

© 2019 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 22: 1-13, 2019.

DOI: [10.22201/fesz.23958723e.2019.0.179](https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2019.0.179)

Identificación de compuestos fenólicos en extractos de almendra (*Prunus dulcis*) y nuez pecana (*Carya illinoensis*) mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS)

Laura A. de la Rosa¹, Emilio Álvarez-Parrilla¹ y Jorge A. García-Fajardo²

¹Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Anillo Envolvente del Pronaf y Estocolmo s/n, Ciudad Juárez, Chihuahua 32310, México. ²CIATEJ (Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco) Unidad Noreste, Apodaca, Nuevo León, México. E-mail: ldelaros@uacj.mx

RESUMEN

La almendra y nuez pecana son alimentos funcionales, cuyo consumo habitual puede prevenir el desarrollo de numerosas enfermedades crónico-degenerativas. Los compuestos fenólicos (CF) son algunos de los que poseen mayor actividad biológica en estos frutos secos, pero su identificación y caracterización siempre representa un reto analítico. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar el perfil de los CF, mediante HPLC acoplado a espectrometría de masas en tándem (MS/MS) de dos tipos de extractos de nuez pecana y almendra, un extracto etanólico y uno acetónico. Se identificaron, mediante HPLC acoplado a espectrometría de masas de alta resolución (Q-TOF), 29 compuestos en almendra (22 estuvieron en el extracto acetónico y 24 en el etanólico) y 43 en nuez pecana (39 en el acetónico y 37 en el etanólico). La identidad de 6 compuestos de la almendra y 20 de nuez pecana se confirmó mediante el análisis de sus patrones de fragmentación en el modo MS/MS del equipo. El perfil de los CF fue claramente diferente entre almendra y nuez, pero muy parecido entre ambos tipos de solventes empleados (acetona y etanol), para un mismo fruto seco. En la almendra predominó la presencia de flavonoles y flavanonas, mientras que en nuez pecana predominaron taninos hidrolizables (sobre todo elagitaninos y derivados simples del ácido elágico) y condensados (hasta tetrámeros). En este estudio se describe por primera vez la identificación de tres elagitaninos en nuez pecana.

Palabras Clave: alimentos funcionales, frutos oleaginosos, taninos condensados, taninos hidrolizables, flavonoides.

Identification of phenolic compounds in almond (*Prunus dulcis*) and pecan (*Carya illinoensis*) extracts by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)

ABSTRACT

Almonds and pecans are considered functional foods because their regular intake provides protection against several chronic-degenerative diseases. Phenolic compounds are some of the most bioactive components of these tree nuts; yet, their identification and characterization is regularly viewed as an analytical challenge. The aim of the present work was to characterize the phenolic compound profile of acetone and methanol extracts of almond and pecan nut, by using HPLC coupled to tandem mass spectrometry (MS/MS). First, high resolution MS (Q-TOF) was used to identify phenolic compounds in the extracts: 29 compounds were detected in almond (22 in acetone extract, 24 in ethanol extract) and 43 in pecan (39 in acetone extract, 37 in ethanol extract). Identity of 6 almond compounds and 20 pecan compounds was confirmed through analysis of their MS/MS fragmentation patterns. Phenolic profiles were different between pecan and almond but similar between extraction solvents for a same tree nut species. Flavonols and flavanones were the major types of phenolic compounds in almond, while pecan phenolics were mostly hydrolysable (ellagitannins acid ellagic acid derivatives) and condensed tannins (upto tetramers). Three ellagitannins are described for the first time in pecan.

Key Words: functional foods, oleaginous fruits, condensed tannins, hydrolysable tannins, flavonoids.

INTRODUCCIÓN

La almendra y nuez pecana son los frutos del Almendro (*Prunus dulcis*) y del Pecano (*Carya illinoensis*) respectivamente. Son clasificadas como frutos secos, o frutos oleaginosos por su bajo contenido de agua y elevado contenido de aceite, en comparación con las frutas convencionales, por ejemplo, la manzana. Han sido consumidas como alimento por los seres humanos desde épocas muy remotas por su alto valor nutritivo (Alasalvar & Shahidi, 2008). Hace algunas décadas, su consumo era poco recomendado por médicos y profesionales de la nutrición debido a su alto contenido lipídico, sin embargo, multitud de estudios han demostrado que el consumo habitual de frutos secos incluyendo nueces, almendras avellanas y cacahuates (alrededor de 30-40 g diarios), está asociado con una menor mortalidad por enfermedades del corazón y otros padecimientos como los crónicos degenerativos, incluso se le relaciona con una mayor esperanza de vida (Aune *et al.*, 2016); por lo que actualmente son recomendadas por diversas asociaciones americanas y europeas para la protección de la salud (Chang, Alasalvar, Bolling & Shahidi, 2016).

Por su alto contenido de ácidos grasos insaturados y tocoferoles (formas de la vitamina E), las propiedades benéficas de las nueces se atribuyeron sobre todo a la porción lipídica de estos alimentos; sin embargo, los frutos secos también son ricos en antioxidantes polares (compuestos fenólicos, CF) y micronutrientes, por lo que es muy probable que el mecanismo de protección sea dependiente de los efectos sinérgicos entre los numerosos componentes bioactivos de estos alimentos (Chang, Alasalvar, Bolling & Shahidi, 2016). Entre los frutos secos, las almendras destacan por su alto contenido de α -tocoferol (la forma más bioactiva de la vitamina E) y son los frutos secos más producidos y consumidos a nivel mundial (Chang, Alasalvar, Bolling & Shahidi, 2016). La nuez pecana posee el mayor contenido de CF y una muy elevada capacidad antioxidante. A nivel mundial su producción y consumo no son muy altos, estando en el 5º y 6º lugar entre los frutos secos, pero a nivel nacional, es un producto sumamente importante, ya que México es el primer productor y exportador (Álvarez-Parrilla, Urrea-López & de la Rosa, 2018). Por su menor presencia mundial, la nuez pecana no ha sido tan estudiada como la almendra, sin embargo, se ha reportado que su perfil de CF es sumamente complejo, ya que es rico en taninos condensados e hidrolizables (Robbins, Ma, Wells, Greenspan & Pegg, 2014). En cuanto a la identidad de los CF de la almendra, también contiene taninos condensados, pero es más rica en flavonoides monoméricos (Monagas, Garrido, Lebrón-Aguilar, Bartolomé & Gómez-Cordovés, 2007).

Varios trabajos que han caracterizado el perfil de los CF de nuez pecana y almendra demuestran que éste puede variar en respuesta a factores intrínsecos de la muestra, como por ejemplo: la variedad, región y condiciones de cultivo,

tratamiento y almacenamiento poscosecha, así como por condiciones experimentales de extracción. Por otra parte, el uso cada vez más habitual de nuevas herramientas analíticas, como la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS) permite identificar un mayor número de compuestos con menor manipulación de los extractos, que da una idea más clara de las estructuras nativas de los compuestos presentes en las plantas silvestres y en especies vegetales cultivadas. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar el perfil de los CF, mediante HPLC-MS/MS de dos tipos de extractos de nuez pecana y almendra, un extracto etanólico y uno acetónico. El primero es el disolvente utilizado preferentemente para la extracción de los CF monoméricos, mientras que el segundo es utilizado para la extracción de compuestos poliméricos (de la Rosa, Álvarez-Parrilla & Shahidi, 2011). En lo que respecta a un perfil fenólico detallado, se compara el efecto de la naturaleza del solvente frente al de las diferencias naturales entre dos diferentes especies de fruto seco. Asimismo, se identifica y se caracterizan los patrones de fragmentación de los compuestos bioactivos presentes en los extractos crudos de ambas especies con el objeto de profundizar en el conocimiento de este importante grupo de alimentos.

Los CF presentes en productos alimenticios son reconocidos por su actividad antioxidante, que puede tener efectos positivos en la conservación del alimento, así como en la salud del consumidor. Adicionalmente, se ha demostrado que los CF presentan múltiples actividades biológicas, incluyendo la regulación de la expresión de genes, la inhibición de enzimas y la modulación de la microbiota entérica (Sauceda *et al.*, 2018; Lamuel-Raventos & St. Onge, 2017). Por este motivo, es importante conocer el perfil y contenido de los CF en los alimentos que consumimos, sin embargo, la gran diversidad estructural de los mismos dificulta esta labor. Existen más de 8,000 CF en el reino vegetal, la mayoría de los cuales se pueden agrupar en las categorías de flavonoides y ácidos fenólicos. Sin embargo, éstos rara vez se encuentran en la naturaleza en forma de compuestos libres, sino que más bien se presentan glicosilados (generalmente unidos a mono o disacáridos) esterificados con ácidos orgánicos, o incluso ligados con macromoléculas o formando complejas estructuras poliméricas.

La identificación de los CF individuales, se ha realizado principalmente por técnicas de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC); sin embargo, estos análisis se han visto limitados en gran parte por la falta de estándares de las formas nativas (glicosiladas, esterificadas, etc) de estos compuestos. Actualmente, el uso de detectores de masas acoplados a equipos de HPLC, aunado al desarrollo de técnicas más eficientes de cromatografía de ultra alta eficiencia (UPLC) ha permitido mejorar la capacidad de detección e identificación de un gran número de compuestos individuales en matrices

altamente complejas, como lo son los alimentos y extractos fenólicos de alimentos (Motilva, Serra & Macià, 2013). Los detectores de masas facilitan la identificación de señales cromatográficas por la asignación de un valor de masa/carga específico para cada una de ellas, incluso cuando las señales de dos o más compuestos coinciden; sin embargo, la identificación de compuestos nuevos, para los que no hay estándares disponibles, requiere del uso de equipos de masas en tándem que proveen información estructural gracias a los patrones de fragmentación de los iones precursores seleccionados (Abu-Reidah, 2013).

En el presente trabajo, se analizaron extractos de nuez pecana y almendra mediante un sistema de HPLC acoplado a masas en tándem (HPLC-QTOF), tomando en cuenta que las características de la columna y método cromatográfico se pueden considerar propias de una cromatografía de ultra alta eficiencia (Motilva, Serra & Macià, 2013). Asimismo, el detector de tiempo de vuelo (TOF) tiene la capacidad de asignar masas con alta exactitud (errores menores a 10 ppm), permitiendo identificar compuestos diferentes con masas muy similares. Se comparó además la identidad de los compuestos presentes en extractos de acetona: agua con la de extractos etanol: agua y aunque ambos solventes tienen características similares, se ha reportado a la acetona como uno de los mejores solventes para extraer polifenoles poliméricos de tipo taninos, muy abundantes en las nueces (Álvarez-Parrilla, Urrea-López & de la Rosa, 2018); mientras que el etanol presenta ventajas por ser considerado apto para el consumo humano, pero hay muy pocos estudios que analizan extractos etanólicos de nueces por HPLC acoplado a masas. En todas las muestras analizadas se realizó una primera identificación (identificación tentativa) de CF mediante el software Qualitative analysis B.07.00 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) utilizando un algoritmo que combina la asignación de masas exactas con la comparación de los patrones de distribución isotópica de los iones extraídos de cada señal cromatográfica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de CF

Las muestras de almendra y nuez pecana fueron adquiridas en comercios de Ciudad Juárez en abril de 2017; las de nuez se descascararon manualmente desechando las cáscaras, las de almendra provenientes de Estados Unidos se compraron sin cáscara. Antes de extraer los CF se realizó un proceso de desgrasado, de acuerdo a la metodología reportada por de la Rosa, Álvarez-Parrilla & Shahidi (2011). Para ello, se homogenizaron 10 g de nuez o almendra con 100 mL de hexano en un homogenizador (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA) a 8000 rpm durante 3 minutos, la mezcla se filtró al vacío con papel filtro Whatman # 4. Se separó el hexano conteniendo el aceite y el procedimiento se repitió dos veces más sobre el residuo sólido. Finalmente, el aceite se recuperó de los extractos hexánicos combinados,

mientras que el residuo sólido (harina desgrasada) se secó al aire durante toda la noche en una campana de extracción y se almacenó a -20 °C hasta su uso como fuente de CF. Los CF se obtuvieron mediante una extracción con solvente asistida por ultrasonido (Torres-Aguirre *et al.*, 2018). Para ambas muestras se obtuvieron dos tipos de extractos: uno con etanol y otro con acetona ambos al 80% v/v en agua destilada. Un gramo de harina desgrasada se colocó en un tubo de 25 mL, se agregaron 10 mL de solvente y se colocaron en un baño de ultrasonido (Branson modelo 5800, Danbury, CT, USA) durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los tubos se centrifugaron en una centrífuga refrigerada (Eppendorff modelo AG 5810R, Hamburg, Germany) durante 15 min a 3,500 rpm y a 4 °C; se recuperó el sobrenadante y el precipitado fue re-extraído. Finalmente, los sobrenadantes de ambas extracciones fueron combinados, el solvente eliminado por medio de un rotavapor (Buchi modelo AG R-3, Flawil, Suiza) a 45 °C y el agua restante por liofilización (Labconco Freezezone 6, Kansas City, MO, USA) durante 48 h. Los extractos secos fueron empacados al vacío y almacenados hasta su análisis por HPLC-MS/MS.

Identificación de CF

Los extractos secos fueron disueltos en metanol al 80% (v/v en agua) y diluidos (1:1) en agua para una concentración final de 2 mg de extracto por mL. Todos los disolventes fueron grado LC-MS. Estas muestras fueron filtradas a través de un filtro de jeringa de nylon, 0.45 µm e inyectadas al equipo de HPLC acoplado a masas (HPLC-QTOF Agilent Modelo G6530, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipado con una columna Kinetex® biphenyl de 50 x 2.1 mm con un tamaño de partícula de 2.6 µm y un tamaño de poro de 100 Å (Phenomenex, Torrance, CA, USA) Para la separación cromatográfica se utilizó un gradiente de dos fases móviles (fase A, ácido fórmico al 0.1 % en agua; fase B, ácido fórmico al 0.1 % en metanol) con un flujo de 0.4 mL/min y un volumen de inyección de 1 µL. El gradiente se programó de la siguiente manera: 10-100 % de B de los 0 a los 8 minutos; 100 % B de los 8 a los 9.5 minutos; 100-10 % de B de los 9.5 a los 9.6 minutos.

La detección e identificación de los CF se realizó mediante un analizador de masas en tándem cuadrupolo tiempo de vuelo (Q-TOF) con una fuente de ionización por electrospray (ESI). Se utilizó ionización negativa con las siguientes condiciones: voltaje del capilar 4,000 V, presión del gas nebulizador 40 psi, temperatura del gas de secado 350 °C y flujo de 10 L/min. Las condiciones de voltaje del TOF fueron: fragmentador 150 V, skimmer 65 V y octopolo 750 V. La fragmentación de los iones precursores se llevó a cabo mediante un método no dirigido (Auto MS/MS), seleccionando los 5 iones más abundantes de cada señal cromatográfica y una rampa de energías de colisión desde -10 hasta -40 V. Se utilizó un algoritmo de identificación por base de datos, donde la base de datos se

construyó utilizando los CF más abundantes en alimentos, así como los CF reportados en la literatura característicos de diferentes tipos de frutos secos, limitándose a almendra y nuez pecana y otros de naturaleza química similar. Se realizó una identificación tentativa por comparación de la masa calculada vs la masa teórica (registrada en la base de datos) aunada al análisis de la distribución isotópica del ion extraído. Dentro de los criterios de identificación, también se consideró un porcentaje de identidad (score) mayor al 70 %, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, que recomienda un score mayor al 50% para la identificación tentativa, y una abundancia del ion mayor a 1,000 cuentas en los extractos de almendra y mayor a 5,000 cuentas en los extractos de nuez pecana debido a que la abundancia de los iones individuales fue más alta en general en los extractos de nuez pecana. La identidad de los compuestos más abundantes fue confirmada o descartada por su patrón de fragmentación el cual se comparó con el de bases de datos de espectros de masas (Metlin integrada al software MassHunter PCDL Manager for Metabolomics B.07.00 [Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA] y The Human Metabolome Database [www.hmdb.ca]) y lo reportado en literatura.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestra, como ejemplo, el proceso para realizar la identificación tentativa y confirmación por MS/MS de la estructura de un compuesto abundante en los extractos de nuez pecana (monogaloil glucosa, compuesto 6 de la Tabla I). La figura 1A corresponde al cromatograma de ion total (TIC). El primer análisis de la muestra consiste en obtener los cromatogramas de ion extraído (Figura 1B) de todos los compuestos cuyas masas exactas coincidían con las de la base de datos (con un error menor a 10 ppm). Para cada compuesto identificado se comparó la distribución isotópica encontrada en la muestra con la teórica de acuerdo con su fórmula molecular (Figura 1C). Con esta información se obtuvo la identificación tentativa en un primer nivel (Tablas II y I). A continuación se analizaron los patrones de fragmentación de los cinco iones más abundantes en cada tiempo de retención, en la Figura 1D se muestra el espectro de masas de monogaloil glucosa (rt 0.86), donde se observa la abundancia del ion precursor, de los fragmentos principales y las estructuras de los tres iones: el ion molecular (que fue el ion precursor) y los dos fragmentos más abundantes (estructuras teóricas según www.hmdb.ca).

La identificación tentativa de algunos compuestos indicó que, de acuerdo con la información de la base de datos, existe más de una posible correspondencia. Las correspondencias múltiples consistieron siempre en diversos isómeros con una misma masa molecular exacta, no en compuestos con masas moleculares similares, como es el caso de los compuestos glicosilados. Sin embargo, hay que considerar que dicha base de datos contiene información limitada, por lo que el

número real de compuestos que pueden corresponder a una misma masa (incluso considerando la asignación con alta exactitud) y distribución isotópica determinadas es mucho mayor, ya que para, exactamente, la misma fórmula molecular predicha existen en algunos casos cientos de compuestos posibles (muchos de ellos ni siquiera son CF). A pesar de que la identificación absoluta de un producto natural, mediante la elucidación de su estructura, requiere de un conjunto de técnicas analíticas, especialmente resonancia magnética nuclear, mediante el análisis de los patrones de fragmentación de sus iones moleculares en un espectrómetro de masas en tándem es posible hacer una predicción aproximada de su estructura; lo que, en conjunto con la masa exacta del ion molecular (el ion precursor), nos permite proponer su identidad con una baja incertidumbre (Abu-Reidah, 2013; Fabre, Rustan, Hoffmann & Quetin-Leclercq, 2001; Justesen, 2000).

Una vez considerados todos los criterios de identificación descritos en la sección de Materiales y métodos, los compuestos así identificados en los extractos etanólicos y acetónicos de almendra y nuez pecana se muestran en las Tablas II y I.

Se encontraron un total de 29 compuestos en almendra (22 estuvieron presentes en el extracto acetónico y 24 en el etanólico) y 43 en nuez pecana igual que el anterior (39 en el acetónico y 37 en el etanólico).

En general, tanto el número de compuestos identificados como las abundancias de cada ion individual fueron mayores en los extractos de nuez pecana que en los de almendra. En cuanto a la comparación por solvente de extracción, la acetona resultó ligeramente más efectiva en cuanto al número de compuestos extraídos y la abundancia de los iones identificados; sin embargo, esta diferencia fue muy ligera y se puede atribuir a la diferencia en polaridad de ambos solventes. En ambas muestras se identificó ácido cítrico (en el extracto acetónico para la almendra y en el extracto etanólico para la nuez), siendo más abundante en la almendra. Hasta el momento, no se han encontrado reportes previos de la presencia de este compuesto en almendra o nuez pecana, quizá porque el presente estudio es uno de los primeros análisis no dirigidos que se realiza con estas nueces a diferencia de otros donde no se buscó la presencia de ácidos orgánicos. El número e identidad de los CF presentes en ambos frutos secos fueron, distintos, sin embargo, no hubo diferencias significativas por efecto del disolvente.

Los compuestos más abundantes en almendra fueron los flavonoides de las familias de los flavonoles y las flavanonas, mientras que en nuez pecana fueron taninos hidrolizables (sobre todo elagitaninos) y condensados (en el extracto acetónico) de bajo-mediano peso molecular y algunos ácidos hidroxibenzoicos.

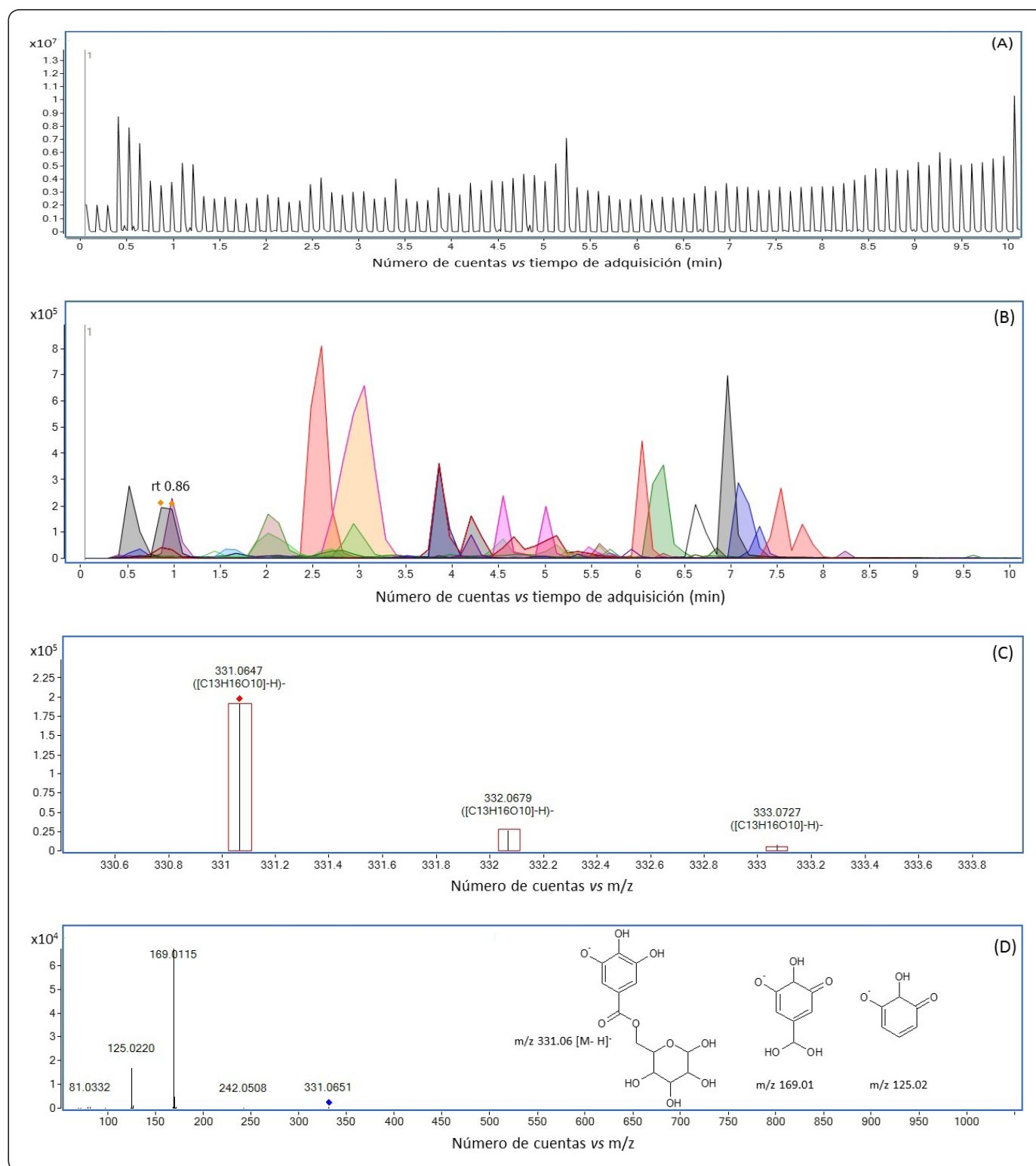


Figura 1. Identificación tentativa de la monogalloyl-glucosa en un extracto etanólico de nuez pecana. (A) Cromatograma de ion total (TIC) en modo auto MS/MS del extracto. (B) Superposición de los cromatogramas de ion extraído (EIC) de los compuestos identificados tentativamente en el cromatograma mostrado en A. (C) Comparación de las distribuciones isotópicas identificadas para el ion 331.0647 en comparación con las teóricas de acuerdo a la fórmula de monogalloyl glucosa. (D) Espectro de masas obtenido a partir del ion precursor 331.0651 (ion molecular de monogalloyl glucosa), donde se muestran las estructuras predichas para el ion precursor y cada uno de sus fragmentos (www.hmdb.ca). Elaborada por los autores.

Comp.	Rt	[M-H]-	Masa calculada	Masa teórica	Fórmula	Identificación tentativa	Abundancia del ion	
							Ex. Ac.	Ex. Et.
1	0.52	665.2103	666.2176	666.2160	C31 H38 O16	Syringaresinol malonilhexósido	ND	5,568
2	0.52	191.0181	192.0253	192.0270	C6 H8 O7	Ácido cítrico	ND	102,174
3	0.63	481.0598	482.0677	482.0697	C20 H18 O14	HHDP-glucosa	55,401	21,843
4	0.86	261.0053	262.0128	262.0147	C9 H10 O7 S	Sulfato de ácido dihidrocafeico	11,360	ND
5	0.86	865.1974	866.2047	866.2058	C45 H38 O18	Trímero de procianidina tipo B	18,574	15,976
6	0.86	331.0647	332.0720	332.0743	C13 H16 O10	Monogaloil-glucosa (glucogaliina)	131,130	191,047
7	0.98	633.0716	634.0789	634.0806	C27 H22 O18	Galoil-HHDP-glucosa	9,782	ND
8	0.98	305.0638	306.0713	306.0740	C15 H14 O7	(Epi)Galocatequina	35,170	ND
9	0.98	315.0697	316.0769	316.0794	C13 H16 O9	Hexósido de ácido protocatequico	131,670	144,745
10	0.98	483.0772	484.0849	484.0853	C20 H20 O14	Digaloil-glucosa	ND	4,058
11	1.55	329.0856	330.0932	330.0951	C14 H18 O9	Glicósido de ácido vanílico	11,688	15,602
12	1.67	633.0713	634.0785	634.0806	C27 H22 O18	Galoil-HHDP-glucosa	12,651	6,138
13	2.01	451.1221	452.1293	452.1319	C21 H24 O11	Hexósido de (epi)catequina	43,565	46,769
14	2.01	783.0678	784.0749	784.0759	C34 H24 O22	Di-HHDP-glucosa (pedunculagina o casuarina)	135,382	75,599
15	2.59	289.0692	290.0764	290.0790	C15 H14 O6	Catequina (por Rt)	139,824	185,404
16	2.75	881.1917	882.1988	882.2007	C45 H38 O19	Trímero de prodelfinidina tipo B	12,961	9,028
17	2.93	783.0684	784.0755	784.0759	C34 H24 O22	Di-HHDP-glucosa (pedunculagina o casuarina)	136,513	52,150
18	3.05	577.1334	578.1408	578.1424	C30 H26 O12	Dímero de procianidina tipo B	120,412	91,105
19	3.39	935.0779	936.0864	936.0869	C41 H28 O26	Galoil-pedunculagina o isómero	9,541	ND
20	3.85	865.1972	866.2043	866.2058	C45 H38 O18	Trímero de procianidina tipo B	62,593	96,169
21	3.85	633.072	634.0792	634.0806	C27 H22 O18	Galoil-HHDP-glucosa	150,874	88,064
22	4.2	935.0793	936.0866	936.0869	C41 H28 O26	Galoil-pedunculagina o isómero	83,354	26,383
23	4.43	337.0905	338.0977	338.1002	C16 H18 O8	Ácido coumaroilquínico	105,728	117,010
24	4.54	1153.2620	1154.2685	1154.2692	C60 H50 O24	Tetramero de procianidina tipo B	19,574	15,566
25	4.54	577.1334	578.1406	578.1424	C30 H26 O12	Dímero de procianidina tipo B	204,365	74,543
26	4.89	933.0639	934.0725	934.0712	C41 H26 O26	Pracoxina D o isómero	33,140	ND
27	5.12	865.1966	866.2036	866.2058	C45 H38 O18	Trímero de procianidina tipo B	ND	27,877
28	5.23	635.0878	636.0951	636.0963	C27 H24 O18	Trigaloil-glucosa	11,255	ND
29	5.23	513.0820	514.0888	514.0878	C22 H23 Cl O12	Petunidina-3-galactosa (Cl ⁻)	27,189	23,484
30	5.46	463.0505	464.0577	464.0591	C20 H16 O13	Hexósido de ácido elágico	29,338	31,037
31	5.58	453.1333	454.1403	454.1416	C28 H22 O6	Dímero de resveratrol	7,268	17,945
32	5.58	469.0040	470.0111	470.0121	C21 H10 O13	Dilactona del ácido valoneico	11,504	4,841
33	5.6-5.69	1103.0870	1104.0944	1104.0928	C48 H32 O31	Pracoxina C o isómero	69,791	24,582
34	5.69	787.0983	788.1051	788.1072	C34 H28 O22	Tetragaloil-glucosa	7,948	7,523
35	6.04	433.0392	434.0464	434.0485	C19 H14 O12	Pentósido de ácido elágico	374,302	448,327
36	6.27	507.1119	508.1193	508.1217	C23 H24 O13	Syringetin-3-glucósido	12,442	19,009
37	6.27	300.9961	302.0034	302.0063	C14 H6 O8	Ácido elágico	45,893	54,266
38	6.84	477.0656	478.0734	478.0747	C21 H18 O13	Hexósido de metil-ácido elágico o Quercetín-glucurónido	19,978	39,800
39	6.96	585.0503	586.0578	586.0595	C26 H18 O16	Galoil-pentósido de ácido elágico	88,585	71,022
40	7.07	447.0551	448.0624	448.0642	C20 H16 O12	Pentósido de metil-ácido elágico	53,997	123,150
41	7.3	315.0128	316.0201	316.0219	C15 H8 O8	Metil-ácido elágico	102,982	56,142
42	7.54	599.0656	600.0727	600.0751	C27 H20 O16	Galoil-pentósido de metil-ácido elágico	81,126	87,862
43	8.23	447.1324	448.1391	448.1369	C22 H24 O10	Di(4-hidroxifenilacetil)-hexosa	28,496	27,677

Rt: tiempo de retención; Ex. Ac: extracto acetónico 70%; Ex. Et: extracto etanólico 70%; HHDP: hexahidroxidifenol. ND: no detectado.

Tabla I. Identificación tentativa de compuestos fenólicos en extractos de nuez pecana (*Carya illinoensis*) mediante HPLC-MS.

Comp.	Rt	[M-H]-	Masa calculada	Masa teórica	Fórmula	Identificación tentativa	Abundancia del ion	
							Ex. Ac.	Ex. Et.
1	0.51	191.0178	192.0251	192.0270	C6 H8 O7	Ácido cítrico	212,251	ND
2	0.63	665.2096	666.2169	666.2160	C31 H38 O16	Syringaresinol malonilhexósido	ND	3,800
3	0.86	147.0448	148.0520	148.0524	C9 H8 O2	Ácido cinámico	ND	1,643
4	0.97	315.0698	316.0776	316.0794	C13 H16 O9	Hexósido de ácido protocatequico	12,145	ND
5	2.24	329.0867	330.0943	330.0951	C14 H18 O9	Glucósido de ácido vanílico	6,831	4,599
6	2.58	289.0698	290.0772	290.0790	C15 H14 O6	Catequina (por Rt)	20,624	23,077
7	3.62	465.1032	466.1105	466.1111	C21 H22 O12	Hexósido de taxifolina	ND	1,894
8	4.08	517.1535	518.1611	518.1636	C22 H30 O14	Dihexósido de ácido ferúlico	9,997	10,670
9	4.31	329.0859	330.0931	330.0951	C14 H18 O9	Glicósido de ácido vanílico	10,414	7,071
10	4.43	289.0696	290.0770	290.0790	C15 H14 O6	Epicatequina (por Rt)	3,457	14,255
11	5.00	577.1350	578.1427	578.1424	C30 H26 O12	Dímero de procianidina tipo B	5,408	3,305
12	5.92	499.0634	500.0713	500.0722	C21 H21 Cl O12	Hexósido de delfinidina (Cl)	8,086	4,666
13	6.04	463.0863	464.0946	464.0955	C21 H20 O12	Hexósido de quercetina	13,870	7,637
14	6.15	287.0534	288.0607	288.0634	C15 H12 O6	Eriodictyol o Dihidrokaempferol	57,302	82,012
15	6.16	449.1064	450.1133	450.1162	C21 H22 O11	Ramnósido de taxifolina o Hexósido de eriodictyol o dihidrokaempferol	ND	6,335
16	6.16	300.9976	302.0048	302.0063	C14 H6 O8	Ácido elágico	ND	2,351
17	6.38	593.1492	594.1567	594.1585	C27 H30 O15	Diglicósido de apigenina o Rutinósido de kaempferol	40,491	23,488
18	6.38	447.0908	448.0982	448.1006	C21 H20 O11	Hexósido de kaempferol	19,502	4,736
19	6.61	477.1021	478.1093	478.1111	C22 H22 O12	Glicósido de isoramnetina	284,349	169,602
20	6.73	433.1114	434.1191	434.1213	C21 H22 O10	Naringenina-C-hexósido	34,759	21,561
21	6.73	513.0769	514.0867	514.0878	C22 H23 Cl O12	Petunidina-3-galactósido (Cl)	5,105	ND
22	6.96	301.0332	302.0401	302.0427	C15 H10 O7	Quercetina	43,450	ND
23	6.96	585.0509	586.0582	586.0595	C26 H18 O16	Ácido elágico-galoil-pentósido	ND	4,722
24	7.42	285.0377	286.045	286.0477	C15 H10 O6	Kaempferol o luteolina	81,610	52,137
25	7.42	271.0589	272.0661	272.0685	C15 H12 O5	Naringenina	96,235	100,288
26	7.65	315.0498	316.0569	316.0583	C16 H12 O7	Isoramnetina o azaleatina	878,654	473,504
27	7.65	301.0688	302.0762	302.0790	C16 H14 O6	Hesperetina	ND	10,096
28	8.22	447.1319	448.1388	448.1369	C22 H24 O10	Di(4-hidroxifenilacetil)-hexosa	41,032	35,486
29	8.57	329.0648	330.0720	330.0740	C17 H14 O7	Caryatina	45,171	ND

Rt: tiempo de retención; Ex. Ac: extracto acetónico 70%; Ex. Et: extracto etanólico 70%. ND: no detectado.

Tabla II. Identificación tentativa de compuestos fenólicos en extractos de almendra (*Prunus dulcis*) mediante HPLC-MS.

Sólo 7 compuestos identificados en la almendra se encontraron entre los iones que, por su abundancia, fueron fragmentados en sus respectivos tiempos de retención. Sus iones precursores y fragmentos se enlistan en la Tabla III, así como la confirmación o rectificación de su identificación tentativa (Tabla II), por comparación con los fragmentos reportados en bases de datos y literatura científica. La fragmentación del compuesto 1 (Rt 0.51, [M-H]- 191.0178) confirmó que se trata del ácido cítrico (el mismo compuesto con similar tiempo de retención se encontró también en nuez pecana), confirmado en la base de datos Metlin integrada al propio software de identificación. El compuesto 14 (Rt 6.15, [M-H]- 287.0534) mostró dos posibles coincidencias: eriodictyol (una flavanona) o dihidrokaempferol (un dihidroflavonol o flavanonol); ambos han sido reportados

previamente en extractos de piel de almendra (Monagas, Garrido, Lebrón-Aguilar, Bartolomé & Gómez-Cordovés, 2007), sin embargo, el patrón de fragmentación fue más parecido al de dihidrokaempferol, según lo reportado por Moqbel *et al.* (2018), quien indica que el fragmento de m/z 259 corresponde a la pérdida de un grupo CO, característica de flavanonoles, mientras que el fragmento de m/z 125 podría corresponder a la fragmentación del anillo A. Esta fragmentación del anillo A se ha reportado también en flavanonas (Fabre, Rustan, Hoffmann & Quetin-Leclercq, 2001), sin embargo, la presencia de ambos fragmentos juntos coincide con lo observado por Moqbel *et al.* (2018) para dihidrokaempferol, al tiempo que no se encuentran ninguno de los fragmentos más característicos del eriodictyol, motivo por el cual se concluye que el compuesto

Comp.	[M-H] ⁻ (ion precursor)	Fragmentos	Fórmula	Identificación por patrón de fragmentación	Referencia para comparación de fragmentos
1	191.0178	111.007, 87.008, 85.028	C6 H8 O7	Ácido cítrico	base de datos Metlin;
14	287.0534	259.058, 125.022	C15 H12 O6	Dihidrokaempferol	Moqbel <i>et al.</i> , 2018
17	593.1492	285.038	C27 H30 O15	Rutinósido de kaempferol	Monagas , Garrido, Lebrón-Aguilar, Bartolomé & Gómez-Cordovés , 2007
19	477.1021	314.041, 271.021, 243.027, 151.000	C22 H22 O12	Glicósido de isoramnetina	Moqbel <i>et al.</i> , 2018
25	271.0589	151.000, 119.048	C15 H12 O5	Naringenina	base de datos Metlin; Fabre, Rustan, Hoffmann & Quetin-Leclercq, 2001
26	315.0498	300.025, 151.000	C16 H12 O7	Isoramnetina	HMDB; Justesen, 2000
28	447.1319	375.081, 219.837, 162.836	C22 H24 O10	Desconocido	

Tabla III. Confirmación de la identificación tentativa de compuestos fenólicos en extractos de almendra, por comparación de sus patrones de fragmentación en modo negativa con el de bases de datos de espectros de masas (Metlin integrada al software MassHunter PCDL Manager for Metabolomics B.07.00 [Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA] y The Human Metabolome Database [www.hmdb.ca]) y lo reportado en la literatura científica.

14 corresponde a dihidrokaempferol. El compuesto 17 (Rt 6.38, [M-H]⁻ 593.1492) mostró un fragmento de m/z 285, que corresponde a la masa del kaempferol como aglicona, mientras que la diferencia (308) corresponde a la pérdida de un rutinósido (disacárido glucosa-ramnosa), indicando la presencia del rutinósido de kaempferol, que ya ha sido reportado por Monagas, Garrido, Lebrón-Aguilar, Bartolomé & Gómez-Cordovés, (2007) en piel de almendra. Aunque esta información no permite descartar la posibilidad de que la aglicona sea luteolina en lugar de kaempferol, (ya que ambos poseen la misma fórmula y masa molecular), no se ha reportado en almendra la presencia de rutinósido de luteolina, infiriendo con un alto grado de certidumbre que el compuesto 17 corresponde a un rutinósido de kaempferol. El compuesto 19 (Rt 6.61, [M-H]⁻ 477.1021) se identificó como glucósido de isoramnetina, a pesar de que en un principio no presentó el ion característico de cualquier glucósido, que consiste en el ion de la aglicona -H (Justesen, 2000) que en este caso sería de una m/z 315. Sin embargo, los fragmentos con m/z 314, 271 y 243 coinciden con los encontrados por Moqbel *et al.* (2018), quien identificó al glucósido de isoramnetina en hojas y tallos de árbol de almendra, con unas condiciones de ionización muy similares a las utilizadas en el presente trabajo; además el fragmento m/z 151 corresponde a un producto de fragmentación del anillo A característico de flavonas, flavonoles y flavanonas no metilados en dicho anillo, incluyendo a la isoramnetina (Fabre, Rustan, Hoffmann & Quetin-Leclercq, 2001; Justesen, 2000). Los compuestos 25 (Rt 7.42, [M-H]⁻ 271.0589) y 26 (Rt 7.65, [M-H]⁻ 315.0498) fueron identificados fácilmente por tratarse de agliconas:

naringenina (una flavanona) e isoramnetina (un flavonol), respectivamente. Sus patrones de fragmentación mostraron los fragmentos característicos descritos en bases de datos y referencias especializadas (Fabre, Rustan, Hoffmann & Quetin-Leclercq, 2001; Justesen, 2000). Por último, el compuesto 28 (Rt 8.22, [M-H]⁻ 447.1319) no pudo ser identificado. La identificación tentativa marcó un compuesto fenólico no flavonoide reportado en lechuga (Abu-Reidah, 2013) sin embargo, su patrón de fragmentación no coincidió.

En resumen, los CF más abundantes pudieron ser identificados y confirmada su estructura por HPLC-MS-MS en ambos extractos de almendra y fueron: 1) isoramnetina aglicona, 2) glicósido de isoramnetina y 3) naringenina aglicona. Los dos primeros son flavonoles metilados, y el último una flavanona.

En la Tabla IV se muestran los iones precursores y fragmentos obtenidos en el análisis de la nuez pecana. 24 iones precursores fueron fragmentados, de los cuales 3 se identificaron tentativamente como diferentes isómeros del mismo compuesto, dos procianidinas y un elagitanino. Los compuestos identificados por su patrón de fragmentación pueden dividirse en 5 grupos, según su naturaleza química: 1) glicósidos de ácidos fenólicos (compuesto 9); 2) flavan-3-oles, incluyendo monómeros, glicósidos y procianidinas (compuestos 13, 15, 18, 20, 25 y 27); 3) galotaninos (compuestos 6 y 34); 4) derivados de ácido elágico, con o sin ácido gálico (compuestos 30, 35 y 37-42); y 5) elagitaninos, que contienen al menos una unidad de ácido hexahidroxidifénico (HHDP, compuestos 14, 17, 21, 22, 26 y 33). El compuesto 23

Comp.	[M-H] ⁻ (ion precursor)	Fragmentos	Fórmula	Identificación por patrón de fragmentación	Referencia para comparación de fragmentos
6	331.0647	169.011, 125.022	C13 H16 O10	Monogaloil-glucosa (glucogaliina)	HMDB (predicted); Gong & Pegg, 2017; Robbins, Ma, Wells, Greenspan & Pegg, 2014
9	315.0697	152.008, 108.019	C13 H16 O9	Hexósido de ácido protocatéquico	Abu-Reidah <i>et al.</i> , 2018
13	451.1221	289.069, 245.079, 125.021	C21 H24 O11	Hexósido de (epi)catequina	HMDB (predicted); Gong & Pegg, 2017; Robbins, Ma, Wells, Greenspan & Pegg, 2014
14	783.0678	300.996, 481.059, 275.017	C34 H24 O22	Di-HHDP-glucosa (pedunculagina o isómero)	Boulekbache-Makhlouf <i>et al.</i> , 2010
15	289.0692	245.079, 109.028	C15 H14 O6	Catequina (por Rt)	Metlin
17	783.0684	300.996, 481.059, 275.017	C34 H24 O22	Di-HHDP-glucosa (pedunculagina o isómero)	Boulekbache-Makhlouf <i>et al.</i> , 2010
18	577.1334	407.074, 289.069, 125.022	C30 H26 O12	Dímero de procianidina tipo B	HMDB; Monagas, Garrido, Lebrón-Aguilar, Bartolomé & Gómez-Cordovés, 2007
20	865.1972	407.074, 287.053, 289.069, 577.132, 125.022, 695.138	C45 H38 O18	Trímero de procianidina tipo B	HMDB; Monagas, Garrido, Lebrón-Aguilar, Bartolomé & Gómez-Cordovés, 2007
21	633.072	300.996, 463.049, 169.012	C27 H22 O18	Galoil-HHDP-glucosa	Gong & Pegg, 2017
22	935.0793	275.017, 633.069, 299.016, 169.011, 783.069	C41 H28 O26	Galoil-di-HHDP-glucosa (casuarictina o isómero)	Boulekbache-Makhlouf <i>et al.</i> , 2010; Barry, Davies & Mohamed, 2001
23	337.0905	175.038, 131.048, 157.027	C16 H18 O8	Desconocido	
25	577.1334	407.074, 289.069, 125.022	C30 H26 O12	Dímero de procianidina tipo B	HMDB; Monagas, Garrido, Lebrón-Aguilar, Bartolomé & Gómez-Cordovés, 2007
26	933.0639	450.990, 300.996, 633.069, 125.020	C41 H26 O26	Castalagina/vescalagina, praecoxina D o isómero	Grace, Warlick, Neff & Lila, 2014; Hager, Howard, Liyanage, Lay & Prior, 2008
27	865.1966	407.076, 289.070, 125.022, 577.136, 695.135	C45 H38 O18	Trímero de procianidina tipo B	HMDB; Monagas, Garrido, Lebrón-Aguilar, Bartolomé & Gómez-Cordovés, 2007
30	463.0505	299.994	C20 H16 O13	Hexósido de ácido elágico	Identificación tentativa
33	1103.087	300.995, 633.068, 935.073, 1059.096, 425.010, 125.019	C48 H32 O31	Sanguina H-2 o isómero	Kool, Comeskey, Cooney & McGhie, 2010
34	787.0983	617.074, 169.011, 465.060, 295.040	C34 H28 O22	Tetragaloil-glucosa	HMDB (predicted); Boulekbache-Makhlouf <i>et al.</i> , 2010
35	433.0392	299.988, 271.056	C19 H14 O12	Pentósido de ácido elágico	Identificación tentativa
37	300.9961	185.022, 283.992, 257.007, 229.010	C14 H6 O8	Ácido elágico	base de datos Metlin; Mullen, Yokota, Lean & Crozier, 2003
38	477.0656	315.012, 299.986	C21 H18 O13	Hexósido de metil-ácido elágico	Gong & Pegg, 2017; Robbins, Ma, Wells, Greenspan & Pegg, 2014
39	585.0503	300.997, 415.028, 169.011	C26 H18 O16	Galoil pentósido de ácido elágico	Gong & Pegg, 2017; Robbins, Ma, Wells, Greenspan & Pegg, 2014
40	447.0551	315.011, 299.988	C20 H16 O12	Pentósido de metil-ácido elágico	Gong & Pegg, 2017; Robbins, Ma, Wells, Greenspan & Pegg, 2014
41	315.0128	299.989, 216.000	C15 H8 O8	Metil-ácido elágico	Identificación tentativa
42	599.0656	447.054, 315.011, 169.011	C27 H20 O16	Galoil pentósido de metil-ácido elágico	Gong & Pegg, 2017; Robbins, Ma, wells, Greenspan & Pegg, 2014

HHDP: hexahidroxidifenol

Tabla IV. Confirmación de la identificación tentativa de compuestos fenólicos en extractos de nuez pecana, por comparación de sus patrones de fragmentación en modo negativa con el de bases de datos de espectros de masas (Metlin integrada al software MassHunter PCDL Manager for Metabolomics B.07.00 [Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA] y The Human Metabolome Database [www.hmdb.ca]) y lo reportado en la literatura científica.

no pudo ser identificado, ya que su patrón de fragmentación no coincidió con el del ácido coumaroilquinico que había sido identificado tentativamente por su masa exacta y distribución isotópica (ver Tabla I).

El compuesto 9 (Rt 0.98, [M-H]- 315.0697) se identificó como un derivado glicosilado del ácido protocatéquico, aunque no presentó el típico fragmento correspondiente a la pérdida del residuo de azúcar (162) para dar un fragmento de m/z 153 ([M-H]- del ácido protocatéquico), los fragmentos con m/z 152 y 108 han sido detectados por Abu-Reidah, Ali-Shtayeh, Jamous, Arráez-Román & Segura-Carretero, (2015) y corresponden también a la pérdida de un hidrógeno adicional, al residuo de azúcar, seguido de la pérdida de un CO₂, característica de los ácidos fenólicos. Algunos hexósidos de ácido protocatéquico han sido reportados en extractos acetónicos de nuez pecana (Gong & Pegg, 2017; Robbins, Ma, Wells, Greenspan & Pegg, 2014).

Dentro de los flavan-3-oles, los compuestos 13 y 15 pudieron ser identificados como un hexósido de catequina o epicatequina y como catequina libre, respectivamente. La catequina (Rt 2.59, [M-H]- 289.0692) pudo ser identificada fácilmente por su patrón de fragmentación comparable con el de la base de datos integrada al software, pero para poderla distinguir de su estereoisómero, la epicatequina, fue necesario comparar los Rt de estándares comerciales. En el caso del hexósido, se identificó claramente el fragmento correspondiente a la pérdida del residuo de azúcar (fragmento 289, correspondiente a [M-H]- de catequina o epicatequina), así como otros productos de la fragmentación de la aglicona, aunque no fue posible confirmar de cuál de los dos estereoisómeros se trataba. Los compuestos 18 y 25 (Rt 3.05 y 4.54, [M-H]- 577.1334) corresponden a dímeros de procianidinas tipo B, es decir, dímeros de (epi) catequina unidos entre sí mediante un solo enlace interflavan; mientras que los compuestos 20 y 27 (Rt 3.85 y 5.12, [M-H]- 865.197) son trímeros. Sus patrones de fragmentación han sido descritos por Monagas, Garrido, Lebrón-Aguilar, Bartolomé & Gómez-Cordovés, (2007): los fragmentos con m/z 695 en trímeros y 407 en dímeros y trímeros son producto de la fragmentación retro-Diels-Adler seguida de la eliminación de una molécula de agua; los fragmentos con m/z 289 en dímeros y trímeros y m/z 287 y 577 en trímeros corresponden a la ruptura del enlace interflavan por un mecanismo quinonametino (Monagas, Garrido, Lebrón-Aguilar, Bartolomé & Gómez-Cordovés, 2007). Todos estos flavan-3-oles ya han sido reportados en extractos acetónicos de nuez pecana y en el presente trabajo mostramos también su presencia en el extracto etanólico; también se identificaron otros flavan-3-oles oligoméricos como un tetrámero de procianidina B (Rt 4.54, [M-H]- 1153.262) y un trímero de prodelfinidina B (Rt 2.75, [M-H]- 881.1917) que si bien no pudieron ser confirmados por su patrón de fragmentación, también han sido descritos como componentes importantes de la nuez pecana por varios

autores (Álvarez-Parrilla, Urrea-López & de la Rosa, 2018).

Los compuestos 6 y 34 se identificaron como galotaninos, estructuras formadas por uno o más residuos galoilo unidos a un núcleo de glucosa. El compuesto 6 (Rt 0.86, [M-H]- 331.0647) fue identificado como un monogaloilo glucosa (Figura 1) por su [M-H]- y la presencia de fragmentos correspondientes a la pérdida del residuo de azúcar, para dar la [M-H]- del ácido gálico (m/z 169), seguida de la pérdida de un grupo CO₂ (m/z 125). El compuesto 34 (Rt 5.69, [M-H]- 787.0983) se identificó como un derivado tetragaloilo glucosa con fragmentos característicos de la pérdida de residuos galoilo (152) y galoilo más agua (170), así como la presencia del ion con m/z 169 (Boulekbache-Makhlouf *et al.*, 2010). También el compuesto 28 (trigaloilo glucosa) se identificó como galotanino (trigaloilo glucosa, Rt 5.23, [M-H]- 635.0878) aunque no se obtuvo su patrón de fragmentación. Otros autores han encontrado galotaninos con una y dos unidades de ácido gálico (Álvarez-Parrilla, Urrea-López & de la Rosa, 2018) pero el presente es el primer reporte de las formas tri y tetra galoiladas. Los galotaninos fueron menos abundantes y diversos que los elagitaninos, que serán descritos a continuación.

Se encontraron 8 derivados glicosilados (donde el carbohidrato puede ser hexosa o pentosa, no necesariamente glucosa), metilados o galoilados del ácido elágico, o combinaciones entre ellos; aunque la identidad de los compuestos 30, 35, y 41 no pudo ser del todo confirmada por su patrón de fragmentación. Los compuestos 30 (Rt 5.46, [M-H]- 463.0505) y 35 (Rt 6.04, [M-H]- 433.0392) fueron identificados tentativamente como un hexósido y pentósido de ácido elágico, respectivamente; ambos han sido descritos en nuez pecana (Gong & Pegg, 2017; Robbins, Ma, Wells, Greenspan & Pegg, 2014) sin embargo, su fragmento característico tiene una m/z de 301, correspondiente a la pérdida de la hexosa (162) o pentosa (132). En el presente trabajo el fragmento liberado (m/z 300) correspondería a la pérdida del carbohidrato seguido de un átomo de hidrógeno adicional (163 y 133, respectivamente). Otros trabajos han identificado un fragmento similar (m/z 300) como producto de hexósidos y pentósidos de ácido elágico (Sandhu & Gu, 2010); sin embargo, esta información no es suficiente para confirmar la identidad, ya que en nuestros resultados no se observó la presencia de fragmentos característicos del ácido elágico, como son los de m/z 257 y 229 (Mullen, Yokota, Lean & Crozier, 2003). De manera similar, el compuesto 41 (Rt 7.3, [M-H]- 315.0128) puede ser identificado tentativamente como metil-ácido elágico, también descrito previamente en nuez pecana (de la Rosa, Álvarez-Parrilla & Shahidi, 2011), y el fragmento de m/z 300 (299.989 masa exacta), correspondiente a la pérdida del grupo metilo (15), puede considerarse un buen indicador de la identidad del compuesto. Sin embargo, de nuevo, no existen fragmentos característicos del ácido elágico y no se encontraron reportes

del patrón de fragmentación del metil ácido elágico, por lo que consideramos que no se cuenta con información suficiente para confirmar su identificación. Por otro lado, el compuesto 37 (Rt 6.27) presentó una [M-H]⁻ de 300.9961 y fragmentos característicos del ácido elágico (incluyendo los de m/z 257 y 229), por lo que pudo ser identificado con certeza. Los compuestos 38 (Rt 6.84, [M-H]⁻ 477.0656) y 40 (Rt 7.07, [M-H]⁻ 447.0551) fueron identificados como derivados glicosilados del metil ácido elágico, hexósido y pentósido, respectivamente. Su identidad pudo ser confirmada por la presencia, en ambos casos, de fragmentos correspondientes a la pérdida del carbohidrato (m/z 315) y a la pérdida del carbohidrato y el grupo metilo (m/z 300). Los compuestos 39 (Rt 6.96, [M-H]⁻ 585.0503) y 42 (Rt 7.54, [M-H]⁻ 599.0656) fueron identificados como galoil pentósidos de ácido elágico y de metil ácido elágico, respectivamente. En ambos casos se observaron fragmentos correspondientes a la pérdida del residuo galoil-pentosa (284), para quedar m/z de 301 para el compuesto 39 y el 315 para el compuesto 42, coincidiendo con lo reportado en la literatura por (Gong & Pegg, 2017; Robbins, Ma, Wells, Greenspan & Pegg, 2014). También se observó en ambos la liberación de ácido gálico (fragmentos con m/z 169), en el compuesto 42 la pérdida de un residuo galoilo (fragmento con m/z 447) y en el compuesto 39 la de un residuo galoilo con una molécula de agua (fragmento con m/z 415). Todos los derivados de ácido elágico encontrados en el presente trabajo ya han sido reportados en nuez pecana (Álvarez-Parrilla, Urrea-López & de la Rosa, 2018).

Finalmente, se encontraron 6 elagitaninos, cuya característica principal es la presencia de grupos HHDP. Cuando el HHDP es liberado por hidrólisis se lactoniza para dar lugar al ácido elágico, que puede ser cuantificado como producto de la hidrólisis de elagitaninos (Gong & Pegg, 2017; Lee, Johnson & Talcott, 2005). Los compuestos 14 y 17 (Rt 2.01 y 2.93, [M-H]⁻ 783.068) fueron identificados como isómeros de di-HHDP-hexosa, probablemente pedunculagina, de acuerdo a su patrón de fragmentación (Boulekbache-Makhlouf *et al.*, 2010). En ambos se observaron los mismos fragmentos: el de m/z 301 (300.996) que corresponde a la liberación de ácido elágico por la pérdida de un grupo HHDP-glucosa (482) y el de m/z 481 que corresponde a la pérdida de un grupo HHD qu P (302). También se observó un fragmento de m/z 275, sin embargo no se encontró el que corresponde a la pérdida de una molécula de agua, característico de elagitaninos con enlace C-glicosídico en los que la molécula de glucosa se encuentra en conformación abierta (Boulekbache-Makhlouf *et al.*, 2010; Barry, Davies & Mohamed, 2001), por lo que se considera probable que estos compuestos correspondan a dos anómeros de la pedunculagina u otras formas de di-HHDP-hexosa con enlace O-glicosídico. No existen reportes previos de este compuesto en extractos de nuez pecana. El compuesto 21, (Rt 3.85, [M-H]⁻ 633.072) correspondió al galoil-HHDP-glucosa, que había sido identificado por Gong & Pegg (2017) en nuez

pecana, por la presencia de fragmentos correspondientes a la pérdida del residuo galoilo más agua (fragmento con m/z 463) y a la liberación de ácido elágico (fragmento con m/z 301 [masa exacta de 300.996]); en el presente análisis también se pudo observar un fragmento correspondiente a la liberación de ácido gálico (m/z 169). Cabe mencionar que se identificaron por su masa exacta y distribución isotópica otros dos isómeros de galoil-HHDP-glucosa (compuestos 7, Rt 0.98 y 12, Rt 1.67).

El compuesto 22 (Rt 4.2) presentó una [M-H]⁻ de 935.0793 con un fragmento de m/z 633 correspondiente a la pérdida de un residuo HHDP-glucosa, así como uno de m/z 783 por la pérdida de un residuo galoilo. Se presentaron también otros fragmentos (m/z 275 y m/z 169, similares a los encontrados en galotaninos antes descritos) pero ninguno correspondiente a la pérdida de una molécula de agua, lo que sugiere que este compuesto es un isómero de casuarictina, es decir un galoil-di-HHDP-glucosa con conformación cerrada de la glucosa (Boulekbache-Makhlouf *et al.*, 2010; Barry, Davies & Mohamed, 2001). Este compuesto mostró un isómero con Rt de 3.39 (compuesto 19, Tabla I). El compuesto 26 (Rt 4.89) mostró una [M-H]⁻ de 933.0639, dos unidades menor que el compuesto 22 (galoil-di-HHDP-glucosa), lo que indica la formación de un enlace por oxidación entre el grupo galoil y un grupo HHDP adyacente (Barry, Davies & Mohamed, 2001). Este tipo de estructura puede corresponder a elagitaninos como castalagina/vescalagina o praecoxina-D, aunque el patrón de fragmentación y la literatura disponible no permiten distinguirlo con certeza. Sin embargo, si es posible aseverar que se trata de alguno de estos taninos, ya que muestra fragmentos como el de m/z 451 (450.99) que corresponde a la liberación de un residuo trigaloilo y el de m/z 301 (300.996) correspondiente a la liberación de ácido elágico; estos fragmentos han sido descritos por Hager, Howard, Liyanage, Lay & Prior, (2008), quien identificó castalagina/vescalagina mediante HPLC-MS/MS en extractos de zarzamoras (*Rubus sp.*), y por Grace, Warlick, Neff & Lila, (2014), quien aisló y caracterizó la fragmentación de praecoxina D a partir de extractos de nuez de Castilla (*Juglans regia*). Por último, el compuesto 33 (Rt 5.6-5.69, [M-H]⁻ 1103.087) se identificó como sanguina H-2 de acuerdo a la comparación de su patrón de fragmentación con el descrito por Kool, Comeskey, Cooney & McGhie, (2010), quien aisló y caracterizó a este compuesto a partir de extractos de zarzamora de la especie *Rubus loganbaccus x baileyanus*, observando fragmentos de m/z 1059, 935 y 633, los mismos que fueron detectados en el presente estudio. Una búsqueda bibliográfica exhaustiva nos indicó que este es el primer estudio que reporta la presencia de elagitaninos como casuarictina, castalagina/vescalagina, praecoxina D o sanguina H-2 en nuez pecana. Los compuestos más abundantes en el extracto acetónico de nuez pecana fueron el pentósido de ácido elágico (solo identificación tentativa), el dímero de procianidina B con Rt 4.54 y el galoil-

HHDP-glucosa con Rt 3.85. En el extracto etanólico también fue más abundante el pentósido de ácido elágico, seguido por monogaloil glucosa y catequina libre.

CONCLUSIONES

Este estudio permitió demostrar que el perfil polifenólico de la almendra y nuez pecana es claramente diferente, dominando en la primera flavonoides y en la segunda taninos condensados e hidrolizables (sobre todo elagitaninos). Se describió por primera vez la presencia de elagitaninos como casuarictina, castalagina/vescalagina, praecoxina D o sanguina H-2 en nuez pecana. Por otro lado, se demostró también que los extractos etanólicos muestran una riqueza, en cantidad y diversidad, de CF similar al de los extractos acetónicos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a CONACYT por el financiamiento otorgado al proyecto CB-2016-286449, así como a la UACJ y al CIATEJ por las facilidades otorgadas para la realización de una estancia sabática de Laura A. de la Rosa y Emilio Álvarez-Parrilla. A Víctor M. Alcantar Rosales del CIATEJ por su valioso apoyo para realizar el análisis de las muestras en el HPLC-QTOF. A Jasmin C. Stevens Barrón y Gaspar A. Torres Aguirre por su apoyo en la obtención de los extractos.

REFERENCIAS

- Abu-Reidah, I.M., (2013). Characterization of phenolic compounds in highly-consumed vegetable matrix by using advanced analytical techniques (Caracterización de compuestos fenólicos en matrices vegetales mediante técnicas analíticas avanzadas). *Doctoral thesis*, Granada: Editorial de la Universidad de Granada.
- Abu-Reidah, I. M., Ali-Shtayeh, M. S., Jamous, R. M., Arráez-Román, D. & Antonio Segura-Carretero, A. (2015). HPLC–DAD–ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. *Food Chem.*, **166**, 179–191. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.06.011
- Alasalvar, C. & Shahidi, F. (2008). *Tree nuts: Composition, phytochemicals, and health effects*. Boca Raton: CRC Press.
- Álvarez-Parrilla, E., Urrea-López, R. & de la Rosa, L. A. (2018). Bioactive components and health effects of pecan nuts and their by-products: a review. *J. Food Bioact.*, **1**, 56-92. DOI: 10.31665/JFB.2018.1127
- Aune, D., Keum, N., Giovannucci, E., Fadnes, L. T., Boffetta, P., Greenwood, D. C., Tonstad, S., Vatten, L. J., Riboli, E. & Norat, T. (2016). Nut consumption and risk of cardiovascular disease, total cancer, all-cause and cause specific mortality: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMC Medicine*, **14:207**, 1-14. DOI: 10.1186/s12916-016-0730-3
- Barry, K. M., Davies, N. W. & Mohamed, C. L. (2001). Identification of hydrolysable tannins in the reaction zone of *Eucalyptus nitens* wood by High Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionisation Mass Spectrometry. *Phytochem. Anal.*, **12**, 120–127. DOI: 10.1002/pca.548
- Boulekbache-Makhlouf, L., Meudec, E., Chibane, M., Mazaruic, J. -P., Slimani, S., Henry, M., Cheynier, V. & Madani, K. (2010). Analysis by High-Performance Liquid Chromatography Diode Array Detection Mass Spectrometry of phenolic compounds in fruit of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria. *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 12615–12624. DOI: 10.1021/jf1029509
- Chang, S. K., Alasalvar, C., Bolling, B. W. & Shahidi, F. (2016). Nuts and their co-products: The impact of processing (roasting) on phenolics, bioavailability, and health benefits – A comprehensive review. *J. Funct. Foods*, **26**, 88–122. DOI: 10.1016/j.jff.2016.06.029
- de la Rosa, L. A., Álvarez-Parrilla, E. & Shahidi, F. (2011). Phenolic compounds and antioxidant activity of kernels and shells of mexican pecan (*Carya illinoensis*). *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 152-162. DOI: 10.1021/jf1034306
- Fabre, N., Rustan, I., Hoffmann, E. & Quetin-Leclercq, J. (2001). Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **12**, 707-715. DOI: 10.1016/S1044-0305(01)00226-4
- Gong, Y. & Pegg, R. B. (2017). Separation of ellagitannin-rich phenolics from U.S. pecans and chinese hickory nuts using Fused-Core HPLC columns and their characterization. *J. Agric. Food Chem.*, **65**, 5810–5820. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b01597
- Grace, M. H., Warlick, C. C., Neff, S. A. & Lila, M. A. (2014). Efficient preparative isolation and identification of walnut bioactive components using high-speed counter-current chromatography and LC-ESI-IT-TOF-MS. *Food Chem.*, **158**, 229–238. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.02.117
- Hager, T. J., Howard, L. R., Liyanage, R., Lay, J. O. & Prior, R. L. (2008). Ellagitannin composition of blackberry as determined by HPLC-ESI-MS and MALDI-TOF-MS. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 661–669. DOI: 10.1021/jf071990b
- Justesen, U. (2000). Negative atmospheric pressure chemical ionisation low-energy collision activation mass spectrometry for the characterisation of flavonoids in extracts of fresh herbs. *J. Chromatogr. A.*, **902**, 369-379. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00861-X
- Kool, M. M., Comeskey, D. J., Cooney, J. M. & McGhie, T. K. (2010). Structural identification of the main ellagitannins of a boysenberry (*Rubus loganbaccus* x *baileyanus* Britt.) extract by LC–ESI-MS/MS, MALDI-TOF-MS and NMR spectroscopy. *Food Chem.*, **119**, 1535–1543. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.09.039
- Lamuel-Raventos, R. M. & St. Onge, M. -P. (2017). Prebiotic nut compounds and human microbiota.

- Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **57**, 3154–3163. DOI: 10.1080/10408398.2015.1096763
- Lee, J. -H., Johnson, O. V. & Talcott, S. T. (2005). Identification of ellagic acid conjugates and other polyphenolics in muscadine grapes by HPLC-ESI-MS. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 6003-6010. DOI: 10.1021/jf050468r
- Monagas, M., Garrido, I., Lebrón-Aguilar, R., Bartolomé, B. & Gómez-Cordovés, C. (2007). Almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) skins as a potential source of bioactive polyphenols. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 8498-8507. DOI: 10.1021/jf071780z
- Moqbel, H., Hawary, S. S. E. D. E., Sokkar, N. M., El-Naggar, E. M. B., Boghdady, N. E. & Halawany, A. M. E. (2018). HPLC-ESI-MS/MS characterization of phenolics in *Prunus amygdalus*, cultivar “umm alfahm” and its antioxidant and hepatoprotective activity. *J. Food Meas. Charact.*, **12**, 808-819. DOI: 10.1007/s11694-017-9695-5
- Motilva, M. -J., Serra, A. & Macià, A. (2013). Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: An overview. *J. Chromatogr. A.*, **1292**, 66-82. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.01.012
- Mullen, W., Yokota, T., Lean, M. E. J. & Crozier, A. (2003). Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC-MSⁿ. *Phytochem.*, **64**, 617–624. DOI: 10.1016/S0031-9422(03)00281-4
- Robbins, K. S., Ma, Y., Wells, M. L., Greenspan, P. & Pegg, R. B. (2014). Separation and characterization of phenolic compounds from U.S. pecans by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 4332–4341. DOI: 10.1021/jf500909h
- Sandhu, A. K. & Gu, L. (2010). Antioxidant capacity, phenolic content, and profiling of phenolic compounds in the seeds, skin, and pulp of *Vitis rotundifolia* (*Muscadine grapes*) as determined by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 4681–4692. DOI: 10.1021/jf904211q
- Sauceda, A. E. Q., Sáyago-Ayerdi, S. G., Ayala-Zavala, J. F., Wall-Medrano, A., de la Rosa, L. A., González-Aguilar, G. A. & Álvarez-Parrilla, E. (2018). Biological Actions of Phenolic Compounds. En: Yahia, E. M. (Ed.) *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health* (pp. 286–307). Hoboken: John Wiley and Sons Ltd.
- Torres-Aguirre, G. A., Muñoz-Bernal, O. A., Álvarez-Parrilla, E., Núñez-Gastélum, J. A., Wall-Medrano, A., Sáyago-Ayerdi, S. G. & de la Rosa, L. A. (2018). Optimización de la extracción e identificación de compuestos polifenólicos en anís (*Pimpinella anisum*), clavo (*Syzygium aromaticum*) y cilantro (*Coriandrum sativum*) mediante HPLC acoplado a espectrometría de masas. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, **21**, 103-115. DOI: 10.22201/fesz.23958723e.2018.2.4