillo de algunas flores.

Las flavanonas y flavanonoles existen en muy pequeñas cantidades comparados con los otros flavonoides. Son incoloros o ligeramente amarillos. Los flavonoides tienen el anillo bencénico B en posición 2 del heterociclo central, mientras que en los isoflavonoides el anillo B ocupa la posición 3.

Las isoflavonas son incoloras y están mucho menos distribuidas en las plantas.

1.5.1. Funciones de los flavonoides en plantas

Los flavonoides cumplen diferentes funciones en las plantas de las cuales algunas de ellas son:

- Proteger al organismo del daño producido por agentes oxidantes como los rayos ultravioletas y la polución ambiental (Harborne & William, 2000), y contra agentes agresores externos como bacterias, hongos e insectos, otros animales herbívoros y las otras plantas (efecto alelopático). (Aoki et al., 2000).
- Actuar como señales químicas o marcadores florales que guían a las abejas y otros insectos polinizadores hacia el néctar, indicando así que la planta es apropiada para su alimentación, o bien para depositar sus huevos. Facilitan así de forma indirecta la polinización. (Cook et al., 1996).
- Son los responsables de los colores de muchos frutos, particularmente por la presencia de antocianos, variando según la acidez del medio y las interacciones con otras sustancias presentes. Un medio básico o débilmente ácido suele desplazar la coloración a tonos azules, mientras que medios más ácidos produce tonalidades más bien rojizas (Cartaya et al., 2001).
- Controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas.

1.5.2. Caracterización fenólica: antecedentes bibliográficos

Los flavonoides son metabolitos secundarios de origen vegetal que se ubican principalmente en las hojas y las partes aéreas de las plantas, apareciendo sólo rastros de ellos en las partes de la planta por debajo de la superficie del suelo.

En la actualidad, la razón por la que resultan tan interesantes los flavonoides es porque contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y por ello, presentan excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, y una gran capacidad antioxidante. Esta actividad antioxidante depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química. Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C (Martínez-Flores *et al.*, 2002)

Para su estudio, la extracción de los diferentes flavonoides se realiza a partir del material vegetal fresco o bien seco, siempre y cuando el proceso de secado no altere la composición de los flavonoides. Moliendo el material se facilita la extracción de los compuestos, ya que presentan una alta solubilidad en una gran variedad de solventes orgánicos. Por ejemplo, los flavonoides que poseen un gran número de grupos hidroxilos o azúcares son considerados compuestos polares, y resultan moderadamente solubles en solventes polares (etanol, metanol, acetona, agua, etc). En cambio, las agliconas menos polares como isoflavonas y flavanonas tienden a ser más solubles en solventes más apolares (éteres, cloroformo, etc).

La siguiente etapa a seguir es la separación e identificación de los flavonoides presentes en el extracto. Con este objetivo se pueden utilizar diferentes técnicas cromatográficas: la cromatografía de papel (CP), la cromatografía de capa fina (CCF), la cromatografía de columna (CC) y especialmente la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Siendo esta última muy usada para la separación, determinación cuantitativa e identificación de flavonoides, por su altos niveles de resolución y sensibilidad.

2. OBJETIVOS

- 1) Adaptar un método de HPLC en fase reversa que permita la correcta separación de los compuestos fenólicos presentes en las muestras objeto de estudio.
- 2) Establecer, mediante HPLC-DAD-MS el perfil de compuestos fenólicos característicos de las partes aéreas (tallos, hojas e inflorescencias) de las especies *Bidens aurea* (Aiton) Sherff y *Daphne gnidium* L.

II. MUESTREO

1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE *BIDENS AUREA* (AITON) SHERFF Y *DAPHNE GNIDIUM* L.

Las muestras de las plantas, tanto de *Bidens aurea* (Aiton) Sherff como de *Daphne gnidium* L. fueron recogidas durante el otoño de 2017, en los meses de Octubre y Noviembre.

Ambas muestras fueron herborizadas en el nordeste de la provincia de Cáceres, concretamente en la comarca de La Vera, como se muestra en las Tabla 3 y Figura 16. Una muestra testigo de cada una se incluyó en el Herbario de la Universidad de Salamanca, cuyo acrónimo en el *Index Herbariorum* es SALA.

Tabla 3: Información sobre la recogida de las plantas

MUESTRA	FECHA DE RECOGIDA	LOCALIDAD	COORDENADAS UTM	Nº PLIEGO SALA
<i>Daphne gnidium</i> L.	01/10/2017	Jaraíz de la Vera	30TTK6832	163350
<i>Bidens aurea</i> (Aiton) Sherff	16/11/2017	Talaveruela de la Vera	30TTK8544	163349



Figura 16: Mapa de la comarca donde fueron recogidas las muestras.

Las muestras fueron obtenidas en estado fresco y secadas al aire sin ningún tipo de tratamiento.

2. ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras de las plantas una vez desecadas se conservaron a -18 °C hasta su utilización.

Para realizar los ensayos se trataron independientemente muestras de tallos, hojas e inflorescencias de ambas plantas, identificándolas con los códigos reflejados en la Tabla 4:

Tabla 4: Códigos asignados a las distintas muestras analizadas.

Planta	Parte de la planta	Código identificativo
<i>Daphne gnidium</i> L.	Tallos	DGT
<i>Daphne gnidium</i> L.	Hojas	DGH
<i>Daphne gnidium</i> L.	Inflorescencias	DGF
<i>Bidens aurea</i> (Aiton) Sherff	Tallos	BAT
<i>Bidens aurea</i> (Aiton) Sherff	Hojas	BAH
<i>Bidens aurea</i> (Aiton) Sherff	Inflorescencias	BAF

**III. CARACTERIZACIÓN DE FLAVONOLES Y
FLAVONAS PRESENTES EN LAS ESPECIES
BIDENS AUREA (AITON) SHERFF Y *DAPHNE
GNIDIUM* L.**

1. MATERIAL Y MÉTODOS

1.1. Reactivos y soluciones de trabajo

Equipo

- Balanza analítica “Sartorius” Extend ED124S con aproximación de 0,1 mg
- Agitador orbital con incubación “VWR”
- Sistema de purificación de agua ultrapura Direct-QTM “Millipore”
- Microcentrífuga “Thermo scientific” Heraeus Fresco 17
- Centrífuga “Kokusan” H-103N Series
- Equipo de evaporación rotatorio “Büchi” formado por:
 - Controlador de vacío V-850
 - Rotavapor R-210
 - Baño calefactor B-491
- Equipo cromatográfico “Agilent Technologies” 1200 Series Binary SL constituido por:
 - Desgasificador
 - Bomba binaria
 - Columna con termostato
 - Inyector automático
 - Detector de haz de fotodiodos
- Espectrómetro de masas “Applied Biosystems” 3200 Q TRAP® LC/MS/MS System
- Matraz en forma de corazón (25 mL) “Alamo”
- Pipetas Pipetman Classic™ P10 mL (100 - 1000 µL) “Gilson”
- Pipetas Pipet-Lite XLS (500 -5000 µL) LTS® “Rainin”
- Puntas de pipeta universal (100 - 1000 µL) “Daslab”
- Puntas de pipeta BioClean (500 - 5000 µL) LTS® “Rainin”
- Microtubos de centrifuga graduados de fondo redondo (2 mL) “Eppendorf”
- Tubos de centrifuga graduados de polipropileno (15 mL)
- Viales de cristal con tapón de rosca con septum de silicona para inyección de muestras en HPLC

Reactivos y disolventes específicos

a) Empleados para la extracción de compuestos fenólicos

- Agua ultrapura Quantum EX Ultrapure Organex Cartridge “Millipore”
- Metanol calidad HPLC “Lab-Scan”

b) Empleados para el análisis de compuestos fenólicos

- Acetonitrilo HiPerSolv CHROMANORM®, calidad gradiente para HPLC
- Ácido fórmico (Panreac)

1.2. Método de extracción y análisis

1.2.1. Extracción.

Para llevar a cabo el proceso de extracción de los compuestos fenólicos, aproximadamente 5 g de cada una de las muestras (flores, tallo y hojas) fueron finamente pulverizados y extraídos con 100 mL de una mezcla de metanol/agua (75:25). Las muestras se tuvieron en agitación 24 h, transcurridas las cuales se centrifugaron, se separaron los sobrenadantes, en los que estaban los compuestos de interés, y los precipitados se sometieron dos veces más al proceso descrito.

Posteriormente se juntaron todos los sobrenadantes correspondientes a cada muestra y el metanol se eliminó por evaporación con vacío a temperaturas no superiores a 40 °C. A continuación, la fase acuosa resultante se enrasó hasta 100 mL y se mantuvo en refrigeración hasta el momento de su análisis.

1.2.2. Detección e identificación

Se empezó a utilizar HPLC para el análisis de compuestos fenólicos en torno a 1970 (Adamovics & Stermitz, 1976; Wulf & Nagel, 1976), y desde entonces, se ha convertido la técnica de elección para el análisis individual, tanto cualitativo como cuantitativo, de todas las clases de flavonoides.

No hay un método universal de uso del HPLC que se puede aplicar para la separación de compuestos fenólicos en cada situación, por eso los laboratorios tienden desarrollar sus propios métodos de acuerdo a sus necesidades analíticas particulares.

Todos los métodos de análisis en HPLC de flavonoides se han basado principalmente en la detección de UV-vis a longitudes de onda específicas. La detección a 280 nm indica la presencia de flavonoides. Sin embargo, las distintas subclases de flavonoides poseen formas de espectros características con máximos de absorción a longitudes de onda concretas y específicas que ayudan a su identificación. Las isoflavonas suelen exhibir su máximo a 255-265 nm, catequinas a 270-280 nm, flavanonas a 280-290 nm, flavonas a 330-350 nm y 250-270 nm, flavonoles a 330-380 nm y 250-270 nm, chalconas a 340-390 nm y antocianinas a 500-530 nm y 270-280 nm (Markham, 1982).

1.2.2.1. Análisis por HPLC-DAD-MS

El análisis de los compuestos fenólicos se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa, utilizando una doble detección en línea mediante espectrofotometría de diodos y espectrometría de masas (HPLC-DAD-MS).

La separación se llevó a cabo en una columna Agilent Poroshell 120 EC-C18 (2,7 μm , 150 mm x 4,6 mm) termostaticada a 35 °C, utilizando como fase móvil ácido fórmico 0,1% (eluyente A) y acetonitrilo (eluyente B) y fijándose un flujo de trabajo de 0,5 mL/min. El gradiente de elución empleado fue el siguiente: se comienza con un 15 % de acetonitrilo que se mantiene constante hasta el minuto 5, posteriormente se incrementa hasta alcanzar un 20% en 5 minutos, del 20-35% en 10 minutos, 35–50% B en 10 minutos, 50–60% B en 5 min, y después permanece isocrático al 60% B durante 5 minutos más, procediéndose posteriormente a un re-equilibrado de la columna a condiciones iniciales antes de realizar una nueva inyección (Tabla 5)

Previo a la inyección la muestra fue centrifugada durante 5 min a 10000 rpm, el volumen de inyección fue de 100 μL y la detección espectrofotométrica se realizó seleccionando como longitudes de onda preferentes 280 y 360 nm.

Tabla 5: Gradiente de elución utilizado para el método en HPLC.

Tiempo (minutos)	% Eluyente A	% Eluyente B
0	85	15
5	85	15
10	80	20
20	65	35
30	50	50
32	40	60
37	40	60
40	85	15

El análisis de masas se llevó a cabo operando con ionización en modo negativo a una temperatura de 400 °C y registrando los espectros entre m/z 100 y m/z 1500. Para el secado del eluyente se utilizó aire Zero como gas nebulizador (30 psi) y gas turbo (400 °C, 40 psi), y nitrógeno como gas cortina (20 psi) y gas de colisión. Los espectros de masas se registraron entre m/z 100 y 1500. El método de detección seleccionado fue *full scan* de alta sensibilidad (Enhanced MS, EMS) con un voltaje del capilar -4500 V, declustering potential (DP) -50 V, potencial de entrada (EP) -6 V, y energía de colisión (CE) -10 V. Seguido de este análisis se llevó a cabo otro en modo *Enhanced Product Ion* (EPI) para obtener la fragmentación característica del ión mayoritario obtenido en el primer experimento. En este caso las condiciones empleadas fueron: DP -50 V, EP -6 V, CE -25 V y collision energy spread (CES) 0 V.

La identificación de los compuestos fenólicos se realizó en base a los criterios de tiempos de retención observados en los cromatogramas, los espectros UV – visible y los datos de MS y MSⁿ obtenidos en el espectrómetro de masas.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. Información preliminar

La espectroscopía UV-Vis es una técnica útil para la caracterización e identificación de compuestos fenólicos ya que los máximos de absorción de sus espectros UV-Vis sufren desplazamientos según algunos patrones de sustitución, medio disolvente y adición de algunos reactivos (Markham, 1982).

En el caso de los flavonoides, la posición de las bandas depende de la naturaleza del anillo C y de la posición del grupo fenilo (anillo B: sustituyente del C² o C³). El número y posición de los sustituyentes sobre los anillos aromáticos provocan cambios en la absorción y por tanto en la apariencia del espectro.

La absorción de los distintos flavonoides en la región de 300-560 nm se designa como banda I y se asume que es originada por el anillo B y su conjugación con el grupo carbonilo en C⁴ cuando éste existe (flavonas, flavonoles y dihidroflavonas). La posición de esta banda puede favorecer la identificación del tipo de flavonoide y su patrón de sustitución. Por otro lado, la banda II se sitúa en la región de 240-280 nm y se debe al anillo A, siendo característica de todas las familias de compuestos fenólicos.

En las Figura 17 y Figura 18 se muestran la estructura general de las bandas I y II para los flavonoides y la comparación de la longitud de onda a la que aparecen las mismas en los distintos tipos de flavonoides (mismo patrón de oxigenación).

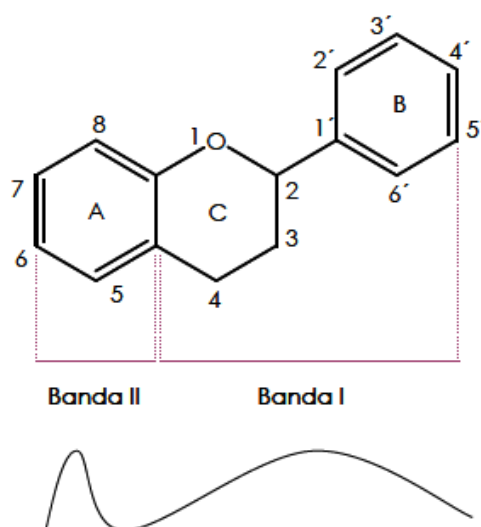


Figura 17: Esquema del perfil de absorción en UV- Vis para las bandas I y II en flavonoides.

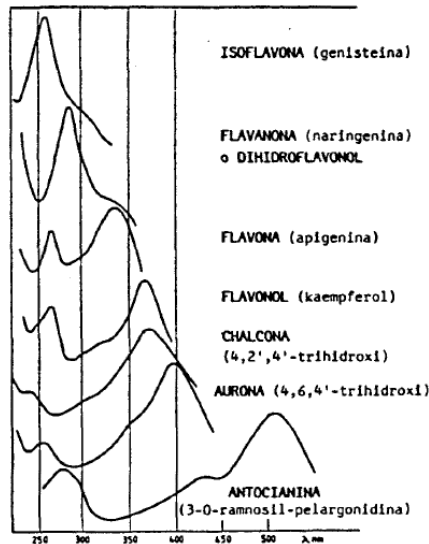


Figura 18: Comparación de los espectros de UV-Vis en diferentes tipos de flavonoides con el mismo patrón de oxigenación (tomada de Markham, 1982).

Se observa como flavanonas, dihidroflavonoles e isoflavonas tienen una banda I de muy baja intensidad, casi inapreciable y esto se debe a que no hay conjugación entre los anillos A y B. En cambio, otros tipos de flavonoides como flavonas, flavonoles, chalconas, auronas y antocianinas presentan una marcada banda I, con máximos de absorción a longitudes de onda crecientes.

El resumen de las longitudes de onda a las que aparecen las bandas I y II queda reflejado en la Tabla 6

Tabla 6: Distintos tipos de flavonoides y las longitudes de onda a las que aparecen sus bandas I y II.

Tipo	λ Banda I (nm)	λ Banda II (nm)
Flavonas	310-350	250-280
Flavonoles (3-OH-sustituidos)	330-360	250-280
Flavonoles (3-OH-libres)	350-385	250-280
Isoflavonas	310-330 (hombro)	245-275
Flavanonas y Dihidroflavonoles	300-330 (hombro)	275-295
Chalconas	340-390	230-270 (baja intensidad)
Auronas	380-430	230-270 (baja intensidad)
Antocianidinas y antocianinas	465-560	270-280

→Efecto de los sustituyentes en el espectro UV-Vis

Con el aumento de la oxigenación en el anillo B se produce un efecto batocrómico (desplazamiento hacia longitudes de onda mayores) en la banda I por cada sustituyente. Con los dos primeros sustituyentes el efecto es notablemente alto, mientras que con el tercero no se ve tan afectada la posición de la banda I. En cuanto a la banda II, según el patrón de oxigenación del anillo B, puede mostrar uno o dos picos (IIa y IIb), siendo el pico IIa el de mayor longitud de onda.

En cambio, el incremento de la hidroxilación en el anillo A causa el efecto batocrómico en la banda II y no tanto en la banda I (Markham, 1982).

→Efecto de la metilación y glicosilación

Si un grupo hidroxilo de las posiciones 3, 5, o 4' se metila o glicosila se aprecia un efecto hipsocrómico (desplazamiento hacia longitudes de onda menores) especialmente en la banda I de unos 12-17 nm e incluso puede alcanzar hasta 22-25 nm en flavonoles que no tienen un OH en el C⁵.

La sustitución de grupos OH en posiciones diferentes a 3, 5 y 4' no tienen o tienen poco efecto en el espectro UV-Vis.

→Efecto de la acetilación

La acetilación de los grupos fenólicos anula el efecto de este grupo sobre el espectro UV-Vis., es decir, anula el efecto batocrómico que produce el grupo hidroxilo en las bandas del anillo aromático ya que se afecta la conjugación entre el átomo de oxígeno y el anillo aromático.

2.2. Resultados obtenidos

La identificación de los distintos compuestos fue posible tras analizar minuciosa y exhaustivamente los datos referidos a los tiempos de retención observados en los cromatogramas, los espectros UV – vis y los datos de MS y MSⁿ obtenidos en el espectrómetro de masas.

En cuanto al formato de trabajo, se realizaron paralelamente dos investigaciones con las mismas muestras sometiendo a las mismas a distintas condiciones:

- En un primer caso, se mantuvieron todo el tiempo las extracciones de las muestras a temperatura ambiente en botes cerrados.
- En el segundo caso, se conservaron refrigeradas a una temperatura de unos 4 °C, en botes similares a los anteriores.

Se descubrió así que eran sensibles a la temperatura, pues las muestras que estuvieron a temperatura ambiente todo el proceso, mostraron signos de que los compuestos se habían degradado con el paso del tiempo.

1.2.1. Resultados obtenidos para la muestra de *Bidens aurea* (Aiton) Sherff

En las Figura 19, Figura 39 y Figura 41 se recogen los cromatogramas de HPLC registrados a longitudes de onda de 280 y 360 nm con los perfiles de compuestos fenólicos de las tres diferentes muestras de *Bidens aurea* (Aiton) Sherff (BAF, BAH, BAT).

En los cromatogramas se han numerado aquellos picos para los que se pudo obtener datos para su identificación definitiva o provisional. La identificación de compuestos, como se ha mencionado, se hizo basándose en su comportamiento cromatográfico en HPLC, espectros de absorción obtenidos con el detector de espectrofotometría de diodos (DAD) y datos obtenidos de la detección por espectrometría de masas (ión pseudomolecular y patrón de fragmentación).

Se puede observar que las tres muestras presentan un perfil distinto, como cabía esperar, pero todas tienen en común que predominan los compuestos menos polares, que eluyen a tiempos de retención más largos.

→ Muestra BAF:

En la Figura 19 se representa el cromatograma correspondiente a la muestra BAF a las longitudes de onda de 360 y 280 nm.

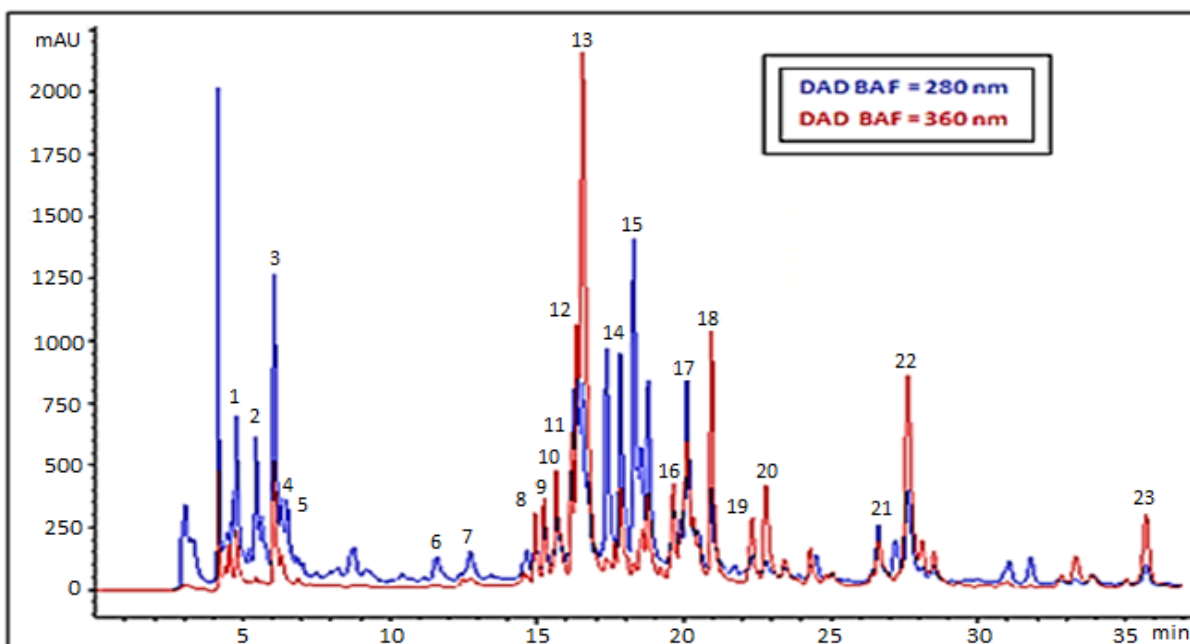


Figura 19: Cromatograma de los extractos fenólicos de las flores de *Bidens aurea* (Aiton) Sherff (BAF).

Como se puede observar, se consideraron un total de 23 picos de interés, siendo los mayoritarios los picos **1, 2, 3, 12, 13, 14, 15, 17, 18 y 22**. Más adelante, en la Tabla 7 se recogen las características espectrales, tanto de absorción UV-Vis como de masas, de los mismos.

Los picos 1, 3, 4, 5, 7, 14, 15 y 17 presentan espectros de absorbancia similares, con un máximo en torno a 320-330 nm y un hombro a 290-300 nm (Figura 20). Con estos datos se pudieron asociar a derivados hidroxicinámicos.

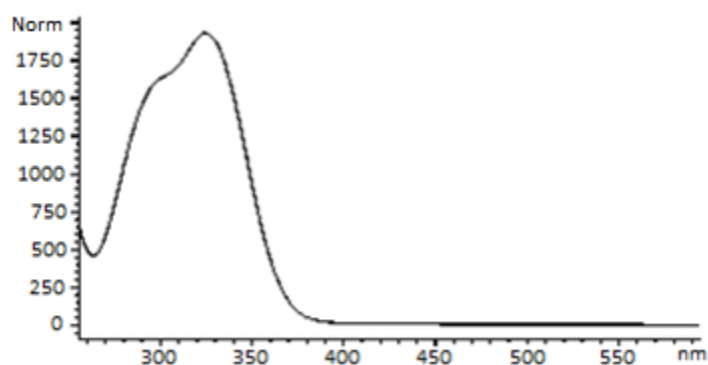


Figura 20: Espectro UV del pico 1.

Los picos 1, 3 y 4 tienen un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ con relación m/z de 707 (doble de 353), que origina tres fragmentos distintos, de m/z 191, 179 y 135 en el

espectro MS. El fragmento 191 podría corresponder al ión $[M-H]^-$ del ácido quínico y el fragmento 179, al del ácido cafeico, siendo también 135 un fragmento característico correspondiente al ácido cafeico descarboxilado (Khoza et al., 2016). Estos datos indican que se trata de ácidos cafeoilquínicos (ácidos clorogénicos).

Basándose en datos recogidos en la bibliografía sobre el orden de elución y fragmentos característicos en el análisis de masas, el pico 1 podría corresponderse con el ácido 3-*O*-cafeoilquínico (Figura 21), mientras que los picos 3 y 4 podrían asignarse a los ácidos 5-*O*-cafeoilquínico y 4-*O*-cafeoilquínico, respectivamente (Clifford et al., 2003; Solís et al., 2005).

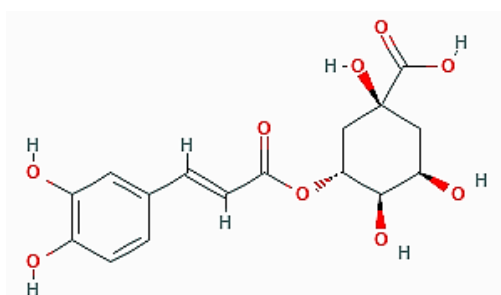


Figura 21: Ácido 3-*O*-cafeoilquínico (imagen tomada de pubchem).

El pico 5, que también pertenece a esta familia, presenta un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ con relación m/z de 367, que origina tres fragmentos distintos, de m/z 191, 175 y 135 en el espectro MS^2 . El fragmento de m/z 191 al igual que antes hace referencia al ácido quínico. Se puede tratar de un ácido feruoilquínico (Figura 22)

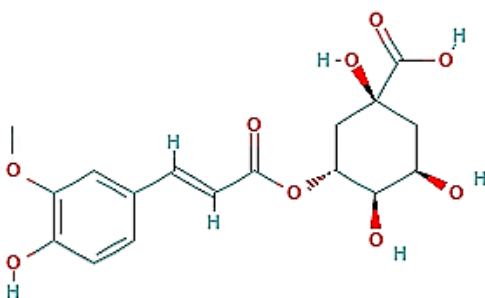


Figura 22: Ácido 3-*O*-feruoilquínico (imagen tomada de pubchem).

El pico 7, con características UV similares en su espectro un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ con relación m/z de 677, y fragmentaciones de 515, 353, 179 y 135, correspondería con un derivado del ácido cafeoilquínico unido a dos ácidos cafeicos más resultando el ácido tricafeoilquínico (Figura 23).

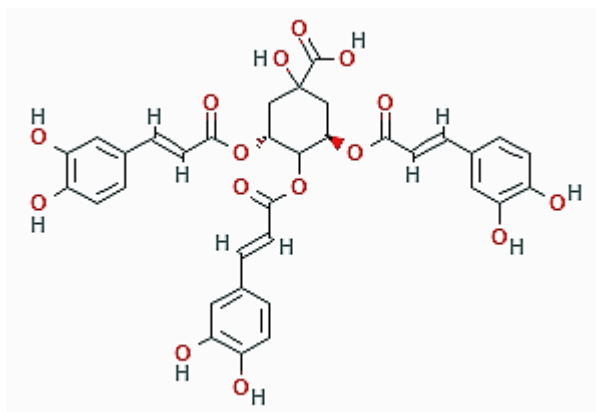


Figura 23: Estructura del ácido 3,4,5-tricafeoilquínico (imagen tomada de pubchem).

Los picos 14, 15 y 17 presentan un ión $[M-H]^-$ de m/z 515 y fragmentos característicos de ácido cafeico a m/z 179 y 135, lo que podría asociarlos a ácidos dicafeoilquínicos (ejemplo: Figura 24). Se trataría, por tanto, de distintos isómeros de este tipo de ácidos.

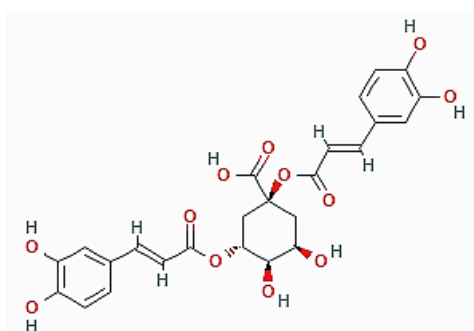


Figura 24: Ácido 1,3-*O*-dicafeoilquínico (imagen tomada de pubchem).

Los picos 8, 9, 11, 12 y 16 presentan espectros de absorción similares entre sí, con máximos en torno a 340-350 nm y a 265-270 nm (Figura 25). Estas características permiten asociarlos a la familia de las flavonas (Markham, 1982).

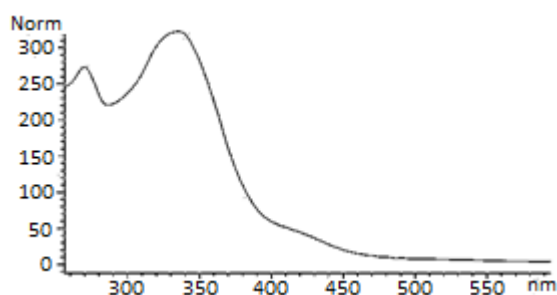


Figura 25: Espectro UV del pico 8.

El pico 12 presenta un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ con relación m/z de 447. Además se pueden observar fragmentos con m/z 285, 269, 153 y 135 en el espectro MS^2 . Estas fragmentaciones son coherentes con la flavona luteolina (Lv et al., 2013), lo que hace pensar que el pico corresponde a un derivado con una hexosa (285+162 um). El compuesto luteolina-7-O-glucósido (cinarósido; Figura 26) se encuentra descrito en el género *Bidens* (Deiana et al., 2003), por lo que el pico 12 se ha asociado al mismo de manera tentativa.

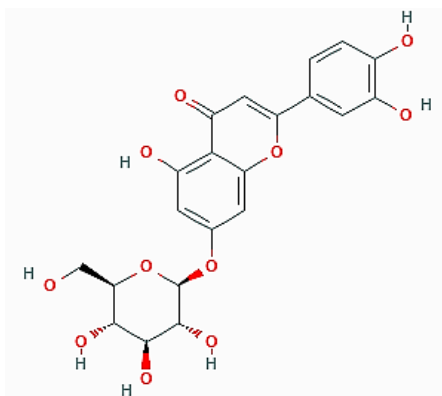


Figura 26: Estructura del cinarósido (luteolina-7-O-glucósido) (imagen tomada de pubchem).

El pico 8, a su vez, presenta un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ con relación m/z de 609 con un patrón de fragmentación similar al caso anterior, lo que hace pensar en un derivado con dos hexosas unidas a la luteolina, concretamente podría tratarse de luteolina-7-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopiranosido, también descrito en el género *Bidens* (Saltos et al., 2015). A diferencia del anterior, el pico 9, que presenta un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ con relación m/z de 593 y también con un fragmento de m/z 285, de acuerdo con su masa podría ser un derivado de luteolina unido a restos hexosa (162 um) y desoxihexosa (146 um); el hecho de que no se observen fragmentos correspondientes a la pérdida de cada uno de estos restos sugiere que ambos azúcares se encuentran unidos entre sí, por lo que se identifica tentativamente como luteolina-rhamno-glucósido, posiblemente luteolina-rutinósido (Figura 27).

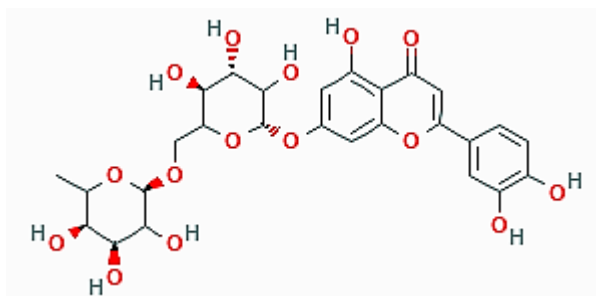


Figura 27: Estructura de luteolina 7-O-rutinósido (imagen tomada de pubchem).

El pico 16, aparece con un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ con relación m/z de 431 y también las fragmentaciones características de la luteolina, puede corresponder de acuerdo con la pérdida de un resto de 146 um a un luteolin-rhamnósido (Figura 28).

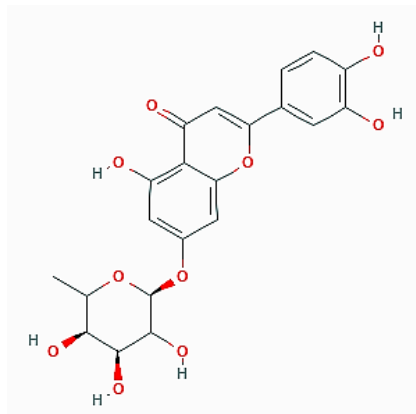


Figura 28: Estructura de la luteolina 7-O-rhamnósido (imagen tomada de pubchem).

El pico 11 presenta un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ con relación m/z de 463 y fragmentaciones m/z 301, 287, 271, 245, 151, 135. Estos resultados permiten asociarlo a un hexósido derivado de un aglucón flavonoide de m/z 301, como podría ser la flavona tricetina o el flavonol quercetina. Existen referencias (Uysal et al., 2018) de identificación de quercetina 3-O-galactósido (hiperósido) en el género *Bidens*, por lo que a falta de más información se asocia tentativamente esa identidad.

Los picos 2, 6 y 21, presentan similitudes en su espectro UV, teniendo un máximo de absorción en 279-287 nm y un hombro a 325-335 nm (Figura 29), sugiriendo que podría tratarse de compuestos de la misma familia. Estos podrían ser o bien dihidroflavonoles o bien dihidroflavonas (flavanonas) (Markham, 1982).

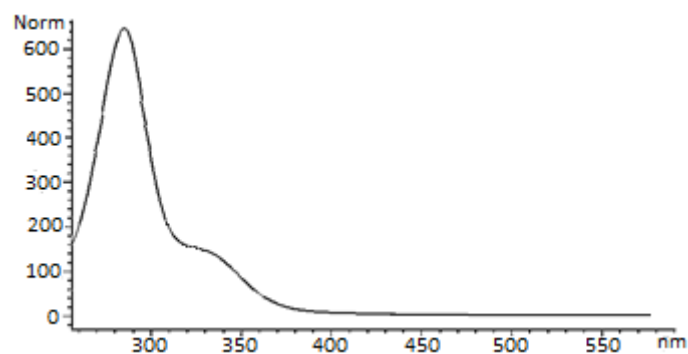


Figura 29: Espectro UV del pico 2.

El pico 2 muestra un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ con relación m/z de 465, así como fragmentos de m/z 303, 275, 179 y 153. Con estos datos podría identificarse como el dihidroflavonol dihidroquercetina (m/z 303) (Figura 30) unido a un resto hexósido (162 um), descrito en el género *Bidens* (Li et al., 2008).

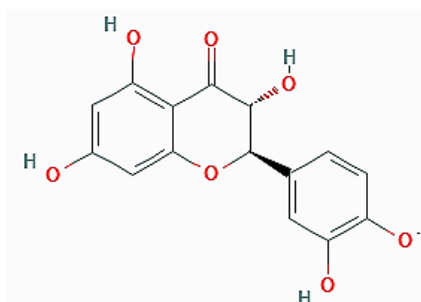


Figura 30: Estructura de taxifolina (dihidroquercetina) (imagen tomada de pubchem).

El pico 6 presenta un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ con relación m/z de 463, así como fragmentos con m/z 301, 287, 267 y 151. Con estos datos podría corresponder a un hexósido de las flavanonas hesperetina u homoeriodictiol (m/z 301), sin que se pueda concluir a cuál de ellos de manera definitiva.

El pico 21, con un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ con relación m/z de 287 um y fragmentos de m/z 151, 135 y 125 um podría tratarse de la flavanona isookanina (Figura 31), que se encuentra descrita en *Bidens* (Wolniak et al., 2007).

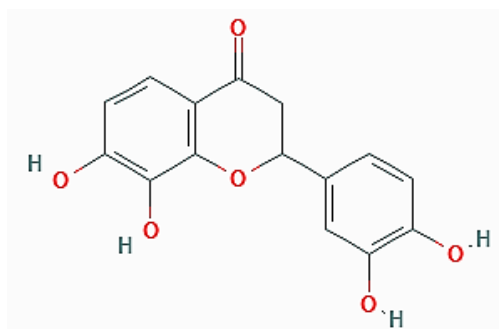


Figura 31: Estructura de isookanina (imagen tomada de pubchem).

El pico 10 es el único que aparece en esta muestra con un espectro UV como el que se muestra en la Figura 32, con máximos a 329 y 413 nm. Este tipo de espectro sugiere que puede pertenecer a la familia de las auronas (Markham, 1982). Como presenta un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ con relación m/z de 447 um y fragmentos de 285 y 269 nm, podría tratarse de un hexósido de la aurona maritimina (3',4',6,7-tetrahidroxiaurona; Figura 33), descrita en *Bidens* (Tomczykowa et al., 2017).

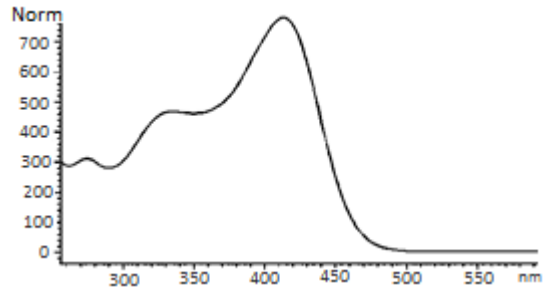


Figura 32: Espectro UV del pico 10.

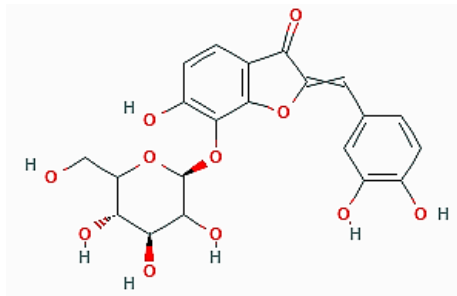


Figura 33: Estructura de maritimetina-7-*O*-glucósido (imagen tomada de pubchem).

Los picos 13, 18, 19, 20 y 23 tienen espectros UV con similitudes entre ellos, presentando máximos de absorción alrededor de 380-385 nm (Figura 34), que podrían corresponder a compuestos de la familia de las chalconas (Markham, 1982).

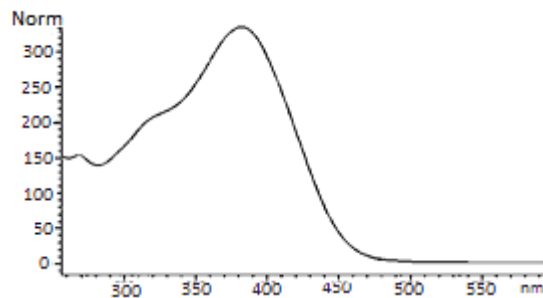


Figura 34: Espectro UV del pico 13.

El pico 13, que muestra en el espectro de masas un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ con relación m/z de 461 um y fragmentos con m/z 451, 285, 151 y 135, podría tratarse de un derivado glucoronido de la chalcona 4-*O*-metilbuteina (m/z 285) (Figura 35), que se encuentra descrita en el género *Bidens* (Lv et al., 2013). La masa del compuesto permite asociarlo a un derivado glucurónido (176 um).

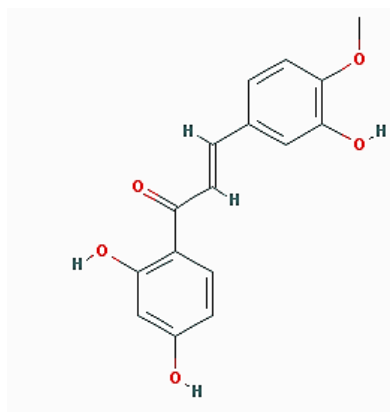


Figura 35: Estructura de 4-O-metilbuteína (imagen tomada de pubchem).

El pico 18 muestra un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ con relación m/z 463 um y fragmentos de m/z 445, 301, 287, 165 y 135 um. La existencia del fragmento de m/z 301 (-162 um) sugiere que podría tratarse de un derivado hexósido de la chalcona 4-O-metilokanina (Figura 36), descrita en *Bidens* (Thien et al., 2017). La observación del fragmento de m/z 287 (301-14 um) confirmaría la existencia de un sustituyente metilo en el aglucón, apoyando la estructura indicada.

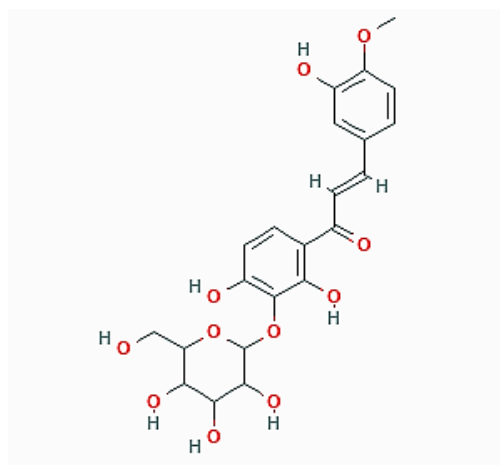


Figura 36: Estructura de okanina-4-metiléter-3'-O-glucósido (imagen tomada de pubchem).

Los picos 19 y 20 presentan el mismo fragmento mayoritario de m/z 287 um, patrones similares de fragmentación con fragmentos de m/z 269, 169, 151, 135 y 123, indicando que ambos son derivados del mismo aglucón, que podría ser la chalcona okanina. En el caso del pico 19, de acuerdo a su ión pseudomolecular $[M-H]^-$ con relación m/z 491, podría tratarse del compuesto okanina 4'-O-(6''-O-acetil-b-D-glucopiranosido) (Figura 37), que se encuentra descrito en *Bidens* (Lv et al., 2013). Sin embargo, el ión pseudomolecular $[M-H]^-$ del pico 20 (m/z 349) no permite asociarlo a ningún compuesto conocido ni especular sobre su posible identidad.

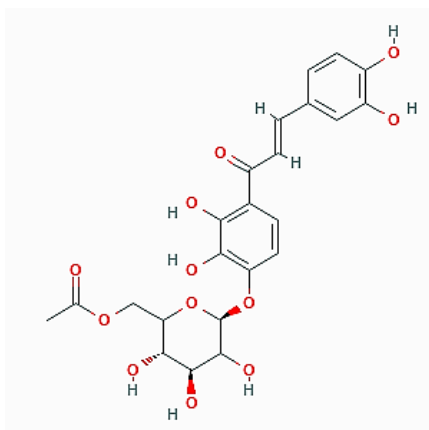


Figura 37: Estructura de okanina 4'-O-(6''-O-acetil-β-D-glucopiranosido. (imagen tomada de pubchem).

El pico 22 posee un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ de m/z 533 ($491+42$ um), que podría corresponder a un derivado acetilado del pico 19, es decir a okanina-diacetilglucósido; la existencia de varios fragmentos comunes en ambos casos (m/z 473, 287, 269, 151, 135) parece apoyar esta identidad, que se ofrece de manera tentativa, aunque su espectro de absorción (Figura 38), con un máximo a 354 nm inferior al del pico 9 y de otras chalconas detectadas en esta muestra, y un hombro en torno a 295 nm, parece más propio de una flavona o un flavonol.

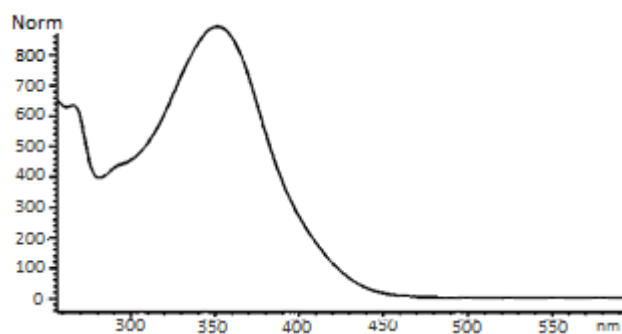


Figura 38: Espectro UV del pico 22.

Por último, el pico 23 también posee un espectro de absorción característico de una chalcona, pero sus características de masas (ión pseudomolecular $[M-H]^-$ de m/z 519 y fragmentos con m/z 459, 417, 375, 331, 161, 143, 125, 113) no han permitido asignarle una identidad concreta.

En la Tabla 7 se resumen los datos obtenidos del análisis de HPLC-DAD-MS de la muestra BAF y las identificaciones realizadas en base a los mismos.

Tabla 7: Resultados obtenidos para los picos de la muestra BAF

Nº	TR (min)	λ_{\max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)	Identidad propuesta
1	4,8	297sh, 325	707	353, 191, 179, 161, 135	Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquinico
2	5,4	285, 333sh	465	447, 303, 287, 275, 179, 153, 135	Dihidroquercetina hexósido
3	6,1	298sh, 324	707	353, 191, 179, 161, 135	Ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquinico
4	6,3	297sh, 324	707	353, 191, 179, 161, 135	Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquinico
5	6,8	292sh, 324	367	191, 175, 135	Ácido feruoilquinico
6	11,6	279, 325sh	463	445, 301, 285, 269, 165, 151, 135	Hexósido de homoeriodictiol/hesperetina
7	12,7	293sh, 321	677	515, 353, 191, 179, 135	Ácido tricafeoilquinico
8	15	266, 288, 350	609	595, 299, 285, 269, 151, 135	Luteolina-glucosil-galactósido
9	15,2	267, 343	593	463, 285	Luteolina rutinósido
10	15,7	329, 413	447	287, 269	Maritimetina-hexósido
11	16,2	294, 344	463	449, 301, 287, 271, 245, 151, 135	Quercetina-3- <i>O</i> -galactósido
12	16,4	266, 343	447	327, 285, 151, 135	Luteolina-7- <i>O</i> -glucósido
13	16,6	370	461	451, 285, 151, 135	4- <i>O</i> -metilbuteina glucurónido
14	17,8	295sh, 325	515	353, 335, 191, 179, 173, 161, 135	Ácido dicafeoilquinico
15	18,8	298sh, 328	515	353, 191, 179, 161, 135, 127	Ácido dicafeoilquinico
16	19,6	267, 336	431	285, 269	Luteolina rhamnósido
17	20,1	299sh, 327	515	353, 317, 255, 191, 179, 173, 135	Ácido dicafeoilquinico
18	20,9	322sh, 382	463	445, 301, 287, 268, 241, 165, 135	Hexósido de 4- <i>O</i> -metilokanina
19	22,3	320sh, 382	491	473, 449, 431, 413, 329, 311, 287, 269, 169, 151, 135,	Okanina-acetilglucósido
20	22,8	315sh,380	349	287, 269, 169, 151, 135, 123	Chalcona
21	27,2	287, 335	287	151, 135, 125	Isookanina
22	27,6	269, 352	533	515, 491, 473, 455, 397, 337, 287, 269, 151, 135	Okanina-diacetilglucósido
23	35,7	316sh, 380	519	459, 417, 375, 331, 161, 143, 125, 113	Chalcona

→ Muestra BAH:

En la Figura 39 se representa el cromatograma correspondiente a la muestra BAH registrado a las longitudes de onda de 360 y 280 nm.

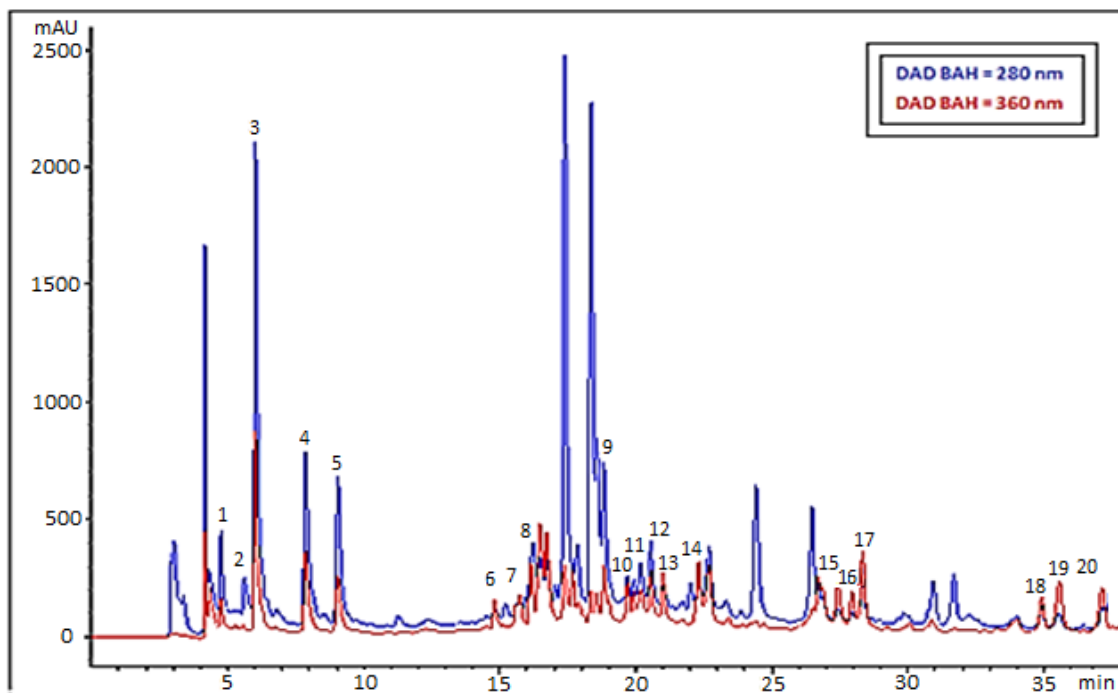


Figura 39: Cromatograma de los extractos fenólicos de las hojas de *Bidens aurea* (Aiton) Sherff (BAH).

Para esta muestra, se han detectado un total de 20 picos de interés, siendo los mayoritarios los picos **3, 4, 5 y 9**. Como se puede ver es bastante similar a las muestra BAF, por lo que la mayoría de los compuestos coinciden.

Los picos 1, 3, 4, 5, 9 y 12 presentan un máximo de absorción en torno a 325 con un hombro a 300 nm, lo que les ubica en la familia de los derivados hidroxicinámicos. Los picos 1, 3 y 9 son equivalentes a los picos 1, 3 y 4 de la muestra BAF. El pico 12 a su vez, es equivalente a los picos 14 y 15 de la muestra BAF. En cambio, los picos 4 y 5 son ligeramente diferentes, muestran en el espectro de masas un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ con relación m/z de 621 (doble de 311) um y fragmentos con m/z 311, 179, 161, 149 y 135. Asumiendo que el ión de m/z 311 corresponde al compuesto, estos picos podrían asociarse a isómeros del ácido cafeoil-tartárico, donde los fragmentos de m/z 179 y 149 corresponderían respectivamente a los ácidos cafeico y tartárico. Este tipo de derivados fueron identificados en *Bidens pilosa* por Khoza et al. (2016).

El pico 2 presenta en el espectro UV un máximo a 279 nm con un hombro a 315 nm, lo que permite asociarlo a una flavanona o un dihidroflavonol. Muestra un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ con relación m/z 653 y fragmentos con m/z 477, 315, 203, 185, 159, 143, 115. La pérdida consecutiva de 176 um y 162 um para dar los fragmentos de m/z 477 y 315 lleva a suponer que el compuesto posee restos de ácido glucurónico y hexosa. El aglicón de m/z 315 podría corresponder a una dimetoxi-dihydroxiflavanona

El pico 6 muestra máximos de absorción a 265 y 356 nm, apuntando a que se trata de un flavonol. Su ión pseudomolecular $[M-H]^-$ con relación m/z 609 y fragmentos con m/z 301, 191, 179 y 135 permiten asociarlo quercetina 3-*O*-rutinósido (rutina; Figura 40), cuya presencia ha sido descrita en diversas especies del género *Bidens* (Chiang et al., 2004; Cortes-Rojas et al., 2010; Uysal et al., 2018).

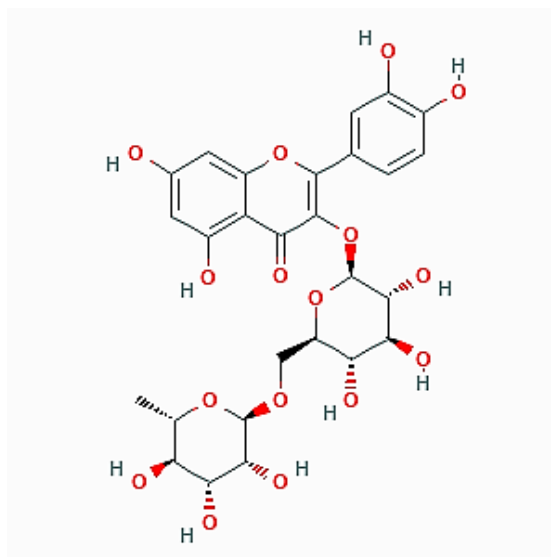


Figura 40: Estructura de rutina (quercetina-3-*O*-rutinósido) (imagen tomada de pubchem).

Los picos 7 y 8 tienen un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ con relación m/z de 463 y fragmentos con m/z de 449, 301, 287, 179, 151, 135, características que son similares a las del pico 11 en la muestra BAF. En ese caso se había discutido la posibilidad de que se tratase de un hexóido de la flavona tricetina o del flavonol quercetina, ambos con m/z 301. Como se indicó anteriormente, la presencia de quercetina-3-*O*-galactósido (hiperósido) está descrita en el género *Bidens*, aunque los máximos de absorción de los compuestos, a 340 nm, parecen apuntar más a una identidad como flavonas.

Los picos 10 y 11 presentan también máximos de absorción característicos de flavonas (335 nm) y la presencia de los fragmentos de m/z 447 y 285 sugiere que podrían ser derivados de luteolina-hexósido, aunque su ión pseudomolecular $[M-H]^-$, con una relación m/z 551, no pudo ser asignado a ningún compuesto específico.

Los picos 13, 14, 17, 18 y 20 presentan un espectro UV parecido al pico 10 de la muestra BAF, con máximos de absorción en torno a 330 y 410-415 nm, que como se ha comentado podrían corresponder a auronas. Los picos 13 y 14 tienen un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ con relación m/z 489 y fragmentos con m/z 447 (-42 um) y 285 (-42-162 um), lo que apunta a que podría tratarse de derivados acetilados de maritimetina-hexósido. Los picos 18 y 20 presentan un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ con relación m/z 573 y también el fragmento con m/z 285, que podría también corresponder a maritimetina, aunque sus datos de masas no han permitido asignarles una identidad concreta. Para el pico 17 no se han podido obtener datos de masas para su identificación.

Los picos 15 y 16 muestran el mismo ión pseudomolecular $[M-H]^-$ (m/z 533) y patrón de fragmentación. Estas características de masas son similares a las del pico 22 de la muestra BAF, que, como se había discutido podría corresponder a la chalcona okanina-diacetil-glucósido. En todo caso, los espectros de absorción de estos dos picos, con máximos a 313-412 nm (pico 15) y 376 nm (pico 16), son distintos entre sí, lo que plantea dudas sobre su pertenencia a la misma familia

Para el pico 19 no se han podido obtener datos de masas aunque su espectro de absorción indica que se puede tratarse de una chalcona.

En la Tabla 8 se resumen los datos obtenidos del análisis de HPLC-DAD-MS de la muestra BAH y las identificaciones realizadas en base a los mismos.

Tabla 8: Resultados obtenidos para los picos de la muestra BAH

Nº	TR (min)	λ_{max} (nm)	[M - H] (m/z)	MS ² (m/z)	Identidad propuesta
1	4,8	298sh, 324	706	353, 191, 179, 161, 135	Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico
2	5,6	279, 315sh	653	477, 315, 203, 185, 159, 143, 115	Dimetoxi-dihidroxi-flavanona glucuronil-hexósido
3	6,3	301sh, 326	353	191, 173, 161, 135	Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico
4	7,9	302sh, 326	621	311, 179, 161, 149, 135	Ácido cafeoil tartárico
5	9	302sh, 326	621	311, 179, 161, 149, 135	Ácido cafeoil tartárico
6	14,8	265, 346	609	301, 191, 179, 135	Quercetina 3- <i>O</i> -rutinosido
7	16,1	269, 340	463	449, 301, 285, 271, 179, 151, 135	Tricetina/quercetina hexósido
8	16,5	269, 340	463	449, 301, 285, 271, 179, 151, 135	Tricetina/quercetina hexósido
9	18,8	305sh, 326	353	191, 179, 135	Ácido cafeoilquínico
10	19,7	273, 335	551	489, 447, 429, 285, 151	Derivado de luteolina-hexósido
11	19,9	273, 335	551	489, 447, 429, 285, 151	Derivado de luteolina-hexósido
12	20,2	300sh, 325	515	489, 353, 285, 191, 179, 173, 155, 135	Ácido dicafeoilquínico
13	21	337, 412	489	447, 431, 285	Maritimetina acetilhexósido.
14	22,3	331, 412	489	473, 447, 431, 285, 269, 151	Maritimetina acetilhexósido.
15	27,4	331, 412	533	515, 473, 337, 287, 271, 151, 135	Okanina-diacetil-glucósido
16	27,9	376	533	515, 473, 337, 287, 271, 151, 135	Okanina-diacetil-glucósido
17	28,3	330, 415	-	-	Aurona
18	34,9	330, 414	573	531, 513, 471, 453, 429, 411, 351, 285	Derivado de maritimetina
19	35,6	325, 383	-	-	Chalcona
20	37,1	328, 409	573	557, 531, 513, 471, 285, 269, 151, 135	Derivado de maritimetina

→ Muestra BAT:

En la Figura 41 se representa el cromatograma correspondiente a la muestra BAT registrado a las longitudes de onda de 360 y 280 nm.

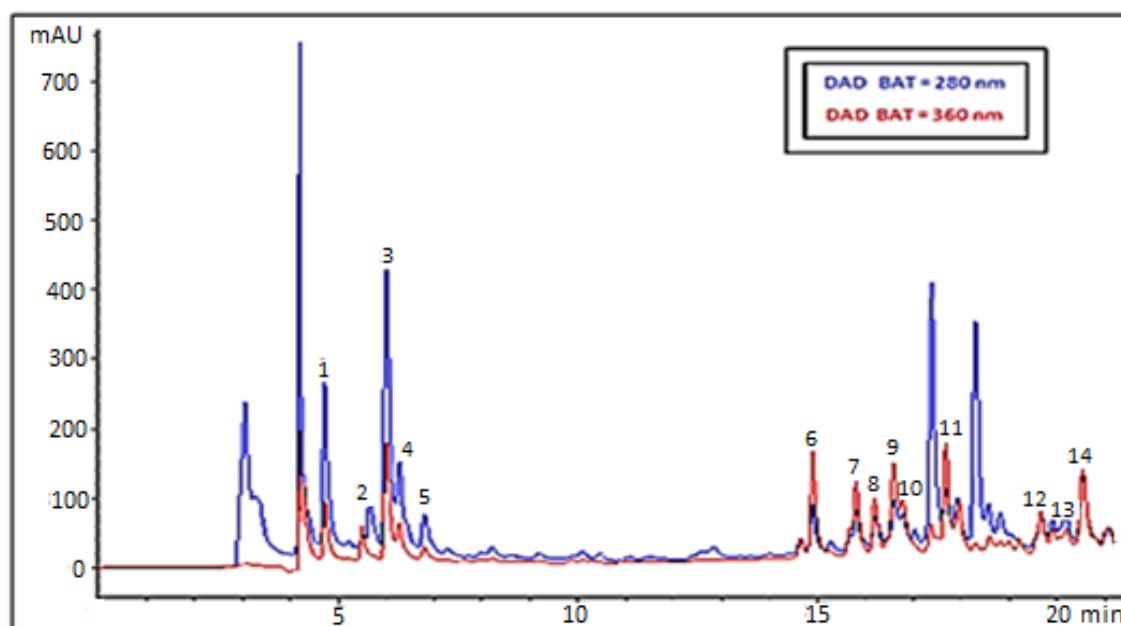


Figura 41: Cromatograma de los extractos fenólicos del tallo de *Bidens aurea* (Aiton) Sherff (BAT).

Como se observa, se han detectado un total de 14 picos de interés, siendo los mayoritarios los picos **1, 3, 6, 9, 11, 14**. También para esta muestra hay similitud de picos con BAF y BAH. Así, los picos 1, 3, 4, 5, y 14 muestran espectros UV semejantes a los picos 1, 3, 4, 5, 9 y 12 de la muestra BAH y a los 1, 3, 4, 5, 14, 15 y 17 de la muestra BAF.

El pico 2, corresponde al mismo compuesto que el pico 2 de la muestra BAH, ya que tiene el mismo espectro UV y los mismos datos de masas.

Los picos, 6 y 11 tienen espectros UV con máximos en torno a 260 y 350 nm y el mismo ión pseudomolecular $[M-H]^-$ con relación m/z 609 que libera un fragmento con m/z 301. El primero de ellos coincide en sus características con el pico 6 de la muestra BAH, identificándose como rutina (quercetina 3-*O*-rutinósido). El pico 11 podría corresponder a otro derivado de quercetina donde el resto de rutinosa se localiza sobre otra posición del aglucón, pero también a un neohesperidósido de quercetina (Figura 42) o a quercetina con otro tipo de sustituyente glicosilado que contenga una hexosa y una desoxihexosa.

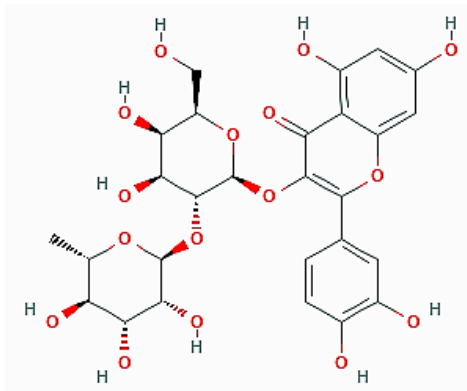


Figura 42: Estructura de quercetina 3-*O*-neohesperidósido (imagen tomada de pubchem).

El pico 7 también posee un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ de m/z 609, aunque su espectro de absorción es distinto a los anteriores, con máximos a 335 y 412 nm, lo que sugiere que podrían corresponder a una aurona. La existencia de un fragmento de m/z 463 parece relacionarlo con el pico 18 de la muestra BAF, correspondiente a un hexósido de 4-*O*-metilkanina. La diferencia de masa entre los dos compuestos (146 um) sugiere la existencia de un resto desoxihexosa adicional, por lo que el pico se identifica tentativamente como 4-*O*-metilkanina desoxihexosil-hexósido.

El pico 10 tiene un espectro de absorción similar al pico 7, con máximos en 340 y 410 nm, lo que sugiere que también corresponde a una aurona. Este pico presenta características similares al pico 13 de la muestra BAF en cuanto a ión pseudomolecular ($[M-H]^-$ de m/z 461), fragmento de m/z 285 y tiempo de retención, por lo que se identifica tentativamente como la misma sustancia (4-*O*-metilbuteína glucurónido).

Por último, los picos 9, 8, 12 y 13, tienen el espectro típico de la familia de las flavonas con máximos de absorción en torno a 265 y 335-345 nm. Se pueden relacionar con los picos 7, 8, 10 y 11 de la muestra BAH y los picos 8, 9, 11, 12 y 16 de la BAF, por lo que se han aplicado criterios similares para su identificación.

En la Tabla 9 se resumen los datos obtenidos del análisis de HPLC-DAD-MS de la muestra BAT y las identificaciones realizadas en base a los mismos.

Tabla 9: Resultados obtenidos para los picos de la muestra BAT

Nº	TR (min)	λ_{max} (nm)	$[M-H]^-$ (m/z)	MS ² (m/z)	Identidad propuesta
1	4,7	297sh, 324	353	191, 179, 161, 135	Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico
2	5,7	280, 321sh	653	477, 315, 203, 185, 159, 143, 115	Dimetoxi-dihydroxiflavanona glucuronil-hexósido
3	6	298sh, 324	353	191, 179, 161, 135	Ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquínico
4	6,3	298sh, 326	353	191, 179, 161, 135	Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico
5	6,8	297sh, 326	367	193, 173, 149, 135, 117	Ácido feruolquínico
6	14,9	261, 353	609	593, 343, 301, 285, 271	Rutina
7	15,8	335, 412	609	463, 341, 299, 285, 271	4- <i>O</i> -metilokanina desoxihexosil-hexósido
8	16,2	269, 345	461	301, 285, 271, 255, 179, 151	Tricetina/quercetina hexósido
9	16,6	269, 345	461	357, 327, 301, 285	Tricetina/quercetina hexósido
10	16,8	344, 411	461	299, 285, 269	4- <i>O</i> -metilbuteína glucurónido
11	17,7	257, 348	609	545, 505, 463, 301	Quercetina-desoxihexosil-hexósido
12	19,7	265, 334	447	357, 315, 299, 285, 271, 243	Luteolina-hexósido
13	19,9	269, 335	579	515, 447, 429, 353, 285, 203, 191, 179, 173, 161, 135	Luteolina-pentosil-hexósido
14	20,2	298, 329	515	489, 429, 353, 299, 285, 203, 191, 179, 173, 161, 135	Ácido dicafeoilquínico

1.2.2. Resultados obtenidos para la muestra de *Daphne gnidium* L.

En las Figura 43, Figura 60 y Figura 64 se recogen los cromatogramas de HPLC registrados a 280 nm con los perfiles de compuestos fenólicos de las tres diferentes muestras de *Daphne gnidium* L. (DGF, DGH, DGT) analizadas por HPLC-DAD-MS.

Al igual que para el caso anterior, se han numerado aquellos picos en los cromatogramas para los que se pudo obtener datos para su identificación definitiva o provisional.

Para esta planta la mayoría de los compuestos relevantes detectados pertenecen a las familias de las cumarinas.

→ Muestra DGF

En la Figura 43 se representa el cromatograma correspondiente a la muestra DGF registrado a 280 nm.

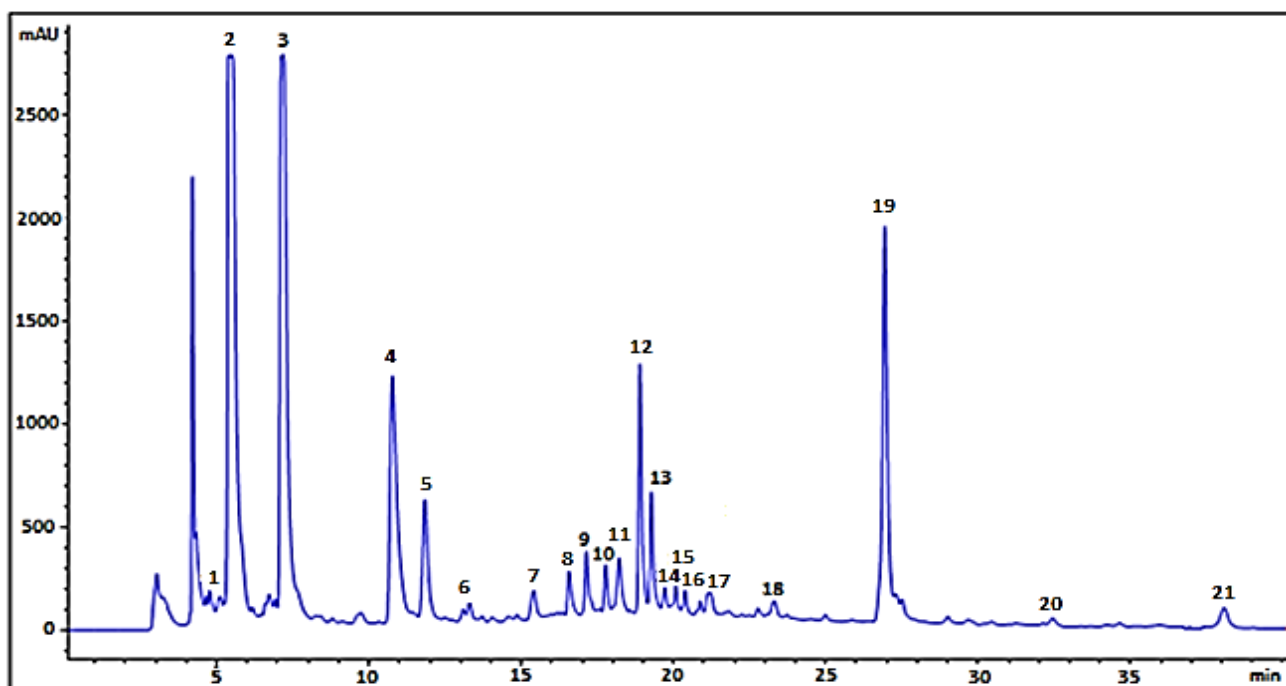


Figura 43: Cromatograma de un extracto fenólico de las flores de *Daphne gnidium* L. (DGF).

Como se observa, se han detectado un total de 21 picos de interés, siendo los mayoritarios los picos **2, 3, 4, 5, 12, 13 y 19**. Más adelante, en la Tabla 10 se recogen

las características, tanto de absorción como de masas, de los picos numerados en el cromatograma, así como la identificación propuesta para los mismos de acuerdo con la discusión que se realiza a continuación.

Los picos 1, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 21 se asocian a cumarinas en función de sus características espectrales y de masas.

El pico 4 ($[M-H]^-$ de m/z 177), cuyo espectro UV se recoge en la Figura 44, se identifica como daphnetina (Figura 45), cuya presencia en *Daphne gnidium* L. se encuentra bien documentada (Cottiglia et al., 2001; Deiana et al., 2003; Nowik, 2005).

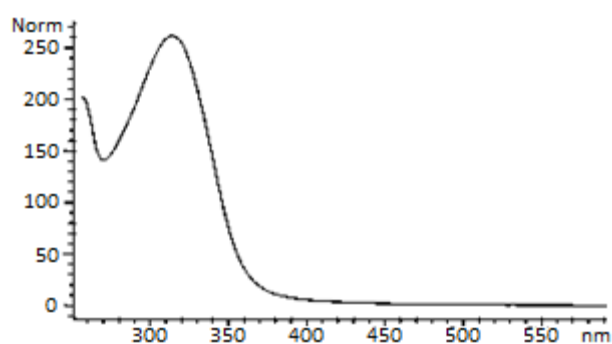


Figura 44: Espectro UV del pico 4.

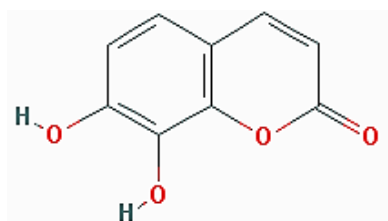


Figura 45: Estructura de daphnetina (imagen tomada de pubchem).

El pico 1, con un ion pseudomolecular $[M-H]^-$ de m/z 339, es coherente con un daphnetin-glucósido, también citado en *D. gnidium* por los mismos autores.

Existen dos posibles glucósidos de daphnetina, daphnetina-7-*O*-glucósido (daphnina) y daphnetina-8-*O*-glucósido. De acuerdo con las características de espectro UV recogidas por Nowik (2005) para ambos compuestos, el pico detectado en nuestro caso podría corresponder a daphnetina-8-*O*-glucósido (Figura 46), para el que se indica un máximo UV de 322 nm, del mismo orden al observado por nosotros (324 nm), mientras que para daphnetina-7-*O*-glucósido Nowik recoge un máximo de 310 nm.

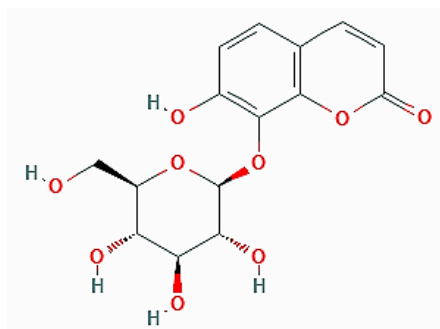


Figura 46: Estructura de daphnetina-8-*O*-glucósido (imagen tomada de pubchem).

Los picos 5, 9, 10 y 14 muestran similar espectro UV, con máximo de absorción a 320-324 nm (Figura 47), y poseen el mismo ion pseudomolecular $[M-H]^-$ de m/z 483. Liberan también un fragmento de m/z 321. Esta masa puede asociarse a dihidroxi-biscumarinas. Un compuesto de este tipo, denominado daphnogitina (Figura 48), fue identificado en hojas y tallos de *Daphne giraldii* por Liao et al. (2005). Esto sugiere que podría tratarse de distintos hexósidos de esa cumarina, aunque se plantea la duda de si se trata de diferentes hexosas o están unidas por diferentes posiciones a la molécula de la daphnogitina.

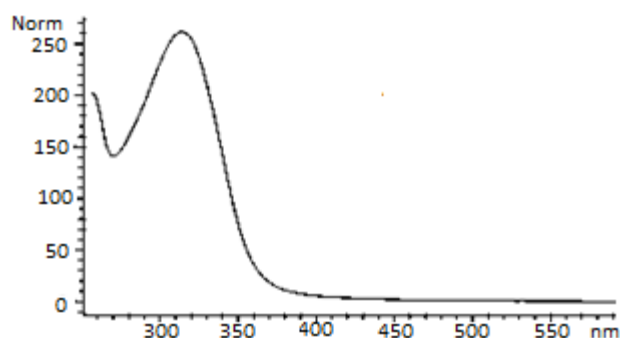


Figura 47: Espectro UV del pico 5.

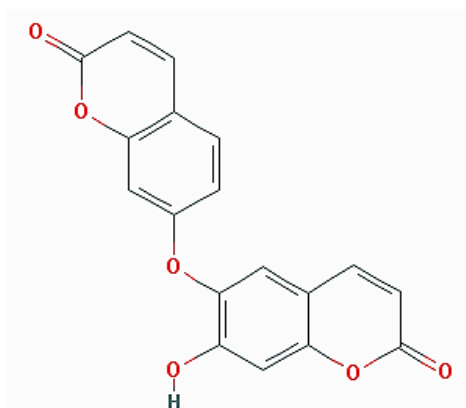


Figura 48: Estructura de la daphnogitina glucósido (imagen tomada de pubchem).

Por otra parte, el patrón de fragmentación MS² del pico 14 difiere de los otros tres, por lo que es posible que pueda corresponder a otra estructura de tipo dihidroxi-biscumarinas, en las que la unión entre las dos unidades se realiza a través de posiciones diferentes (Figura 49) a las de daphnogitina, pudiendo ser así el pico 14 un hexósido derivado de éstas.

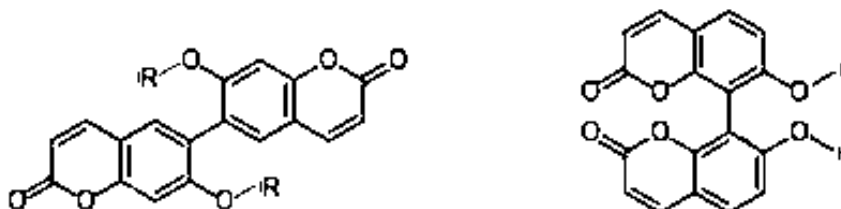


Figura 49: Posibles estructuras para dihidroxi-biscumarinas (imagen propia).

Los picos 11 y 18 poseen el mismo ion pseudomolecular ([M-H]⁻ de *m/z* 321), aunque distinto patrón de fragmentación. Al igual que en el grupo de picos anterior, el patrón de fragmentación del pico 18 sugiere la existencia de dos cumarinas unidas mediante un enlace C-C, ya que no se libera ningún fragmento que pueda asociarse a una unidad cumarina, mientras que en el caso del pico 11 se observa un fragmento de *m/z* 177, correspondiente a una dihidroxicumarina. Esto apunta a que el pico 11 puede tratarse de daphnogitina, mientras el pico 18 sería una dihidroxi-biscumarina unida por un enlace C-C, del tipo a las mostradas en la Figura 49.

Los picos 12 y 13 tienen el mismo ion pseudomolecular ([M-H]⁻ de *m/z* 515) e idéntico patrón de fragmentación. Liberan un fragmento de *m/z* 353, que puede asociarse a una biscumarina, concretamente podría tratarse de una tetrahidroxi-biscumarina con enlaces C-C o bien C-O-C. Los picos 12 y 13 podrían corresponder, así, a hexósidos de tetrahidroxi-biscumarina. En la Figura 50 se recogen dos posibles estructuras que encajarían con la masa de los compuestos.

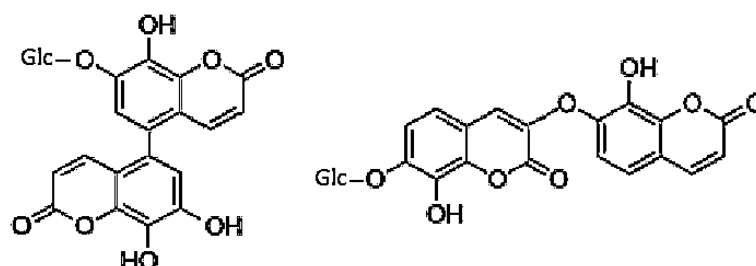


Figura 50: Posibles estructuras para tetrahidroxi-biscumarinas (imagen propia).

El pico 15 ($[M-H]^-$ de m/z 853) presenta en su espectro MS^2 un fragmento de m/z 351, que podría corresponder a la cumarina daphnoretina, aunque no se ha podido asignar a la masa del compuesto ninguna estructura concreta derivada de esa cumarina. La presencia del fragmento de m/z 515 parece emparentarlo con los compuestos 12 y 13. Este fragmento deriva de la pérdida desde el ion pseudomolecular de un resto de 162 um (que da lugar al fragmento de m/z 691) y de otro de 176 um, apuntando hacia la existencia en su estructura de posible restos hexosa y ácido hexurónico. El pico podría, así, corresponder a un glucuronil-dihexósido de tetradihidro-biscumarina.

El pico 21 ($[M-H]^-$ de m/z 351) posee una masa coherente con la de daphnoretina (Figura 51), una cumarina repetidamente reportada en *D. gnidium* (Cottiglia et al., 2001; Deiana et al., 2003; Nowik, 2005) y en otras especies del género *Daphne* (Badawi et al., 1983; Liao et al., 2005; Pan et al., 2010).

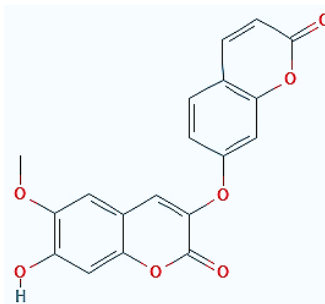


Figura 51: Estructura de daphnoretina (imagen tomada de pubchem).

El pico 17 ($[M-H]^-$ de m/z 499), posee una masa coherente con la del compuesto desmetildaphnoretina-7-*O*-glucósido (edgeworthin glucósido; Figura 52) identificado en especies de *Daphne* (Lin et al., 1983; Liao et al., 2005). La observación del fragmento MS^2 de m/z 337 (-162 um), correspondiente a la pérdida del resto glucosa, avalaría esta identidad.

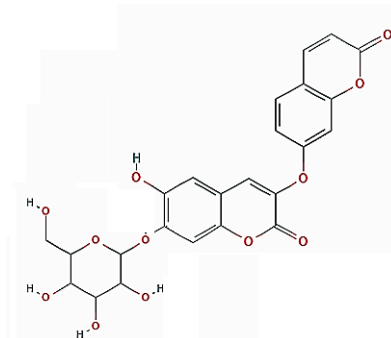


Figura 52: Estructura de desmetildaphnoretina-7-*O*-glucósido (edgeworthin glucósido) (imagen tomada de pubchem).

El pico 19 posee un ion pseudomolecular $[M-H]^-$ de m/z 657 que podría asociarse a la cumarina rutarensin (Figura 53).

Este compuesto ha sido identificado en el género *Daphne* (Kreher et al., 1990; Süntar et al., 2014).

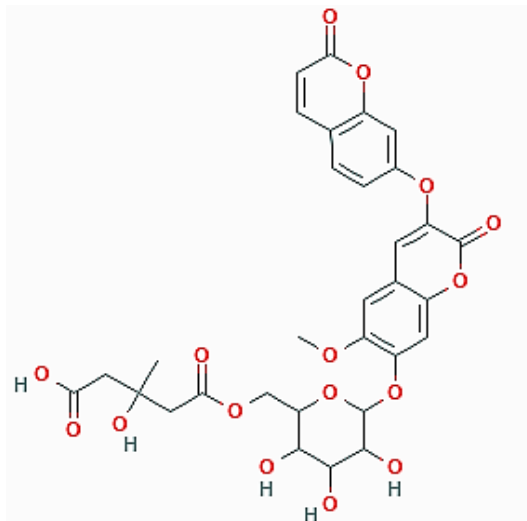


Figura 53: Estructura de Rutarensin (imagen tomada de pubchem).

Con respecto al pico 7, la presencia de un fragmento de m/z 161, sería coherente con umbeliferona (Figura 54), una cumarina citada en especies de *Daphne* (Pan et al., 2010; Juskovic et al., 2012). Particularmente, en *Daphne gnidium* L. se ha descrito la presencia de acetilumbeliferona (Cottiglia et al., 2001; Deiana et al., 2003; Nowik, 2005).

Sin embargo, el ion pseudomolecular del pico no se ha podido asociar a una estructura concreta, por lo que el pico se marca simplemente como un posible derivado de umbeliferona.

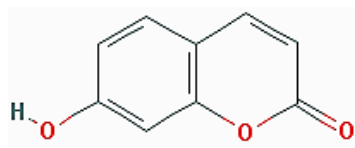


Figura 54: Estructura de umbeliferona (imagen tomada de pubchem).

Por último, el pico 16 ($[M-H]^-$ de m/z 785) tiene patrón de fragmentación MS^2 que indica la liberación sucesiva de dos restos hexosa (162 um; fragmentos de m/z 623 y 461) y de un posible resto hexurónico (176 um) para dar un fragmento MS^2 de m/z 285, que podría asociarse a luteolina. Estas observaciones sugerirían que el pico podría ser un derivado luteolina-glucuronil-diglucósido. No obstante, su espectro UV (máximo a 322 nm) no parece característico de esa flavona y, además, su elución

retrasada (menor polaridad) con respecto al pico 9 (luteolina-glucósido) tampoco sería coherente con esa estructura. Por otra parte, en su fragmentación se producen señales de m/z 339 y 177, coherentes con daphnetina-glucósido, por lo que el pico podría contener una unidad de este tipo, sin que pueda descartarse que el compuesto contenga también una unidad de luteolina, lo que justificaría el fragmento de m/z 285. En base a estos comentarios, el compuesto se asocia de manera tentativa a un híbrido flavona-cumarina, formado por luteolina y daphnetina unidos a dos restos hexósido. La existencia en el espectro MS^2 de un fragmento de m/z 461, coincidente con el ion pseudomolecular del pico 9 en la muestra DGH (ver comentarios posteriormente) puede constituir un elemento adicional en apoyo de esta identidad. La elución del pico 16 a un tiempo de retención inferior al del pico 9 de DGH indica su mayor polaridad, como correspondería a un derivado con restos de azúcar en su estructura de los que carecería el pico 9 de la muestra DGH. La presencia de híbridos flavona-cumarina está documentada en *Timeláceas* (Franke et al., 2002).

Los picos 2, 6 y 20 se han asociado a lignanos. En la Figura 55 se muestra el espectro UV del pico 2.

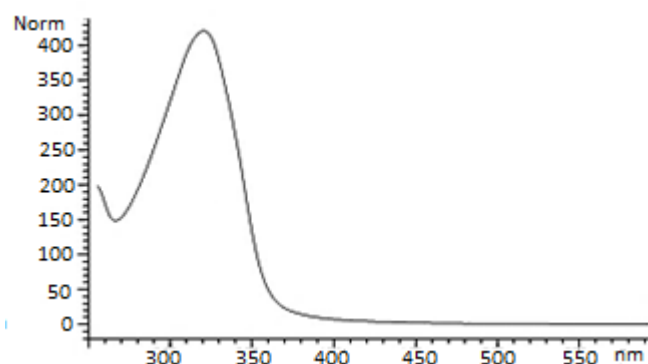


Figura 55: Espectro UV del pico 2.

De acuerdo con su masa, este pico ($[M-H]^-$ de m/z 357) podría corresponder a pinoresinol (Figura 56), previamente descrito en otras especies de *Daphne* (Li et al., 2010; Malafrente et al., 2012).

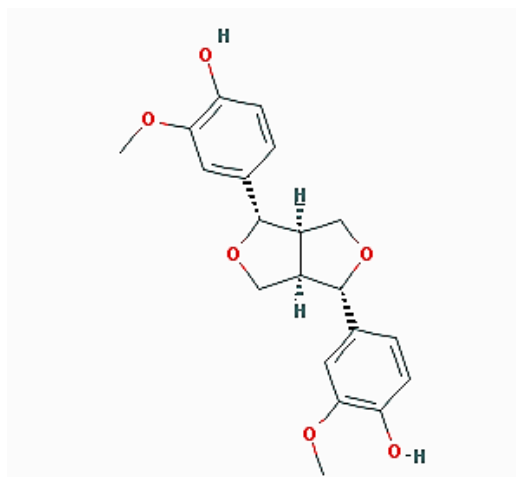


Figura 56: Estructura de pinoresinol (imagen tomada de pubchem).

El pico 6, con un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ de m/z 523, podría corresponder a secoisolariciresinol hexósido (Figura 57). La presencia del fragmento de m/z 361 (-162 um), coherente con secoisolariciresinol, avalaría esta identificación. En nuestro conocimiento, un derivado hexósido de este lignano no se encuentra descrito en especies de *Daphne*, aunque si lo está, por ejemplo, en especies de *Cistus* (Tomas-Menor et al., 2013) y en extractos de semillas de lino (Popova et al., 2009), presentando características similares a las del compuesto aquí detectado.

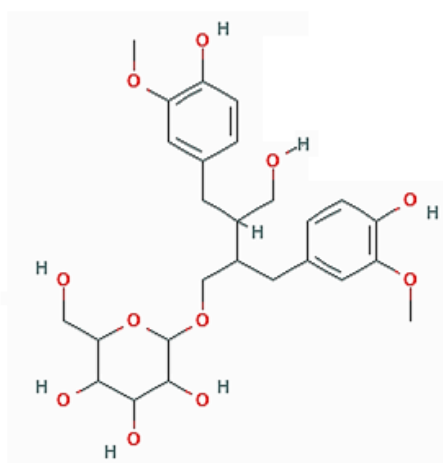


Figura 57: Estructura de secoisolariciresinol monoglucósido.

El pico 20 cuyo pseudoión molecular $[M-H]^-$ tiene una relación m/z de 355, podría tratarse del lignano dihidrosesamina (Figura 58), cuya presencia se encuentra descrita en algunas especies de *Daphne* (Zhuang et al., 1986; Liao et al., 2006).

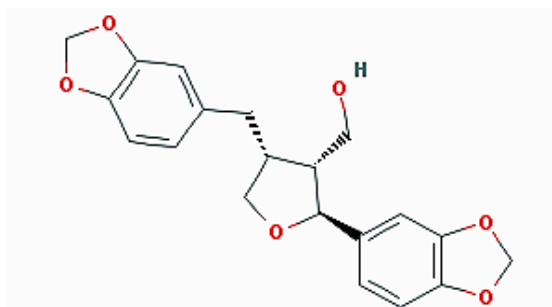


Figura 58: Estructura de dihidrosesamina (imagen tomada de pubchem).

El pico 8 tiene unas características diferentes a los anteriores pero es semejante a los picos 8, 9, 12 y 16 de la muestra BAF de *Bidens aurea* (Aiton) Sherff, anteriormente comentada. Su espectro de absorción, con máximos en torno a 270 y 330-340 nm, es característico de flavonas, y su pseudoión molecular ($[M-H]^-$ de m/z 447) y la liberación de un único fragmento de m/z 285, apunta a que puede tratarse de un hexósido de luteolina. La presencia de luteolina-7-*O*-glucósido ha sido descrita en *Daphne gnidium* L. por distintos autores (Cottiglia et al., 2001; Deiana et al., 2003; Nowik, 2005), por lo que se asigna al pico esa identidad.

Finalmente, el pico 3 ($[M-H]^-$ de m/z 593) presenta un patrón de fragmentación característico de *C*-glicosilflavonas, con fragmentos derivados de pérdidas de 30, 60 y 90 um (Cuyckens & Claeys, 2004), siendo su masa coherente con la del compuesto apigenina-6,8-*C*-diglucósido (vicenin-2; Figura 59), que se encuentra citado en especies de *Daphne* (Ulubelen et al., 1986)

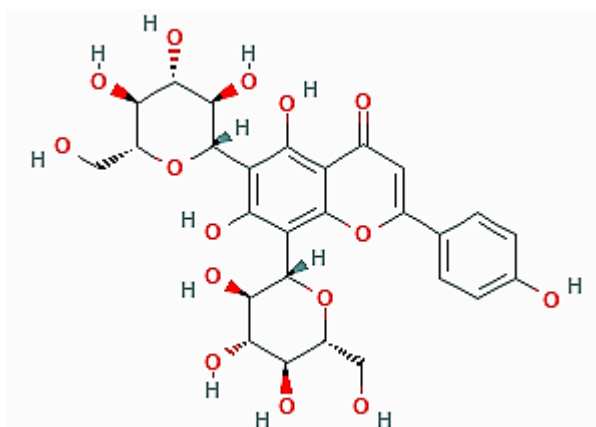


Figura 59: Estructura de apigenina-6,8-*C*-diglucósido (imagen tomada de pubchem).

En la Tabla 10 se resumen los datos obtenidos del análisis de HPLC-DAD-MS de la muestra DGF y las identificaciones realizadas en base a los mismos.

Tabla 10: Resultados obtenidos para los picos de la muestra DGF.

Nº	TR (min)	λ_{max} (nm)	$[M - H]^-$ (m/z)	MS^2 (m/z)	Identidad propuesta
1	5	324	339	177, 149	Daphnetin-glucósido
2	6,2	313	357	315, 151	Pinoresinol
3	6,9	323	593	503, 473, 413, 383, 353	Apigenina-6,8-C-diglucósido
4	10,8	323	177	149, 133, 121	Daphnetina
5	11,8	319	483	321, 277, 233, 143	Daphnogitina hexósido
6	13	334	523	361, 346, 315, 165	Secoisolariciresinol hexósido
7	15,4	314	261	241, 199, 189, 171, 161	Posible derivado de umbeliferona
8	16,6	263, 344	447	285	Luteolina-7-O-glucósido
9	17,1	322	483	321, 277, 143	Daphnogitina hexósido
10	17,8	322	483	321, 277, 143	Daphnogitina hexósido
11	18,2	322	321	277, 249, 233, 215, 177	Daphnogitina
12	18,9	315	515	353, 339, 205, 177	Hexósido de tetrahidroxi-biscumarina
13	19,3	315	515	353, 339, 205, 177	Hexósido de tetrahidroxi-biscumarina
14	19,7	324	483	321, 291	Hexósido de dihidroxi-biscumarina
15	20,1	315	853	691, 529, 515, 351, 323, 177	Glucuronil-dihexósido de tetradihidro-biscumarina
16	20,4	322	785	623, 461, 339, 285, 177	Derivado de daphnetina-glucósido
17	21,1	325	499	337, 309, 281, 191, 165	Desmetildaphnoretina-7-O-glucósido
18	23,3	322	321	303, 277, 259, 231	Dihidroxi-biscumarina
19	27,3	336	657	393, 361, 351, 335, 161	Rutarensin
20	32,5	320	355	175, 147, 121	Dihidrosesamina
21	39,1	341	351	335, 191, 163	Daphnoretina

→ Muestra DGH

En la Figura 60 se representa el cromatograma correspondiente a la muestra DGH registrado a 280 nm.

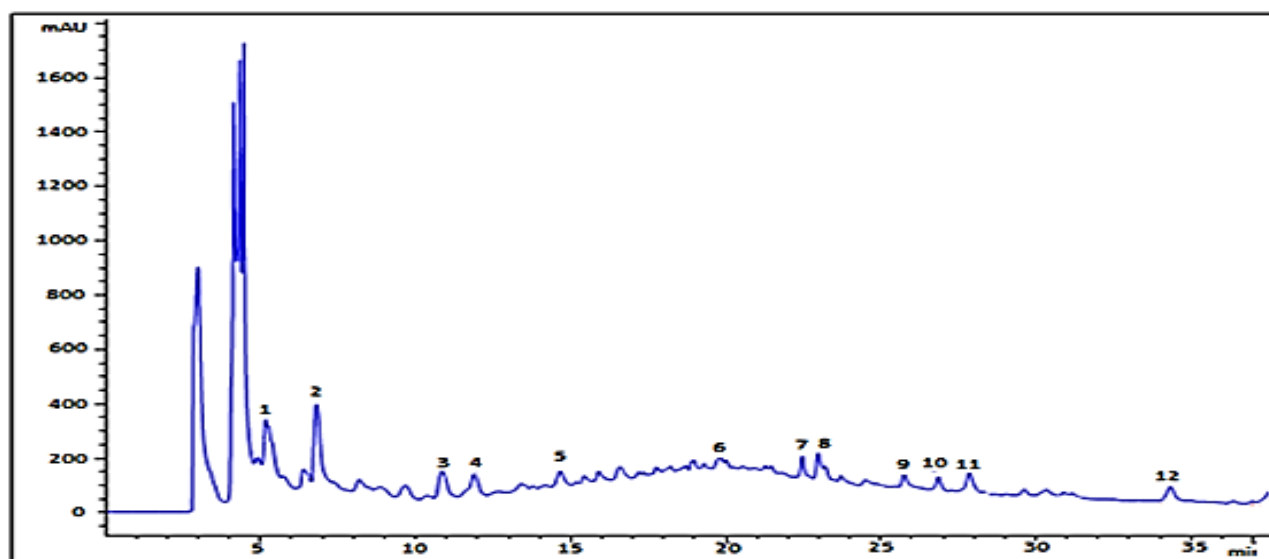


Figura 60: Cromatograma de un extracto fenólico de las hojas de *Daphne gnidium* L. (DGH).

Como se observa, se han marcado un total de 12 picos de interés, siendo los mayoritarios los picos **1 y 2**. Más adelante, en la Tabla 11 se recogen las características espectrales, tanto de absorción UV-Vis como de masas, de los mismos.

Para esta muestra, los picos 1, 3, 4, 5 y 10 se han asociado a cumarinas en función de sus características espectrales y de masas. El pico 3 ($[M-H]^-$ de m/z 177) corresponde al pico 4 de la muestra DGF, identificándose como la cumarina daphnetina. El pico 1 ($[M-H]^-$ de m/z 501) libera un fragmento de m/z 177, que podría resultar de la pérdida de dos unidades hexosa (324 um), asociándose así a un derivado dihexósido de daphnetina. El pico 4 presenta características similares a los picos 5, 9 y 10 de la muestra DGF en cuanto a ión pseudomolecular ($[M-H]^-$ de m/z 483), fragmento de m/z 321 y tiempo de retención, por lo que se identifica tentativamente como la misma sustancia (daphnogitina hexósido). Igualmente, el pico 10 ($[M-H]^-$ de m/z 657) coincide con el pico 19 de la muestra DGF, lo que permite identificarlo como rutarensin.

El pico 5 ($[M-H]^-$ de m/z 593) se identifica como una cumarina, en base a su espectro UV, similar a daphnetina, sin embargo, no se ha podido asociar la masa del compuesto a una estructura concreta, por lo que recoge como una cumarina no identificada.

El pico 9 muestra un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ de m/z 461 y libera fragmentos de m/z 417, 399, 371, 361, 307, 283. La masa del compuesto coincidiría con la suma de las masas de la flavona luteolina y de la cumarina daphnetina. La existencia de un resto cumarina parece avalada por la producción de un fragmento derivado de la pérdida de 28 um (m/z 551 a 533), considerada característica de cumarinas (Franke et al., 2002). Por otra parte, la presencia de híbridos flavona-cumarina está reportada en especies de la familia de las Timeláceas (Franke et al., 2002). En base a estas observaciones, el pico 9 se ha asignado tentativamente como un híbrido luteolina-daphnetina. Una posible estructura para el mismo se recoge en la Figura 61.

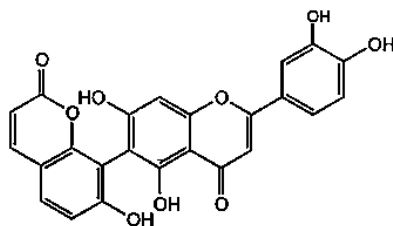


Figura 61: Posible estructura para el pico 9 de la muestra DGH (imagen propia).

Los picos 6 ($[M-H]^-$ de m/z 503), 7 ($[M-H]^-$ de m/z 447) y 8 ($[M-H]^-$ de m/z 461) tienen en común un fragmento de m/z 285 que puede asociarse a la flavona luteolina.

La masa del pico 8 coincide con la del pico 9 discutido en el párrafo previo, aunque sus patrones de fragmentación son distintos, denotando que se trata de compuestos con diferente estructura. De acuerdo con sus masas, los picos podrían corresponder respectivamente a los compuestos luteolina-acetilglucurónido, luteolina-hexósido y luteolina-glucurónido. La presencia de luteolina-7-*O*-glucósido está documentada en *Daphne gnidium* L. (Cottiglia et al., 2001; Deiana et al., 2003; Nowik, 2005). No obstante, esta identidad plantea algunas dudas, ya que las características de sus espectros de absorción no coinciden en cuanto a sus máximos de absorción, aunque sí en su forma, como se puede comprobar en la Figura 62, donde se hace una comparación entre los espectros UV del pico 7 y el del pico 8 de la muestra DGF, identificado tentativamente como luteolina-7-*O*-glucósido. Por esta razón, el pico se asigna simplemente como luteolina hexósido.

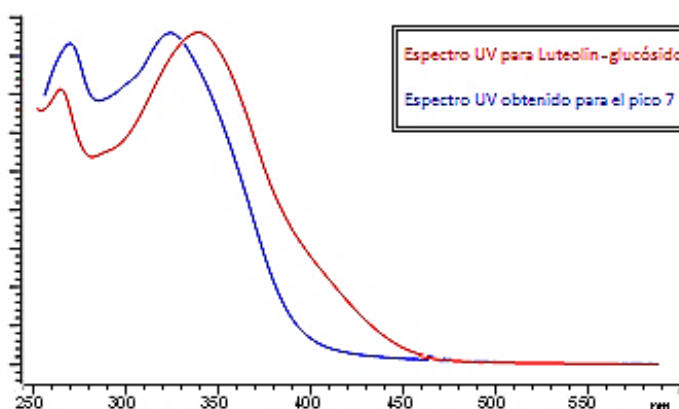


Figura 62: Comparativa espectros UV del pico 7 vs luteolina-7-*O*-glucósido.

El pico 2 ($[M-H]^-$ de m/z 593) coincide en sus características con el pico 3 de la muestra DGF, por lo que se identifica como apigenina-6,8-*C*-glucósido (vincenin-2). Por su parte, los espectros UV y de masas del pico 12 ($[M-H]^-$ de m/z 269) permiten asociarlo al aglucón, apigenina (Figura 63). La presencia de esta flavona se encuentra descrita en diversas especies de *Daphne*, incluyendo *Daphne gnidium* L. (Deiana et al., 2003; Nowik, 2005)

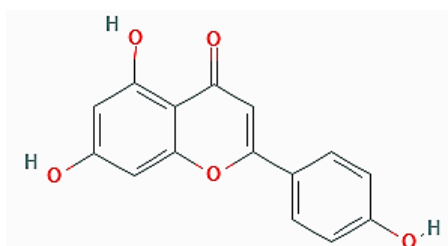


Figura 63: Estructura de apigenina (imagen tomada de pubchem).

Finalmente, las características de espectro de absorción y de masas ($[M-H]^-$ de m/z 593) del pico 11 permiten identificarlo como luteolina, compuesto también descrito en *Daphne gnidium* L. (Cottiglia et al., 2001; Deiana et al., 2003; Nowik, 2005).

En la Tabla 11 se resumen los datos obtenidos del análisis de HPLC-DAD-MS de la muestra DGH y las identificaciones realizadas en base a los mismos.

Tabla 11: Resultados obtenidos para los picos de la muestra DGH.

Nº	TR (min)	λ_{max} (nm)	$[M-H]^-$ (m/z)	MS ² (m/z)	Identidad propuesta
1	5,2	264, 320	501	177	Daphnetina dihexósido
2	6,8	269, 325	593	503, 473, 383, 365, 351, 327	Apigenina-6,8-C-diglucósido
3	10,9	323	177	149, 133, 121	Daphnetina
4	11,9	317	483	339, 321, 277, 233, 177	Daphnogitina hexósido
5	14,7	310	593	551, 533, 485, 387, 371, 161	Cumarina no identificada
6	20	321	503	489, 463, 449, 327, 303, 285	Luteolina-acetilglucurónido
7	22,5	323	447	285, 241	Luteolina- hexósido
8	23	322	461	285, 213, 187, 159	Luteolina-glucurónido
9	25,8	326	461	417, 399, 371, 361, 307, 283	Híbrido daphnetina-luteolina
10	26,9	325	657	393, 361, 351, 335, 305, 125	Rutarensin
11	27,9	268, 344	285	217, 201, 175, 151, 133	Luteolina
12	34,2	265, 337	269	225, 201, 159, 151, 117	Apigenina

→ Muestra DGT

En la Figura 64 se representa un cromatograma correspondiente a la muestra DGT registrado a 280 nm.

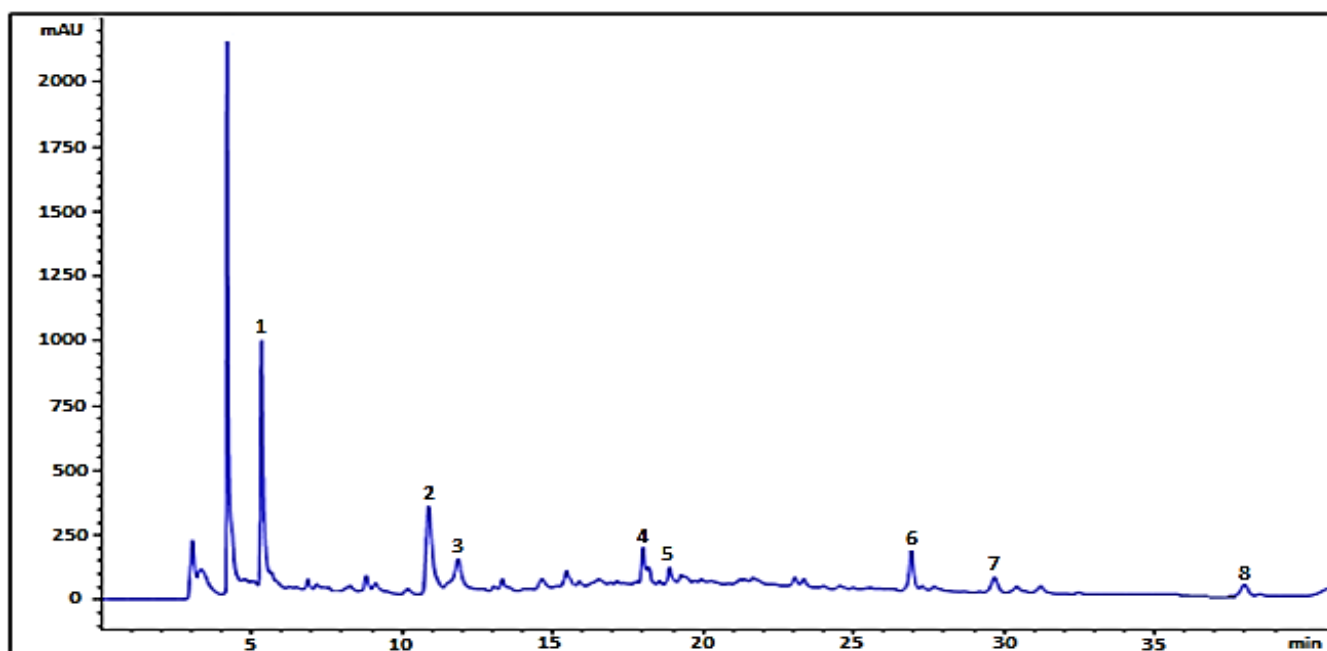


Figura 64: Cromatograma de un extracto fenólico del tallo de *Daphne gnidium* L. (DGT).

Como se observa, se han marcado un total de 8 picos de interés, siendo los mayoritarios los picos **1** y **2**. Más adelante, en la Tabla 12 se recogen las características espectrales, tanto de absorción UV-Vis como de masas, de los mismos.

El pico 1 tiene un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ de m/z 417, masa que coincide con la de siringaresinol (Figura 65), un lignano descrito en *Daphne* (Pan et al., 2010), por lo que se le asigna tentativamente esta identidad.

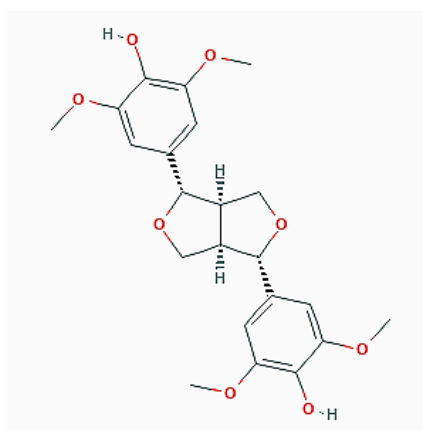


Figura 65: Estructura del siringaresinol (imagen tomada de pubchem).

El pico 2 ($[M-H]^-$ de m/z 177) puede identificarse como la cumarina daphnetina en base a sus datos de masas, como ya se ha comentado para las muestras DGF y DGH. Lo mismo ocurre con los picos 5 ($[M-H]^-$ de m/z 515), 6 ($[M-H]^-$ de m/z 657) y

8 ($[M-H]^-$ de m/z 321), que presentan características similares en cuanto a ión pseudomolecular, patrón de fragmentación, espectro UV y tiempo de retención a compuestos ya discutidos para las muestras DGF y DGH, por lo que se les asigna la misma identidad.

Sin embargo, no se ha podido asignar una identidad concreta a los picos 3 ($[M-H]^-$ de m/z 367), 4 ($[M-H]^-$ de m/z 413) y 7 ($[M-H]^-$ de m/z 337). En el caso del pico 3 se observa la presencia de un fragmento de m/z 321 que puede asociarse a una dihidroxi-biscumarina, como las detectadas en la muestra DGF, por lo que se le asocia tentativamente como un derivado de ese tipo de estructura. Los picos 4 y 7 parecen relacionados entre sí, ya que comparten fragmentos comunes en sus espectros de masas y similar espectro UV. La observación en el espectro MS^2 del pico 7 de fragmentos resultantes de la pérdida de 28 um (m/z 265 a 237, y m/z 165 a 147) sugiere una posible identidad como cumarina (Franke *et al.*, 2002). Por otra parte, la presencia del fragmento de m/z 321 parece indicar, como se ha señalado, una estructura de tipo dihidroxi-biscumarina, aunque en este caso el espectro UV no presenta las mismas características que las del pico 3 de esta muestra y otras posibles biscumarinas detectadas en la muestra DGF. Por esta razón, el pico se asigna simplemente como cumarina no identificada. Finalmente, el pico 4, con un fragmento de m/z 337, podría ser un derivado del pico 7.

En la Tabla 12 se resumen los datos obtenidos del análisis de HPLC-DAD-MS de la muestra DGT y las identificaciones realizadas en base a los mismos.

Tabla 12: Resultados obtenidos para los picos de la muestra DGT.

Nº	TR (min)	λ_{max} (nm)	$[M - H]^-$ (m/z)	MS^2 (m/z)	Identidad propuesta
1	5,3	264	417	209, 195, 177, 161	Syringaresinol
2	10,9	322	177	149, 133, 121	Daphnetina
3	11,8	317	367	339, 321, 305, 295, 283, 279, 267, 239, 195, 167	(Bis)cumarina no identificada
4	18	283, 328	413	337, 309, 295, 265	(Bis)cumarina no identificada
5	18,9	316	515	353, 339, 177	Hexósido de tetrahidroxi-biscumarina
6	26,9	332	657	393, 365, 351, 335, 305, 161	Rutarensin
7	29,7	281, 318sh	337	321, 309, 293, 281, 265, 237, 209, 191, 165, 147, 119	(Bis)cumarina no identificada
8	38	341	351	335, 323, 279, 251, 191, 135	Daphnoretina

3. CONCLUSIONES

Se han analizado las plantas *Bidens aurea* (Aiton) Sherff y *Daphne gnidium* L. herborizadas en el nordeste de la provincia de Cáceres, en la comarca de La Vera. Para ambas plantas se han hecho análisis de la composición fenólica las hojas, flores y el tallo, designando como muestras BAF, BAH y BAT para las muestras de *Bidens aurea* (Aiton) Sherff y DGF, DGH y DGT para las muestras de *Daphne gnidium* L.

No se han hecho análisis cuantitativos para poder calcular la proporción presente de cada compuesto, pero si se ha podido establecer la influencia de la temperatura en los mismos ya que sufren degradación si se conserva los macerados a temperatura ambiente.

Tras los resultados obtenidos se puede concluir que para *Bidens aurea* (Aiton) Sherff, los compuestos fenólicos predominantes son ácidos fenólicos, flavonas y flavonoles, aunque también se detectan auronas y chalconas. Para *Daphne gnidium* L. en cambio los compuestos predominantes son cumarinas, aunque también se detectan algunos lignanos y flavonas. Basándose en los resultados obtenidos en análisis de HPC-DAD-MS se ha podido realizar la identificación tentativa de la mayoría de los compuestos detectados. En particular, se han podido obtener información sobre 23 compuestos entre los detectados en la muestra de las flores de *Bidens aurea* (Aiton) Sherff (BAF), 20 compuestos en las hojas (BAH) y 14 compuestos en el tallo (BAT), y en el caso de *Daphne gnidium* L., de 21 compuestos para las flores (DGF), 12 para las hojas (DGH) y 8 para el tallo (DGT). Varios de los compuestos detectados no habían sido descritos anteriormente en estas especies. Por otro lado, se observó que algunos de los compuestos encontrados en una de las partes de las partes de las plantas, no estaban presentes en otras mientras que otros aparecían en todas. Las hojas fueron las que mostraron mayor composición fenólica respecto a las otras muestras en ambas plantas. Una posible explicación a este hecho es la importancia del papel de las hojas en la fotosíntesis de las plantas y las reacciones químicas que tienen lugar durante este proceso.

IV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamovics, J. & Stermitz, F.R. (1976) High-performance liquid chromatography of some anthocyanidins and flavonoids. *J. Chrom.* 129:464.
- Alarcón de la Lastra C., la Casa C., Motilva V., López, A. & Martín, M.J. (1997). Ulcer-protecting effects of a flavonoid fraction from *Bidens aurea* (Aiton) Sherff. Role of endogenous prostaglandins and microvascular permeability, *Phytomedicine*, 3: 327-333.
- Anthos.es (2018). *Sistema de información sobre las plantas de España*. Real Jardín Botánico-CSIC. Disponible en: www.anthos.es (fecha de consulta 12-09-2018)
- Aoki, T., Akashi, T. & Ayabe, S-I. (2000). Flavonoids of Leguminous Plants: Structure, Biological Activity, and Biosynthesis. *J. Plant Res.* 113: 475
- Ávalos A.G. & Pérez U.E. (2009). *Metabolismo secundario de plantas*. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal 2 (3): 119-145
- Badawi, M.M., Handa, S.S., Kinghorn, A.D., Cordell, G.A. & Farnsworth, N.R. (1983). Plant anticancer agents XXVII: Antileukemic and cytotoxic constituents of *Dirca occidentalis* (*Thymelaeaceae*). *J. Pharm. Sci.* 72: 1285.
- Blanco, E. & Cuadrado, C. (2000). *Etnobotánica en Extremadura: Estudio de La Calabria y La Siberia extremeñas*. Centro de Profesores y de Recursos Pintor Ortega. Alcoba de los Montes.
- Blanco, E. (2002). *Etnobotánica en los Montes de Toledo*. Asociación Cultural Montes de Toledo. Toledo.
- Cabrera, E., & A. Garcia-Granados. (1981). Fitoquímica de *Thymeleaceas* (III): Componentes Cumarínicos y Flavónicos en Hojas de *Daphne gnidium* L., *Ann. Quim.* 77:31–34.
- Cartaya, O. & Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. *Cultivos Tropicales*, 22 (2): 5-14
- Castroviejo, S., Aedo, C., Cirujano, S., Laínz, M., Montserrat, P., Morales, R., Muñoz Garmendia, F., Navarro, C., Paiva, J. & Soriano (1997). *Flora Ibérica vol. VIII*. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.
- Clifford M. N., Johnston K. L., Knight S. & Kuhnert N. A. (2003). A hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2900-2911.

- Cook, N. C. & Samman, S. (1996). Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.*, 7: 66–76.
- Cordell, A. G. (2004). Studies in the *Thymelaeaceae* I. Nmr Spectral Assignments of Daphnoretin. *J. Nat. Prod.*, 47(1): 84–88.
- Cottiglia, F., Loy, G., Garau, D., Floris, C., Caus, M., Pompei, R. & Bonsignore, L. (2001). Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L. *Phytomedicine*, 8: 302-305.
- Cuyckens, F. & Claeys, M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J Mass Spectrom.* 39(1):1-15.
- D'Arcy, W. G. (1975). Flora of Panama, Part IX. Family 184. *Compositae. V. Heliantheae. F. Coreopsidinae. Ann. Missouri Bot. Gard.* 62(4): 1178.
- Deiana, M., Rosa, A. & Casu, V. J. (2003). Chemical composition and antioxidant activity of extracts from *Daphne gnidium* L. *Chem. Soc.* 80: 65.
- Ferdinand, B., Maniruddin, A., King, R.M. & Harold, R. (1983). Acetylenic compounds from *Bidens graveolens*. *Phytochemistry*, 22: 5.
- Franke, K., Porzel, A. & Schmidt, J. (2002). Flavone-coumarin hybrids from *Gnidia socotrana*. *Phytochemistry*. 61: 873-879.
- García, A. & Pérez, E. (2009). *Metabolismo secundario de plantas*. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2(3): 119-145.
- García-Granados, A. & Sáenz de Buruaga, J. M. (1980). The ¹³C NMR spectrum of 5-O-b-D-primeverosyl genkwanine. *Org. Magn. Reson.*: 13: 462-463.
- Gbashi, S., Njobeh, P., Steenkamp, P., Tutu, H. & Madala, N. (2016). Pressurized hot water extraction (PHWE) and chemometric fingerprinting of phytochemicals from *Bidens pilosa* by UPLC-tandem mass spectrometry. CYTA-Journal of Food.
- González, A. (1993). Biological screening of Uruguayan medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 39(3): 2187.
- González-Tejero, M. R. (1990). *Investigaciones etnobotánicas en la provincia de Granada*. Ph. D. Tesis, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Granada.
- Harborne, J. B. & Mabry, T. J. (eds.)(1994). *The flavonoids: advances in research since 1986*. Chapman & Hall, London, U.K. 676 pp.

- Harborne, J.B. & William, C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*, 55(6): 481-504
- Jusković, M., Vasiljević, P., Manojlović, N., Krstev, T.M., & Stevanović, B. (2012) Phytochemical and Antimicrobial Screening of Leaves and Stems of Balkan Endemic Species *Daphne Malyana* Blečić. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 26:3, 3010-3015.
- Khoza, B. S., Gbashi, S., Steenkampa, P. A., Njobehb, P. B. & Madalaa, N. E. (2016). Identification of hydroxycinnamoyl tartaric acid esters in *Bidens pilosa* by UPLC-tandem mass spectrometry. *South Africa Journal of Botany* 103: 95-100.
- Kreher, B., Neszmelyi, A. & Wagner, H. (1990) Triumbellin, a tricoumarin rhamnopyranoside from *Daphne mezereum*. *Phytochemistry*, 29 (11): 3633-3637.
- Li, Y.L., Li, J., Wang, N.L. & Yao, X.S. (2008) Flavonoids and a new poliacetilene from *Bidens parviflora* wild. 13: 1931-1941.
- Liao, S.G., Zhang, B.L., Wu, Y. & Jian-Min Yue, J.M. (2005). New Phenolic Components from *Daphne giraldii*. *Helvetica Chimica Acta*. 88
- Lv, J., L. & Zhang, L.,B. (2013). Flavonoids and polyacetylenes from the aerial parts of *Bidens tripartite*. *Biochemical Systematics and Ecology* 48: 42–44
- Malafronte, N., Vassallo, A., Dal Piaz, F., Bader, A., Braca, A. & De Tommasi, N. (2012). Biflavonoids from *Daphne linearifolia* Hart. *Phytochemistry Letters* 5: 621–625.
- Março, P.H., Poppi, R.J. & Scarminio, I.S. (2008). Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. *Química Nova*. 31(5), 1218-1223
- Markham, K. R. (1982) *Techniques of flavonoid identification*. Academic Press. London, New York. 36-51.
- Martínez-Flores, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M. & Tuñón, M^a. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* 17(6): 271-278.
- Mulet, L. (1991). *Estudio etnobotánico de la provincia de Castellón*. Diputación de Castellón.

- Muñoz , J. A., Ramos, E.F., Alvarado O. C. & Castañeda, C.B. (2007). Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Rev. Soc. Quím. Perú* .73 (3):142-149.
- Nieto Feliner, G. (1997). *Daphne* L. in Castroviejo, S., Aedo, C., Laínz, M., Muñoz Garmendia, F., Nieto Feliner, G., Paiva, J. & Benedí, C. (eds.). *Flora iberica* 8: 33-42. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.
- Nowik, W. (2005). HPLC-PDA characterisation of *Daphne gnidium* L. (*Thymeleaceae*) dyeing extracts using two different C-18 stationary phases. *J. Sep. Sci.* 28: 1595 – 1600.
- Pan, L., Zhang, X.F., Deng, Y., Zhou, Y., Wang, H., Ding, L.S. (2010). Chemical constituents investigation of *Daphne tangutica*. *Fitoterapia*. 81:38-41
- Paray, L. (1957). El género *Bidens* en el Valle de México. Boletín de la Sociedad Botánica de México 20: 1-12.
- Pardo de Santayana, M., Blanco, E. & Morales, R. (2005). Plants known as té in Spain: An ethno-pharmaco-botanical review. *Journal of Ethnopharmacology* 98: 1–19.
- Popova, I.E., Hall, C. & Kubátová, A. (2009). Determination of lignans in flaxseed using liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216 : 217–229.
- Ragot, J., Tubery, P., Carreras-Jansou, M., Lattes, A., Symonds, P. (1988). Isolament de la 5 primeverosyl genkwanine des racines de *Daphne gnidium* L. *Fitoterapia* 59: 336–337.
- Rodríguez Franco (2018). *Daphne gnidium* L. in Pardo de Santayana, M., Morales, R., Tardío, J., Aceituno, L. & Molina, M. (eds.). *Inventario español de los conocimientos tradicionales relativos a la biodiversidad*. Fase II (2): 353-359. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Madrid. 425 p.p.
- Saltos, M.V.B., Puente, B.F.N., Milella, I., De Tomasi, N., Dal Piaz, F. & Brac, A. (2015). Antioxidant and free radical scavenging activity of phenolics from *Bidens humilis*. *Planta Medica* 81:1056-1064.
- San Miguel, E. (2004). *Etnobotánica de Piloña (Asturias)*. *Cultura y saber popular sobre las plantas en un concejo del Centro-Oriente Asturiano*. Ph.D.

Tesis, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.

- Sherff. (1937). *The genus Bidens*. Publication. Field Museum of Natural History., Botanical. Ser. 16:1-709.
- Solís, D. L. & Herrera, H. C. (2005). Desarrollo de un método de análisis para la cuantificación de ácidos clorogénicos en café. *Agronomía Costarricense*, 29(2): 99-107.
- Süntar , I., Akkol, E.K., Keles, H., Yesilada, E., Sarker S. & Baykal, T. (2014). *Daphne oleoides* Schreber ssp. *oleoides* exhibits potent wound healing effect: isolation of the active components and elucidation of the activity mechanism, *Rec. Nat. Prod.* 8(2): 93-109.
- Thien, T.V.N., Huynh, VHT., Vo, L.K.T., Tran, N.T., Loung, T.M., Le, T.H., Duc, T.P. & That, Q.T. (2017). Two new compounds and α -glucosidase inhibitors from the leaves of *Bidens pilosa* L. *Phytochemistry Letters*. 20: 119-122.
- Tomás-Menor, L.1, Morales-Soto, A., Barrajon-Catalán, E., Roldán-Segura, C., Segura-Carretero, A. & Micol, V. (2013). Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish *Cistus* species. *Food Chem Toxicol.* 55: 313-22.
- Tomczykowa, M., Tomczyk, M., Leszcznska, K. & Kalemba, D. (2017). Flavonoids and essential oils of *Bidens cernua* of Polish origin and in vitro antimicrobial activity of the oil. *Rec. Nat. Prod.* 11:6.
- Ulubelen, A., Terem, B., Tuzlaci, E. (1986). Coumarins and flavonoids from *Daphne gnidiodes*. *J. Nat. Prod.* 49: 692–694.
- Uysal, S., Ugurlu,,A., Zengin, G., Baloglu, M.C., Altunoglu, Y.C., Mollica, A., Custodio, L., Neng, N.R., Nogueira, J. M.F. & Mahomoodally M.F. (2018). Novel in vitro and in silico insights of the multi-biological activities and chemical composition of *Bidens tripartita* L. *Food and Chemical Toxicology*. 111: 525-536.
- Valdés, B., Talavera, S. & & Galiano, F. (eds.) (1987). *Flora Vascular de Andalucía Occidental*. Ed. Ketres. Barcelona.

- Verdú, M. & García-Fayos, P. (1998). Old-field colonization by *Daphne gnidium* L.: seedling distribution and spatial dependence at different scales. *J. Veget. Sci*, 9(5): 713–718.
- Wagner, H. & Chari, V.M. (1976). Sonnenbichler, J.: ¹³C-NMR-Spektren natürlich vorkommender Flavonoide. *Tetrahedron Lett.* 17(21):1799–1802.
- Wang, J., Yang, H., Lin, Z.W. & Sun, H.D. (1997). Flavonoids from *Bidens pilosa* var. *radiata*. *Phytochemistry*. 46: 1275–1278.
- Wolniak, M., Tomczykowa, M., Tomczyk., M., Gudej, J. & Wawer, I. (2017) Antioxidant activity of extracts and flavonoids from *Bidens tripartite*. *Acta Pol. Pharm.* 64: 441-447.
- Wulf, L. W. & Nagel, C. W. (1976). Analysis of phenolic acids and flavonoids by high-pressure liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 116: 271–279.
- Xu, W. C., Shen, J. G. & Jiang, J. Q. (2011). Phytochemical and biological studies of the plants from the genus *Daphne*. *Chemistry & Biodiversity*, 8: 1215-1233.
- Zhuang, L.G., Otto, S., Hermann, L. & Hildebert W. (1986). Constituents of *Daphne tangutica*. *Planta Med.* 45:172–6.