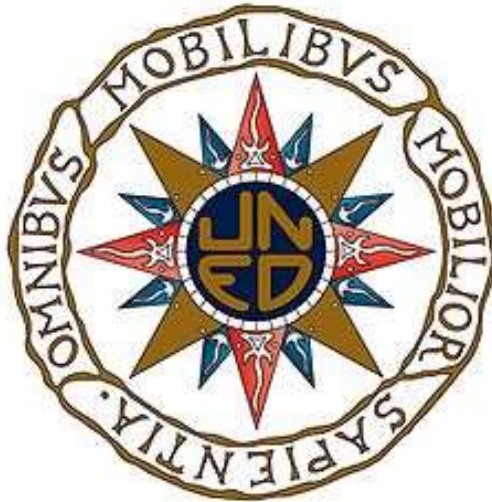


TESIS DOCTORAL

2021



**ESTRATEGIAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE
FLAVAN-3-OLEOS Y SUS PRINCIPALES CATABOLITOS EN
DIFERENTES MATRICES**

MARCO-ANTONIO MORA-GRANADOS GARCÍA

Licenciado en Ciencias Químicas

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS

Directores:

Dra. Alejandrina Gallego Picó

Dr. David González Gómez

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS ANALÍTICAS

FACULTAD DE CIENCIAS



TESIS DOCTORAL

**ESTRATEGIAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE
FLAVAN-3-OLEOS Y SUS PRINCIPALES CATABOLITOS EN
DIFERENTES MATRICES**

MARCO-ANTONIO MORA-GRANADOS GARCÍA

Directores:

Dra. Alejandrina Gallego Picó

Dr. David González Gómez

ESTRATEGIAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE FLAVAN-3-OLEOS Y SUS PRINCIPALES CATABOLITOS EN DIFERENTES MATRICES

Memoria de Investigación para optar al Grado de Doctor MARCO-ANTONIO MORA-GRANADOS GARCÍA

Directora del trabajo:

Dra. Alejandrina Gallego Picó

Dpto. Ciencias Químicas

Facultad de Ciencias

Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED)

Codirector del trabajo:

Dr. David González Gómez

Dpto. Didáctica de las Ciencias Experimentales y Educación

Matemática

Facultad de Educación

Universidad de Extremadura (UNEX)

Tutora del trabajo:

Dra. Gema Paniagua González

Dpto. Ciencias Químicas

Facultad de Ciencias

Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED)

AGRADECIMIENTOS

Una vez finalizado este proyecto que comenzó siendo un sueño, deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mis Directores de Tesis, Dra. Alejandrina Gallego Picó y Dr. David González Gómez, por la ayuda y apoyo prestados, por su esfuerzo y trabajo constante para el buen desarrollo de esta Tesis Doctoral, introduciéndome en el mundo de la investigación, siempre pendientes con pasión por el trabajo bien hecho, grandes profesionales y personas, y para siempre amigos.

Quiero agradecer a los profesores de la Universidad Nacional de Educación a Distancia, Dr. Jesús Senén Durand Alegría, Dra. Rosa María Garcinuño Martínez y Dra. Pilar Fernández Hernando, por estar siempre ahí, pendientes y disponibles para echarme una mano, ayudándome siempre que lo he necesitado. Al Dr. Angel Maroto Valiente, por su ayuda, tiempo y explicaciones, en los ensayos BET y SEM.

También tengo que agradecer de manera especial a dos profesores, que han trabajado conmigo de manera más estrecha, Dr. Agustín González Crevillén, por su ayuda tiempo y dedicación en la parte electroquímica de esta Tesis y a la Dra. Gema Paniagua González, por su ayuda ante cualquier problema o dificultad, la cual como tutora de este proyecto, ha sido infinita, mostrándome y ayudándome en el manejo de diferentes equipos de laboratorio. Al Dr. Jin Su Jeong, por sus consejos y colaboración.

También me gustaría agradecer a los compañeros de laboratorio con los que he tenido el placer de coincidir, Montse, Ana, Edu, Vanesa, Raquel, Lorena, y Aitor, por los gratos momentos y por su apoyo y ánimo en los duros e interminables días de trabajo.

También tengo que agradecer su aportación a Ana María Silva Sánchez-Bayuela, o más en concreto a su hijo (Noah Hurtado Silva), por cedermme sus muestras de orina y a mi prima Virginia Lumbreras García, enfermera de profesión y que ha colaborado en la recolecta de musestras de orina de diferentes individuos. A Estefanía Fernández Bartolomé y a Mónica Bartolomé Jiménez, por su ayuda con los detalles de las gráficas isotermas.

A todos los compañeros y amigos que he ido conociendo a lo largo de mi estancia en el Departamento de Tecnología Química y Energética, Tecnología Química y Ambiental y Tecnología Mecánica y Química Analítica de la Universidad Rey Juan Carlos de Madrid, especialmente a las profesoras Dra. Isabel Sierra Alonso y Dra. Judith Gañán Aceituno.

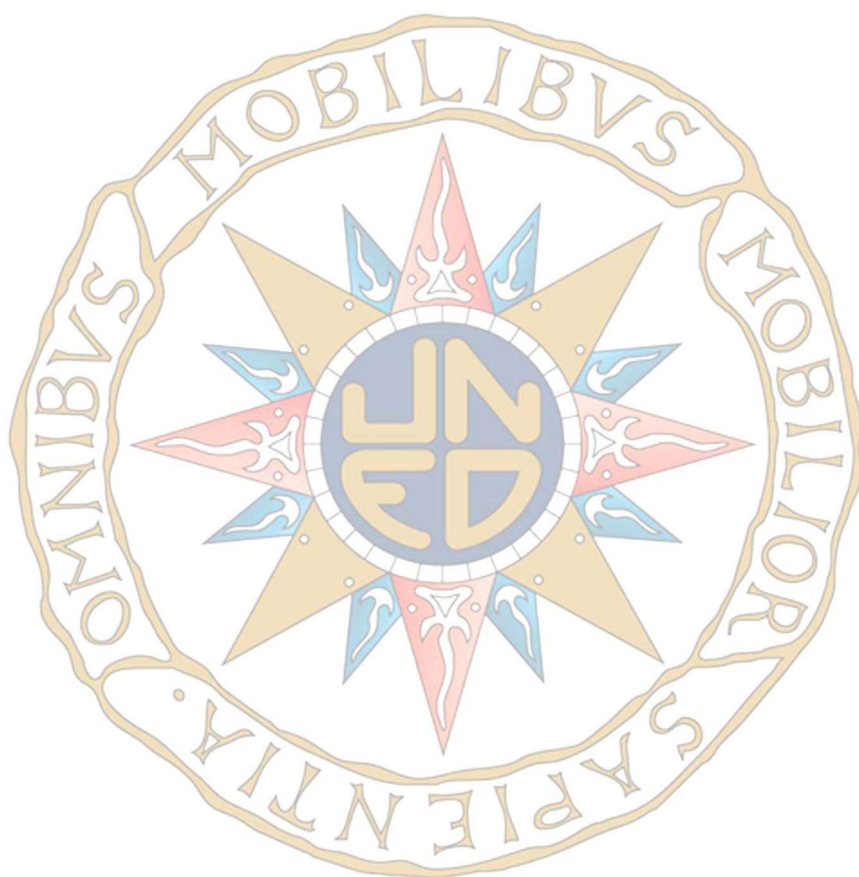
Quiero terminar estos agradecimientos de manera muy especial mencionando a las personas más importantes en mi vida y que siempre han estado conmigo, me han animado y querido, mis amigos y mi familia, sobre todo mis padres (Antonio y Custodia) y mis suegros (Antonio y Matilde), por la comprensión y apoyo que siempre han demostrado. Y, por último, a mi mujer Miriam y a mis dos hijas Daniella y Martina, por hacer que cada día sea más feliz y haber llenado mi vida con su presencia. Os quiero mucho mis princesas.

De modo muy especial a todos os guardo y os guardaré siempre en mi corazón por la ayuda prestada, no habría sido posible sin vosotros.

Mil gracias por todo.

*En la noche que me envuelve,
negra, como un pozo insondable,
doy gracias al Dios que fuere
por mi alma inconquistable.
En las garras de las circunstancias
no he gemido ni llorado.
Sometido a los golpes del destino
mi cabeza ensangrentada jamás se ha postrado.
Más allá de este lugar de ira y llantos
acecha la oscuridad con su horror.
Y sin embargo la amenaza de los años
me halla, y me hallará, sin temor.
No importa cuán estrecho haya sido el camino,
ni cuantos castigos lleve a mi espalda:
soy el amo de mi destino,
soy el capitán de mi alma.*

William Ernest Henley



ÍNDICE

ÍNDICE	I
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS	VI
LISTA DE TABLAS	XVIII
LISTA DE FIGURAS	XXIII
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. COMPUESTOS POLIFENÓLICOS	3
1.1.1. Clasificación de los compuestos polifenólicos	4
1.1.2. Compuestos fenólicos flavonoides y no flavonoides	7
1.1.3. Compuestos polifenólicos en alimentos, actividad biológica y efectos en la salud	9
1.1.4. Biodisponibilidad y metabolismo de los compuestos polifenólicos	20
1.2. FLAVONOIDES	24
1.2.1. Estructura química	25
1.2.2. Biosíntesis de flavonoides	26
1.2.3. Clasificación y principales fuentes naturales	30
1.2.4. Actividad biológica de los flavonoides	39
1.2.5. Propiedades antioxidantes de los flavonoides	41
1.2.6. Farmacocinética y biodisponibilidad	45
1.2.7. Aplicaciones de los flavonoides	46
1.2.8. Biomarcadores de los compuestos fenólicos	47
CAPÍTULO 2. FLAVAN-3-OLES Y SUS METABOLITOS	51
2.1. INTRODUCCIÓN	53
2.2. FLAVAN-3-OLES	55
2.2.1. Estructura	56
2.2.2. Fuentes dietéticas	59
2.3. METABOLITOS	61
2.3.1. Biodisponibilidad de flavan-3-oles y sus metabolitos	66
2.3.2. Acciones biológicas de los flavan-3-oles y sus metabolitos	74
2.3.3. Efectos en salud de flavan-3-oles y sus metabolitos	76

CAPÍTULO 3. ESTRATEGIAS PARA LA DETERMINACIÓN DE FLAVAN-3-OLES EN MATRICES VEGETALES Y BIOLÓGICAS	81
3.1. INTRODUCCIÓN	83
3.2. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA	86
3.2.1. Materiales adsorbentes	91
3.2.2. Polímeros de impronta molecular (MIP)	95
3.2.3. Aplicaciones de los MIP en la determinación de compuestos fenólicos	120
3.3. TÉCNICAS DE ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y SUS BIOMARCADORES	130
3.3.1. Técnicas espectrofotométricas	131
3.3.2. Técnicas cromatográficas	136
3.3.3. Técnicas electroforéticas	146
3.3.4. Técnicas electroquímicas	146
3.4. TÉCNICAS MULTIVARIANTES	160
3.4.1. Introducción	160
3.4.2. Clasificación de los métodos de calibración	161
3.4.3. Calibración multivariante de primer orden, Método PLS o mínimos cuadrados parciales	172
3.4.4. Calibración multivariante de segundo orden	179
3.5. CONSIDERACIONES Y FUTURAS PERSPECTIVAS	198
CAPÍTULO 4: OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN	201
4.1. OBJETIVOS	203
4.2. PLAN DE TRABAJO Y EXPOSICIÓN	205
PARTE EXPERIMENTAL	209
CAPÍTULO 5: REACTIVOS, MATERIAL, EQUIPOS Y TÉCNICAS	211
5.1. REACTIVOS, MATERIAL Y DISOLUCIONES	213
5.2. EQUIPOS Y PROGRAMAS INFORMÁTICOS	217

CAPÍTULO 6. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE CATABOLITOS DE FLAVAN-3-OLES UTILIZANDO TÉCNICAS MULTIVARIANTES	219
6.1. OBJETIVO DEL ESTUDIO	221
6.2. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES FLUORESCENTES DE DIFERENTES CATABOLITOS DE FLAVAN-3-OLES Y ELECCIÓN DE LOS ANALITOS DE INTERÉS	222
6.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE MEDIDA Y VARIABLES QUÍMICAS	226
6.3.1. Estudio del efecto del pH en la intensidad de la señal	227
6.3.2. Estudio del efecto de la irradiación externa en la intensidad de cada compuesto.	236
6.3.3. Otros estudios de optimización	237
6.4. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS INSTRUMENTALES	243
6.4.1. Optimización de las condiciones experimentales para la determinación simultánea de los catabolitos. Determinación en muestras sintéticas	244
6.4.2. Resultados	246
6.5. DETERMINACIÓN SIMUTÁNEA DE CATABOLITOS DE FLAVAN-3-OLES EN ORINA	258
6.5.1. Estudio individual de cada catabolito en orina	264
6.5.2. Proceso de optimización de mezclas en orina	267
6.5.3. Resultados para muestras en orina	270
6.6. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE ÁCIDO SIRÍNGICO, ÁCIDO 4-HIDROFIFENILACÉTICO Y ÁCIDO 3 HIDROXIFENILACÉTICO MEDIANTE PARAFAC. UTILIZACIÓN DE MATRICES DE EXCITACIÓN Y EMISIÓN	282
6.6.1. Condiciones experimentales	282
6.6.2. Software utilizado	284
6.6.3. Matriz de calibración y set de validación.	285
6.6.4. Análisis de las matrices de excitación-emisión fluorescente	280
6.6.5. Aplicación de PARAFAC al análisis de muestras de orina	292

6.6.6. Selección del número de factores	294
6.6.7. Resultados PARAFAC	296
6.7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	309
CAPÍTULO 7. EXTRACCIÓN SELECTIVA MEDIANTE UN PROCEDIMIENTO MISPE DE CATABOLITOS DE FLAVAN-3- OLES EN MUESTRAS BIOLÓGICAS	313
7.1. OBJETIVO DEL ESTUDIO	315
7.2. ESTRATEGÍA DE SÍNTESIS, ELECCIÓN DE LA PLANTILLA Y ANALITOS ANÁLOGOS	315
7.3. SÍNTESIS DE LOS POLÍMEROS	317
7.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS POLÍMEROS	320
7.4.1. Caracterización morfológica	321
7.4.2. Caracterización química	327
7.4.3. Propiedades adsortivas	332
7.5. MÉTODO CROMATOGRÁFICO	350
7.5.1. Estudios preliminares y optimización del método cromatográfico	351
7.5.2. Condiciones cromatográficas	354
7.6. PROCEDIMIENTO MISPE	358
7.6.1. Preparación de los cartuchos de extracción	360
7.6.2. Optimización del procedimiento MISPE	360
7.7. VALIDACIÓN DEL PROCEDIMIENTO MISPE	368
7.7.1. Estudios de reproducibilidad y repetibilidad	368
7.7.2. Estudios de selectividad	368
7.8. APLICACIÓN DEL PROCEDIMIENTO MISPE A MUESTRAS DE ORINA	370
7.8.1. Preparación de la muestra y estudio de pH	370
7.8.2. Resultados y discusión	372
7.9. CONCLUSIONES	376

CAPÍTULO 8. DESARROLLO DE UN SENSOR ELECTROQUÍMICO COBINADO CON UN PROCEDIMIENTO MISPE PARA LA DETECCIÓN DE CATABOLITOS DE FLAVAN-3-OLES EN MUESTRAS BIOLÓGICAS	379
8.1. OBJETIVOS DEL ESTUDIO	381
8.2. ESTUDIO DE LA ELECTROACTIVIDAD DE LOS ANALITOS DE INTERÉS	383
8.3. PREPARACIÓN DE LOS ELECTRODOS SPCE	388
8.3.1. Activación de los electrodos SPCE	388
8.3.2. Modificación del electrodo SPCE con óxido de grafeno	390
8.4. PROCEDIMIENTO MISPE	393
8.5. AdDPV. OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES ELECTROQUÍMICAS	394
8.5.1. Optimización del pH	394
8.5.2. Optimización del volumen de muestra	396
8.6. ESTUDIO DE LINEALIDAD DE MEZCLAS SINTÉTICAS	397
8.7. APLICACIÓN DE ERGO-SPCE A LA DETECCIÓN DE LOS CATABOLITOS EN ORINA	399
8.8. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS	401
8.8.1. El ácido úrico como interferente	401
8.8.2. Ácido úrico y procedimiento MISPE-AdDPV	403
8.9. VALIDACIÓN DEL PROCEDIMIENTO MISPE-AdDPV EN MUESTRAS DE ORINA	404
8.9.1. Estudio de linealidad	404
8.9.2. Estudios de recuperación	408
8.9.3. Estudio comparativo entre métodos	411
8.10. CONCLUSIONES	413
CAPÍTULO 9. CONCLUSIONES GENERALES	415
BIBLIOGRAFÍA	423
PUBLICACIONES	509

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS

- **2D** Bidimensional (*Two-dimensional*)
- **2HBA** Ácido 2-hidroxibenzoico (*2-hydroxybenzoic acid*)
- **2-AcOBA** Ácido 2-acetoxibenzoico (*2-acetoxybenzoic acid*)
- **2,4-DHBA** Ácido 2,4-dihidroxibenzoico (*2,4-dihydroxybenzoic acid*)
- **3-HBA** Ácido 3-hidroxibenzoico (*3-hydroxybenzoic acid*)
- **3,4-DHBA** Ácido 3,4-dihidroxibenzoico (*3,4-dihydroxybenzoic acid*)
- **3-HPA** Ácido 3-hidroxifenilacético (*3-hydroxyphenylacetic acid*)
- **4CL** 4-cumaroil-CoA-ligasa (*4-coumaroyl-CoA-ligase*)
- **4-HBA** Ácido 4-hidroxibenzoico (*4-hydroxybenzoic acid*)
- **4-HBAD** Ácido 4-hidroxibenzaldehído (*4-hydroxybenzaldehyde acid*)
- **4-HPA** Ácido 4-hidroxifenilacético (*4-hydroxyphenylacetic acid*)
- **4-HPPA** Ácido 4-hidroxifenilpropiónico (*4-hydroxyphenyl-propionic acid*)
- **4-MHA** Ácido 4-metilhipúrico (*4-methylhippuric acid*)
- **4-ABA** Ácido 4-aminobenzoico (*4-aminobenzoic acid*)
- **4-NBA** Ácido 4-nitrobenzoico (*4-nitrobenzoic acid*)
- **4-Vpy** 4-vinilpiridina (*4-vinylpyridine*)
- **ABCVA** Ácido 4,4'-azobis cianovalérico (*4,4'-azobis cyanovaleric acid*)
- **ABDV** Azo-bis-dimetilvaleronitrilo (*Azo-bis-dimethylvaleronitrile*)
- **ABTS** 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (*2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)*)
- **ACC** Acetil-CoA-carboxilasa (*Acetyl-CoA-carboxylase*)
- **ACE** Espectativa condicional alterna (*Alternating conditional expectations*)
- **AcH** Ácido acético glacial (*Glacial acetic acid*)
- **ACN** Acetonitrilo (*Acetonitrile*)
- **ADN** Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)
- **ADP** Adenosín difosfato (*Adenosine diphosphate*)

-
- **AdDPV** Voltametría diferencial de pulsos de redisolución adsortiva (*Adsorptive transfer differential pulse voltammetry*)
 - **AdSV** Voltamperometría de redisolución adsortiva (*Adsorptive redissolution voltammetry*)
 - **AIBN** 2-2-Azo(bis)isobutironitrilo (*2-2-Azo (bis)isobutyronitrile*)
 - **ANN** Redes neuronales artificiales (*Artificial neural networks*)
 - **ANR** Antocianidina reductasa (*Anthocyanidin reductase*)
 - **AOA** Análisis de la actividad antioxidante (*Analysis antioxidant activity*)
 - **APTLD** Descomposición trilineal alterna penalizada (*Alternating penalty trilinear decomposition*)
 - **AQLD** Algoritmo de descomposición cuadrilínea alterna (*Alternating quadrilinear decomposition*)
 - **ASN** Antocianidina sintetasa (*Anthocyanidin synthase*)
 - **ATLD** Descomposición trilineal alterna (*Alternating trilinear decomposition*)
 - **ATP** Adenosín trifosfato (*Adenosine triphosphate*)
 - **ATR** Reflectancia total atenuada (*Attenuated total reflectance*)
 - **BA** Ácido benzoico (*Benzoic acid*)
 - **BET** Absorción de gases (Brunauer-Emmett-Teller)
 - **BLLS** Mínimos cuadrados bilineales (*Bilinear least squares*)
 - **C4H** Cinamato-4-hidroxilasa (*Cinnamate-4-hydroxylase*)
 - **CA** Ácido cafeico (*Caffeic acid*)
 - **CAD** Detector de aerosol cargado (*Charged aerosol detector*)
 - **CANDECOMP** Descomposición canónica (*Canonical decomposition*)
 - **CAPE** Éster fenetílico del ácido cafeico (*Phenethyl ester of caffeic acid*)
 - **CC** Concentración calculada (*Calculated concentration*)
 - **CCC** Cromatografía a contracorriente (*Counter current chromatography*)
 - **CE** Electroforesis capilar (*Capillary electrophoresis*)

- **CEC** Electro cromatografía capilar (*Capillary electrochromatography*)
- **CGA** Ácido clorogénico (*Chlorogenic acid*)
- **CGE** Electroforesis capilar en gel (*Capillary gel electrophoresis*)
- **CHI** Chalcona isomerasa (*Chalcone isomerase*)
- **CHS** Chalcona sintasa (*Chalcone synthase*)
- **CLS** Análisis multicomponente clásico (*Classical least squares*)
- **CMC** Concentración micelar crítica (*Critical micellar concentration*)
- **CoA** Coenzima A (*Coenzyme A*)
- **COMT** Catecol-O-metil-transferasa (*Catechol-O-methyltransferase*)
- **CONCORDIA** Diagnóstico de la consistencia del modelo (*Core consistency diagnostic*)
- **COW** Deformación optimizada por correlación (*Correlation optimized warping*)
- **CSP** Fases estacionarias quirales (*Chiral stationary phases*)
- **CT** Concentración teórica (*Theoretical concentration*)
- **CV** Voltametría cíclica (*Cyclic voltammetry*)
- **CVD** Enfermedad cardiovascular (*Cardiovascular disease*)
- **CXLE** Extracción líquida con dióxido de carbono (*Liquid extraction expanded carbon dioxide*)
- **CZE** Electroforesis capilar de zona (*Capillary zone electrophoresis*)
- **DAD** Detector de diodos en serie (*Diode array detector*)
- **DCPA** Amperometría catódica (DC potential amperometry)
- **DE** Detección electroquímica (*Electrochemical detection*)
- **DEAE** Dietilaminoetilo (*Diethylaminoethyl*)
- **DFR** Dihidroflavonol reductasa (*Dihydroflavonol reductase*)
- **DMPD** N, N'-dimetil-p-fenilendiamina (*N, N'-dimethyl-p-phenylenediamine*)
- **DMSO** Dimetilsulfóxido (*Dimethylsulfoxide*)

-
- **DPPH** 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*)
 - **DPV** Voltamperometría de pulso diferenciado (*Differential pulse voltammetric*)
 - **dSPE** Extracción en fase sólida dispersiva (*Dispersive solid phase extraction*)
 - **d-MSPE** Microextracción en fase sólida dispersiva (*Dispersive solid phase microextraction*)
 - **DTLD** Descomposición trilineal directa (*Direct trilinear decomposition*)
 - **DVB80** Divinilbenceno (*Divinylbenzene*)
 - **EC** Epicatequina (*Epicatechin*)
 - **ECD** Detector de captura de electrones (*Electron capture detector*)
 - **ECG** Epicatequina-3-galato (*Epicatechin-3-gallate*)
 - **EEMs** Matrices de excitación-emisión (*Excitation-emission matrices*)
 - **EGC** Epigallocatequina (*Epigallocatechin*)
 - **EGCG** Epigallocatequina-3-galato (*Epigallocatechin-3-gallate*)
 - **EGDMA** Etilenglicol dimetacrilato (*Ethylene glycol dimethacrylate*)
 - **ELISA** Inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)
 - **EM** Microscopía electrónica (*Electron microscopy*)
 - **ERGO** Óxido de grafeno electroquímicamente reducido (*Electrochemically reduced graphene oxide*)
 - **ESI** Ionización por electrospray (*Electrospray ionization*)
 - **ET** Transferencia de electrones (*Electron transfer*)
 - **F3H** Flavanona 3- β -hidroxilasa (*Flavanone 3- β -hydroxylase*)
 - **F3'H** Flavonoide 3'-hidroxilasa (*Flavonoid 3'-hydroxylase*)
 - **F3'5'H** Flavonoide 3', 5'-hidroxilasa (*Flavonoid 3', 5'-hydroxylase*)
 - **FA** Ácido ferúlico (*Ferulic acid*)
 - **FC** Folin-Ciocalteu

- **FD** Detector de fluorescencia (*Fluorescence detector*)
- **FGT** Flavonoide glucosil-transferasa (*Flavonoid glucosyl-transferase*)
- **FIA** Análisis por inyección de flujo (*Flow injection análisis*)
- **FID** Detector de ionización de llama (*Flame ionization detector*)
- **FIR** Espectroscopía de infrarrojo lejano (*Far infrared spectroscopy*)
- **FL** Fluorescencia (*Fluorescence*)
- **FLS** Flavonol sintetasa (*Flavonol synthetase*)
- **FRAP** Capacidad antioxidante para reducir ion férrico (*Ferric ion reducing antioxidant*)
- **FSI/II** Enzimas flavanonas sintetetas (*Flavanones synthetases*)
- **FT** Transformada de Fourier (*Fourier transform*)
- **FTIR** Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (*Fourier transform infrared spectroscopy*)
- **FU** Unidad de fluorescencia (*Fluorescence unit*)
- **GA** Ácido gálico (*Gallic acid*)
- **GC** Cromatografía de gases (*Gas chromatography*)
- **GCE** Electrodo de carbono vítreo (*Glassy carbon electrode*)
- **GeA** Ácido gentísico (*Gentisic acid*)
- **GO** Óxido de grafeno (*Graphene oxide*)
- **GRAM** Método generalizado de reducción de rango (*Generalized method of range reduction*)
- **H₂O** Agua (*Water*)
- **HA** Ácido hipúrico (*Hippuric acid*)
- **HAT** Transferencia de átomos de hidrógeno (*Hydrogen atom transfer*)
- **HDL** Lipoproteína de alta densidad (*High-density lipoprotein*)
- **HHPE** Extracción con alta presión hidrostática (*High Hydrostatic pressure extraction*)
- **HILIC** Cromatografía de interacción hidrofílica (*Hydrophilic interaction liquid chromatography*)

-
- **HLA** Análisis lineal híbrido (*Híbrid linear analysis*)
 - **HPLC** Cromatografía de líquidos de alta eficacia (*High performance liquid chromatography*)
 - **HPTLC** Cromatografía de capa fina de alta resolución (*High-performance thin-layer chromatography*)
 - **HRGC** Cromatografía de gases de alta resolución (*High-resolution gas chromatography*)
 - **HSCCC** Cromatografía de contracorriente de alta velocidad (*High speed counter current chromatography*)
 - **HT** Alta temperatura (*High temperature*)
 - **HVED** Descargas eléctricas de alto voltaje (*High voltage electrical discharges*)
 - **IF** Factor de impresión (*Impresión factor*)
 - **IFS** Isoflavona sintetasa (*Isoflavone synthetase*)
 - **ILS** Regresión inversa por mínimos cuadrados (*Inverse least squares*)
 - **IMC** Índice de masa corporal
 - **IR** Espectroscopía infrarroja (*Infrared spectroscopy*)
 - **IT** Trampa de iones (*Ion trap*)
 - **IUPAC** Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (*International union of pure and applied chemistry*)
 - **LDL** Lipoproteína de baja densidad (*Low-density lipoprotein*)
 - **LC** Cromatografía de líquidos (*Liquid chromatography*)
 - **LCxLC** Cromatografía líquida multidimensional (*Multidimensional liquid chromatography*)
 - **LLE** Extracción líquido-líquido (*Liquid-liquid extraction*)
 - **LOD** Límite de detección (*Limit of detection*)
 - **LOQ** Límite de cuantificación (*Limit of quantification*)
 - **L-Phe** L-fenilalanina (*L-phenylalanine*)
 - **LS** Mínimos cuadrados (*Least-squares*)
 - **LSV** Voltamperometría de barrido lineal (*Linear sweep voltammetry*)
 - **LTQ-Orbitrap** Analizador de masas híbrido Orbitrap (*Linear trap quadrupole-Orbitrap*)

- **LWR** Regression ponderada local (*Locally weighted regression*)
- **MA** Acrilamida (*Acrylamide*)
- **MAA** Ácido metacrílico (*Methacrylic acid*)
- **MAE** Extracción asistida por microondas (*Microwave assisted extraction*)
- **MARS** Regresión adaptativa multivariante (*Multivariate Adaptive regression splines*)
- **MATLAB** Laboratorio de matrices (*Matrix Laboratory*)
- **MCM** Métodos de calibración multivariable (*Multivariable calibration methods*)
- **MCR-ALS** Resolución multivariada por mínimos cuadrados alternantes (*Multivariate resolution of alternating least squares*)
- **MEKC** Cromatografía capilar electrocinética micelar (*Micellar electrokinetic capillary chromatography*)
- **MEPS** Microextracción con sorbentes empaquetados (*Microextraction by packed sorbent*)
- **MeOH** Metanol (*Methanol*)
- **MIA** Ensayo solvente por impresión molecular (*Molecularly imprinted sorbent assay*)
- **MIM** Monolito de impresión molecular (*Molecular impression monolith*)
- **MI-ELISA** Inmunoensayos ligados a enzimas con MIP (*Molecularly imprinted enzyme-linked immunosorbent assay*)
- **MI-SBSE** Extracción por barras de agitación magnética con MIP (*Molecularly imprinted stir bar sorptive extraction*)
- **MI-SPME** Microextracción en fase sólida con MIP (*Molecularly imprinted solid phase microextraction*)
- **MIP** Polímero de impresión molecular (*Molecular Imprinted Polymers*)
- **MIR** Espectroscopía de infrarrojo medio (*Mid-infrared spectroscopy*)

-
- **MISPE** Extracción en fase sólida con MIP (*Molecularly imprinted solid-phase extraction*)
 - **MLR** Regresión lineal múltiple (*Multiple linear regression*)
 - **MOF** Redes Metal-Orgánicas (*Metal-organic frameworks*)
 - **MSPD** Método de dispersión de matriz en fase sólida (*Matrix solid phase dispersión*)
 - **MS** Espectroscopía de masas (*Mass spectroscopy*)
 - **MSⁿ** Espectrometría de masas en tándem múltiple (*Multiple tandem mass spectrometry*)
 - **MS/MS** Espectrometría de masas en tándem (*Tandem mass spectrometry*)
 - **MVC1** Calibración multivariante de primer orden (*Multivariate calibration for first-order*)
 - **MVC2** Calibración multivariante de segundo orden (*Multivariate calibration for second-order*)
 - **MWCNT** Nanotubos de carbono multipared (*Multi-walled carbon nanotubes*)
 - **NIP** Polímero no impreso (*Non-printed polymer*)
 - **NIR** Espectroscopía de infrarrojo cercano (*Near infrared spectroscopy*)
 - **NMR** Resonancia magnética nuclear (*Nuclear magnetic resonance*)
 - **n^o** Número de átomos de carbono (*Number of carbon atoms*)
 - **NaOH** Hidróxido sódico (*Sodium hydroxide*)
 - **N-PLS** Mínimos cuadrados parciales multidimensionales (*Multidimensional-partial least squares*)
 - **N'N-MAA** N'N-metilenebisacrilamida (*N,N'-Methylenebisacrylamide*)
 - **OMS** Organización Mundial de la Salud
 - **OMTs** Flavonoide O-metiltransferasa (*Flavonoid O-methyltransferase*)
 - **ORAC** Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (*Oxygen radical absorption capacity*)

- **PAHs** Hidrocarburos aromáticos policíclicos (*Polycyclic aromatic hydrocarbons*)
- **PAL** Fenilalanina amino liasa (*Phenylalanine amino lyase*)
- **PARAFAC** Análisis factorial paralelo (*Parallel factor analysis*)
- **PARAFAC2** PARAFAC que permite variaciones de perfiles (*Parallel factor analysis allows profile variations*)
- **PARALIND** PARAFAC para sistemas con dependencia lineal (*Parallel profiles with linear dependencies*)
- **PCA** Análisis por componentes principales (*Principal component analysis*)
- **PCA** Ácido protocatecuico (*Protocatechic acid*)
- **PCR** Regresión por componentes principales (*Principal component regression*)
- **PCX** Intercambiador polimérico para SPE (*Bond Elut Plexa*)
- **PDA** Fotodiodo de detección de matriz (*Photodiode-Array Detection*)
- **PDMS** Polidimetilsiloxano (*Polydimethylsiloxane*)
- **PE** Polifenoles extraíbles (*Extractable polyphenols*)
- **PEF** Campos eléctricos pulsados (*Pulsed electric fields*)
- **PETRA** Pentaeritritol trimetilacrilato (*Pentaerythritol trimethylacrylate*)
- **P-gp** Glicoproteína de permeabilidad (*Permeability glycoprotein*)
- **PHWE** Extracción con agua caliente presurizada (*Pressurized hot water extraction*)
- **Pi** Grupo fosfato (*Phosphate group*)
- **PLE** Extracción líquida presurizada (*Pressurized liquid extraction*)
- **PLS** Regresión por mínimos cuadrados parciales (*Principal component analysis*)
- **PLS2** Regresión parcial de mínimos cuadrados para varias variables independientes (*Partial least squares regression for several independent variables*)
- **PNE** Polifenoles no extraíbles (*Non-extractable polyphenols*)

-
- **PPR** Regresión de persecución de proyección (*Projection pursuit regression*)
 - **PRESS** Predicción de errores residuales de la suma de cuadrados (*Prediction residual error sum of squares*)
 - **PT-SPE** Puntas de extracción de fase sólida (*Pipette tip solid-phase extraction*)
 - **PVC** Policloruro de vinilo (*Polyvinylchloride*)
 - **Q** Cuadrupolo (*Quadrupole*)
 - **QqQ** Triple cuadrupolo (*Triple quadrupole*)
 - **QuEChERS** Rápido, fácil, económico, eficaz, sólido y seguro (*Quick, easy, cheap, effective, rugged & safe*)
 - **QTOF** Cuadrupolo-tiempo de vuelo (*Quadrupole-time of flight*)
 - **R** Recuperación (*Recovery*)
 - **R²** Coeficiente de correlación (*Correlation coefficient*)
 - **r.p.m.** Revoluciones por minuto (*Revolutions per minute*)
 - **RBL** Bilinealización residual (*Residual bilinearization*)
 - **S.E.** Errores estándar (*Standard errors*)
 - **REP** Errores relativos de predicción (*Relative error prediction*)
 - **rGO** Óxido de grafeno reducido (*Reduced graphene oxide*)
 - **RIA** Radioinmunoensayos (*Radioimmunoassays*)
 - **RMSEP** Error cuadrático medio de predicción (*Root mean square error of prediction*)
 - **ROS** Especies reactivas de oxígeno (*Reactive oxygen species*)
 - **RSD** Desviación típica relativa (*Relative standard deviation*)
 - **RTL** Trilinealización residual (*Residual trilinearization*)
 - **RP** Fase reversa (*Reverse phase*)
 - **SA** Ácido salicílico (*Salicylic acid*)
 - **SAX** Intercambio aniónico fuerte (*Strong anion exchange*)
 - **SBSE** Extracción con barra agitada (*Stir-bar sorptive extraction*)
 - **SCX** Intercambio catiónico fuerte (*Strong cation exchange*)
 - **SD** Desviación estándar (*Standard deviation*)
 - **SDS** Dodecil sulfato de sodio (*Sodium dodecyl sulfate*)
 - **SE** Extracción con solvente (*Solvent extraction*)

- **SEL** Selectividad (*Selectivity*)
- **SEM** Microscopía electrónica de barrido (*Scanning electron microscopy*)
- **SEN** Sensibilidad (*Sensitivity*)
- **SEP** Error estándar de la predicción (*Standard error of prediction*)
- **SERS** Espectroscopía Raman con superficie mejorada (*Surface-enhanced raman spectroscopy*)
- **SLE** Extracción sólido-líquido (*Solid-liquid extraction*)
- **SPCE** Electrodo serigrafiado de carbono (*Screen-printed carbon electrode*)
- **SPE** Extracción en fase sólida (*Solid phase extraction*)
- **SPE** Electrodo serigrafiado (*Screen-printing electrode*)
- **SFC** Cromatografía de fluidos supercríticos (*Supercritical fluid chromatography*)
- **SFE** Extracción por fluidos supercríticos (*Supercritical fluid extraction*)
- **SPME** Microextracción en fase sólida (*Solid phase microextraction*)
- **STS** Estilbeno-sintasa (*Stilbene synthase*)
- **SULT** Sulfotransferasa (*Sulfotransferase*)
- **SVD** Descomposición de valor singular (*Singular value decomposition*)
- **SVR** Soporte de regresión vectorial (*Support vector regression*)
- **SWATLD** Descomposición trilineal alternada autoponderada (*Self-weighted alternating trilinear decomposition*)
- **SyA** Ácido siríngico (*Syringic acid*)
- **TAC** Capacidad antioxidante total (*Total antioxidant capacity*)
- **TBZ** Tiabendazol (*Thiabendazole*)
- **TDL** Descomposición trilineal (*Trilinear decomposition*)
- **TEAC** Capacidad antioxidante equivalente al trolox (*Trolox equivalent antioxidant capacity*)
- **THF** Tetrahidrofurano (*Tetrahydrofuran*)

-
- **TLC** Cromatografía en capa fina (*Thin layer chromatography*)
 - **TMS** Trimetilsilil eter (*Trimethylsilyl ether*)
 - **TOF** Analizador de tiempo de vuelo (*Time of flight analyzer*)
 - **TRAP** Poder de captación de radicales totales (*Total radical-trapping antioxidant parameter*)
 - **TRIM** Trimetilpropano trimetacrilato (*Trimethylpropane trimethacrylate*)
 - **UA** Ácido úrico (*Uric acid*)
 - **UAE** Extracción asistida por ultrasonidos (*Ultrasonic assisted extraction*)
 - **UGT** UDP-glucuronosil-transferasa (*UDP-glucuronosyl-transferase*)
 - **U-PCR** Desdoblamiento de regresión de componentes principales (*Unfolding-principal component regresión*)
 - **UHPLC** Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (*Ultra high performance liquid chromatography*)
 - **UHPSFC** Cromatografía de fluidos supercríticos de ultra alto rendimiento (*Ultra high performance supercritical fluid chromatography*)
 - **UPLC** Cromatografía líquida de ultra rendimiento (*Ultra performance liquid chromatography*)
 - **U-PLS** Mínimos cuadrados parciales concatenados (*Unfolding partial least squares*)
 - **UV** Ultravioleta (*Ultraviolet*)
 - **UV-DAD** Detector ultravioleta con diodo array (*Ultraviolet with diode array detector*)
 - **VIS** Visible
 - **VA** Ácido vanílico (*Vanillic acid*)
 - **WCX** Intercambio catiónico débil (*Weak cation exchange*)
 - **ZIF-8** Imidazolato zeolítico (*Zeolitic-Imidazolate Framework-8*)
 - λ_{emi} Longitud de onda de emisión (*Emission wavelength*)
 - λ_{exc} Longitud de onda de excitación (*Excitation wavelength*)

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.1.** Clasificación de compuestos fenólicos en función del número de átomos de carbono (n°)
- Tabla 1.2.** Clasificación de compuestos fenólicos en función de la solubilidad
- Tabla 1.3.** Propiedades beneficiosas de los flavonoides
- Tabla 2.1.** Biodisponibilidad y principales metabolitos del colon de los polifenoles dietéticos más comunes
- Tabla 3.1.** Tipo de sorbentes de sílica y sus aplicaciones
- Tabla 3.2.** Principales polímeros de impresión molecular sintetizados con ácidos fenólicos como plantilla
- Tabla 3.3.** Ejemplos de métodos de cromatografía líquida para la determinación de compuestos fenólicos y sus metabolitos
- Tabla 3.4.** Clasificación de los métodos de calibración
- Tabla 3.5.** Clasificación de los tipos de datos analíticos y de las calibraciones a las que dan lugar
- Tabla 3.6.** Síntesis sobre las características de los modelos de calibración más utilizados
- Tabla 3.7.** Revisión bibliográfica sobre técnicas multivariantes aplicadas a diferentes compuestos
- Tabla 6.1.** Compuestos fenólicos, catabolitos de flavan-3-oles estudiados
- Tabla 6.2.** Longitudes de onda emisión/excitación más adecuadas para cada compuesto estudiado
- Tabla 6.3.** Estudio del pH más adecuado para cada compuesto estudiado
- Tabla 6.4.** Parámetros de las curvas de calibración y parámetros analíticos de calidad
- Tabla 6.5.** Determinación de las longitudes de onda de excitación y emisión óptimas en la mezcla de catabolitos de flavan-3-oles
- Tabla 6.6.** Composición de la matriz de calibración para mezclas sintéticas

-
- Tabla 6.7.** Parámetros estadísticos del modelo PLS en la zona espectral óptima para cada componente en muestras sintéticas
- Tablas 6.8.** Aplicación del modelo PLS optimizado a la resolución de mezclas ternarias de ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 3-hidroxifenilacético y ácido siríngico en muestras sintéticas
- Tabla 6.9.** Parámetros de calidad para cada analito en muestras sintéticas
- Tabla 6.10.** Resultados del proceso de desproteización de la orina
- Tabla 6.11.** Concentraciones más habituales encontradas en heces de los flavan-3-oles estudiados en este capítulo
- Tabla 6.12.** Intervalos de longitud de onda y óptimos de excitación y de emisión
- Tabla 6.13.** Parámetros de las curvas de calibración y parámetros analíticos de calidad en muestras de orina
- Tabla 6.14.** Parámetros de las curvas de calibración y parámetros analíticos de calidad en muestras de orina, para mezclas
- Tabla 6.15.** Composición de la matriz de calibración optimizada en orina
- Tabla 6.16.** Parámetros estadísticos del modelo PLS en la zona espectral óptima para cada componente
- Tablas 6.17.** Aplicación del modelo PLS optimizado a la resolución de mezclas ternarias de ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 3-hidroxifenilacético y ácido siríngico en orina
- Tabla 6.18.** Parámetros de calidad para cada analito en muestras de orina
- Tabla 6.19.** Diseño Experimental central, atendiendo a las concentraciones y linealidad de cada catabolito
- Tabla 6.20.** Composición de la matriz de calibración y del conjunto de predicción, formado por un conjunto de 23 muestras para calibración y un conjunto total de 8 muestras (d24 a d31)
- Tabla 6.21.** Descripción de las dos alternativas de calibración usando PARAFAC

- Tablas 6.22.** Aplicación del modelo PARAFAC optimizado a la resolución de mezclas ternarias de ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 3-hidroxifenilacético y ácido siríngico en orina. RMSEP, error de predicción de la raíz cuadrática media; REP%, error relativo de predicción
- Tabla 6.23.** Parámetros de calidad para cada analito en muestras de orina, usando PARAFAC
- Tabla 6.24.** Datos para calcular los porcentajes de recuperación, usando PARAFAC
- Tabla 7.1.** Datos y proporciones de los distintos reactivos empleados para la síntesis del MIP en bloque para el ácido 4-hidroxifenilacético
- Tabla 7.2.** Optimización del volumen de porógeno en la síntesis del polímero.
- Tabla 7.3.** Modelos de isothermas de adsorción
- Tabla 7.4.** Datos de la isoterma de adsorción del MIP y NIP para el 4-HPA
- Tabla 7.5.** Datos experimentales, para las isothermas de adsorción, de todos los catabolitos de flavan-3-oles estudiados
- Tabla 7.6.** Parámetros de la isoterma de Langmuir y Freundlich obtenidos para el MIP y los ácidos fenólicos estudiados
- Tabla 7.7.** Cinética MIP y NIP para una concentración inicial de 1000 mg/L de 4-HPA
- Tabla 7.8.** Parámetros de las curvas de calibrado, coeficiente de correlación lineal, límite de detección y de cuantificación para los 6 analitos estudiados en muestras sintéticas, determinadas por HPLC-DAD, flujo 0,5 mL/min
- Tabla 7.9.** Parámetros del detector MS, para los 6 metabolitos de flavan-3-oles en muestras sintéticas, flujo 0,5 mL/min
- Tabla 7.10.** Parámetros del detector MS, para los 6 metabolitos de flavan-3-oles en muestras de orina, flujo 0,4 mL/min

-
- Tabla 7.11.** Parámetros de las curvas de calibrado, coeficiente de correlación lineal, límite de detección y de cuantificación para los 6 analitos estudiados en orina, determinadas por HPLC-DAD-MS, flujo 0,4 mL/min, intervalo de concentración de 0,25 a 40 mg/L
- Tabla 7.12.** Condiciones MISPE optimizadas para el 4-HPA
- Tabla 7.13.** Reproducibilidad y repetibilidad del MISPE en muestras sintéticas
- Tabla 7.14.** Resultados obtenidos en el procedimiento MISPE en muestras sintéticas de concentración 4 mg/L, para los catabolitos estudiados, por separado
- Tabla 7.15.** Resultados obtenidos en el proceso MISPE en muestras sintéticas de 6 catabolitos juntos
- Tabla 7.16.** Reproducibilidad y repetibilidad del MISPE en muestras de orina
- Tabla 7.17.** Resultados obtenidos en el proceso MISPE, para los 6 catabolitos por separado en muestras de orina para una concentración de 4 mg/L
- Tabla 7.18.** Resultados obtenidos en el proceso MISPE, para la mezcla de 6 catabolitos juntos en orina en concentración 4 mg/L
- Tabla 8.1.** Parámetros impuestos en el equipo para la realización de la voltametría cíclica
- Tabla 8.2.** Datos obtenidos al aplicar CV, a una concentración 500 μM de los catabolitos estudiados en Britton-Robinson pH 2 y velocidad de barrido de 100 mV/s
- Tabla 8.3.** Parámetros impuestos en el equipo para la realización de la voltametría cíclica de activación de SPCE
- Tabla 8.4.** Datos obtenidos al aplicar AdDPV, a disoluciones de 500 μM de PCA y 4-HPA a diferentes pH (2, 5 y 8)
- Tabla 8.5.** Datos obtenidos al aplicar AdDPV, a disoluciones de 500 μM de PCA y 4-HPA (pH=2) a diferentes volúmenes de muestra (5, 10, 20 y 30 μL)

- Tabla 8.6.** Datos obtenidos al aplicar AdDPV, a mezclas sintéticas de PCA y 4-HPA (10, 50, 100 y 150 mg/L). Condiciones: Britton-Robinson pH 2, amplitud del impulso 125 mV, tiempo del impulso 50 ms, potencial del escalón 4 mV, intervalo de tiempo 200 ms
- Tabla 8.7.** Parámetros de las curvas de calibrado, coeficiente de determinación lineal, límite de detección y de cuantificación para PCA y 4-HPA en muestras sintéticas
- Tabla 8.8.** Datos obtenidos al aplicar AdDPV, a una disolución de 500 μ M de UA y Britton-Robinson pH=2
- Tabla 8.9.** Datos obtenidos al aplicar AdDPV, a muestras de orina dopadas con PCA (10, 50, 100, 150 y 200 mg/L). Condiciones: Britton-Robinson pH 2, amplitud del impulso 125 mV, tiempo del impulso 50 ms, potencial del escalón 4 mV, intervalo de tiempo 200 ms
- Tabla 8.10.** Datos obtenidos al aplicar AdDPV, a muestras de orina dopadas con 4-HPA (10, 50, 100, 150 y 200 mg/L). Condiciones: Britton-Robinson pH 2, amplitud del impulso 125 mV, tiempo del impulso 50 ms, potencial del escalón 4 mV, intervalo de tiempo 200 ms
- Tabla 8.11.** Datos obtenidos al aplicar AdDPV, a muestras de orina dopadas con SyA (10, 50, 100, 150 y 200 mg/L). Condiciones: Britton-Robinson pH 2, amplitud del impulso 125 mV, tiempo del impulso 50 ms, potencial del escalón 4 mV, intervalo de tiempo 200 ms
- Tabla 8.12.** Datos obtenidos al aplicar AdDPV, a muestras de orina dopadas con 4-HBA (10, 50, 100, 150 y 200 mg/L). Condiciones: Britton-Robinson pH 2, amplitud del impulso 125 mV, tiempo del impulso 50 ms, potencial del escalón 4 mV, intervalo de tiempo 200 ms
- Tabla 8.13.** Parámetros de las curvas de calibrado, coeficiente de determinación lineal, límite de detección y de cuantificación para PCA, 4-HPA, SyA y 4-HBA en muestras de orina

- Tabla 8.14.** Resultados de recuperación de los catabolitos estudiados mediante el procedimiento MISPE-AdDPV, en condiciones óptimas
- Tabla 8.15.** Comparación del método MISPE-AdDPV con el método MISPE-HPLC-DAD-MS (n=3)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Mecanismos de acción y actividades biológicas de los polifenoles de la dieta
- Figura 1.2.** Estructuras químicas de antioxidantes dietéticos fenólicos no flavonoides: (1) resveratrol; (2) curcumina; y (3) ácido rosmarínico
- Figura 1.3.** Estructuras químicas de los antioxidantes dietéticos fenólicos flavonoides: (1) quercetina; y (2) epigallocatequina-3-galato
- Figura 1.4.** Metabolismo de compuestos polifenólicos en alimentos sólidos y bebidas
- Figura 1.5.** Estructura básica de los flavonoides
- Figura 1.6.** Ruta del acetato-malonato, de acetyl-CoA a malonil-CoA
- Figura 1.7.** Ruta común fenilpropanoide, de fenilalanina a p-cumaril-CoA
- Figura 1.8.** Ruta biosintética de flavonoides
- Figura 1.9.** Tipos más comunes de compuestos flavonoides
- Figura 1.10.** Hesperetina
- Figura 1.11.** Luteolina
- Figura 1.12.** Genisteína
- Figura 1.13.** Quercetina
- Figura 1.14.** Epicatequina
- Figura 1.15.** Procianidina B1 (epicatequina-(4 β →8)-catequina)
- Figura 1.16.** Cianidina
- Figura 1.17.** Estructura de quercetina, resaltando los grupos implicados en su actividad antioxidante

- Figura 1.18.** Grupo galato presente en la molécula epigallocatequina galato (EGCG). En verde, grupo pirogalol; en amarillo, grupo galato
- Figura 1.19.** Degradación de compuestos polifenólicos, con formación de piragolol y ácidos fenólicos
- Figura 2.1.** Estructuras químicas de los principales flavanoles de la dieta
- Figura 2.2.** Estructuras químicas de proantocianidinas
- Figura 2.3.** Metabolitos de (-)-epicatequina detectados después del consumo de una bebida rica en cacao UGT, UDP-glucuronosiltransferasa; SULT, sulfotransferasa; COMT, catecol-O-metiltransferasa
- Figura 2.4.** Derivados metilados del ácido gálico excretados después del consumo de té negro
- Figura 3.1.** Esquema de estrategia para la determinación de ácidos fenólicos y flavonoides en fluidos biológicos, bebidas, plantas y alimentos
- Figura 3.2.** Esquema del proceso de formación del polímero de impresión molecular
- Figura 3.3.** Monómeros funcionales comunes utilizados en procedimientos de impresión molecular
- Figura 3.4.** Entrecruzantes más comunes empleados en la síntesis de MIP
- Figura 3.5.** Estructuras de los iniciadores más comunes utilizados en la impresión molecular
- Figura 3.6.** Esquema de la técnica de impresión covalente
- Figura 3.7.** Esquema de la técnica de impresión no covalente
- Figura 3.8.** Esquema de la técnica de impresión semi-covalente
- Figura 3.9.** Imagen SEM de: (A) MIP en bloque. (B) MIP por precipitación. (C) y (D) MIP por precipitación con agitación
- Figura 3.10.** Diagrama de métodos para el análisis de compuestos polifenólicos
- Figura 3.11.** Clasificación de las técnicas electroquímicas

- Figura 3.12.** Celdas electroquímicas formadas por tres electrodos: (A) celda convencional (volumen 20-200 mL), (B) electrodo serigrafiado (thick film; volumen 50 μ L) y (C) electrodos serigrafiados (thin film; volumen 1-10 μ L)
- Figura 3.13.** Fabricación de un electrodo serigrafiado de carbono: a) impresión de contactos de Ag sobre el sustrato de cerámica; b) impresión del electrodo de trabajo y electrodo auxiliar ambos de carbono; c) impresión del electrodo de referencia de Ag; d) capa de aislante
- Figura 3.14.** Electrodo serigrafiado SPEs (Metrohm DropSens)
- Figura 3.15.** Esquema de calibración de primer orden
- Figura 3.16.** Esquema de calibración de segundo orden
- Figura 3.17.** Representación esquemática de tubo, fila y columna (izquierda) y capa k-ésima del conjunto de datos (derecha)
- Figura 3.18.** Dos maneras básicas de obtener la ventaja de segundo orden
- Figura 3.19.** Representación gráfica del concepto de *unfolding*
- Figura 3.20.** Representación gráfica del modelo de descomposición trilineal de un componente de \underline{X}
- Figura 3.21.** Esquema representativo de cómo PARAFAC ubica las matrices de datos para procesarlas
- Figura 3.22.** Dos componentes del modelo de tres vías PARAFAC, para una organización de tres vías de datos \underline{X}
- Figura 3.23.** Representación esquemática de datos de tercer orden
- Figura 3.24.** Unicidad en PARAFAC, para tres analitos en dos muestras diferentes
- Figura 3.25.** Representación del Core consistency en función del número de componentes
- Figura 6.1.** Ejemplo de espectros de emisión para el ácido 4-hidroxifenilacético a distintas longitudes de onda de excitación ($V=500$ V)
- Figura 6.2.** Espectros de excitación y emisión de disoluciones acuosas de ácido 4-hidroxifenilacético a diferente pH

- Figura 6.3.** Espectro de emisión para el ácido 4-hidroxifenilacético a diferentes valores de pH, manteniendo la misma longitud de onda de excitación ($\lambda_{exc}=224\text{nm}$) y la misma concentración (0,75 mg/L)
- Figura 6.4.** Espectros de excitación y emisión de disoluciones acuosas de ácido 3-hidroxifenilacético a diferente pH
- Figura 6.5.** Evolución de la fluorescencia con el pH. Espectro de emisión para ácido 3-hidroxifenilacético a diferentes valores de pH, manteniendo la misma longitud de onda de excitación ($\lambda_{exc}=272\text{nm}$) y la misma concentración (0,70 mg/L)
- Figura 6.6.** Espectros de excitación y emisión de disoluciones acuosas de ácido siríntrico a diferentes valores de pH
- Figura 6.7.** Evolución de la fluorescencia con el pH. Espectro de emisión para ácido siríntrico a diferentes valores de pH, manteniendo la misma longitud de onda de excitación ($\lambda_{exc}=264\text{ nm}$) y la misma concentración (3 mg/L)
- Figura 6.8.** Espectros de excitación y emisión de disoluciones acuosas de ácido protocatecuico a diferentes valores de pH
- Figura 6.9.** Evolución de la fluorescencia con el pH. Espectro de emisión para ácido protocatecuico a diferentes valores de pH, manteniendo la misma longitud de onda de excitación ($\lambda_{exc}=253\text{ nm}$) y la misma concentración (2 mg/L)
- Figura 6.10.** Espectro de emisión para el ácido siríntrico, con y sin exposición a la luz ultravioleta, manteniendo la misma longitud de onda de excitación ($\lambda_{exc}=338\text{nm}$) y la misma concentración (2 mg/L)
- Figura 6.11.** Espectro de emisión de los catabolitos de flavan-3-oles fluorescentes estudiados en este trabajo, teniendo en cuenta la presencia de luz y la temperatura y manteniendo la misma concentración
- Figura 6.12.** Espectros de emisión y excitación del ácido 4-hidroxifenilacético, en diferentes disolventes

- Figura 6.13.** Incremento de señal producido en el ácido 4-hidroxifenilacético, utilizando diferentes disolventes. Concentración 100 µg/L
- Figura 6.14.** Ácido 4-hidroxifenilacético, en presencia y ausencia del agente surfactante, SDS. [NOR]=0,75 mg/L. [SDS]=10,4 mM. (λ_{exc} = 224 nm y λ_{emi} = 306 nm), V=500 V
- Figura 6.15.** Influencia de la concentración de SDS sobre la fluorescencia, para catabolitos de flavan-3-oles. [NOR]=2 mg/L. V=500 V
- Figura 6.16.** Mapa de contorno de la mezcla: [4-HPA]=0,06 mg/L, [3-HPA]=0,2 mg/L, [SyA]=3,5 mg/L, [PCA]=7 mg/L
- Figura 6.17.** Espectros de emisión de los catabolitos de Flavan-3-oles estudiados en este trabajo y de su correspondiente mezcla. [4-HPA]=0,06 mg/L, [3-HPA]=0,2 mg/L, [SyA]=3,5 mg/L, [PCA]=7 mg/L, $\lambda_{excitación}$ =272 nm
- Figura 6.18.** Espectros de emisión correspondientes a las muestras que componen la matriz de calibración ($\lambda_{excitación}$ =272 nm)
- Figura 6.19.** Variables latentes para el 4-HPA
- Figura 6.20.** Variables latentes para el 3-HPA
- Figura 6.21.** Variables latentes para el SyA
- Figura 6.22.** Resultados de la predicción para el 4-HPA
- Figura 6.23.** Resultados de la predicción para el 3-HPA
- Figura 6.24.** Resultados de la predicción para el SyA
- Figura 6.25.** Relación entre la concentración teórica y calculada para el ácido 4-hidroxifenilacético en muestras sintéticas
- Figura 6.26.** Relación entre la concentración teórica y calculada para el ácido 3-hidroxifenilacético en muestras sintéticas
- Figura 6.27.** Relación entre la concentración teórica y calculada para el ácido siríngico en muestras sintéticas
- Figura 6.28.** Porcentajes de recuperación de la mezcla de analitos obtenidos utilizando PLS
- Figura 6.29.** Recuperaciones medias de ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 3-hidroxifenilacético y ácido siríngico en muestras sintéticas de nueve muestras problema

- Figura 6.30.** Estudio del comportamiento en la señal de fluorescencia de diferentes mezclas orina-agua, en ausencia de nuestros catabolitos. Espectros de emisión ($\lambda_{\text{excitación}}=272$ nm)
- Figura 6.31.** Estudio del comportamiento en la señal de fluorescencia de diferentes mezclas orina-agua
- Figura 6.32.** Mapa de contorno de la mezcla de 200 μL de orina y agua hasta alcanzar el volumen total de 10 mL
- Figura 6.33.** Espectros de emisión para conocer el blanco de orina. 1=200 μL de orina y agua hasta alcanzar el volumen total de 10 mL; 2=200 μL de orina diluida 0,1:10 (v:v y agua hasta alcanzar los 10 mL; 3= 200 μL de orina diluida y dopada con 4 mg/L en 4-HPA y agua hasta alcanzar los 10 mL
- Figura 6.34.** Recta de calibrado para la determinación de ácido 4 hidroxifenilacético en muestras de orina. $\lambda_{\text{excitación}}=277$ nm
- Figura 6.35.** Rectas de calibrado para la determinación de ácido 4-hidroxifenilacético en muestras de orina, usando agua como disolvente y teniendo en cuenta las condiciones óptimas del análisis
- Figura 6.36.** Espectros de emisión correspondientes a las muestras que componen la matriz de calibración optimizada en muestras de orina ($\lambda_{\text{excitación}}=255$ nm)
- Figura 6.37.** Relación entre la concentración añadida y predicha para el ácido 4-hidroxifenilacético en muestras de orina
- Figura 6.38.** Relación entre la concentración añadida y predicha para el ácido 3-hidroxifenilacético en muestras de orina
- Figura 6.39.** Relación entre la concentración añadida y predicha para el ácido siríntrico en muestras de orina
- Figura 6.40.** Porcentajes de recuperación de ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 3-hidroxifenilacético y ácido siríntrico utilizando PLS en muestras de orina

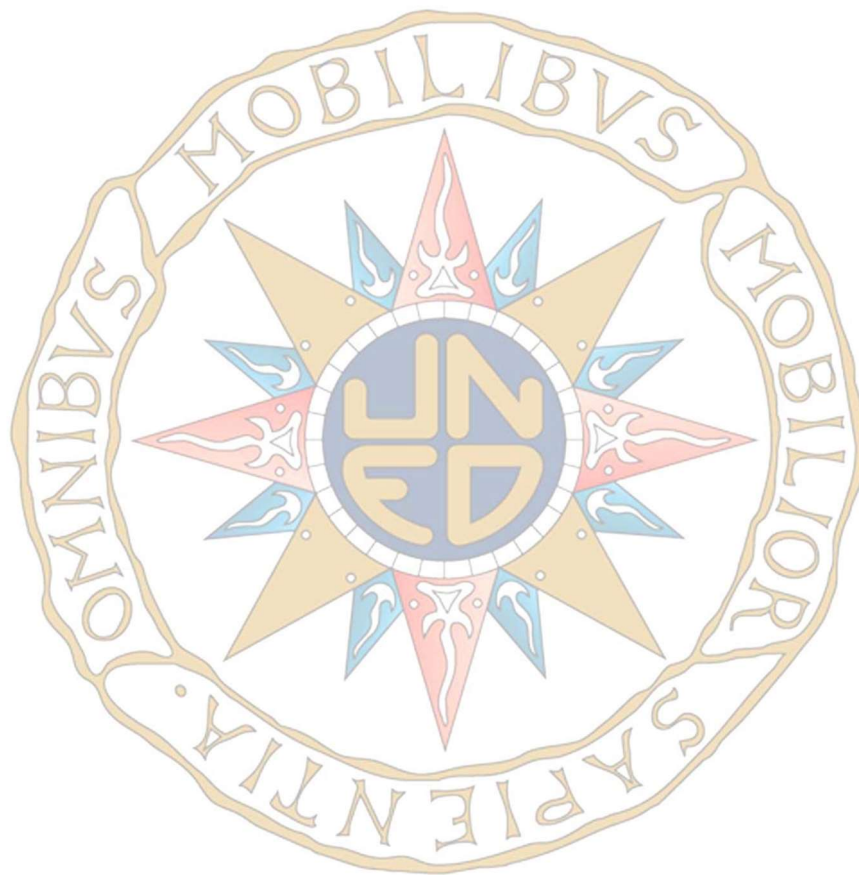
- Figura 6.41.** Recuperaciones medias de ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 3-hidroxifenilacético y ácido sirínico utilizando PLS en muestras de orina de ocho muestras problema
- Figura 6.42.** Espectros de emisión y excitación, para disoluciones estándar de 4-HPA, 3-HPA y SyA. [NOR]=600 µg/L.
- Figura 6.43.** Pantalla principal para realizar cálculos de calibración multivariante de segundo orden, utilizando el paquete informático MATLAB R2013a y la interfaz gráfica MVC2
- Figura 6.44.** Representación tridimensional de emisión-excitación, para la muestra de calibración d1
- Figura 6.45.** (A) Gráfico tridimensional del EEMs para la muestra estándar registrada en rangos de longitud de onda de excitación y emisión. (B) Gráfico de la EEMs para la muestra de orina enriquecida
- Figura 6.46.** Matriz de excitación/emisión de una muestra conteniendo solo el blanco de orina (A) y en presencia de 4-HPA, 3-HPA Y SyA (B) en orina
- Figura 6.47.** Representación del valor del Core Consistency en función del número de componentes modelados (A), y del error de regresión para la relación puesto/encontrado sobre las muestras de calibración (B)
- Figura 6.48.** Matriz de excitación/emisión de la muestra problema d31. Las concentraciones son 660 ppb para 4-HPA, 3-HPA y SyA en orina
- Figura 6.49.** Perfiles de excitación emisión de los factores optimizados en muestras de orina y en presencia de 4-HPA, 3-HPA y SyA, utilizando PARAFAC. Calibrados de los patrones: (B) 4-HPA, (C) 3-HPA y (D) SyA, en orina
- Figura 6.50.** Espectros de emisión experimentales para los tres catabolitos estudiados en ausencia de orina (A) y en presencia (B)
- Figura 6.51.** Relación entre la concentración añadida y predicha para el ácido 4-hidroxifenilacético en muestras de orina, usando PARAFAC

- Figura 6.52.** Relación entre la concentración añadida y predicha para el ácido 3-hidroxifenilacético en muestras de orina, usando PARAFAC
- Figura 6.53.** Relación entre la concentración añadida y predicha para el ácido sirínico en muestras de orina, usando PARAFAC
- Figura 6.54.** Porcentajes de recuperación de 4-HPA, 3-HPA y SyA en muestras de orina, usando PARAFAC
- Figura 6.55.** Recuperaciones medias de ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 3-hidroxifenilacético y ácido sirínico en muestras de orina de ocho muestras problema, utilizando PARAFAC
- Figura 7.1.** Imágenes SEM de los polímeros sintetizados. A y B muestran las partículas del MIP, aumento x150 y x3200, respectivamente. C muestra la superficie de una partícula del NIP, aumento x3200
- Figura 7.2.** Grafica lineal obtenida, a partir de datos BET, de las áreas superficiales para MIP y NIP, utilizando N₂ a 77 °K (Q indica la cantidad adsorbida en cm³/g)
- Figura 7.3.** Espectros ATR-FTIR para MIP, NIP y 4-HPA
- Figura 7.4.** Representación gráfica de la Isoterma de Langmuir, de los datos experimentales MIP y NIP para el 4-HPA
- Figura 7.5.** Representación gráfica de las isotermas de Langmuir y de los datos experimentales para todos los catabolitos estudiados
- Figura 7.6.** Factores de impresión (IF) de los analitos objeto de estudio
- Figura 7.7.** Cinética de absorción MIP y NIP para el 4-HPA
- Figura 7.8.** Representación del modelo de Lagergren de pseudo-primer orden para el MIP sintetizado y una concentración de 1000 mg/L de 4-HPA
- Figura 7.9.** Representación del modelo de segundo orden para el MIP sintetizado y una concentración de 1000 mg/L de 4-HPA
- Figura 7.10.** Representación del modelo de Elovich para el MIP sintetizado y una concentración de 1000 mg/L de 4-HPA

-
- Figura 7.11.** Cromatograma obtenido a una longitud de onda de 280 nm de los 6 metabolitos, concentración 4 mg/L, y un flujo de 5 mL/min
- Figura 7.12.** Cromatogramas del 4-HPA en concentración 4 mg/L y en las condiciones cromatográficas descritas, en muestras de orina
- Figura 7.13.** Cromatograma de los 6 analitos en concentración 4 mg/L y en las condiciones cromatográficas descritas, en muestras de orina
- Figura 7.14.** Etapas del procedimiento MISPE
- Figura 7.15.** Optimización del disolvente de lavado para el polímero impreso MIP
- Figura 7.16.** Optimización del volumen de lavado
- Figura 7.17.** Optimización del disolvente de elución
- Figura 7.18.** Optimización del volumen de elución
- Figura 7.19.** Estudios de recuperación en el proceso MISPE en muestras de orina, con respecto a las modificaciones de pH, para el 4-HPA, y una concentración de 4 mg/L
- Figura 7.20.** Porcentaje de recuperación para análogos de ácidos fenólicos, obtenidos por procedimiento MISPE
- Figura 8.1.** Estructuras químicas de los ácidos fenólicos estudiados
- Figura 8.2.** Voltamperogramas cíclicos (CV) de 500 μ M de los catabolitos estudiados en Britton-Robinson pH 2, y del blanco (sólo el tampón). Velocidad de barrido 100 mV/s
- Figura 8.3.** Voltamperogramas cíclicos (CV) de 500 μ M de los catabolitos electroactivos en Britton-Robinson pH 2. Velocidad de barrido 100 mV/s
- Figura 8.4.** AdDPV de una mezcla de PCA, SyA, 4-HBA y 4-HPA en una concentración 125 mg/L en orina. Condiciones: Britton-Robinson pH 2, amplitud del impulso 125 mV, tiempo del impulso 50 ms, potencial del escalón 4 mV, intervalo de tiempo 200 ms
- Figura 8.5.** Esquema de la modificación ERGO del SPCE

- Figura 8.6.** Intensidad de pico obtenida por AdDPV para disoluciones de 500 μM de PCA y 4-HPA a diferentes pH. Condiciones: Britton-Robinson (pH 2, 5 y 8), amplitud del impulso 125 mV, tiempo del impulso 50 ms, potencial del escalón 4 mV, intervalo de tiempo 200 ms
- Figura 8.7.** Intensidad de pico obtenida por AdDPV para disoluciones de 500 μM de PCA y 4-HPA a diferentes volúmenes de muestra. Condiciones: Britton-Robinson pH 2, amplitud del impulso 125 mV, tiempo del impulso 50 ms, potencial del escalón 4 mV, intervalo de tiempo 200 ms
- Figura 8.8.** Curvas de calibrado para 4-HPA y PCA. Condiciones: Britton-Robinson pH 2, amplitud del impulso 125 mV, tiempo del impulso 50 ms, potencial del escalón 4 mV, intervalo de tiempo 200 ms
- Figura 8.9.** Voltamperograma de una mezcla de PCA y 4-HPA, con una concentración 4 mg/L en orina y proceso MISPE (ERGO_2). Medida de la matriz de orina y proceso MISPE (ERGO_1). Condiciones: Britton-Robinson pH 2, amplitud del impulso 125 mV, tiempo del impulso 50 ms, potencial del escalón 4 mV, intervalo de tiempo 200 ms
- Figura 8.10.** Estructura química del ácido úrico
- Figura 8.11.** Voltamperograma AdDPV de una muestra patrón 500 μM de UA. Condiciones: Britton-Robinson pH 2, amplitud del impulso 125 mV, tiempo del impulso 50 ms, potencial del escalón 4 mV, intervalo de tiempo 200 ms
- Figura 8.12.** AdDPV de una muestra de orina pasada por el MISPE. Condiciones: Britton-Robinson pH 2, amplitud del impulso 125 mV, tiempo del impulso 50 ms, potencial del escalón 4 mV, intervalo de tiempo 200 ms
- Figura 8.13.** Curvas de calibrado de PCA, 4-HPA, SyA y 4-HBA. Intervalo de concentraciones 10 a 200 mg/L (5 niveles de concentración). Condiciones: Britton-Robinson pH 2, amplitud del impulso 125 mV, tiempo del impulso 50 ms, potencial del escalón 4 mV, intervalo de tiempo 200 ms

- Figura 8.14.** Voltamperograma de una mezcla de 200 mg/L de 4-HPA, 50 mg/L de PCA, 150 mg/L de SyA y 200 mg/L de 4-HBA en orina. Condiciones: Britton-Robinson pH 2, amplitud del impulso 125 mV, tiempo del impulso 50 ms, potencial del escalón 4 mV, intervalo de tiempo 200 ms
- Figura 8.15.** Recuperación de los catabolitos estudiados mediante el procedimiento MISPE-AdDPV, en condiciones óptimas



Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1. COMPUESTOS POLIFENÓLICOS

Desde un punto de vista químico, los compuestos fenólicos y los compuestos polifenólicos o polifenoles, son compuestos orgánicos cuyas estructuras moleculares contienen al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo (como los ácidos fenólicos), además pueden presentar otros grupos funcionales como sustituyentes. La variedad estructural de los compuestos polifenólicos es muy amplia, conociéndose en la actualidad más de 8000 estructuras de este tipo de compuestos (Del Rio et al., 2013; Oroian & Escriche, 2015). Estos compuestos se denominan glicósidos cuando aparecen conjugados con uno o más restos de azúcares, unidos a grupos hidroxilo o directamente al anillo aromático. También pueden encontrarse asociados a otros compuestos (Liu, Wang, Yong, Kan, & Jin, 2018; Manach & Donovan, 2004).

Realizan funciones importantes en las plantas, ya que intervienen en su crecimiento, reproducción y defensa, protegiendo del ataque de patógenos o herbívoros y produciendo pigmentos que atraen a los polinizadores. Muchos compuestos fenólicos son clasificados como metabolitos secundarios de las plantas, por ejemplo, los flavonoides. Se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y, por lo tanto, constituyen parte integral de nuestra dieta mediante el consumo de alimentos de dicho origen vegetal, tales como cereales, legumbres, frutas y verduras. Asimismo, bebidas populares como zumos de fruta, té, café, cacao, cerveza y vino, son otra fuente habitual de polifenoles en nuestra ingesta diaria (Crozier, Jaganath, & Clifford, 2009; Dixon & Steele, 1999; Nabavi et al., 2020).

El interés del consumidor por los compuestos fenólicos ha aumentado notablemente en los últimos años y, por tanto, las industrias alimentarias desarrollan nuevos productos ricos en polifenoles, definiéndolos como alimentos funcionales, debido a los efectos beneficiosos para la salud, sus propiedades antioxidantes y su abundancia en la dieta (Zhang et al., 2018).

La investigación y los estudios epidemiológicos, han aportado pruebas sobre los efectos protectores del consumo a largo plazo de alimentos ricos en polifenoles, a los cuales se les atribuye gran cantidad de

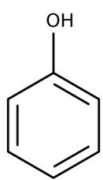
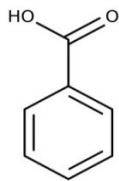
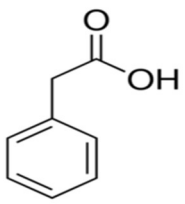
efectos favorables en enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, inflamatorias, cancerígenas y demás enfermedades asociadas al estrés oxidativo celular (Crozier et al., 2009; Del Rio et al., 2013; Li et al., 2013; Rady, Mohamed, Rady, Siddiqui, & Mukhtar, 2018).

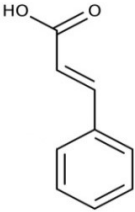
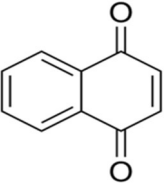
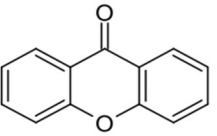
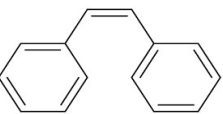
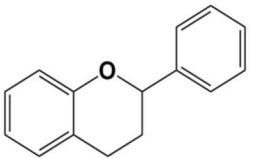
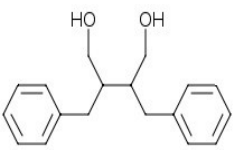
Los compuestos fenólicos son buenos antioxidantes, porque son capaces de captar iones metálicos, e impedir la formación de radicales libres, además pueden deslocalizar cargas, cediendo átomos de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un radical libre (Benfeito et al., 2013).

1.1.1. Clasificación de los compuestos polifenólicos

Los compuestos fenólicos se pueden clasificar de diferentes maneras, en función de alguna característica destacable como: el origen, la actividad biológica, el peso molecular, la estructura química, el número de átomos de carbono la solubilidad, etc. En la Tabla 1.1, se muestra la clasificación, atendiendo al número de átomos de carbono.

Tabla 1.1. Clasificación de compuestos fenólicos en función del número de átomos de carbono (nº).

nº	Esqueleto	Tipo	Estructura básica	Ejemplos
6	C ₆	Fenoles simples		Resorcinol Catecol Hidroquinona
7	C ₆ -C ₁	Ácidos hidroxibenzoicos		Ácido hidroxibenzoico Ácido protocatecuico Ácido siríngico
8	C ₆ -C ₂	Ácidos fenilacéticos		Ácido 4-hidroxifenilacético Ácido 3- hidroxifenilacético Ácido homovalínico

9	C_6-C_3	Ácidos hidroxicinámicos		Ácido cafeico Ácido ferúlico Ácido cumárico
10	C_6-C_4	Naftoquinonas		2-hidroxi-1,4 naftoquinoma
13	$C_6-C_1-C_6$	Xantonas		8-desoxigartanina
14	$C_6-C_2-C_6$	Estilbenos		Resveratrol Pteroestilbeno
15	$C_6-C_3-C_6$	Flavonoides		Epicatequina Quercetina Naringenina
18	$(C_6-C_3)_2$	Lignanós		Enterodiol Pinoresinol

De la condensación de varias unidades de ácidos fenólicos, resultan compuestos con elevado peso molecular, llamados taninos hidrolizables, que a su vez pueden dividirse en galotaninos $(C_6-C_1)_n$ y elagitaninos $(C_6)_n$, dependiendo de la naturaleza del anillo benzoico, ácido gálico o elágico, respectivamente. El ácido tánico es un representante del grupo de los galotatinos y la punicalagina del grupo de los elagitaninos. Otros compuestos fenólicos que pueden condensarse dando lugar a estructuras muy grandes son los flavonoides, formando compuestos

denominados bioflavonoides (C₆-C₃-C₆)₂ y taninos condensados (C₆-C₃-C₆)_n. La unión de ácidos hidroxicinámicos forma ligninas (C₆-C₃)_n.

Lo más habitual es encontrar conjugados a los compuestos fenólicos, con azúcares, lípidos, ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos y aminas (Duthie, Gardner, & Kyle, 2003), encontrando diferentes niveles de concentración en función del ambiente, genética, crecimiento y calidad de las plantas (Benfeito et al., 2013).

Para realizar una segunda clasificación de los compuestos polifenólicos, atenderemos a la solubilidad de estos y debemos tener en cuenta que, aunque la elección del disolvente sea correcta, no es posible la extracción de todos los compuestos polifenólicos de una muestra (Arranz Martínez, 2010). Por tanto, la clasificación basada en la solubilidad, que se representa en la Tabla 1.2, sugiere la división de los compuestos fenólicos en dos grupos.

Tabla 1.2. Clasificación de compuestos fenólicos en función de la solubilidad.

Polifenoles extraíbles (PE)	Se solubilizan en los disolventes acuoso-orgánicos	Poseen pesos moleculares bajos o medios (de monómeros a decámeros)
Polifenoles no extraíbles (PNE)	Se quedan retenidos en el residuo resultante tras la extracción acuoso-orgánica	Peso molecular elevado (5000 unidades o mayores)

Dentro de los PNE, se incluyen los ácidos benzoicos y los ácidos cinámicos, cuando se encuentran unidos a estructuras más complejas mediante enlaces glicosídicos, también pertenecen a este grupo las proantocianidinas de alto peso molecular, también llamadas taninos condensados. Algunos PNE de peso molecular bajo, también pueden quedar atrapados en la matriz vegetal o estar unidos a algún componente, como puede ser la fibra dietética, o algunas proteínas, inaccesibles a los

disolventes (Bravo, Abia, & Saura-Calixto, 1994; Saura-Calixto & Díaz-Rubio, 2007).

Un ejemplo de PE, son los ácidos fenólicos libres o esterificados, los cuales presentan una estructura más simple que los PNE. También son polifenoles extraíbles los flavonoides y otros compuestos más complejos como las proantocianidinas de bajo peso molecular (oligómeros de catequina y epicatequina con grado de polimerización entre 2 y 10) y los taninos hidrolizables.

1.1.2. Compuestos fenólicos flavonoides y no flavonoides

Debido al gran número de compuestos fenólicos que existen, otra clasificación es la fundamentada en dos grandes grupos, los compuestos fenólicos no flavonoides: (ácidos hidroxicinámicos, taninos hidrolizables, ácidos hidroxibenzoicos, estilbenos y lignanos) y los flavonoides: (flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavan-3-oles, proantocianidinas y antocianos) (Crozier et al., 2009; Lucci, Saurina, & Núñez, 2017).

Los principales compuestos no flavonoides de importancia dietética, son aquellos que destacan por ser buenos agentes antioxidantes, por ejemplo, los ácidos hidroxibenzoicos (ácido gálico, vanílico, siríngico, etc.), se pueden encontrar en la naturaleza libres o en forma de ésteres del ácido benzoico, los hallamos en algunas plantas como las cebollas o algunas frutas rojas, también en el té verde y el té negro, uvas, vino y mangos.

Los taninos hidrolizables presentan una estructura mucho más compleja, por ejemplo, (galotaninos en mangos y elagitaninos en frutas rojas, como las granadas, fresas y moras), también están presentes en la frambuesas, pomelos, caquis, nueces, avellanas y vinos envejecidos en roble (Manach, Scalbert, Morand, Rémésy, & Jiménez, 2004).

Los ácidos hidroxicinámicos más comunes son el ácido cafeico, ferúlico, p-cumárico y sináptico, además también pueden presentarse conjugados en forma de ésteres con baja solubilidad, como el ácido clorogénico. Se hallan presentes en la pared celular vegetal y los

encontramos, por ejemplo, en el café, las zanahorias, los tomates el ajo y el zumo de manzana.

Los estilbenos son producidos por las plantas, en respuesta a enfermedades, lesiones y estrés. No poseen una gran distribución en los alimentos vegetales (García et al., 2004), siendo el resveratrol el más abundante, y a la vez, el que presenta mayor interés nutricional. Para este compuesto se han descrito un gran número de beneficios antioxidantes, como por ejemplo propiedades anticancerígenas, cardiprotectoras, neuroprotectoras y antiinflamatorias (Fu et al., 2018; Stervbo, Vang, & Bonnesen, 2007). Las fuentes en la dieta de este compuesto son escasas, únicamente lo encontramos en cacahuets, pistachos (Grippi et al., 2008), algunas bayas y en uva (piel y semillas), así como en sus derivados (zumo y vino), en cantidades muy pequeñas (Burns, Yokota, Ashihara, Lean, & Crozier, 2002).

Los lignanos se pueden encontrar en gran variedad de plantas como el lino, la calabaza, el centeno, el sésamo y algunas bayas en cantidades muy pequeñas, del orden de μg por cada gramo de producto seco (Crosby, 2005). Su comportamiento es parecido al de las isoflavonas, comportándose como fitoestrógenos, los cuales reducen la acción de la hormona estrógeno (Basu & Maier, 2018). Cuando los lignanos pasan por el tracto intestinal, la flora bacteriana los convierte en otros lignanos como: enterodiol y enterolactona, los cuales tienen efectos parecidos al estrógeno, pero mucho más débil. Esta reducción en la actividad total de los estrógenos es beneficiosa para la salud de la mujer, previniendo varios tipos de cáncer, como puede ser el cáncer de mama (Carreau, Flouriot, Bennetau-Pelissero, & Potier, 2008). Además, a estos compuestos se les atribuyen otros efectos antioxidantes, que ayudan a combatir los efectos dañinos de los radicales libres (Aehle et al., 2011; Cotterchio, Boucher, Kreiger, Mills, & Thompson, 2008).

Los flavonoides son compuestos polifenólicos que poseen una estructura común de difenilpropano ($\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$), formada por dos anillos aromáticos conectados por un heterociclo oxigenado de tres carbonos puente (anillo de pirano). Los flavonoides son los compuestos fenólicos más abundantes del reino vegetal con más de 5000 compuestos diferentes, están presentes particularmente en la epidermis de las hojas y la piel de

frutas. Las principales subclases de flavonoides aportados a la dieta, son los flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanoles (flavan-3-oles), antocianidinas, y flavanonas (Manach et al., 2004). Otros ejemplos de flavonoides menos abundantes son: dihidroflavonoles, flavan-3,4-dioles, cumarinas, chalconas, dihidrochalconas y auronas.

El esqueleto flavonoide básico puede tener numerosos sustituyentes (grupos OH, metilos, isopentilo, etc.), siendo muy común la unión con azúcares formando flavonoides en su forma glicosilada, aunque también pueden encontrarse en las plantas en forma libre (agliconas) o conjugada (esterificados, sulfatados, etc.). La solubilidad en agua por tanto, estará marcada por la presencia de estos grupos (Crozier et al., 2009; Del Rio et al., 2013).

1.1.3. Compuestos polifenólicos en alimentos, actividad biológica y efectos en salud

Existen numerosos estudios clínicos, que demuestran los beneficios que los alimentos ricos en polifenoles aportan a la salud humana. Las propiedades sensoriales y la calidad de los alimentos de origen vegetal, depende en gran medida de la presencia de compuestos fenólicos, los cuales son responsables de los tonos coloreados característicos de frutas, verduras y hortalizas. Además, algunos fenoles son los responsables del sabor amargo y astringencia de algunos frutos (Tomás-Barberán & Espin, 2001).

Algunos polifenoles son específicos de determinados alimentos, por ejemplo, las flavanonas solo aparecen en los cítricos, mientras que las isoflavonas solo lo hacen en la soja. Sin embargo, otros compuestos fenólicos como la quercetina, es frecuente en gran cantidad de alimentos como frutas, cereales, té, vino, legumbres, etc. Lo más común, es que los alimentos contengan una mezcla compleja de polifenoles, e incluso algunos compuestos fenólicos se encuentren asociados a otros componentes de la matriz alimentaria, formando compuestos con alto peso molecular como los taninos hidrolizables y condensados. Cuando estos y otros compuestos fenólicos se encuentran fuertemente ligados a la pared celular de las

plantas, forman parte de la fibra dietética, por tanto, no serán metabolizados por las enzimas digestivas del hombre y llegarán intactos al intestino grueso, donde la microbiota del colón ejercerá su acción a través de metabolitos biodisponibles, lo cual repercutirá en efectos positivos para la salud humana (Giménez-Bastida et al., 2012).

Calcular la cantidad de compuestos fenólicos presentes en los alimentos, es fundamental para conocer el consumo medio de estos compuestos en la dieta. Esta tarea es difícil de llevar a cabo, ya que la composición fenólica de un alimento está condicionada por diversos factores como: la genética del componente vegetal, las condiciones ambientales del producto, la manipulación industrial y la elaboración del alimento para su consumo. Todas estas variables pueden hacer disminuir significativamente la concentración de polifenoles en los alimentos (Kschonsek, Wiegand, Hipler, & Böhm, 2019).

En una dieta normal, con hábitos de vida saludable, la ingesta de polifenoles se ha estimado entre 2590 y 3016 mg/día, incluidos en esta cantidad los polifenoles extraíbles y los no extraíbles, mediante métodos espectrofotométricos (Saura-Calixto, Serrano, & Goñi, 2007). Sin embargo, solo un bajo porcentaje de los polifenoles ingeridos se absorben en el intestino delgado después el proceso de desconjugación, mientras que los restantes polifenoles no modificados y sus formas conjugadas que alcanzan el intestino delgado a través de la bilis, se acumulan en el intestino grueso (Cardona, Andrés-Lacueva, Tulipani, Tinahones, & Queipo-Ortuño, 2013), donde la acción enzimática de las bacterias intestinales, producirá una variedad de metabolitos que exhiben diferentes efectos fisiológicos (Santhakumar, Battino, & Alvarez-Suarez, 2018).

Mediante métodos cromatográficos, otros autores han determinado la ingesta total de polifenoles en 820 ± 323 mg al día, procedente fundamentalmente de frutas, verduras y bebidas. La clase de polifenoles mayoritariamente consumidos fueron los flavonoides (443 ± 218 mg al día), lo que representa el 54% del total, seguido de los ácidos fenólicos con (304 ± 156 mg al día), es decir un 37% aproximadamente. El 9% restante, está compuesto de una mezcla de fenoles entre los que destacan los estilbenos del vino, entre otros (Tresserra-Rimbau et al., 2013).

Alimentos como naranjas, cerezas, fresas, granadas, manzanas, verduras y bebidas como el té, son una fuente importante de flavonoides, el café es fuente de ácidos hidroxicinámicos, mientras que el vino es fuente importante de proantocianidinas. Estos son los alimentos que están más presentes en la dieta humana y, por tanto, los responsables de la ingesta total de polifenoles, destacando: el café, frutas (naranjas y manzanas), productos derivados del olivo (aceitunas y aceite de oliva), cereales, vino, té, patatas y pan blanco.

La actividad biológica de los compuestos fenólicos se debe en su mayor parte a su gran poder antioxidante, porque pueden proteger contra el daño oxidativo, limitando el riesgo a padecer enfermedades degenerativas asociadas a estrés oxidativo. Además, están implicados en muchos mecanismos y rutas moleculares que intervienen en distintas funciones fisiológicas, que conducen a la disminución de riesgo a padecer diversas patologías (Crozier et al., 2009). Las principales actividades y los mecanismos de acción de estos compuestos se presentan en la Figura 1.1, donde los efectos positivos en salud dependerán de la dosis ingerida y de la biodisponibilidad.

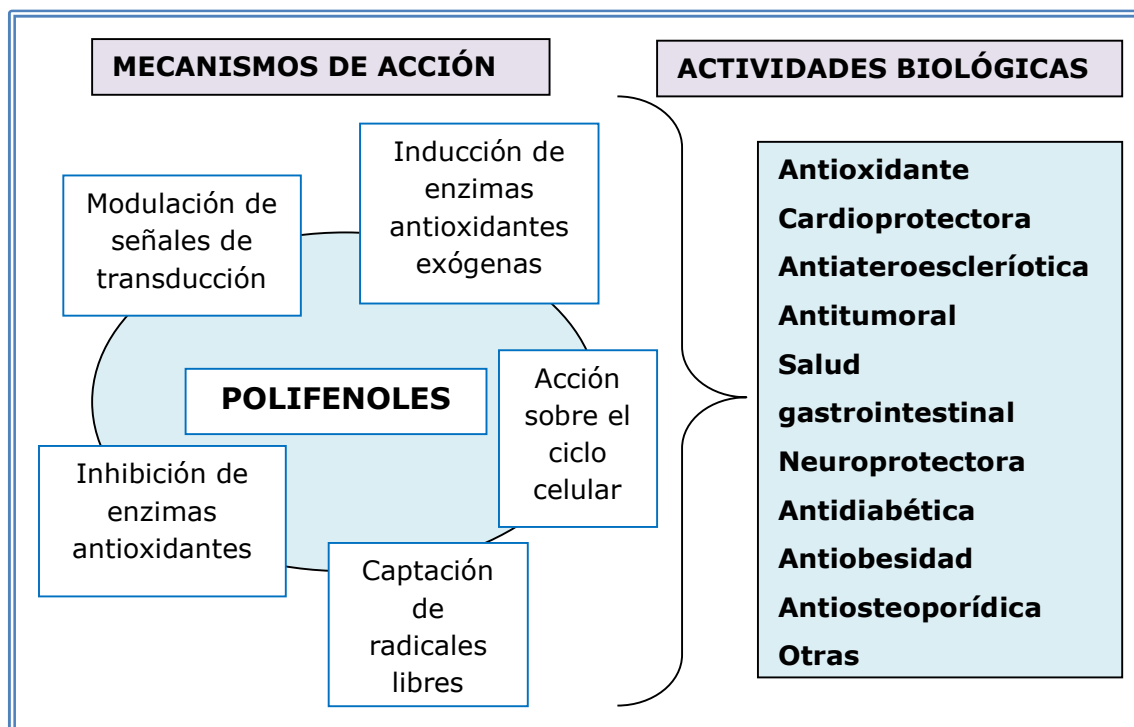


Figura 1.1. Mecanismos de acción y actividades biológicas de los polifenoles de la dieta (adaptado de Han, Shen, & Lou, 2007).

Los polifenoles presentan actividad antioxidante, porque son capaces de donar electrones a especies oxidantes, captar radicales libres y quelar iones metálicos (Wang, Liang, Wen, Shan, & Liu, 2014). La propiedad antioxidante está relacionada con la capacidad de proteger frente a patologías como la diabetes, el cáncer, cardiopatías, enfermedades víricas e inflamatorias. Los radicales libres más abundantes se denominan especies reactivas de oxígeno (ROS), los cuales pueden atacar a moléculas como los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, provocando efectos como envejecimiento, cataratas, diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Silva, Pinheiro-Castro, Novaes, Pascoal, & Ong, 2019). La defensa de nuestro organismo ante estos radicales libres, está formada por determinados tipos de enzimas (catalasa, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, etc.) y por sustancias procedentes de la dieta como las vitaminas C y E, los carotenos y los polifenoles. Aun así, en ocasiones todos estos mecanismos no son capaces de frenar el estrés oxidativo celular, lo que daría lugar a diversos tipos de patologías (Halliwell, 2012).

El efecto cardioprotector se ha asociado al consumo regular de alimentos ricos en polifenoles, encontrándose evidencias sobre la relación directa entre el consumo de polifenoles, principalmente flavonoides, con el efecto cardioprotector. Los beneficios en el sistema cardiovascular son debidos a las propiedades antioxidantes, las cuales mejoran el metabolismo lipídico, reducen la presión sanguínea, la agregación plaquetaria y regulan la respuesta inflamatoria (Silva et al., 2019). Algunos estudios epidemiológicos sugieren que las catequinas del té verde pueden reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, reduciendo los niveles de absorción del colesterol y otros lípidos de la dieta (Koo & Noh, 2007). Los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva presentan propiedades antioxidantes y antihipertensivas y su consumo disminuye la incidencia de enfermedad coronaria, disminuyendo los niveles de LDL oxidado en plasma y de peróxidos lipídicos (Fitó et al., 2005). Esta protección de los LDL contra el daño oxidativo también es llevada a cabo por los polifenoles del cacao y del café (Winklhofer-Roob, Faustmann, & Roob, 2017).

La respuesta inflamatoria es una reacción fisiológica y protectora del organismo frente a la presencia de un estímulo agresor, la respuesta además de ser inmediata provoca vasodilatación, aumento de permeabilidad vascular y salida de glóbulos blancos (linfocitos y macrófagos), de los capilares sanguíneos a la zona afectada. Cuando la inflamación se hace crónica los efectos pueden ser desproporcionados causando dolor, es por ello la importancia de algunos compuestos fenólicos, los cuales aportan un efecto antiinflamatorio, como los flavonoides (Giacometti, Muhvić, Pavletić, & Đudarić, 2016), que actúan inhibiendo algunas enzimas mediadoras cruciales de la inflamación. La inflamación juega un papel clave en enfermedades como diabetes, asma, enfermedades cardiovasculares y cáncer, la dieta rica en flavonoides puede influir en diferentes etapas de la inflamación y puede tener un impacto importante en varias enfermedades inflamatorias (Maleki, Crespo, & Cabanillas, 2019).

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, siendo los cánceres de pulmón, hígado, estómago, colon y mama los más letales. La OMS señala que una parte de las muertes por cáncer (30%), son debidas a factores de riesgo como la obesidad, ingesta reducida de frutas y verduras, consumo de tabaco, consumo de alcohol y falta de

actividad física. Las células tumorales han perdido la respuesta a factores que regulan su crecimiento, diferenciación y apoptosis celular en el tejido del cual proceden, además las células tumorales malignas, tienen la capacidad de invadir tejidos adyacentes, e incluso en otras etapas migrar a sitios distantes dando lugar a otros tumores secundarios (metástasis). La carcinogénesis se divide en cuatro etapas: iniciación (es la etapa donde el ADN es dañado por diferentes causas y no es reparado de manera eficiente por los mecanismos de protección celular), promoción, progresión e invasión de tejidos (metástasis). Los flavonoides pueden emplear diferentes mecanismos para interferir en cada una de las cuatro etapas anteriores, actuando como agentes bloqueantes de la iniciación y como agentes supresores, inhibiendo la formación y crecimiento de tumores (Chikara et al., 2018; Johnson, 2004).

Se han descrito diferentes acciones antitumorales llevadas a cabo por los compuestos fenólicos, los cuales pueden inhibir la formación de compuestos cancerígenos, capturando al mutágeno o interfiriendo en su célula diana; estimular los sistemas metabólicos a través de diferentes enzimas detoxificantes como catecol-O-metil-transferasa (COMT), UDP-glucuronosil-transferasa (UGT) y sulfotransferasa (SULT), las cuales mediante reacciones de conjugación aumentan la solubilidad de compuestos tóxicos, facilitando su eliminación; estimular el proceso de reparación del ADN dañado impidiendo su oxidación; mejorar los procesos de crecimiento y diferenciación celular; inducir la apoptosis de las células tumorales; inhibir la metástasis; etc.

Se ha encontrado una relación entre el consumo de polifenoles y su potencial efecto protector frente a distintos tipos de cáncer. A una dieta enriquecida en cacao se le atribuye prevención en la formación de células tumorales formadoras de cáncer de colon (Rodríguez-Ramiro et al., 2011). De hecho, el cacao y sus flavanoles pueden interferir en la iniciación y progresión de enfermedades crónicas relevantes como el cáncer, la diabetes y las enfermedades cardiovasculares (Martín & Ramos, 2016). El consumo diario y regular de alimentos ricos en polifenoles, tales como té, cacao, vino y aceite de oliva, evidencia un efecto protector frente al desarrollo de cáncer y metástasis (Weng & Yen, 2012).

Los polifenoles que tomamos de la dieta, también influyen en la salud gastrointestinal. En el colon, es donde se alcanza la mayor concentración de compuestos fenólicos que no se han absorbido en el tracto gastrointestinal y son metabolizados por la microflora intestinal, para que ellos y sus metabolitos puedan acumularse y ejercer efectos fisiológicos de protección, frente a la acción de compuestos oxidantes. En este sentido se ha descrito un efecto modulador de la epicatequina en el crecimiento de ciertas bacterias patógenas del género *Clostridium* y *Bacterioides*, actuando como prebióticos metabólicos (Chen et al., 2020; Lee, Jenner, Low, & Lee, 2006).

El estrés oxidativo, también ejerce un efecto negativo en enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y el Alzheimer, las cuales representan un grave problema en la sociedad. Los compuestos fenólicos, gracias a su poder antioxidante podrían reducir el daño mediante protección y regeneración neuronal. En el tejido cerebral se puede amplificar la generación de ROS, aumentando la acumulación de biomoléculas oxidadas, las cuales producen el estrés oxidativo. La acumulación de ROS en el cerebro estimula la oxidación de lípidos, proteínas y ADN, que son cambios característicos de muchas patologías neuronales, como las enfermedades de Parkinson y Alzheimer. Muchas investigaciones apuntan a una actividad neuroprotectora por parte de los compuestos fenólicos (Kim et al., 2018). En los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva virgen extra, se han demostrado beneficios cardiovasculares y cerebrovasculares, que podrían reportar numerosos efectos terapéuticos en la enfermedad de Alzheimer (Román et al., 2019).

La osteoporosis es una disminución de la masa ósea que ocasiona una menor resistencia mecánica del hueso, la cual puede conducir fácilmente a fracturas. En este sentido existen estudios que sugieren una relación directa entre compuestos fenólicos (procianidinas y catequinas), con un aumento de la densidad ósea (Hardcastle, Aucott, Reid, & Macdonald, 2011; Raut, Wicks, Lawal, & Mahady, 2019). La evidencia epidemiológica ha demostrado una asociación entre el consumo de algunos alimentos ricos en polifenoles como el cacao puro y el té, en la prevención de la pérdida ósea, en concreto el té y los compuestos bioactivos del té verde, pueden ser beneficiosos para mitigar la pérdida ósea disminuyendo

el riesgo de fracturas osteoporóticas (Shen, Yeh, Cao, Chyu, & Wang, 2011).

La diabetes mellitus es una alteración metabólica que se caracteriza por los niveles altos de azúcar en sangre (hiperglucemia), que puede ser debido a una baja o nula producción de insulina por los islotes pancreáticos (diabetes tipo I). Cuando son las propias células del organismo las que no responden a la insulina (resistencia), se trata de la diabetes tipo II, la cual es la más frecuente. La diabetes afecta con el tiempo a los tejidos y puede causar complicaciones potencialmente graves con el tiempo. Los compuestos polifenólicos que han llegado a la microbiota intestinal, son capaces de inhibir la absorción de glucosa, disminuyendo sus niveles en sangre, mejorando la secreción de insulina mediante la estimulación de las células pancreáticas, la activación de receptores de insulina, la activación de glucosa en tejidos periféricos y la modulación de señales mejorando la sensibilidad tisular a la insulina (Gowd, Karim, Shishir, Xie, & Chen, 2019). La ingesta de polifenoles (flavonoides), se asocia a una menor incidencia de la alteración metabólica diabetes tipo II (Zamora-Ros et al., 2013). Alimentos como el cacao el té y el café, gracias a sus componentes bioactivos, pueden reducir el riesgo de padecer diabetes al activar la acción de la insulina y mejorar la tolerancia a la glucosa (Meng, Cao, Feng, Peng, & Hu, 2013). La ingesta de té verde puede mejorar a largo plazo el perfil lipídico del organismo, al reducir las concentraciones séricas de triglicéridos y colesterol en pacientes con diabetes mellitus tipo II (Asbaghi et al., 2020).

La obesidad es una enfermedad que conlleva efectos metabólicos y alteraciones graves asociadas, siendo un problema de salud pública mundial. La obesidad y el sobrepeso está fundamentada en un desequilibrio entre las calorías ingeridas y las gastadas, de tal manera que un elevado índice de masa corporal (IMC), es el principal factor de riesgo para patologías como la diabetes, el cáncer y enfermedades cardiovasculares. Algunos compuestos fenólicos como las catequinas, antocianidinas, resveratrol, etc., han demostrado tener capacidad de modulación de los mecanismos implicados en la obesidad, mostrando reducción de la viabilidad de los adipocitos, reduciendo la acumulación de triglicéridos y la inflamación, lo que sugiere su posible aplicación terapéutica en el tratamiento o prevención de la obesidad y los síntomas metabólicos

relacionados (Chen, Zhou, Zhang, Li, & Zhu, 2015). Los polifenoles contenidos en el té producen una disminución en la absorción de lípidos y glucosa, mediante la inhibición de ciertas enzimas, las cuales disminuyen la síntesis lipídica en el intestino, tejido adiposo, hígado y músculo (Saeed et al., 2017). Se ha demostrado mediante estudios epidemiológicos y clínicos, que el consumo habitual de té verde y la realización de ejercicio físico, se puede asociar con efectos de interés en la lucha contra la obesidad (Sugita, Kapoor, Nishimura, & Okubo, 2016).

En la literatura se pueden encontrar múltiples referencias relacionadas con la actividad biológica de los polifenoles y sus efectos en salud: la cebolla y la planta de Gingo-Biloba son ricas en quercetina y kaempferol, tienen un efecto de disminución de la presión arterial, de los radicales libres, del daño oxidativo y de la incidencia a padecer cáncer (Kudolo, Delaney, & Blodgett, 2005; Liao et al., 2016). Los polifenoles presentes en el jugo de granada ejercen gran capacidad antioxidante, antiaterogénica, antihipertensiva y antiinflamatoria, además de prevenir el riesgo cardiovascular (Sahebkar et al., 2017). Los alimentos derivados de la soja contienen polifenoles como, genisteína, daidzeína e isoflavonas, con capacidad para aumentar la densidad ósea, disminuir la cantidad de colesterol y la resistencia a la insulina, disminuyendo el riesgo de padecer enfermedades como el cáncer (Androutsopoulos, Papakyriakou, Vourloumis, Tsatsakis, & Spandidos, 2010). Otros alimentos como té, cacao, chocolate, vino tinto, arándanos, mora, etc., ricos en catequina, epicatequina, procianidinas y otros compuestos fenólicos, son responsables de efectos positivos en la salud, como la disminución de peso corporal, riesgo de cáncer, presión arterial, oxidación de LDL y peróxidos en plasma (Martin, Goya, & Ramos, 2017; Terao, 2017).

El potencial terapéutico de los compuestos fenólicos como antioxidantes naturales en enfermedades asociadas con el daño oxidativo, ha recibido gran atención hasta la fecha. Algunos de los compuestos más representativos a este fin, se detallan a continuación y se pueden clasificar como no flavonoides (Figura 1.2) y flavonoides (Figura 1.3) (Benfeito et al., 2013).

Resveratrol: es el compuesto no flavonoide biológicamente más activo y relevante que se encuentra en frutas rojas, uvas y vino tinto. El

resveratrol se describe como un potente antioxidante que secuestra los radicales libres, además de tener capacidad antioxidante intrínseca, también tiene un efecto sobre la expresión de una serie de enzimas antioxidantes. Tiene la habilidad para prevenir la peroxidación lipídica, mediante la eliminación de radicales peroxilo dentro de la membrana. Los datos *in vivo* de varios estudios, demostraron claramente que la ingesta de resveratrol tiene propiedades protectoras contra múltiples enfermedades (Smoliga, Baur, & Hausenblas, 2011). Se ha demostrado que el tratamiento agudo con resveratrol tiene un efecto neuroprotector, contra la pérdida neuronal del hipocampo inducida por trauma y asociada al deterioro cognitivo (Sönmez, Sönmez, Erbil, Tekmen, & Baykara, 2007). El resveratrol puede interactuar con varios receptores, quinasas y otras enzimas como ciclooxigenasas, y en consecuencia se asocia con una gran cantidad de efectos biológicos, como agente antienvjecimiento en el tratamiento de enfermedades humanas relacionadas con la edad (Benfeito et al., 2013).

Curcumina: es un compuesto no flavonoide, es un polifenol de bajo peso molecular extraído del rizoma de *Cúrcuma longa*, es un antioxidante lipofílico más potente que la vitamina E, capaz de prevenir el daño oxidativo y proteger el cerebro de la peroxidación lipídica (Aggarwal, Surh, & Shishodia, 2007). La curcumina es un potente eliminador de superóxido y radicales hidroxilo, con la capacidad de disminuir la concentración de circulación de productos finales de radicales libres y conservación de los niveles de glutatión (Barzegar, 2012). Para este antioxidante natural se han descrito también efectos antiinflamatorios, capacidad de quelación de metales activos redox, como el hierro y el cobre y protección de órganos como el cerebro, el hígado, los pulmones, los riñones y el corazón (Belkacemi, Doggui, Dao, & Ramassamy, 2011).

Ácido Rosmarínico: es un compuesto no flavonoide, derivado éster del ácido cafeico y del ácido 3-(3,4-dihidroxifenil) láctico. Este compuesto fenólico, que ocurre naturalmente en varias familias de plantas, tiene varias actividades biológicas interesantes, por ejemplo, antioxidante, antiinflamatorio, antibacteriano y antiviral (Petersen & Simmonds, 2003). Se ha demostrado que el ácido rosmarínico inhibe efectivamente el daño por ROS, por ejemplo, en macrófagos y astrocitos. El ácido rosmarínico es un compuesto con una baja toxicidad, pero se elimina rápidamente de la

circulación sanguínea después de la administración intravenosa, lo que constituye un problema para más aplicaciones en terapia (Zhou, Liu, & Du, 2011).

Quercetina: es un compuesto flavonoide, dietético importante que se encuentra en abundancia en cebollas, manzanas, brócoli y bayas (Wach, Pyrzyńska, & Biesaga, 2007). Tiene una notable actividad antioxidante debido a su poder eliminador de radicales libres y propiedades quelantes de hierro (Dajas, 2012). A la quercetina se le han descrito propiedades beneficiosas en la prevención del daño cerebral y enfermedad de Alzheimer, principalmente debido a su importante capacidad de captura de ROS (Jiménez-Aliaga, Bermejo-Bescós, Benedí, & Martín-Aragón, 2011). La quercetina es un compuesto prometedor para la protección contra diversas enfermedades como la osteoporosis, ciertas formas de cáncer, enfermedades pulmonares, cardiovasculares y envejecimiento (Russo, Spagnuolo, Tedesco, Bilotto, & Russo, 2012). La quercetina tiene una habilidad particular para eliminar especies altamente reactivas, como el peroxinitrito y el radical hidroxilo, aportando efectos beneficiosos para la salud.

Epigallocatequina-3-galato: es un compuesto flavonoide, que como otras catequinas se encuentra principalmente en té verde, té negro y en vino tinto. Los efectos favorables en salud que se le atribuye al té verde, se deben principalmente a su contenido fenólico, particularmente flavonoides, que representan el 30% del peso de las hojas frescas secas (Khan & Mukhtar, 2007). La actividad antioxidante de EGCG está relacionada con su estructura, siendo capaz de regular de forma endógena diferentes defensas antioxidantes, como son enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y tocoferol (Srividhya, Jyothislakshmi, Arulmathi, Senthilkumaran, & Kalaiselvi, 2008). El tratamiento con EGCG a través de los polifenoles del té verde y compuestos relacionados con flavonoides, tiene efectos preventivos, produciendo eliminación de especies radicales y la quelación de iones de metales de transición, evitando la acumulación de peróxidos lipídicos neurotóxicos relacionados con la edad, además la epigallocatequina-3-galato tiene efectos hepatoprotectores, quimiopreventivos y anticancerígenos (Yin et al., 2008).

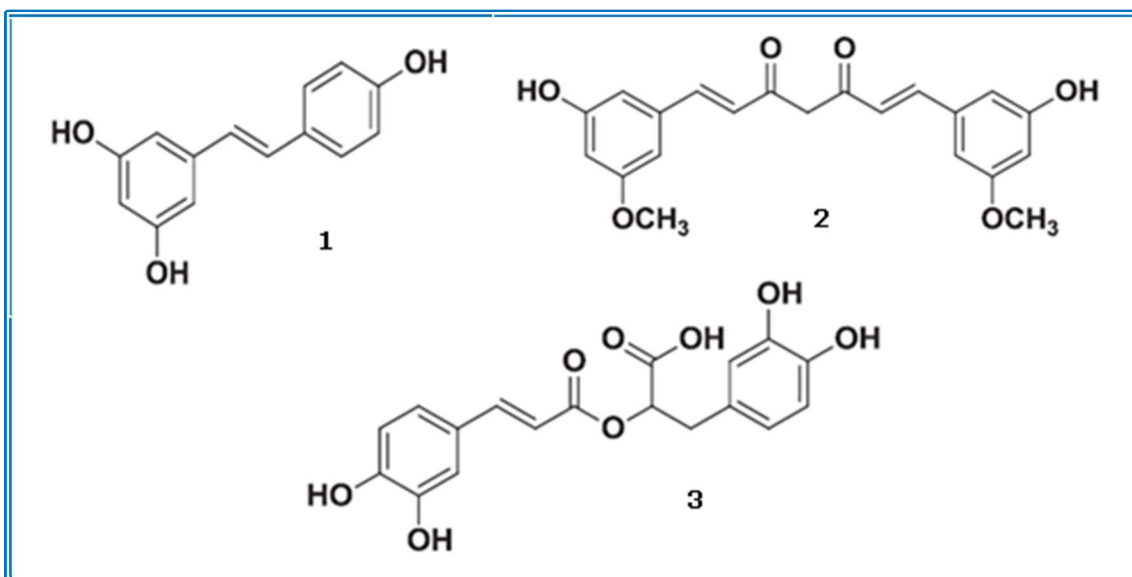


Figura 1.2. Estructuras químicas de antioxidantes dietéticos fenólicos no flavonoides: (1) resveratrol; (2) curcumina; y (3) ácido rosmarínico (Benfeito et al., 2013).

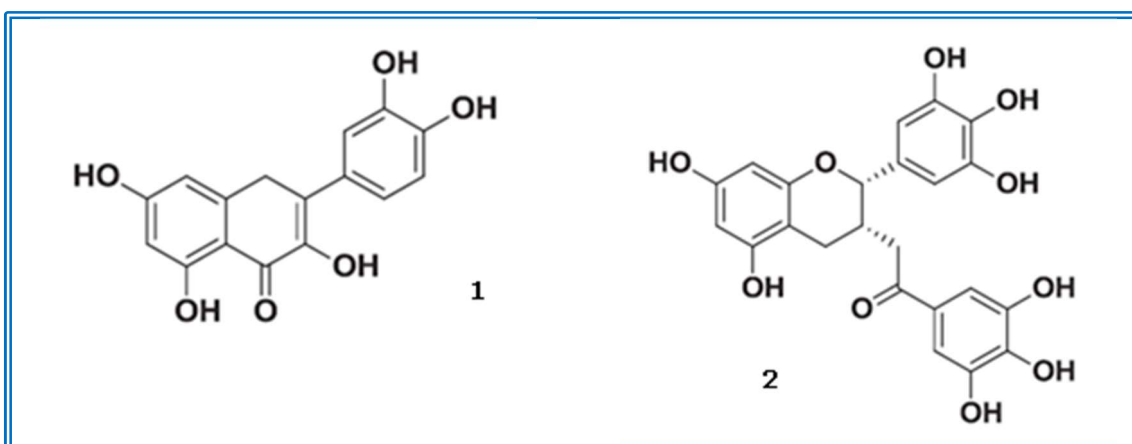


Figura 1.3. Estructuras químicas de los antioxidantes dietéticos fenólicos flavonoides: (1) quercetina; y (2) epigalocatequina-3-galato (Benfeito et al., 2013).

1.1.4. Biodisponibilidad y metabolismo de los compuestos fenólicos

La ingesta de alimentos ricos en sustancias antioxidantes como vitaminas C y E, carotenoides o compuestos polifenólicos, previene o disminuye el desarrollo de enfermedades y por tanto, una dieta rica en fruta

y verdura puede aumentar la defensa antioxidante del organismo, contrarrestando la producción de radicales libres, minimizando el daño oxidativo y el riesgo de contraer enfermedades (Shao & Bao, 2015).

Los compuestos fenólicos se encuentran en una gran variedad de plantas comestibles, frutos, hortalizas, bebidas como té, café, cerveza y vino tinto, en el aceite de oliva, en cereales y en algunas semillas como las leguminosas. Las hortalizas como el tomate, cebolla, ajos, pimientos, etc., contienen altas concentraciones de polifenoles. En la dieta, estas concentraciones pueden estar entre 50 y 800 mg/día, dependiendo del consumo de productos que lo contienen. Un nivel importante de antioxidantes, se alcanza cuando el consumo es de unos 800 mg/día, que puede lograrse con una dieta rica en frutas y hortalizas.

La actividad biológica de los compuestos fenólicos está condicionada por su biodisponibilidad y metabolismo, porque son factores determinantes para conocer la concentración a partir de la cual pueden ejercer su actividad biológica beneficiosa para la salud.

Previo a la absorción de cualquier componente, debe tener lugar su liberación de la matriz donde se encuentre (bioaccesibilidad), disponible por el epitelio intestinal. Podemos decir que el concepto de biodisponibilidad, es la fracción del alimento que alcanza la circulación sistémica y el lugar donde puede ejercer su acción biológica. Factores como la estructura química, la concentración, la genética, el ambiente y la forma de manipular y cocinar los alimentos, influyen también en la biodisponibilidad, además algunos polifenoles son absorbidos débilmente, metabolizados o excretados rápidamente (Hu, Liu, Zhang, & Zeng, 2017).

La biodisponibilidad de algunos grupos de compuestos fenólicos como los flavonoides, es compleja, apreciando que el microbioma intestinal desempeña un papel importante en la acción de estos compuestos (Williamson, Kay, & Crozier, 2018).

Para conocer el metabolismo que los compuestos fenólicos pueden sufrir en el organismo y los efectos positivos sobre diferentes partes del cuerpo, se representa la Figura 1.4.

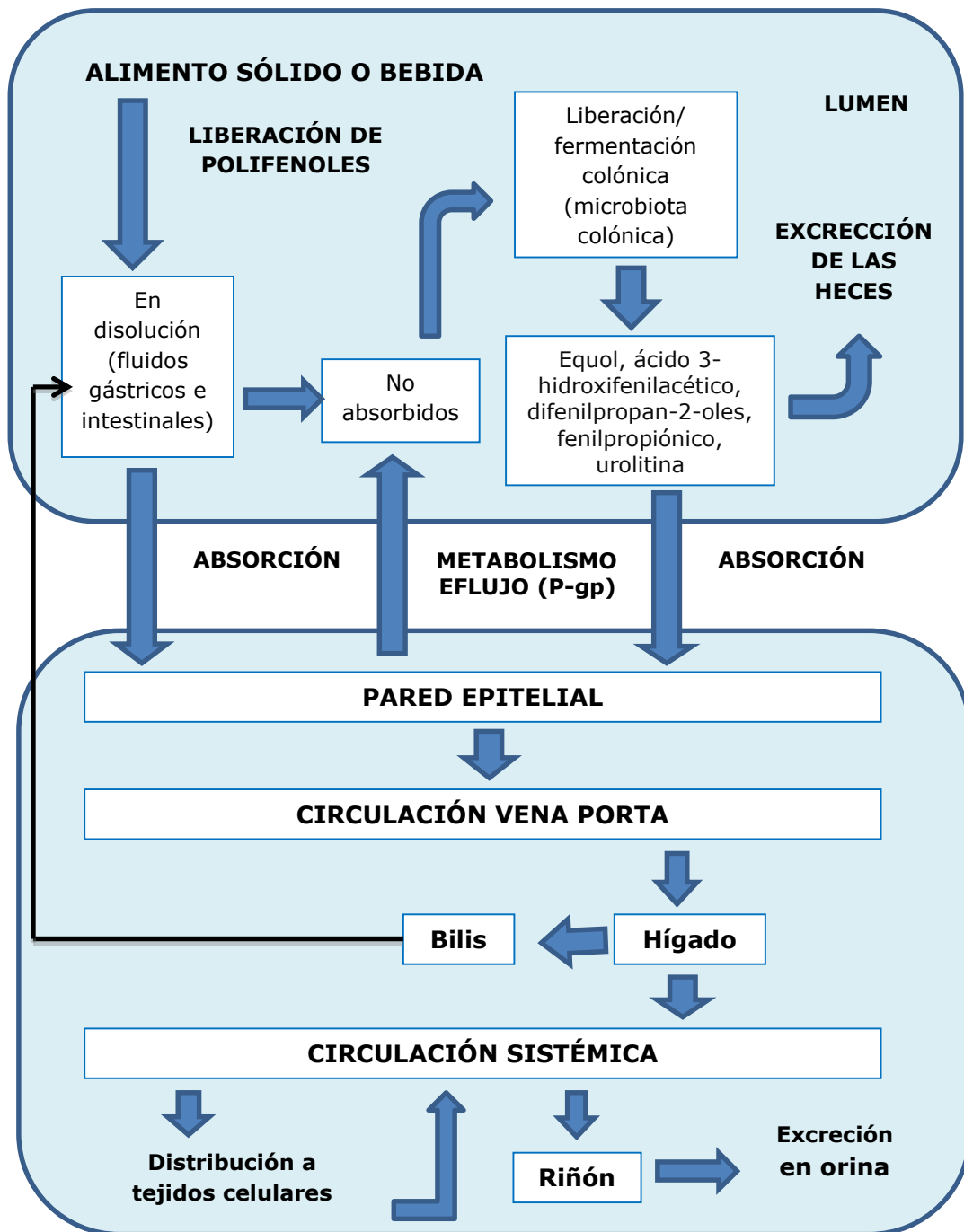


Figura 1.4. Metabolismo de compuestos polifenólicos en alimentos sólidos y bebidas (Holst & Williamson, 2008).

El proceso de absorción de los alimentos ocurre principalmente en el intestino delgado. Los compuestos fenólicos que son absorbidos en el tracto intestinal producen efectos beneficiosos para el organismo, siendo absorbidos y metabolizados y tras convertirse en un nuevo compuesto glucuronidado, sulfatado o metilado son excretados en la orina y bilis

(Singleton, 1981; Liyang Xie et al., 2016). Para el caso de compuestos fenólicos unidos a otras moléculas o polimerizados, la absorción no se produce en el intestino delgado y por tanto pasan al colon, donde aumentarán el ambiente antioxidante o serán metabolizados por la microflora intestinal, siendo parcialmente absorbidos (Hakeem Said, Gencer, Ullrich, & Kuhnert, 2018).

En el estómago también se ha investigado el metabolismo y la biodisponibilidad de los polifenoles, debido al ambiente ácido que allí se encuentra, donde bajo estas condiciones los oligómeros de procianidina se hidrolizan a mezclas de monómeros y dímeros de epicatequina, lo que aumenta su potencial de absorción posteriormente en el intestino delgado (Spencer et al., 2000). Además, existe un metabolismo llamado eflujo que es producido por la glicoproteína-P del enterocito, que hace que compuestos que han sido absorbidos puedan volver a pasar al lumen intestinal (Holst & Williamson, 2008).

Para que la biodisponibilidad de los polifenoles en el organismo humano no sea tan baja, es necesario el consumo diario de alimentos ricos en compuestos fenólicos para mantener las concentraciones plasmáticas y así garantizar las propiedades beneficiosas para la salud que se les asocia. Los compuestos fenólicos que no son absorbidos en el intestino delgado alcanzan el colon, donde se produce su metabolismo debido a la acción de la microflora intestinal (Mocciaro et al., 2019). Al intestino grueso también llegan los compuestos excretados a través de la bilis después de su absorción intestinal (circulación enterohepática), también desde el enterocito a través de transportadores (mecanismo de eflujo). La microbiota colónica metaboliza los compuestos fenólicos mediante reacciones de hidrólisis (compuestos glicosilados, glucuronidados, sulfatados y acilados), de reducción, descarboxilación, desmetilación, deshidroxilación y de rotura de enlaces heterocíclicos, para generar compuestos de menor peso molecular (Calani et al., 2012).

Los metabolitos microbianos formados, pueden ser absorbidos localmente y transportados por la circulación portal hepática hacia el hígado (Figura 1.4), susceptibles de ser de nuevo biotransformados por la acción de las enzimas, formando derivados antes de alcanzar la circulación sistémica, los tejidos y ser excretados por la orina (Scalbert & Williamson,

2000). En el colon se forman generalmente ácidos benzoicos, fenilacéticos, fenilpropiónicos, hipúrico, etc., mientras que los compuestos fenólicos de alto peso molecular como las procianidinas, son despolimerizadas a sus correspondientes monómeros por la acción de las enzimas microbianas (Appeldoorn, Vincken, Aura, Hollman, & Gruppen, 2009). Además, se ha demostrado que los polifenoles interaccionan con la microflora intestinal, provocando cambios en el crecimiento y actividad de las bacterias, provocando poblaciones más beneficiosas para la salud humana y un efecto prebiótico (Gowd et al., 2019).

Algunos ejemplos de metabolitos de polifenoles producidos después de la fermentación colónica son: diversas urolitinas, producidas a partir de ácido elágico y los elagitaninos (Cerdá, Periago, Espín, & Tomás-Barberán, 2005; Landete, 2011); ácidos difenilpropan-2-oles y otros metabolitos, formados a partir de flavan-3-oles (Burgos-Edwards, Jiménez-Aspee, Theoduloz, & Schmeda-Hirschmann, 2018); ácido 3-(3-hidroxifenil)-propiónico para el ácido clorogénico; ácido 3-(4-hidroxifenil)-propiónico y ácido 3-fenilpropiónico para naringina; ácido 3-hidroxifenilacético y ácido 3-(3-hidroxifenil)-propiónico para la rutina (Rechner et al., 2004).

1.2. FLAVONOIDES

Los flavonoides son el tipo de polifenoles más abundante y estudiados del reino vegetal, son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc., también son responsables del crecimiento y la atracción de los agentes polinizadores evitando el ataque de insectos y patógenos (Raffa, Maggio, Raimondi, Plescia, & Daidone, 2017). El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras y en diversas bebidas, formando parte de los componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana (Aherne & O'Brien, 2002; Probst et al., 2018). Pueden actuar como antiinflamatorios,

antibióticos y antioxidantes, siendo estas tres propiedades las más estudiadas en plantas y en humanos (Yakoub et al., 2018; Yin et al., 2019).

Estos compuestos fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-György, quien en 1930 aisló de la cáscara del limón una sustancia, la citrina, que regulaba la permeabilidad de los capilares. Los flavonoides se denominaron en un principio vitamina P (por permeabilidad) y también vitamina C₂ (porque se comprobó que algunos flavonoides tenían propiedades similares a la vitamina C), mejorando su absorción y protegiéndola de la oxidación (Singleton, 1981). Sin embargo, el hecho de que los flavonoides fueran vitaminas no pudo ser confirmado, y ambas denominaciones se abandonaron alrededor de 1950 (Martínez-Flórez, González-Gallego, Culebras, & Tuñón, 2002; Perez-Vizcaino & Fraga, 2018).

Además de los efectos mencionados anteriormente, estudios epidemiológicos revelan que una dieta rica en flavonoides está relacionada con un aumento de la longevidad, disminuyendo la incidencia de enfermedades cardiovasculares, provocando en el organismo efectos antialérgicos, antitrombóticos antihipertensivos, antihemorrágicos, antivirales, hepatoprotectores (Formica & Regelson, 1995; Middleton, Kandaswami, & Theoharides, 2000; Xu et al., 2017), actuando como agentes terapéuticos en enfermedades y por tanto, usados como remedios naturales en medicina alternativa (Miltonprabu et al., 2017).

1.2.1. Estructura química

Los flavonoides se producen a partir de metabolitos secundarios de las plantas y son investigados por su actividad beneficiosa para la salud, son compuestos de bajo peso molecular que se caracterizan por contener: 2-fenil benzopirano como sustancia química fundamental. De todos los compuestos fenólicos que existen, más del 50% se han identificado como flavonoides y el número continúa creciendo (Xu et al., 2017). Su estructura básica, incluye un C₁₅, (C₆-C₃-C₆), compuesto por dos anillos de fenilo (A y B), ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico oxigenado). Los átomos de carbono presentes en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6'. Esta estructura

básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C, se puede observar en la Figura 1.5.

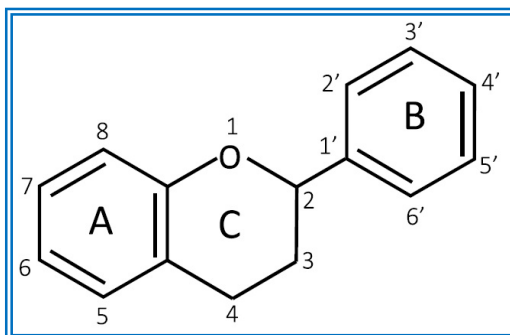


Figura 1.5. Estructura básica de los flavonoides (Alseekh et al., 2020).

Los flavonoides contienen en su estructura química, un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante (Tian et al., 2018). Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías (Raffa et al., 2017).

Las diferencias entre los diversos grupos de flavonoides se establecen por el grado de aromaticidad (dobles enlaces conjugados), el patrón de hidroxilación (orden y número), el tipo de sustituciones (glicosilación, metilación, sulfatación, etc.) y el grado de polimerización de sus estructuras (Wang et al., 2018), modificando las propiedades biológicas del flavonoide. Cuando estas sustancias aparecen unidas a glúcidos se conocen como "glicósidos", en caso contrario se denominan "agliconas". La unión del glúcido a la molécula de flavonoide incrementa la polaridad y lo hace más soluble en agua (Russo, Tedesco, Spagnuolo, & Russo, 2017).

1.2.2. Biosíntesis de flavonoides

La síntesis de flavonoides en vegetales sigue una ruta metabólica muy estudiada, la cual podemos seguir en la Figura 1.8. En esta

ruta intervienen gran variedad de enzimas, empezando por la unión de *p*-cumaril-CoA con tres moléculas de malonil-CoA.

El malonil-CoA, implica a la ruta del acetato-malonato y se inicia con la formación de malonil-CoA, a partir de acetil-CoA, mediante la acetil-CoA-carboxilasa (ACC) (Julsing et al., 2006).

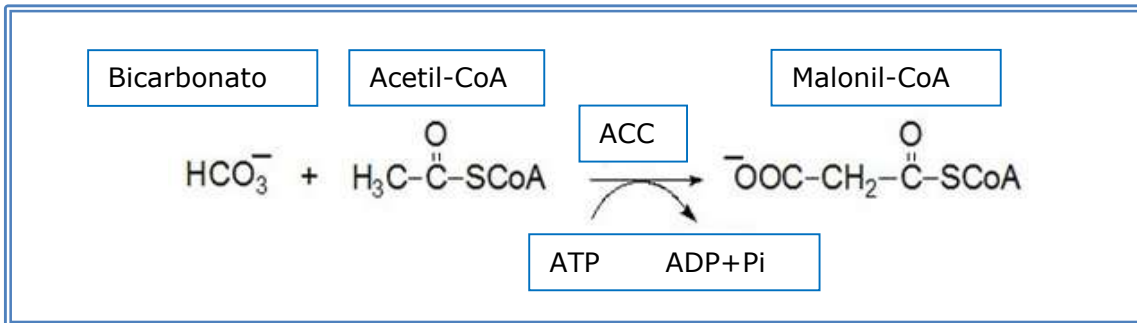


Figura 1.6. Ruta del acetato-malonato, de acetil-CoA a malonil-CoA.

El *p*-cumaril-CoA, proviene de la ruta del shikimato-fenilpropanoide y se produce por la acción de la fenilalanina amino liasa (PAL), esta enzima mediante un proceso de desaminación oxidativa, actúa sobre la L-fenilalanina (L-Phe), dando lugar al ácido cinámico, para posteriormente mediante la acción de la cinamato-4-hidroxilasa (C4H), el ácido cinámico es convertido al ácido *p*-cumárico, el cual es activado en forma de *p*-cumaroil-CoA gracias a la 4-cumaroil-CoA-ligasa (4CL), tal y como se observa en la Figura 1.7, (Lianghua Xie et al., 2018).

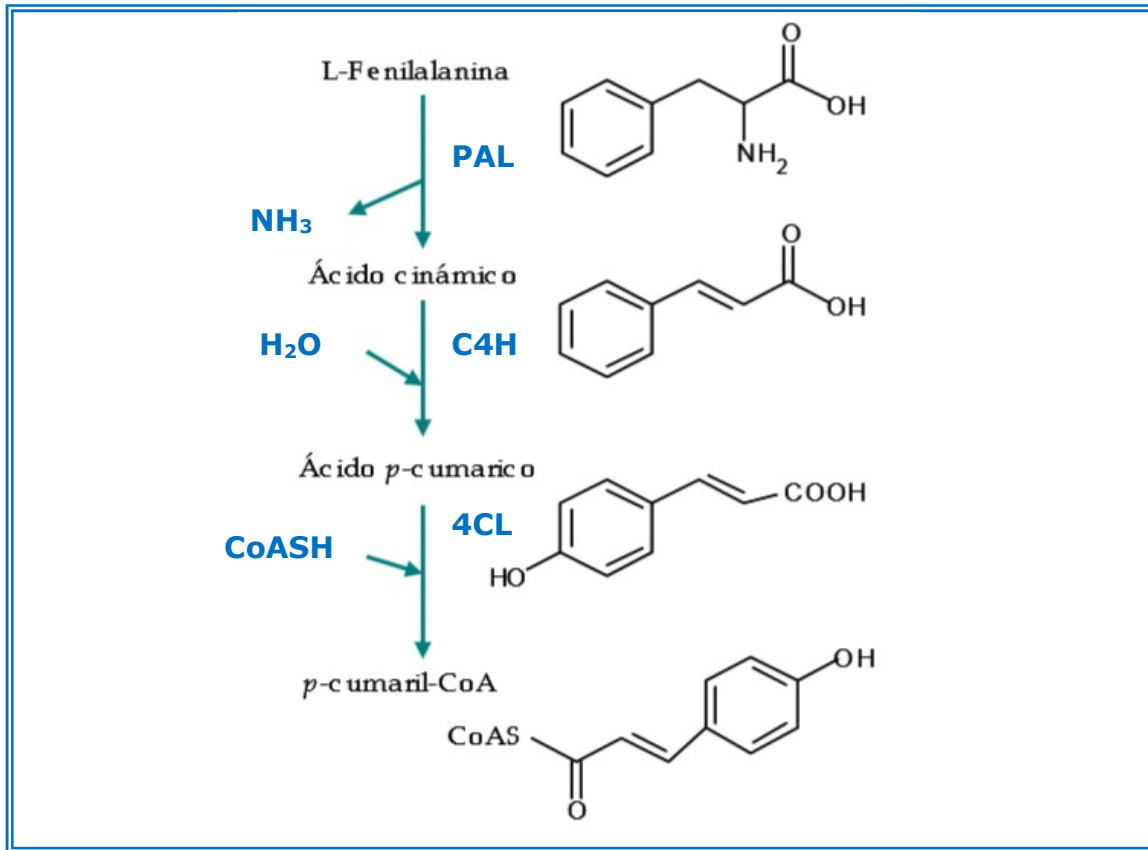


Figura 1.7. Ruta común fenilpropanoide, de fenilalanina a *p*-cumaril-CoA (Julsing, Koulman, Woerdenbag, Quax, & Kayser, 2006).

Sobre el *p*-cumaril-CoA, pueden actuar dos enzimas clave: chalcona sintasa (CHS) o bien estilbeno-sintasa (STS) y se produce la ciclación de la tetracetona lineal (Figura 1.8).

Cuando la enzima que actúa es la STS, el producto final de la reacción es el trans-resveratrol, liberándose cuatro moles de CO₂ por mol de resveratrol formado. En el caso de la CHS, se liberan 3 moléculas de CO₂ para formar una chalcona (Lianghua Xie et al., 2018). Después la chalcona isomerasa (CHI), se cicla mediante una isomerización estereoespecífica para formar las flavanonas. Tras ello, las flavanonas son modificadas por enzimas de la ruta de los flavonoides, para generar una amplia variedad de derivados (Dixon & Steele, 1999).

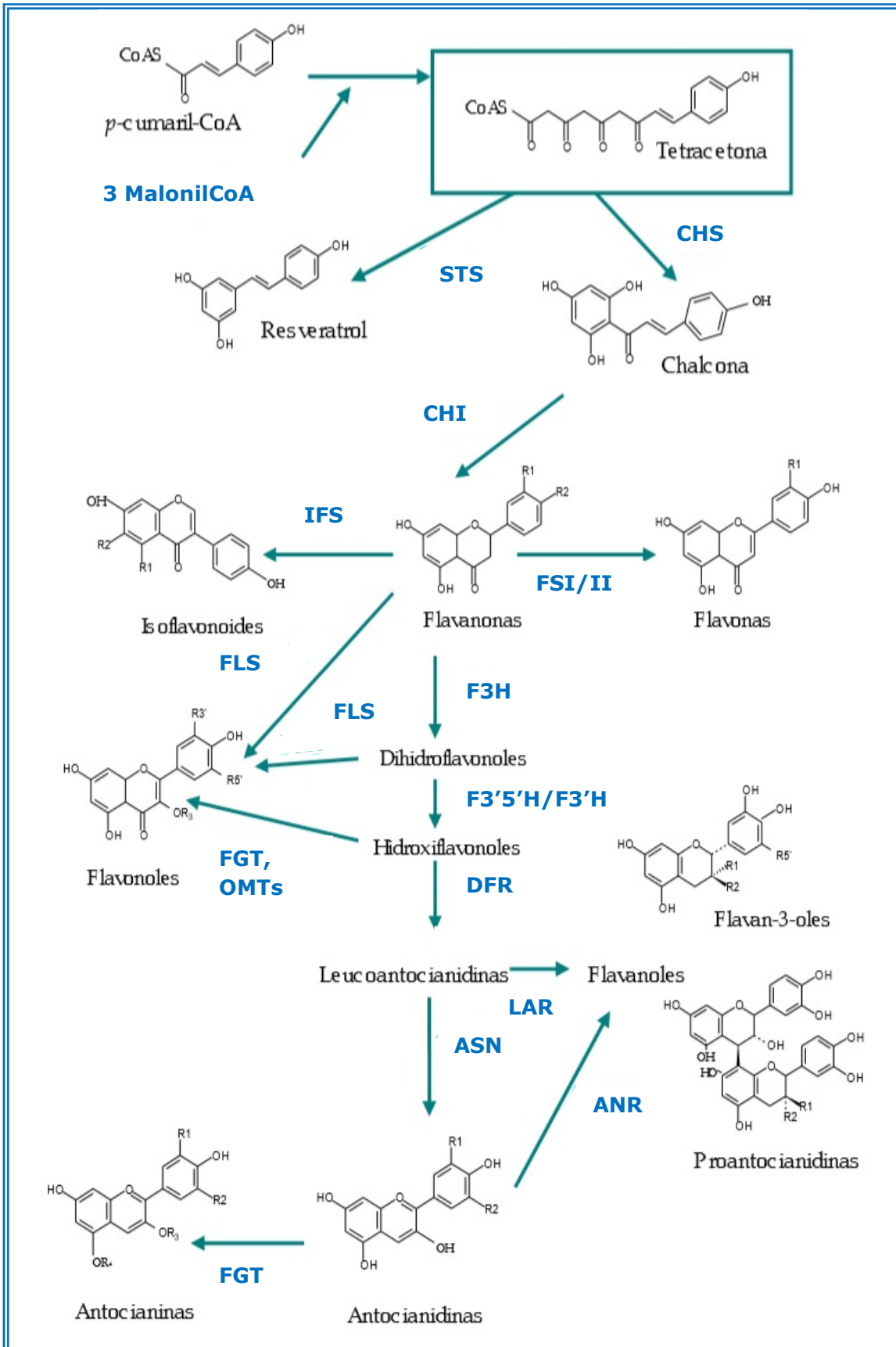


Figura 1.8. Ruta biosintética de flavonoides (Dixon & Steele, 1999; Lianghua Xie, Su, Sun, Zheng, & Chen, 2018).

Los flavonoides tienen una amplia variedad de funciones biológicas, que incluyen protección contra rayos ultravioleta (UV), resistencia a enfermedades y estrés, crecimiento y desarrollo de polen, nodulación de leguminosas, moléculas de señalización en plantas e interacciones microbianas, transporte de auxinas, polinización de insectos y pigmentación (Falcone Ferreyra, Rius, & Casati, 2012; Zhou, Wang, & Peng, 2011).

Se ha demostrado que se puede favorecer la biosíntesis de flavonoides mediante la irradiación con luz UV, aumentando por tanto su capacidad antioxidante (Antognoni et al., 2007). Se ha argumentado que estos compuestos se forman como mecanismo de defensa frente a los animales herbívoros, aportando un sabor amargo, menor digestibilidad y efectos adversos sobre la permeabilidad de la pared intestinal (Dixon, Liu, & Jun, 2013).

1.2.3. Clasificación y principales fuentes naturales

Los flavonoides se pueden clasificar en seis tipos principales, en función de las variaciones que presente su estructura. Estos grupos son: flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavanoles (flavan-3-oles) y antocianidinas, que se representan en la Figura 1.9. Otros grupos de flavonoides que aparecen en menor proporción en los componentes dietéticos son: chalconas, dihidrochalconas, dihidroflavonoles, flavan-3,4-dioles, cumarinas, y auronas. El esqueleto flavonoide básico puede tener numerosos sustituyentes, aunque la mayoría de los flavonoides ocurren naturalmente como glicósidos en lugar de agliconas (Del Rio et al., 2013). La actividad de los flavonoides como antioxidantes, depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química (Perez-Vizcaino & Fraga, 2018).

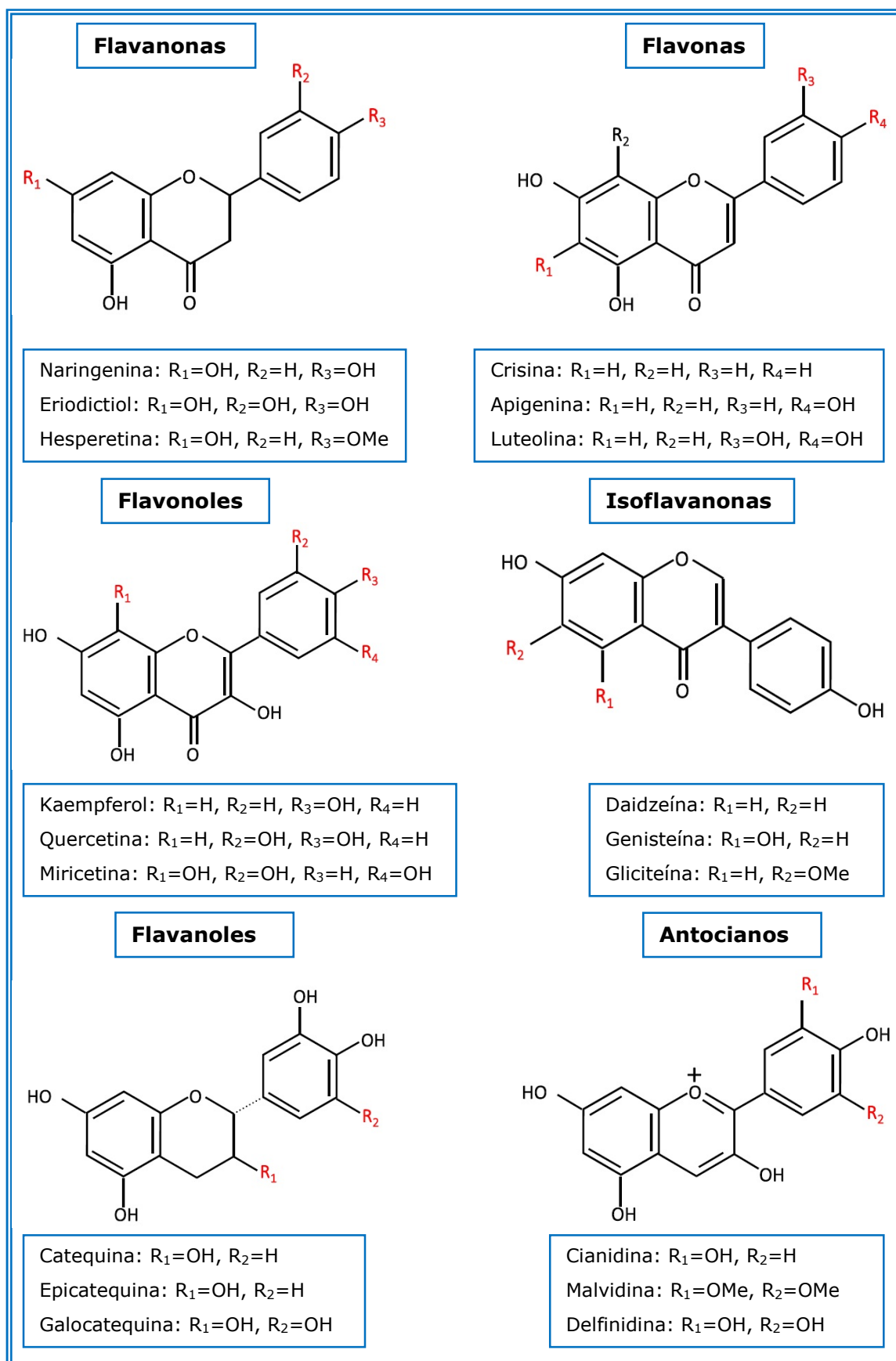


Figura 1.9. Tipos más comunes de compuestos flavonoides (Nabavi et al., 2020; Wang, Li, & Bi, 2018).

Flavanonas

Se ponen de manifiesto numerosos estudios sobre flavanonas, cuya relevancia radica, no solo en ser precursoras de otros flavonoides, sino también por poseer actividad antitumoral, antimicrobiana y terapéutica (Harborne & Williams, 2000; Raffa et al., 2017). Las flavanonas no son planas y tienen un centro quiral en C₂ y las podemos encontrar principalmente en frutas cítricas, tomates y plantas aromáticas como la menta, otorgando en algunas ocasiones el sabor amargo de algunas frutas. Dentro del grupo de flavanonas y sus derivados hidroxilados o glicosilados, podemos encontrar naringenina en el pomelo, pinocembrina en la miel, narirutina y hesperetina en la naranja y eriodictiol en el limón (Perez-Vizcaino & Fraga, 2018). Un litro de zumo de naranja puede contener entre 200 y 600 mg de hesperetina (Figura 1.10), siendo las membranas internas de la naranja y mandarina donde mayor contenido de flavanonas se encuentran (González-Castejón & Rodríguez-Casado, 2011).

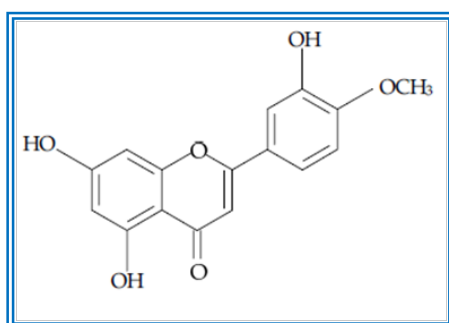


Figura 1.10. Hesperetina.

Flavonas

En este grupo encontramos compuestos relevantes por su actividad fitoestrogénica y antimicrobiana (Harborne & Williams, 2000). Las flavonas derivan de las flavanonas por acción de las enzimas flavonas sintetasas (FSI o FSII) (Figura 1.8). Estas enzimas introducen dobles enlaces entre el C₂ y C₃ del anillo C de la flavanona (Del Rio et al., 2013). Las flavonas están presentes en pequeñas cantidades en vegetales como el perejil y el apio. Estos compuestos son amarillos y están presentes en

algunas flores o en sus frutos, como en la piel de las uvas, otorgando el color amarillento a los vinos blancos. Las más representativas son la tricetina, la luteolina (Figura 1.11), y apigenina en forma glicosilada. Los cítricos contienen flavonas polimetoxiladas tales como: tengeritina, nobiletina y sinensetina, siendo éstas las más hidrofóbicas (Manach et al., 2004; Wu et al., 2013).

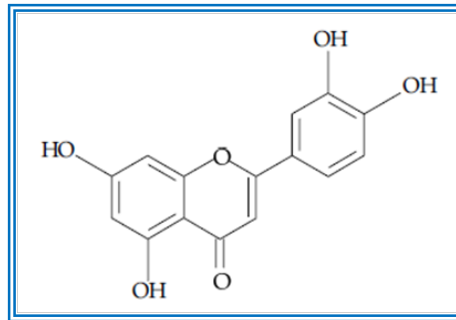


Figura 1.11. Luteolina.

Isoflavonas

En estos compuestos se han descrito diferentes efectos inmunomoduladores, además forman parte junto con estilbenos y lignanos, del grupo de fitoestrógenos de origen vegetal con actividad estrogénica (Dijsselbloem, Vanden Berghe, De Naeyer, & Haegeman, 2004; Yasui et al., 2019). Son ejemplos de isoflavonoides: la genisteína (Figura 1.12) y la daidzeína, la primera es el isoflavonoide más sencillo, pero funciona como precursor de isoflavonoides más complejos, siendo sintetizada por la vía fenilpropanoide a partir de la flavanona naringenina, por acción de la enzima isoflavona sintetasa (IFS) (Figura 1.8). La enzima da lugar a la migración del C₂ del anillo B al C₃ del anillo C de dicha flavanona, seguida de la hidroxilación en el C₂ de este mismo anillo. El intermedio resultante es el: 2-hidroxi-genisteína, es inestable y rápidamente se deshidrata para generar el producto estable correspondiente que es la genisteína. Las propiedades de estos compuestos les permiten regular el balance hormonal en la mujer, pudiendo prevenir la osteoporosis y actuar como potentes antioxidantes, que protegen frente al desarrollo de cáncer de mama y reducen los efectos de la menopausia. Las Isoflavonas causan estos efectos,

al competir con el propio estrógeno del cuerpo por los mismos sitios receptores en las células. Algunas de las enfermedades por estrógeno excesivo, pueden disminuirse de esta manera (Papaj et al., 2020). Estos flavonoides se encuentran casi exclusivamente en plantas leguminosas y su principal fuente es la soja. La semilla de soja contiene entre 580 y 3800 mg de isoflavonas/Kg y la leche de soja contiene de 30 a 175 mg/L (Crozier et al., 2009; Messina & Bennink, 1998).

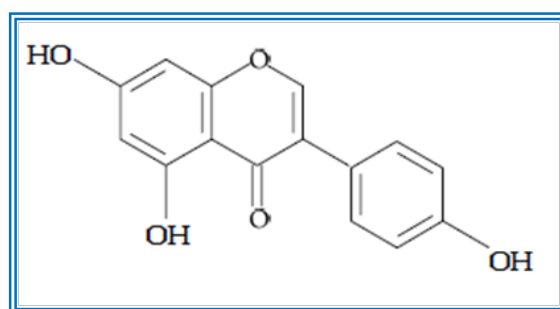


Figura 1.12. Genisteína.

Flavonoles

Los flavonoles son los flavonoides más extendidos, se encuentran en todo el reino vegetal con la excepción de algas y hongos. La distribución y las variaciones estructurales de los flavonoles son extensas, dentro de este grupo se incluyen derivados acilados, hidroxilados, metilados y glicosilados. Son ejemplos la quercetina (Figura 1.13), miricetina, kaempferol y rutina, entre otros. La sustitución del hidrógeno, en el carbono 3 del anillo C de las flavonas por el grupo 3-hidroxi, genera los flavonoles (Crozier et al., 2009).

Lo más destacado de este grupo de flavonoides es su actividad antiinflamatoria, antioxidante y antimicrobiana (Raffa et al., 2017; Wang et al., 2018). La biosíntesis de flavonoles ocurre directamente mediante la reducción de flavanonas por la flavonol sintetasa (FLS). También pueden ser sintetizadas por una ruta indirecta, que consiste en la hidroxilación de flavanonas, en el carbono 3 del anillo C por la enzima flavanona 3- β -hidroxilasa (F3H), para generar dihidroflavonoles, que posteriormente son reducidos mediante instauración por la enzima FLS, dando lugar a

flavonoles (Figura 1.8). Otros flavonoles, son sintetizados a partir de la hidroxilación del dihidroflavonol en los carbonos 3', 5' o sólo en el carbono 3' del anillo B, por las enzimas flavonoide 3', 5'-hidroxilasa (F3'5'H) o flavonoide 3'-hidroxilasa (F3'H), respectivamente. Otras enzimas como la flavonoide glucosiltransferasa (GT) y la flavonoide O-metiltransferasa (OMTs), al llevar a cabo la reacción de glicosilación o metilación, respectivamente, contribuyen a la diversificación de flavonoles (Dixon & Steele, 1999).

Los flavonoles poseen una coloración amarillenta y son muy frecuentes en los alimentos, se presentan en forma glicosilada y se acumulan en los tejidos de las plantas, ya que su síntesis y concentración dependen de factores ambientales. Las frutas contienen entre 5 y 10 flavonoles glicosilados diferentes (Antognoni et al., 2007), siendo muy abundantes en vino tinto, té, cebolla, escarola, puerros y brócoli, encontrándose generalmente en concentraciones relativamente bajas, comprendidas entre 15-30 mg/Kg de peso fresco. En el vino tinto y el té las concentraciones pueden llegar a los 45 mg/L y en la cebolla con aproximadamente 1200 mg/Kg de flavonoles, es donde mayor cantidad de estos compuestos se encuentra (González-Castejón & Rodríguez-Casado, 2011).

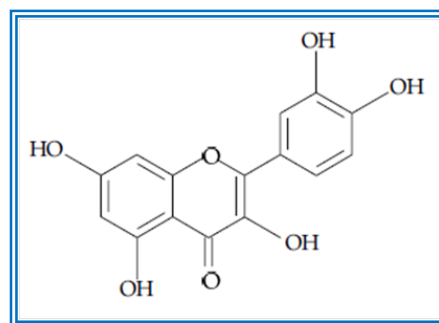


Figura 1.13. Quercetina.

Flavonoles

Estos flavonoides pueden presentarse en forma monomérica, denominándose flavan-3-oles, como: la catequina y la epicatequina (Figura 1.14) y en forma polimérica, en este caso formando las proantocianidinas

(taninos condensados). Los flavanoles no son planos, ya que presentan posiciones quirales, poseen actividad antioxidante, anticancerígena, antialérgica, antiinflamatoria, antimicrobiana y vasodilatadora entre otras, siendo unos compuestos muy importantes para la salud (Fernandes, Nave, Gonçalves, de Freitas, & Mateus, 2012; Ottaviani, Heiss, Spencer, Kelm, & Schroeter, 2018).

En la formación de catequina, intervienen las enzimas dihidroflavonol reductasa (DFR) y leucoantocianidina reductasa (LAR), actuando sobre dihidroflavonoles, mientras que en la formación de epicatequina, epigalocatequina y epigalocatequina galato, actúan las enzimas antocianidina sintetasa (ANS) y antocianidina reductasa (ANR) sobre las leucoantocianidinas (Punyasiri et al., 2004) (Figura 1.8).

Las catequinas y epicatequinas se encuentran en muchos tipos de frutas, siendo en los albaricoques con 250 mg/Kg de peso fresco de fruta, donde mayor concentración de estos compuestos se encuentra. Aun así, las principales fuentes de estos compuestos son el té verde, el chocolate y el vino tinto, encontrándose concentraciones entre 200 y 300 mg/L, en un vaso de estas bebidas. Los compuestos galocatequina, epigalocatequina y epigalocatequina galato, se encuentran en algunas semillas leguminosas y uva, aunque es en el té, donde se encuentra en mayor proporción (de Mejía, Ramirez-Mares, & Puangpraphant, 2009; González-Castejón & Rodríguez-Casado, 2011).

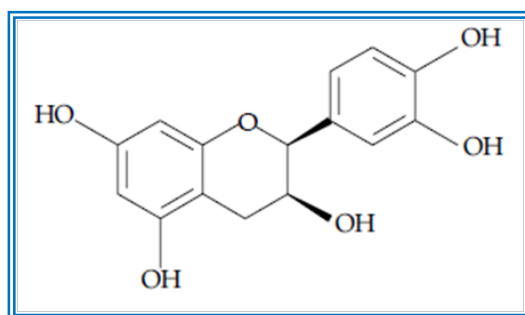


Figura 1.14. Epicatequina.

Las proantocianidinas conocidas también con el nombre de taninos condensados, son dímeros, oligómeros y polímeros de catequinas (Figura 1.15), unidos por enlaces C₆ o C₄ y C₈. Las podemos encontrar en

muchas frutas como la uva, melocotón y manzana, en bebidas como cerveza, vino y té y en productos como el chocolate la canela y el cacao (Pérez-Jiménez, Arranz, & Saura-Calixto, 2009).

Estos compuestos son responsables del carácter astringente de la fruta y de la amargura del chocolate, al formar complejos con las proteínas de la saliva, resultando difícil su cuantificación, ya que según sea el estado de maduración del fruto, podemos encontrar diferentes estados de polimerización. El contenido en alimentos de proantocianidina es difícil de estimar, debido a la variedad de sus estructuras y pesos moleculares que existen, es importante destacar que las proantocianidinas inhiben procesos inflamatorios y protegen de enfermedades cardiovasculares (González-Castejón & Rodríguez-Casado, 2011).

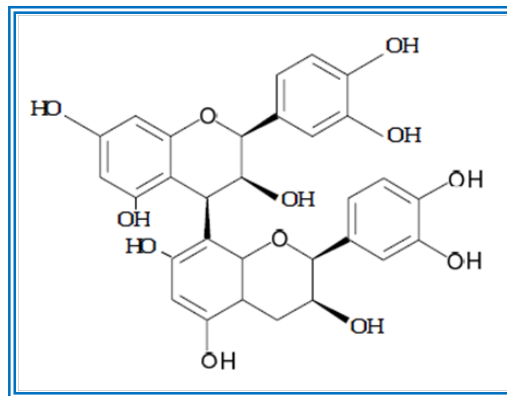


Figura 1.15. Procianidina B1 (epicatequina-(4 β →8)-catequina).

Antocianos

Son los pigmentos responsables de la llamativa coloración de las flores y los frutos de ciertos vegetales, son hidrosolubles y se encuentran en las vacuolas de estas células. Confieren a las hojas, flores y frutos el color rojo, púrpura o azul (Kong, Chia, Goh, Chia, & Brouillard, 2003). Son derivados glicosilados de las antocianidinas, es decir, están constituidas por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace glicosídico. Son altamente inestables en forma de aglicona y son resistentes a la luz, el pH y las condiciones de oxidación mientras están en las plantas.

En el grupo de las antocianidinas se incluyen compuestos como la pelargonidina, cianidina (Figura 1.16), peonina, malvidina y petunidina (Kharadze, Japaridze, Kalandia, & Vanidze, 2018).

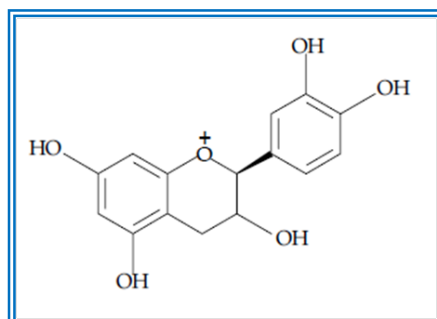


Figura 1.16. Cianidina.

Las antocianinas también presentan actividad antiinflamatoria, antitumoral y antioxidante (Kharadze et al., 2018). Tanto las antocianinas como las antocianidinas presentan pigmentos coloreados, aunque estas últimas son altamente inestables (Carmona, Alquézar, Marques, & Peña, 2017).

En la formación de las antocianinas, la flavanona es convertida en dihidroflavonol por la enzima flavanona 3- β -hidroxilasa (F3H). El paso siguiente, implica la conversión del dihidroflavonol en leucoantocianidina, mediante la enzima dihidroflavonol reductasa (DFR) (Turnbull et al., 2004). La leucoantocianidina es transformada en antocianidina por la enzima antocianidina sintetasa (ANS) (Figura 1.8).

Sus funciones en las plantas son múltiples, desde la de protección de la radiación ultravioleta, hasta la de atracción de insectos polinizadores. El pH es un factor importante a tener en cuenta, ya que además de influir en el color de los antocianos, también afecta a su estabilidad, un menor valor de pH implica un color rojo más intenso y una mayor estabilidad (Carmona et al., 2017).

En la dieta humana, se encuentran en el vino tinto, ciertas variedades de cereales y vegetales como la cebolla, guisantes, calabaza, pero sobre todo en frutas, como cerezas, frambuesas, moras y ciruelas, entre otras. Su concentración en los alimentos viene determinada por la intensidad del color, pudiendo alcanzar valores entre 2000-4000 mg/Kg en

la grosella y en la fresa, aumentando su contenido con el proceso de la maduración. El vino tinto contiene entre 200-350 mg de antocianinas/L, las cuales se transforman en complejas estructuras a medida que aumenta la edad del vino (González-Castejón & Rodríguez-Casado, 2011; Kharadze et al., 2018).

1.2.4. Actividad biológica de los flavonoides

Algunos efectos importantes que ejercen los flavonoides sobre la salud son: el antioxidante, la quelación de metales, la inhibición enzimática, la regulación génica y otros muchos beneficios para la salud, (Grzesik, Naparło, Bartosz, & Sadowska-Bartosz, 2018). Últimamente los flavonoides están adquiriendo gran interés por su potencial terapéutico en los huesos, donde la ingesta de flavonoides ha demostrado mejorar la salud ósea debido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Preethi Soundarya, Sanjay, Haritha Menon, Dhivya, & Selvamurugan, 2018). La acción antioxidante de los flavonoides depende de la interacción con determinadas macromoléculas y de la hidrofiliidad (Saija et al., 1995; Terao, 2017).

Las catequinas, presentan capacidad para neutralizar o secuestrar radicales libres y además actúan regulando ciertas actividades enzimáticas celulares, las cuales se llevan a cabo gracias a la capacidad de los flavonoides para alterar la estructura de la membrana plasmática, permitiendo actuar sobre diversos procesos relacionados con la membrana, como la señalización celular, el ciclo celular, el metabolismo de ácidos grasos insaturados, la apoptosis y la funcionalidad de las mitocondrias (Caturla, Vera-Samper, Villalaín, Mateo, & Micol, 2003; Funes, Laporta, Cerdán-Calero, & Micol, 2010).

Las acciones farmacológicas presentadas por los flavonoides se pueden clasificar en varios grupos: vasoprotectores, modificadores de los niveles de colesterol y lípidos, antiagregantes, modificadores enzimáticos, controladores de actividad estrogénica, anticancerígenos, antifúngicos y antibacterianos, antiurémica, antivírica, antiespasmótica, antialérgicos y

antiinflamatoria (Perez-Vizcaino & Fraga, 2018; Raffa et al., 2017; Wang et al., 2018).

En la Tabla 1.3, aparecen resumidas las actividades biológicas asignadas a los flavonoides y algunas de las fuentes donde podemos encontrar estos compuestos.

Tabla 1.3. Propiedades beneficiosas de los flavonoides.

Compuesto	Acción	Alimentos	Referencia
Flavanonas Naringenina Hesperidina Eriocitrina	Antioxidante Antitumoral Antimicrobiano	Cítricos Miel Tomates Menta	(Donia, Gerges, & Mohamed, 2018)
Flavonas Luteolina Apigenina	Antioxidante Fitoestrógenos Antimicrobiano	Pimiento Apio Perejil	(Kwon, 2017)
Isoflavonas Daidzeína Genisteína	Antioxidante Actividad estrogénica	Soja Plantas leguminosas	(Dixon, 2004) (Markovic et al., 2015)
Flavonoles Quercetina Miricetina Kaempferol	Antioxidante Disminuyen la agregación plaquetaria y la oxidación de los LDL Antimutagénico Antiinflamatorio Antimicrobiano	Manzana Uva Cereza Granada Cebollas Escarola Té Brócoli	(Ben Yakoub et al., 2018; Choi, Park, Kim, & Kim, 2015)
Flavonoles Catequinas Proantocianidinas	Antioxidante Antimutagénico Antiinflamatorio Antialérgico Anticancerígeno Antimicrobiano Disminuye la oxidación	Uva Manzana Pera Cerezas Granada Té Chocolate	(Bondonno, Bondonno, Ward, Hodgson, & Croft, 2017)

	de las LDL y la agregación plaquetaria		
Antocianos Cianidina Pelargonidina	Antioxidante Antitumoral Antiinflamatorio	Cereza Uva Fresa	(Kharadze et al., 2018)

1.2.5. Propiedades antioxidantes de los flavonoides

Los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno, que se generan durante el metabolismo normal de este o bien son inducidos por factores exógenos, suponen un riesgo potencial para las células y tejidos. Los flavonoides que incorporamos a través de la dieta, nos protegen de la oxidación de nuestro cuerpo, mediante diferentes tipos de mecanismos, actuando como pequeñas enzimas antioxidantes, las cuales comprenden en la mayoría de los casos una transferencia de electrones entre el radical libre y el flavonoide (Taleb et al., 2018).

Los flavonoides ejercen la acción antioxidante, incluso a bajas concentraciones y tienden a ser estables cuando se unen al radical libre. Los últimos estudios realizados, sugieren que el mecanismo por el que los flavonoides ejercen su actividad antioxidante, se basa en la transferencia de electrones, que conlleva la aparición de una molécula radical activa y la capacidad de estos compuestos para quelar metales (Sridevi, Srividya, Sembulingam, & Sembulingam, 2018; Wan & Jiang, 2018).

La unión del flavonoide con el radical recibe el nombre de (aroxilo), siendo un compuesto bastante inestable pero reactivo, además la colaboración entre moléculas antioxidantes, favorece la recuperación del radical aroxilo por otros antioxidantes, como el ascorbato (Jabeen et al., 2017).

La mayor o menor capacidad antioxidante de los flavonoides, depende del número y posición de sus grupos hidroxilo unidos a las estructuras del anillo, presentando características estructurales como son: la presencia de un grupo catecol (3', 4'-dihidroxi) en el anillo B, el cual confiere una mayor estabilidad al radical y participa en la deslocalización de

electrones (resaltado en amarillo); la presencia de un doble enlace insaturado entre C₂ y C₃ en conjugación con el enlace 4-oxo en el anillo C (resaltado en color rojo); los grupos 3- y 5-OH del anillo A, con el grupo 4-oxo del anillo C y la presencia de un grupo hidroxilo en C₃ en el anillo C, son útiles para tener el máximo potencial de atrapadores de radicales libres (resaltado en color verde).

Otra característica muy importante, es la presencia de grupos funciones capaces de unir iones de metales de transición, como el hierro o el cobre (Perez-Vizcaino & Fraga, 2018).

El ejemplo de flavonoide que cumple todas estas propiedades químicas descritas es el flavonol, quercetina (Figura 1.17), en amarillo, el grupo catecol del anillo B; en rojo, enlace insaturado del anillo C; en verde, función 4-oxo en el anillo C; en azul, puntos con capacidad de quelación de metales.

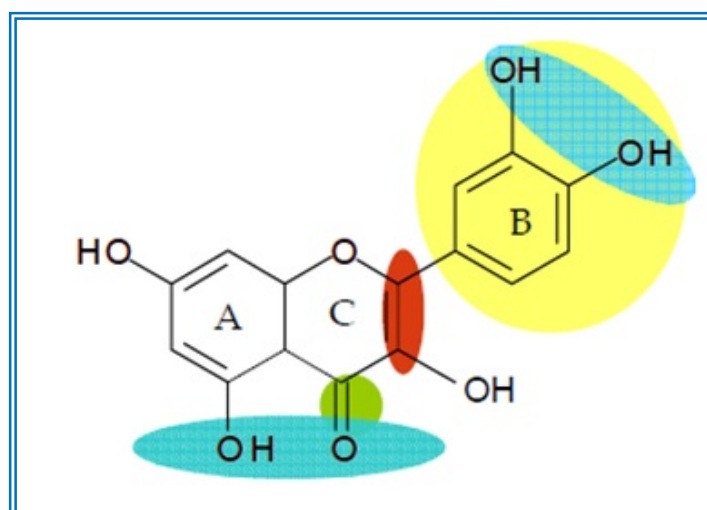


Figura 1.17. Estructura de quercetina, resaltando los grupos implicados en su actividad antioxidante (Williams, Spencer, & Rice-Evans, 2004).

Se ha estimado una actividad antioxidante en la quercetina, cinco veces mayor que la determinada para las vitaminas C y E, además posee una hidrosolubilidad similar a esta última. Exhibe un efecto sinérgico con estas vitaminas, ya que el ácido ascórbico reduce la oxidación de la quercetina, de manera que combinado con ella permite al flavonoide mantener sus propiedades durante más tiempo, protegiendo de la oxidación

a la vitamina E (Jiménez-Aguilar & Grusak, 2017; Perez-Vizcaino & Fraga, 2018).

Otro factor a tener en cuenta a la hora de valorar el poder antioxidante de los flavonoides, es la presencia de grupos galato. Numerosos estudios demuestran, que muchas de las actividades biológicas de las catequinas del té, se relacionan con la presencia de grupos pirogalol y ácido gálico en su estructura (Figura 1.18), haciendo aumentar de manera considerable a la planta la capacidad antibacteriana y anticarcinogénica, favoreciendo su actividad antioxidante como secuestrante de radicales libres (Funes et al., 2010; Grzesik et al., 2018).

Un flavonoide muy estudiado, dentro del grupo de las catequinas, ha sido la epigalocatequina-3-galato (EGCG), siendo el principal compuesto bioactivo en el té verde, por sus efectos de quimioprevención del cáncer y por su capacidad de quimioterapia contra esta enfermedad (Rady et al., 2018), además se ha demostrado que EGCG, tiene una actividad antiviral para muchos virus (Carneiro, Batista, Braga, Nogueira, & Rahal, 2016).

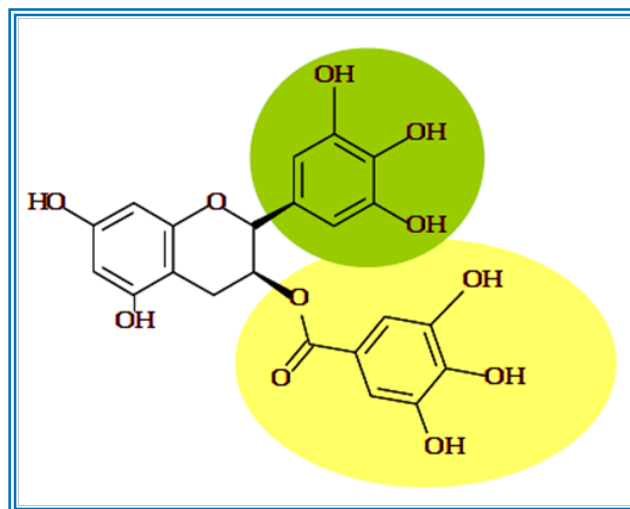


Figura 1.18. Grupo galato presente en la molécula epigalocatequina galato (EGCG). En verde, grupo pirogalol; en amarillo, grupo galato (Williams et al., 2004).

En la siguiente figura, se puede observar el proceso de degradación de un compuesto de este tipo.

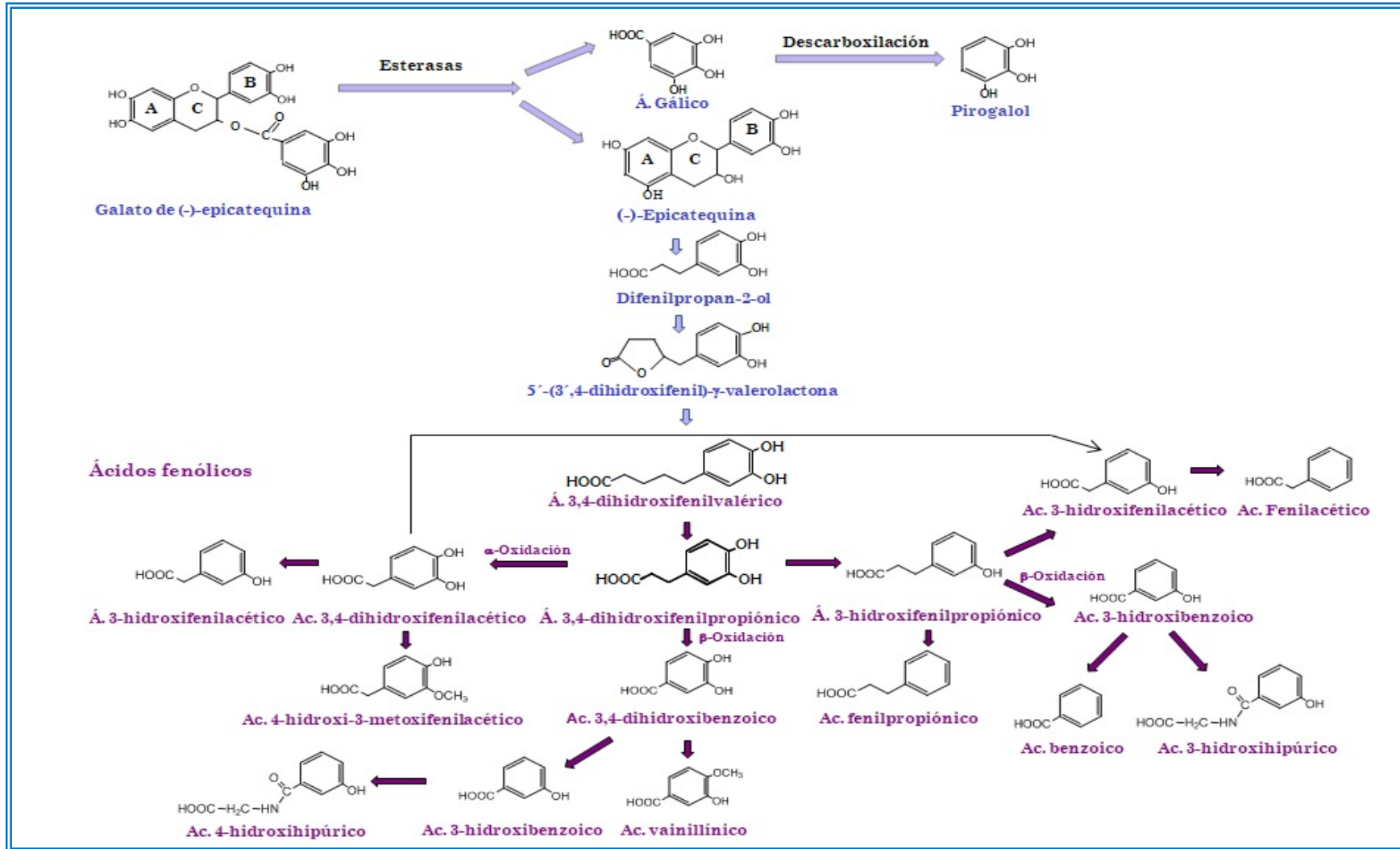


Figura 1.19. Degradación de compuestos polifenólicos, con formación de pirogalol y ácidos fenólicos (Crozier et al., 2010).

Aunque los flavonoides presentan gran poder antioxidante, es necesario tener en cuenta otros factores como la biodisponibilidad y las interacciones en el tracto gastrointestinal, así como la influencia de la conjugación y el metabolismo (Karabin, Hudcova, Jelinek, & Dostalek, 2015; Sytar, Hemmerich, Zivcak, Rauh, & Brestic, 2018).

Los estudios que indican posibles efectos tóxicos de los flavonoides, son superados de forma mucho más amplia por aquellos que referencian su capacidad como antioxidantes y protectores de enfermedades. Algunos autores determinan posibles efectos tóxicos de los flavonoides, cuando estos se ingieren de manera artificial y excesiva mediante suplementos, pudiendo causar daño oxidativo al reaccionar con varias biomoléculas, como lípidos, proteínas y ADN (Procházková, Boušová, & Wilhelmová, 2011).

Las últimas investigaciones sobre flavonoides, reportan que el impacto positivo que ejercen en la salud humana, así como su metabolismo y bioactividad, está intrínsecamente ligado al microbioma intestinal, por tanto, se piensa menos en la acción antioxidante directa y más en comprender los complejos efectos sobre las dianas moleculares y las enzimas, en tipos celulares específicos (Williamson et al., 2018).

1.2.6. Farmacocinética y biodisponibilidad

Previamente a la absorción, los flavonoides son divididos en glicósido y en la aglicona correspondiente, siendo el glicósido mucho más soluble en agua y por tanto más soluble que la aglicona. Este hecho determina una espera de cerca de 2 horas, para poder alcanzar concentraciones máximas de flavonoides después de una ingesta (Witteimer et al., 2005). La distribución de estos compuestos, es generalizada en todos los tejidos corporales, gracias a sus propiedades hidrofóbicas (Youdim, Kaiser, Begley, Rice-Evans, & Abbott, 2004).

Después de la ingesta de flavonoides se produce una rápida biotransformación, debido a múltiples reacciones que ocurren en diferentes partes del cuerpo. En el hígado, ocurren las primeras y en la microbiota intestinal del colon, se producen la degradación de los flavonoides no

absorbidos (Liyang Xie et al., 2016). Se forman por tanto, diferentes compuestos conjugados, que pueden ser eliminados por diferentes vías, en función de la solubilidad. Cuando son insolubles en agua se excretan al duodeno junto con la bilis y cuando son solubles en agua, son los riñones los encargados de eliminarlos junto con la orina (Abrahamse, Kloots, & van Amelsvoort, 2005; Bernatova, 2018).

1.2.7. Aplicaciones de los flavonoides

Una de las más importantes aplicaciones de estos compuestos, es su empleo como productos farmacéuticos, ya que se ha demostrado que la administración de flavonoides produce una actividad antiinflamatoria, evitando edemas, insuficiencias cardíacas leves, problemas cerebrales relacionadas con la edad, disminución de la concentración de colesterol en sangre, aportando así mayor protección frente a las enfermedades cardiovasculares y protegiendo el hígado (Kwon, 2017; Li et al., 2013).

Algunos flavonoides se pueden transformar en derivados con gran poder edulcorante, siendo esta propiedad utilizada por la industria para la realización de productos que puedan reemplazar a los aditivos sintéticos, siendo una solución para la prevención de la diabetes (Mohan & Nandhakumar, 2014).

Otra aplicación muy en auge a nivel industrial, es el uso de los flavonoides como alimento funcional, es decir, alimentos saludables que son capaces de mejorar el estado general de salud y reducen la posibilidad de sufrir una enfermedad. Estos alimentos, se introducen de manera habitual en la dieta del consumidor y se espera de ellos, que puedan eliminar componentes perjudiciales del organismo, y que a su vez puedan aumentar la concentración de otros, que si son reconocidos como beneficiosos y que no estén presentes de manera habitual en la dieta. De esta manera, estos alimentos se relacionan con efectos beneficiosos y con propiedades de reducción del riesgo de enfermedad del propio alimento (Ye & Shaw, 2019). Para conseguirlo, se pueden adicionar extractos vegetales ricos en compuestos fenólicos a determinados alimentos (Larrosa, Llorach, Espín, & Tomás-Barberán, 2002; Terao, 2017).

1.2.8. Biomarcadores de los compuestos fenólicos

En los últimos años, se han utilizado varios metabolitos de flavonoides como biomarcadores, con el fin de estudiar la biodisponibilidad y la ingesta dietética de estos compuestos polifenólicos en la orina y en las heces después del consumo (Del Rio, Borges, & Crozier, 2010; Penczynski et al., 2017).

Los ácidos fenólicos de bajo peso molecular, han sido principalmente los compuestos más utilizados para este propósito. Se han descrito gran cantidad de procedimientos analíticos, para la determinación de compuestos polifenólicos y sus metabolitos, los cuáles se han utilizado en estudios epidemiológicos y clínicos (Corradini et al., 2011; Oroian et al., 2015).

Los estudios metabólicos mostraron, que la concentración en compuestos fenólicos ácidos, es más alta en muestras de orina cuando la dieta se ha enriquecido con flavonoides, en concreto, se produce un aumento del sulfato de ácido vanílico, del ácido fenilacético y de los ácidos hidroxifenilacéticos (Ulaszewska et al., 2016). El grupo de metabolitos del ácido gálico, en las muestras de orina, también resulta ser un buen biomarcador de la ingesta de vino (Urpi-Sarda et al., 2015). El ácido hipúrico se excreta en altas cantidades, el ácido 4-hidroxifenilacético y el ácido 3-hidroxifenilacético, también se han observado en la orina de animales alimentados con un nivel alto de flavonoides (Prior et al., 2010).

Existen otros metabolitos microbianos fenólicos, que se pueden determinar después de la ingesta de cacao en humanos y en la orina de las ratas, y que se han propuesto como biomarcadores (Urpi-Sarda et al., 2009). Los resultados apoyan el metabolismo extenso de polifenoles dietéticos en el colon, los cuales dependiendo de la concentración del sustrato y del tiempo de residencia, formarán diferentes fenoles simples, que pueden considerarse biomarcadores del metabolismo colónico si se absorben posteriormente. También es evidente, que se forma un número relativamente pequeño de productos de degradación fenólica en el colon, a partir del grupo diverso de polifenoles naturales (Rechner et al., 2004).

Tal y como se ha subrayado al principio de este apartado, sin lugar a dudas, la propiedad de los compuestos polifenólicos que mayor

interés ha despertado en la actualidad es su potencial poder antioxidante. Los polifenoles actúan como antioxidantes mediante distintos mecanismos de acción. Son potentes atrapadores de radicales libres, que son aquellas especies inestables que provocan la peroxidación lipídica, produciendo la destrucción de las membranas celulares y mutaciones en el ADN de las células, jugando un papel importante en distintas enfermedades tales como: enfermedades cardiacas, artritis, cáncer, cataratas, arterioesclerosis, diabetes, osteoporosis y enfermedades degenerativas como el Alzheimer.

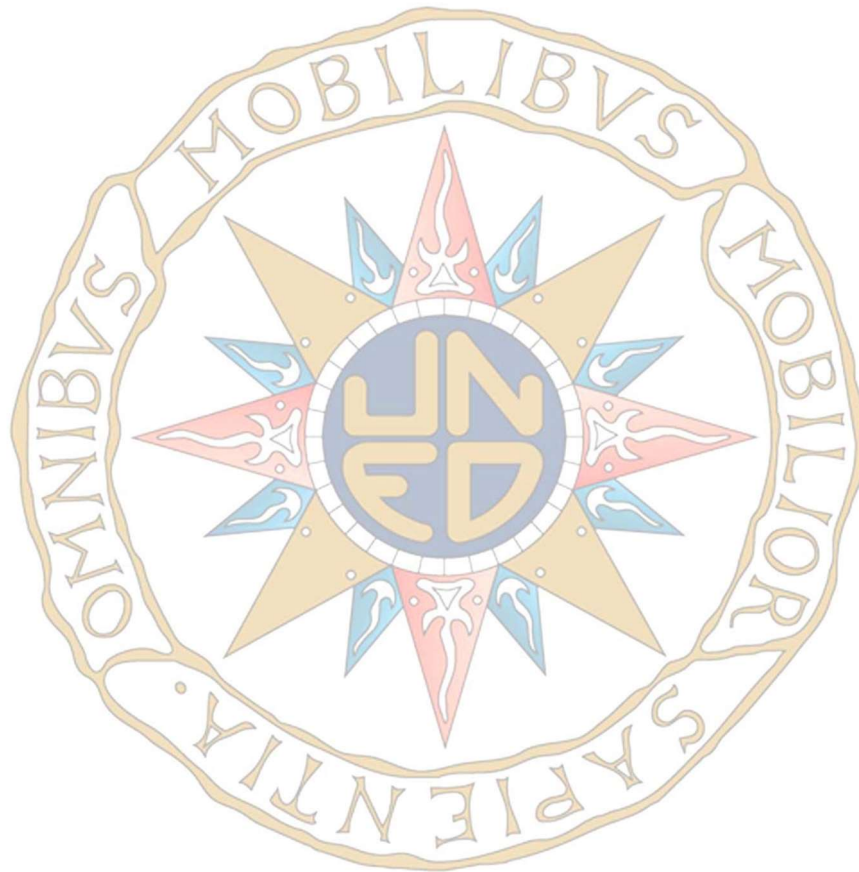
Los compuestos polifenólicos actúan como agentes quelatantes de metales de transición, uniéndose a estos iones y reduciendo su capacidad de generar radicales libres. Por sus propiedades de solubilidad pueden localizarse sobre las partículas de lipoproteínas de baja densidad (LDL), disminuyendo el consumo de los antioxidantes propios de las LDL como vitamina E y carotenoides, y en algunos casos, regenerando vitamina E oxidada en la partícula de LDL.

Poseen la capacidad de inhibir, activar o proteger enzimas específicas en el organismo. Por ejemplo, se ha observado que el consumo de (+)-catequina, quercetina y vino tinto, preservan la actividad de la paraoxonasa, enzima asociada a las lipoproteínas de alta densidad (HDL) o "colesterol bueno", que puede hidrolizar y regenerar lípidos oxidados en las LDL. Otros polifenoles inhiben oxigenasas celulares y por tanto, la producción de especies oxidantes de oxígeno y nitrógeno dentro del cuerpo humano. Quercetina y sus glicósidos, inhiben la oxidación de las moléculas de LDL inducida por lipoxigenasa. (+)-Catequina, (-)-epicatequina, epigalocatequina, epicatequina galato y epigalocatequina galato, inhiben la producción de radicales libres por inhibición de la xantino oxidasa hepática.

Por otra parte, los flavonoides disminuyen la presión arterial y regulan adecuadamente el ritmo cardiaco. Se comentan a continuación, dos ejemplos representativos que pueden enmarcarse dentro de este contexto. En Japón hay un alto porcentaje de fumadores y sin embargo hay una baja incidencia de enfermedades cardiacas; esto se atribuye al elevado consumo de té (la media es de 7 tazas por día), ya que los polifenoles del té verde disminuyen la oxidación de LDL y ayudan a mejorar la salud cardiovascular. Un caso parecido es el conocido como la "paradoja francesa", ya que a pesar del elevado contenido en grasa de su dieta, fundamentalmente por el

consumo de quesos, la incidencia de enfermedades cardiovasculares es muy baja, atribuyéndose en este caso a la ingesta de polifenoles mediante el consumo de vino tinto.

En definitiva, los polifenoles son potentes antioxidantes, denominados también antioxidantes naturales y/o dietéticos, presentando propiedades relacionadas con la prevención de la oxidación, tales como antiinflamatorias, antialérgicas y anticancerígenas (Ross & Kasum, 2002).



Capítulo 2

FLAVAN-3-OLS Y SUS METABOLITOS

2.1. INTRODUCCIÓN

El estilo de vida personal, puede estar marcado por diversas opciones como: el consumo de tabaco, una actividad física regular, la dieta equilibrada y otros muchos factores importantes para la prevención de enfermedades y el mantenimiento de la salud. En particular, una ingesta baja en productos vegetales se ha identificado como contribuyente clave a la aparición de enfermedad, reflejado en las recomendaciones y pautas dietéticas (Lim et al., 2012). Además de los nutrientes esenciales para la vida, los alimentos de origen vegetal contienen fitoquímicos, denominados compuestos bioactivos, que si bien no son esenciales para la vida, afectan de manera importante a la salud y a la reducción de enfermedad y por tanto existe un gran interés por desarrollar recomendaciones dietéticas y valores de referencia de estos compuestos bioactivos dietéticos (Pardo et al., 2014).

El papel de los flavonoides y compuestos relacionados, se ha tratado cada vez más en investigación sobre nutrición humana, haciéndolos responsables, en parte de los efectos protectores para la salud. A diferencia de las tradicionales vitaminas, no son esenciales para el bienestar a corto plazo, pero cada vez hay más evidencias de que las ingestas modestas a largo plazo pueden tener efectos favorables sobre la incidencia de cánceres y enfermedades crónicas, incluida la enfermedad cardiovascular (CVD) y la diabetes tipo II. Se han estudiado los diferentes grupos de compuestos que están involucrados, su destino en el cuerpo después de la ingestión, su paso a través del tracto gastrointestinal y los mecanismos de acción a través de sus metabolitos, hallando evidencias de protección e impacto en la salud humana (Del Rio et al., 2013).

Los flavonoides se metabolizan ampliamente en el intestino. Los que alcanzan el hígado son sometidos a una metabolización mayor, pudiendo reingresar de nuevo en el organismo a través de la circulación enterohepática, para después excretarse a través de la orina o las heces. Los metabolitos que no sufren absorción en el intestino y llegan al colon, pueden ser degradados por la microbiota del colon y ser reabsorbidos (Maleki et al., 2019).

Tal y como se ha subrayado en el capítulo anterior, sin lugar a duda, la propiedad de los compuestos polifenólicos que mayor interés ha despertado en la actualidad es su potencial poder antioxidante. Este poder lo ejercen a través de distintos mecanismos de acción. Los polifenoles son potentes atrapadores de radicales libres, siendo estos radicales aquellas especies inestables que provocan la peroxidación lipídica, produciendo la destrucción de las membranas celulares y mutaciones en el ADN de las células. Los compuestos polifenólicos actúan como agentes quelatantes de metales de transición, uniéndose a estos iones y reduciendo su capacidad de generar radicales libres.

Por sus propiedades de solubilidad pueden localizarse sobre las partículas de lipoproteínas de baja densidad (LDL), ayudando a otros antioxidantes como la vitamina C y los carotenoides, y en algunos casos, regenerando vitamina E oxidada en la partícula de LDL. Estos compuestos polifenólicos juegan un papel importante en distintas enfermedades tales como, enfermedades cardíacas, artritis, cáncer, cataratas, arteriosclerosis, diabetes, osteoporosis y enfermedades degenerativas como el Alzheimer (Del Rio et al., 2013; Winklhofer-Roob et al., 2017).

Poseen la capacidad de inhibir, activar o proteger enzimas específicas en el organismo, por ejemplo, la (+)-catequina y la quercetina preservan la actividad de la paraoxonasa, enzima asociada a las lipoproteínas de alta densidad (HDL), e inhiben oxigenasas celulares y por tanto, la producción de especies oxidantes de oxígeno y nitrógeno dentro del cuerpo humano. La (+)-catequina, (-)-epicatequina, epigallocatequina, epicatequina-galato y epigallocatequina-galato, inhiben la producción de radicales libres por inhibición de la xantina oxidasa hepática.

Por otra parte, los flavonoides disminuyen la presión arterial y regulan adecuadamente el ritmo cardíaco. En diferentes estudios se ha demostrado, que los polifenoles del té verde disminuyen la oxidación de las LDL y ayudan a mejorar la salud cardiovascular, así el consumo moderado de vino tinto disminuye la incidencia de enfermedades cardiovasculares. En definitiva, los polifenoles son potentes antioxidantes, denominados también como antioxidantes naturales y/o dietéticos, presentando propiedades

relacionadas con la prevención de la oxidación, como antiinflamatorias, antialérgicas y anticancerígenas (Chen, Xie, & Shi, 2013).

2.2. FLAVAN-3-OLES

Los flavan-3-oles, son los flavonoides más abundantes en la dieta, por tanto, el análisis y la cuantificación de éstos y sus metabolitos, podrían reportar información valiosa para evaluar sus mecanismos de absorción y biodisponibilidad. Los flavan-3-oles son considerados como ingredientes funcionales (bioactivos), principalmente debido a sus características antioxidantes en alimentos naturales y procesados, bebidas, remedios herbales y suplementos alimenticios (Aron & Kennedy, 2008). El grupo está formado por compuestos monoméricos y poliméricos (Figura 2.1), que han sido ampliamente investigados por su papel en la salud humana y la nutrición, tal y como desvelan los estudios epidemiológicos que sobre estos compuestos se han llevado a cabo (Zhang et al., 2014).

Los estudios llevados a cabo sobre flavan-3-oles, sugieren que, tras la ingestión y posterior reacción con proteínas ricas en prolina, cruzan la barrera intestinal hasta el hígado, donde se degradan aún más en metabolitos y pueden llegar a todos los tejidos dentro de las horas siguientes al consumo (Clifford, van der Hooft, & Crozier, 2013).

Se han descrito gran cantidad de procedimientos analíticos, los cuales han sido utilizados en estudios epidemiológicos y clínicos, para la determinación de flavan-3-oles y sus metabolitos (de Rijke et al., 2006; Nolvachai & Marriott, 2013; Oroian et al., 2015), aunque actualmente las técnicas cromatográficas junto con la espectrometría de masas, se han convertido en los métodos más ampliamente utilizados, estas técnicas son muy caras y no siempre están disponibles en laboratorios de rutina, por lo tanto, es importante la incorporación que otros nuevos procedimientos como las herramientas quimiométricas y voltamperométricas (Volikakis & Efstathiou, 2005).

Los flavan-3-oles se encuentran en frutas, corteza, hojas y semillas de muchas plantas, y en alimentos como frutas y bayas, nueces,

frijoles, algunos cereales (cebada y sorgo), especias como el curry y la canela, el cacao y algunos chocolates oscuros (He et al., 2011).

2.2.1. Estructura

Las características estructurales principales de los flavan-3-oles, son la ausencia de un doble enlace en posición C₂ y C₃, lo que da lugar a la aparición de un carbono asimétrico (lo cual conlleva a la formación de dos centros quirales en estas posiciones) y la presencia de un hidroxilo en el carbono 3. Su presencia en los alimentos afecta a diferentes parámetros de calidad tales como la astringencia, amargura, acidez, dulzor, viscosidad salival, aroma, y color (Del Rio et al., 2013).

Los flavan-3-oles, representan la subclase de flavonoides estructuralmente más compleja, e incluye desde los monómeros simples: (+)-catequina y su isómero (-)-epicatequina, ambos muy abundantes en la naturaleza y que pueden hidroxilarse para formar galocatequinas o someterse a esterificación con el ácido gálico para formar estructuras complejas (proantocianidinas oligoméricas y poliméricas). Otros como la (-)-catequina y la (+)-epicatequina son relativamente raros. La (-)-epiafzelequina y la (+)-afzelequina, presentan una distribución más limitada. Las formas oligoméricas de estos compuestos se llaman proantocianidinas, también conocidos como taninos condensados. La clase más abundante de las proantocianidinas en las plantas son las procianidinas, las cuales están compuestas exclusivamente por subunidades (epi) afzelequina y (epi) galocatequina, que se llaman propelargonidinas y prodelfinidinas, respectivamente (Crozier, Jaganath, & Clifford, 2009; Del Rio et al., 2013).

La epicatequina (EC), pertenece al grupo de flavan-3-oles que tienen diversos beneficios para la salud en humanos. Las epicatequinas son compuestos polifenólicos que tienen anillos de hidrocarburos que contienen grupos hidroxilos en diferentes posiciones. Sus estereoisómeros son epigalocatequina (EGC), epicatequina-3-galato (ECG) y epigalocatequina-3-galato (EGCG) (Moller, Nilsson, & Crescenzi, 2004). La epigalocatequina

galato (EGCG) es la más abundante en el té verde y al igual de otros polifenoles su biodisponibilidad es baja. EGCG, es un producto de esterificación de EGC con GA, que parece ser responsable de la mayoría de las propiedades beneficiosas (Qiu et al., 2012).

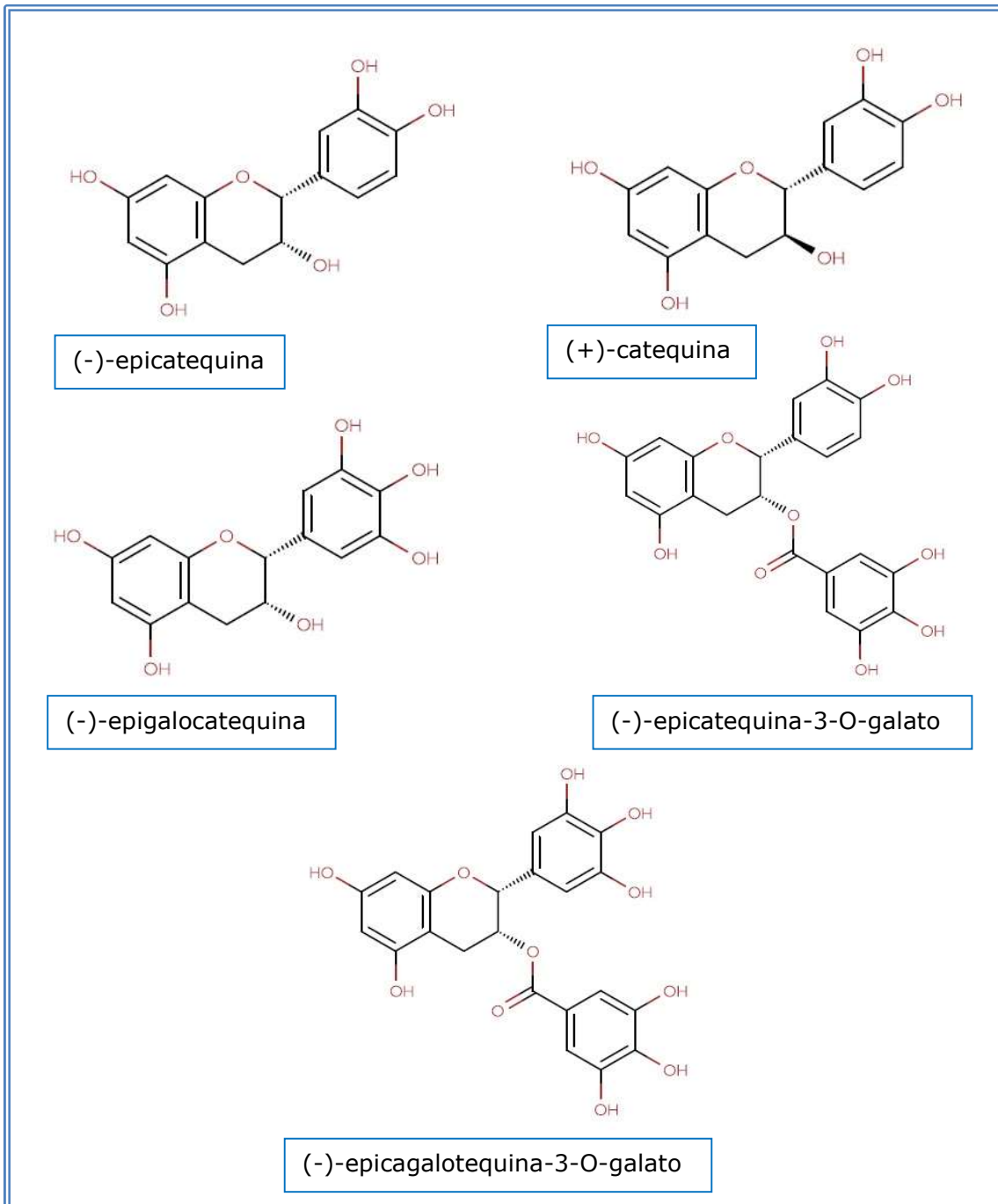


Figura 2.1. Estructuras químicas de los principales flavanoles de la dieta (Zhang et al., 2014).

Los taninos condensados, son estructuras poliméricas compuestas por la unión de flavanoles, se encuentran en abundancia en la naturaleza y son responsables de la textura, color y sabor astringente y amargo de algunos alimentos como el té, café o el chocolate. A estos compuestos se le atribuyen propiedades antimicrobianas, antioxidantes, anticancerígenas y antiinflamatorias, además de ser beneficiosos para la prevención de enfermedades relacionadas con el metabolismo (Braga, Rosa, & Dias, 2014; Nolvachai, Kulsing, Boysen, Hearn, & Marriott, 2014). Existen diferentes variedades de clases de proantocianidinas dependiendo de la unidad monomérica de la que esté compuesta, el número de grupos hidroxilo, su posición en los anillos aromáticos y su configuración espacial en las unidades de flavanoles constituyentes. Pueden presentar una estructura homogénea constituida únicamente por unidades de un único flavanol o presentar una composición mixta con distintas unidades monoméricas, siendo las procianidinas (polímeros homogéneos de (epi)catequina, mayoritarias respecto a otras proantocianidinas en el reino vegetal (Hong & Chen, 2013; Santhakumar et al., 2018).

Según el tipo de unión, las proantocianidinas pueden ser del tipo A o del tipo B. En los enlaces del tipo B, las unidades de flavan-3-oles de (+)-catequina y (-)-epicatequina, realizan un acoplamiento oxidativo entre el carbono C₄-C₆ o C₄-C₈, siendo los segundos más abundantes, creando oligómeros o polímeros. Las proantocianidinas del tipo A, además de este enlace interflavánico, presentan una unión adicional (éter), entre el carbono C₂ y el hidroxilo del carbono C₇ principalmente. Las proantocianidinas pueden aparecer como polímeros de hasta 50 unidades y los monómeros de flavan-3-oles son ampliamente transformados durante el procesamiento tradicional de vinos, cacao y té negro, en este último caso produciendo teaflavinas y tearubiginas (Crozier et al., 2009).

Las proantocianidinas del tipo B, se encuentran en muchas especies de plantas como el cacao, manzana, té, uva etc., mientras que las de tipo A son más extensas en ciruela, cacahuete, aguacate, canela, curry, etc. Las proantocianidinas de tipo A resisten más la despolimerización, por ejemplo, en condiciones de tiólisis, se representan ejemplos de estas estructuras mencionadas en la Figura 2.2.

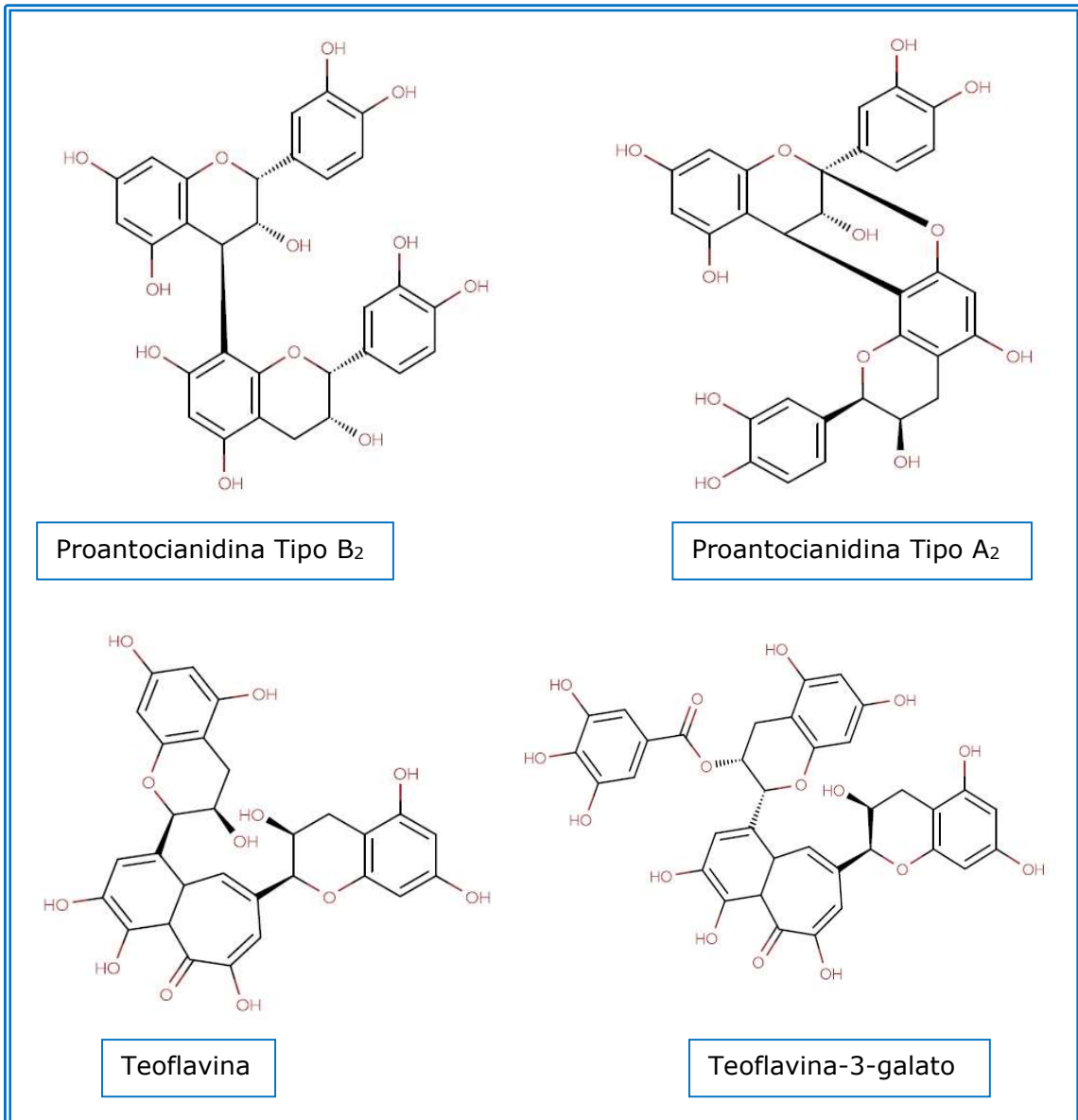


Figura 2.2. Estructuras químicas de proantocianidinas (Zhang, Gao, An, Xu, & Zhang, 2014).

2.2.2. Fuentes dietéticas

Los flavan-3-oles, son uno de los tipos de flavonoides más comúnmente consumidos y se encuentran en una amplia gama de alimentos diferentes. Las diferencias culturales de cada país, hace que estos compuestos se incorporen en la dieta a través de fuentes diferentes, así países con una fuerte cultura del té como Japón, Australia o el Reino Unido, el té es la principal fuente de ingesta total de flavan-3-oles, mientras que

en otros países, las principales fuentes son las frutas, en particular frutas de pepita (Murphy, Walker, Dyer, & Bryan, 2019; Salmi et al., 2013). Estas diferencias geográficas también marcan la variación respecto al tipo de flavan-3-oles consumido, por ejemplo: en los países con una alta ingesta de té, los más consumidos son los galatos de flavan-3-oles (teaflavinas y tearubiginas). Por el contrario, en países donde las principales fuentes son las frutas y verduras, los principales tipos de los flavan-3-oles consumidos son las proantocianidinas, formadas por monómeros de (-)-epicatequina.

En el Reino Unido, donde el té es la principal fuente de flavan-3-oles, teaflavinas y tearubiginas aportan más de la mitad de la ingesta total de flavan-3-oles, mientras que en España, donde las principales fuentes son las frutas, el principal contribuyente son las proantocianidinas, mientras que la ingesta de teflavinas y tearubiginas es insignificante (Salmi et al., 2013; Sun, Zhang, Li, & He, 2013).

Aunque se conozcan los datos sobre la composición de los alimentos, la ingesta real de flavan-3-oles presenta gran variabilidad, ya que depende de factores como la variedad del producto, crecimiento, condiciones de cosecha, almacenamiento, procesado y otros muchos. De hecho, es probable que el contenido varíe incluso en frutas de la misma planta (Zamora-Ros, Touillaud, Rothwell, Romieu, & Scalbert, 2014).

Los flavan-3-oles se encuentran abundantemente en frutas como el albaricoque, las guindas, las uvas y las moras, también en cereales como la cebada, con un importante contenido de proantocianidinas. La (+)-catequina y la proantocianidina prodelfinidina B₃, son los principales flavan-3-oles monoméricos y diméricos, respectivamente que se encuentran en la cebada y la malta, donde la prodelfinidina B₃ es el principal contribuyente a la actividad atrapadora de radicales libres. En la cerveza, en concreto la (-)-epicatequina se encontró en valores comprendidos entre 0,89 y 1,48 mg/L, la (+)-catequina entre 1,41 y 3,75 mg/L (Pakade, Cukrowska, Lindahl, Turner, & Chimuka, 2013).

Las proantocianidinas también se han detectado en los frutos secos, como las avellanas y las nueces. De hecho, las avellanas y las nueces de pecan son particularmente ricas en proantocianidinas (5 g/Kg), mientras que las almendras y los pistachos contienen (1,8-2,4 mg/kg), las nueces

California (0,67 g/Kg), los cacahuets tostados (0,16 g/Kg) y los anacardos (0,09 g/Kg) (Crozier et al., 2009). El chocolate negro derivado de las semillas tostadas de cacao, es también una fuente rica de procianidinas, los flavan-3-oles y la proantocianidina B₂, los dímeros B₅ y los trímeros C₁ se encuentran en los granos de cacao fresco. También encontramos estos compuestos en la menta, la albahaca, el romero y el eneldo (Bi, Tian, & Row, 2013; Wang & Wang, 2013).

En un estudio realizado sobre el contenido de flavan-3-oles en 56 tipos de alimentos y bebidas, se mostró que la fruta, verduras, legumbres, bebidas (sidra, café, cerveza, té y vino), y el chocolate contienen cantidades significativas de catequinas y proantocianidinas, en concreto la ciruela, manzana Reineta y fruta del madroño, contienen alrededor de 50, 38 y 21 mg/100g de peso fresco, respectivamente. De los vegetales estudiados, las habas presentan alto contenido de flavan-3-oles (155 mg/100g de peso fresco). De las bebidas estudiadas, el té negro y el té verde presentan 27 y 44 mg/100ml de flavan-3-oles, mientras que el chocolate presenta 7 mg/100g de estos compuestos (Arabi, Ghaedi, & Ostovan, 2017).

2.3. METABOLITOS

La evidencia de los efectos promotores de salud de los polifenoles, ha sido fortalecida en los últimos años por varios estudios basados en una variedad de modelos experimentales como: experimentos *in vitro*, *in vivo* y ensayos clínicos. Recientes investigaciones han demostrado los mecanismos involucrados en el metabolismo de polifenoles en humanos (Qiu et al., 2012). En este respecto, debe tenerse en cuenta las modificaciones que estos compuestos pueden sufrir antes de llegar a diferentes células, tejidos y órganos, condicionando así sus efectos sobre la salud. Se deben de tener presentes las diferentes rutas metabólicas de los polifenoles dietéticos en humanos y la biodisponibilidad de estos.

En la literatura, se han identificado numerosos metabolitos en plasma (Urpi-Sarda et al., 2015), orina (Pereira-Caro et al., 2016), heces

(de Ferrars et al., 2014) y en muestras de tejido (Kahle et al., 2011), recogidas después del consumo de alimentos ricos en polifenoles en humanos y en animales. Numerosos estudios identifican a múltiples ácidos fenólicos pertenecientes a diferentes estructuras y familias químicas, como metabolitos (Pereira-Caro et al., 2016), que pueden ser utilizados como biomarcadores de la ingesta dietética de flavonoides en muestras de orina humana (Penczynski et al., 2017). Los estudios metabólicos, hallan ácidos fenólicos en concentraciones más altas en muestras de orina, cuando las dietas han sido enriquecidas con flavonoides, encontrando ácidos vanílicos, fenilacéticos e hidroxifenilacéticos (Ulaszewska et al., 2016). Los metabolitos del ácido gálico, también resultan buenos biomarcadores, el ácido hipúrico, el ácido 4-hidroxifenilacético, el ácido 3-hidroxifenilacético y otros ácidos fenólicos, también pueden ejercer la función de marcadores, siendo excretados en muestras de orina (Urpi-Sarda et al., 2015).

Después de la ingestión, los polifenoles se metabolizan sufriendo alteraciones durante su primer contacto con la saliva, después mediante la biotransformación de las formas conjugadas a través de reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis y conjugación enzimática, lo que resulta en varios conjugados solubles en agua, metabolitos capaces de cruzar la barrera entérica para su posterior distribución a los órganos y finalmente se excretan en la orina. Sin embargo, solo un bajo porcentaje de los polifenoles ingeridos (~5-10% de la ingesta total), se absorben en el intestino delgado después del proceso de desconjugación. Los restantes polifenoles no modificados (~90-95%) y el resto de formas conjugadas que alcanzan el intestino delgado a través de la bilis, cruzan el tracto intestinal y se acumulan en el intestino grueso, donde sufren una acción enzimática por parte de la microbiota intestinal y en consecuencia, llevando a la producción de una variedad de metabolitos que exhiben diferentes efectos fisiológicos.

Estas transformaciones ocurren a través de diferentes pasos como la hidrólisis de éster y glicósido, desmetilación, deshidroxilación y descarboxilación, llevada a cabo por los grupos de bacterias presentes en el intestino grueso. Finalmente, cruzan a la circulación del portal, llegan al hígado y son sometidos a un mayor metabolismo, antes de entrar en la

circulación sistémica y los tejidos periféricos y ser excretado por los riñones (Del Rio, Borges, & Crozier, 2010).

El colon, es un sitio activo para el metabolismo de los polifenoles, e implica la biotransformación de compuestos de flavan-3-oles a fenoles simples, ácidos fenólicos, aromáticos y lactonas con diferentes grados de hidroxilación (Neto et al., 2017; Sanchez-Patan, Monagas, Moreno-Arribas, & Bartolome, 2011). Por otro lado, los estudios que consideran la excreción de metabolitos fenólicos en la orina y las heces, revelaron que estos metabolitos representan la mayor proporción de la ingesta de polifenoles (Penczynski et al., 2017; Urpi-Sarda et al., 2009).

En la siguiente Tabla, se puede apreciar la biodisponibilidad de algunos metabolitos formados en el intestino grueso.

Tabla 2.1. Biodisponibilidad y principales metabolitos del colon de los polifenoles dietéticos más comunes (Santhakumar et al., 2018).

<p>Ácidos fenólicos</p>	<p>Máxima absorción a nivel del intestino delgado. Máximo nivel de concentración plasmática a los 30 minutos después de la ingestión. Las excreciones urinarias representan aproximadamente el 40% de la ingesta total, la excreción máxima después de 8 h de ingesta</p>	<p>Ácidos vanílico, hipúrico, hidroxibenzóico, dihidrocafeíco, dihidrofelúrico</p>	<p>(Del Rio et al., 2013; Zanotti et al., 2015)</p>
<p>Estilbenos</p>	<p>El resveratrol se absorbe en la zona gastrointestinal, puede modificarse por los enterocitos y por los hepatocitos, produciendo formas de glucurónido y sulfato</p>	<p>Dihidroresveratrol, 3,4-dihidro-trans-estilbeno, 3,4-dihidroxibibencil (lunularin)</p>	<p>(Calabriso et al., 2016; Del Rio et al., 2013)</p>
<p>Elagitaninos</p>	<p>Los elagitaninos se hidrolizan en el intestino liberando ácido elágico. En el intestino grueso el ácido elágico es metabolizado por la microbiota, produciendo compuestos conocidos como urolitinas, las cuales se absorben en gran medida, sulfatada y glucuronidada por células intestinales y hepáticas</p>	<p>Urolitina A y B (forma libre, glucurónidos y sulfatada) Urolitina D Ácido dimetilelágico</p>	<p>(Bialonska, Kasimsetty, Khan, & Ferreira, 2009; Del Rio et al., 2013)</p>

Antocianinas	Bajo nivel de absorción intestinal. Las antocianinas son hidrolizadas por la microbiota formando diferentes metabolitos	Conjugados metílicos, gluconidados y sulfatados. Ácido protocatecuíco, síringico, vanílico, propiónico y hidroxihipúricos Catecol Piragalol	(Aura et al., 2005; Del Rio et al., 2013)
Flavan-3-oles y Proantocianidinas	Entre el 8-17% de los monómeros de flavan-3-oles se absorben en el intestino. La fracción no absorbida restante llega al intestino grueso casi intacta, donde la acción de la microbiota intestinal descompone el esqueleto de flavonoide, generando varios metabolitos de bajo peso molecular	Ácidos valéricos. Fenilvalerolactonas. Ácidos benzoicos, hipúricos, fenilacéticos y fenilpropiónicos	(Del Rio et al., 2013; Plaza, Domínguez-Rodríguez, Castro-Puyana, & Marina, 2018)
Flavonoles	Baja absorción a nivel del intestino delgado. Las enzimas microbianas descomponen el flavonol, formando varios metabolitos polares con bajo peso molecular	Ácido propiónico y protocatecuíco. Derivados del ácido hidroxifenilacético	(Del Rio et al., 2013; Zanotti et al., 2015)

Por lo tanto, muchos investigadores han desviado su atención desde el polifenol original ingerido en los alimentos, a los metabolitos, especialmente a metabolitos microbianos. En las últimas décadas se ha reconocido que la microbiota colónica juega un papel importante en la biotransformación, absorción, metabolismo y actividades fisiológicas de los polifenoles *in vivo* (Shan & Wang, 2011).

En los últimos años, se sugieren varios metabolitos como biomarcadores de la biodisponibilidad y la ingesta dietética de compuestos polifenólicos en orina y heces después del consumo, los ácidos fenólicos de bajo peso molecular, han sido principalmente los compuestos propuestos para este propósito (Pereira-Caro et al., 2016; Ulaszewska et al., 2016; Urpi-Sarda et al., 2015).

La influencia del metabolismo microbiano intestinal en la actividad antioxidante de catequina y epicatequina, es complicada e involucra una serie de reacciones complejas, donde la actividad antioxidante aumenta significativamente, lo que puede ser debido a la apertura del anillo C, o a la formación de metabolitos intermedios con tres grupos meta-hidroxilo. Posteriormente, la actividad de estos metabolitos intermedios produce aperturas del anillo A, lo que conlleva actividades antioxidantes ligeramente afectadas de los metabolitos. La deshidroxilación en el C3' y C4' del anillo B disminuyó en gran medida la actividad antioxidante, destacando que algunos metabolitos intermedios pueden llegar a exhibir una actividad antioxidante aproximadamente dos veces más alta que los compuestos originales de catequina y epicatequina, como es el caso del ácido 2-(3', 4'-dihidroxifenil) acético. Se desvela por tanto que los cambios en la actividad antioxidante durante la biotransformación de catequina y epicatequina por la microbiota fecal, son un hecho y contribuye beneficios para la salud humana (Xia, Zhang, Xu, & Deng, 2015).

2.3.1. Biodisponibilidad de flavan-3-oles y sus metabolitos

Los estudios de biodisponibilidad con flavan-3-oles, se suelen realizar con suplementación aguda con té verde o a base de productos derivados del cacao. Se ha investigado la biodisponibilidad de las diferentes

formas enantioméricas, de los monómeros de flavan-3-oles en humanos adultos, que habían consumido cantidades iguales de (-)-epicatequina, (-)-catequina, (+)-epicatequina y (+)-catequina, en una bebida de cacao. Los resultados según las concentraciones plasmáticas y la excreción urinaria, reflejan la biodisponibilidad de los estereoisómeros clasificándolos de la siguiente manera: en primer lugar la (-)-epicatequina, después la (+)-epicatequina con una concentración semejante a la (+)-catequina y por último la (-)-catequina.

También hubo diferencias en el destino metabólico de los epímeros de catequina y epicatequina, tal y como se refleja en las proporciones de los metabolitos metilados y en los no metilados, la proporción de (-)-epicatequina y de (+)-epicatequina en plasma y en orina es diferente, lo que demuestra que la estereoquímica de los flavan-3-oles también afecta el metabolismo (Song, Li, Wang, & Chen, 2009).

Flavan-3-oles en el cacao

Los estudios realizados en humanos sobre el destino después de la ingestión de cacao, se han llevado a cabo en plasma y en orina utilizando un tratamiento con β -glucuronidasas y sulfatasas y analizando la aglicona (epi)catequina mediante HPLC. Después del consumo de 40 g de chocolate negro, que contiene 282 μmol de (-)-epicatequina, los niveles de metabolitos (epi)catequina en plasma, aumentaron rápidamente alcanzando una concentración máxima de 355 nM en un tiempo máximo de 2 horas, indicando por tanto que la absorción gastrointestinal se ha producido en el intestino delgado (Tasselli, Donato, & Drioli, 2008). Otros estudios basados también en un chocolate que contiene 760 μmol de (-)-epicatequina y 214 μmol de catequina, llevados a cabo en plasma y orina, arrojaron una concentración máxima de metabolitos de $4,8 \pm 0,9 \mu\text{M}$ en un tiempo máximo de 2 horas. La excreción urinaria total en un tiempo de 24 horas de los metabolitos de (epi)catequina y metilados fue de $227 \pm 39 \mu\text{mol}$, que corresponde al 29,9% de la (-)-epicatequina ingerida. Este alto nivel de excreción de metabolitos de (epi)catequina, ha sido confirmado en una serie

de posteriores estudios de alimentación con cacao y té verde (Del Rio et al., 2013).

Otros estudios de biodisponibilidad de flavan-3-oles en cacao, se llevaron a cacao en plasma y en orina usando HPLC-MS, después de la ingestión de una bebida que contenía 22,3 μmol de catequina y 23 μmol de (-)-epicatequina. En este ensayo se detectaron dos metabolitos de flavan-3-oles en plasma: un O-metil-(epi)catequina-O-sulfato y un (epi)catequina-O-sulfato, ambos tenían una concentración máxima por debajo de 100 nM, en un tiempo de absorción máximo de 1,5 h. Mencionar que después de 8 h, solo quedaron niveles de trazas en el sistema circulatorio. Los dos flavan-3-oles sulfatados fueron también los principales metabolitos en la orina, además de un (epi)catequina-O-glucurónido. La razón de estos diferentes perfiles de metabolitos, especialmente el dominio de los glucurónidos en algunos estudios y sulfatos en otros, podrían deberse a pérdidas de (epi) catequina-O-sulfatos, los cuales son inestables durante el procesamiento de muestras antes del análisis. La cantidad de metabolitos de flavan-3-oles excretado en orina durante un período de recolección de 24 h fue de 7,32 \pm 0,82 μmol , lo que equivale al 16,3% \pm 1,8% de la ingesta. (Steiakaki, Chatzidakis, Kefalopoufos, & Ververidis, 2008).

En otros estudios llevados a cabo en cacao, sobre los metabolitos de flavan-3-oles que estaban disponibles después de la ingesta de 6,2 mmol de (-)epicatequina, se identificaron los siguientes metabolitos en plasma con un tiempo máximo de 2 horas y unas (concentraciones máximas indicadas entre paréntesis): (-)-epicatequina-3'-O-glucurónido (589 \pm 85 nM), 4'-O-metil(-)-epicatequina-7-O-glucurónido (20 nM), (-)-epicatequina-3'-O-sulfato (331 \pm 26 nM), (-)-epicatequina-5-O-sulfato (37 \pm 3 nM) y (-)-epicatequina-7-O-sulfato (12 \pm 1 nM), algunos se pueden observar en a Figura 2.3. También estaban presentes en pequeñas cantidades los: 3' y 4'-O-metil(-)-epicatequina-O-sulfatos, cada uno de los cuales fue sulfatado en la posición C₅ o C₇. Esto establece que el metabolito principal de la (-)-epicatequina en humanos es (-)-epicatequina-3'-O-glucurónido, y que metabolitos de sulfato se acumulan en plasma a concentraciones ligeramente más bajas (Ottaviani et al., 2012).

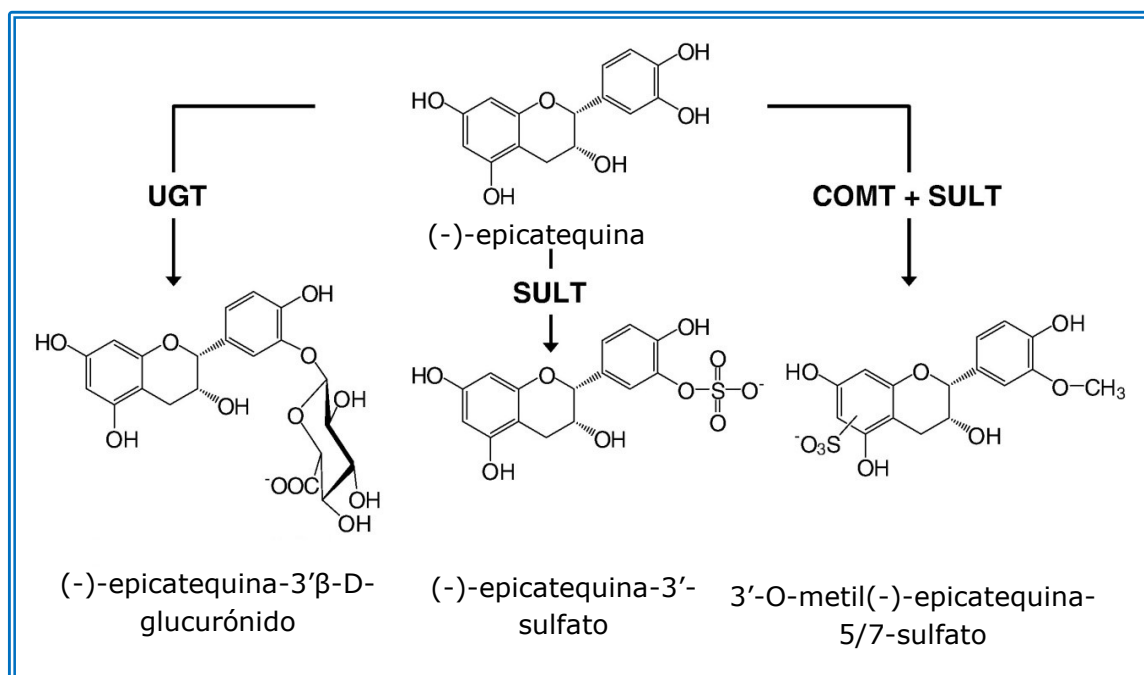


Figura 2.3. Metabolitos de (-)-epicatequina detectados después del consumo de una bebida rica en cacao UGT, UDP-glucuronosil-transferasa; SULT, sulfotransferasa; COMT, catecol-O-metiltransferasa (Ottaviani, Momma, Kuhnle, Keen, & Schroeter, 2012).

El estrés oxidativo se ha relacionado con patologías que pueden degenerar en enfermedades crónicas, por tanto, la prevención de estas patologías puede evitar efectos dañinos, desde un enfoque quimiopreventivo y terapéutico.

Los estudios epidemiológicos han demostrado que los antioxidantes dietéticos, parecen jugar un papel principal en la prevención de enfermedades crónicas causadas por el estrés oxidativo, como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y diabetes. De hecho, el cacao y sus flavan-3-oles, pueden interferir en la iniciación y progresión de las enfermedades mencionadas a través de diferentes mecanismos. Los flavan-3-oles del cacao, ejercen un efecto modulador en diversos procesos celulares como apoptosis e inflamación, siendo capaces de prevenir y/o ralentizar la progresión de iniciación de diferentes enfermedades crónicas. De hecho, los estudios realizados, han reportado algunos cambios positivos en biomarcadores que evalúan el estado antioxidante. Además, se tiene que tener en cuenta que muchas características relacionadas con los

mecanismos de acción del cacao y sus flavanoles, pueden diferir mucho dependiendo de su origen geográfico, así como su procesado (durante los procesos de fabricación del cacao disminuyen los flavonoides). Siempre los productos de cacao con bajo contenido de grasa y sin contenido de azúcar, son preferibles, ya que las ingestas altas de azúcar y grasa son asociadas con diferentes enfermedades, como cáncer, CVD y diabetes, entre otras (Liu et al., 2016).

Flavan-3-oles en el té verde

El té verde contiene altas concentraciones de flavan-3-oles, como (-)-epicatequina y (+)-catequina, (epi)galocatequinas y galatos de flavan-3-oles que no están presentes en el cacao. Los más abundantes son: (-)-epigallocatequina-3-O-galato, (-)-epigallocatequina y (-)-epicatequina.

En estudios realizados en humanos, donde consumieron 500 mL de té verde que contiene 648 μmol de flavan-3-oles, se recogieron muestras de plasma y orina durante un periodo de 24 horas y se analizaron después por HPLC-MS. El plasma contenía un total de 12 metabolitos en forma de O-metilados, sulfatados y glucurónidos conjugados de (epi)catequina y (epi)galocatequina, junto con flavan-3-oles nativos del té, como: (-)-epigallocatequina-3-O-galato y (-)-epicatequina-3-O-galato.

Después del consumo de té verde, el componente principal que se acumuló fue un (epi)galocatequina-O-glucurónido, con una concentración máxima de 126 nM, en un tiempo de 2,2 h, mientras que un (epi)catequina-O-glucurónido alcanzó una concentración máxima de 29 nM, en un tiempo máximo de 1,7 h. Compuestos flavan-3-oles no metabolizados como la (-)-epigallocatequina-3-O-galato y la (-)-epicatequina-3-O-galato, tienen en plasma valores de concentración máxima de 55 y 25 nM después de 1,6 y 2,3 h, respectivamente. Todos los flavan-3-oles y sus metabolitos estuvieron presentes en pequeñas cantidades después de 8 h, y no se detectaron en el plasma pasadas 24 h. Estos valores de tiempo máximo y los perfiles farmacocinéticos, son indicativos de absorción en el intestino delgado (Fu, Chen, Yu, Yue, & Di, 2012).

Cuando después de la ingestión de té verde lo recolectado es orina, los metabolitos de flavan-3-oles detectados son similares, excepto por la presencia de (epi)galocatequina-O-sulfatos y la ausencia de: (-)-epicatequina-3-O-galato y (-)-epigalocatequina-3-O-galato. Se aprecian por tanto, diferencias en el relativo a la cantidad de metabolitos individuales en plasma y orina. Por ejemplo, un (epi)galocatequina-O-glucurónido fue el principal metabolito en plasma, pero no en orina. En total, se excretaron 52,4 μmol de metabolitos, que fue equivalente al 8,1% de los flavan-3-oles ingeridos en el té verde. La excreción de metabolitos de (epi)galocatequina fue de 33,3 μmol lo que representa un 11,4% de lo ingerido, mientras que de la (epi)catequina se recuperan $19,1 \pm 2,2$ μmol que representa el 28,5% de la ingesta. Este estudio demuestra altas recuperaciones urinarias de metabolitos de (epi)catequina, que indica que la (-)-epicatequina es altamente biodisponible y se absorbe y excreta en un grado mucho mayor que otros flavonoides.

La ausencia de cantidades detectables de (-)-epigalocatequina-3-O-galato en orina, a pesar de su presencia en plasma, puede deberse a que los riñones no pueden excretarla y por tanto puede ser eliminada del torrente sanguíneo a través del hígado y devuelto al intestino delgado mediante la bilis. Muy posiblemente, estos excretados de flavan-3-oles en la bilis, serán desconjugados por la microbiota intestinal (Fu et al., 2012).

La excreción urinaria de metabolitos de flavan-3-oles, tras haber consumido diferente dosis de té verde, no aumenta para el caso de las (epi)galocatequinas (glucuronidadas, sulfatadas y metiladas), por tanto, existe un límite estricto en la medida en que estos metabolitos pueden ser absorbidos. Sin embargo, las dosis crecientes en (epi)catequinas, producen aumentos en la excreción de metabolitos en la orina. La presencia de determinados grupos en la molécula de (epi)catequina, reduce notablemente la medida en que la molécula puede ingresar al sistema circulatorio desde el intestino delgado (Auger, Mullen, Hara, & Crozier, 2008).

A pesar de la absorción sustancial de los flavan-3-oles del té verde en la parte superior del tracto gastrointestinal, como una mezcla de compuestos nativos y metabolitos, la mayoría de los flavan-3-oles ingeridos pasarán del intestino delgado al grueso, siendo un lugar importante en

términos de biodisponibilidad de los metabolitos. Algunos catabolitos, como el ácido 4-hidroxifenilacético y el ácido hipúrico fueron detectado en orina, lo que indica que se producen en el cuerpo por rutas adicionales no relacionadas con degradación colónica de flavan-3-oles, no obstante, la elevada excreción urinaria de estos dos ácidos, que ocurre después del consumo de té verde, es debida a la degradación de flavan-3-oles (Del Rio et al., 2013).

Otro estudio sobre absorción, metabolismo y excreción de flavan-3-oles, fue realizado sobre una bebida de té verde que contenía 634 ± 714 μmol de flavan-3-oles, donde el principal componente fue (-)-epigallocatequina-3-O-galato (38% del total de flavan-3-oles), seguido de (-)-epigallocatequina (30%), (-)-epicatequina y (-) epicatequina-3-O-galato (11 y 10% respectivamente). El 11% restante de los flavan-3-oles, consistió en (+)-galocatequina, (+)-catequina y (+)-galocatequina-3-O-galato. Las muestras en plasma y en orina se recolectaron de 0-24h, después de la ingestión y posteriormente analizadas por HPLC-MS. De este estudio se desprende que el plasma contenía 16 metabolitos, principalmente conjugados metilados, sulfatados y glucuronidados de (epi)catequina y (epi)galocatequina, con una concentración plasmática máxima entre 101–256 nM, en un tiempo en alcanzar la concentración plasmática máxima entre 0,8 y 2,2 h, lo que indica que se produce la absorción de flavan-3-oles en el intestino delgado. La orina contenía 18 metabolitos de (epi)catequina y (epi)galocatequina en cantidades correspondientes a $6,8 \pm 0,6\%$ de la ingesta total de flavan-3-oles. Sin embargo, la excreción de metabolitos de (epi)catequina fue equivalente al 27% de la ingesta de (-)-epicatequina y (+)-catequina (Fu et al., 2012).

Té negro: teaflavinas y tearubiginas

El té negro es más consumido en Europa que el té verde, la absorción de los flavan-3-oles presentes en el té negro, se ha investigado menos y los estudios se han centrado en la absorción de monómeros de flavan-3-oles como los metabolitos de ácido gálico: ácido 3-O-metilgálico, ácido 4-O-metilgálico y ácido 3,4-di-O-metilgálico en orina, Figura 2.4.

Estos compuestos se han utilizado como marcadores de índice de consumo de té negro, aunque estos metabolitos también pueden aparecer después del consumo de té verde, ciertas frutas, como las uvas, y el vino (Ding, Li, Tang, & Yao, 2006).

En los estudios realizados se refleja una absorción de teaflavinas del 17,7%, teaflavin-3-O-galato 31,8%, teaflavin-3'-O-galato 16,7%, y teaflavin-3,3'-digalato 31,4%. Tras analizar por HPLC-MS, las concentraciones plasmáticas y en orina de la ingestión de una dosis extremadamente alta de 700 mg de teaflavinas mixtas, equivalentes a aproximadamente 30 tazas de té negro y después de la desconjugación enzimática con β -glucuronidasa y sulfatasa, las cantidades de teaflavinas detectadas en plasma después de 2 horas eran insignificantes, en torno al 0,001%, demostrando que la bebida de té negro produce una excreción grande de ácido hipúrico y un catabolismo intestinal microbiano (Mulder, Rietveld, & van Amelsvoort, 2005).

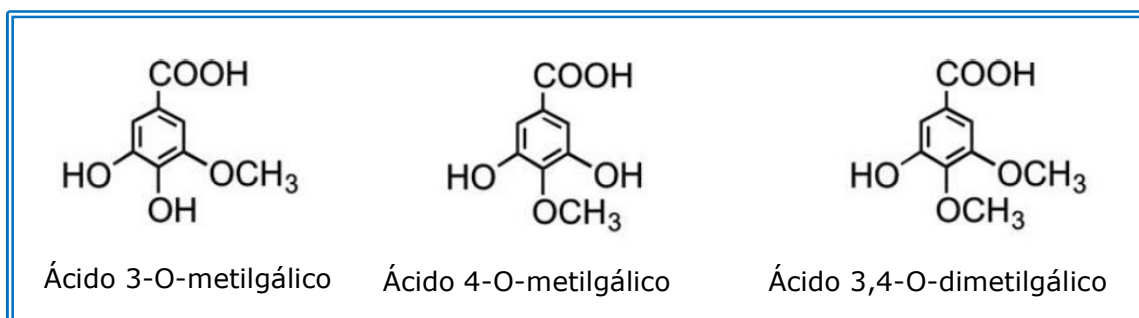


Figura 2.4. Derivados metilados del ácido gálico excretados después del consumo de té negro (Del Rio et al., 2013).

Proantocianidinas

Son compuestos fenólicos altamente abundantes en la dieta humana y además son responsables de efectos positivos sobre la salud. Los numerosos estudios que se han llevado a cabo, indican que las proantocianidinas oligoméricas y poliméricas prácticamente no son absorbidas en el intestino delgado y la mayoría pasa sin alteraciones al intestino grueso, donde son catabolizadas por la microbiota colónica, que

produce una diversidad de ácidos fenólicos y componentes aromáticos como: ácido 3-(3'-hidroxifenil)-propiónico y ácido 4-O-metil-gálico, que se absorben en el sistema circulatorio y se excretan en la orina (Naczki & Shahidi, 2004). Otros metabolitos que se identifican son los ácidos 2-(3,4-dihidroxifenil) acético, 3-hidroxifenilacético, 4-hidroxifenilacético, 3-hidroxifenilpropiónico, ácidos fenilvaléricos, y otros muchos (Appeldoorn et al., 2009). Los posibles efectos biológicos de las procianidinas son generalmente atribuidos a su descomposición colónica, formando productos más fácilmente absorbidos, como los ácidos fenólicos.

2.3.2. Acciones biológicas de los flavan-3-oles y sus metabolitos

La biotransformación que sufren los compuestos fenólicos durante el proceso digestivo, va a determinar la bioactividad final de estos compuestos en el organismo (Crozier, Del Rio, & Clifford, 2010; Donato, Chiappetta, & Drioli, 2011). Numerosos ensayos *in vitro*, han revelado una pérdida significativa del carácter antioxidante de los metabolitos respecto al compuesto parental. Por ejemplo, la glucuronidación en C3' y C4' del anillo B de la quercetina, resta potencia respecto a la posición C3 del anillo pirano y los derivados metilados en la posición C3' y C4' de la catequina y epicatequina son menos antioxidantes que la aglicona (Dueñas, González-Manzano, González-Paramás, & Santos-Buelga, 2010).

Existen evidencias de la acumulación de metabolitos de flavan-3-oles en diferentes tejidos corporales y de la acción biológica que ejercen en el organismo. La actividad antioxidante de los principales metabolitos de flavan-3-oles, ha sido probada por varios estudios como FRAP, DPPH, ABTS, etc. La O-metilación en el anillo B, presenta una actividad antioxidante reducida con respecto a los compuestos parentales, sin embargo, los metabolitos metilados conservaban una actividad significativa alta de eliminación de radicales, lo que sugiere que podrían actuar como potenciales antioxidantes en condiciones fisiológicas.

El más alto nivel de actividad antioxidante fue del 3'-O-metilcatequina, comparable a su compuesto principal y a metabolitos de quercetina (Dueñas et al., 2010). El metabolito denominado (-)-

epigallocatequina-3-O-galato, exhibió actividad antioxidante cinco veces más alta que la de Trolox (compuesto análogo de la vitamina E), mientras que el 4',4''-di-O-metil-epigallocatequina-3-O-galato, fue similar al Trolox (Xie et al., 2001). La epigallocatequina-3-O-galato-3'-O-glucurónido y la molécula de epigallocatequina-3-O-galato-3-O-glucurónido, presentan una capacidad antioxidante similar a (-)-epigallocatequina-3-O-galato. La molécula de epigallocatequina-3-O-galato-4''-O-glucurónido, molécula epigallocatequina-3-O-galato-7-O-glucurónido y epigallocatequina-7-O-glucurónido, fueron menos activas que sus compuestos originales, y la epigallocatequina-3'-O-glucurónido fue mucho menos activa que (-)-epigallocatequina (Weiss, Molinelli, Jakusch, & Mizaikoff, 2001). Estos resultados demuestran que los metabolitos de (-)-epicatequina, pueden prevenir daños fisiológicos inducidos por oxidación y presentan interés en patologías relacionadas con la inflamación (Meng et al., 2014).

También se destaca el efecto de los metabolitos microbianos sobre la microbiota intestinal, de tal manera que algunos ácidos como el metil-gálico, gálico, cafeico, 4-hidroxifenilpropiónico, fenilpropiónico y 4-hidroxifenilacético, procedentes del metabolismo microbiano de las catequinas del té, fueron capaces de inhibir el crecimiento de bacterias intestinales patógenas, sin afectar a las bacterias beneficiosas (Boscari, Mazzuia, Wisniewski, Borges, & Figueiredo, 2017). Los efectos en salud derivados de la interacción entre los compuestos fenólicos y la microbiota intestinal, no solo tienen que ver con la población de bacterias beneficiosas ejerciendo acciones prebióticas, sino que podrían estar relacionados con la funcionalidad de la actividad metabólica de la microbiota (Monagas et al., 2010).

Es importante comprender la importancia de estos compuestos en la salud, ya que se han demostrado diversas funciones biológicas en estudios preclínicos, como efectos neuroprotectores, antitumorales, cardioprotectores, antidiabéticos, antimicrobianos, antiinflamatorios, y otros muchos más (Prakash, Basavaraj, & Murthy, 2019).

2.3.3. Efectos en salud de flavan-3-oles y sus metabolitos

Los estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado el papel protector de flavonoides en el desarrollo y progresión de la CVD. Los experimentos con quercetina (flavonol), desvelaron que su consumo estaba asociado con una disminución de la inflamación y la arteriosclerosis (Guillermo Gormaz, Quintremil, & Rodrigo, 2015; Lin et al., 2017). Se ha demostrado que una dieta rica en quercetina produce una disminución significativa de los niveles de colesterol, atribuyendo a los metabolitos de este flavonoide efectos antiateroscleróticos (Kamada, da Silva, Ohnishi-Kameyama, Moon, & Terao, 2005). Las propiedades ateroprotectoras de la quercetina estaría asociada con una reducción en el estrés oxidativo, a través de un mecanismo que implica la regulación de la formación de ROS en las células vasculares (Xiao et al., 2017).

Los mecanismos por los cuales los flavan-3-oles benefician a los humanos, dependen de las concentraciones ingeridas y del metabolismo de los polifenoles ingeridos (Dmitrienko, Kudrinskaya, & Apyari, 2012). La catequina y la epicatequina son flavan-3-oles monoméricos, y son también la unidad de formación de procianidinas. El consumo de alimentos ricos en polifenoles, como el té verde, el vino tinto y el cacao, tiene efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antibacterianos, y pueden ejercer efectos positivos sobre enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo II y obesidad (Fu, Chen, Wang, Yu, & Di, 2012; Qureshi, Stecher, Huck, & Bonn, 2011). En ese sentido, el flavanol epicatequina contenido en el cacao y en otros alimentos, como ciertas manzanas y té verde, mostraron efectos antialérgicos. El efecto puede ser desencadenada por la modulación de epicatequina de los receptores del huésped en el sitio local de inflamación o a nivel sistémico (Singh et al., 2014).

Basándonos en evidencias epidemiológicas y clínicas, se asocia a las dietas altas en alimentos que contienen flavan-3-oles, con beneficios para la salud en humanos. La catequina y la epicatequina, son los flavanoles más comunes en los alimentos, estando presentes en la dieta en diferentes formas enantioméricas. Se ha demostrado que la estereoquímica influye en la configuración, absorción, metabolismo y actividad biológica de los flavan-3-oles. La (-)- epicatequina es un estereoisómero único, capaz de mediar la

respuesta a una dilatación arterial significativa, además de las propiedades antioxidantes clásicas de los flavanoles (Zhang, Shan, & Gao, 2011).

Hay buenas evidencias, que sugieren que los flavan-3-oles contenidos en el cacao y en los productos derivados de éste, pueden tener efectos beneficiosos sobre la sangre en sujetos sanos y, en particular en individuos hipertensos (Sun, Li, & Chang, 2001).

Los flavan-3-oles que contiene el cacao, son un biomarcador para la salud cardiovascular, ya que el cacao contiene entre 176–963 mg de flavan-3-oles, entre monómeros y oligómeros. Se ha demostrado que mejora la vasodilatación, la hipertensión y la diabetes, tanto en individuos sanos como en pacientes con enfermedades coronarias, los ensayos se repiten con la ingesta de (-)-epicatequina pura, estableciendo una causa y un efecto, relación entre flavan-3-oles y mejoras vasculares (Hosny, El Gohary, Saad, Handoussa, & El Nashar, 2018). Se ha encontrado también que el consumo de cacao rico en flavan-3-oles, aumenta las lipoproteínas de alta densidad del colesterol (HDL) en 0,046 mM y disminuye el colesterol (LDL) por 0,07 mM (Meischl, Kirchler, Jager, Huck, & Rainer, 2018).

Además de los efectos positivos que los flavan-3-oles del cacao ejercen en CVD, se ha investigado que puede mejorar la resistencia de la insulina, con una ingesta de 500-1000 mg/día (Tashakkori, Erdem, & Bozkurt, 2017). La ingesta de cacao puede mejorar la sensibilidad a la insulina en personas sanas, hipertensas, y personas obesas (Meischl et al., 2018). Se ha investigado también como el consumo de cacao y chocolate, ricos en flavan-3-oles, mejoran la función plaquetaria, de tal manera que se ha descrito un efecto similar a la aspirina para flavan-3-oles, en la inhibición de la activación plaquetaria (Pearson et al., 2002; Qiu, Liang, Guo, Wang, & Lin, 2015).

El té también es rico en flavan-3-oles, con la diferencia de que los compuestos que aquí se encuentran son predominantemente galatos. Se ha investigado como el consumo de té verde o negro, produce efectos positivos en lo que se refiere a la presión arterial. La función endotelial en lo que se refiere a la vasodilatación, el consumo de té negro aumenta significativamente esta respuesta en un 1,7% en un consumo a largo plazo, y en un 3,4% cuando la medida es a medio plazo (Shi, Guo, You, Chen, & Zhang, 2014). La intervención con diferentes tipos de flavan-3-oles del té,

como la (-)-epigallocatequina-3-O-galato, también condujo a las mejoras en la función endotelial, lo que sugiere que el galato puede ser en parte responsable de los efectos vasculares del té (Leite, Santos, & Kubota, 2014).

Con respecto a otros factores de riesgo de CVD, el té negro disminuye los niveles de triglicéridos en un 35,8% y la relación de colesterol en plasma LDL/HDL en un 20,3% después de 12 semanas de consumo (Park, Tian, & Row, 2014).

Las nueces enteras sin procesar son ricas en flavan-3-oles, flavonoles, antocianinas y, sobre todo, procianidinas y ácidos fenólicos (Li et al., 2013). El consumo de nueces o pistachos produce mejoras en salud a personas con el colesterol alto y diabetes tipo II, produciendo cambios de lípidos en el plasma, en concreto el consumo de nueces por períodos de 4 a 24 semanas, es capaz de disminuir los niveles totales de LDL, mientras que los HDL y los triglicéridos no fueron afectados (Hrobonova, Spevak, Spisska, Lehotay, & Cizmarik, 2013).

La combinación de estudios preclínicos y epidemiológicos, sugieren que los polifenoles pueden ser efectivos para disminuir patologías neurodegenerativas relacionadas con la edad, mejorando el rendimiento neurocognitivo. La asociación directa entre el consumo de polifenoles y la mejora, parece estar relacionada con una serie de mecanismos, incluida su capacidad para interactuar con la señalización neuronal y glial intracelular, para influir el flujo sanguíneo periférico y cerebrovascular, y para reducir el daño neuronal y las pérdidas inducidas por neurotoxinas y neuroinflamación (Chen, Wang, & Shi, 2011; Feng, Zhao, & Lin, 2009). En este terreno se han examinado los efectos positivos de los extractos de Ginkgo biloba, ricos en flavonoides en adultos mayores con enfermedad de Alzheimer, también los extractos de corteza de pino ricos en procianidinas, en adultos mayores sanos (Feng, Zhao, Yan, Lin, & Zheng, 2009), así como los efectos del cacao rico en flavan-3-oles sobre la función cognitiva en mujeres jóvenes y adultas sanas (Xia et al., 2007).

Aunque la acción antioxidante de los metabolitos, se estima que disminuye en un 20% respecto al compuesto original, algunos metabolitos de epicatequina demostraron inhibir el crecimiento celular, como es el caso del metilado (3'metil-epicatequina), que mostró ser tan

efectivo como la epicatequina en la inhibición de la apoptosis inducida en neuronas (Hosny et al., 2018).

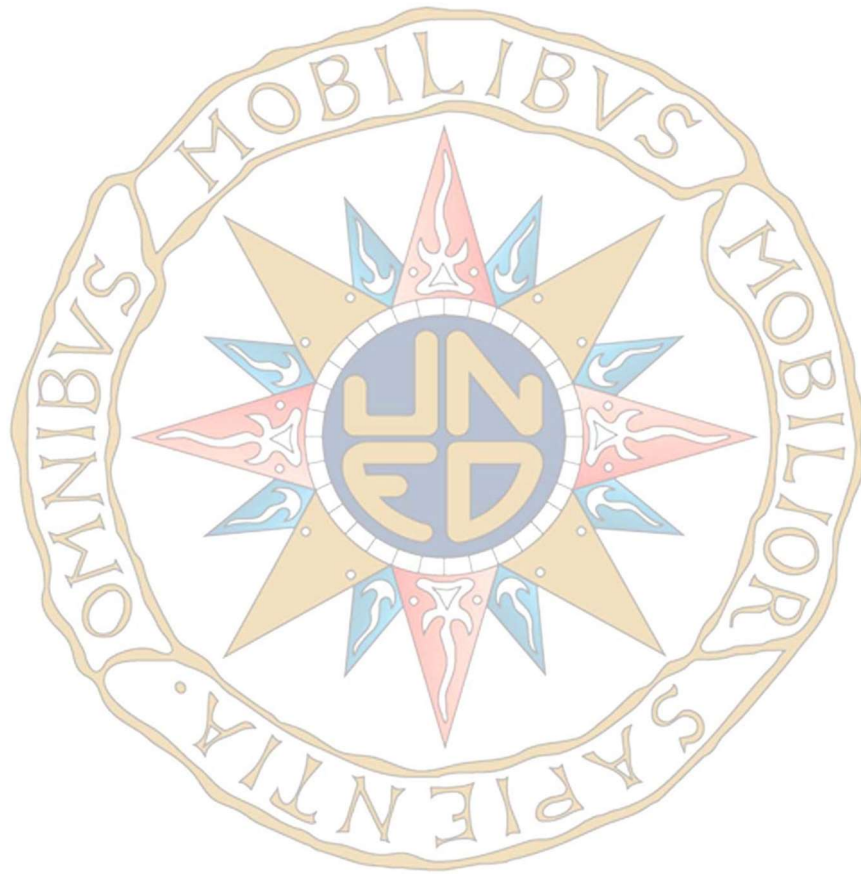
Varios estudios epidemiológicos, han investigado la relación entre la ingesta de frutas y verduras y la incidencia del cáncer, y muchos indican una correlación positiva, influyendo en los procesos de carcinogénesis y desarrollo tumoral. Para el caso del metabolito 4'-metil-epigallocatequina-galato, se ha demostrado que inhibe la proliferación y la activación del factor nuclear que controla la transcripción del ADN, e induce la apoptosis de células de cáncer de próstata, en menos medida que el compuesto epigallocatequina-galato libre (Karasova, Lehotay, Sadecka, Skacani, & Lachova, 2005).

La (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG), es un componente flavonoide importante del té verde, que muestra efectos antiapoptóticos en numerosos modelos de neurotoxicidad. Se ha demostrado que la EGCG protege selectivamente las neuronas de la apoptosis, convirtiendo a este compuesto, en un interesante candidato terapéutico para enfermedades neurodegenerativas que involucran apoptosis neuronal, desencadenadas por el estrés oxidativo mitocondrial (Raof, Mohamad, & Abas, 2013). La EGCG además de ser la principal catequina bioactiva del té verde, ha sido un compuesto muy estudiado en los últimos años, debido a sus efectos quimiopreventivos del cáncer y a su capacidad quimioterapéutica. Estudios realizados implican a la EGCG en efectos anticancerígenos en células madres cancerosas y además reporta mejora a la sensibilidad de los medicamentos de quimioterapia (Rady et al., 2018).

La revisión sistemática actual y el metaanálisis, desvela que el consumo regular de té en sujetos con niveles elevados de presión arterial, logra reducir la presión arterial sistólica y diastólica en aproximadamente 4,81 y 1,98 mm de Hg respectivamente. Se indicó que los efectos hipotensores del té verde son más pronunciados que los del té negro. Estos hallazgos son aplicables en medicina y de especial interés en pacientes hipertensos (Mahdavi-Roshan, Salari, Ghorbani, & Ashouri, 2020).

Los ácidos fenólicos y los flavan-3-oles, son componentes dietéticos importantes para la prevención de trastornos de salud, en parte debido a sus propiedades antioxidantes. Existen evidencias que sugieren que estos compuestos tienen efectos beneficiosos contra varios tipos de

cánceres humanos (Denderz & Lehotay, 2014), efectos antiinflamatorios y efectos positivos en enfermedades cardiovasculares. Los flavan-3-oles, como es el caso de la (-)-epicatequina, está vinculada con estos efectos positivos para la salud (Schroeter et al., 2006). Otros efectos beneficiosos que ejercen estos compuestos, están relacionados con enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad (Alzheimer y Parkinson), a través de su capacidad para reducir el estrés oxidativo y la inflamación (Denderz & Lehotay, 2012; Schroeter et al., 2006).



Capítulo 3

ESTRATEGIAS PARA LA DETERMINACIÓN DE FLAVAN-3-OLE EN MATRICES VEGETALES Y BIOLÓGICAS

3.1. INTRODUCCIÓN

Como se ha apuntado en capítulos anteriores, los flavan-3-oles se encuentran en abundancia en frutas, verduras, legumbres y en algunas bebidas de frecuente consumo, constituyendo el grupo de flavonoides más común en la dieta. El análisis y determinación de estos compuestos y sus metabolitos, puede aportar una información relevante para poder comprender los mecanismos de absorción y biodisponibilidad y evaluar mejor sus beneficiosos efectos sobre la salud. En consecuencia, el gran interés por conseguir esta información, ha estimulado el desarrollo de nuevas estrategias analíticas, para la determinación de polifenoles y sus metabolitos en plantas o en muestras fisiológicas animales y humanas.

Aunque las técnicas cromatográficas con diferentes detectores se han impuesto como el medio de determinación más frecuente en los laboratorios de rutina, nuevas líneas de investigación se han desarrollado buscando procedimientos que mejoren la especificidad, sensibilidad y costes de los métodos analíticos (de Rijke et al., 2006; Plaza, Domínguez-Rodríguez, Castro-Puyana, & Marina, 2018; Stalikas, 2007).

En los últimos años, algunos de los más importantes avances se han orientado en la mejora de los tratamientos de la muestra, en la extracción y aislamiento de estos compuestos de las complejas matrices en las que se encuentran (Raks, Al-Suod, & Buszewski, 2018; Ramos, 2012), centrándose principalmente en el desarrollo de nuevos materiales sorbentes, más selectivos (Fumes, Silva, Andrade, Nazario, & Lanças, 2015), en la miniaturización de las técnicas (Casado, Morante-Zarcelero, Pérez-Quintanilla, Cámara, & Sierra, 2020; Filippou, Bitas, & Samanidou, 2017) y en la automatización y acoplamiento de las etapas de análisis (Regazzoni et al., 2013). Procedimientos todos ellos que minimizan el uso de disolventes, aplicables a pequeñas cantidades de muestra, y que eliminan etapas de preparación de la muestra, lo que acorta los tiempos de análisis y abarata costes.

Por otro lado, en cuanto a las técnicas analíticas instrumentales, las más innovadoras aportaciones se han dirigido a mejorar la sensibilidad y selectividad con el desarrollo de nuevas fases

cromatográficas, consiguiendo la determinación de múltiples analitos en un único análisis, reduciendo así tiempo y costes. También, se ha avanzado hacia la miniaturización de equipos y los acoplamientos de técnicas complementarias (Plaza et al., 2018).

Otras investigaciones se han orientado al desarrollo de sensores y métodos de cribado, que aportan datos fiables rápidamente (Othman, Norton, Finny, & Andreescu, 2020).

Por último, las técnicas quimiométricas se presentan como herramientas poderosas que facilitan el análisis, permitiendo extraer la información requerida sobre los analitos de interés, a partir del tratamiento de datos, sin necesidad de su separación previa (Simpson, Burke, & Jiji, 2011). En la Figura 3.1, se resumen esquemáticamente las estrategias más importantes para la determinación de ácidos fenólicos y flavonoides en fluidos biológicos, bebidas, plantas y alimentos (Plaza et al., 2018; Stalikas, 2007).

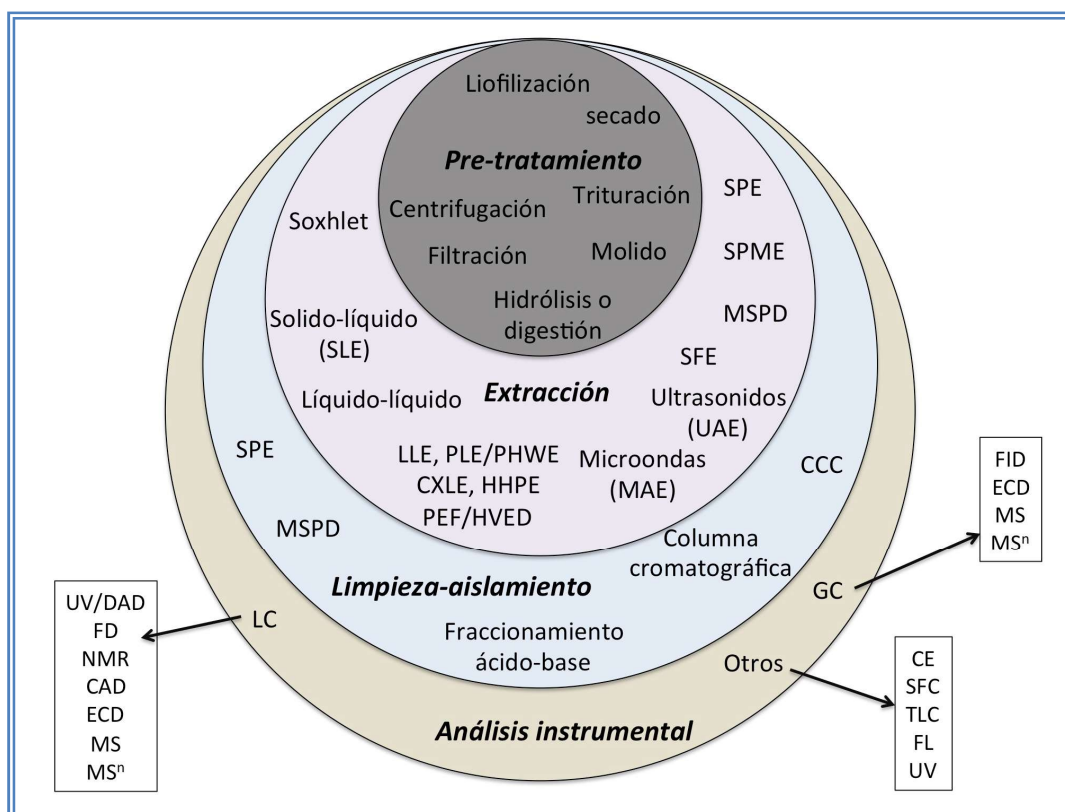


Figura 3.1. Esquema de estrategia para la determinación de ácidos fenólicos y flavonoides en fluidos biológicos, bebidas, plantas y alimentos (adaptado de Stalikas, 2007)

Así, se puede observar que la etapa de pre-tratamiento puede consistir en una filtración, centrifugación, secado o liofilización, entre otras. La extracción puede fundamentarse en una extracción líquido-líquido (LLE) o sólido-líquido (SLE o Soxhlet). Este tipo de extracción puede realizarse a presión y temperatura controlada (PLE), ser asistida por ultrasonidos (UAE) o por microondas (MAE). En los últimos años, otros procedimientos de extracción se han desarrollado, como la extracción con alta presión hidrostática (HHPE), la extracción con agua caliente presurizada (PHWE) o la extracción líquida con dióxido de carbono (CXLE). Todos ellos reducen el consumo de disolventes y mejoran los tiempos de extracción.

Por otra parte, la extracción se puede realizar en muy diferentes formatos, en cartucho (extracción en fase sólida, SPE), mediante una fibra recubierta de un material sorbente (SPME) o por dispersión de la muestra en una fase sólida (MSPD). También pueden utilizarse fluidos supercríticos (SFE) con este propósito. En la fase de limpieza y/o aislamiento, se pueden utilizar procedimientos mencionados en la fase de extracción (SPE, MSPD) u otros como la cromatografía a contracorriente (CCC) o el fraccionamiento ácido-base (de Rijke et al., 2006; Plaza et al., 2018; Stalikas, 2007).

En cuanto al análisis instrumental, se destaca la cromatografía líquida (LC) y de gases (GC), con diferentes detectores y otras técnicas instrumentales como la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC), la cromatografía en capa fina (TLC), la espectroscopía de absorción (UV) o de fluorescencia (FL) o la electroforesis capilar (CE) (Plaza et al., 2018).

Recientes publicaciones, han revisado el estado del arte en lo que a estrategias y procedimientos de determinación de compuestos fenólicos se refiere en alimentos y plantas (Corradini et al., 2011; Harnly, Bhagwat, & Lin, 2007; Naczk & Shahidi, 2004; Robards, 2003) o en otras matrices más específicas, como árboles (Bedgood, Bishop, Prenzler, & Robards, 2005) o miel (Pyrzynska & Biesaga, 2009). Entre ellas destacan las revisiones de, de Rijke y col. (2006) y Stalikas (2007) sobre la extracción, separación y métodos de detección de ácidos fenólicos y flavonoides en plantas, alimentos, bebidas y fluidos biológicos (de Rijke et al., 2006; Stalikas, 2007) y la realizada recientemente por Plaza y col.

(2018) sobre las estrategias del análisis de polifenoles en muestras naturales (Plaza et al., 2018). Otros autores han centrado sus revisiones sobre los analitos a determinar: ácidos fenólicos, antocianinas, quercetina, isoflavonas y otros flavonoides (Dmitrienko, Kudrinskaya, & Apyari, 2012; Ongkowijoyo, Luna-Vital, & Gonzalez de Mejia, 2018; Robbins, 2003; Vacek, Klejdus, Lojkova, & Kuban, 2008).

En este capítulo se realiza una profunda revisión de los métodos y estrategias de análisis, resaltando los últimos avances en la determinación de compuestos fenólicos en matrices vegetales y biológicas, profundizando en aquellas estrategias que constituyen el eje central y objetivo de esta tesis.

3.2. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

El tratamiento de la muestra es una etapa decisiva del proceso analítico, ya que condiciona notablemente los resultados que se obtengan. Un tratamiento correcto de la muestra, aumenta la eficacia del procedimiento de extracción o aislamiento del analito de interés, eliminando interferentes, mejorando la sensibilidad del método analítico, aumentando la concentración del analito de interés, o bien convirtiendo al analito en un derivado que pueda ser más fácilmente separado, detectado y/o cuantificado.

Tanto la naturaleza de la matriz como la de los analitos, va a influir en el tratamiento de la muestra. Según la matriz a analizar, sólida o líquida, el procedimiento de preparación de la muestra será diferente, pero debido a la gran variedad de estructuras y propiedades químicas de los compuestos fenólicos (diferente polaridad, acidez, número de grupos hidroxilo y anillos aromáticos, nivel de concentración en la muestra, etc.), el analito de interés también condicionará el tipo de tratamiento a aplicar (Naczki & Shahidi, 2004). Además, en el caso de los flavonoides, estos compuestos pueden presentarse libres o conjugados. En los alimentos forman agliconas en los que se presentan conjugados con azúcares, en forma de ésteres o formando polímeros, o unidos a proteínas y a

carbohidratos, variando sus propiedades de acidez, solubilidad, etc. En muestras biológicas (plasma, suero y orina), también pueden presentarse como glucurónidos o conjugados sulfatados (Stalikas, 2007).

Considerando la complejidad de las matrices donde pueden encontrarse los compuestos fenólicos y sus metabolitos, la preparación de muestra hay que tenerla en cuenta como una etapa crítica de todo el proceso de análisis. Por tanto, la etapa de preparación de la muestra estará condicionada por el número de muestras, el analito y por la complejidad de la matriz. La elección del procedimiento buscará un compromiso entre la eficiencia de la reproducibilidad del tratamiento, facilidad del proceso, la consideración del coste, el tiempo, la posibilidad de automatización y la seguridad. Lo ideal del tratamiento de muestra, es que sea versátil, con capacidad para poder ser analizado con diferente instrumentación analítica. En las últimas décadas, las técnicas de microextracción también han tenido un importante desarrollo por sus ventajosas aportaciones (Casado et al., 2020).

Todos estos factores hacen que el posible tratamiento de la muestra sea muy diverso, de tal forma que puede consistir en un simple filtrado o centrifugación, como en el caso de algunas bebidas u orinas, o en complicadas operaciones de hidrólisis de glicósidos, extracción y limpieza, que deben realizarse previas al análisis en algunas muestras biológicas (Bedgood et al., 2005; Corradini et al., 2011; de Rijke et al., 2006; Dmitrienko et al., 2012; Harnly et al., 2007; Naczek & Shahidi, 2004; Plaza et al., 2018; Robards, 2003; Stalikas, 2007; Tura & Robards, 2002; Vacek et al., 2008).

La mayoría de los métodos descritos en la bibliografía incluyen dos o más pasos en el tratamiento de la muestra. En general, cada paso aporta un nivel de sensibilidad y selectividad, pero también puede incrementar el número de errores, aumentando las posibilidades de contaminación de la muestra y disminuyendo el porcentaje de recuperación del método.

Pre-tratamiento

Normalmente, las muestras sólidas conllevan un pre-tratamiento de molido, cribado y homogenización, también puede procederse a una liofilización o secado. Las muestras líquidas suelen filtrarse o centrifugarse, en algunos casos, este tratamiento es suficiente para proceder directamente a su inyección en el equipo cromatográfico. Así sucede en la determinación de flavan-3-oles, antocianinas, derivados del ácido cinámico y de flavonoles en vinos o en zumos de manzana (Tura & Robards, 2002). Diferentes catabolitos de flavan-3-oles, han sido determinados en orina y heces (aguas fecales) con una simple centrifugación, filtración y dilución de la muestra (Del Rio et al., 2010; Sanchez-Patan, Monagas, Moreno-Arribas, & Bartolome, 2011). En el caso de bebidas alcohólicas, dependiendo de la técnica analítica de cuantificación, el alcohol debe ser eliminado por evaporación en un rotavapor (de Rijke et al., 2006; Stalikas, 2007; Tura & Robards, 2002).

Hidrólisis de flavonoides y ácidos fenólicos

Salvo que el objeto del análisis sea la determinación de las formas conjugadas, en la mayoría de los casos será necesaria una etapa de hidrólisis que destruya las uniones glicosídicas o sulfuro, para liberar los analitos de interés cuando no se encuentran libres. Otras veces, la falta de patrones comerciales de algunos analitos obliga a la hidrólisis para poder cuantificar. En muestras de plasma, suero u orina, generalmente se realiza una hidrólisis enzimática con β -glucuronidasa y sulfatasa como paso previo a la extracción. Flavanonas y sus metabolitos han sido determinados en orina de esta forma (Aschoff et al., 2016). Urpi-Sarda y col. (2009) han determinado flavonoles y metabolitos colónicos en orina y plasma después de realizar su hidrólisis (Urpi-Sarda et al., 2009). La hidrólisis enzimática también ha sido necesaria para la determinación de metabolitos de quercetina en orina y plasma de rata (Lee, Sim, & Cheng, 2008), la determinación de 11 ácidos fenólicos en orina, plasma e hígado (de Oliveira

et al., 2013) o la determinación de flavonoides y ácidos fenólicos en plasma (Bolarinwa & Linseisen, 2005; Bustamante et al., 2018). También en orina y mediante una hidrólisis enzimática y dansilación, se han podido determinar 38 compuestos fenólicos y metabolitos por UHPLC-DAD-MS (Achaintre et al., 2016). Para la determinación de los ácidos fenólicos, la hidrólisis enzimática no suele ser muy utilizada, siendo más común la hidrólisis ácida o la saponificación (Stalikas, 2007; Tura & Robards, 2002). Owolabi y col. (2007) determinan rutina, luteolina, quercetina, apigenina y otros metabolitos en orina de esta forma (Owolabi, Coker, & Jaja, 2007). Así mismo, Sasot y col. (2017) aplican una hidrólisis ácida y posterior filtración para la determinación de 41 compuestos fenólicos (procianidinas, ácidos fenólicos, flavonoles) y otros metabolitos en orina por LC/ESI-LTQ-Orbitrap-MS (Sasot et al., 2017).

Extracción, limpieza y aislamiento

La extracción líquido-líquido y sólido-líquido, son los procedimientos más usuales para extraer compuestos fenólicos en plantas y alimentos (Plaza et al., 2018; Tura & Robards, 2002) y en otras matrices (de Rijke et al., 2006). Los solventes de extracción suelen ser alcoholes (metanol, etanol), acetona, dietil-eter o acetato de etilo. Para extraer ácidos fenólicos (muy polares) las mezclas agua-acetona o agua-alcohol son las más recomendadas. Para otros compuestos no-polares se aconseja utilizar solventes menos polares (diclorometano, cloroformo, hexano, benceno...) (Dmitrienko et al., 2012; Oroian & Escriche, 2015; Stalikas, 2007).

La clásica extracción sólido-líquido con Soxhlet, es frecuentemente utilizada en la extracción de flavonoides en múltiples matrices sólidas o semisólidas. Actualmente, la extracción líquida presurizada (PLE), resulta una técnica de preparación más amigable con el medio ambiente al utilizar menos cantidad de disolventes. La PLE se realiza a temperatura y presión controlada, lo que acorta los tiempos de extracción. Además, esta técnica permite la automatización del proceso, por lo que está siendo ampliamente aplicada en la extracción de analitos en

muestras medioambientales, alimentos y otros productos farmacéuticos (Ramos, 2012). Igualmente, en la extracción asistida por microondas (MAE) o en la extracción asistida por ultrasonidos (UAE) se aumentan los rendimientos de extracción, se reduce el consumo de disolventes y energía, y se acortan los tiempos del proceso (Plaza et al., 2018). Routray y Orsat (2012) revisan la aplicación del microondas en la extracción de flavonoides resaltando su aplicabilidad (Routray & Orsat, 2012).

Para su determinación por cromatografía líquida, metabolitos de quercetina y kaempferol se han determinado en orina liofilizada mediante extracción con disolventes (Hong & Mitchell, 2004). Otros autores aplican este tratamiento a muestras de orina y plasma para la determinación de metabolitos de quercetina (Lee, Ebeler, Zweigenbaum, & Mitchell, 2012; Mullen, Boitier, Stewart, & Crozier, 2004). En muestras de origen vegetal, esta técnica también se ha utilizado para la determinación de 13 compuestos fenólicos en jengibre (Tohma et al., 2017), y de quercetina, naringenina, naringina, miricetina, rutina y kaempferol en tomate (Biesaga, Ochnik, & Pyrzyńska, 2009). Rutina, ácido gálico, ácido hidroxibenzóico, ácido siríngico, ácido p-cumárico, quercetina y resveratrol, son extraídos de uvas con una extracción asistida por ultrasonidos (Bagheri & Esmaili, 2017). Miricetina, quercetina, luteolina y kaempferol se han determinado en cebolla, pimiento y puerro, realizando después de una extracción asistida por ultrasonidos, la extracción con disolventes a presión en capsulas de acero y una máquina de café Nespresso modificada (Corell, Armenta, Esteve-Turrillas, & de la Guardia, 2018). En plantas, se han determinado 18 ácidos fenólicos mediante extracción acelerada de solventes, extracción asistida por ultrasonidos y extracción con Soxhlet, comparando los resultados obtenidos (Szewczyk & Olech, 2017).

La extracción con fluidos supercríticos (SFE), también es utilizada para la extracción de compuestos orgánicos, que pueden ser alterados por las altas temperaturas o el oxígeno. Esta técnica puede aplicarse combinada con otras, a la extracción de los analitos de interés en plantas y vegetales, obteniéndose extractos relativamente limpios. Sin embargo, los flavonoides con alta polaridad no pueden ser extraídos con un 100% de CO₂. En estos casos, el poder de solvatación de los fluidos

supercríticos, debe ser mejorado controlando la presión o añadiendo modificadores orgánicos, por ejemplo, metanol (Raks et al., 2018; Sökmen, Demir, & Alomar, 2018; Stalikas, 2007; Tura & Robards, 2002).

Los distintos procedimientos de extracción anteriormente descritos presentan ventajas e inconvenientes (Oroian & Escriche, 2015) y la elección de uno u otro dependerá tanto de la matriz como del analito, el número de muestras, disponibilidad, etc.

Por otra parte, las técnicas de extracción basadas en mecanismos de sorción (SPE, dSPE, SPME, MSPD), pueden considerarse actualmente las más utilizadas en todo tipo de laboratorios y para todo tipo de muestras (Ramos, 2012), reforzadas por la síntesis de nuevos materiales (Fumes et al., 2015) y las nuevas técnicas de microextracción, como la microextracción en fase sólida (μ -SPE), microextracción en fase sólida dispersiva (d-MSPE), la miniaturización de la dispersión de la matriz en fase sólida (μ -MSPD), μ -QuEChERS, microextracción con sorbentes empaquetados (MEPS), μ SPEed®, puntas de extracción de fase sólida (PT-SPE), microextracción en fase sólida (SPME) y extracción con barra agitada (SBSE) (Casado et al., 2020).

La extracción en fase sólida (SPE), es el procedimiento más generalizado de preconcentración, aislamiento y limpieza para el tratamiento de extractos líquidos o muestras acuosas. La gran variedad y disponibilidad de sorbentes, permite su aplicación a la extracción de analitos de muy diferente estructura y polaridad.

3.2.1. Materiales adsorbentes

La extracción en fase sólida se basa en la distribución selectiva de los analitos entre el material sólido y la fase móvil líquida, y todos los procedimientos de extracción se rigen por la ley de distribución de Nernst (Buszewski, Szultka, & Gadzała-Kopciuch, 2012).

La tendencia en el desarrollo de nuevos sorbentes, se enfoca principalmente en conseguir materiales que permitan una mayor capacidad de carga, mayor eficiencia y mayor selectividad en la retención de los

analitos, contribuyendo a la simplificación de los pasos de aislamiento y limpieza.

Los sorbentes de sílica han sido ampliamente utilizados para analitos no polares o con polaridad moderada. En la Tabla 3.1, se recogen los principales tipos de fases, sorbente y características de los analitos para las que se han recomendado (Buszewski et al., 2012).

Tabla 3.1. Tipo de sorbentes de sílica y sus aplicaciones (Buszewski et al., 2012).

Tipo de sorbente	Tipo de analito	Solvente de disolución	Solvente de elución
Fases reversas	moderadamente no-polar – no polar	Metanol/Agua; Acetonitrilo/Agua	Hexano, cloroformo (analitos no-polares); Metanol (analitos polares)
Octadecil (C18) Octadecil(C18)LightLoad Octadecil(C18)PolarPlus Octil (C8) Etil (C2) Ciclohexil Fenil			
Fases normales (enlazada)	moderadamente polar – muy polar	Hexano, cloroformo, acetona	Metanol
Ciano (CN) Amino (NH ₂) Diol (COHCOH)			
Fases normales (adsorción)	moderadamente polar – muy polar	Hexano, cloroformo	Metanol (depende del tipo de analito)
Silica gel Florisil® Alúmina			
Intercambio iónico (anión y catión intercambio)	Intercambio aniónico ácido	Agua o tampón (pH = pKa + 2)	a) Tampón (pH = pKa + 2) b) pH donde el sorbente o el analito es neutral c) Solvente con alta fuerza iónica
Amino (NH ₂) 1°, 2°-Amino (NH/NH ₂) Amina cuaternaria (N ⁺)			
Ácido carboxílico (COOH) Ácido (SO ₃ H) Ácido (ArSO ₃ H) E-Sephadex Sephadex® G-25	Intercambio catiónico básico	Agua o tampón (pH = pKa - 2)	a) Tampón (pH = pKa - 2) b) pH donde el sorbente o el analito es neutral c) Solvente con fuerza iónica

Existen en el mercado adsorbentes hidrofóbicos en fase reversa, recomendados para la extracción de analitos moderadamente no polares (octilsilano, C8) o no polares (octadecilsilano, C18) en extractos acuosos. Adsorbentes hidrofílicos en fase normal, que permiten una limpieza eficiente en compuestos polares (adsorbentes tipo amino, ciano o diol). Los adsorbentes de intercambio iónico, crean atracción con los grupos funcionales opuestos de los compuestos de la muestra, dependiendo del pH y de la fuerza iónica. Hay fases de intercambio aniónico fuerte (SAX) que contienen una fuerte amina cuaternaria, o débil (DEAE, NH₂) que contienen un grupo dietilamino o amino. También hay adsorbentes de intercambio catiónico fuerte que contienen grupos sulfónico (SCX), o débil que contiene un grupo carboxílico (WCX). Los adsorbentes amino (NH₂), pueden usarse tanto como intercambiadores de aniones débiles (para ácidos fuertes), o como adsorbente polar que puede interactuar con OH, NH, SH...

En la determinación de compuestos fenólicos, los adsorbentes utilizados más frecuentemente son adsorbentes hidrofóbicos tipo C8 y C18, con grupos amino y de intercambio (Tura & Robards, 2002). Una de las desventajas de este tipo de adsorbente es la presencia residual de grupos silanol, que tiene una influencia negativa en la separación de analitos polares (Raks et al., 2018).

Otro tipo de adsorbente muy utilizado en los procedimientos SPE, debido a su estabilidad y diversidad estructural, son los que tienen como base polímeros sintéticos y se utilizan para la extracción de compuestos fuertemente polares (Buszewski et al., 2012). Las resinas poliméricas han sido ampliamente usadas para la adsorción, extracción y purificación de compuestos bioactivos en matrices acuosas. La adsorción de los flavonoides puede ser descrita como una sinergia entre los enlaces de hidrógeno, electrostática π - π , e interacciones hidrofóbicas de los flavonoides y el adsorbente (Raks et al., 2018). En las últimas décadas se han sintetizados resinas químicamente modificadas de todo tipo, con base de poliestireno (Amberlite), resinas tipo poliacrílico, polímeros de β -ciclodextrinas y diferentes copolímeros acrílicos conteniendo grupos CN-, -CONH₂ Y -COOH con diferentes grados de sustitución (Raks et al., 2018). El adsorbente polimérico en fase reversa, Oasis HLB, puede ser utilizado

tanto para analitos ácidos, básicos o neutros, y para un amplio rango de pH (0-14). Este adsorbente ha sido muy utilizado en el tratamiento de muestras biológicas de orina y plasma, para la determinación de compuestos fenólicos y sus metabolitos por cromatografía líquida (Bolarinwa & Linseisen, 2005; de Oliveira et al., 2013; Del Rio et al., 2010; Roura et al., 2007; Urpi-Sarda et al., 2009; Zamora-Ros et al., 2009).

Los rellenos adsorbentes basados en carbono (carbón activo, carbón grafitado, nanotubos de carbono multipared, etc.), se han utilizado para la separación y purificación de flavonoides en muestras vegetales (Raks et al., 2018). Nanocomposites de óxido de grafeno y partículas de Fe_3O_4 , se han utilizado como sorbentes magnéticos para la extracción de flavonoides en té, vino y orina (Wu et al., 2015). Otros adsorbentes con base de grafeno se han sintetizado para este fin (Hou et al., 2016). Ribero y col. (2002) han investigado diferentes adsorbentes, incluido el carbón activo, para la extracción de flavonoides en zumo de naranja, haciendo un estudio comparativo (Ribeiro, Silveira, & Ferreira-Dias, 2002). Ahmed y col. (2016) han utilizado nanotubos de carbono multipared (MWCNT), en la extracción SPE para la determinación cromatográfica de 29 polifenoles en miel (Ahmed et al., 2016).

Por último, los polímeros de impronta molecular (MIP) se presentan como un nuevo material adsorbente que ofrece una mejora en el aislamiento selectivo. Estos polímeros altamente entrecruzados, como su nombre indica, presentan propiedades de reconocimiento molecular selectivo para los compuestos plantilla con los que fueron sintetizados. Durante la polimerización, el compuesto plantilla (igual o análogo al analito a separar) crea cavidades en la estructura polimérica con tamaño, forma y funcionalidad química complementarias al analito, lo que permite una mayor interacción con los compuestos de interés, facilitando la extracción específica. Otro grupo de adsorbentes basados en MIP, son los llamados "core-shell". Las estructuras *core-shell* están formadas por un núcleo que se emplea como soporte de otro material que lo recubre. El núcleo puede estar formado por la agregación de múltiples partículas y el recubrimiento por diferentes capas superpuestas. De esta forma, la capacidad de adsorción y especificidad, puede ser controlada mediante el diseño y la arquitectura de

la estructura (Raks et al., 2018). Las estructuras *core-shell* pueden estar compuestas por una amplia gama de materiales, incluyendo materiales inorgánicos u orgánicos, o por ejemplo, nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 .

En las últimas décadas, ha habido un gran interés en aumentar el tamaño de los poros en los materiales adsorbentes desde dimensiones microscópicas a macroscópicas, definiendo muy bien la estructura porosa, dando lugar a lo que se conoce como sílices mesoporosas. Estos materiales inicialmente eran amorfos y tenían una distribución de tamaño de poros muy amplia. Sin embargo, en la actualidad, es posible preparar tamices moleculares con materiales mesoporosos o materiales mesoporosos híbridos con excelentes propiedades, como las Redes Metal-Orgánicas (MOF) que presentan una alta porosidad y un área superficial específica (Casado, Morante-Zarcelero, Perez-Quintanilla, Camara, & Sierra, 2018; Raks et al., 2018).

3.2.2. Polímeros de impronta molecular (MIP)

Las técnicas de identificación, cuantificación y detección de flavan-3-oles en muestras biológicas, requieren generalmente de la aplicación de procedimientos de aislamiento de los analitos de la matriz, evitando las posibles interferencias. La extracción en fase sólida, es una técnica ampliamente utilizada por su gran versatilidad, aunque presenta el inconveniente de extraer a la vez el analito de interés, junto con algunos componentes de la matriz. La técnica empleada para producir adsorbentes con una mayor afinidad hacia los compuestos de interés, es la técnica de impresión molecular.

La impresión molecular, es una técnica consistente en la formación de un polímero, que contiene grupos funcionales fijos predeterminados estequiométricamente, que pueden unirse de manera específica a una molécula plantilla. Al retirar dicha plantilla, los huecos formados, complementarios en tamaño, forma y orientación a esta molécula, quedan disponibles, pudiéndose emplear como sitios de

reconocimiento específico para la plantilla con la que fueron preparados. Los polímeros así formados se denominan polímeros de impresión molecular o (MIP) y representan una nueva clase de materiales, diseñados como receptores estructurales (Martín-Esteban, 2013).

Desde su descubrimiento en 1972, debido a los trabajos de Wulff (Wulff, 1972), se han desarrollado numerosas aplicaciones utilizando MIP como sorbentes, en la preparación de muestras medioambientales y biológicas para la determinación de todo tipo de analitos (Caro, Marce, Borrell, Cormack, & Sherrington, 2006; He, Long, Pan, Li, & Liu, 2007; Hu et al., 2013; Rutkowska et al., 2018), dando lugar a un gran número de publicaciones y patentes (Hu et al., 2013; Piletsky, Alcock, & Turner, 2001).

Esto es debido, a que los MIP son sencillos de preparar, no suponen grandes costes y presentan una alta afinidad y selectividad hacia el analito de interés, haciéndolos muy adecuados para análisis de compuestos que se encuentren a baja concentración o en matrices complejas. Son además, insolubles y muy estables tanto térmica como químicamente. Son muy versátiles, tanto en sus aplicaciones y número de analitos para los que pueden ser desarrollados, como en sus diferentes presentaciones, pudiendo ser preparados en distintos soportes (perlas, bloque, películas delgadas, membranas, etc.), de acuerdo a las necesidades que proponga la aplicación (Martín-Esteban, 2013).

De igual forma, los MIP han sido ampliamente usados como biosensores o sensores químicos (Haupt & Mosbach, 2000; Huang, Wu, Cong, Luo, & Liu, 2018), en catálisis (Gui, Jin, Guo, & Wang, 2018; Wulff, 2002), en electrocromatografía capilar (CEC) (Rutkowska et al., 2018; Turiel & Martín-Esteban, 2005), o como fase estacionaria en HPLC (Guo et al., 2017; Hogendoorn & Van Zoonen, 2000), permitiendo unificar las etapas de limpieza y detección de los analitos, disminuyendo considerablemente los tiempos de análisis.

Síntesis de los polímeros de impresión molecular

Para la síntesis del polímero de impresión molecular se necesita: un monómero polimerizable funcional, un entrecruzante, el iniciador de la polimerización, el disolvente o porógeno y el analito plantilla. De la elección adecuada de estos componentes, va a depender la selectividad, constante de afinidad, capacidad y propiedades físicas del polímero. Con estos componentes, se va a formar una estructura polimérica altamente entrecruzada alrededor de la plantilla (Hu et al., 2013).

La síntesis consta de tres etapas. En la primera de ellas, se pone en contacto el analito plantilla con el monómero funcional adecuado, formándose un complejo de prepolimerización. Es importante destacar, que las propiedades del polímero obtenido, así como su estabilidad, dependen en gran medida del tipo de enlace formado entre este monómero y la plantilla.

La segunda etapa consiste en la polimerización propiamente dicha. La polimerización se induce añadiendo el entrecruzante, el iniciador y el disolvente o porógeno, dando lugar a una matriz polimérica macroporosa. Generalmente sigue un mecanismo de propagación radicalico, que puede ser inducido tanto térmica como fotoquímicamente.

Una vez formado el polímero, en la tercera etapa del proceso se extrae el analito (plantilla), del interior de la estructura tridimensional constituida, liberando los sitios de reconocimiento específicos para ese analito. Estas cavidades creadas en la matriz polimérica, como se ha mencionado con anterioridad, serán complementarias en tamaño, forma y funcionalidad química al analito, y quedan disponibles para enlazar con la plantilla o con sus análogos estructurales (Haupt & Mosbach, 2000). De esta manera, el MIP formado será capaz de reconocer de forma selectiva al analito para el cual se ha diseñado, cuando vuelva a ponerse en contacto con él (Whitcombe & Vulfson, 2001).

La molécula molde se extrae del material, utilizando un disolvente capaz de anular las interacciones específicas o con tratamientos químicos más agresivos, según sea el tipo de interacción molécula

molde/monómero funcional, como se verá a continuación. Se puede seguir el proceso a través de la Figura 3.2, que lo esquematiza.

Además de la propiedad de reconocimiento selectivo, estos polímeros tienen unas propiedades físicas y químicas muy atractivas, ya que son altamente estables al estrés mecánico, a elevadas temperaturas y a altas presiones. Son también resistentes al tratamiento con ácidos, bases, e iones metálicos, y presentan una gran estabilidad en un amplio intervalo de disolventes (Martín-Esteban, 2013).

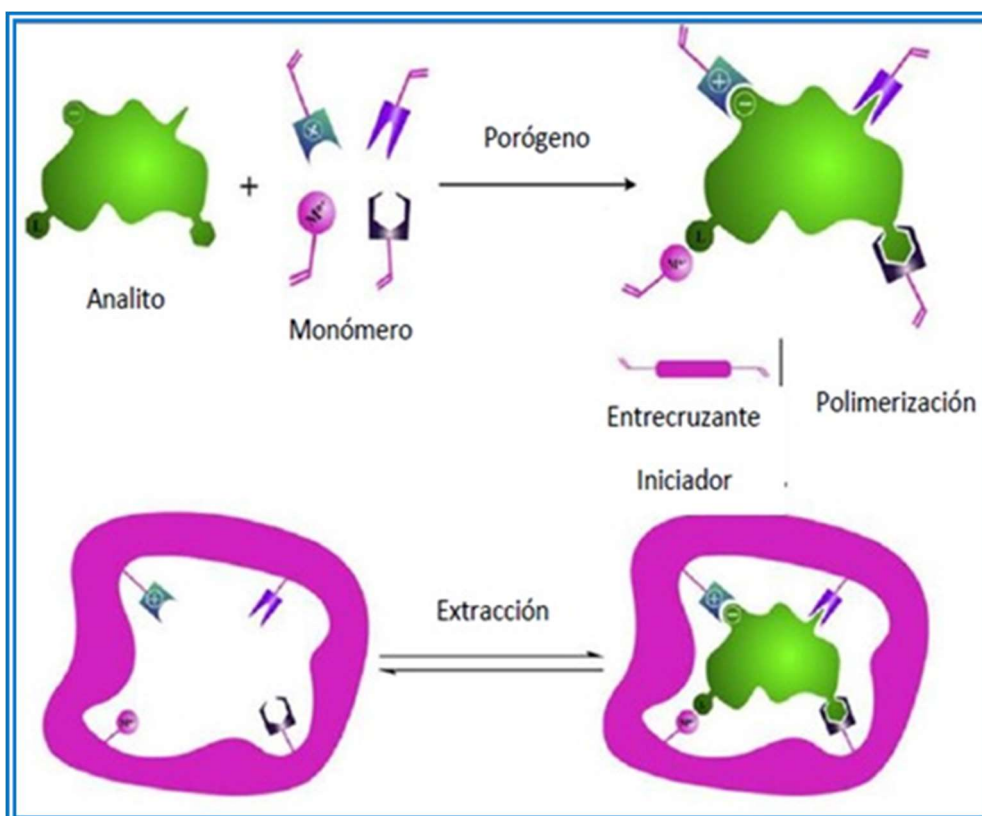


Figura 3.2. Esquema del proceso de formación del polímero de impresión molecular (Hu, Pan, Zhang, Lian, & Li, 2013).

Los componentes estructurales básicos con los cuales se forma el polímero, serán claves en el MIP obtenido y determinarán sus posibles aplicaciones.

La molécula plantilla es el componente al que va dirigido la síntesis del polímero. El analito que va a servir como molde para la formación del MIP, ha de presentar una serie de características, que le

permitan interactuar con el monómero funcional, generando un complejo estable durante la polimerización. Una de las características que debe tener una plantilla, es la de no poseer grupos polarizables, porque la polimerización suele darse por radicales libres. Por otra parte, no debe presentar funcionalidad que inhiba la polimerización, además de ser soluble en el medio y estable según el método de iniciación de la polimerización empleado (temperatura o radiación ultravioleta) (Cormack & Elorza, 2004).

Por lo general, los MIP son capaces de distinguir entre la molécula para la que fueron generados y moléculas muy parecidas estructural o conformacionalmente. Por este motivo, la forma y el tamaño de la plantilla va a tener posteriormente, una gran influencia en la selectividad del polímero.

Se han descrito aplicaciones, donde se ha utilizado una plantilla múltiple para la formación del MIP, ofreciendo muchas ventajas, como ejemplo destacamos: la determinación simultánea, de los metabolitos de hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras de orina, seguido de análisis mediante HPLC, con una sensibilidad mejorada y alto rendimiento en el análisis de rutina (Chauhan et al., 2015). También se utilizó una multiplantilla, en la extracción simultánea de seis catabolitos de benceno en orina, mediante polimerización por precipitación (Samah, Sánchez-Martín, Sebastián, Valiente, & López-Mesas, 2018).

Por otro lado, la elección de un monómero adecuado, se deberá realizar en función de las características de los grupos funcionales del analito. El monómero ha de contener en su estructura, grupos funcionales que permitan la interacción con el analito plantilla, con suficiente fuerza como para poder formar un complejo que se mantenga estable durante la polimerización. El equilibrio de la reacción, debe estar totalmente desplazado hacia la formación del complejo, trabajando con una relación estequiométrica en exceso de monómero. Entre los más comúnmente empleados en la síntesis, destacan los monómeros representados en la Figura 3.3.

El ácido metacrílico (MAA), ha sido el monómero más empleado hasta la fecha, resultando apropiado para analitos que presentan grupos funcionales básicos en su estructura. De igual forma, la vinilpiridina ha

resultado muy adecuada para analitos que contengan grupos ácidos. En el caso de que la molécula molde fuera capaz de formar complejos con determinados iones, el empleo de monómeros funcionales quelantes como el vinilimidazol, sería el más conveniente (González & Guardia, 2007).

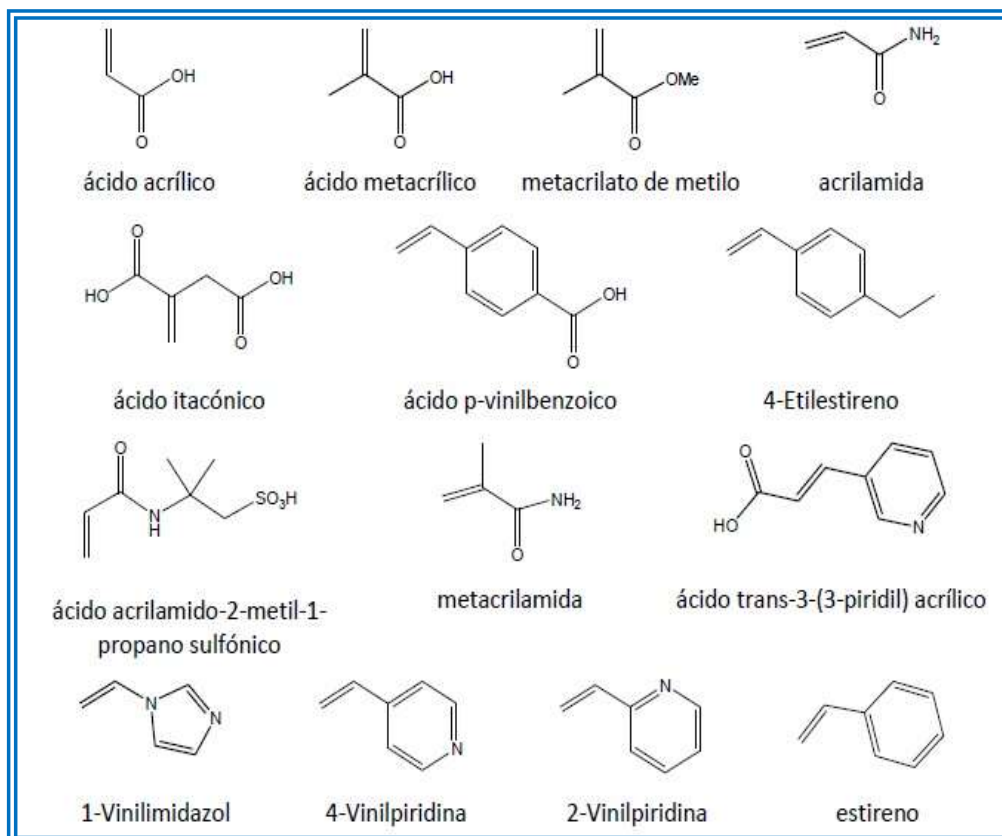


Figura 3.3. Monómeros funcionales comunes utilizados en procedimientos de impresión molecular (Yan & Row, 2006).

También la naturaleza del disolvente o porógeno, va a influir en las interacciones entre el monómero funcional y la plantilla, proporcionando una única fase a todos los componentes de la polimerización. La elección y cantidad de un disolvente porógeno, afecta de forma significativa al proceso de impresión, a la morfología final de la estructura (tamaño y distribución de los poros, hinchazón, resistencia) y a la estabilidad del polímero. Tanto el disolvente porógeno empleado como el entrecruzante, determinan las propiedades físico-químicas del polímero formado, como la porosidad, la cual facilita el acceso del analito a los sitios de unión específicos.

La estabilización de los enlaces por puentes de hidrógeno o por interacciones electrostáticas entre los monómeros y la plantilla, se van a ver muy favorecidos por el empleo de disolventes con una constante dieléctrica baja, es decir, con disolventes apróticos, como pueden ser el tolueno, el cloroformo o el acetonitrilo (ACN) (Sellergren & Allender, 2005).

El uso de disolventes más polares, como pueden ser el agua o el metanol, suelen ser los más adecuados cuando la unión que interesa es de tipo hidrofóbico (Nicholls et al., 2001). Cuando la impresión es no covalente, el disolvente debe ser elegido de tal forma, que maximice la probabilidad de formación del complejo plantilla-monómeros funcionales (Cormack & Elorza, 2004).

En la impresión molecular, los entrecruzantes cumplen importantes funciones como: preservar la estabilidad estructural del polímero a lo largo del proceso de polimerización, ser los responsables de la morfología y porosidad de la matriz, siendo capaces de dar a la estructura su alto grado de entrecruzamiento y estabilidad, con la finalidad de que se generen las cavidades complementarias en tamaño y forma al analito, además ha de estabilizar los sitios de unión selectiva, confiriendo una gran estabilidad térmica y mecánica, consiguiendo una buena transferencia de masa. Los entrecruzantes más usados se muestran en la Figura 3.4.

Con el fin de obtener un material poroso de alta estabilidad mecánica, la proporción de entrecruzante debe ser elevada. Además, se debe elegir un entrecruzante cuya reactividad sea similar al monómero funcional, para evitar la polimerización predominante de uno sobre otro (Takeuchi, Mukawa, & Asanuma, 2003). Se suelen emplear los ácidos acrílico o metacrílico, ya que dan una elevada especificidad (Cormack & Elorza, 2004).

El etilenglicol dimetacrilato (EGDMA), es el entrecruzante más comúnmente empleado en combinación con el MAA, resultando muy adecuado ya que preserva los sitios de unión durante la polimerización, al mismo tiempo que confiere al polímero una gran estabilidad mecánica y térmica y buena mojabilidad, permitiendo una adecuada transferencia de masa. El trimetilpropano trimetacrilato (TRIM), posee características similares al EGDMA (Glad, Reinholdsson, & Mosbach, 1995). La diferencia

entre estos dos entrecruzantes se encuentra en el número de agentes entrecruzantes multifuncionales: el EGDMA (tiene dos grupos metacrilato) y el TRIM (tres grupos metacrilato), ambos demostraron en algunos casos, generar sitios de reconocimiento mejor definidos y robustos, trasladando al MIP mejores valores de afinidad y capacidad.

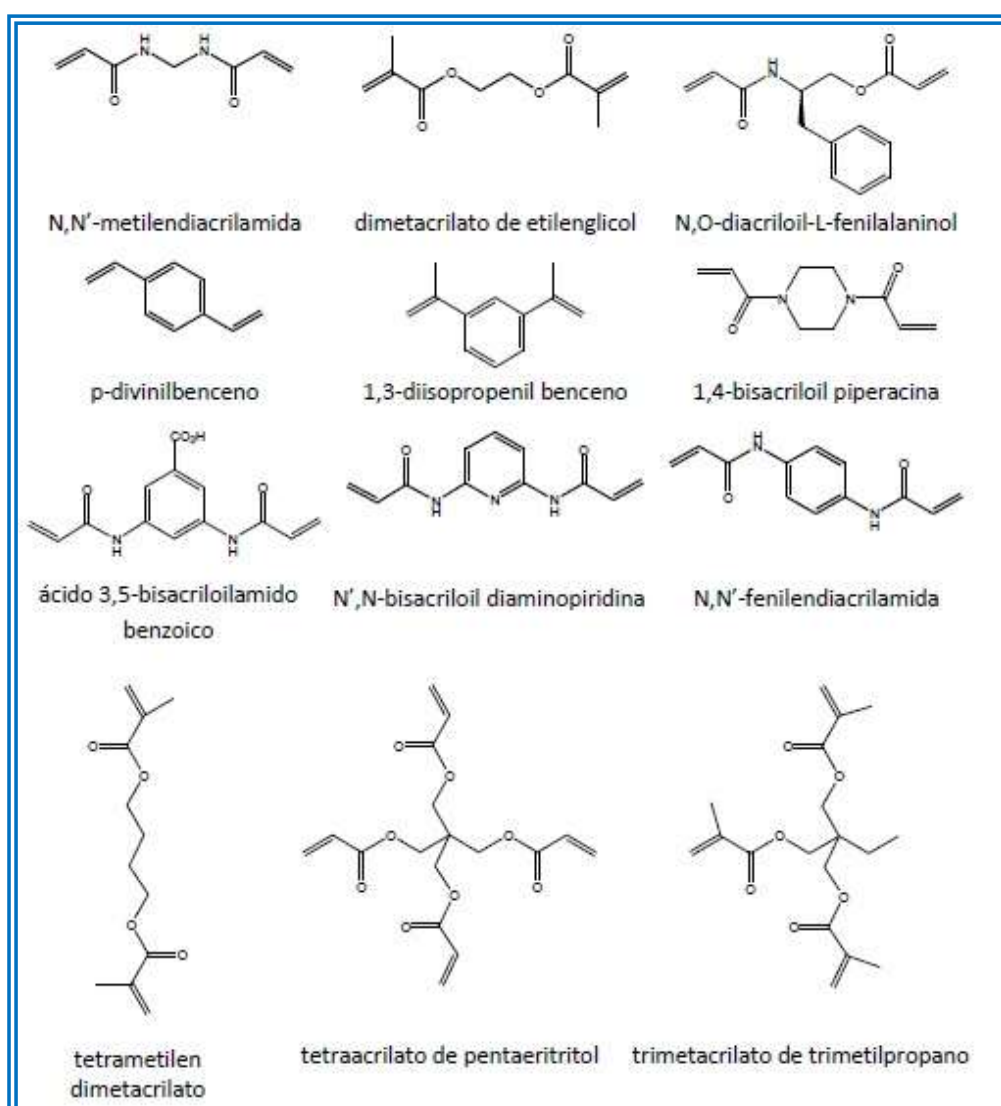


Figura 3.4. Entrecruzantes más comunes empleados en la síntesis de MIP (Yan & Row, 2006).

Otros entrecruzantes son capaces de formar un complejo simultáneamente con la plantilla, y por tanto actuar al mismo tiempo como monómero funcional y entrecruzante (Sibrian-Vazquez & Spivak, 2004).

La polimerización puede llevarse a cabo mediante varios métodos, aunque la polimerización por radicales libres, es la forma más importante al preparar polímeros de impresión molecular (Takeuchi et al., 2003). Por otro lado, la polimerización se podrá llevar a cabo vía fotoquímica o vía térmica, es decir, por acción de radiación ultravioleta o por acción del calor. Los iniciadores suelen ser de tipo Azo, el más empleado es el 2-2-Azo(bis)isobutironitrilo (AIBN), que puede emplearse tanto vía radiación ultravioleta, como por acción del calor a temperaturas superiores a 60 °C. Por lo general, la polimerización se lleva a cabo durante 24 horas (Lanza et al., 2001). Cuando la molécula plantilla es térmicamente inestable, es posible, que se puedan generar radicales libres a bajas temperaturas, por debajo de los 4 °C, por lo que será necesario utilizar iniciadores activados fotoquímicamente, como la dimetoxifenil acetona (González & Guardia, 2007), ya que pueden operar de forma efectiva a baja temperatura (Cormack & Elorza, 2004). En la Figura 3.5, se muestran las estructuras de los iniciadores más comunes.

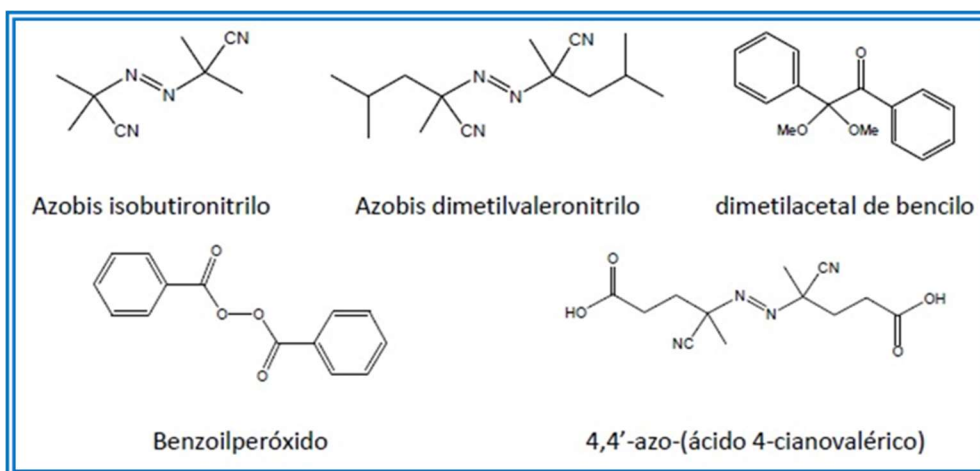


Figura 3.5. Estructuras de los iniciadores más comunes utilizados en la impresión molecular (Yan & Row, 2006).

Técnicas de impresión molecular

Atendiendo a la naturaleza de la interacción entre el monómero funcional y la plantilla, los MIP se pueden clasificar en función del tipo de

síntesis en tres categorías: la técnica covalente, la técnica no covalente, y la semi-covalente (espaciador sacrificable). La diferencia radica en la interacción que se produce entre la molécula plantilla y los monómeros funcionales, marcando las propiedades del polímero final obtenido (He et al., 2007; Mayes & Whitcombe, 2005).

La impresión molecular covalente fue desarrollada por el grupo de Wulff (Wulff, 1972; Wulff, Sarhan, & Zabrocki, 1973). En este trabajo se describía la preparación de un polímero, cuyas cavidades presentaban propiedades quirales, que permitían la separación de especies en una mezcla racémica. En este caso la unión entre el monómero y el analito se realiza de forma covalente, tanto en su formación como en el reconocimiento posterior de los analitos, permitiendo una gran definición estructural en la forma y el tamaño de las cavidades generadas. Requiere, por tanto, de la formación de enlaces covalentes reversibles entre los monómeros y la plantilla. Los monómeros funcionales suelen ser de tipo acrílico o vinílico. Después de la síntesis, la plantilla se extrae mediante rotura química de los enlaces covalentes, lo que suele realizarse mediante un proceso de hidrólisis (Wulff, Vesper, Grobe-Einsler, & Sarhan, 1977).

La ventaja de la impresión molecular covalente, es la obtención de lugares de enlace con una distribución de afinidad homogénea hacia la plantilla, formando así, MIP muy selectivos y con un porcentaje de unión específico muy alto (Mayes & Whitcombe, 2005).

El inconveniente reside en el número de monómeros capaces de llevar a cabo un enlace covalente, de naturaleza reversible con el analito, lo que junto a una cinética de reenlace baja y el número reducido de plantillas capaces de formar interacciones covalentes reversibles, hacen que esta técnica tenga un uso limitado (Tang et al., 2017), además la mayor parte de los enlaces covalentes formados en este tipo de polimerización, son inestables en medio acuoso (Öpik, Menaker, Reut, & Syritski, 2009), limitando su aplicación en Química Analítica.

En la Figura 3.6, se puede observar el procedimiento de impresión molecular covalente en sus etapas de preensamblado, polimerización y rotura de enlaces-extracción, representado por las letras: A) formación del complejo de pre-polimerización entre la molécula molde y

los monómeros funcionalizados; B) adición del agente de entrecruzamiento y polimerización; C) extracción del molde.

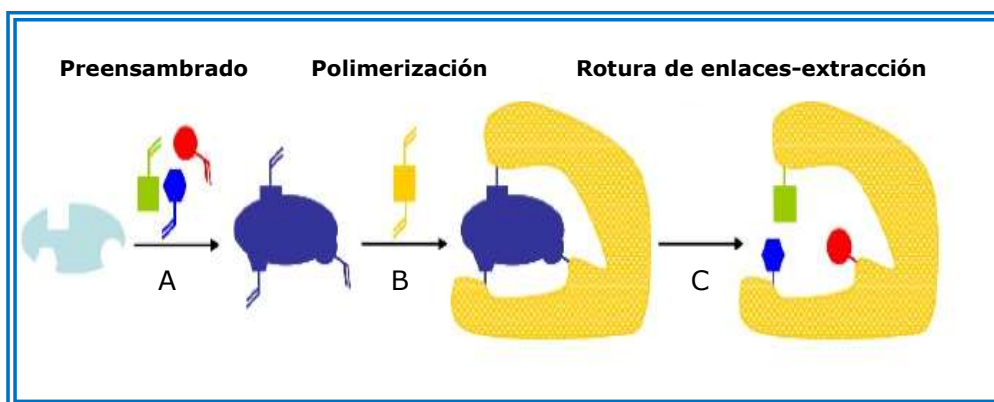


Figura 3.6. Esquema de la técnica de impresión covalente (Orellana Ruiz, 2016).

La técnica de impresión molecular no covalente, fue desarrollada por el grupo de Mosbach (Arshady & Mosbach, 1981). En este trabajo, se preparó un polímero empleando metacrilato de metilo como monómero funcional que, mediante fuerzas electroestáticas, formaba un compuesto de prepolimerización con la N,N'-fenildiacrilamida.

En un primer paso, se mezclan los monómeros y la plantilla para que formen interacciones no covalentes. El complejo así formado, se polimeriza con un alto grado de entrecruzamiento y la plantilla se libera mediante una simple extracción con un disolvente adecuado, sin necesidad de llevar a cabo una hidrólisis, como en el caso de la síntesis covalente. El enlace no covalente, se forma mediante interacciones moleculares de carácter débil, como el enlace de puentes de hidrógeno, pares iónicos, asociaciones bipolares, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrófobas, etc. (Whitcombe & Vulfson, 2001).

Actualmente es el método más empleado para preparar MIP, por su versatilidad, flexibilidad y sencillez, haciendo que esta técnica, pueda ser aplicada a un amplio rango de monómeros y analitos. La única desventaja, es la de ser menos selectiva y homogénea en los puntos de unión que la síntesis covalente (Alexander et al., 2006).

En la Figura 3.7, se puede observar el procedimiento de impresión no covalente en sus etapas de preensamblado, polimerización y extracción, representado por las letras: A) formación del complejo de prepolimerización entre la molécula molde y los monómeros funcionalizados; B) adición del agente de entrecruzamiento y polimerización; C) extracción del molde.

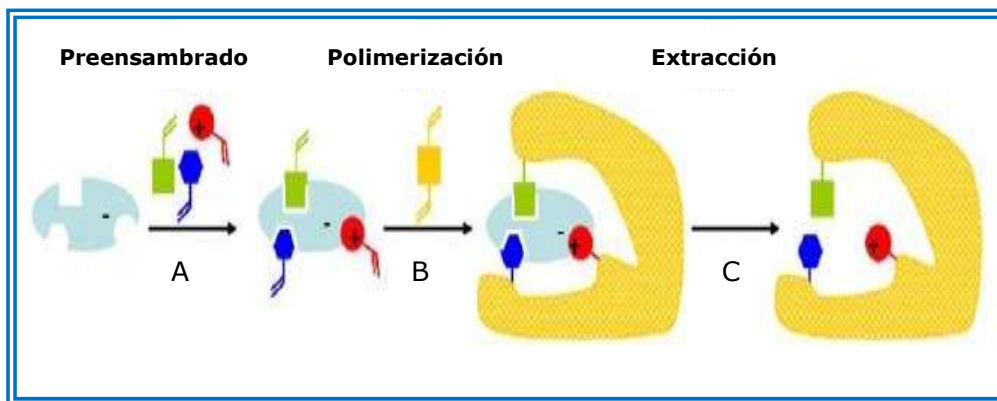


Figura 3.7. Esquema de la técnica de impresión no covalente (Orellana Ruiz, 2016).

El procedimiento de síntesis semi-covalente fue propuesto por primera vez por Sellergren y Andersson en 1990 (Sellergren & Andersson, 1990), al que siguieron otros estudios, como los llevados a cabo por el equipo de Whitcombe (Whitcombe, Rodriguez, Villar, & Vulfson, 1995).

En este caso, se pretende combinar las ventajas de la impresión covalente y no covalente. Se utilizan interacciones covalentes durante la etapa de impresión, lo que da lugar a una distribución más uniforme de las afinidades de los lugares de enlace, pero el reconocimiento posterior se lleva a cabo mediante interacciones no covalentes, ya que después de la hidrólisis del enlace y mediante la eliminación de una molécula pequeña (espaciador sacrificable), se obtienen funcionalidades residuales en posiciones espaciales precisas, capaces de formar interacciones no covalentes con la plantilla durante la fase de reenlace.

Sellergren sintetizó un polímero covalente a partir de la p-aminofenilalanina. Los restos de ácido carboxílico presentes en la matriz, formados tras la hidrólisis de la plantilla, eran capaces de interactuar con

el aminoácido plantilla mediante la formación de enlaces por puentes de hidrógeno. De igual forma que en los casos anteriores, los MIP formados son muy selectivos, aunque siguen estando limitados a determinados compuestos, cuyas funcionalidades puedan adaptarse a ella (Sellergren & Andersson, 1990).

El principal inconveniente de este tipo de polímeros, deriva de las diferencias estéricas entre los enlaces covalente y no covalente, ya que se necesita una mayor distancia para formar el enlace no covalente, que uno covalente. Esta limitación fue resuelta por Whitcombe en 1995, sintetizando un MIP utilizando el grupo carbonilo como "espaciador sacrificable" (se elimina junto con la molécula molde), entre el monómero funcional y la plantilla molecular (Whitcombe, Rodriguez, Villar, & Vulfson, 1995).

En la Figura 3.8, se puede observar el procedimiento de impresión semi-covalente en sus etapas de preensamblado, polimerización y rotura de enlaces-extracción, representado por las letras: A) síntesis del MIP mediante impresión covalente; B) reenlace de la molécula molde mediante interacciones no covalentes.

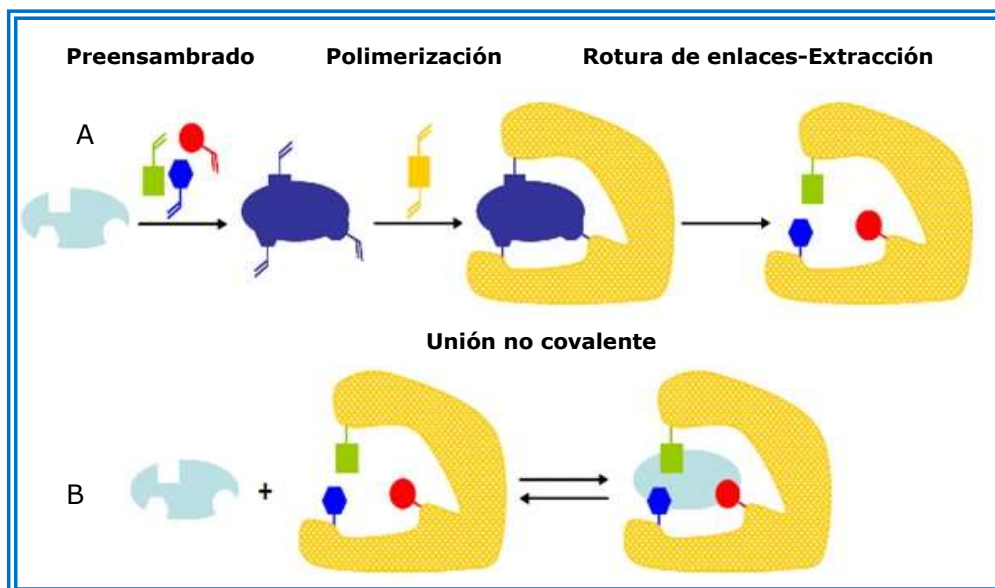


Figura 3.8. Esquema de la técnica de impresión semi-covalente (Orellana Ruiz, 2016).

Protocolos y métodos de polimerización

Los MIP, se pueden preparar utilizando diferentes metodologías y por tanto, se obtendrán diferentes morfologías, las cuales se encaminan dependiendo de la aplicación final a la que vaya destinado el polímero. Así la polimerización puede realizarse en bloque, en forma de esferas o *in-situ* (Beltran, Borrull, Marcé, & Cormack, 2010; Caro et al., 2006; He et al., 2007).

La polimerización en bloque es el método más utilizado y fue el primer método que se empleó para fabricar polímeros de impresión molecular (Mosbach & Ramström, 1996; Wulff, 1995). El procedimiento es muy sencillo y está basado en la polimerización radicalica de una disolución concentrada de monómeros, en la cual se mezclan todos los componentes (plantilla, monómeros funcionales y entrecruzantes, disolvente e iniciador), dando como resultado un monolito (bloque), de polímero de forma idéntica al recipiente empleado en el que se ha llevado a cabo la polimerización. Terminado el proceso, el recipiente se rompe y el polímero obtenido necesita ser triturado y tamizado, hasta obtener el tamaño deseado, dando como resultado partículas con forma irregular y con un amplio intervalo de tamaños (Mosbach & Haupt, 1998). El analito plantilla se elimina posteriormente, liberando las cavidades responsables del reconocimiento selectivo del analito. Por ejemplo, tamaños de partícula empleados para cromatografía suelen ser de 25-38 μm y para la extracción en fase sólida, se suele emplear un tamaño de entre 50-200 μm . Aunque esta forma de polimerización sea la más sencilla y económica, presenta algunos inconvenientes como la necesidad de tamizar y triturar el polímero, provocando que las partículas creadas no sean homogéneas en tamaño y forma, disminuyendo la capacidad de carga del polímero y produciendo una pérdida de rendimiento (alrededor del 80%). Por otra parte, al destruir en este proceso de triturado algunos sitios de reconocimiento molecular, se pueden producir sitios de enlace no específico (Mosbach, 2001).

Para mitigar los inconvenientes apuntados anteriormente, se ha investigado en protocolos de polimerización que den lugar a partículas

más homogéneas en tamaño y forma. La polimerización en forma de esferas cumpliría con este objetivo.

La primera técnica utilizada para conseguir partículas esféricas es la polimerización por precipitación, la cual es muy parecida a la polimerización en bloque, ya que se parte prácticamente de la misma mezcla de polimerización (plantilla, monómeros e iniciador), excepto que la cantidad relativa de disolvente presente en la mezcla, es mucho más grande, esto hace que las partículas crezcan y se vuelvan más insolubles en el disolvente orgánico, lo que produce una precipitación de las mismas.

Al trabajar con exceso de disolvente las cadenas poliméricas no ocupan el volumen total del disolvente, encontrándose la mezcla de reactivos mucho más diluida (Ye & Mosbach, 2001).

Se puede llevar a cabo, un proceso complementario de agitación durante la polimerización, formando partículas más pequeñas en función de la velocidad de agitación y creando partículas esféricas individuales en el seno del polímero (Ye, Cormack, & Mosbach, 2001).

Las ventajas de esta técnica de polimerización, viene dada por sus partículas independientes, esféricas y mucho más homogéneas, con mayor capacidad y mejor distribución de los sitios de unión que las conseguidas por la anterior técnica, eliminando las etapas de trituración y tamizado del polímero, con lo que las pérdidas y manipulación del mismo se minimizan, mejorando el rendimiento de la polimerización (Wei & Mizaikoff, 2007). Estas esferas son muy adecuadas para trabajar con sistemas de flujo, en el desarrollo de sensores (Haupt, Dzgoev, & Mosbach, 1998), o fases estacionarias en técnicas de separación (de Boer et al., 2002).

Los inconvenientes de este tipo de polimerización son: la obtención de partículas de un tamaño concreto, la gran cantidad de plantilla que se requiere debido al factor de dilución empleado y la aparición de partículas de tamaño comprendido entre 0,3-10 μm , lo que provoca sobrepresión cuando se emplean como fase estacionaria (Ye & Mosbach, 2001).

La segunda técnica que produce partículas esféricas es la polimerización en suspensión. Se produce una combinación de una fase hidrofóbica, en la que se dispersan gotas formadas por una fase orgánica

inmiscible compuesta de porógeno, molécula plantilla, monómeros funcionales y entrecruzantes e iniciador. Se emplean líquidos perfluorados, porque la fase acuosa puede impedir la interacción entre el analito y el monómero. La mezcla se agita, polimerizando en forma de gotas en suspensión, que son estabilizadas por agentes surfactantes (Daniel, Prabhakara Rao, & Prasada Rao, 2005). Los agentes surfactantes se encargan de controlar el tamaño de partícula junto con la agitación, lo cual es una ventaja respecto a la técnica anterior (Guerrero-Sanchez, Erdmenger, Šereda, Wouters, & Schubert, 2006). Este tipo de polimerización es rápida, se puede utilizar para interacciones covalentes fuertes y en la impresión molecular no covalente, aunque se encarece con el uso de los compuestos fluorocarbono (Ansell & Mosbach, 1997). Otros autores, proponen el empleo de la parafina líquida, en lugar de los compuestos fluorocarbono (Kempe & Kempe, 2004). Actualmente se han preparado MIP de reconocimiento selectivo en matrices acuosas (Zhou, Ding, Che, Jiang, & Sang, 2019).

El siguiente tipo de polimerización, es la polimerización por revestimiento. Mediante este tipo de polimerización se pueden obtener partículas esféricas monodispersas, con un alto control en el tamaño de la partícula (Pérez-Moral & Mayes, 2004), comprendido entre 2 y 50 micras. En este método, se recubren núcleos esféricos preformados mediante una capa de polímero impreso, utilizando para ello diferentes estrategias. Estos núcleos pueden consistir en partículas de sílice funcionalizadas, poliestireno o polidivinilbenceno, cuyos grupos superficiales proveen los sitios de anclaje para incorporar la capa de polímero impreso (Biffis, Dvorakova, & Falcimaigne-Cordin, 2010).

Por último, otra manera de obtener partículas esféricas, es la polimerización en dos etapas. Esta técnica de polimerización fue propuesta por Hosoya (Hosoya et al., 1994), y consiste en sintetizar partículas esféricas de látex en medio acuoso, que posteriormente se hinchan al formar microemulsiones tras adicionar un agente plastificante. Estas partículas se impregnan con la mezcla de prepolimerización, de tal forma que, en su superficie se forme una capa de polímero. Es el método más complejo, no indicado en la síntesis no covalente. En otro estudio se utilizó

un método de polimerización redox, con hinchamiento en varias etapas, en el cual se comparó la capacidad de reconocimiento molecular (Haginaka, Takehira, Hosoya, & Tanaka, 1998).

En la Figura 3.9, se muestran las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM), de polímeros obtenidos con diferentes métodos de polimerización. Se puede observar claramente la diferente morfología de los mismos. Las imágenes corresponden a trabajos preliminares utilizando MAA como monómero, EGDMA como entrecruzante, ACN como porógeno, y AIBN como iniciador.

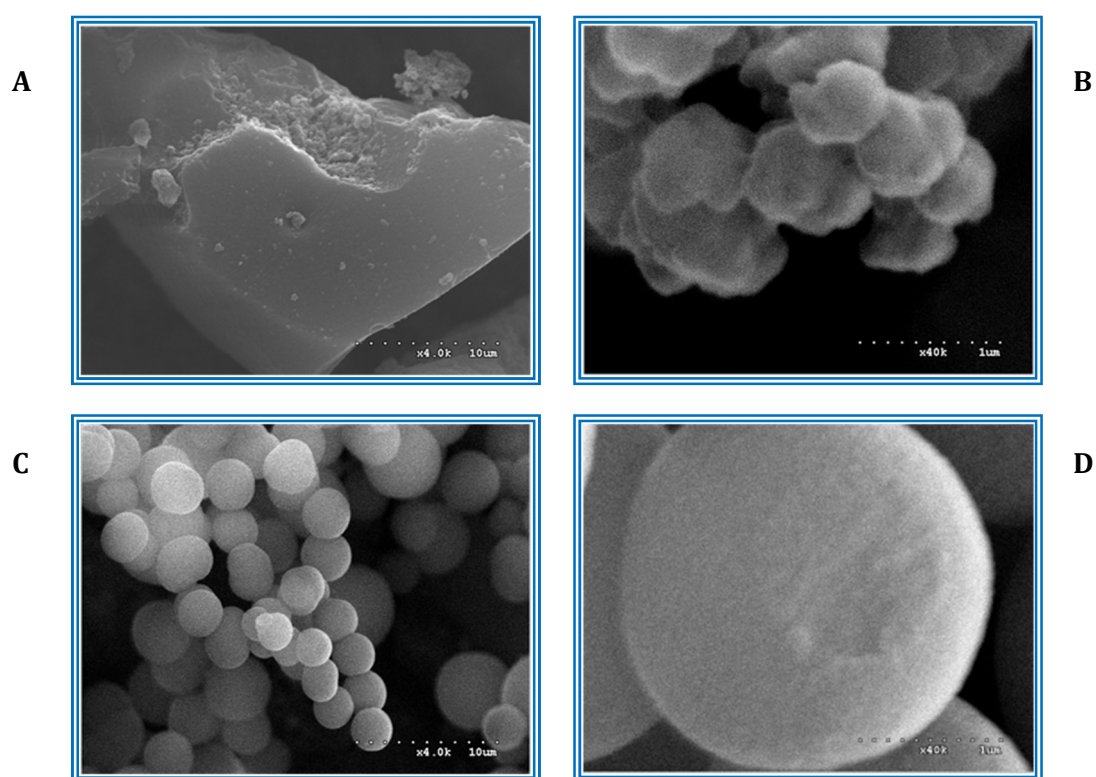


Figura 3.9. Imagen SEM de: (A) MIP en bloque. (B) MIP por precipitación. (C) y (D) MIP por precipitación con agitación.

Otros métodos de polimerización serían, la polimerización *in-situ*, la polimerización en forma de láminas y las técnicas de injerto.

En la polimerización *in-situ*, se pueden obtener polímeros con impresión molecular en forma de cilindros o barras porosas, para su utilización como fases estacionarias en columnas y capilares. Esta técnica evita los tratamientos a la hora de empaquetar las columnas, realizando

solamente el lavado del polímero para extraer la plantilla. El tamaño del poro se puede controlar ajustando la composición del disolvente, consiguiendo así cilindros con una gran permeabilidad al flujo (Cardoso, Tavares, & Sales, 2018; Vallano & Remcho, 2000).

Existen diferentes métodos para obtener polímeros de impresión molecular en forma de láminas delgadas, por ejemplo, el recubrimiento por centrifugación, por inmersión, por pulverización, el recubrimiento químico, la electropolimerización, proceso de moldeado y evaporación del disolvente, utilización de soportes como láminas de vidrio o filtros de vidrio, polimerización “*in situ*” de láminas de polímero en el mismo lugar donde se van a utilizar (columna o capilar), o la funcionalización de la superficie de membranas porosas, mediante la infiltración del polímero en la superficie de la membrana soporte (Nabavi, Vladislavljević, Wicaksono, Georgiadou, & Manović, 2017; Piletsky, Panasyuk, Piletskaya, Nicholls, & Ulbricht, 1999). También se han creado biosensores, a partir de membranas fluorescentes impresas molecularmente, (Zhang et al., 2018).

Las técnicas de injerto emplean partículas (Shamsipur, Fasihi, & Ashtari, 2007) o membranas como soporte de polimerización (Tokuyama, Naohara, Fujioka, & Sakohara, 2008). La superficie donde tiene lugar la polimerización puede presentar dos situaciones: una en la que se encuentra inmóvil el polímero junto con la mezcla de polimerización (Guo et al., 2005), y otra donde el compuesto inmovilizado sobre la superficie, es el iniciador, permitiendo que el crecimiento de las cadenas poliméricas vaya desde la superficie, controlando así, el grosor de la capa. Las técnicas de injerto son una tendencia en la actualidad en la preparación de polímeros de impresión molecular, gracias a sus múltiples aplicaciones (Orihara, Hikichi, Arita, Muguruma, & Yoshimi, 2018).

Formatos y aplicaciones

En los últimos años ha crecido el interés en incluir los selectivos MIP, como material adsorbente en las técnicas de preparación de muestras complejas (SPE, SPME, SBSE, etc.) (Hu et al., 2013; Turiel &

Martin-Esteban, 2010). Así, algunas de las más importantes son: el uso de polímeros de impresión molecular como absorbentes selectivos en procesos de extracción en fase sólida (SPE) (Sánchez-Barragán, Karim, Costa-Fernández, Piletsky, & Sanz-Medel, 2007), como fase estacionaria en cromatografía (HPLC) (Sellergren, 2001), como fases estacionarias de columnas capilares en electrocromatografía capilar (CEC) (Quaglia, Sellergren, & De Lorenzi, 2004), o como reconocimiento selectivo de sensores (Marx, Zaltsman, Turyan, & Mandler, 2004).

Los polímeros impresos, son materiales ideales para su empleo como adsorbentes en procesos que requieran extracción en fase sólida, para la limpieza selectiva de muestras y/o preconcentración de analitos, en diferentes formatos (cartucho, columnas, etc.). La extracción en fase sólida (MI-SPE), es uno de los formatos más utilizados. La mayoría de las aplicaciones desarrolladas se han aplicado *off-line*, no sólo por la simplicidad del procedimiento, también por permitir modificaciones de pH, o la adición de aditivos, que podrían ser incompatibles con la instrumentación analítica (Hu et al., 2013). En los últimos años, innumerables protocolos MISPE se han optimizados para la determinación de múltiples analitos en muestras medioambientales, alimentos o biofluidos (Hu et al., 2013; Martín-Esteban, 2013). Actualmente, se comercializan cartuchos empaquetados con polímeros impresos para la determinación de diferentes analitos en múltiples tipos de muestra.

También se han desarrollado aplicaciones MISPE *on-line*. Generalmente en este tipo de procedimientos se utiliza una precolumna, en la que se empaqueta el MIP, previa a la entrada en el sistema cromatográfico, automatizando el análisis. Esta metodología fue introducida por primera vez por Masqué, acoplado un MISPE a un HPLC para determinar 4-nitrofenol de una mezcla de agua de río (Masqué, Marcé, Borrull, Cormack, & Sherrington, 2000), también lo encontramos en trabajos más actuales (Serrano et al., 2017). Con este método se reduce la manipulación de la muestra, minimizando las pérdidas y contaminación del analito, pudiéndose mejorar los límites de detección y reproducibilidad del método (Hu et al., 2013). El problema de este protocolo de trabajo, es la posible falta de compatibilidad entre la fase móvil requerida para producir la

separación en la columna analítica y el disolvente de elución necesario para extraer los analitos de la precolumna del MIP (Turiel & Martín-Esteban, 2010).

Otra de las aplicaciones que ha tenido mayor desarrollo, es la microextracción en fase sólida (MI-SPME). Desarrollada por Arthur y Pawliszyn, se basa en el reparto de los analitos entre la muestra y la fase estacionaria, que en este caso recubre la superficie de una fibra normalmente de sílice fundida (Arthur & Pawliszyn, 1990). Los analitos son desorbidos térmicamente en el puerto de inyección de un GC, o llevando a cabo la elución de los mismos en el disolvente adecuado, para posteriormente ser analizados mediante otras técnicas cromatográficas, como HPLC, HPLC-MS o CE. La fibra de la que está constituida la fase estacionaria no es selectiva, por lo que en el proceso de extracción se puede dar una falta de selectividad. Para solucionar estos problemas se utilizan MIP como fases estacionarias, mejorando la simplicidad, flexibilidad y selectividad de este tipo de técnica (Rahimi, Bahar, Heydari, & Amininasab, 2019).

Mullett, introdujo esta técnica por primera vez en estudios sobre la determinación selectiva de propanolol en fluidos biológicos (Mullett, Martin, & Pawliszyn, 2001). La gran ventaja de este protocolo, es la miniaturización y automatización del proceso, ya que se integra en un solo paso la extracción, concentración e inyección de la muestra, además el volumen de adsorbente es mucho más pequeño que el empleado en SPE.

Entre sus inconvenientes se destacan: la complejidad de la instrumentación, y la necesidad de compatibilizar el disolvente necesario para la desorción con la fase móvil empleada en la separación (Hashemi, Zohrabi, & Shamsipur, 2018).

También las barras de agitación magnética (MI-SBSE), ofrecen interesantes aplicaciones de los MIP. En este caso, la polimerización se lleva a cabo sobre unas barras de agitación magnética. Está basado en el reparto de los analitos entre la muestra en estado líquido y una fase estacionaria que recubre dicha barra. Estas barras, comercialmente suelen estar cubiertas de polidimetilsiloxano (PDMS), restringiendo el rango de aplicación

a compuestos hidrofóbicos, debido al carácter apolar del PDMS (Nogueira, 2012).

La impresión molecular, puede mejorar la selectividad de estas barras agitadoras, diseñando MIP en forma de película que recubren dichas barras. De esta forma se aumenta la selectividad, además de presentar un rápido equilibrio de adsorción debido a la naturaleza porosa del MIP (Speltini, Scalabrini, Maraschi, Sturini, & Profumo, 2017; Zhu, Cai, Yang, Su, & Gao, 2006).

Similar al anterior formato, también se han diseñado polímeros en forma de perlas magnéticas. Este procedimiento de síntesis, fue diseñado por primera vez para el análisis de trazas de triazinas, en muestras complejas. Mediante este método, se sintetizaron MIP en forma de perlas magnéticas (Zhang, Liu, Hu, & Li, 2009), el tiempo de polimerización fue muy corto comparado con las otras técnicas, ya que se llevó a cabo mediante microondas, y permitió la síntesis de polímeros con capacidad de reconocimiento molecular, capaces de ser eliminados de la disolución, mediante la aplicación de un campo eléctrico, evitando con ello el paso de eliminarlos filtrando o centrifugando la muestra (Florea et al., 2018).

También los MIP han sido utilizado en la dispersión de la matriz (MSPD) y se ha mostrado como un procedimiento eficiente y versátil, para aislar todo tipo de sustancias (pesticidas, drogas, contaminantes y compuestos naturales), en una amplia variedad de muestras animales y vegetales (Capriotti, Cavaliere, Laganà, Piovesana, & Samperi, 2013). Se pueden encontrar muchos artículos de investigación que informan sobre aplicaciones y mejoras para la MSPD, con aplicaciones recientes, últimos avances y las perspectivas futuras de esta técnica (Wang et al., 2018). Se han extraído los flavonoides neohesperidina y naringina de diferentes frutas utilizando MSPD miniaturizado, acoplado a un HPLC-UV. El método propuesto presenta un factor de enriquecimiento mejorado, un consumo reducido de reactivos, buena linealidad y altas recuperaciones. Los resultados mostraron que el método optimizado, podría ser una alternativa apropiada para la extracción y detección de componentes activos en matrices de frutas (Xu et al., 2016).

Las membranas son otro de los formatos en los que se han aplicado los MIP. La primera utilización de membranas líquidas microporosas en combinación con MIP, fue propuesta por el grupo de Chimuka, para la extracción del 17 β -estradiol en muestras acuosas (Nemulenzi et al., 2009). Se preparó un MIP utilizando 17 β -estradiol como compuesto modelo y después los compuestos fueron extraídos, a través de una membrana porosa hidrofóbica unidos a partículas de MIP. Los MIP fueron preparados por polimerización en bloque.

Experimentalmente, con esta técnica se ponen en contacto dos compartimentos separados por una membrana. El compartimento de abajo se rellena con mezcla acuosa, mientras que el superior está compuesto por la fase orgánica aceptora, a la que se añade una pequeña cantidad de partículas de MIP. Los analitos unidos a la matriz de la muestra, son extraídos desde la fase acuosa a la fase orgánica y de ésta a los sitios de unión del MIP. El MIP, es entonces separado de la fase orgánica por filtración y los analitos son liberados posteriormente, con el eluyente adecuado (Ghasemi & Nematollahzadeh, 2018).

Dentro del campo de la Química Analítica, las técnicas cromatográficas de separación, como la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), son las que se han visto más favorecidas con el nacimiento de la tecnología de impresión molecular. La utilización de columnas cromatográficas con capacidad de reconocimiento, aumenta enormemente la retención de un analito específico cuanto atraviesa el polímero, permitiendo su separación. Se han adoptado distintas estrategias, para minimizar los inconvenientes debidos al carácter heterogéneo de las cavidades y al proceso de transferencia de masa (Marc, Panuszko, Namieśnik, & Wieczorek, 2018). De esta forma se han podido determinar de una manera rápida y sencilla carbohidratos, aminoácidos, péptidos, proteínas, drogas, fármacos, pesticidas, flavonoides, etc.

La combinación de la impresión molecular con la cromatografía líquida, ha resultado tan eficaz que se han descrito trabajos que permiten la separación de enantiómeros en mezclas racémicas, utilizando como fase estacionaria un polímero impreso con uno de los enantiómeros puros (Aboul-Enein & Stefan, 1998; Sellergren, 2001). Esos polímeros impresos

con plantillas quirales, ofrecen una nueva generación de diseños hechos a medida, formando fases estacionarias quirales (CSP), con selectividades predecibles (Rutkowska et al., 2018; Trojanowicz, 2014).

La utilización de polímeros de impresión molecular, como fase estacionaria en electroforesis capilar (CE), une la eficacia de la separación electroforética con la selectividad del reconocimiento de los MIP. El relleno de la columna es sencillo, rápido económico y puede llevarse a cabo bien sintetizando el polímero y rellenando la columna posteriormente, o bien realizando la síntesis del polímero en el interior de la propia columna.

El primer método es el más habitual, sintetizando el polímero mediante cualquiera de las metodologías anteriormente descritas. Una vez formado el polímero, la columna se rellena manteniendo el polímero retenido mediante fritas (Maloney & Colón, 2002). La preparación también se puede dar en el interior de la columna, obteniéndose fases estacionarias de mayor porosidad y permeabilidad. Estos capilares recubiertos se enlazan a las paredes del capilar, donde la fase estacionaria puede estar adsorbida, o unida covalentemente a la pared del capilar (Liu, Zou, Ye, Ni, & Zhang, 1999). Es una técnica sencilla que elimina los problemas de atasco de las columnas, aunque la capacidad de éstas es menor debido a la cantidad de polímero presente en el interior de la misma. Con esta técnica se puede controlar el tamaño de partícula, su porosidad y el tipo de interacción con el analito, sin embargo, existe el inconveniente de la formación de burbujas en el interior de la columna, las cuales interrumpen la transmisión de campo eléctrico. Para evitarlo, se ha propuesto la formación de monolitos dentro del capilar, que eliminarían las fritas y por tanto, estos problemas con las burbujas (Liu, Xu, Yan, & Gao, 2005).

El empleo de los MIP en electrocromatografía capilar, proporciona separaciones eficaces y selectivas, aunque el principal inconveniente es la necesidad de un flujo electroosmótico que impulse la fase móvil a través del capilar, sin que perjudique la interacción entre el analito plantilla y los sitios de unión del polímero. Esto es debido a la incompatibilidad entre el medio necesario para favorecer la interacción analito-MIP, generalmente un disolvente polar, mientras que el flujo electroosmótico necesita un medio acuoso o disolución acuosa salina, por lo

que este proceso ha de optimizarse para no perjudicar dicha interacción (Turiel & Martín-Esteban, 2005). La combinación de impresión molecular y electrocromatografía capilar (MIP-CEC), es idónea para algunas determinaciones y se ha empleado en muchos estudios de separación llevados a cabo sobre muestras racémicas, aminoácidos, anestésicos, etc. (Liu, Zheng, Yan, & Gao, 2007), por ejemplo, en la determinación de zopiclona, un fármaco análogo de las benzodiazepinas (Liu, Wei, Huang, Yang, & Liu, 2012). Se ha comprobado que es una herramienta poderosa en el análisis ambiental (Cacho, Schweitz, Turiel, & Pérez-Conde, 2008), estos autores han sintetizado y evaluado un monolito de impresión molecular (MIM), como fase estacionaria para la determinación selectiva del fungicida tiabendazol (TBZ), en muestras de cítricos mediante electrocromatografía capilar no acuosa.

Los MIP se pueden utilizar también como sensores. Un sensor es un dispositivo que debe responder de forma sensible, selectiva, continua, reversible y rápidamente a los cambios de concentración de una determinada sustancia en una muestra, por lo que debe de disponer de un elemento de reconocimiento. La utilización de polímeros de impresión molecular como sensores, presenta gran versatilidad, siendo fácilmente adaptables a diferentes sistemas. Se han desarrollado sensores basados en MIP, para una alta variedad de compuestos y con muy buenos resultados (Lakshmi, Prasad, & Sharma, 2006).

Los sensores se pueden presentar en diferentes formatos y se han podido analizar numerosos compuestos como: hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en agua (Dickert, Achatz, & Halikias, 2001), fármacos, pesticidas, aminoácidos, etc. (Khasanah et al., 2017). Siendo los MIP preparados sobre láminas delgadas o capas, muy útiles en este tipo de aplicaciones, principalmente debido a sus rápidos tiempos de respuesta y sencillez de uso.

Las aplicaciones de los MIP como sensores, se han orientado fundamentalmente a la rama analítica de la química, empleándose en diferentes aplicaciones químicas, con características atractivas como su bajo coste, versatilidad, resistencia, alta selectividad y sencillez de preparación.

Su empleo como material adsorbente en SPE, supone uno de sus usos más extendidos y de mayor interés actual.

También se pueden realizar ensayos empleando MIP, dado que los polímeros de impresión molecular comparten con los anticuerpos, su capacidad de unión selectiva a una molécula diana, resulta lógico pensar en gran diversidad de técnicas desarrolladas para la determinación de analitos mediante inmunoensayos, radioinmunoensayos (RIA), ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), que van a utilizar MIP como materiales de reconocimiento. Estos procedimientos se denominan (MIA), ensayo solvente por impresión molecular.

La mayoría de los métodos desarrollados están basados en ensayos de tipo competitivo, en los que el analito y una pequeña cantidad de análogo marcado, compiten para unirse a un número limitado de sitios de unión específicos del polímero. La cantidad de analito marcado unido al polímero, será proporcional a la cantidad de especie no marcada presente en la mezcla.

Mediante procedimientos (MIA), se han desarrollado polímeros de impresión molecular fluorescente, para detectar aminos biogénicas en muestras de peces. Este pseudo-inmunoensayo utiliza MIP que se ha sintetizado mediante polimerización por precipitación, usando histamina como molde, y debido a la complejidad de la matriz (extracto de pescado), toma gran importancia la etapa de preparación de la muestra (Mattsson, Xu, Preininger, Tse Sum Bui, & Haupt, 2018).

Inmunoensayos enzimáticos de quimioluminiscencia sensible, basados en polímeros de impresión molecular sintetizados por precipitación, para la extracción en fase sólida del paratión, un plaguicida organofosforado prohibido en todas sus formulaciones y usos, por ser dañino para la salud humana, animal y el ambiente (Chen et al., 2017).

Inmunoensayos mediante electroforesis capilar, usando un material polimérico como anticuerpo biomimético, para la determinación de trazas de triclorfón en las verduras, este compuesto también llamado metrifonato, es un insecticida muy eficaz, que presenta efectos adversos en la salud humana (Li, Lu, Qiao, & Xu, 2017).

Se han descrito otros inmunoensayos ligados a enzimas, basándose en microesferas impresas para la detección de residuos de sulfametazina, un antimicrobiano de uso veterinario. El método se denomina (MI-ELISA), y es una herramienta analítica útil para la detección rápida en el análisis de residuos (Peng et al., 2017).

El primer ensayo con MIP, fue descrito por Vlatakis, fue un ensayo farmacológico utilizando imitaciones de anticuerpos fabricadas mediante impresión molecular para la determinación en sangre de teofilina, un alcaloide de la familia metilxantina, la misma a la que pertenecen la cafeína y la teobromina, caracterizada por ser estimulante del sistema nervioso central y broncodilatadora (Vlatakis, Andersson, Müller, & Mosbach, 1993). Estudios más recientes, realizan ensayos competitivos fluorescentes para melanina, utilizando polímeros de impresión molecular ficticia como imitadores de anticuerpos (Du et al., 2016).

Todos los ensayos descritos, evitan la utilización de marcadores radioactivos. Los compuestos radiactivamente marcados son virtualmente idénticos a los no marcados y, a menudo, asequibles comercialmente. Sin embargo, el riesgo sanitario asociado al uso de material radiactivo, impulsó el desarrollo de sistemas de detección menos peligrosos. La detección fluorescente, colorimétrica y enzimática son alternativas posibles y, por ello, se han desarrollado ensayos enzimáticos, basados en la utilización de polímeros de impresión molecular.

En los últimos años, la combinación de MIP con otros materiales porosos y nanoestructuras abren nuevas expectativas en el desarrollo de materiales adsorbente para la preparación de la muestra, que mejoran las posibilidades de automatización y miniaturización de los sistemas analíticos (Casado et al., 2020; Hu et al., 2013).

3.2.3. Aplicaciones de los MIP en la determinación de compuestos fenólicos

Mediante esta tecnología se han determinado diferentes metabolitos de compuestos fenólicos, así como los precursores de los

mismos en diferentes matrices, tanto de origen vegetal como biológico. Sin embargo, la aplicación de los MIP en la determinación de compuestos fenólicos es escasa. La mayoría de ellos se han sintetizado por polimerización en bloque y las aplicaciones desarrolladas se han llevado a cabo *off-line* en cartuchos de extracción. Así se ha determinado (+)-catequina, para la extracción selectiva de ésta en un extracto de té verde, utilizando un MIP sintetizado con acrilamida (MA) como monómero funcional, EDGMA y acetonitrilo como entrecruzante y porógeno (Blahova, Lehotay, & Skacani, 2004). Se ha determinado quercetina en plasma utilizando acrilamida y 2,2-bis(hidroximetil)butanol trimetacrilato (TRIM), como monómero funcional y entrecruzante (Xie, Chen, Li, & Xu, 2003). También utilizando como monómero acrilamida, se ha determinado quercetina en extracto de *Caragana jubata* (Zhu & Xu, 2003). También se ha extraído selectivamente quercetina y kaempferol de las hojas de Gingo, mediante un MIP sintetizado, utilizando quercetina como plantilla, acrilamida y EDGMA como monómero y entrecruzante (Xie et al., 2001). Molinelli y col. (2002) sintetizaron un MIP para la determinación de quercetina en vino tinto, utilizando 4-vinilpiridina como monómero y EDGMA como entrecruzante (Molinelli, Weiss, & Mizaikoff, 2002). Un MIP de galato de epigallocatequina, se ha preparado utilizando ácido metacrílico (MAA) y EGDMA, para la determinación de éste (Lei, Zhong, Xiang, Zhou, & Yu, 2005). Zeng y col. (2012) prepararon un MIP utilizando un monómero bifuncional y rutina como plantilla, para la extracción en fase sólida de rutina, quercetina, naringenina y kaempferol en extractos vegetales, comparando los resultados con cartuchos comerciales de SPE con rellenos de adsorbente C18, sílica y PCX (Zeng, Wang, Liu, Kong, & Nie, 2012).

Jaouhari y col. (2020) aplicaron la sensibilidad excepcional del (MIP), en la fabricación de un sensor electroquímico de alto rendimiento para el reconocimiento de rutinas. La combinación del MIP con otros materiales consigue propiedades como gran superficie, alto efecto catalítico, estabilidad eléctrica, térmica y mecánica, además de la gran sensibilidad. El MIP fue decorado en la superficie de su estructura con imidazolato zeolítico (ZIF-8) y un compuesto de óxido de grafeno reducido (rGO) modificado con

electrodo de carbono vítreo (GCE), para fabricar el electrodo GCE/rGO/ZIF-8/MIP (El Jaouhari et al., 2020).

Recientemente Gao y col., han desarrollado un método basado en una microextracción en fase sólida utilizando un MIP como sorbente (MI-SPME), acoplado a un sistema LC-MS/MS con analizador de tiempo de vuelo (QTOF-MS/MS), para la detección de luteolina y sus metabolitos en vivo, en hígado de rata. La fibra MI-SPME se prepara con luteolina, acrilamida y EGDMA como plantilla, monómero y entrecruzante respectivamente. Este procedimiento ha permitido identificar rápidamente luteolina, y eventualmente apigenina, crisoeriol y diosmetina (Gao et al., 2017).

Cheng y col. (2020) sintetizaron y caracterizaron un polímero magnético impreso molecularmente ($\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2\text{-MIP}$), para la extracción y determinación eficaz del kaempferol de muestras de manzana. El MIP se fabricó mediante tecnología de impresión molecular de superficie y separación magnética, utilizando kaempferol como plantilla, acrilamida (MA) como monómero funcional, (AIBN) como iniciador y (EGDMA) como entrecruzante, mostrando una alta capacidad de adsorción, alta selectividad hacia el kaempferol sobre los análogos estructurales y buenas recuperaciones para la muestra real, obteniendo un método simple y factible (Cheng, Nie, Liu, Kuang, & Xu, 2020).

Para la determinación de taninos condensados, Martins y col. (2020) han utilizado un polímero de impresión molecular como fase de extracción en SPE, para la determinación de estos compuestos en diferentes especies vegetales. El MIP se sintetizó utilizando el tanino condensado extraído de la corteza de una de las plantas estudiadas como molécula plantilla, así como solución estándar de catequina para tener una referencia de tanino condensado. Los polímeros se emplearon para la extracción en fase sólida (MISPE), de taninos condensados, logrando altos valores de recuperación y buenos límites de detección y cuantificación, reduciendo coste, residuos y tiempo de análisis (Martins et al., 2020).

Algunas de las principales aplicaciones de los MIP se han utilizado para determinar ácidos fenólicos, principales metabolitos de los compuestos fenólicos, y otros compuestos de bajo peso molecular.

Boscari y col. (2017) sintetizan un MIP con ácido 4-metilhipúrico (4-MHA), como plantilla para la extracción selectiva del ácido hipúrico (HA) y el ácido 4-metilhipúrico (4-MHA) en orina humana mediante un proceso MISPE. Ambos compuestos son metabolitos de compuestos fenólicos y su determinación en la orina sirve como biomarcadores, pero con diferente propósito, la evaluación de exposición a tolueno y xilenos (Boscari, Mazzuia, Wisniewski, Borges, & Figueiredo, 2017).

Aunque en la mayoría de los casos, la polimerización se ha realizado en bloque, una polimerización por precipitación ha sido utilizada para la síntesis de un MIP con el ácido protocatecuico (PCA) como plantilla, que ha permitido la extracción selectiva de diferentes compuestos fenólicos de extractos vegetales. En este estudio se extrajeron compuestos fenólicos similares al analito molde, como el ácido 4-hidroxibenzoico (4-HBA), el ácido gálico (GA), el ácido salicílico (SA), el ácido siríngico (SyA), el ácido vanílico (VA) y el ácido ferúlico (FA), para su posterior determinación por HPLC-DAD (Chen, Wang, & Shi, 2011).

En 2012, Denderz y Lehotay sintetizaron diferentes polímeros utilizando diversos compuestos fenólicos como plantilla: ácido gálico (GA), ácido gentísico (GeA), ácido siríngico (SyA), ácido protocatecuico (PCA), ácido 4-hidroxibenzoico (4-HBA) y ácido vanílico (VA). Los MIP fueron utilizados como fases estacionarias de cromatografía líquida, permitiendo el estudio termodinámico de ellas y los efectos de la temperatura durante los procesos de adsorción (Denderz & Lehotay, 2012). Estos mismos autores en 2014, usaron polímeros de impresión molecular en procesos MISPE y columnas para la determinación de ácido gálico (GA) y ácido protocatecuico (PCA) en vinos tintos, utilizando estos mismos compuestos como plantillas, para la posterior detección por HPLC-DAD (Denderz & Lehotay, 2014).

Dmitrienko y col., sintetizaron MIP, utilizando como platilla el ácido 4-hidroxibenzoico (4-HBA), con diferentes tipos de monómeros funcionales y entrecruzantes, estudiando los factores que afectan a las propiedades de adsorción en cada caso para las mezclas de prepolimerización, las determinaciones se realizaron con un espectrofotómetro UV (Dmitrienko, Irkha, Duisebaeva, Mikhailik, & Zolotov, 2006). Posteriormente, este grupo de investigación sintetizó varios MIP

utilizando seis plantillas diferentes: el ácido 2-hidroxibenzoico (2-HBA), el ácido 4-hidroxibenzoico (4-HBA), el metil-4 hidroxibenzoico (metil-4-HBA), el ácido 2-acetoxibenzoico (2-AcOBA), el ácido 2,4-dihidroxibenzoico (2,4-DHBA) y el ácido 3,4-dihidroxibenzoico (3,4-DHBA), para el reconocimiento de ácidos hidroxibenzoicos y sus ésteres, llevando a cabo estudios de adsorción en muestras sintéticas (Dmitrienko, Irkha, Apyari, Klokova, & Zolotov, 2008).

También se ha realizado el aislamiento selectivo de derivados del ácido 4-hidroxibenzoico (4-HBA), de extractos vegetales mediante el uso de un polímero impreso molecularmente, utilizando como plantilla el ácido protocatecuíco (PCA). Evaluando el MIP, para seis ácidos fenólicos: ácido gálico (GA), vanílico (VA), gentísico (GeA), siríngico (SyA), 4-hidroxibenzoico (4-HBA) y para el propio PCA, optimizando las etapas del proceso MISPE y posterior análisis cromatográfico por HPLC-DAD (Karasova, Lehotay, Sadecka, Skacani, & Lachova, 2005).

Otros compuestos fenólicos naturales y antioxidantes que se han separado y purificado utilizando MIP, han sido el ácido cafeico (CA) y su éster fenetílico (CAPE) en 25 especies de hongos. En este caso, la plantilla utilizada ha sido CAPE, estudiando su comportamiento y adsorción mediante un proceso MISPE y para cinco diferentes porógenos, comprobándose la alta afinidad del MIP hacia los dos compuestos fenólicos estudiados (Li et al., 2013).

El ácido cafeico (CA) y el ácido 4-hidroxibenzoico (4-HBA), también se han utilizado como plantilla en la síntesis de diferentes polímeros de impresión molecular, para la extracción de polifenoles de bajo peso molecular en aguas residuales procedentes de almazaras sin tratamiento previo. Las síntesis de los polímeros se realizaron con diversos monómeros y entrecruzantes, utilizando tetrahidrofurano (THF), como porógeno para la síntesis del MIP-CA y acetonitrilo (ACN) para la síntesis del MIP-4-HBA, evaluando el rendimiento de los polímeros sintetizados frente a siete compuestos estructuralmente relacionados mediante HPLC-DAD (Michailof, Manesiotis, & Panayiotou, 2008). También se ha utilizado el ácido cafeico (CA) como plantilla en la síntesis de un polímero de impresión molecular por precipitación, que posteriormente se empaquetó en columnas

para aplicarlo en la extracción de ácido cafeico (CA) y ácido clorogénico (CGA) de muestras vegetales de forma muy específica y selectiva, con respecto a otros compuestos fenólicos como el ácido gálico (GA), el ácido protocatecuico (PCA) y el ácido vanílico (VA) (Miura, Matsunaga, & Haginaka, 2016).

Otros compuestos fenólicos, que se han utilizado como plantillas en la síntesis de polímeros de impresión molecular han sido: el ácido 4-hidroxibenzoico (4-HBA), el ácido 4-hidroxifenilacético (4-HPA) y el ácido 4-hidroxifenilpropiónico (4-HPPA), estudiando el rendimiento de estas plantillas mediante HPLC-DAD y realizando comparaciones entre ellas, mostrando especificidad por los compuestos utilizados como plantilla y por sus análogos estructurales (Sun, Li, & Chang, 2001).

En la Tabla 3.2, que se presenta a continuación, están recogidos de manera detallada algunos de los procesos que hemos indicado anteriormente, basados en la utilización de impresión molecular para la determinación de algunos compuestos fenólicos en diferentes matrices.

Tabla 3.2. Principales polímeros de impresión molecular sintetizados con ácidos fenólicos como plantilla.

Plantilla	Monómero	Entrecruzante	Iniciador	Porógeno	Relación T:M:C	Analitos Muestra	Aplicaciones	Referencia
4-MHA	4-Vpy	EGDMA	ABCVA	MeOH (11 mL)	2,04:8,39:0,69	HA, 4-MHA Orina	Sonda-MIP CE/MECK	(Boscari et al., 2017)
PCA	MA	EGDMA	AIBN	ACN (25mL)	Diferentes relaciones	PCA, 4-HBA, GA, SA, SyA, VA, FA Extractos de Rhizoma homalomenae	MISPE HPLC-DAD	(Chen et al., 2011)
GA, GeA, SyA, PCA, 4-HBA, VA	MA	EGDMA	AIBN	ACN (3mL)	0,3:1,8:9,0	GA, GeA, SyA, PCA, 4-HBA, VA Muestras sintéticas	Columnas Análisis termodinámico HPLC-DAD	(Denderz & Lehotay, 2012)
GA, PCA	MAA	EGDMA	AIBN	MeOH (3 mL)	0,3:1,8:9,0 (mmol)	GA, PCA Vino tinto	Columnas y MISPE HPLC-DAD	(Denderz & Lehotay, 2014)
PCA	MA	EGDMA	AIBN	ACN (10 mL)	1:6:30	PCA, GA, VA, 4-HBA, GeA, SyA Extractos de Melissa officinalis	MISPE HPLC-DAD	(Karasova et al., 2005)

4-HBA	4-Vpy	EGDMA	AIBN	Mezclas MeOH/Agua, 3:1 v/v (3,2 mL)	2,35:2,35:15,7	4-HBA Muestras sintéticas	Estudio de las propiedades de sorción y pre- concentración en sorción dinámica de 4-HBA Espectrometría UV	(Dmitrienko et al., 2006)
	MA	EGDMA	AIBN	Mezclas MeOH/Agua, 3:1 v/v (3,2 mL)	Diferentes relaciones			
	MA	N'N-MAA	AIBN	Mezclas MeOH/Agua, 3:1 v/v (5,6 mL)	2,35:2,35:10,7			
	MAA	EGDMA	AIBN	Mezclas MeOH/Agua, 3:1 v/v (3,2 mL)	2,35:2,35:15,7			
CA	4-Vpy + MAA	DVB	AIBN	ACN:TOLUENO (3:1 v/v) (128 mL)	0,66:M:28,8 M: MAM+4Vpy 3-1	CA, CGA, GA, PCA, VA Extracto de hojas de Eucommia ulmodies	Columna HILIC Cromatografía de interacción hidrofílica	(Miura et al., 2016)

CA	4-Vpy	EGDMA	ABDV	THF	1:4:20	GA, PCA, tirosol, 4-HBA, VA, CA, ácido p-cumárico ácido verátrico Aguas y aguas residuales de almazaras	MISPE HPLC-DAD	(Michailof et al., 2008)
	4-Vpy	PETRA	ABDV	THF	1:4:12			
	4-Vpy	DBV80	ABDV	THF	1:4:20			
	Alilurea	PETRA	ABDV	THF	1:4:12			
	MAA	PETRA	ABDV	THF	1:4:12			
	MAA	EGDMA	ABDV	THF	1:4:20			
	Alilnilina	EGDMA	ABDV	THF	1:4:20			
4-HBA	4-Vpy	EGDMA	ABDV	ACN	1:4:20			
	4-Vpy	PETRA	ABDV	ACN	1:4:12			
	Alilurea	PETRA	ABDV	ACN	1:4:12			
	Alilnilina	EGDMA	ABDV	ACN	1:4:20			
4-HBA, 2-HBA (SA), Metil- 4-HBA, 2- AcOBA, 2,4-DHBA, 3,4-DHBA (PCA)	MA	EGDMA	AIBN	Mezclas MeOH/Agua, 3:1 v/v (3,2 mL)	2,35:2,35:15,7	Ácidos hidroxibenzoicos y sus ésteres Muestras sintéticas	Estudio de las propiedades de sorción de polímeros impresos molecular- mente	(Dmitrienko et al., 2008)

4-HBA, 4-HPA, 4-HPPA	4-Vpy	EGDMA	AIBN	ACN (10 mL)	1:4:20	4-HBA, 4-HPA, 4-HPPA, 4-NBA, 4-HBAD, 4-ABA, 3,4-DHBA, BA	Columna HPLC-UV	(Sun et al., 2001)
CAPE	4-Vpy	EGDMA	AIBN	5 porógenos: acetona, THF, DMSO, acetona e isooctano (2:3, v/v), THF e isooctano (2:3, v/v)	1:4:12	CAPE, CA Extractos de hongos	MISPE HPLC-UV	(Li et al., 2013)

ABREVIATURAS: 2-AcOBA, ácido 2-acetoxibenzoico (ácido acetilsalicílico); 2-HBA, ácido 2-hidroxibenzoico (ácido salicílico); 2,4-DHBA, ácido 2,4-dihidroxibenzoico; 3-HBA, ácido 3-hidroxibenzoico; 3-HPA, ácido 3-hidroxifenilacético; 3,4-DHBA, ácido 3,4-dihidroxibenzoico (ácido protocatecuico); 4-ABA, ácido 4-aminobenzoico; 4-HBA, ácido 4-hidroxibenzoico; 4-HBAD, 4-hidroxibenzaldehído; 4-HPA, ácido 4-hidroxifenilacético; 4-HPPA, ácido 4-hidroxifenilpropiónico; 4-MHA, ácido 4-metilhipúrico; 4-NBA, 4-nitrobenzoico; 4-Vpy, 4-vinilpiridina; ABCVA, ácido 4,4'-azobis cianovalérico; ABDV, azo-bis-dimetilvaleronitrilo; ACN, acetonitrilo; AIBN, 2,2'-Azobis(2-metil-propionitrilo); BA, ácido benzoico; CA, ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinnámico, ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)acrílico); CAPE, éster fenético del ácido cafeico (fenetil 3-(3,4-dihidroxifenil)acrilato); CGA, ácido clorogénico (ácido (1S,3R,4R,5R)-3-[(E)-3-(3,4-dihidroxifenil)prop-2-enil]oxi-1,4,5-trihidroxicyclohexano-1-carboxílico); DMSO, dimetilsulfóxido; DVB80, divinilbenceno; EGDMA, etilenglicol dimetacrilato; FA, ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinnámico, (ácido (E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-enico); GA, ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico); GeA, ácido gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzoico); HA, ácido hipúrico (ácido 2-benzamidoacético); HILIC, cromatografía de interacción hidrofílica; MA, acrilamida; MAA, ácido metacrílico; MeOH, metanol; Metil-4-HBA, metil 4-hidroxibenzoato; N'N-MAA, N'N-metilenebisacrilamida; PCA, ácido protocatecuico (ácido 3,4-dihidroxibenzoico); PETRA, pentaeritritol trimetilacrilato; SA, ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzoico); SyA, ácido sirínico (ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico); THF, tetrahidrofurano; VA, ácido vanílico (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico).

3.3 TÉCNICAS DE ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y SUS BIOMARCADORES

El análisis de cualquier compuesto, tiene dos etapas fundamentales de similar importancia. Por un lado, el tratamiento de la muestra y por otro el análisis instrumental. Como se ha visto previamente, la preparación de la muestra en un análisis es un proceso que incluye una serie de etapas, cuya finalidad es hacer que el analito sea accesible al proceso de medida química.

En las últimas décadas se han realizado importantes revisiones bibliográficas sobre las técnicas analíticas instrumentales, aplicables a la determinación de los compuestos fenólicos y sus biomarcadores (Corradini et al., 2011; de Rijke et al., 2006; Plaza et al., 2018; Stalikas, 2007).

Algunos de estos autores, se han centrado principalmente en recoger los avances en las técnicas instrumentales de separación y en los métodos de detección acoplados a éstas. En la Figura 3.10, se recogen de una forma esquemática las principales técnicas y sus detectores.

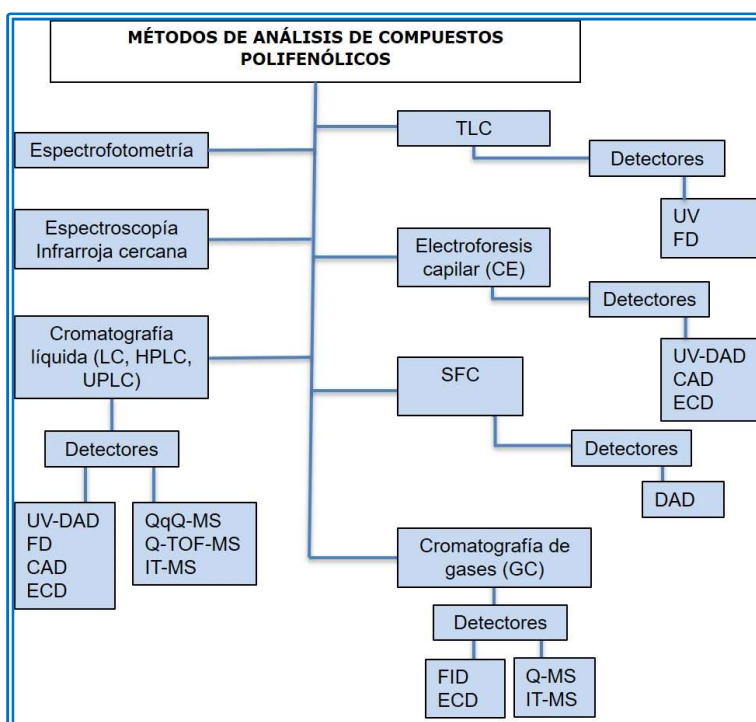


Figura 3.10. Diagrama de métodos para el análisis de compuestos polifenólicos (adaptado de Plaza y col. (2018) y de Rijke (2006) (de Rijke et al., 2006; Plaza et al., 2018)).

Las principales técnicas de separación son las técnicas cromatográficas, la cromatografía líquida (LC) y de gases (GC), también la electroforesis capilar (CE) y la cromatografía de capa fina (TLC). Así mismo, la cromatografía de líquidos supercríticos (SFC), se ha utilizado para la determinación de los compuestos fenólicos.

Todas ellas pueden llevar acoplados diferentes detectores, destacando el detector ultravioleta con diodo array (UV-DAD), y otros detectores más específicos como los detectores de masas (MS) y de resonancia magnética nuclear (NMR), que posibilitan una inequívoca identificación de los compuestos fenólicos en mezclas complejas.

Debido a las matrices en las que se presentan los compuestos fenólicos, se puede señalar que casi todos los métodos analíticos utilizados para su determinación, requieren un método de separación de alto rendimiento. La elección del método, depende de la sensibilidad requerida para cada propósito en cuestión y de la complejidad de la matriz biológica, aspectos estos a tener en cuenta pues, están relacionados con el tiempo dedicado al pretratamiento de muestra previo al análisis.

3.3.1. Técnicas espectrofotométricas

Algunos métodos espectrofotométricos, incluyendo la espectrofotometría de absorción molecular, la espectroscopía infrarroja o la fluorescencia molecular, han sido desarrollados para la cuantificación de compuestos fenólicos en las complejas matrices en las que se encuentran. Sin embargo, estos métodos sin una previa separación cromatográfica, generalmente presentan una baja resolución y únicamente suelen ser utilizados para determinar el contenido total de flavonoides y para establecer perfiles diferenciados de determinadas clases de flavonoides (antocianinas totales, etc.), o como técnica complementaria de otras más específicas (Stalikas, 2007).

Espectrofotometría de absorción molecular UV-VIS

La espectrofotometría de absorción molecular ultravioleta-visible (UV-VIS), ha tenido y tiene una gran importancia en el análisis de todo tipo de compuestos. Como es sabido, esta técnica se basa en la medida de la absorción de la radiación, por determinadas moléculas en estas regiones del espectro electromagnético, dando lugar a transiciones electrónicas a longitudes de ondas características de la estructura del analito, es decir, cada molécula presenta un perfil espectral definido por sus niveles energéticos característicos.

En el caso de los compuestos fenólicos, la absorción se atribuye a las transiciones que tienen lugar entre los OH-grupos fenólicos. Además, estas transiciones son características de las distintas clases de compuestos fenólicos, siendo una de sus principales aplicaciones la determinación de diferentes grupos estructurales presentes en los compuestos fenólicos, permitiendo conocer el contenido de polifenoles totales (Plaza et al., 2018).

Esta técnica se caracteriza por ser sencilla, relativamente rápida y de bajo coste, estando disponible en todos los laboratorios. Entre las principales desventajas, está la escasa información que reporta sobre los distintos compuestos fenólicos presentes en la muestra. De Rijke y col. (2006) recoge en su artículo las longitudes de ondas representativas de las principales subclases de flavonoides, con ejemplos de cada clase (de Rijke et al., 2006).

Utilizando la espectrofotometría UV-VIS, se puede determinar el contenido total de algunos compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante total (TAC). El contenido de polifenoles totales puede ser determinado por el método de Folin-Ciocalteu (FC), o el de Folin-Denis, entre otros. Estos métodos se basan en una reacción redox de los compuestos fenólicos, con una mezcla de wolframio y molibdeno en medio alcalino, que genera un complejo azul que puede ser cuantificado a una longitud de onda de 760 nm. También se puede determinar el contenido total de flavonoides, mediante la formación de un complejo coloreado con cloruro de aluminio y posterior medida en un intervalo de 240-500 nm. Con

otros procedimientos similares, se pueden determinar con técnicas espectrofotométricas el contenido total de proantocianidinas, los taninos hidrolizables totales o el contenido de antocianinas totales (Naczki & Shahidi, 2004; Plaza et al., 2018). Estos compuestos están presentes en cantidades importantes en algunos alimentos, y las cantidades determinadas se relacionan directamente con su biodisponibilidad y con los beneficiosos efectos biológicos.

Otra de las determinaciones más frecuentes en el análisis de compuestos fenólicos, es la evaluación de la capacidad antioxidante (TAC) de las muestras y extractos. Esta capacidad dependerá de las propiedades reductoras de la muestra. Se han desarrollado diferentes métodos para la determinación de la capacidad antioxidante. Éstos se pueden dividir en dos grupos: basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT, *hydrogen atom transfer*) o basados en la transferencia de electrones (ET, *electron transfer*). Los métodos HAT, miden la capacidad antioxidante por eliminación de los radicales libres por donación de átomos de hidrógeno. A este grupo pertenece la determinación de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC, *oxygen radical absorbance capacity*) o la determinación del poder de captación de radicales totales (TRAP, *total radical trapping antioxidant power*). Los métodos ET, miden la habilidad de un antioxidante para transferir un electrón y así reducir algún compuesto. Dentro de este grupo se encuentra el método ABTS ([2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)], el conocido como DPPH ([2,2-difenilpicrilhidrazilo]), y otros métodos basados en la reducción de un ion metálico como el ensayo de la capacidad antioxidante para reducir cobre, o el método de determinación de la capacidad antioxidante para reducir el ion hierro (FRAP, *ferric ion reducing antioxidant power*) (Plaza et al., 2018).

Como se ha indicado anteriormente, sin una separación previa, las técnicas espectrofotométricas presentan una baja resolución y sólo pueden utilizarse para establecer un perfil espectral, que puede facilitar la diferenciación de especies o áreas geográficas de procedencia de algunas especies vegetales (Zhang & Ye, 2009). González-Barrio y col. (2011) utilizan el espectro UV de compuestos fenólicos para la identificación de flavonoides. En esa investigación, los espectros UV de los metabolitos de

urolitina, son estudiados para establecer una relación estructura-espectro. Junto con el análisis HPLC-MS, el espectro UV es útil para el estudio de la actividad biológica de este elagitanino metabolito (Gonzalez-Barrio, Truchado, Ito, Espin, & Tomas-Barberan, 2011). El estudio de los espectros UV-VIS también se han utilizado para la evaluación de las propiedades de adsorción de MIP en muestras sintéticas (Dmitrienko et al., 2006).

Sin embargo, a pesar de los intentos por desarrollar métodos sencillos de identificación y cuantificación en UV-VIS, la absorción de los compuestos polifenólicos se ve afectada por variables como la naturaleza de los disolventes, el pH, el tipo de matriz y por otros compuestos que absorben en UV-VIS y que actúan como interferencias (grasas, vitaminas, aminoácidos, etc.), limitando su aplicación (Georgé, Brat, Alter, & Amiot, 2005; Kozyra, Biernasiuk, & Malm, 2017).

Espectroscopía de fluorescencia molecular

La fluorescencia es un fenómeno fotoluminiscente, que ocurre cuando una especie química es excitada por radiación electromagnética. Cuando las moléculas excitadas se relajan al estado fundamental, reemiten la energía adquirida en forma de radiación luminosa.

En el análisis de flavonoides, la detección fluorescente es utilizada sólo ocasionalmente, pues el número de flavonoides que presentan fluorescencia nativa es limitado. Entre los flavonoides que presentan fluorescencia, se encuentran las isoflavonas, sólo las que no tienen un grupo OH en la posición 5, muestran una fuerte fluorescencia nativa. También presentan fluorescencia los flavonoides con un grupo OH en la posición 3, por ejemplo, la 3-hidroxiflavona y la catequina (trans-3,3,4,5,7-pentahidroxiflavona) y los flavonoides metoxilados, por ejemplo, la 3,4,5-trimetoxiflavona (de Rijke et al., 2006). También algunos flavan-3-oles y sus metabolitos presentan fluorescencia nativa. La fluorescencia de estos compuestos depende grandemente del pH y de los disolventes utilizados.

Para ampliar la aplicación de la fluorescencia en el análisis de los compuestos fenólicos, se han propuesto diferentes procedimientos de

derivatización, por ejemplo, la quercetina, el kaempferol y la morina, con sus 3-OH, 4-ceto sustituyentes, pueden formar complejos con cationes metálicos, algunos de los cuales son muy fluorescentes (Stalikas, 2007). Aunque el hecho de que pocos compuestos presenten fluorescencia, limita posibles interferencias, las aplicaciones de esta técnica para la determinación de flavonoides, sin separación cromatográfica, es muy limitada. Únicamente con el apoyo de técnicas quimiométricas se han determinado algunos compuestos. La utilización de las señales emisión/excitación, proporcionadas por el espectrómetro de fluorescencia, proporcionan señales de gran sensibilidad, que con apoyo de técnicas quimiométricas (PARAFAC, U-PLS/RBL, N-PLS/RBL, etc.), permiten llegar a medir concentraciones relativamente bajas de compuestos fenólicos fluorescentes, de manera simple, rápida y económica (Airado-Rodríguez, Durán-Merás, Galeano-Díaz, & Wold, 2011; Cabrera-Bañegil, Valdés-Sánchez, Moreno, Airado-Rodríguez, & Durán-Merás, 2019; Monago-Maraña, Durán-Merás, Galeano-Díaz, & Muñoz de la Peña, 2016).

Espectroscopía infrarroja

La espectroscopía infrarroja es una técnica espectroscópica vibracional, que se basa en la absorción producida cuando la frecuencia de vibración es igual a la frecuencia de la radiación infrarroja incidente. Las principales aplicaciones de la espectroscopía infrarroja, se han desarrollado en el rango espectral de la espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR), a longitudes de onda entre 800 y 2500 nm. Al igual que en otras técnicas espectroscópicas, la muestra absorbe la radiación incidente a longitudes de onda específica.

Bittner y col. (2013) utilizaron la espectroscopía infrarroja cercana, como herramienta para analizar compuestos fenólicos en plantas (Bittner, Schonbichler, Bonn, & Huck, 2013). Chen y col. (2006) realizan un análisis cualitativo y cuantitativo en té con NIR y calibración multivariante (Chen, Zhao, Zhang, & Wang, 2006). También se ha determinado la capacidad antioxidante total con NIR y calibración multivariante en té y en

granos (Wiedemair, Ramoner, & Huck, 2019; Zhang, Luypaert, Pierna, Xu, & Massart, 2004). En 2009, Chen y col., determinaron simultáneamente el contenido de las principales catequinas (epigallocatequina galato, epigallocatequina, epicatequina galato y epicatequina), en hojas de té verde por espectroscopía de infrarrojo cercano con transformada de Fourier (FT-NIR) y calibración multivariante (Chen, Zhao, Chaitep, & Guo, 2009).

3.3.2. Técnicas cromatográficas

Cromatografía líquida (LC)

Aunque la cromatografía de gases (GC), la electroforesis capilar (CE) y la cromatografía en capa fina (TLC), se han utilizado en el pasado para la determinación de flavonoides, en la actualidad los más importantes métodos se basan en la cromatografía líquida.

Existe una amplia variedad de soportes y fases móviles disponibles para la separación de flavonoides por LC. Habitualmente, la separación cromatográfica se lleva a cabo en fase reversa (RP) y las columnas más utilizadas son de tipo C8 y C18. También se utilizan otras fases estacionarias como Sephadex (gel dextrano) o poliamidas. La elución se realiza generalmente en gradiente mediante un sistema de disolventes binarios, que permite la separación de los polifenoles con diferente estructura química (de Rijke et al., 2006).

La cuantificación cromatográfica más frecuente, barata y robusta, se realiza con detectores de absorbancia UV o fotométricos, generalmente, utilizando un fotodiodo (LC-UV-DAD). Los detectores de fotodiodos, utilizan un rango espectral continuo y permiten estimar la absorbancia a longitudes de onda distintas.

Como se ha mencionado anteriormente, algunos compuestos fenólicos pueden detectarse por fluorescencia. El análisis de polifenoles por cromatografía líquida y detección por fluorescencia, es más selectivo y sensible, presentando un límite de detección para el análisis de los flavan-3-oles, 67 veces más bajo que el obtenido con un detector DAD (de Rijke et

al., 2006). Por otro lado, cuando la detección fluorescente se combina con la detección UV, se posibilita la discriminación entre los compuestos fluorescentes y no fluorescentes eluidos en la columna cromatográfica.

Para determinar sustancias oxidables o reducibles, pueden emplearse detectores electroquímicos (ECD). La mayoría de los flavonoides, presentan electroactividad debido a la presencia de grupos fenólicos en su estructura, por lo que este tipo de detectores puede ser utilizado para su determinación. Sin embargo, estos detectores son menos sensibles que los detectores FD. Utilizando el detector ECD, se han determinado por ejemplo, flavonoides y ácidos fenólicos en cerveza (Plaza et al., 2018).

Recientemente se han desarrollado otro tipo de detectores, los detectores de aerosol cargado (*CAD, Charged Aerosol Detection*). Estos detectores combinan elementos evaporativos de dispersión lumínica, con otros detectores de masas. Inicialmente, se produce la nebulización con nitrógeno de la fase móvil y la selección de las gotas más pequeñas; después se lleva cabo la evaporación del disolvente; a continuación, el nitrógeno es ionizado en una cámara de ionización y se adsorbe sobre las partículas del analito. Las partículas cargadas llegan a una caja de Faraday, donde se produce la transferencia de cargas y la detección de estas, siendo su intensidad proporcional a la concentración del analito en la muestra. Cuando no existen en el mercado, patrones de los compuestos a determinar y no se pueden cuantificar o identificar los analitos, se puede utilizar este tipo de detectores. La carga no depende de las propiedades químicas de los analitos, por lo que un estándar químico es utilizado para cuantificar el amplio número de analitos en complejas muestras naturales. La HPLC acoplado a CAD, ha sido utilizada para cuantificar polifenoles en productos de manzana y productos de cacao (Plaza et al., 2018). Estos detectores son universales y tienen una sensibilidad similar a los detectores UV-VIS y son compatibles con los gradientes de elución, muy reproducibles y de fácil manejo.

La resonancia magnética nuclear, también se utiliza como detector en la cromatografía líquida (LC-NMR) (Robards, 2003). La ventaja de la NMR es que permite diferenciar isómeros u otras configuraciones. Como desventajas presenta una baja sensibilidad, instrumentación costosa

y tiempos de ejecución largos (Wilson & Brinkman, 2003). Sin embargo, aunque la detección con NMR es particularmente poderosa, en el análisis de flavonoides, se necesita recurrir a analizadores de masas (MS/MS), para obtener más información, por ejemplo, sobre la masa molecular y los grupos funcionales (Wolfender, Ndjoko, & Hostettmann, 2003). Recientemente, la técnica de resonancia magnética nuclear de protón ($^1\text{H-NMR}$), se ha aplicado en la cuantificación de flavonoides y otros derivados fenólicos en plantas, validando y comparando los resultados por HPLC-DAD (Lund, Brown, & Shipley, 2020).

En las últimas décadas, la cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas, o ésta acoplada a otros detectores ya mencionados (LC-MS, LC-MS/MS o LC-UV-DAD-MS), es ampliamente utilizada para dilucidar y cuantificar mezclas complejas de compuestos fenólicos. En la mayoría de los casos el detector de masas combinado con la detección UV facilita la confirmación de la identidad del compuesto en una muestra, con ayuda de patrones y datos de referencia. Para compuestos desconocidos los detectores de masas en tándem (MS/MS o MS^n), son utilizados para la caracterización estructural y análisis de flavonoides.

Actualmente, diferentes tipos de analizadores de masas son utilizados acoplados a LC, para la determinación de polifenoles, desde el simple cuadrupolo (Q o MS), el triple cuadrupolo (QqQ o MS/MS), la trampa de iones (IT-MS), el analizador de tiempo de vuelo (TOF-MS) o el analizador de tiempo de vuelo cuadrupolar (Q-TOF-MS) con transformada de Fourier (FT-MS), y el analizador de masas híbrido Orbitrap (LTQ-Orbitrap) (Plaza et al., 2018).

Por otro lado, otras nuevas técnicas de cromatografía líquida se han ido desarrollando en los últimos años, aplicándose también al análisis de polifenoles, por ejemplo, la cromatografía de ultra alto rendimiento (UHPLC), que incorpora columnas con relleno de alta eficiencia; la cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC), que se puede considerar una extensión de la cromatografía en fase normal en el ámbito de las fases móviles acuosas; o la cromatografía líquida multidimensional (LC x LC).

Múltiples publicaciones, recogen algunos ejemplos recientes de separaciones y detección de compuestos fenólicos por cromatografía líquida

(de Rijke et al., 2006; Harnly, Bhagwat, & Lin, 2007; Plaza et al., 2018; Robards, 2003).

En la Tabla 3.3, que se presenta a continuación, se han recogido a modo de ejemplo y de forma detallada, algunos métodos de análisis publicados para la determinación de compuestos fenólicos y sus metabolitos en diferentes matrices.

Tabla 3.3. Ejemplos de métodos de cromatografía líquida para la determinación de compuestos fenólicos y sus metabolitos.

Método Detección	Fase móvil	Fase estacionaria	Matriz	Analitos	Referencia
LC-UV-MS/MS	H ₂ O-ACN (ambos con 1% ácido fórmico)	C18	Orina	Metabolitos de quercetina y kaempferol	(Hong & Mitchell, 2004)
UHPLC-MS/MS	H ₃ PO ₄ acuoso 0,25% y ACN	C18	Miel	Quercetina, luteolina, kaempferol y apigenina	(Wang, Zhou, & Cui, 2019)
LC-DAD	H ₃ PO ₄ acuoso y MeOH	C18	Cebolla, pimiento y puerro	Miricetina, quercetina, luteolina y kaempferol	(Corell et al., 2018)
HPLC-UV-MS	Ácido fórmico/ACN (75:25 v/v)	C18	Tomate	Quercetina, naringenina, naringina, miricetina, rutina y kaempferol	(Biesaga, Ochnik, & Pyrzynska, 2009)
HPLC-PDA (Fotodiodo de detección de matriz)	Agua MeOH ACN y mezclas	C18	Mieles	10 ácidos fenólicos 9 flavonoides 6 fenoles	(Ahmed et al., 2016)
HPLC-DAD	Agua-ácido acético al 2% MeOH	C18	Uva Negra inmadura	Rutina, ácido gálico, ácido hidroxibenzóico, ácido siríngico, ácido p-cumárico, quercetina y resveratrol.	(Bagheri & Esmaili, 2017)

HPLC/MS/MS	ACN Agua-1% ácido fórmico	C18	Orina y plasma	39 catabolitos de flavan-3-oles	(Del Rio et al., 2010)
UHPLC-DAD-MS	Agua/ácido acético (98:2 v/v) ACN: ácido acético (98:2, v/v)	C18	Heces	Diferentes catabolitos de flavan-3-oles	(Sánchez-Patán et al., 2012)
UHPLC-DAD-MS	Ácido fórmico al 0,1% en metanol /agua 10/90 (v/v) Acetonitrilo	C18	Orina	38 compuestos fenólicos y metabolitos	(Achaintre et al., 2016)
UHPLC-DAD-MS	Ácido acético 0,1% en agua Ácido acético 0,1% en MeOH	C18	Orina	Flavanonas y metabolitos	(Aschoff et al., 2016)
UHPLC-MS-MS	MeOH, acetato de amonio 2 mM y ácido fórmico al 0,1% Agua acetato de amonio 2 mM y ácido fórmico al 0,1%	C18	Zumos y batidos	20 polifenoles	(Casado, Morante-Zarcero, Pérez-Quintanilla, Cámara, & Sierra, 2018)
HPLC-MS-MS	Agua-0,1% ácido fórmico MeOH-0,1 % Ácido fórmico	C18	Extractos de plantas	18 ácidos fenólicos	(Szewczyk & Olech, 2017)

HPLC-MS-MS	MeOH-0,5 % ácido fórmico Agua-5 % ácido fórmico	C18	Jengibre	13 compuestos fenólicos	(Tohma et al., 2017)
UHPLC-ESI-MS/MS	0,1% de ácido fórmico en MeOH-Agua 10/90 v/v ACN	C18	Plasma	38 compuestos fenólicos y metabolitos	(Achaintre, Gicquiau, Li, Rinaldi, & Scalbert, 2018)
HPLC-ESI-MS-MS	5% de ACN-Agua 0,1% de ácido fórmico 40% de ACN-Agua 0,1% de ácido fórmico	C18	Orina	14 ácidos fenólicos, metabolitos de compuestos fenólicos	(Gonthier, Rios, Verny, Rémésy, & Scalbert, 2003)
LC-ESI-MS/MS	Agua-0,1% ácido fórmico ACN-0,1% ácido fórmico	C18	Orina y Plasma	31 compuestos fenólicos y metabolitos	(Bartolomé et al., 2010)
LC(ESI)-QTOF-MS	Agua-0,1% ácido fórmico ACN-MeOH-0,1% ácido fórmico	C18	Orina	Diferentes metabolitos de compuestos fenólicos	(Cuparencu et al., 2016)
UHPLC-ESI-MS/MS	ACN Agua-1% ácido fórmico	C18	Heces	24 metabolitos de polifenoles	(Dall'Asta et al., 2012)
HPLC-UV/VIS	Ácido ortofosfórico 1,5% Ácido ortofosfórico-ácido acético glacial-ACN (1,5- 20-25%)	C18	Cyamopsis tetragonaloba (Planta leguminosa)	Ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido gálico, ácido ferúlico y flavonoides como kaempferol y miricetina	(Sharma, Joshi, Kumar, Agrawal, & Prasad, 2017)

HPLC-DAD	Agua-ácido acético ACN-ácido acético	C18	Bayas de Mahonia aquifolium	Ácido protocatecuico, ácido siríngico, ácido p-cumárico, ácido cafeico, ácido 2,5-dihidroxibenzoico y ácido clorogénico	(Coklar & Akbulut, 2017)
UPLC-QTOF/ESI-MS	Agua-0,1% ácido fórmico ACN-0,1% ácido fórmico	C18	Mango	Ácido gálico, galato de etilo, digalato de etilo y ácido elágico	(Shaheen, Lu, Geng, Shao, & Wei, 2017)
HPLC-ESI-QTOF/MS	Agua-2% ácido fórmico MeOH	C18	Moras negras	Diferentes antocianidinas	(Espada-Bellido et al., 2017)
HPLC-DAD	Agua-ácido acético (95:5,v/v) Metanol Isopropanol	C18	Aceitunas	14 ácidos fenólicos y flavonoides	(Deng et al., 2017)
HPLC-UV-DAD	Agua-0,1% ácido fórmico ACN	C18	Grosella	5 ácidos fenólicos	(Vega-Gálvez et al., 2014)
HPLC-DAD	MeOH Agua-3% ácido fórmico	C18	Fresas	Diferentes antocianidinas	(Arend et al., 2017)
UPLC-Q-TOF-MS	Agua-1% de ácido fórmico/ACN (90:10, v/v) ACN	C18	Arándano	Diferentes polifenoles y 32 metabolitos	(Iswaldi et al., 2013)

Cromatografía de gases (GC)

La cromatografía de gases ha sido utilizada para el análisis de flavonoides desde la década de los 60. La mayoría de los compuestos volátiles pueden ser analizados fácilmente por esta técnica. Aunque la GC se ha utilizado ampliamente para la determinación de ácidos fenólicos en plantas, sin embargo, las características químicas de los polifenoles, con grupos OH con capacidad de establecer puentes de hidrógeno, hace que estos compuestos sean poco volátiles y por tanto la GC no pueda utilizarse para determinar la mayoría de los flavonoides (Stalikas, 2007). Por otro lado, esta técnica presenta una alta resolución y unos límites de detección bajos, pero el procedimiento de tratamiento de muestra es laborioso y tradicionalmente se precisa una etapa adicional de derivatización. Con frecuencia, la derivatización consiste en la formación de derivados de trimetilsilil eter (TMS). Stalikas (2007) recoge ejemplos representativos de los métodos de análisis de ácidos fenólicos y flavonoides por cromatografía de gases, que principalmente utilizan como detectores, el detector de ionización de llama (FID) o el detector de masas (MS) (Stalikas, 2007). En la actualidad, la cromatografía de gases de alta resolución (HRGC-MS) y de alta temperatura y alta resolución, acopladas a un detector de masas (HT-HRGC-MS) permiten la inyección directa de la muestra a la columna cromatográfica sin derivatización. Con HT-HRGC-MS se han determinado 6 flavonoles mono-isoprenilatados en extractos de plantas, y con HRGC-MS y FID se han determinado hesperidina, crisina, apigenina y quercetina en mezclas sintéticas. Las más recientes aplicaciones de la GC en el análisis de flavonoides se han orientado al estudio de la actividad antioxidante, el metabolismo o la taxonomía de los compuestos fenólicos (de Rijke et al., 2006).

Otras técnicas cromatográficas

Otras técnicas cromatográficas menos comunes para la determinación de compuestos fenólicos son la cromatografía de capa fina

(TLC), la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) y la cromatografía de contracorriente de alta velocidad (HSCCC).

La cromatografía de capa fina (TLC) se ha utilizado como método de cribado rápido, mostrándose especialmente útil para la detección de flavonoides en muestras vegetales o en extractos medicinales, antes del análisis por LC-UV. En la mayoría de los casos, la fase estacionaria es sílica y el desarrollo de las placas se realiza con una combinación de 2-(difenilborioxo)-etilamina y polietilen glicol, o con cloruro de aluminio. La detección se realiza por absorción UV o densitometría a 350-365 o 250-260 nm (de Rijke et al., 2006). Mejores separaciones se pueden conseguir con TLC bidimensional (TLC-2D), con TLC con doble desarrollo o con cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC). Aunque la cuantificación no es el principal objetivo de la TLC, se ha determinado kaempferol y quercetina en extracto de Ginkgo biloba por HPTLC, escaneando las placas por reflectancia a 254 nm (de Rijke et al., 2006).

La cromatografía de fluidos supercríticos (SFC), es poco utilizada en la separación e identificación de los polifenoles. Se han determinado compuestos fenólicos en semillas de uva por SFC-DAD (Plaza et al., 2018). Recientemente, la resolución de la tradicional SFC se ha mejorado gracias a la utilización de columnas con empaquetamiento de menor tamaño, dando lugar a la cromatografía de fluidos supercríticos de ultra alto rendimiento (UHPSFC), que acoplada a un DAD ha permitido la separación de algunos derivados fenólicos (Plaza et al., 2018).

Por último, la cromatografía en contracorriente de alta velocidad (HSCCC), es una nueva técnica cromatográfica basada en un procedimiento repetido de extracción líquido-líquido. Utilizando la fuerza centrífuga, es posible realizar las separaciones cromatográficas en ausencia de fase sólida. Zheng y col. (2011) utilizaron la HSCCC para la separación y purificación de flavonoides y otros compuestos (Di, Zheng, Chen, Huang, & Feng, 2011).

3.3.3. Técnicas electroforéticas

Las técnicas electroforéticas se fundamentan en la separación de las moléculas al ser sometidas a un campo eléctrico. La separación se realiza en base a sus tamaños moleculares y carga eléctrica. Entre las técnicas electroforéticas destacan la electroforesis capilar en gel (CGE), la electroforesis capilar (CE) en disolución libre o en zona (CZE) y la cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC). Estas últimas y la electrocromatografía capilar (CEC), son las más utilizadas en la determinación de los compuestos fenólicos.

La CE ya es considerada como una técnica complementaria a las técnicas cromatográficas en el análisis de los compuestos fenólicos. Tradicionalmente, se utilizan capilares de 50-100 μm de diámetro interior, voltajes de 10-30 kV y tampones fosfato o borato. La detección se realiza por absorción ultravioleta, fluorescencia o analizador de masas (de Rijke et al., 2006). La principal ventaja de estas técnicas de separación, estriba en que permite la separación de compuestos de bajo o medio peso molecular con alta eficiencia y resolución, en un corto tiempo de análisis y pequeño consumo de muestra y reactivos. El corto paso óptico (el capilar) y la pequeña cantidad de muestra inyectada en el sistema, muestran que la principal desventaja de la CE es su escasa detectabilidad, en términos de sensibilidad con detectores ópticos.

Varios autores han documentados los principales trabajos realizados en la determinación de compuestos fenólicos con esta técnica (de Rijke et al., 2006; Plaza et al., 2018).

3.3.4. Técnicas electroquímicas

Las técnicas electroquímicas se basan en las transformaciones químicas que sufren las sustancias, como consecuencia del intercambio de electrones que se produce entre la interfaz electrodo-disolución. En la Figura 3.11, se muestran algunas de las técnicas electroquímicas

disponibles, en función de la intensidad de corriente o del potencial aplicado.

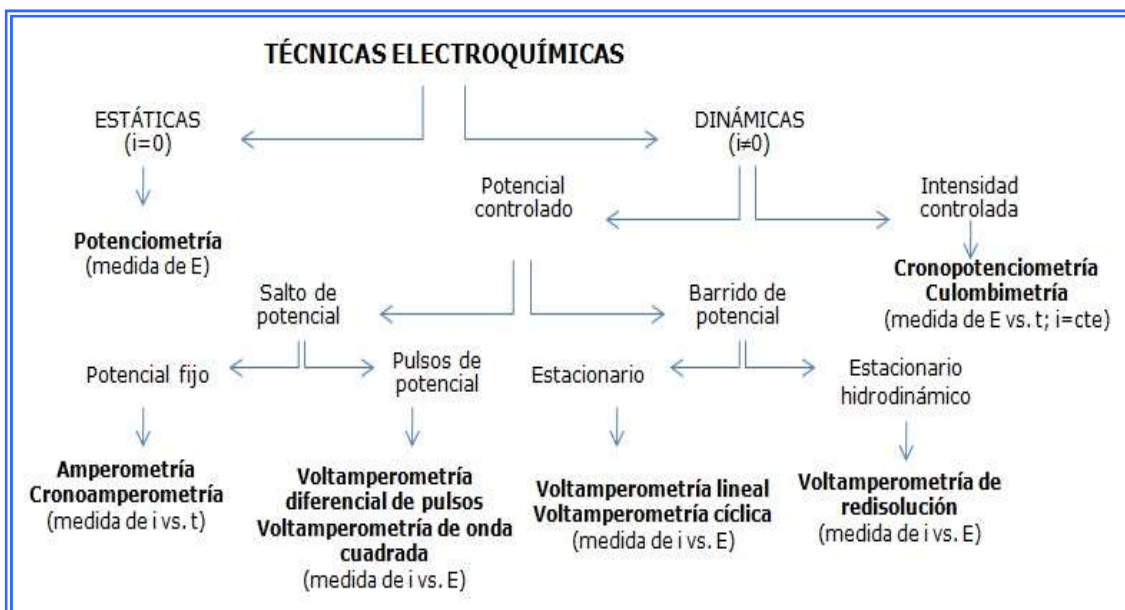


Figura 3.11. Clasificación de las técnicas electroquímicas.

Las metodologías electroanalíticas existentes para el estudio de los compuestos polifenólicos, se clasifican en dos grandes grupos: las que se dedican a evaluar la capacidad antioxidante y las que se encargan de la determinación e identificación exacta de los compuestos polifenólicos.

Como se ha visto anteriormente, la evaluación de la capacidad antioxidante total, es un proceso global, que emplea metodologías actuales para la determinación de índices totales de antioxidantes. El método es rápido y económico, ya que no es necesario separar de forma individual, cada uno de los antioxidantes de la matriz.

Los ensayos que se realizan para medir la capacidad antioxidante, se pueden llevar a cabo mediante una reacción química, la cual puede ser: de transferencia de un átomo de hidrógeno (HTA) y de transferencia de electrones (ET) (Wu, Wu, Huang, Lin, & Chang, 2003). Los primeros cuantifican la capacidad de donar un átomo de hidrógeno, que resulta ser la etapa clave dentro de la reacción radicalica en cadena; los segundos miden la capacidad reductora de los antioxidantes. Los ET son los métodos más utilizados hoy en día, entre los que encontramos los

siguientes: Folin-Ciocalteu (FC), DPPH, Trolox (TEAC), FRAP, DMPD y ensayos de capacidad de reducción del Cu (II) (Amatatongchai, Laosing, Chailapakul, & Nacapricha, 2012). En este segundo grupo, es donde se encuadran los métodos electroanalíticos destinados a la medida de la capacidad antioxidante o a la determinación directa del compuesto, donde la reacción redox se transforma en reacción electroquímica, al trasladarse la transferencia de carga desde el seno de la disolución a la superficie del electrodo.

La detección electroquímica, se puede realizar en discontinuo o acoplada a un sistema de inyección de flujo (FIA), con o sin separación analítica. Estos métodos son muy usados en la actualidad, para la determinación de compuestos polifenólicos (individuales o totales), así como para determinar la capacidad antioxidante de los mismos, teniendo en cuenta su facilidad para ser oxidados, las matrices donde se encuentran, las condiciones experimentales y el pH (Barathi & Kumar, 2014). Entre las técnicas electroquímicas más utilizadas para la determinación de polifenoles totales y la capacidad antioxidante, se encuentran las voltamperometrías y amperometrías.

En la bibliografía, se pueden encontrar ejemplos de técnicas electroquímicas aplicadas a la detección de antioxidantes fenólicos en el vino, mediante un sensor electroquímico de carbono, desechable de un solo uso, con buen límite de detección y sensibilidad. El método permitió la detección rápida de antioxidantes fenólicos comunes, como el ácido cafeico, ácido gálico y quercetina, en el rango de concentración de los micromoles, demostrando buena funcionalidad, para el análisis del contenido de antioxidantes en varias muestras de vino (Andrei, Sharpe, Vasilescu, & Andreescu, 2016).

También en vino, se ha usado la voltamperometría cíclica (CV) para la determinación de polifenoles, teniendo en cuenta las variaciones de adsorción que se producen, debido a la presencia de dióxido de azufre y acetaldehído en el vino, utilizando un electrodo de carbono (Makhotkina & Kilmartin, 2010). En 2012, estos autores han llevado a cabo métodos comparativos utilizando HPLC-MS y la medida Folin-Ciocalteu, antes de la voltamperometría cíclica, mostrando picos anódicos procedentes de la

oxidación de los ácidos hidroxicinámicos y de flavonoles como la quercetina (Makhotkina & Kilmartin, 2012).

En el kiwi, se caracterizaron y cuantificaron sus constituyentes fenólicos y la actividad antioxidante, mediante voltamperometría cíclica combinada con HPLC, de una manera rápida y económica, siendo la epicatequina el compuesto fenólico predominante y el que más contribuye a su capacidad antioxidante, en comparación con otros métodos como ABTS, DPPH y FRAP (Jiao, Kilmartin, Fan, & Quek, 2018).

También se ha determinado la capacidad antioxidante total, utilizando un sistema electroquímico de inyección de flujo (FIA), realizando ensayos en ácido ascórbico y en muestras de jugos de naranja y granada, vino blanco y té verde, demostrando resultados comparables a los obtenidos con técnicas convencionales, pero más rápidamente y aplicable a muestras alimentarias y biológicas (Veenuttranon & Nguyen, 2018). Otros estudios también realizados en diferentes infusiones de té, determinan la capacidad antioxidante mediante CV, reportando que los grupos ortodihydroxifenol y los galatos, son los principales contribuyentes a la capacidad antioxidante de los té investigados, estableciendo una fuerte correlación positiva, entre las capacidades antioxidantes deducidas por CV y por otras técnicas espectrofotométricas (FRAP, ABTS y DPPH) (Piljac-Zegarac, Valek, Stipcevic, & Martinez, 2010).

En otras investigaciones, el electrodo de carbono, fue el elegido para caracterizar polifenoles en diferentes variedades de té y café, usando voltamperometría cíclica, proporcionando una buena medida de galato de epigallocatequina y otros compuestos fenólicos presente en el té, y de ácido clorogénico en el café (Kilmartin & Hsu, 2003).

Mediante CV, se ha estudiado el comportamiento del resveratrol en preparados farmacéuticos y en orina. La oxidación de este compuesto es irreversible, depende del pH y de la velocidad y naturaleza del tampón, comprobando la reproducibilidad, precisión y exactitud del método por HPLC (Zhang, Xu, & Zheng, 2007). La oxidación de la luteolina, un flavonoide natural, también se ha estudiado por métodos electroquímicos, mediante un mecanismo de oxidación también dependiente del pH (Ramesova, Sokolova, Tarabek, & Degano, 2013).

Se ha determinado también la actividad antioxidante de flavonoides y ácidos fenólicos mediante CV, obteniendo buena correlación con la actividad antioxidante calculada mediante inhibición de peroxidación lipídica, con una buena correlación entre el primer potencial de oxidación que presentan los flavonoides y la actividad antioxidante calculada mediante la inhibición de esta enzima, por tanto, se propone este potencial para utilizarse como índice de la AOA en sistema biológicos (McNaught et al., 1996; Yang et al., 2001).

La oxidación electroquímica de los ácidos fenólicos (cafeico, clorogénico, sináptico, ferúlico y p-cumárico), fue investigada por voltamperometría cíclica, utilizando electrodo de carbono y otro modificado, confirmando los resultados por DPPH, aplicándolo a naranja y jugo de naranja (Sousa et al., 2004). De igual manera otros procedimientos miden la capacidad antioxidante de diferentes flavonoides mediante ensayo FRAP y por sus potenciales de oxidación mediante CV, observando buena correlación entre ambos (Firuzi et al., 2005).

Otros autores, proponen evaluar el potencial antioxidante de los subproductos de la vinificación mediante voltamperometría cíclica. El orujo de uva está compuesto de semillas, pieles y tallos, que son una fuente importante de sustancias fenólicas, que tienen propiedades antioxidantes y beneficios potenciales para la salud humana. El análisis proporciona una buena correlación entre los datos electroquímicos y valores de inhibición de la peroxidación lipídica, demostrando que los métodos electroquímicos son una alternativa atractiva a los métodos biológicos (Jara-Palacios, Escudero-Gilete, Hernandez-Hierro, Heredia, & Hernanz, 2017).

Se ha determinado el flavonoide rutina, en preparaciones farmacéuticas y plantas medicinales, sin necesidad de separación previa mediante voltamperometría de barrido lineal (LSV), utilizando un electrodo de gota colgante de mercurio. En este método se consigue aumentar la señal 70 veces, obteniéndose un límite de detección de $2 \cdot 10^{-9}$ M (Song et al., 2002).

Para determinar el contenido total de flavonoles en vino, té y zumo de tomate, utilizando FIA, se ha realizado una detección rápida mediante voltamperometría de redisolución adsortiva (AdSV). En este caso

se ha utilizado el tampón Britton-Robinson, solución a pH 5, con límites de detección bajos, para la determinación de kaempferol, quercetina y miricetina, además la mezcla puede usarse para el cálculo de los flavonoles totales (Volikakis & Efstathiou, 2005).

La voltamperometría cíclica (CV) y la voltamperometría diferencial de impulso (DPV), se utilizan para averiguar el contenido total de polifenoles en muestras de vino tinto, con el fin de caracterizarlos. En función de la presencia de dióxido de azufre en el vino, se deberá elegir una u otra técnica voltamperométrica, para minimizar la interferencia. Los resultados en este trabajo, indican que DPV es más adecuada para la cuantificación de polifenoles totales, debido a su menor sensibilidad al dióxido de azufre. Además, la combinación de CV con datos DPV, puede ser usada para estimar el contenido de dióxido de azufre total (Vilas-Boas et al., 2019).

Sensores electroquímicos

Actualmente, la utilización de sensores electroquímicos en el análisis de los compuestos polifenólicos, se presenta como una alternativa real a los métodos tradicionales, presentando ventajas con respecto a los mismos, tales como selectividad, sensibilidad, la necesidad de menores volúmenes de muestra y la posibilidad de aplicación a muestras coloreadas, turbias o coloidales.

Un sensor consta principalmente de dos componentes básicos conectados en serie: un receptor o elemento de reconocimiento del analito y un transductor. El primero convierte la información proporcionada por el analito, en una señal química o física medible con una sensibilidad definida; el segundo se encarga de transferir dicha señal al sistema de medida. Los cambios electroquímicos que se producen en el sensor, ocurren cuando la especie química interacciona con el elemento de reconocimiento conectado con el transductor, originándose cambios eléctricos, los cuales pueden ser: un cambio en el voltaje (potenciometría), un cambio en la corriente al aplicar un potencial (amperometría), un cambio en la capacidad del

electrodo para el transporte de carga (conductimetría) o un cambio en la concentración de iones (*field-effect transistors*) (Thevenot et al., 2001b). La utilización de sensores electroquímicos aporta importantes ventajas, ya que las medidas pueden llevarse a cabo en volúmenes pequeños de muestra, de manera sencilla, con límite de detección adecuados, aplicables a gran número de analitos y con bajo coste de instrumentación (Pingarrón Carrazón & Sánchez Batanero, 1999).

Un proceso que adquiere suma importancia, es la inmovilización del elemento de reconocimiento, el cual depende de cómo se haya fabricado el sensor, ya que de él dependen características tan importantes como el tiempo de vida o la sensibilidad. Un problema que suele ocurrir habitualmente en la inmovilización del analito, es la alteración del material respecto a su estado inicial, implicando una pérdida en su capacidad de reconocer el analito. Los métodos de inmovilización se pueden clasificar en dos grupos: los físicos (adsorción, atrapamiento y encapsulación; y los químicos (de unión covalente y entrecruzamiento) (Thevenot, Toth, Durst, & Wilson, 2001a).

Muchos de los sensores electroquímicos están contruidos utilizando la adsorción como método de inmovilización. La adsorción se basa en interacciones de tipo no covalente como fuerzas electroestáticas, hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno o de Van der Waals. El procedimiento habitual, consiste en incubar una disolución que contiene el analito al sensor, sobre la superficie electródica durante un tiempo. La adsorción es un método de inmovilización sencillo y de bajo coste, que no implica cambios en la conformación del material a analizar, pero tiene los inconvenientes de su poca estabilidad mecánica y la debilidad de la unión al sensor (Putzbach & Ronkainen, 2013).

Una de las principales tendencias de la Química Analítica, es la automatización, simplificación y la miniaturización de los métodos analíticos. La utilización de sistemas miniaturizados aporta grandes ventajas, como la reducción en el consumo de muestra y reactivos, generando por tanto menos productos de desecho y realizando los análisis en una simple gota de muestra, como puede ser orina, sangre u otros fluidos.

La miniaturización electroquímica es muy sencilla, registrando las medidas eléctricas que suceden en la interfase electrodo-disolución, y ofreciendo límites de detección suficientes para la detección de numerosos analitos de interés. Son técnicas simples y de bajo coste de instrumentación, que además producen un aumento de la sensibilidad, debido a la mayor velocidad de transporte de masa entre el electrodo y la disolución, un menor tiempo de respuesta y la posibilidad de trabajar en medios de baja conductividad. Para disminuir el inconveniente de la baja selectividad, hay que utilizar un elemento de reconocimiento que posea alta especificidad (Couto et al., 2016).

Esta tendencia en la miniaturización de los dispositivos, ha hecho que las celdas electroquímicas convencionales en las que se trabaja con volúmenes del orden de los mililitros, se hayan visto reemplazadas por celdas más pequeñas en las que el volumen de trabajo es del orden de los microlitros, Figura 3.12.

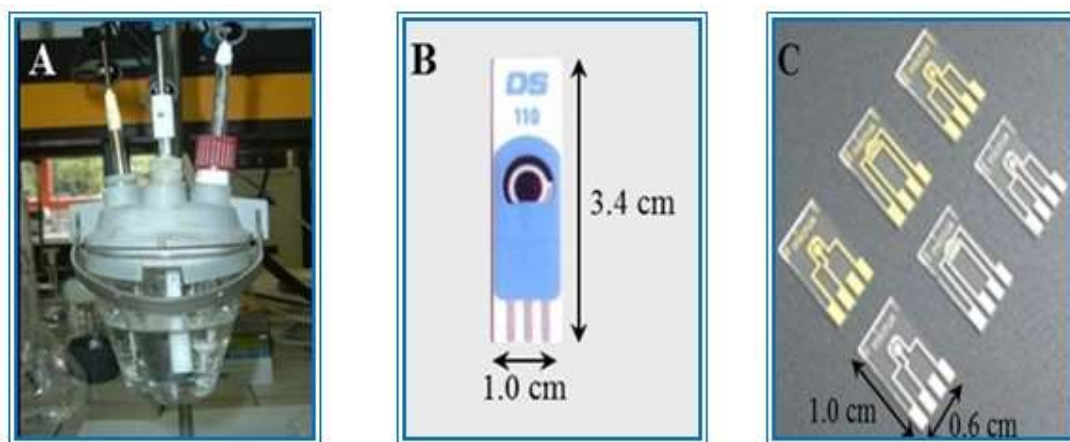


Figura 3.12. Celdas electroquímicas formadas por tres electrodos: (A) celda convencional (volumen 20-200 mL), (B) electrodo serigrafiado (*thick film*; volumen 50 μL) y (C) electrodos serigrafiados (*thin film*; volumen 1-10 μL) (Costa Rama, 2016; Plaza et al., 2018; Stalikas, 2007).

Los electrodos serigrafiados también llamados *screen-printing* (SPEs), son los electrodos electroquímicos más utilizados actualmente, porque muestran buenas características electroanalíticas, diseño flexible, bajo coste, pequeñas dimensiones que los hace útiles en sistemas portátiles

y facilidad de manejo. Debido a estas características, se usan cada vez más como transductores electroquímicos para el análisis clínico, alimentario, medioambiental, etc. (Sophocleous & Atkinson, 2017). Para los análisis clínicos, estos electrodos presentan más ventajas adicionales que los hacen idóneos, porque gracias a su bajo coste, son desechables, de un solo uso, y además permiten trabajar con volúmenes muy pequeños tanto de reactivos como de muestras biológicas.

Los electrodos planos serigrafiados son sólidos, robustos y presentan una gran versatilidad, en función de la aplicación a la que vayan dirigidos. El material que forma el electrodo puede ser PVC, poliéster, cerámica o aluminio, dependiendo de las condiciones a las que vayan a ser sometidos, como temperatura o disolvente (Kroger & Turner, 1997). Sobre este material se imprimen los tres electrodos (auxiliar, de referencia y de trabajo), en el centro el electrodo de trabajo porque es el principal, mientras que el electrodo de referencia y auxiliar, se disponen a su alrededor y son necesarios para completar el sistema electródico de la celda electroquímica (Tesarova et al., 2009).

El serigrafiado del electrodo de trabajo se suele llevar a cabo utilizando carbono o metales como el oro o el platino, para el electrodo de referencia se suele utilizar plata y el electrodo auxiliar suele estar tintado de carbono o platino (Wang, Tian, Nascimento, & Angnes, 1998), buscando propiedades como viscosidad, conductividad o resistencia térmica. El carbono es el material más utilizado, debido a su bajo coste, a que es relativamente inerte químicamente y a que puede ser modificado con facilidad, mientras que las tintas de oro o platino son menos usadas debido a su mayor coste. La plata es muy utilizada para los electrodos de referencia y las conexiones eléctricas. Los electrodos además deben llevar una capa de aislante, que define el conjunto de electrodos y contactos eléctricos (Couto et al., 2016; Ohfuji et al., 2004). En la Figura 3.13, se muestra el diseño de un electrodo serigrafiado.

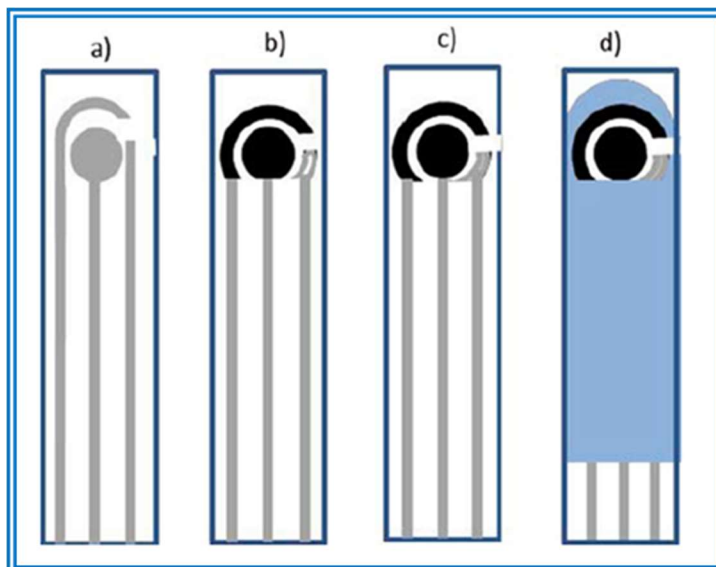


Figura 3.13. Fabricación de un electrodo serigrafiado de carbono: a) impresión de contactos de Ag sobre el sustrato de cerámica; b) impresión del electrodo de trabajo y electrodo auxiliar ambos de carbono; c) impresión del electrodo de referencia de Ag; d) capa de aislante (Sosa Gómez, 2015).

Comercialmente, existe una amplia gama de este tipo de dispositivos en cuanto a su diseño se refiere, debido a la gran versatilidad que presentan, ya que los electrodos serigrafiados son fáciles de modificar, mediante la adición de diferentes especies o materiales a la superficie serigrafiada, modificándola y por tanto, cambiando las propiedades de reconocimiento (Renedo, Alonso-Lomillo, & Martínez, 2007).

En función de la modificación llevada a cabo sobre los electrodos de trabajo, los SPEs se pueden clasificar en: SPEs no modificados, modificados con partículas de metales, modificados con enzimas y modificados con antígeno/anticuerpo (Renedo et al., 2007). Los SPEs no modificados suelen llevar electrodos serigrafiados de carbono (SPCE), y los basados en películas de metales están fabricados por el método de pulverización catódica (*sputtering*). Estos dispositivos tan innovadores, son muy utilizados para análisis electroquímico en las áreas medioambiental, clínica y agroalimentaria. Son además sistemas de bajo coste, desechables y diseñados para trabajar con microvolúmenes de muestra y fáciles de personalizar, en la Figura 3.14, se puede observar un electro serigrafiado utilizado en este trabajo.

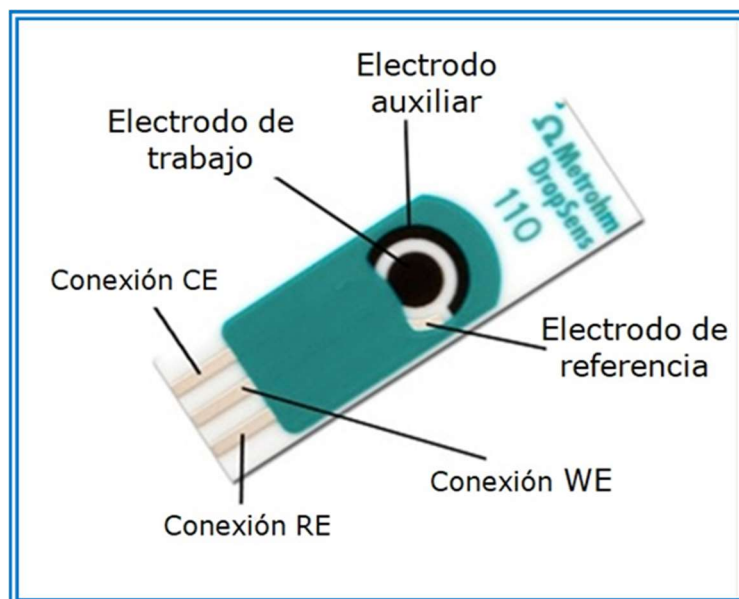


Figura 3.14. Electrodo serigrafiado SPEs (Metrohm DropSens).

Aunque los SPEs producidos sin modificar, son considerados muy buenos sistemas de detección, son además muy útiles para la fabricación de sensores electroquímicos, ya que presentan la gran ventaja de poder modificar su superficie fácilmente, proporcionando así un comportamiento completamente diferente, al que puede presentar sin modificar, mejorando las características analíticas y haciendo posible que puedan ser utilizados en nuevas aplicaciones.

En los últimos años la nanoestructuración de la superficie de los electrodos serigrafiados, es la modificación más utilizada e importante, debido a que el empleo de nanomateriales como nanotubos de carbono o nanopartículas de oro, permiten mejorar la sensibilidad de los ensayos, como consecuencia de las propiedades especiales que poseen (Apetrei & Apetrei, 2018; Fanjul-Bolado, Queipo, Lamas-Ardisana, & Costa-Garcia, 2007).

Las ventajas que se pueden conseguir con la modificación de los SPEs, son muy numerosas, debido a que los materiales que se usan, presentan un área superficial elevada, que favorece los procesos electroquímicos que tienen lugar en la superficie del electrodo. Gracias a esta mayor superficie respecto a los electrodos sin modificar, se produce una mejora en la sensibilidad del método, porque según la Ecuación 3.1

(Randles-Sevcik), la intensidad de pico medida es proporcional a la superficie del electrodo.

$$i_p = 2,69 \cdot 10^5 n^{3/2} v^{1/2} D^{1/2} AC \quad \text{Ecuación 3.1.}$$

Donde i_p es la intensidad de pico medida, n el número de electrones intercambiados entre la especie electroactiva y la superficie del electrodo, v la velocidad de barrido, D el coeficiente de difusión, C la concentración y A el área del electrodo.

Otra ventaja de la modificación, es que se mejora la transferencia de carga entre la molécula electroactiva y el electrodo, mejorando la inmovilización de determinados analitos. Además, los materiales utilizados pueden actuar como catalizadores de la reacción electroquímica, disminuyendo la energía de reacción y favoreciendo que el proceso sea reversible, mejorando la sensibilidad. Existe una gran variedad de materiales que se pueden emplear para modificar la superficie de los electrodos, entre ellos destacan las nanopartículas metálicas, nanotubos de carbono, nanofibras de carbono y el grafeno.

El grafeno es un material que presenta una estructura formada por átomos de carbono con hibridación sp^2 , fuertemente cohesionados en una superficie uniforme, plana, con pequeñas ondulaciones, de un átomo de espesor y con similitud a un panel de abejas por su configuración atómica hexagonal (Guo & Dong, 2011; Katsnelson, 2007). Esta estructura atómica de átomos del carbono, otorga al grafeno unas propiedades químicas, mecánicas y electrónicas excepcionales como: alta conductividad térmica y eléctrica, alta dureza y elasticidad, con una resistencia mecánica mayor que el acero (Wei et al., 2016). Presenta alta resistencia a la ionización y un área superficial específica de $2630 \text{ m}^2/\text{g}$ (Méndez Medrano, Rosu, & Torres González, 2012). Todas estas propiedades, hacen que el grafeno sea empleado en el ámbito medioambiental, industrial y electroquímico (Agarwal et al., 2015; Pan, Ji, Zhang, & Xing, 2020).

El grafeno presenta una variante muy utilizada, el óxido de grafeno (GO). Este material presenta propiedades similares al grafeno, pero ahora la superficie contiene numerosos grupos funcionales como ácidos

carboxílicos, hidroxilos, fenólicos y epóxidos, que confieren al GO unas propiedades eléctricas situadas entre aislante y semiconductor, siendo más reactivo que el grafeno puro y más fácil de funcionalizar (Dreyer, Park, Bielawski, & Ruoff, 2010).

El óxido de grafeno producido, se reduce mediante métodos térmicos, electroquímicos o químicos (Gao, 2015) y también se puede producir mediante extractos naturales, de forma económica y sin dañar al medioambiente ni a la salud humana (Rattan, Kumar, & Goswamy, 2020). Esta reducción es un paso necesario para eliminar las especies de oxígeno y recuperar la configuración sp^2 de la red de carbono. Entre las estrategias de reducción mencionadas anteriormente, la reducción electroquímica ha generado una gran expectativa, porque es un enfoque ecológico (sin reactivos), simple (solo una celda electroquímica), económico y rápido (Guo, Wang, Qian, Wang, & Xia, 2009). El grafeno sintetizado por esta estrategia, se denomina óxido de grafeno electroquímicamente reducido (ERGO).

La manera de llevar a cabo la modificación de un electrodo serigrafiado con grafeno, es de lo más sencillo y consiste simplemente en depositar una gota de una dispersión de óxido de grafeno en agua, sobre el electrodo de trabajo, y posteriormente, dejar secar a temperatura ambiente. Una alternativa más adecuada, es utilizar el óxido de grafeno reducido electroquímicamente, el cual se puede obtener por deposición de una disolución de óxido de grafeno sobre la superficie del electrodo de trabajo, con la posterior evaporación del disolvente, de tal manera que queden retenidas en la superficie del mismo, las láminas de óxido de grafeno, y finalmente, mediante la aplicación de una determinada intensidad de reducción durante un periodo de tiempo, producir la reducción de los grupos portadores de oxígeno y formar así el óxido de grafeno reducido (rGO). Para conseguir ahorrar tiempo se puede realizar una modificación directa, conocido como electrodeposición, la cual consiste en añadir un determinado volumen de una disolución de óxido de grafeno sobre el electrodo de trabajo y realizar un proceso de reducción para generar así el rGO, no siendo necesario esperar a que el disolvente se

evapore (Martin, Hernandez-Ferrer, Martinez, & Escarpa, 2015; Valentini, Romanazzo, Carbone, & Palleschi, 2012).

En la determinación de compuestos polifenólicos mediante técnicas electroquímicas, se describen también gran variedad de trabajos en los que se ha utilizado distintos tipos de electrodos modificados: pasta de carbono, nanotubos, oro, grafito, etc.

El uso de electrodos modificados se ha utilizado para la determinación voltamperométrica de hesperidina. Este flavonoide es un glucósido de flavona que se encuentra en las pieles y los jugos de los cítricos, se puede detectar utilizando electrodos modificados con nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT), utilizando la técnica de separación por adsorción voltamperométrica (AdSV). La hesperidina puede usarse como una indicación de la frescura del jugo de cítricos. Los electrodos serigrafados modificados SPEs, permiten el desarrollo de un sensor económico, desechable y capaz de medir la concentración de hesperidina en muestras de jugo de naranja y de otros cítricos (Sims, Li, Kachosangi, Wildgoose, & Compton, 2009). Otro sensor electroquímico, sensible para flavonoides y basado en un electrodo de pasta de carbono de paredes múltiples modificado, se ha desarrollado para determinar de manera fácil y sensible flavonoides, como kaempferol y quercetina en plantas (Liang et al., 2017).

La modificación de un electrodo con óxido de grafeno y nanopartículas de hexacianoferrato de itrio, se ha utilizado para la detección de rutina, de manera simple, rápida y ecológica, debido al tamaño de las partículas. Este sensor fue utilizado con éxito en la determinación de rutina en productos farmacéuticos, con notable sensibilidad y selectividad, con resultados satisfactorios (Yang et al., 2015).

Para la determinación de quercetina en zumo de manzana, se ha utilizado una metodología electroanalítica utilizando un electrodo de diamante dopado con boro, llevando a cabo diferentes técnicas voltamperométricas, logrando un método muy adecuado para la determinación de este flavonoide, con LOD extremadamente bajos y tiempos de análisis muy cortos (Abdullah, Yardim, & Senturk, 2018).

3.4. TÉCNICAS MULTIVARIANTES

3.4.1. Introducción

En el desarrollo de este trabajo de investigación se presentan, de forma resumida, las distintas técnicas de calibración multivariante, cuándo y cómo aplicarlas, indicando distintas metodologías y formas de trabajo, con el objetivo de conocer las ventajas y desventajas de cada una de ellas, así como sus aplicaciones más adecuadas.

El análisis de muestras que contienen mezclas de compuestos químicos, constituye uno de los retos más importantes de la Química Analítica, sobre todo, cuando se pretende determinar de manera simultánea, compuestos a baja concentración y/o en presencia de otras sustancias con estructuras similares, las cuales actúan como interferentes en la propia respuesta instrumental del analito, produciendo errores sistemáticos en la determinación. Esto ocurre en la mayoría de las muestras, sobre todo en aquellas de origen biológico, ya que son mezclas de constituyentes químicos similares, que afectan de manera parecida a la señal instrumental, por ello, es difícil encontrar mediciones sencillas lo suficientemente selectivas para el analito. Para realizar un análisis cuantitativo en muestras complejas, es necesario utilizar un conjunto de muestras de referencia, que tenga las mismas características que las muestras a analizar y de un método instrumental, con capacidad de medir alguna propiedad característica de los analitos.

Los métodos quimiométricos, se han desarrollado como una alternativa a los métodos clásicos de análisis, porque son capaces de extraer información sobre los componentes de interés de las muestras, mediante el tratamiento de datos y sin necesidad de su separación previa. Gracias a la quimiometría, las medidas han pasado de ser puntuales a un único valor de longitud de onda (datos univariantes), a medidas espectrales denominadas (datos multivariantes), con gran contenido de información. Por tanto, los métodos tradicionales de análisis y procesado de datos, resultan totalmente insuficientes (García, 2002).

3.4.2. Clasificación de los métodos de calibración

Existen diversas clasificaciones de los métodos de calibración, siendo la presentada por Booksh y Kowalski en 1994, una de las más utilizadas (Booksh & Kowalski, 1994). En esta propuesta, se clasifican los métodos de calibración desde un punto de vista matemático, en función de la dimensión de los datos disponibles por muestra. Estos métodos se presentan en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Clasificación de los métodos de calibración
(Booksh & Kowalski, 1994).

Datos univariables	Datos escalares
	Instrumentos de orden cero
Datos multivariables	Datos vectoriales
	Instrumentos de primer orden
	Matriz de datos
	Instrumentos de segundo orden
	Datos de orden superior
	Instrumentos de orden superior

Los métodos de calibración pueden clasificarse en diferentes órdenes desde el punto de vista tensorial. El orden de un método de calibración (n) viene dado por el tipo de tensor (número de medidas instrumentales) utilizado por dicho método. Así, un tensor de orden cero corresponde a una única medida, un tensor de orden uno corresponde a un vector de medidas (p.e., un espectro de absorción), etc. En este sentido, la utilización de datos de orden n para cada muestra en un conjunto de muestras de calibración, da lugar a un tensor de orden $n+1$, el cual es utilizado para formar un modelo de calibración de orden n . Cuanto mayor es el orden del método de calibración, mayor es la cantidad de información que se puede extraer del sistema analítico al utilizar un tensor de mayor orden y algoritmos matemáticos más potentes, (Booksh & Kowalski, 1994).

Según esta clasificación, los datos univariables, son datos escalares, es decir, de orden cero. Este tipo es el más sencillo, ya que,

trabaja con medidas en las que únicamente se obtiene un valor numérico, un escalar, por ejemplo, la medida de absorbancia a una única longitud de onda. La estadística univariable y la regresión lineal univariable, es utilizada en gran parte de los estudios analíticos, donde existe la necesidad de establecer una relación lineal entre una señal instrumental y una variable química controlada, encontrando un gran número de trabajos experimentales que pueden ser modelados mediante la utilización de una regresión lineal, mediante el uso de ciertos programas informáticos, los cuales permiten simplificar de forma importante los cálculos estadísticos (Kumar, Bansal, Sarma, & Rawal, 2014). Por tanto, los métodos de calibración univariantes, son aquellos que utilizan señales analíticas que se miden en un determinado método instrumental, en función de una única variable controlada. Por este motivo, la información obtenida a partir de señales univariantes, resulta bastante limitada (Kościelniak & Wieczorek, 2016).

Los métodos univariantes suelen llevar consigo, complejos procesos previos a la adquisición de la señal, procesos de separación, que en la mayoría de los casos, aumentan los tiempos de análisis y pueden conducir a la contaminación de las muestras y por tanto, pérdida de sensibilidad. Además, la estadística univariante solo es aplicable a casos limitados y sólo se aplicará para la determinación cuantitativa de un único componente en una muestra compleja (Goodarzi, Sharma, Ramon, & Saeys, 2015).

Aunque la simplicidad de la calibración univariada es un aspecto muy atractivo, presenta algunas limitaciones importantes. Entre ellas, la principal es que los métodos univariados requieren de una selectividad absoluta para el analito de interés. En principio, las interferencias sólo podrían modelarse, cuando la cantidad de interferente fuera constante tanto en muestras de calibrado como en muestras de predicción. Esta severa limitación, impide desde el punto de vista matemático, realizar calibraciones en presencia de interferentes, así como un análisis simultáneo de múltiples componentes. Es por esto, que el movimiento desde el mundo de la calibración univariada a la multivariada, se justifica por la aparición de numerosas ventajas, que resultan muy

importantes desde el punto de vista de la Química Analítica cuantitativa (Allegrini, 2015).

En calibración multivariada de primer orden, se mide un vector (tensor de primer orden), con una cantidad J de sensores o elementos predictores, para cada una de las I muestras. Además, este tipo de calibración incluye la situación, en la que para cada muestra, se realizan medidas de concentración de A especies individuales contenidas en esa muestra.

La utilización de métodos de calibración de primer orden en Química Analítica, se justifica por una serie de ventajas respecto a los de orden cero (univariados) (Allegrini, 2015), tales como:

- Determinar de manera simultánea múltiples componentes de una mezcla.
- Determinar la concentración de un analito en presencia de especies interferentes, en caso de ser incluidas en la calibración.
- Detectar la presencia de interferentes en caso que no sean contemplados durante la calibración, aunque no pueda corregirse (lo que se conoce normalmente como “ventaja de primer orden”).
- Mejorar la precisión en las determinaciones debido al uso de múltiples respuestas.

Aunque en calibración multivariante de primer orden, no sea necesario eliminar los interferentes ni el ruido de fondo, antes de comenzar la calibración, será necesario la realización de tratamientos previos de la información analítica, para poder así, detectar estas interferencias y llegar a resultados satisfactorios. La principal aplicación de esta calibración, es el análisis de más de un componente de interés en sistemas complejos reales, de forma más directa (Yun et al., 2015).

Dada la complejidad y variedad de los métodos de calibración multivariable (MCM) descritos en la bibliografía, no existe una clasificación única, sino que se suelen clasificar en función de que posean o no una determinada propiedad, así pues, se distingue entre métodos lineales y no lineales.

Los métodos lineales son los que se pueden escribir como:

$$y = b_0 + \sum_{k=1}^K b_k X_k \quad \text{Ecuación 3.2.}$$

Siendo b_0 y b_k los parámetros a determinar, y la variable dependiente, y X_k la variable independiente, es decir, el concepto de linealidad se refiere a la relación entre variables dependiente y parámetros de la regresión, no a la relación entre variables. Los modelos no lineales son aquellos que no son lineales en los parámetros, como por ejemplo del tipo:

$$y = \alpha x^\beta \quad \text{Ecuación 3.3.}$$

Donde α y β son parámetros a determinar.

Otras clasificaciones, distinguen entre métodos directos y métodos indirectos. En los primeros los parámetros de la calibración se calculan a partir de la señal de cada uno de los analitos, registrada de forma individual. En los indirectos, los parámetros de calibración se calculan a partir de las señales analíticas de mezclas de los componentes. Dependiendo de la magnitud utilizada, se distingue entre la calibración clásica y la inversa. Con la clásica, se sigue un criterio directamente relacionado con la Ley de Lambert-Beer, donde la señal analítica actúa como variable dependiente de la concentración, y con la inversa se sigue un concepto más matemático y, puesto que el objetivo final es el cálculo de una concentración, se utiliza esta como variable dependiente y la señal analítica como variable independiente. También se pueden clasificar en métodos rígidos y flexibles, en los primeros el número de términos de la ecuación de regresión está fijado inicialmente, mientras que en los flexibles el propio método calcula el número óptimo a utilizar (Blanco & Cerdà, 2007).

Teniendo en cuenta todas estas clasificaciones, los métodos de calibración multivariante de primer orden más utilizados en el análisis (González Gómez, 2005), aplicables a sistemas lineales son los siguientes:

- MLR (*Multiple Linear Regression*), regresión lineal múltiple.
- CLS (*Classical Least Squares*), análisis multicomponente clásico.

- ILS (*Inverse Least Squares*), regresión inversa por mínimos cuadrados.
- HLA (*Hibrid Linear Analysis*), análisis lineal híbrido.
Aplicables tanto a sistemas lineales como no lineales:
- PCR (*Principal Component Regression*), regresión por componentes principales.
- PLS (*Principal Component Analysis*), regresión por mínimos cuadrados parciales.
- ACE (*Alternating Conditional Expectations*), expectativa condicional alterna.
- LWR (*Locally Weighted Regression*), regression ponderada local.
- MARS (*Multivariate Adaptive Regression Splines*), regresión adaptativa multivariante.
- PPR (*Projection Pursuit Regression*), regresión de persecución de proyección.
- ANN (*Artificial Neural Networks*), redes neuronales artificiales.

Cuando cada muestra produce una matriz de respuesta, (tensor de orden dos, tamaño $J \times K$), por ejemplo la matriz obtenida del espectro de excitación-emisión de fluorescencia, una matriz absorbancia-tiempo, etc., el conjunto de calibración es un cubo (tamaño $I \times J \times K$). Los métodos de calibración se conocen como de segundo orden. También se llama calibración de tres modos o de tres vías, atendiendo al orden tres del cubo de calibrado. En este sentido, la calibración de primer orden se llamaría de dos modos o de dos vías. Y así sucesivamente, porque no hay límite teórico para el orden. Una muestra puede producir una matriz de excitación-emisión resuelta en el tiempo, lo que sería un dato de orden tres (calibración de cuatro vías).

Los métodos de calibración de segundo orden, permiten el análisis en presencia de algún componente en la muestra que no esté incluido en la calibración, por tanto, la calibración será posible en presencia de interferencias. Esta característica particular se llama "ventaja de segundo orden", la cuantificación puede ser llevada a cabo, con tan solo una muestra de calibración. En algunas ocasiones, se pueden determinar incluso las respuestas puras de cada componente en cada uno de los

órdenes de medida, porque son capaces de medir en función de dos o más variables controladas, haciendo mucho más extensas las posibilidades de estas técnicas analíticas (Cuadros-Rodríguez, Pérez-Castaño, & Ruiz-Samblás, 2016; López, Callao, & Ruisánchez, 2015).

En la Tabla 3.5, se resumen las diferentes posibilidades.

Tabla 3.5. Clasificación de los tipos de datos analíticos y de las calibraciones a las que dan lugar (Girón, 2007).

La muestra produce	El conjunto de calibración es	La calibración es
Un único dato (escalar)	Un vector	Univariante o de orden cero
Un vector de datos	Una matriz	Multivariante de primer orden
Una matriz de datos	Un cubo	Multivariante de segundo orden
Un cubo de datos	Un hipercubo	Multivariante de tercer orden
Un hipercubo de orden n	Un hipercubo de orden n+1	Multivariante de orden n

De forma gráfica, las calibraciones multivariantes de primer orden y segundo orden, se pueden representar como se muestra en las Figuras 3.15 y 3.16.

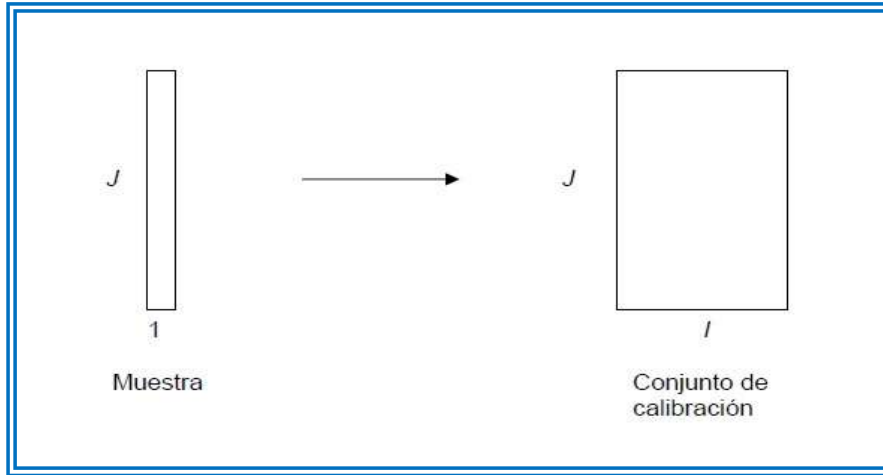


Figura 3.15. Esquema de calibración de primer orden (González Gómez, 2005).

Para el caso anterior, una muestra produce un vector de datos, y el conjunto de calibración de las I muestras dará lugar a una matriz.

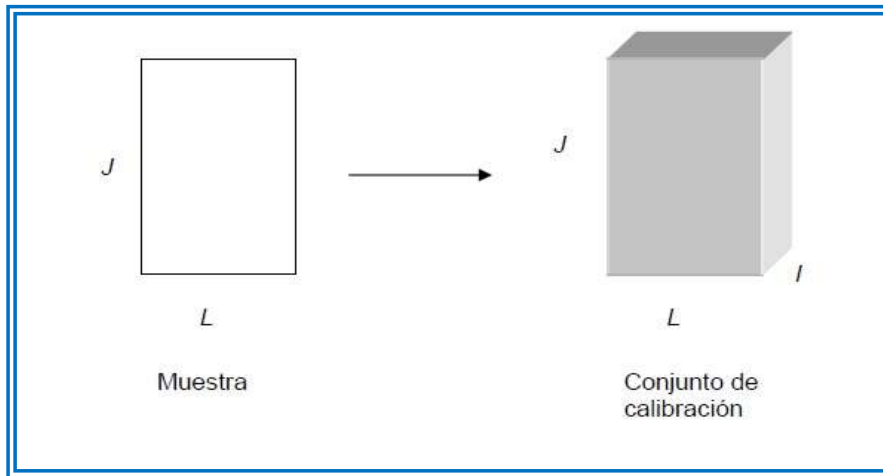


Figura 3.16. Esquema de calibración de segundo orden (González Gómez, 2005).

En este caso, cada sección del cubo es una matriz de datos para cada una de las I muestras del conjunto de calibración.

Los datos que se obtienen como tensores de orden superior, son especialmente útiles en el análisis cuantitativo de mezclas complejas de multicomponentes y, específicamente, los tensores de tercer orden, o datos de 3 vías, han alcanzado una gran aceptación analítica (Booksh & Kowalski, 1994; Escandar et al., 2007; Olivieri et al., 2005).

Podemos definir el conjunto de datos multivariante, como un agregado de datos que pueden ser organizados del siguiente modo:

$$X_{ijk...} \quad i = 1 \dots I; j = 1 \dots J; k = 1 \dots K \quad \text{Ecuación 3.4.}$$

El número de índices puede ser variable, con un solo índice se trataría de un conjunto univariante o un vector, con dos índices se trataría de una matriz. Si el número de índices es tres, el grupo de datos puede organizarse como un cubo de datos. Cuando los datos están organizados en forma matricial, hablamos de filas y columnas. Para el caso de datos de tres vías, a los vectores se les denominan tubos. Podemos definir una sub-matriz, haciendo fijo el índice del tercer orden. A esta sub-matriz se la denomina capa o corte. Estas capas pueden ser frontales, horizontales y verticales. En tercer orden, cada una de estas direcciones se denomina modos o vías. El número de niveles en cada modo o vía, se denomina dimensión de ese modo o vía. Podemos hacer una diferenciación entre el número de vías y modos. El número de vías representa la dimensión geométrica de la organización de datos. El número de modos, indica el número de vías independientes, Figura 3.17.

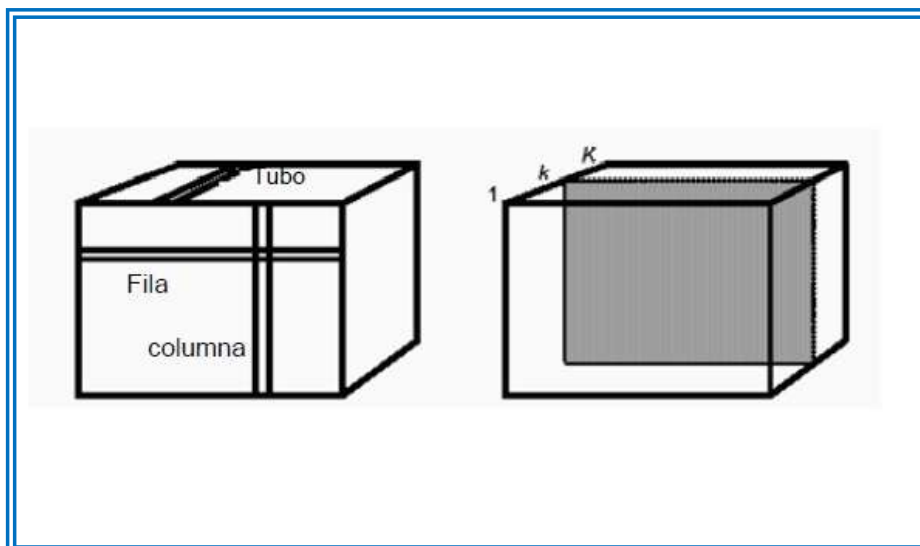


Figura 3.17. Representación esquemática de tubo, fila y columna (izquierda) y capa k-ésima del conjunto de datos (derecha) (González Gómez, 2005).

Para finalizar, en la Tabla 3.6, se realiza una síntesis sobre las características de los modelos de calibración más utilizados.

Tabla 3.6. Síntesis sobre las características de los modelos de calibración más utilizados (Allegrini, 2015).

Modelo	Tipo de datos al que se aplica	Ventajas	Limitaciones	Ecuación de calibración y predicción
Calibración univariada	Escalar	Simplicidad Universalidad	No admite presencia de interferentes	$\hat{x}_{\text{test}} = \hat{b}y_{\text{test}}$ $\hat{b} = (X^T X)^{-1} X^T y$
CLS	Vector (datos de primer orden)	Simplicidad (extensión directa de calibración univariada) Utiliza variables originales Se puede calibrar utilizando el espectro completo	Sensible a colinealidad espectral Necesidad de conocer todos los componentes espectralmente activos de mezclas incógnita	$\hat{c}_{\text{test}} = S^+ r_{\text{test}}^T$ $\hat{S} = R^T C (C^T C)^{-1}$
ILS		Calibración directa (posibilidad de desacoplar componentes)	Sensible a colinealidad espectral Requiere más muestras que sensores de medición	$\hat{y}_{\text{test}} = x_{\text{test}} \hat{b}_{\text{ILS}}$ $\hat{b}_{\text{ILS}} = (X^T X)^{-1} X^T y$

<p>PCR</p>		<p>Calibración directa</p> <p>Elimina problemas asociados con la colinealidad espectral</p> <p>Posibilidad de detectar la presencia de potenciales interferentes (ventaja de primer orden)</p>	<p>Utiliza factores calculados únicamente a partir de los espectros sin considerar las concentraciones</p> <p>No permite lidiar con desviaciones severas de la linealidad</p>	$\hat{y}_{\text{test}} = x_{\text{test}} \hat{b}_{\text{PCR}}$ $\hat{b}_{\text{PCR}} = Vv$ $v = T^+y$ $= (T^T T)^{-1} T^T y$
<p>PLS</p>	<p>Vector (datos de primer orden)</p>	<p>Calibración directa</p> <p>Elimina problemas asociados con la colinealidad espectral</p> <p>Posibilidad de detectar la presencia de potenciales interferentes (ventaja de primer orden)</p>	<p>No permite lidiar con desviaciones severas de la linealidad</p>	$\hat{y}_{\text{test}} = x_{\text{test}} \hat{b}_{\text{PLS}}$ $\hat{b}_{\text{PLS}} = Vv$ $V = W(P^T W)^{-1}$ $v = T^+y$ $= (T^T T)^{-1} T^T y$

<p>PARAFAC</p>		<p>Ventaja de segundo orden y solución única</p> <p>Se obtienen perfiles con sentido fisicoquímico</p> <p>Se mantiene la estructura original de los datos</p>	<p>La calidad predictiva disminuye de forma significativa frente a desviaciones de la trilinealidad</p>	<p>$\hat{y}_{test} = a_{test,n}/k$</p> <p>k: pendiente de la recta de calibración pseudo-univariada</p> <p>$a_{test,n}$: <i>scores</i> obtenidos por descomposición trilineal, para el componente en la muestra de test</p>
<p>MCR-ALS</p>	<p>Matrices, arreglos de tres vías y superiores</p>	<p>Ventaja de segundo orden, permite tratar desviaciones de la trilinealidad</p> <p>Utilizando las restricciones adecuadas, se obtienen perfiles con sentido fisicoquímico</p>	<p>Soluciones variables de acuerdo al tipo de restricciones aplicadas</p> <p>Ambigüedad rotacional</p>	<p>$\hat{y}_{test} = a_{test,n}/k$</p> <p>k: pendiente de la recta de calibración pseudo-univariada</p> <p>$a_{test,n}$: <i>scores</i> obtenidos a partir del área bajo la curva del perfil, resuelto por descomposición bilineal, para el componente de interés n en la muestra de test</p>

<p>UPLS/RML UPLS/RML</p>		<p>Ventaja de segundo orden</p> <p>Admite ciertas desviaciones de la trilinealidad</p>	<p>Trabaja con variables latentes y por lo tanto los perfiles obtenidos no son fáciles de interpretar</p>	<p>$\hat{y}_{\text{test}} = v^T t_{\text{RML}}$</p> <p>$t_{\text{RBL}}$: <i>scores</i> obtenidos por el procedimiento de multilínealización residual</p>
------------------------------	--	--	---	--

3.4.3. Calibración multivariante de primer orden. Método PLS o mínimos cuadrados parciales

El algoritmo PLS, es un método basado en el análisis por componentes principales, en el que además de emplear la información contenida en la matriz de señales, también utiliza la información contenida en la matriz de concentraciones, contribuyendo en mayor cuantía los espectros que corresponden a mayores concentraciones. Este método presenta la ventaja que permite calibrar, predecir y estudiar, estadísticamente los residuos de forma separada para cada componente de una muestra, y es ideal para muestras en los que los componentes tienen intensidades espectrales muy diferentes (Allegrini, Wentzell, & Olivieri, 2016).

Como el resto de métodos de calibración de primer orden, el método PLS, es sensible a la presencia de interferencias no modeladas en la etapa de calibración, lo cual puede conducir a errores en las predicciones.

Optimización del número de *loading*: el número de factores (componentes o *loadings*), que debemos emplear para optimizar un modelo, debe ser tal que garantice la adecuada resolución del problema con la menor complejidad matemática (menor tiempo de cálculo). Si se emplea un número inferior al óptimo, se obtendría un empobrecimiento de las predicciones, y si por otra parte, se incluyen demasiados, se podría estar modelando el denominado ruido del sistema, lo que conllevaría a un sobreajuste y la consiguiente pérdida de exactitud en los resultados.

Se emplean diversos criterios estadísticos, con el objeto de evitar los inconvenientes mencionados. La utilización del denominado parámetro PRESS (*Prediction Residual Error Sum of Squares*), suele estar recomendado en la bibliografía especializada (Geladi & Kowalski, 1986).

Podemos considerar que para cada modelo generado con un determinado número de *loadings*, el PRESS se puede expresar como:

$$\text{PRESS} = \sum_{j=1}^n \sum_{i=1}^m (\hat{C}_i - C_i)^2 \quad \text{Ecuación 3.5.}$$

Siendo n el número total de muestras empleadas en la calibración, m el número total de componentes en la mezcla, \hat{C}_i es la concentración calculada, y C_i la concentración de referencia.

Como alternativa, en lugar del PRESS, puede utilizarse el denominado SEP (*Standard Error of Prediction*), que para un componente viene dado por la expresión:

$$\text{SEP} = [\text{PRESS}/m]^{1/2} \quad \text{Ecuación 3.6.}$$

Experimentalmente, el PRESS se obtiene mediante el siguiente procedimiento:

- De todos los patrones del set de calibración, se prescinde de un cierto número, generalmente solo uno, y con los restantes se realiza la descomposición espectral con un solo factor. Se calcula la matriz de calibración mediante regresión.
- Con dicha matriz, se determina la concentración de la muestra (o las muestras), anteriormente desechadas.
- Se calcula la diferencia entre la concentración predicha con dicha matriz, y la que teóricamente tiene la muestra (concentración actual), y se obtiene la raíz cuadrada de esta diferencia (residuo sin modular).
- A continuación, se deja fuera otra muestra distinta y se repite el proceso. Así, sobre cada una de las muestras que constituyen el set de calibración.

- Como cada muestra es dejada fuera, se añade la raíz cuadrada del error residual calculado a todos los errores previos.
- Se repite el mismo proceso tantas veces como factores se ensayan.

El valor de PRESS, nos da una medida de lo bien que una matriz de cálculo (calibración), está determinando la concentración, para cada número de factores tenidos en cuenta. Cuantos más factores se tienen en cuenta, el error de predicción disminuye. En principio, el número de factores óptimo debería ser aquel que proporciona el mínimo valor de PRESS. En algunos casos, se producen mínimos para volver a aumentar ligeramente después. En esta situación, se considera que el modelo comienza a añadir vectores de ruido.

Incluir demasiados factores o vectores de ruido se denomina sobreajuste. Incluso se produce sobreajuste cuando se optimiza el número de factores para el mínimo PRESS, ya que el número de factores óptimos, deberá ser realmente, aquel que introduce en el sistema un aumento de la capacidad predictiva, estadísticamente mejor que cuando se emplea un número inferior. Por lo tanto, se debe recurrir a un tratamiento estadístico de los resultados, que ponga este hecho de manifiesto.

Haaland y Thomas proponen una solución, de manera que los valores mínimos de PRESS, se comparan con aquellos obtenidos con un número de factores menor que el que produce el mínimo PRESS, haciendo uso del parámetro estadístico F. La estadística F, realmente se emplea para comparar dos series de concentraciones, las calculadas mediante la aplicación del número de factores que generan el mínimo PRESS denominado h^* , y las concentraciones calculadas usando un número inferior de factores denominado h . Según disminuyen las diferencias entre el mínimo valor de PRESS y los otros valores, también disminuye la probabilidad de que cada nuevo factor añadido sea significativo (Haaland & Thomas, 1988).

Todos los modelos con un número de factores $h < h^*$ se comparan con el de referencia, h^* . Con ello se pretende encontrar el modelo más simple (de menor número de factores), que genere un valor de PRESS estadísticamente indistinguible del generado por el modelo que emplea h^* .

Se expresa $F(h)$ como $\text{PRESS}(\text{modelo con } h \text{ factores})/\text{PRESS}(\text{modelo con } h^* \text{ factores})$, siendo $h=1,2, 3\dots h^*$. Se elige como número óptimo de factores el menor h que cumple $F(h) < F_{\alpha, m}$, siendo $F_{\alpha, m}$ el $(1-\alpha)$ por ciento de la probabilidad F de Snedecor con m grados de libertad, siendo m el número de muestras del conjunto de calibración.

Haaland y Thomas, determinaron empíricamente que un valor de $(1-\alpha)$ de 0,75, es una buena elección como criterio de significación, de manera que se selecciona como óptimo el número de factores correspondientes al primer valor del PRESS, cuya probabilidad para la razón F es menor que 0,75.

La determinación del número de factores óptimos es la etapa más importante del análisis, la que requiere mayor atención. En muchos casos no es posible la asignación de la naturaleza de dichos factores. Sin embargo, sí pueden ser atribuidos aquellos que tienen una relación directa con la concentración de los componentes e , incluso, aquellos debidos a interacciones entre los componentes que afectan a sus concentraciones (Liu, Cai, & Shao, 2016). También influyen factores de tipo instrumental (como deriva de la línea base, de la respuesta del detector y de la fuente a lo largo del tiempo), ya que el proceso de ajuste a cero, en muchas ocasiones, sólo se realiza al inicio del análisis. Para asignar la naturaleza de dichos factores, se recurre a un profundo examen del perfil de los *loadings* obtenidos y comparación con los espectros de los componentes puros y sus mezclas, así como, con la evaluación del valor de los *scores* y su relación con las concentraciones, o relaciones entre las concentraciones de los componentes del conjunto de calibración (análisis cluster) (Cui & Fearn, 2018).

Una vez optimizada la matriz de cálculo, teniendo en cuenta el número óptimo de factores, se pueden predecir las muestras desconocidas.

Para seleccionar la región espectral, tendremos en cuenta que, aunque PLS es un método diseñado para usar el espectro completo, sin embargo, nos podemos encontrar con circunstancias o técnicas instrumentales, donde elegir la región del espectro está sobradamente justificado. Por ejemplo, en aquellos casos donde se pueda mejorar la resolución, eliminando zonas de extremadamente alto solapamiento de las

señales, zonas de ruido, zonas de no linealidad, o bien con el objeto de disminuir el tiempo de procesamiento de datos. Hay técnicas, por ejemplo IR, donde amplias zonas del espectro pueden no estar aportando información espectral útil y como consecuencia se deben eliminar. Los métodos matemáticos que posibilitan una elección razonada de la región del espectro adecuado, consisten en calcular la correlación entre la señal analítica, con las concentraciones de cada componente en los espectros de la matriz de calibración y se eligen las regiones que tienen valores de R^2 igual o próximos a 1. En técnicas de absorción y fluorescencia molecular, al ser bandas anchas poco estructuradas, se suele trabajar con el espectro total.

Además de la determinación del número de factores, es igualmente importante la detección de las muestras discrepantes u *outliers*, que se han formado por algún tipo de error, las cuales deben ser eliminadas en la matriz de calibración.

En un grupo de patrones de calibración pueden existir muestras que se aparten del modelo establecido y que, por consiguiente, puedan ser el origen de errores indeseables. El hecho de que el comportamiento de una muestra difiera en mayor o menor grado del conjunto, puede deberse a errores en las concentraciones (muestras discrepantes en la concentración), o a errores espectrales debidos a problemas instrumentales o de manipulación (muestras espectralmente discrepantes), o a ambas causas.

Una herramienta para la detección de muestras erróneas, nos la proporciona la misma manera de calcular el PRESS, dejando sucesivamente y cada vez, y con todas y cada una de las muestras, una fuera de la calibración. La diferencia entre la concentración puesta y la obtenida puede compararse y servir para detectar las muestras erróneas.

Otros métodos, se basan en tratamientos matemáticos más complejos y conducen también a resultados válidos, por ejemplo, el análisis cluster o el análisis de residuos.

- ANÁLISIS CLUSTER: puede emplearse el valor de score para detectar una muestra errónea. Si todos los valores de *scores* para las muestras de una calibración, empleando factor 1, se representan frente a los valores de

scores obtenidos para otro factor, los valores se deben encontrar agrupados alrededor de un valor medio (grupo \equiv cluster). De hecho, se puede medir la distancia estadística entre una muestra sospechosa y el valor medio obtenido para el cluster, que se conoce con el nombre de distancia de Mahalanobis, que asigna una probabilidad ponderada a la muestra en términos de desviación estándar. Cualquier muestra que se encuentre a una distancia superior a ± 3 desviaciones estándar sobre el valor medio, se puede considerar sospechosa, siendo común un aumento en los valores, para aquellas muestras que se encuentren en el extremo más alto o más bajo, del rango de concentraciones elegido para la calibración.

- ANÁLISIS DE RESIDUOS: los residuos constituyen otro camino para identificar muestras sospechosas. Cuando una muestra se predice, el dato es el mejor ajuste obtenido con una combinación lineal de vectores *loading*. Después de ajustar el espectro, queda siempre una información residual. El valor de este residuo, es un indicador de cómo parte de la información puede no haber sido modelada. Si el residuo para una determinada muestra es excepcionalmente elevado comparado con el resto, resulta sospechoso.

Los parámetros de calidad, también denominados en la literatura como cifras o figuras de mérito, son fundamentalmente:

- Los límites de detección y cuantificación.
- La selectividad.
- La sensibilidad.

En calibración multivariante, el límite de detección (LOD) se define normalmente como $3S_b/m$, siendo m la pendiente de la recta de calibrado (y donde el número 3 debería reemplazarse en realidad por el parámetro no centralizado de la distribución t para un 95% de confianza).

Como expresión del concepto anterior, en calibración multivariante podría formularse una expresión similar, basada en los coeficientes de regresión para cada componente según:

$$LOD_k = 3 \cdot S_{bl} \cdot \|b_k\| \quad \text{Ecuación 3.7.}$$

o bien,

$$LOQ_k = 10 \cdot S_{bl} \cdot \|b_k\| \quad \text{Ecuación 3.8.}$$

Siendo S_{bl} , igual a la desviación de la norma del blanco y $\|b_k\|$ la norma del coeficiente de regresión.

Sin embargo, estos parámetros son peligrosos en calibración multivariante, ya que si existen interferencias no modeladas, los límites de detección y cuantificación se vuelven función de las interferencias.

En análisis multivariante, el límite de detección de un componente, va a verse influenciado por la presencia de los demás componentes y las concentraciones relativas.

La selectividad se puede definir en términos de:

$$SEL_k = \frac{1}{\|b_k\| \cdot \|S_k\|} \quad \text{Ecuación 3.9}$$

Por último, la sensibilidad, análoga a la calibración univariante, se define como:

$$SEN_k = \frac{1}{\|b_k\|} \quad \text{Ecuación 3.10.}$$

Conviene también definir la sensibilidad analítica, como el cociente entre la sensibilidad y el nivel promedio del ruido (aproximado a la desviación del blanco).

$$Y_k = \frac{SEN_k}{S_{bl}} \quad \text{Ecuación 3.11.}$$

Este parámetro tiene unidades de inversa de concentración y su inversa, γ^{-1} , se define como la menor diferencia de concentración de un analito dado, que puede apreciarse a lo largo del intervalo de calibración, y es útil para comparar métodos, de forma independiente del tipo de señal utilizada para cuantificar.

El gran avance de la quimiometría es debido, en parte, a la mayor facilidad que existe para el manejo de un gran número de datos, la realización de cálculos y el desarrollo de software concreto, capaces de realizar cálculos de parámetros analíticos específicos, ya sea, sensibilidad analítica, límite de detección, precisión de un método, etc., es decir, programas muy específicos (Olivieri et al., 2015).

3.4.4. Calibración multivariante de segundo orden

Una buena alternativa para solucionar el problema que genera la presencia de interferencias no modeladas en la etapa de calibración, es la utilización de datos con una estructura dimensional mayor, datos de tres vías (Faber, Bro, & Hopke, 2003), que aportarán métodos más robustos frente a la presencia de interferencias y a los efectos de matriz, permitiendo conocer la contribución fundamental de cada analito individual, a la señal medida (Bro, 1997).

La descomposición de los sensores de datos de tres vías, (obtenidos cuando se agrupa un conjunto de muestras de datos de segundo orden) es, bajo determinadas condiciones, única, lo cual permite que las concentraciones relativas y los perfiles espectrales de las muestras individuales, se puedan extraer directamente. Esto permite, la corrección de las contribuciones de los componentes no modelados explícitamente en las muestras. A esta propiedad se la ha llamado "ventaja de segundo orden" (Batista Braga, Allegrini, & Olivieri, 2017; Monzón, Teglia, Delfino, & Goicoechea, 2018).

La denominada ventaja de segundo orden, es aprovechada por los distintos métodos de calibración de dos maneras distintas, representadas esquemáticamente en la Figura 3.18. En la primera opción, A, los datos de una muestra desconocida, se determinan conjuntamente con los datos de calibración y con los coeficientes de regresión que llevan a cabo la predicción, mientras que en la segunda opción, B, se obtiene en primer lugar los vectores directores o *loadings*, utilizando los datos de calibrado, y luego, en un paso posterior, con la adición de la muestra

desconocida, se obtienen los coeficientes de regresión específicos de cada muestra. Ambas maneras, implican la participación de la muestra problema en parte del proceso de calibración. En PARAFAC se sigue el primer procedimiento, mientras que en otros métodos, como BLLS/RBL, N-PLS/RBL o U-PLS/RBL se sigue el segundo.

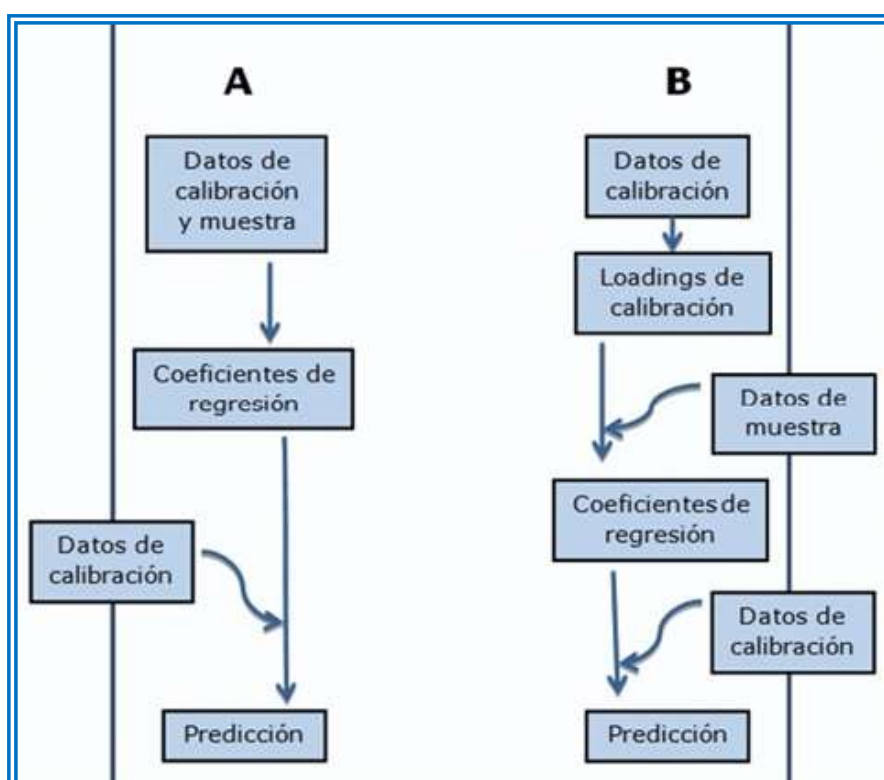


Figura 3.18. Dos maneras básicas de obtener la ventaja de segundo orden (Girón, 2007).

A la hora de establecer un modelo, es muy importante llevar a cabo un análisis de los datos. Lo que permitirá fijar tanto la estructura básica, como las restricciones apropiadas del modelo. Una mala elección de estos parámetros, puede incidir en unos malos resultados del modelo en el análisis de los datos, y por tanto en el propósito del trabajo.

La unicidad, es un concepto importante en el análisis multivariante. Que un modelo sea estructuralmente único, indica que no es necesario definir más restricciones para identificar a ese modelo. Para un modelo con estructura única, no podemos modificar los parámetros sin que cambie el modelo.

Antes de comenzar a explicar los métodos de calibración multivariante de segundo orden empleados en esta investigación, es necesario hablar de la posible estructura de los datos de segundo orden empleados, para lo que es necesario introducir el concepto de trilinealidad.

Cuando tenemos una matriz de datos X para un componente puro, ésta puede expresarse, en ausencia de ruido, como el producto de dos vectores:

$$X = bc^T \quad \text{Ecuación 3.12.}$$

Donde b y c representan los perfiles en ambas dimensiones. Esto ilustra el hecho de que, idealmente, b y c son independientes entre sí, por lo que este tipo de datos han sido denominados bilineales (lineales con una variable cuando la otra se fija y viceversa).

Los métodos de calibración de segundo orden son de gran interés debido a que muchos instrumentos producen datos que siguen un modelo bilineal (Ahmadvand, Parastar, Sereshti, Olivieri, & Tauler, 2017; Asadpour-Zeynali, Maryam Sajjadi, & Taherzadeh, 2016). Cuando una matriz de datos es bilineal, acoplando varias matrices de datos en la tercera dimensión, se puede llegar a un sistema que satisface el siguiente modelo, si se asume la existencia de un solo componente:

$$X_{ijk} = a_i b_j c_k \quad \text{Ecuación 3.13.}$$

Donde X_{ijk} es un elemento del conjunto de datos de tres vías X (de tamaño $I \times J \times K$); a_i , b_j , y c_k son elementos correspondientes a los perfiles a , b y c , que describen el comportamiento de la señal medida en cada una de las dimensiones de datos. En este caso, el conjunto de datos es trilineal. Esta condición está relacionada con el hecho de que los datos de segundo orden, no son solamente una simple colección de conjuntos de datos de dos vías, sino que existe una relación interna, entre cada una de las matrices y, como consecuencia, la descomposición del conjunto de datos de tres vías, construidos con las matrices respuesta medidas para un número de muestras, es única.

En un determinado modelo se pueden aplicar restricciones. Esto se hace por diversas razones, para identificar al modelo o para asegurar que los parámetros del modelo son razonables, es decir, que están conformes con un conocimiento previo del problema.

Los diferentes métodos multivariantes de segundo orden usados para resolver mezclas multicomponentes, pueden dividirse en tres grupos: (a) métodos de solución directa, (b) métodos iterativos y (c) métodos basados en mínimos cuadrados. El primer grupo incluye el método generalizado de reducción de rango (GRAM) (Tao et al., 2017) y el de descomposición trilineal directa (DTLD) (He et al., 2018). Ejemplos de métodos iterativos son: PARAFAC (Rosa, Coqueiro, Março, & Valderrama, 2018), SWATLD (Chen, Wu, Jiang, Li, & Yu, 2000; Y. Li et al., 2013), N-PLS (Baum, Hansen, Meyer, & Mikkelsen, 2013; Yang et al., 2018), y el método de resolución multivariada de curvas por mínimos cuadrados alternantes (MCR-ALS) (Montemurro, Siano, Alcaráz, & Goicoechea, 2017). Mínimos Cuadrados Bilineales (BLLS), es una técnica introducida por Linder y Sundberg y está basada en un procedimiento directo de mínimos cuadrados (Linder & Sundberg, 1998).

A continuación, se describen los métodos de calibración multivariante de segundo orden más empleados.

Mínimos cuadrados parciales concatenados (U-PLS)

Una alternativa para trabajar con datos de segundo orden, es reorganizarlos en vectores y aplicar algoritmos de primer orden. Así, en el tratamiento de datos de segundo orden, aparece el concepto de *unfolding*.

El término *unfolding*, puede ser traducido como desdoblamiento o simplemente reorganización. Este método consiste, en organizar un conjunto de datos multivariantes, en una matriz. Se trata de ir concatenando matrices de diferentes niveles (Figura 3.19).

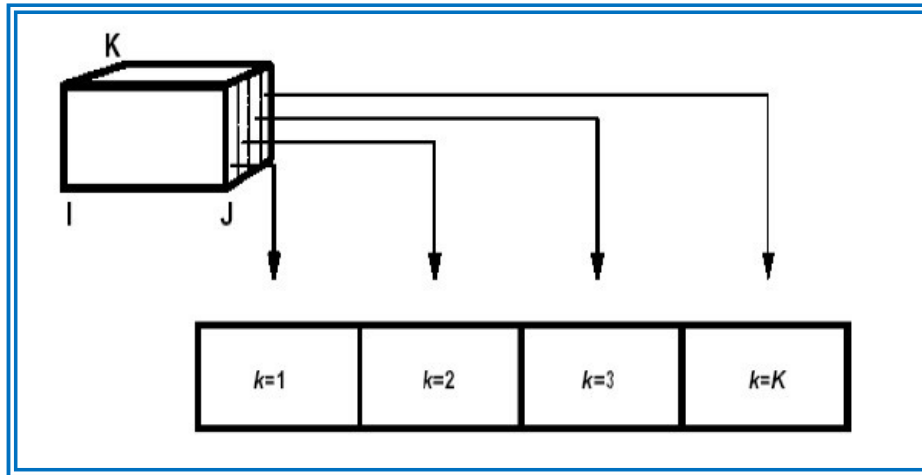


Figura 3.19. Representación gráfica del concepto de *unfolding* (González Gómez, 2005).

El proceso de *unfolding*, se lleva a cabo, principalmente por necesidades computacionales, ya que la forma matricial, es la forma más sencilla de introducir datos en una computadora. El objetivo final de *unfolding*, se logra cuando se consigue ignorar la estructura multivariante de los datos, y se tratan como un conjunto de datos de dos vías. Ejemplos de estos métodos son U-PCR (*Unfolding-Principal Component Regresión*) y U-PLS (*Unfolding-Partial Least Squares*) (Allegrini & Olivieri, 2016; Jiménez Girón et al., 2008).

Mínimos cuadrados parciales multidimensionales (N-PLS)

El algoritmo basado en mínimos cuadrados parciales (PLS), para señales de primer orden, puede ser extendido a señales de mayor orden.

Consideramos un modelo en el que, para cada componente, se construye un modelo lineal X e Y , donde X es la matriz de datos e Y la matriz de concentraciones. Análogamente a PLS de dos vías, la matriz de datos X y la matriz de concentraciones Y se pueden descomponer de la forma que se muestra esquemáticamente en la siguiente figura (Figura 3.20).

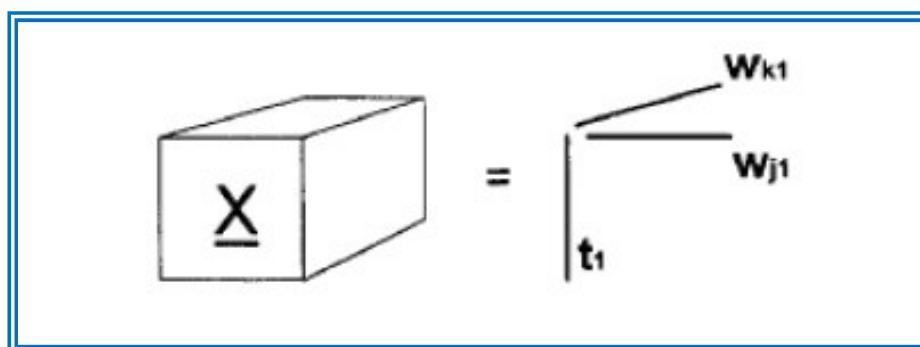


Figura 3.20. Representación gráfica del modelo de descomposición trilineal de un componente de X (Girón, 2007).

El procesado de datos de órdenes elevados, es más difícil que el del caso de datos de dos vías y, al igual que para PLS, el número de factores con N-PLS se determina mediante la validación cruzada y aplicando el criterio de Haaland y Thomas (Haaland & Thomas, 1988).

Comparados con los modelos *unfolding*, los modelos multilineales son mucho más simples porque emplean menos parámetros y son más fáciles de interpretar. Además, los modelos trilineales serán potencialmente menos vulnerables al ruido debido a que, para realizar la descomposición, se emplea la información en todos los órdenes (Rezaei, Khayamian, & Mokhtari, 2009).

Ni U-PLS ni N-PLS presentan la “ventaja de segundo orden”, pero estos algoritmos se han acoplado recientemente a un proceso denominado “bilinealización residual”, RBL (Gomes, Alcaraz, Goicoechea, & Araújo, 2014), que les proporciona esta ventaja para datos de segundo orden (Batista Braga et al., 2017).

Análisis factorial paralelo (Modelo PARAFAC)

PARAFAC, (PARAllel FACTor analysis), es un método de descomposición, que puede ser comparado con el modelo bilineal PCA. Fue propuesto de forma independiente en 1970 por Harshman (Harshman, 1970) y por Carroll y Chang (Carroll & Chang, 1970), quienes renombraron a este modelo como CANDECOMP (*Canonical Decomposition*). Inicialmente

surge como un método de análisis multivariante en el campo de la psicometría, pero que hoy en día se continúa utilizando para el tratamiento de grandes conjuntos de datos (Vigneron, Kodewitz, da Costa, Tome, & Langlang, 2018).

Para el caso del análisis de tres vías, la descomposición de datos, se hace en triadas o componentes trilineales. En lugar de un vector *loading* y *score*, como en PCA; cada componente consiste en un vector *score* y dos vectores *loading*, Figura 3.21.

En este método, los datos que corresponden a la calibración son las I matrices $X_{i,cal}$ y, por cada muestra desconocida, la matriz X_u . Éstas pueden ser "apiladas" para formar una matriz tridimensional \underline{X} . Si las matrices individuales son de un tamaño de $J \times K$, tales como matrices de evolución de los espectros emisión-tiempo (donde J = número de longitudes de onda de emisión y K = número de datos temporales), las dimensiones de \underline{X} son $(I+1) \times J \times K$ (I = número de muestras de calibración).

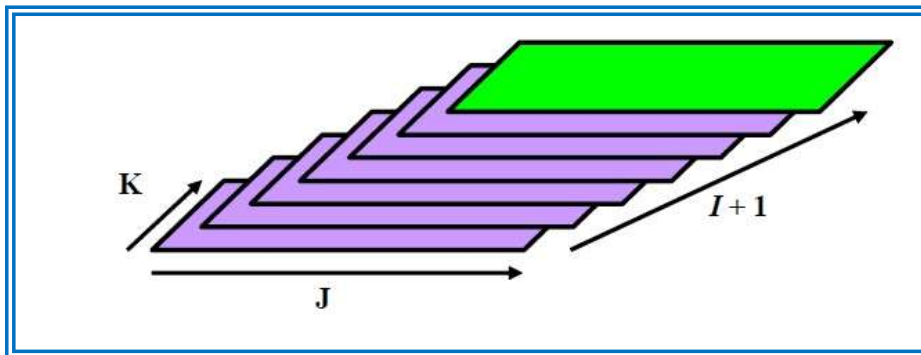


Figura 3.21. Esquema representativo de cómo PARAFAC ubica las matrices de datos para procesarlas (Girón, 2007).

La estructura del modelo PARAFAC, se puede definir basándose en una estructura bilineal, en la Figura 3.22, se ha omitido la matriz E para simplificar el gráfico.

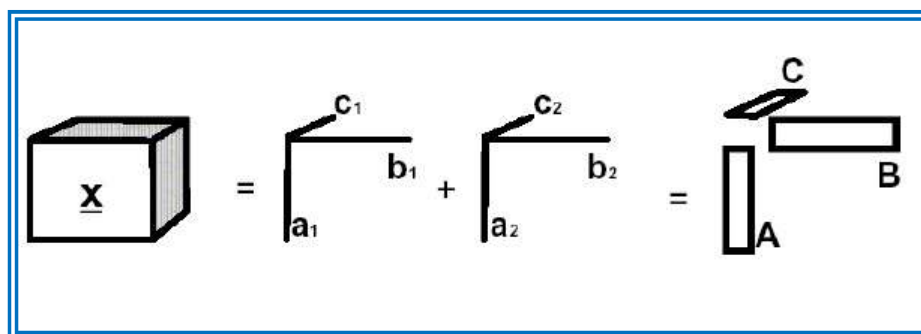


Figura 3.22. Dos componentes del modelo de tres vías PARAFAC, para una organización de tres vías de datos \underline{X} (González Gómez, 2005).

El modelo PARAFAC, parece indicar que los diferentes modos del sistema son tratados de diferente forma; sin embargo PARAFAC, es un modelo simétrico, en el sentido en que si, por ejemplo, una vez establecido un determinado orden, se intercambian el primer modo por el tercero y viceversa, PARAFAC será idéntico para los dos conjuntos de datos, excepto que el vector *loading* tres, habrá pasado a ser el número uno, y al contrario.

Una ventaja importante del modelo PARAFAC, viene dada por el hecho de que las soluciones que propone a un determinado problema, son únicas (unicidad). En los modelos bilineales existe el problema de la libertad rotacional. En una descomposición espectral, en un modelo bilineal, los vectores *loading* muestran los espectros puros de los analitos medidos; pero si se carece de una información externa no es posible encontrar estos espectros puros, debido a los problemas rotacionales mencionados. Este hecho, ha motivado que se propongan nuevos métodos, más interpretativos que PCA y modelos similares (Mortera, Zuljan, Magni, Bortolato, & Alarcón, 2018).

En la siguiente figura (Figura 3.23), se representa de manera esquemática los datos de tercer orden. A la izquierda el cubo de datos tridimensionales y a la derecha una fracción X_i a lo largo de la dimensión I, es decir, la $J \times K$ EEMs para la muestra i .

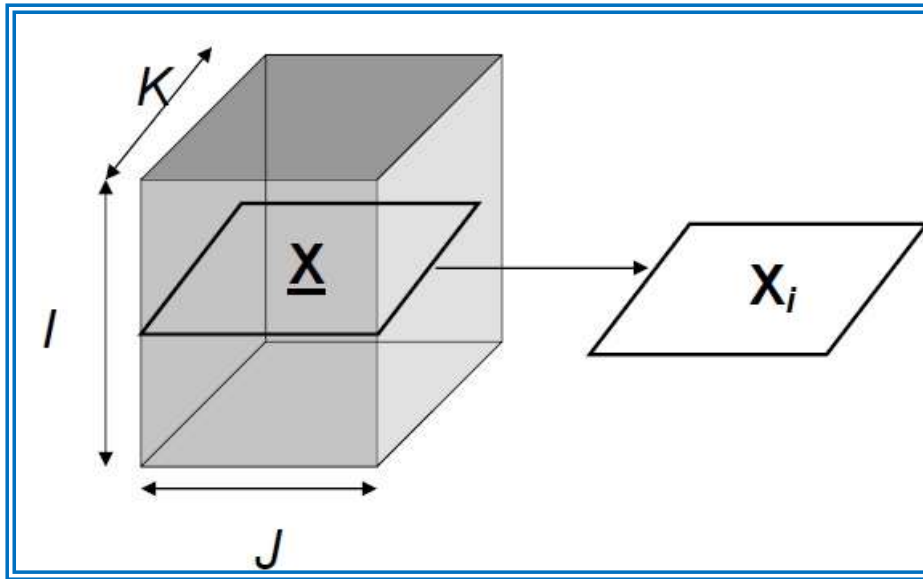


Figura 3.23. Representación esquemática de datos de tercer orden (González Gómez, 2005).

Si los datos son aproximadamente trilineales, podemos determinar el fenómeno que se produce realmente, si empleamos un número correcto de factores y una apropiada relación señal-ruido (Kiers & Harshman, 1997; Kruskal, 1977). Este hecho fue el que motivó a Harshman a desarrollar la idea de los perfiles paralelos proporcionales (Cattell, 1944). Existen muchos ejemplos en los que PARAFAC coincide con un fenómeno físico, por ejemplo fluorescencia de emisión-excitación, cromatografía con detección espectral, etc. (Cabrera-Bañegil, Martín-Vertedor, Boselli, & Durán-Merás, 2018; Lenhardt et al., 2017).

En la Figura 3.24, podemos ver el carácter de unicidad que tiene PARAFAC en un ejemplo de fluorescencia, para dos muestras diferentes de tres analitos, a las que se han registrado los espectros de emisión-excitación fluorescentes, dando lugar a dos matrices de datos diferentes. Este conjunto de datos puede organizarse para formar un conjunto de datos de tres vías (izquierda), o descomponerse y formar un conjunto de datos de dos vías (derecha).

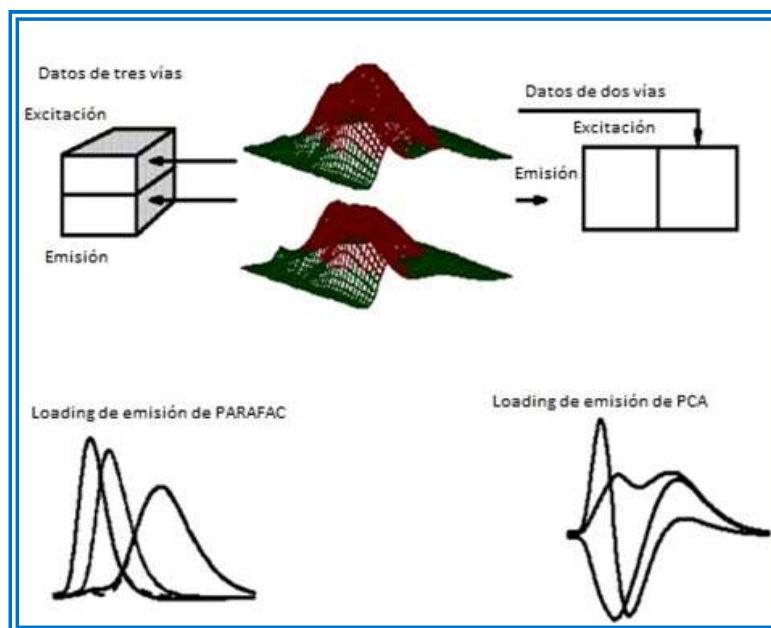


Figura 3.24. Unicidad en PARAFAC, para tres analitos en dos muestras diferentes (González Gómez, 2005).

Es difícil decidir el mejor rango de la mayoría de los modelos multivariantes de varias vías. Sin embargo, es necesario para poder construir un buen modelo. Un paso importante y previo, es el de conocer el número de componentes, y también conocer los espectros de los analitos, siempre que sea posible. Existen varios modos de afrontar esta decisión, se describen tres:

- Por análisis de residuos: si el residuo sufre una variación sistemática, nos indica que se deben considerar más componentes. Si una representación de la suma de los cuadrados de los residuos, frente al número de componentes prácticamente alcanza un valor constante para un determinado número de componentes, se puede considerar que se ha alcanzado un número óptimo de los mismos (Solanki, Kulkarni, Singh, Verma, & Varde, 2018).
- Validación cruzada: éste y otros métodos similares se emplean para determinar la dimensión del modelo. Aunque se emplean ampliamente en modelos de dos vías, también son válidos en modelos de tres vías (Eastment & Krzanowski, 1982).
- Diagnóstico de la consistencia del modelo o bien en su terminología inglesa aceptada ("*Core Consistency Diagnostic, CONCORDIA*") (Bro &

Kiers, 2003; Liu, da Costa, So, Huang, & Ye, 2016), este modelo se aplica al análisis multivariante de tres vías, especialmente a PARAFAC.

Desde un punto de vista práctico, si a un grupo de datos modelados mediante PARAFAC, se le incrementa de forma progresiva el número de componentes, la superidentidad normalmente disminuye de forma progresiva según aumenta el número de componentes. Después de aplicar el número máximo de componentes apropiados para el modelo, e incluir uno más, la superidentidad disminuye de forma drástica, y a menudo se genera un abrupto corte cuando se emplean representaciones del valor del "core" en función del número de componentes (Cabrera-Bañegil, Hurtado-Sánchez, Galeano-Díaz, & Durán-Merás, 2017).

De esta forma, el número de componentes ideales para el modelo será, el anterior al que genera el salto brusco en el valor del "core". Generalmente el valor del "core" estará próximo al 100% y disminuirá bruscamente hasta valores muy pequeños, incluso próximos a 0,1. Dicho comportamiento se puede observar en la Figura 3.25, donde se ha aplicado a la determinación de carbamacepina y su epóxido, en presencia de suero, mediante PARAFAC (Escandar, González Gómez, Espinosa Mansilla, Muñoz de la Peña, & Goicoechea, 2004).

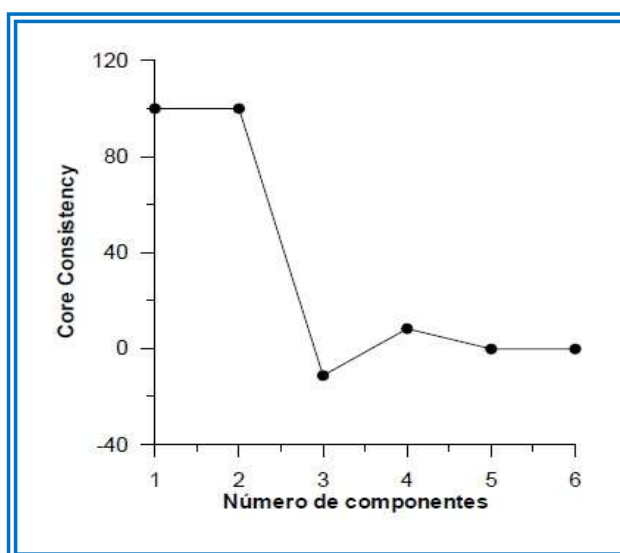


Figura 3.25. Representación del *Core consistency* en función del número de componentes (González Gómez, 2005).

Otra manera de seleccionar el número de factores, es el análisis de los errores de regresión de la calibración lineal pseudo-univariante (Muñoz de la Peña, Espinosa Mansilla, González Gómez, Olivieri, & Goicoechea, 2003).

Otro de los inconvenientes que presenta PARAFAC, es que la velocidad con la que se alcanza la convergencia no es elevada (Bro, 1997), ya que es necesario un gran número de iteraciones antes de conseguir la convergencia. El conjunto de datos analíticos, necesarios para realizar un estudio de calibración de segundo orden es extremadamente extenso y, generalmente, entre ellos aparecen ligeras multicolinearidades. Todo ello provoca que PARAFAC, requiera un elevado número de iteraciones para converger. De modo que el gran tamaño de los datos empleados, hace que cada iteración suponga un elevado coste computacional. En la bibliografía se han propuesto diferentes métodos que intentan evitar este aspecto negativo de PARAFAC, empleando técnicas que tratan de obtener los parámetros del modelo empleando matrices de datos más reducidas y, de este modo, se disminuye el tiempo de computación. Por ejemplo, Andersson y Bro, propusieron una poderosa herramienta para comprimir datos de gran tamaño, empleando el algoritmo Tucker3 (Andersson & Bro, 1998). Por otro lado, existen otros métodos que intentan acelerar el tiempo de cálculo, mediante la reducción del número de iteraciones y, a pesar de que este conjunto de métodos incorpora ventajas respecto a PARAFAC, aún se requiere la estimación de forma exacta del número de factores, que es la principal limitación (Cabrera-Bañegil et al., 2018).

Características de PLS, N-PLS y PARAFAC

Todos los algoritmos indicados son para análisis multivariante, aplicables a diversos tipos de señales ópticas, eléctricas y cromatográficas.

Sin embargo, mientras que PLS utiliza datos de primer orden para llevar a cabo los cálculos, N-PLS y PARAFAC, emplean datos de segundo orden o más, es decir de tres vías o más. Dichos datos podrían ser los obtenidos a partir de las matrices de excitación-emisión, en el caso de la

fluorescencia, o aquellos que derivan de la utilización como tercera vía, de la variable tiempo, pudiendo tratarse tanto de fluorescencia, como absorción u otras señales apropiadas (Hutabarat, Greenfield, & Mulholland, 2001).

También, N-PLS y PARAFAC aprovechan la mayor información espectral, y por tanto, la mayor capacidad diferenciadora de los datos de segundo orden, presentan características distintas que le confieren diferentes capacidades de resolución y por tanto diversos campos de actuación.

N-PLS, utilizada señales de tres vías, y construye la matriz de calibración mediante mezclas de componentes puros como patrones. Tiene la ventaja frente a PARAFAC, de potencialmente poder modelar no linealidades y ser más rápido en los procesos de predicción. Sin embargo, cuando se aplica a la resolución de componentes en presencia de un fondo, que presenta amplia señal y gran variabilidad en función del caso concreto de análisis, por ejemplo, suero u orina en diversos individuos, la única posibilidad es incorporar a la matriz de calibrado, numerosas muestras de suero u orina, si se dispone de él, en ausencia de los analitos de interés. Esta forma de actuación, tiene la limitación de que nunca realmente se está disponiendo del fondo, llamamos interferencia real, que incluso en algunos casos no se puede disponer de ella y que el número de muestras fondo necesarias para poder aproximarnos a una modelación de dicha interferencia es enorme, en muchos casos 50 o más. Por tanto, N-PLS previsiblemente podrá ser aplicado favorablemente, cuando el fondo sea conocido y constante. Este hecho puede ocurrir por ejemplo, cuando se pretende su aplicación al análisis de rutina de productos manufacturados de composición previsible y compleja. En estos casos la optimización de un modelo, con la elevada capacidad de resolución de N-PLS y la rapidez de predicción, puede generar procedimientos competitivos incluso con HPLC, de forma similar a como lo hace PLS para sistemas más simples (Bro, 1996).

Otra ventaja de N-PLS frente a PARAFAC, es la incorporación de las variables dependientes en la descomposición de las variables independientes, lo que podría estabilizar el modelo predictivo (Bro, 1997).

En cuanto a PARAFAC, presenta como limitación fundamental que los datos tengan que ser lineales. En cuanto a la velocidad de predicción de las muestras, es más lento que PLS, pero este hecho por otra parte, deriva de lo que podríamos considerar su mayor virtud, la denominada "ventaja de segundo orden". PARAFAC, utiliza para la calibración las mezclas patrón de los componentes de interés, pero además incluye una a una las muestras problema. De manera que, a través de la información obtenida, discrimina entre la información correspondiente a los componentes de interés, contenidos en los patrones, y el resto de la información presente en la muestra problema, que trata como interferencia. Esta forma de operar, aunque hace que el proceso sea más lento, sin embargo nos asegura que el fondo de la muestra está siendo modelado.

Entre los métodos de calibración que emplean datos de segundo orden, la técnica más utilizada es la luminiscencia molecular, mediante registro de las matrices de excitación-emisión (EEMs) o combinación de fluorescencia-tiempo o fluorescencia-pH. Ejemplos de tales métodos para la resolución de mezclas de componentes o para determinar un único componente en muestras complejas, se pueden encontrar en una revisión publicada por Bro, con los procedimientos descritos hasta 1995 (Bro, Workman JR, Mobley, & Kowalski, 1997). En la Tabla 3.7, se recoge una revisión bibliográfica, más amplia con más ejemplos.

La utilización de las señales emisión/excitación, proporcionadas por el espectrómetro de fluorescencia, son señales de gran sensibilidad, que permiten llegar a medir concentraciones relativamente bajas de analitos fluorescentes, de manera simple, rápida y económica. La combinación con PARAFAC, nos permite realizar separaciones de manera muy eficaz (Cabrera-Bañegil et al., 2018).

En la literatura se pueden encontrar más ejemplos de diferentes revisiones, que sobre los métodos de calibración multivariante de segundo orden se han llevado a cabo (Bortolato, Lozano, de la Peña, & Olivieri, 2015; Escandar, Goicoechea, Muñoz de la Peña, & Olivieri, 2014), y que se han utilizado para la determinación de infinidad de compuestos, como ejemplo se ha realizado la Tabla 3.7.

Tabla 3.7. Revisión bibliográfica sobre técnicas multivariantes aplicadas a diferentes compuestos.

Técnica multivariante	Señal	Analito	Matriz	Referencia
PARAFAC	Fluorescencia EMMs	Catequina, epicatequina, ácido vanílico, oleuropeína	Aceitunas	(Cabrera-Bañegil et al., 2018)
PARAFAC U-PLS/RBL N-PLS/RBL	Fluorescencia EMMs	Miricetina, quercetina, kaempferol	Pimentón	(Monago-Maraña et al., 2016)
PARAFAC PLS	Fluorescencia EMMs	Aminoácidos, flavonoides y fitoquímicos	Miel	(Lenhardt, Bro, Zeković, Dramićanin, & Dramićanin, 2015)
BLLS – RBL PARAFAC	Fluorescencia EMMs	Aflatoxinas B1 y B2	Cacahuete	(Sajjadi, Abdollahi, Rahmanian, & Bagheri, 2016)
PARAFAC	Fluorescencia	Hidrocarburos aromáticos policíclicos	Agua	(Beltrán, Guiteras, & Ferrer, 1998)
MCR-ALS	HPLC-DAD.	Pesticidas	Vegetales	(Sousa, Pinto, & de Araujo, 2017)
PLS SVR	Espectroscopia Raman de superficie mejorada (SERS)	Pesticidas	Manzana	(Fan, Lai, Rasco, & Huang, 2015)

PARAFAC	Fluorescencia	Naftil derivados	Agua	(Cao, Chen, Mo, Wu, & Yu, 2000)
PARAFAC MCR-ALS	Fluorescencia EMMs	Tributilestaño	Agua	(Bravo M, Aguilar, Quiroz V, Olivieri, & Escandar, 2013)
PARAFAC PARALIND	Fluorescencia EMMs	Ácido salicílico	Plasma humano	(Bahram & Bro, 2007)
PLS2	Absorción UV	Clorofila y feopigmentos	Agua	(Moberg, Karlberg, Blomqvist, & Larsson, 2000)
PARAFAC TLD	Fluorescencia EMMs	Varapamilo	Medicamentos	(Esteves da Silva, Leitão, Costa, & Ribeiro, 2002)
AQLD	Fluorescencia Matrices cinéticas	Tiroxina y levodopa	Plasma humano	(Xie et al., 2015)
PARAFAC U-PLS / RBL N-PLS / RBL	Fluorescencia EMMs	Fármacos terapéuticos (irinotecán y talidomida)	Orina Humana	(Hurtado-Sánchez, Durán-Merás, Rodríguez-Cáceres, Jiménez-Girón, & Olivieri, 2012)
PARAFAC	Fluorescencia EMMs	Antiinflamatorios (ácidos flufenámico y meclofenámico)	Orina	(Muñoz de la Peña, Mora Díez, Bohoyo Gil, Olivieri, & Escandar, 2006)

PARAFAC SWATLD PLS U-PLS N-PLS	Fluorescencia EMMs	Fluoroquinolonas (enoxacina norfloxacinaofloxacina)	Orina	(Espinosa-Mansilla, De La Pena, Gómez, & Salinas, 2005)
PARAFAC	Fluorescencia EMMs	Trans-resveratrol	Plasma	(Bernardes, Poppi, & Sena, 2010)
MCR – ALS	Absorbancia-pH EMMs	Doxorrubicina	Plasma	(Alcaráz, Schenone, Culzoni, & Goicoechea, 2014)
PARAFAC	Fluorescencia EMMs	Carbamatos	Lechuga	(Rubio, Sarabia, & Ortiz, 2015)
PARAFAC	Fluorescencia EMMs	Antibiótico (ciprofloxacina)	Orina	(Ortiz, Sarabia, Sánchez, & Giménez, 2009)
PARAFAC ATLD APTLD SWATLD U-PLS/RBL N-PLS/RBL	Fluorescencia EMMs	α -asarona y β -asarona	Plantas Acorus tatarinowii,	(Bai, Liu, Liu, & Wei, 2018)

COW U-PLS-RTL N-PLS-RTL	DPV	Levodopa. Carbidopa, metildopa, acetaminofén tramadol, lidocaína Tolperisona, ofloxacina, levofloxacina y norfloxacina	Plasma	(Jalalvand, Gholivand, & Goicoechea, 2015)
PLS PARAFAC	Espectrofotometría ultravioleta.	Ácido acetilsalicílico y ácido ascórbico	Fármacos	(Sena, Fernandes, Rover, Poppi, & Kubota, 2000)
MCR-ALS	Fluorescencia EMMs	Ácidos fúlvicos	Suelos	(Esteves da Silva, Tavares, & Tauler, 2006)
PARAFAC PARAFAC2	Espectros UV-VIS tiempo	Antihipertensor (nifedipino)	Fármacos	(Leitão & Esteves da Silva, 2006)
SVD-LS SVD-LS/RBL	Fluorescencia EMMs	Naproxeno, ibuprofeno	Orina y Plasma	(Haimovich, Orselli, Escandar, & Olivieri, 2006)
PARAFAC SWATLD PLS1 N-PLS	Fluorescencia EMMs	Sulfatiazol	Miel	(Mahedero et al., 2005)
PARAFAC U-PLS	Fluorescencia EMMs	Compuestos fenólicos. (resveratrol, catequina y epicatequina)	Uva	(Cabrera-Bañegil et al., 2019)

PARAFAC	Fluorescencia EMMs	Compuestos fenólicos Flavan-3-oles	Vino	(Airado-Rodríguez et al., 2011)
MCR-ALS	Fluorescencia EMMs	Compuestos fenólicos y flavonoides	Manzana	(Włodarska, Pawlak- Lemańska, Khmelinskii, & Sikorska, 2017)
PARAFAC	Fluorescencia EMMs	Catequina, ácido protocatecuico, ácido clorogénico, ácido siríngico, ácido ferúlico, etc.	Hierbas medicinales	(Mazina, Vaher, Kuhtinskaja, Poryvkina, & Kaljurand, 2015)
ATLD	Fluorescencia EMMs	Compuestos fenólicos	Té	(Hu et al., 2018)

3.5. CONSIDERACIONES Y FUTURAS PERSPECTIVAS

El adecuado tratamiento de muestra, es una de las etapas fundamentales del proceso analítico, ya que la extracción y el aislamiento de los compuestos a analizar de las matrices en las que se encuentran, es determinante para poder obtener resultados satisfactorios. Por tanto, el ideal de un tratamiento de muestra, es que posibilite el aislamiento del analito de interés, eliminando interferentes, siendo lo más selectivo posible, lo que influirá directamente en la sensibilidad; que sea sencillo, minimizando el número de etapas del procedimiento, con la que se evitará posibles errores y contaminaciones, reduciendo tiempos y costes; que sea amigable con el medioambiente, y que sea compatible con la utilización de diferentes técnicas analíticas instrumentales.

Hoy en día, el acoplamiento en línea del tratamiento de muestra (con o sin automatización) al equipo de detección, es una de las líneas de investigación más potenciadas y exitosas para muestras líquidas, aunque aún limitadas para muestras sólidas o semisólidas. Por otra parte, la miniaturización de las técnicas es clave para integrar los sistemas y así, mejorar el rendimiento de los procedimientos analíticos.

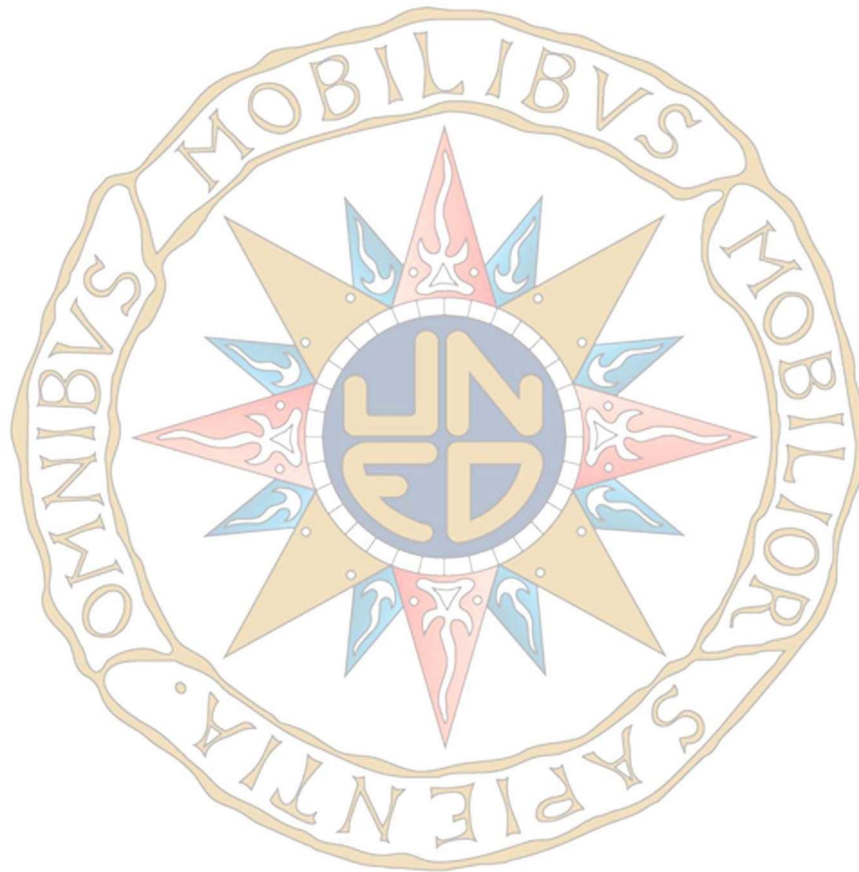
La extracción en fase sólida (SPE) con nuevos materiales más selectivos, junto con la automatización y miniaturización de las técnicas analíticas, son procesos que aportan enormes ventajas, reduciendo tiempos y costes. En este sentido, los polímeros de impresión molecular (MIP) son una alternativa de futuro, debido a las mejoras en el aislamiento selectivo de los analitos de las complejas matrices en las que se encuentran. La facilidad de síntesis de estos materiales tan específicos, su bajo coste, y la posibilidad de adaptarse a diferentes técnicas de extracción, hace que la aplicación de estos materiales al análisis sea una línea de investigación preferente en el futuro.

En cuanto a las técnicas analíticas instrumentales, las técnicas cromatográficas más actuales se dirigen a mejorar la sensibilidad y selectividad, empleando nuevas fases cromatográficas, miniaturizando equipos y acoplando sistemas de detección muy eficaces en la identificación de múltiples analitos en mezclas complejas, reduciendo tiempo y costes.

Entre las técnicas instrumentales, las técnicas electroanalíticas siempre han destacado por su sensibilidad y selectividad. La automatización, simplificación y miniaturización de los diferentes métodos analíticos, es una tendencia en la actualidad por sus grandes ventajas. En este campo, se ha demostrado el importante papel del desarrollo de sensores con transducción electroquímica en el futuro. La utilización de sensores electroquímicos en el análisis de diferentes compuestos, es una alternativa real a los métodos tradicionales, presentando ventajas como la sencillez, el bajo coste de instrumentación, la selectividad y la sensibilidad entre otras, aportando datos fiables rápidamente en diferentes matrices. Si además, se incorporan a estos sensores, materiales como los MIP, el enfoque en el desarrollo de los sensores electroquímicos puede ser revolucionario en el futuro.

Otra perspectiva que se impone en investigaciones futuras son las técnicas quimiométricas. Éstas se presentan como herramientas alternativas a los métodos clásicos de análisis separativos, porque extraen la información sobre los analitos de interés, a partir del tratamiento de datos, sin necesidad de su separación previa, determinando concentraciones relativamente bajas de compuestos, de manera simple, rápida y económica.

Estas consideraciones de futuro, extraídas de la amplia y exhausta revisión bibliográfica del estado del arte en el análisis de flavonoides, son las que han inspirado los objetivos y desarrollo de esta tesis.



Capítulo 4

OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

4.1. OBJETIVOS

Los compuestos polifenólicos son sustancias químicas a las que el ser humano tiene acceso a través de la alimentación, son metabolitos secundarios de las plantas que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y que, por lo tanto, constituyen parte integral de nuestra dieta mediante el consumo de alimentos de dicho origen vegetal, tales como cereales, legumbres, frutas y verduras. Asimismo, bebidas populares como zumos de fruta, té, café, cacao, cerveza y vino son otra fuente habitual de polifenoles en nuestra ingesta diaria. Estas sustancias presentan efectos positivos en salud, manteniendo una relación estrecha entre los alimentos de origen vegetal y la prevención de enfermedades.

De entre el gran número de compuestos fenólicos que existen, los flavonoides ocupan el apartado más importante debido a su abundancia, diversidad y propiedades antioxidantes, considerándose como compuestos bioactivos que actúan como agentes terapéuticos en diferentes problemas de salud. En el caso de los flavan-3-oles, la presencia en la orina de catabolitos de estos compuestos, es decir productos de la degradación metabólica del flavonoide, es utilizado como indicador biológico directo de la entrada de flavanoles en el organismo e indirecto de los demás flavonoides. Diversos estudios han demostrado que estos catabolitos, son marcadores biológicos sensibles y fiables de los niveles de flavonoides consumidos en la dieta, utilizándose para asignar niveles de ingesta de determinados polifenoles individuales, en circunstancias en las cuales es complicado medir directamente dicho polifenol.

Las tendencias actuales en el desarrollo de métodos analíticos, inciden sobre todo en la etapa de preparación de muestra, mejorando los procedimientos clásicos de forma que se facilite la extracción, purificación y preconcentración del analito en muestras complejas, como las muestras biológicas, buscando otras alternativas metodológicas, que minimicen la manipulación, el contacto con los analitos, que empleen volúmenes menores de disolventes y menores tiempos de análisis, reduciendo costes y residuos que presentan una toxicidad considerable y que pueden provocar impactos importantes para el medio ambiente.

Las muestras biológicas presentan una matriz compleja, con baja concentración de los compuestos de interés, además en la mayoría de los casos, las muestras deben ser tratadas previamente a fin de eliminar los compuestos endógenos de la matriz (interferentes), y/o concentrar la muestra, para producir modelos adecuados para su cuantificación y determinación. Esta determinación y cuantificación, en el caso de los catabolitos de flavan-3-oles, se hace complicada por la gran diversidad de compuestos fenólicos que existen y la amplia metabolización que experimentan en el organismo.

Por estas razones, esta Tesis Doctoral tiene como objetivo general el desarrollo de nuevos procedimientos y estrategias analíticas, para la determinación de flavan-3-oles y sus principales catabolitos (biomarcadores), en diferentes matrices biológicas. Este trabajo de investigación propone diferentes métodos, rápidos, simples, fiables y económicos, desarrollando una metodología adecuada para cuantificar diferentes metabolitos fenólicos en la orina, mediante tecnología de impresión molecular, técnicas quimiométricas y técnicas electroquímicas.

Uno de los objetivos será desarrollar un procedimiento para la determinación de los metabolitos de los flavan-3-oles, en muestras de orina aplicando diferentes técnicas quimiométricas, métodos multivariantes de primer y segundo orden (PLS y PARAFAC), aplicadas a las señales fluorescente de los analitos objetos de estudio.

Otro de los objetivos es proponer un procedimiento altamente selectivo para el tratamiento de muestras biológicas, que permita el aislamiento y extracción de los analitos de interés, los catabolitos de los flavan-3-oles, sintetizando nuevos materiales mediante técnicas de impresión molecular, que se utilizaran en procesos de extracción en fase sólida, antes del análisis por HPLC/DAD-MS. EL proceso MISPE deberá permitir el aislamiento y extracción selectiva con altas recuperaciones, mejorando por tanto los límites de detección y cuantificación de las mezclas de estos ácidos fenólicos y otros metabolitos.

Otro de los objetivos será el desarrollo de un sensor electroquímico, para la detección y cuantificación de catabolitos de flavan-3-oles en muestras de orina, posterior a la aplicación del proceso MISPE,

diseñado en este trabajo. Las técnicas electroquímicas, emplean instrumental de bajo coste y fácil uso, además son rápidas y precisas, por lo que la metodología a desarrollar puede ser innovadora en este campo.

4.2. PLAN DE TRABAJO Y EXPOSICIÓN

Las etapas del Plan de Trabajo propuestas para alcanzar los objetivos planteados se encuadran en tres bloques.

Quimiometría

- El estudio de las propiedades luminiscentes de un grupo de catabolitos de flava-3-oles (ácido 4-hidroxifenilacético, ácido siríngico, ácido protocatecuico, ácido 3-hidroxifenilacético, ácido fenilacético y ácido 3-fenilpropiónico).
- Optimización de los parámetros experimentales para la determinación simultánea de los compuestos de interés mencionados, en muestras sintéticas y de orina, aplicando fluorescencia.
- Desarrollo de métodos de análisis, empleando diferentes técnicas quimiométricas de calibración multivariante de primer y segundo orden, a través del estudio de las matrices de emisión/excitación de fluorescencia (EMMs).
- Evaluación de la exactitud y precisión de la metodología desarrollada en este tipo de técnicas, integradas en el ámbito de la determinación de catabolitos de flavan-3-oles en muestras de orina.

Impresión Molecular

- Síntesis de nuevos polímeros de impresión molecular (MIP), específicos para diferentes metabolitos de flavan-3-oles, utilizando 4-HPA como molécula plantilla, para la extracción y el aislamiento de diferentes biomarcadores de la ingesta de compuestos fenólicos.

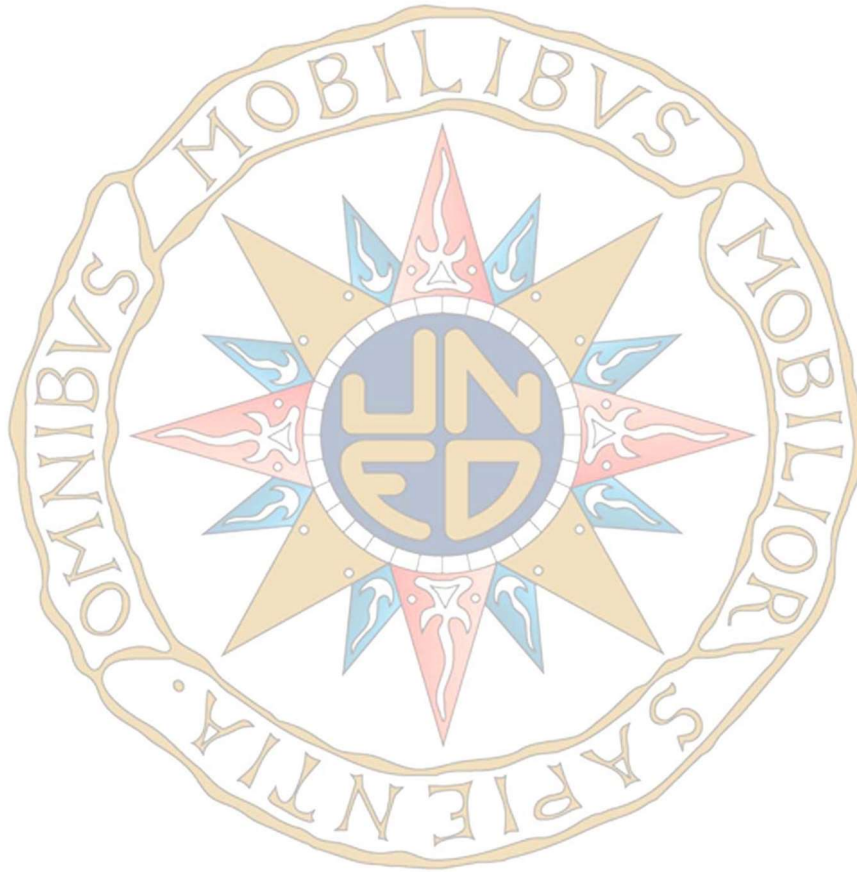
- Caracterización morfológica (SEM y BET), caracterización química (ATR-FTIR) y evaluación de las isothermas de adsorción, y estudios cinéticos de los polímeros impresos y no impresos sintetizados.
- Desarrollo de procedimientos de extracción, utilizando los polímeros de impresión molecular sintetizados como adsorbentes en cartuchos de extracción en fase sólida (MISPE), para la determinación de catabolitos de flavan-3-oles en muestras de orina, empleando como técnica la medida HPLC/DAD-MS.
- Optimización del método cromatográfico, HPLC/DAD-MS para la determinación de catabolitos de flavan-3-oles (ácido 4-hidroxifenilacético, ácido sirínico, ácido protocatecuico, ácido 3-hidroxifenilacético, ácido hipúrico y ácido 4-hidroxibenzoico), en fluidos biológicos.
- Validación de los procedimientos MISPE y cromatográfico desarrollados en muestras de orina, llevando a cabo estudios de linealidad, repetibilidad, reproducibilidad y sensibilidad en las condiciones óptimas, incluyendo diferentes estudios de interferencias.

Electroquímica

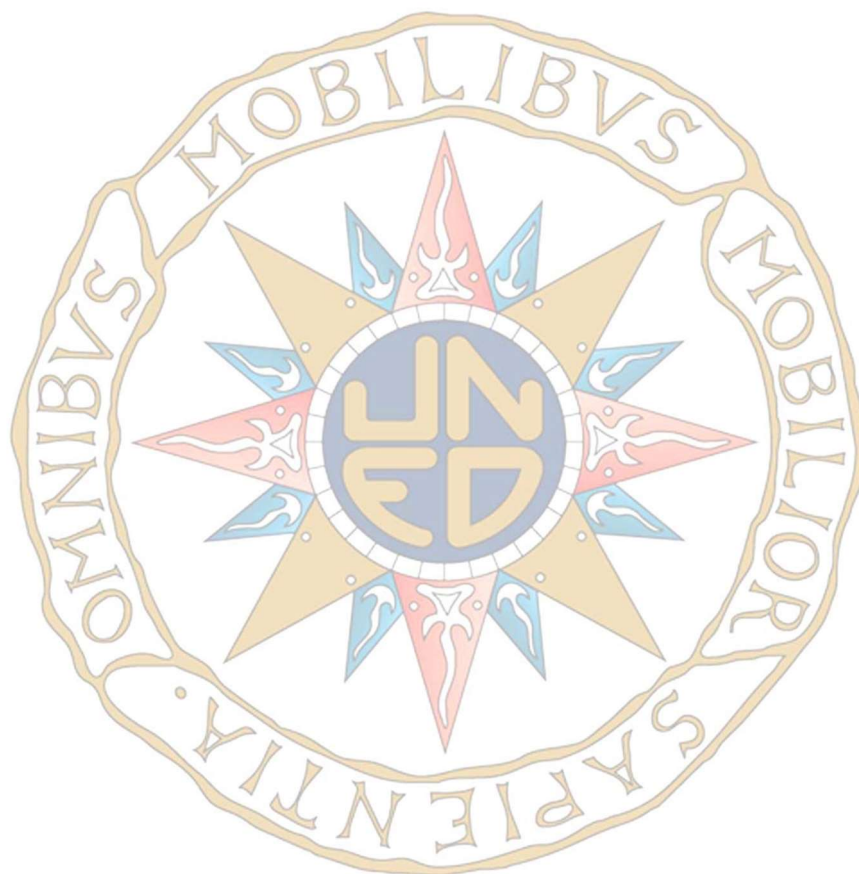
- El estudio de las propiedades electroquímicas de un grupo de los catabolitos de flava-3-oles (ácidos fenólicos).
- Desarrollo de dispositivos analíticos con detección electroquímica, utilizando transductores de carbono, electrodos serigrafiados que aportan grandes ventajas en el desarrollo de sensores.
- Modificación y activación de electrodos serigrafiados comerciales, optimizando las diferentes variables electroquímicas, para emplearlos en la adsorción y cuantificación de catabolitos de flavan-3-oles en muestras de orina.
- Adaptación del proceso MISPE diseñado en este trabajo, para la limpieza y preconcentración de los analitos estudiados en muestras de orina, para después proceder a su detección por métodos voltamperométricos.
- Configuración del sensor electroquímico selectivo para la determinación de diferentes catabolitos de flavan-3-oles (ácido 4-hidroxifenilacético,

ácido siríngico, ácido protocatecuico, ácido 3-hidroxifenilacético y ácido 4-hidroxibenzoico), en muestras biológicas de orina mediante técnicas voltamperométricas.

- Validación del procedimiento electroanalítico (MISPE-AdDPV), desarrollado en muestras de orina, llevando a cabo estudios de linealidad, repetibilidad, reproducibilidad y sensibilidad, comparándolo con el método HPLC-DAD-MS, optimizado.



PARTE EXPERIMENTAL



Capítulo 5

REACTIVOS, MATERIAL, EQUIPOS Y TÉCNICAS

5.1. REACTIVOS, MATERIAL Y DISOLUCIONES

Para la realización de esta Tesis Doctoral se han empleado los siguientes reactivos, materiales e instrumentación:

Reactivos

- Ácido 4-hidroxifenilacético 98%, Sigma-Aldrich (España).
- Ácido 3-hidroxifenilacético 99%, Sigma-Aldrich (España).
- Ácido siríngico >95%, Sigma-Aldrich (España).
- Ácido protocatecuico 99,63%, HWI Analytik (Alemania).
- Ácido hipúrico 98%, Acros Organics (Bélgica).
- Ácido 4-hidroxibenzoico >99%, Acros Organics (Bélgica).
- Ácido fenilacético, 99% Sigma-Aldrich (España).
- Ácido 3-fenilpropiónico, 99% Sigma-Aldrich (España).
- Dimetacrilato de etilenglicol 98% (EDGMA), Sigma-Aldrich (España).
- 2-2-Azo(bis)isobutironitrilo 98% (AIBN), Sigma-Aldrich (España).
- 4-vinilpiridina (4-Vpy), Merck-Schuchardt 95% (Alemania).
- Metanol (MeOH), grado HPLC, Scharlau (España).
- Acetonitrilo (ACN), grado HPLC, Scharlau (España).
- Ácido acético glaciar >99,8%, Scharlau (España).
- Ácido fórmico 98%, Sigma-Aldrich (España).
- Ácido clorhídrico, 37%, Scharlau (España).
- Hidróxido sódico >98,5%, Scharlau (España).
- Dodecilsulfato sódico (SDS), Sigma-Aldrich (España).
- Óxido de grafeno (GO, ref:763705) Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania).
- Dihidrogenofosfato sódico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), Panreac (España).
- Monohidrogenofosfato sódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Panreac (España).

Material

- Columna HPLC Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 x 4,6 mm, 5 μm de tamaño de partícula) Agilent Technologies (España).

- Precolumna Zorbax Eclipse XDB-C18 (12,5 x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de partícula), con relleno XDB-C18 pack Agilent Technologies (España).
- Cubeta espectrofluorimétrica de cuarzo de 1 cm de paso óptico, Perkin Elmer.
- Jeringuillas desechables de 1 y de 5 mL.
- Termómetro de contacto 0-200 °C, Selecta (España).
- Material analítico de laboratorio.
- Micropipetas de émbolo regulable de 0,5-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL y 1-5 mL de volumen, BIOHIT.
- Vasos Green Chem para la extracción asistida por microondas (MAE), Vertex Technics (EEUU).
- Sistema de recogida de muestras de orina.
- Cartucho para SPE de 3 mL de capacidad, Agilent Technologies (España).
- Fritas para cartucho SPE de 3 mL, tamaño de poro de 20 µm, Varian (EEUU).
- Filtros de polipropileno Whatman PPW/GMF con un tamaño de poro de 0,45 µm, Sigma-Aldrich (España).
- Silicona Líquida termorresistente, Scharlau (España).
- Tamices de acero inoxidable de diferentes tamaños de luz.
- Mortero de vidrio, parafilm, papel de filtro, etc.
- Tubos de ensayo y frascos de vidrio blancos y topacio.
- Electrodo comercial de carbono de la marca comercial Metrohm DropSens, denominados por la marca (DRP-110), el electrodo de trabajo y el auxiliar son de carbono, mientras que el electrodo de referencia es de plata, al igual que los contactos eléctricos, Oviedo (Asturias, España).

Disoluciones de trabajo

- Disoluciones patrón en diferentes disolventes (H₂O, ACN y MeOH), de ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 3-hidroxifenilacético y ácido siríngico

de 1000 $\mu\text{g/mL}$, el ácido protocatecuico se preparó de 500 $\mu\text{g/mL}$. Las disoluciones así obtenidas se guardaron a 4 °C en frascos de topacio.

- Las disoluciones de trabajo se prepararon con el estándar comercial de cada patrón en el disolvente seleccionado y en la concentración adecuada. Estas disoluciones eran preparadas frecuentemente, guardadas en frigorífico a 4 °C y conservadas en frascos color ámbar para preservarlas de la fotodegradación.
- Las diluciones de todas las disoluciones patrón se prepararon en diferente concentración (100 mg/L, 50 $\mu\text{g/mL}$ y 4 mg/L), para todos los analitos estudiados en este trabajo.
- Se han preparado múltiples disoluciones de cada uno de los catabolitos de flavan-3-oles estudiados, acordes con la determinación de diferentes parámetros experimentales, algunas concentraciones fueron: 0,06, 0,1, 0,2, 1, 0,6, 0,66, 0,70, 0,75, 2, 3, 3,5 y 7 mg/L.
- Disoluciones concentradas de hidróxido sódico o ácido clorhídrico.
- Las muestras de orina fueron recogidas de niños lactantes y adultos, conservadas en congelación a -21 °C hasta su análisis. Para el caso de los bebés recién nacidos, se ha tenido en cuenta su baja exposición a flavan-3-oles, para considerar estas muestras como blanco del estudio.
- Se han realizado diferentes diluciones de la orina inicial en agua: 2:10; 1.5:10; 1:10; 0.5:10 y 0.1:10 mL respectivamente. Tras este estudio, fijamos como dilución óptima la de 0,1 mL en 10 mL (1:100), seguida de una segunda dilución de 200 μL en 10 mL.
- Se ha preparado 50 mL de blanco de orina, el cual está formado por 0,5 mL de orina centrifugada y filtrada y el resto de agua hasta alcanzar los 50 mL, consiguiendo así la proporción 1:100 (v:v) orina/agua. Esta dilución permite después determinar la concentración de los analitos.
- Disoluciones de dodecilsulfato sódico (SDS), en agua a dos niveles de concentración de este agente tensioactivo, una a 10,4 mM y otra a 17,3 mM.
- Para las isotermas de absorción se han preparado múltiples disoluciones de 4-HPA, 3-HPA, SyA, PCA, HA y 4-HBA, en concentraciones crecientes desde 0,5 a 1000 mg/L.

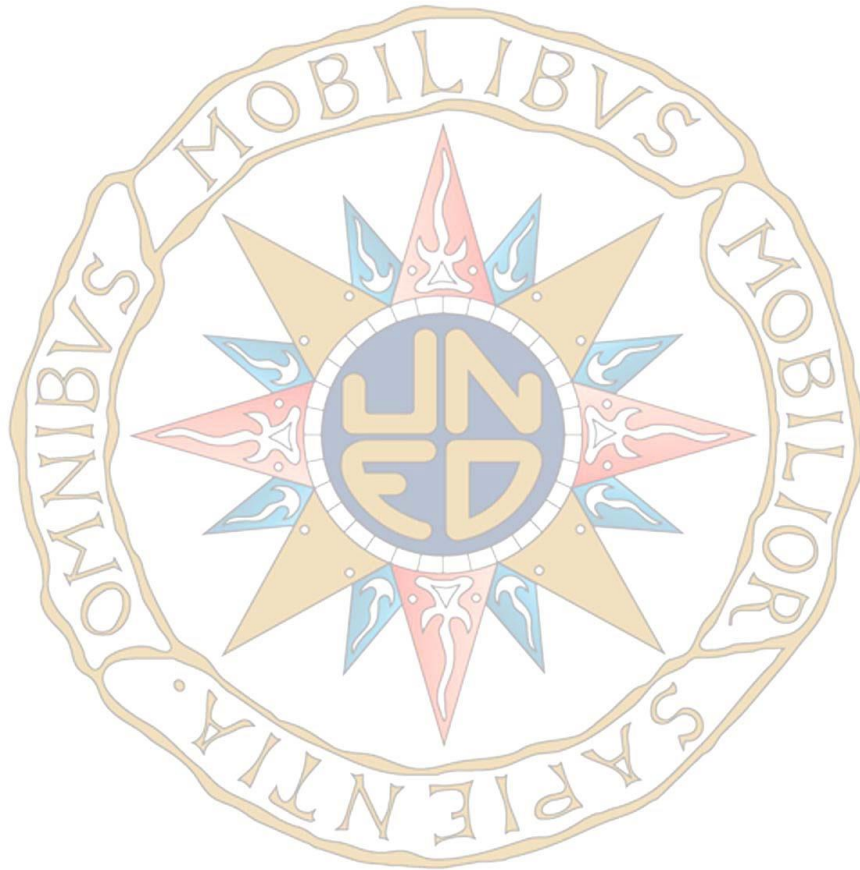
- Disoluciones de cada catabolito en agua y en orina, en diferente concentración, compendiadas entre 0,25 y 100 mg/L.
- Disoluciones formadas por distintas mezclas de disolventes y en diferentes proporciones, por ejemplo: MeOH:AcH, 9:1 (v:v), ACN:Ácido fórmico (99:1,v/v), MeOH/ACN 50:50 (v:v), MeOH/AcH 8:2 (v:v), MeOH-ácido fórmico 1%, ACN/H₂O, MeOH/H₂O, etc.
- Disolución para electroquímica de tampón fosfato a pH=7,2 utilizando dihidrógenofosfato sódico y también monohidrógenofosfato sódico en las proporciones adecuadas.
- Disolución de óxido de grafeno en agua de concentración 4 mg/mL.
- Disolución para modificar el electrodo, formada 1 mL de la disolución de óxido de grafeno con tampón fosfato (pH=7,2), en proporción 1:3 (v:v), alcanzando una concentración aproximada de 1 mg/mL, (750 µL de buffer y 250 µL de grafeno).
- Para AdDPV se han preparado disoluciones madre de 500 mg/L, de PCA, 4-HPA, 3-HPA, SyAc, 4-HBA, HA. A partir de ellas las diluciones de trabajo de cada catabolito en agua, MeOH, ACN y en el disolvente utilizado en la elución del proceso MISPE (ACN-1% de ácido fórmico).
- Preparación de una disolución de 1000 mL tampón Britton-Robinson 0,1M: 6,18 g de ácido bórico 0,04M (H₃BO₃), 5,71 mL de ácido acético glacial 0,04M (CH₃COOH), y 6,75 mL de ácido fosfórico 0,04M (H₃PO₄).
- Se han preparado diferentes disoluciones madre de 500 µM de ácido úrico, en diferentes disolventes (Agua, ACN, MeOH), también en el disolvente el empleado en la elución del proceso MISPE (ACN-1% de ácido fórmico),
- Disoluciones en orina de cada metabolito objeto de estudio: PCA, 4-HPA, 3-HPA, SyAc, 4-HBA y HA, en diferentes concentraciones en función de la técnica electroanalítica a desarrollar (50, 100, 125, 150 y 200 mg/L
- Nuestra muestra de orina preparada para el análisis, contiene las siguientes concentraciones: 200 mg/L de 4-HPA, 50 mg/L de PCA, 150 mg/L de SyA y 200 mg/L de 4-HPA.

5.2. EQUIPOS Y PROGRAMAS INFORMÁTICOS

Para la realización de esta Tesis Doctoral se han empleado los siguientes equipos y programas informáticos:

- Sistemas de purificación de agua (18,2 M Ω /cm), Milli-Q de Millipore Ibérica (España).
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución HPLC serie LC 1200, Agilent Technologies (España), equipado con un compartimento de columna termostaticado, una bomba cuaternaria, un desgasificador de vacío, un módulo de muestras y un inyector automático estándar acoplado a un detector de matriz de diodos en línea (DAD), con un detector de masas con ionización por electrospray (ESI) (serie Agilent 6100 Series Quatropolo LC/MS). El equipo está controlado a través del software Chemstation for LC System (Agilent Technologies).
- Espectrofluorímetro, Perkin Elmer LS 50B (EEUU) controlado por el software FL WinLab.
- Balanza analítica con precisión de 0,1 mg, modelo Mettler AE 200 (España).
- Baño ultrasónico, con control digital de temperatura ($\pm 0,5^{\circ}\text{C}$), Selecta Ultrasons (España).
- Centrifugadora angular 6, Selecta (España).
- Placa calefactora con agitación magnética Agimatic-N, Selecta (España).
- Placa calefactora con sistema de agitación, Ovan (España).
- pH-metro Basic 20, Crison Instruments, (España).
- pH-metro modelo GLP21, con electrodo combinado 50 14 T, Crison.
- Estufa, Selecta (España).
- Sistema de vacío para extracción en fase sólida (SPE) dotado de 20 colectores, Varian Technologies (EEUU).
- Bomba de vacío Vacumm, Selecta (España)
- Horno microondas CEM MARS 5, Vertex Technics (EEUU).
- Microscopio electrónico de barrido (SEM S-3000N), Hitachi, Japón.

- Recubridor por pulverización catódica de Au/Pd (Polaron Range SC7620).
- Microscopio electrónico de barrido (SEM/EDS-EM-30AX), Coxem (Jasco, España).
- Recubridor de iones modelo SPT-20 (Au, Pt, Pd, Cr, Pt-Pd, Cu Ni), (Jasco, España).
- Equipo BET, de adsorción de nitrógeno, Micrometrics ASAP 2020. (Micrometrics Instruments, Norcross, GA, EE. UU).
- Espectrofotómetro FT/IR-4100A, con el accesorio ATR-PRO-ONE (Jasco, España).
- Software OriginPro v. 8.0 de OiginLab Corp. (Northampton, Reino Unido).
- Paquete informático MATLAB R2013a, UNED, Madrid (España).
- Programa de herramientas MVC1, A.C. Olivieri, Rosario (Argentina).
- Interfaz gráfico MVC2, A.C. Olivieri, Rosario (Argentina).
- Programa informático de análisis de calibración de orden cero ACOC, UNEX (España).
- Software Unscrambler X, para la calibración de datos multivariantes, UNED, Madrid (España).
- Lámpara de luz ultravioleta (CN-6T, Vilber Lourmat), Collégien (Francia).
- Potenciostato/galvanostato de un canal (modelo Épsilon Eclipse), West Lafayette, EE. UU.
- Celda para electrólisis (modelo C-3 Cell Stand), West Lafayette, EE. UU.
- Colector de electrodos serigrafiados comerciales, cable flexible DropSens, España.
- Software DigiSim, Simulador de Software para electroquímica, de Épsilon Eclipse, West Lafayette, EE. UU.



Capítulo 6

DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE CATABOLITOS DE FLAVAN-3-OLES UTILIZANDO TÉCNICAS MULTIVARIANTES

6.1. OBJETIVO DEL ESTUDIO

Los métodos de calibración multivariante, permiten obtener información cuantitativa y selectiva a partir de datos poco selectivos, posibilitándose la determinación simultánea de diversos componentes en muestras complejas (Beebe & Kowalski, 1987; Thomas & Haaland, 1990). Esta ventaja, hace disminuir el tratamiento previo de la muestra y que los tiempos de análisis sean más cortos, aspectos ambos de gran importancia en los análisis de rutina o de control sobre gran cantidad de muestras análogas (Carey, Wangen, & Dyke, 1989; Martínez, Saulo, Escobar, & Leao, 2017).

En este trabajo de investigación se propone una metodología rápida, simple, confiable y económica, para cuantificar los metabolitos fenólicos en la orina, como una poderosa herramienta para evaluar la ingesta de polifenoles.

Se seleccionaron cuatro metabolitos fluorescentes de flavan-3-oles: ácido siríngico (SyA), ácido 3-hidroxifenilacético (3-HPA), ácido 4-hidroxifenilacético (4-HPA) y el ácido protocatecuico (PCA) (Tabla 6.1), como compuestos objetivo representativos, llevando a cabo la viabilidad de su determinación en muestras de orina, mediante la utilización de calibración multivariante de primer y segundo orden, a través del estudio de las matrices de emisión/excitación de fluorescencia (EEMs).

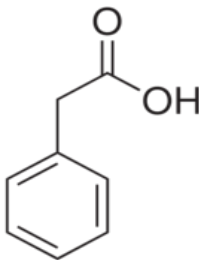
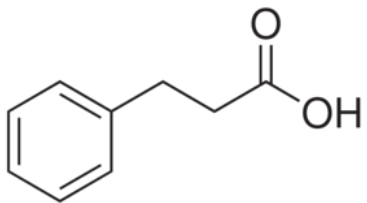
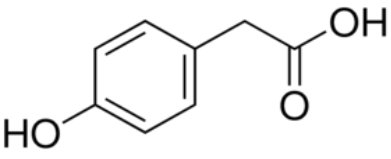
Se han estudiado diversas técnicas multivariantes, siendo PLS y PARAFAC, las más representativas e importantes para nuestro estudio. Con estas técnicas se resuelven dos problemas: la superposición de los espectros de fluorescencia de los catabolitos estudiados, y el gran aumento de intensidad de fluorescencia que se produce cuando se trabaja en muestras reales de orina.

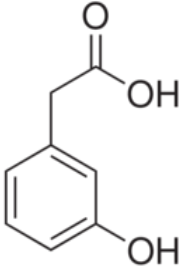
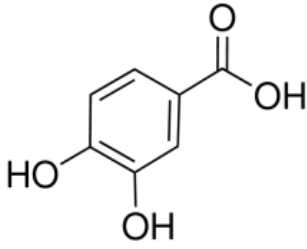
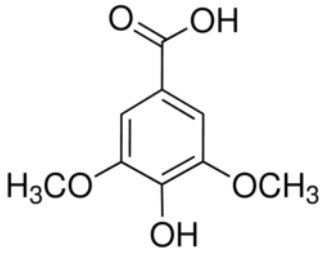
La detección fluorescente ofrece altos niveles de sensibilidad y especificidad, ya que es menos susceptible a las interferencias. Para lograr este objetivo, se revisaron las propiedades luminiscentes de los metabolitos de flavan-3-oles seleccionados, con el objetivo de establecer las condiciones más apropiadas en términos de sensibilidad y estabilidad.

6.2. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES FLUORESCENTES DE DIFERENTES CATABOLITOS DE FLAVAN-3-OLES Y ELECCIÓN DE LOS ANALITOS DE INTERÉS

En base a la bibliografía, se eligen distintos catabolitos de flavan-3-oles para estudiar sus propiedades fluorescentes, Tabla 6.1. La detección de fluorescencia en el análisis de flavonoides, contempla la posibilidad de que no todos los compuestos son adecuados, porque el número de flavonoides que exhiben fluorescencia nativa es limitado (de Rijke et al., 2006). Para ello se estudian los espectros de excitación/emisión de los diferentes analitos.

Tabla 6.1. Compuestos fenólicos, catabolitos de flavan-3-oles estudiados.

Nombre	Estructura
Ácido fenilacético	 <p>The structure shows a benzene ring attached to a methylene group (-CH₂-), which is further attached to an acetic acid group (-COOH).</p>
Ácido 3-fenilpropionico	 <p>The structure shows a benzene ring attached to a propyl chain (-CH₂-CH₂-CH₂-), which ends in a carboxylic acid group (-COOH).</p>
Ácido 4-hidroxifenilacético	 <p>The structure shows a benzene ring with a hydroxyl group (-OH) at the para position relative to a methylene group (-CH₂-), which is attached to an acetic acid group (-COOH).</p>

<p>Ácido 3-hidroxifenilacético</p>	
<p>Ácido protocatecuico</p>	
<p>Ácido siríngico</p>	

Para este ensayo se han preparado disoluciones patrón de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de cada uno de ellos. Las diluciones necesarias, se han elaborado a partir de esta disolución.

Para llevar a cabo la completa disolución de los analitos en los diferentes disolventes utilizados (H_2O , ACN y MeOH), se han sometido todas las disoluciones patrón a ultrasonidos durante 10 minutos.

Se ha estudiado la estabilidad de las disoluciones patrones preparadas, siendo estables durante una semana cuando el disolvente es ACN o MeOH y de cuatro semanas para el caso del H_2O .

Todas las disoluciones patrón se guardan en frigorífico a temperatura de 4 $^{\circ}\text{C}$ y en frascos de color topacio, para evitar su degradación. Las muestras de orina se mantienen congeladas a temperatura de -21 $^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. Después, antes de ser utilizadas para su análisis, tanto las disoluciones patrón como las muestras de orina, se han dejado a oscuridad hasta alcanzar la temperatura ambiente (Malliaris, 1988).

El ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 3-hidroxifenilacético, ácido siríngico y ácido protocatecuíco, presentan características fluorescentes, de tal manera que, aunque las variaciones en la longitud de onda de excitación producen cambios en la intensidad de fluorescencia, el pico de emisión se mantiene en su lugar y no se desplaza de su posición. Esta es una propiedad interesante de los compuestos fluorescentes, que nos ayuda a identificarlos. En la Figura 6.1, se puede observar un ejemplo.

Sin embargo, las pruebas realizadas con el ácido fenilacético, y el ácido hidrocínámico (ácido 3-fenilpropionico), dieron como resultado que ambos compuestos no son fluorescentes. En estos compuestos se observa claramente, como las variaciones en la longitud de onda de excitación, además de producir cambios en la intensidad de fluorescencia, no mantienen ninguna señal de emisión y se observa un gran desplazamiento.

El estudio realizado concluye que, de los seis compuestos estudiados, cuatro son fluorescentes y dos de ellos no lo son.

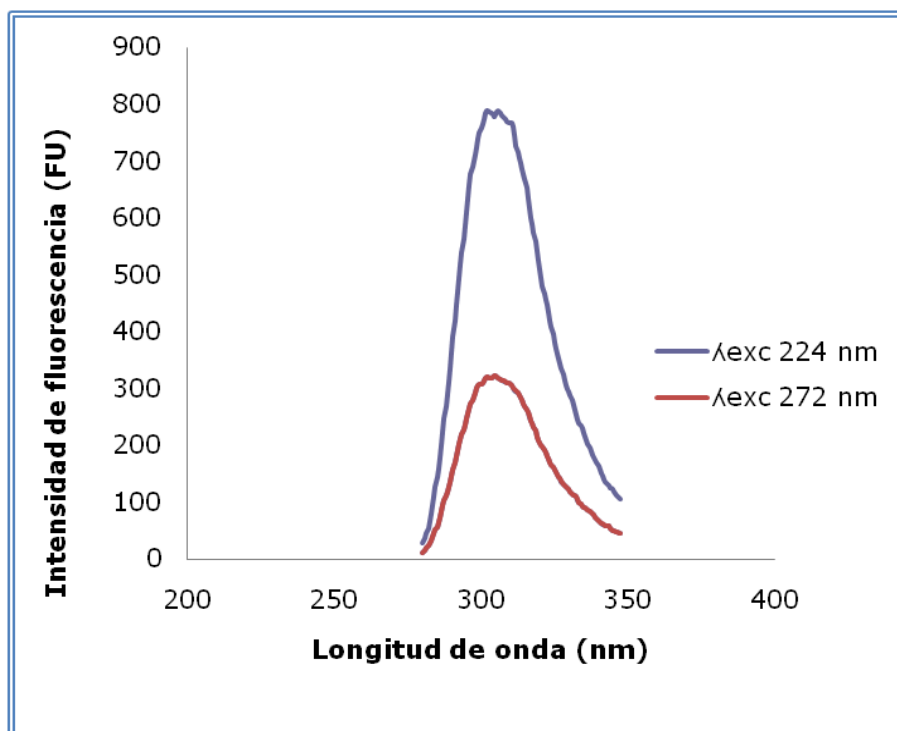


Figura 6.1. Ejemplo de espectros de emisión para el ácido 4-hidroxifenilacético a distintas longitudes de onda de excitación (V=500 V).

Los anteriores estudios han permitido elegir a los cuatro catabolitos fluorescentes objeto de estudio, procediéndose a optimizar las longitudes de ondas para la señal de emisión/excitación.

Así, para el ácido 4-hidroxifenilacético, aparecen dos longitudes de onda de excitación posible (224 y 272 nm), pero se observa una disminución de la señal de emisión con esta última. Se fija por tanto la longitud de onda de excitación en 224 nm. En el espectro de emisión se observa un pico a 306 y otro a 600 nm, aunque este último se descarta debido a su desplazamiento al variar la longitud de onda de excitación. Se fija, por tanto, la longitud de onda de emisión a 306 nm, porque, aunque se varíe la longitud de onda de excitación, vuelve a salir la emisión con menor intensidad a la misma longitud de onda.

El estudio del ácido 3-hidroxifenilacético, revela de una forma muy clara, una sola longitud de onda de excitación (272 nm), aunque existen otras, se observa una fuerte disminución de la señal de emisión. Se fija por tanto la longitud de onda de excitación en 272 nm. En el espectro de emisión se observa un pico a 299 nm y otro a 600 nm, aunque este último, se descarta debido a su desplazamiento al variar la longitud de onda de excitación. Se fija, por tanto, la longitud de onda de emisión a 299 nm, porque, aunque se varíe la longitud de onda de excitación vuelve a salir la emisión con menor intensidad a la misma longitud de onda.

En el estudio del ácido sirínico, aparece de forma muy clara una sola longitud de onda de excitación a (264 nm), aunque existen otras, se observa una fuerte disminución de la señal de emisión. Se fija por tanto la longitud de onda de excitación en 264 nm. En el espectro de emisión, se observa solamente y de manera muy clara un pico a 338 nm. Se fija, por tanto, la longitud de onda de emisión a 338 nm, porque, aunque se varíe la longitud de onda de excitación, vuelve a salir la emisión con menor intensidad a la misma longitud de onda.

Por último, el estudio del ácido protocatecuico, arroja dos longitudes de onda de excitación posibles (253 nm y 286 nm), pero se observa una disminución de la señal de emisión con esta última. Se fija por tanto la longitud de onda de excitación en 253 nm. En el espectro de emisión, se observa un pico a 337 nm y otro a 660 nm, aunque este último se descarta debido a su irregularidad y a que se desliza al variar la

longitud de onda de excitación. Se fija, por tanto, la longitud de onda de emisión a 337 nm, porque, aunque se varíe la longitud de onda de excitación, vuelve a obtenerse la emisión con menor intensidad a la misma longitud de onda.

Los resultados obtenidos en este estudio, nos han servido para poder determinar las longitudes de onda emisión/excitación más adecuadas de cada compuesto, las cuales se resumen en la Tabla 6.2.

Tabla 6.2. Longitudes de onda emisión/excitación más adecuadas para cada compuesto estudiado.

Catabolito flavan-3-oles	λ excitación (nm)	λ emisión (nm)
Ácido 4-hidroxifenilacético (4-HPA)	224	306
Ácido 3-hidroxifenilacético (3-HPA)	272	299
Ácido sirínico (SyA)	264	338
Ácido protocatecuico (PCA)	253	337

6.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE MEDIDA Y VARIABLES QUÍMICAS

Las señales fluorescentes presentan gran sensibilidad, lo cual implica que están muy condicionadas por diversos factores, los cuales se deben optimizar antes de comenzar el análisis de las muestras (Vovk, Simonovska, Andrenšek, Vuorela, & Vuorela, 2003). Algunos de estos factores son la concentración, el pH, la presencia de agentes surfactantes en el medio, la irradiación UV, la luz, la temperatura, el disolvente, la presencia de otras sustancias fluorescentes en el medio de trabajo, la longitud de onda emisión/excitación, entre otros (de Rijke et al., 2006; Fan, Ding, & Gu, 2007).

6.3.1. Estudio del efecto del pH en la intensidad de la señal

A partir de las disoluciones acuosas concentradas (1000 $\mu\text{g/mL}$), se preparó una disolución diluida para cada uno de los analitos, de forma que la concentración en la disolución final fuese de 0,75 mg/L para el 4-HPA, 0,70 mg/L para 3-HPA, 3 mg/L para SyA, y 2 mg/L para PCA.

Para la disolución así preparada de ácido 4-hidroxifenilacético, el pH inicial de la disolución era de 6,8 y se fue modificando, mediante la adición de pequeños volúmenes de disoluciones concentradas de hidróxido sódico o ácido clorhídrico.

En el siguiente gráfico, Figura 6.2, se pueden ver los espectros de excitación y emisión, para una disolución de ácido 4-hidroxifenilacético a diferentes valores de pH y dos longitudes de onda de excitación: 224 nm y 272 nm.

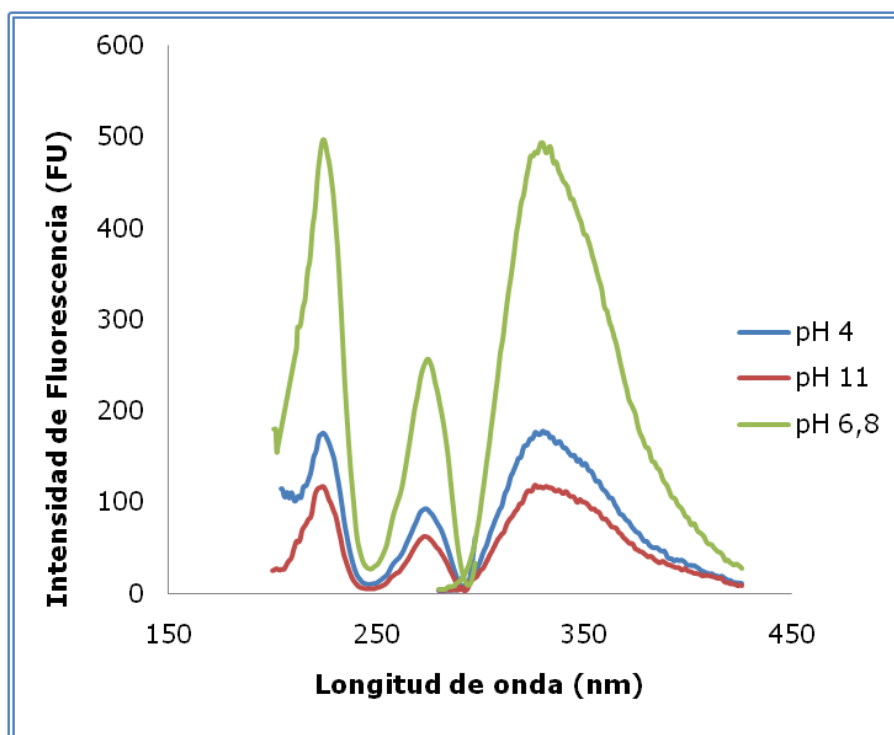


Figura 6.2. Espectros de excitación y emisión de disoluciones acuosas de ácido 4-hidroxifenilacético a diferentes pH.

El espectro de emisión de la Figura 6.2, se ha realizado priorizando la longitud de onda de excitación a 224 nm, debido a su mayor señal, aunque para futuros estudios, no se debe de olvidar la posibilidad de utilizar 272 nm como longitud de onda de excitación.

Como se puede observar en la figura anterior, además de producirse una variación de la intensidad de fluorescencia al modificar la acidez del medio, también se produce un cambio en la forma de los espectros. Se puede comprobar que, a pH bajos o ácidos y a pH altos o básicos, se produce un notable descenso de la señal fluorescente. El estudio realizado confirma, que las variaciones de pH afectan a la intensidad de la señal fluorescente, encontrando las mejores señales desde pH 6 hasta pH 9, tal y como se puede observar en la Figura 6.3.

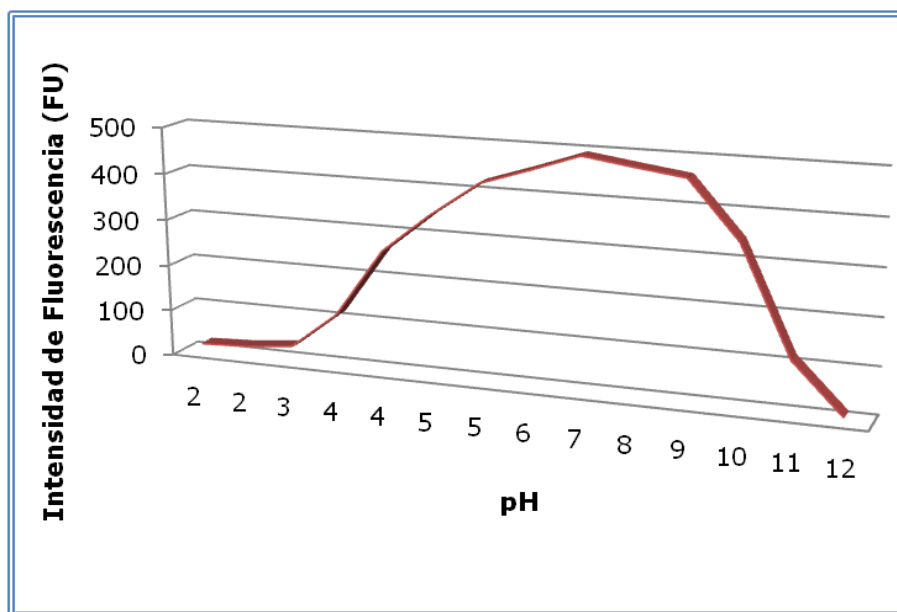


Figura 6.3. Espectro de emisión para el ácido 4-hidroxifenilacético a diferentes valores de pH, manteniendo la misma longitud de onda de excitación ($\lambda_{exc}=224nm$) y la misma concentración (0,75 mg/L).

Se observa claramente, que el mejor resultado en el valor de la intensidad de fluorescencia se produce a pH entre 6 y 7, ya que, evitando los extremos, se evita que se puedan producir variaciones en la morfología de los espectros y en las intensidades de estos. El valor de pH para el

catabolito 4-HPA en agua, sin realizar ninguna modificación se sitúa en 6,8, por lo que se elige este pH como óptimo.

De igual forma se realiza el estudio de pH para los diferentes analitos.

En la Figura 6.4 y 6.5, se representan las variaciones del espectro para el ácido 3-hidroxifenilacético.

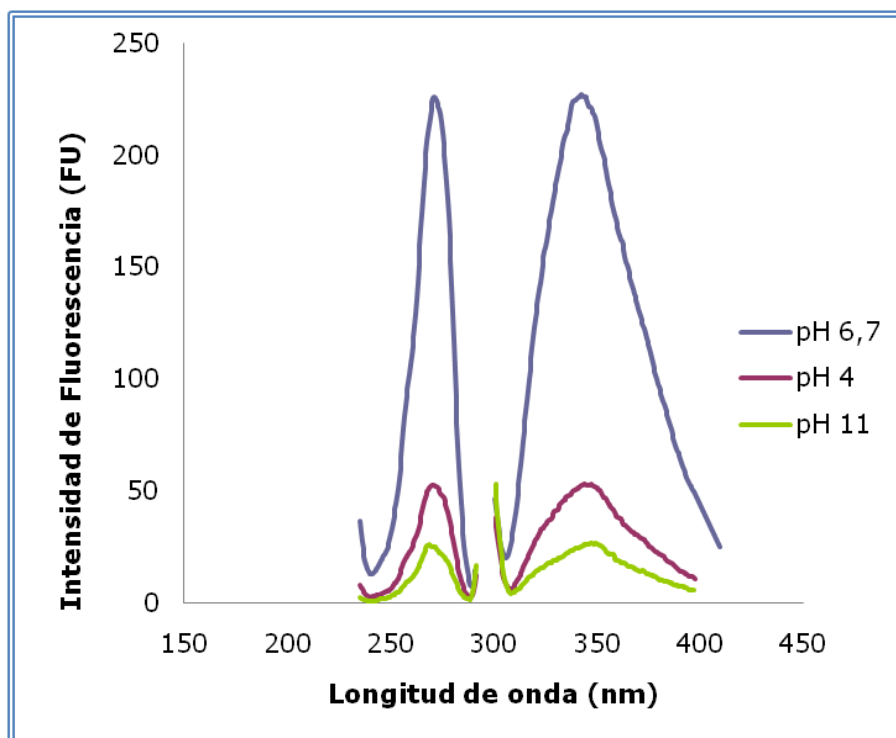


Figura 6.4. Espectros de excitación y emisión de disoluciones acuosas de ácido 3-hidroxifenilacético a diferentes pH.

Se puede observar en la Figura 6.4, como el máximo de excitación, que aparece sobre los 270 nm, permanece prácticamente constante para los tres valores de pH representados. En cuanto a los espectros de emisión, se observa que, a valores de pH básicos y ácidos, se produce una disminución de la intensidad de fluorescencia, con respecto a lo observado en medio neutro, siendo los valores de pH comprendidos entre 6 y 7, donde se produce una mayor señal fluorescente. Para el 3-HPA, se observa una variación en la intensidad de las señales, tanto a pH ácido,

como básico y, además, solo una longitud de onda de excitación, situada a 272 nm.

En la Figura 6.5, se representa la evolución de la intensidad de fluorescencia para los diferentes valores de pH ensayados, todos a 0,70 mg/L de concentración y a longitud de onda ($\lambda_{exc}=272\text{nm}$).

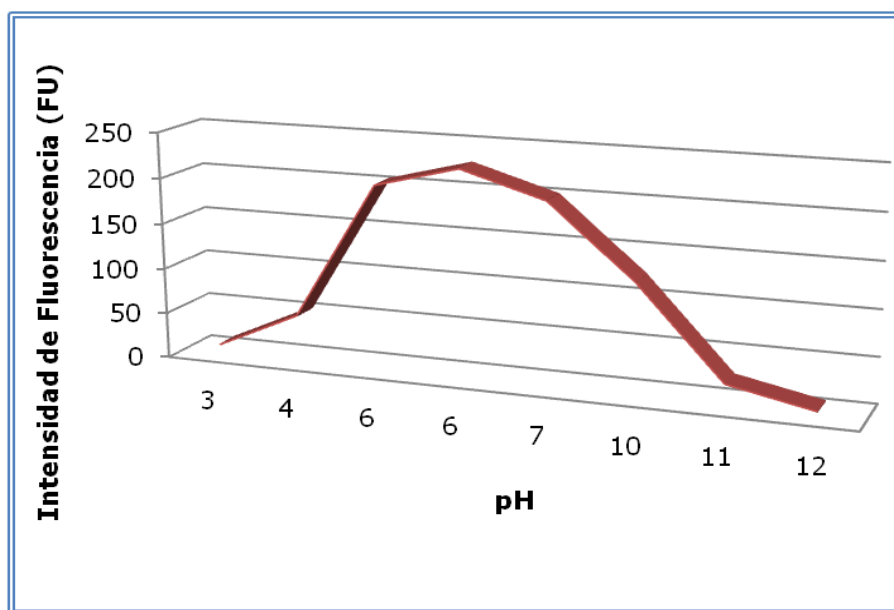


Figura 6.5. Evolución de la fluorescencia con el pH. Espectro de emisión para ácido 3-hidroxifenilacético a diferentes valores de pH, manteniendo la misma longitud de onda de excitación ($\lambda_{exc}=272\text{nm}$) y la misma concentración (0,70 mg/L).

A la vista de la Figura anterior, se puede observar que el mejor resultado en el valor de la intensidad de fluorescencia se produce entre pH 6 y 7. Inicialmente la disolución de 3-HPA presenta un pH de 6,7, por lo que se toma éste como pH óptimo.

Para el ácido siríngico, a partir de la disolución concentrada en agua, se preparó una disolución diluida, de forma que la concentración en la disolución final fuese de 3 mg/L. El pH se fue modificando, mediante la adición de pequeños volúmenes de disoluciones concentradas de hidróxido sódico o ácido clorhídrico.

En la Figura 6.6, se observa la morfología de los espectros de emisión y excitación del ácido sirínico, para tres grados de pH, ácido, neutro y básico, con concentración 3 mg/L.

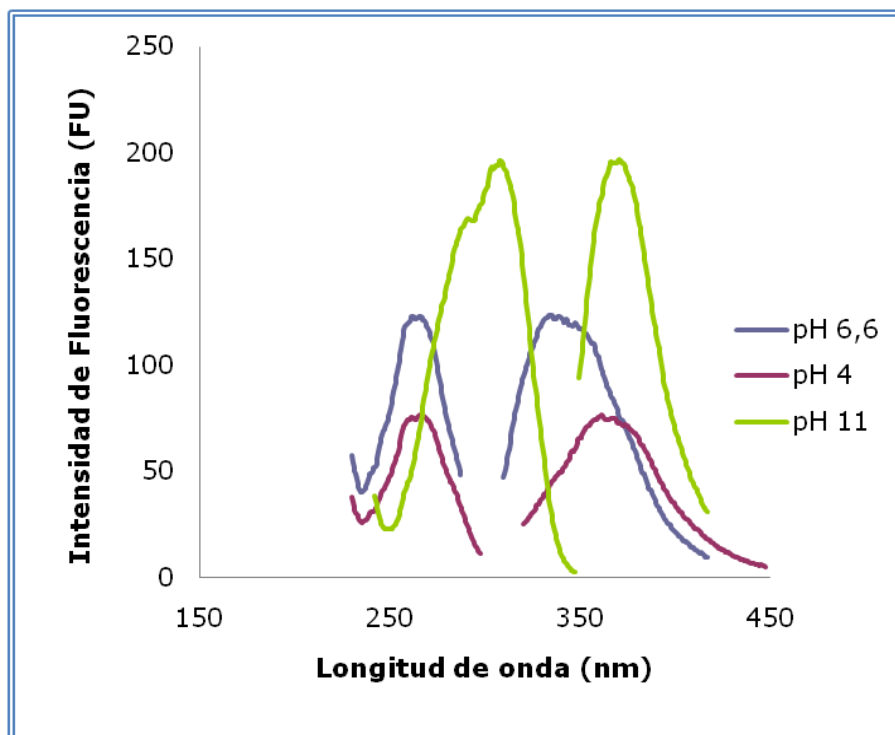


Figura 6.6. Espectros de excitación y emisión de disoluciones acuosas de ácido sirínico a diferentes valores de pH.

Como se observa, en este caso no sólo se produce una variación en la intensidad de las señales, sino que, además, tanto a pH ácido, como básico, se produce un desplazamiento hipsocrómico con respecto al medio neutro. Este compuesto en medio ácido produce un descenso de la señal fluorescente, mientras que en medios alcalinos se produce todo lo contrario, mejorando la intensidad de la señal, por tanto, a priori, el SyA produce mejores señales a pH básicos.

En la Figura 6.7, se representa la evolución de la intensidad de fluorescencia, para los diferentes valores de pH ensayados, manteniendo la concentración en 3 mg/L, y la longitud de onda ($\lambda_{exc}=264nm$).

Para el ácido siríngico se observan dos mesetas, la primera comprendida entre los valores de pH 2 y 4, y una segunda meseta entre los valores de 5 y 9, de mayor intensidad.

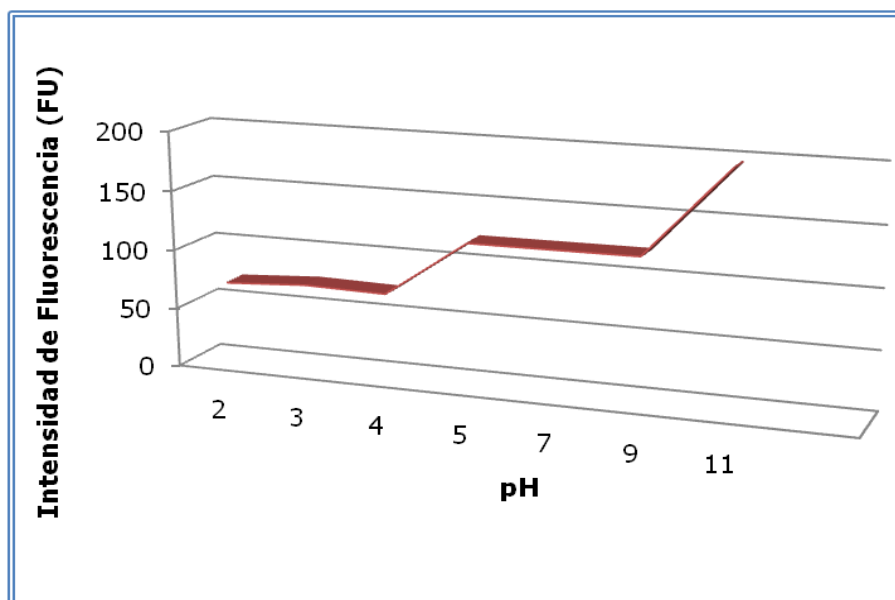


Figura 6.7. Evolución de la fluorescencia con el pH. Espectro de emisión para ácido siríngico a diferentes valores de pH, manteniendo la misma longitud de onda de excitación ($\lambda_{exc}=264$ nm) y la misma concentración (3 mg/L).

En la figura anterior, se observa que el mejor resultado en el valor de la intensidad de fluorescencia se produce con cambios a pH básico, con valores de acidez próximos a once, aunque el principal problema de estos pH básicos es el desplazamiento que se produce en las longitudes de onda emisión/excitación, pasando de 338 a 370 nm y de 264 a 272 nm respectivamente.

Para finalizar, a partir de una disolución acuosa concentrada de ácido protocatecuíco (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se preparó una disolución diluida, de forma que la concentración en la disolución final fuese de 2 mg/L. En la Figura 6.8, se observa la morfología de los espectros de emisión y excitación del PCA, para tres valores de pH, ácido, neutro y básico, con concentración 2 mg/L.

Como se puede observar en la siguiente figura, además de producirse una variación de la intensidad de fluorescencia, al modificar la

acidez del medio, también se produce un cambio en la forma de los espectros.

Este compuesto en medio ácido produce un descenso muy marcado de la señal fluorescente, mientras que en medios alcalinos se produce todo lo contrario, mejorando la intensidad de la señal.

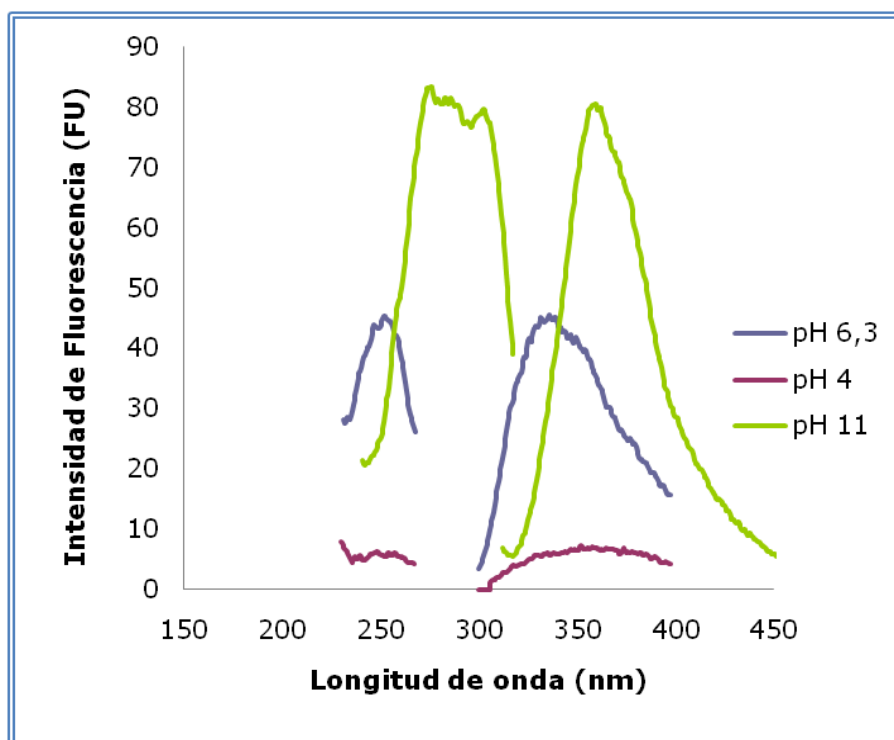


Figura 6.8. Espectros de excitación y emisión de disoluciones acuosas de ácido protocatecuico a diferentes valores de pH.

Al igual que en el caso del SyA, no sólo se puede observar una variación en la intensidad de las señales, sino que, además, tanto a pH ácidos como básicos, se produce un desplazamiento hipsocrómico con respecto al medio neutro. Además, se observa que los medios ácidos y básicos producen picos deformados.

Este estudio realizado, confirma que las variaciones de pH afectan a la intensidad de la señal fluorescente, encontrando las mejores señales a pH básico. En la Figura 6.9, se representa la evolución de la intensidad de fluorescencia, para los diferentes valores de pH ensayados. Las condiciones experimentales son idénticas a las indicadas anteriormente.

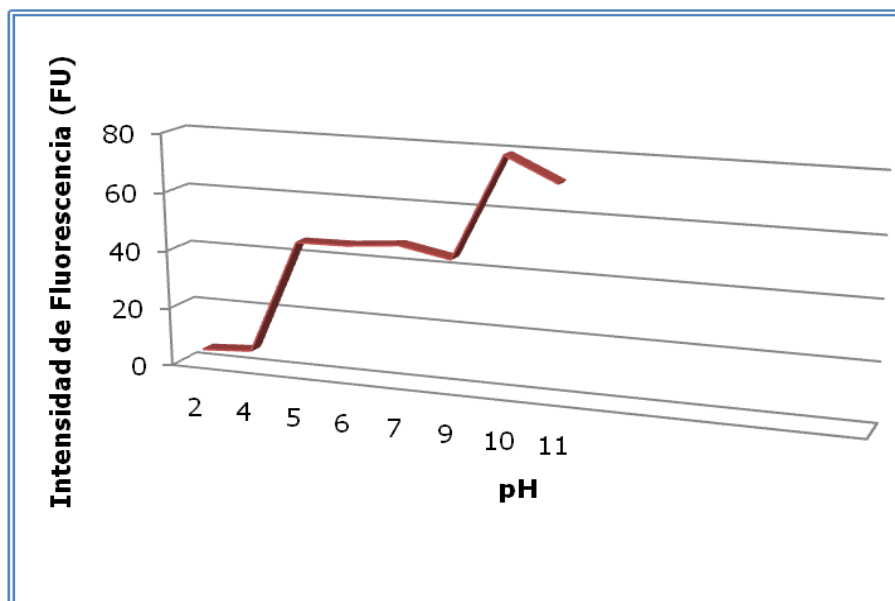


Figura 6.9. Evolución de la fluorescencia con el pH. Espectro de emisión para ácido protocatecúico a diferentes valores de pH, manteniendo la misma longitud de onda de excitación ($\lambda_{exc}=253$ nm) y la misma concentración (2 mg/L).

En el estudio realizado para el PCA, se observa una meseta comprendida entre los valores de pH 5 y 9, y un valor de máxima intensidad para valores de pH más básicos, en concreto, los mejores datos para la intensidad de fluorescencia, se obtienen para valores de pH próximos a 10. El problema de estos pH básicos, es el desplazamiento que se produce en las longitudes de onda emisión/excitación, pasando de 337 a 357 nm y de 253 a 275 nm respectivamente.

Para resumir este estudio, se ha realizado la Tabla 6.3, donde inicialmente se proponen dos posibles valores de pH, un valor neutro en torno a 6-7, y un valor más básico en torno a 11. Para determinar cuál es el adecuado, se registraron los correspondientes espectros para cada uno de los analitos, y como consecuencia de este estudio, se llega a la conclusión de que a valores de pH 6-7, es donde existe menor grado de solapamiento y menor desplazamiento de las longitudes de onda emisión/excitación, por tanto, se evitan variaciones en la morfología de los espectros y en las intensidades de estos.

Tabla 6.3. Estudio del pH más adecuado para cada compuesto estudiado.

Compuesto (Catabolito flavan-3-oles)	Concentración mg/L	λ excitación nm	pH
Ácido 4-hidroxifenilacético (4-HPA)	0,75	224	6,8
Ácido 3-hidroxifenilacético (3-HPA)	0,70	272	6,7
Ácido siríngico (SyA)	3,0	264	11
Ácido protocatecuíco (PCA)	2,0	253	10

Se observa que los metabolitos que presentan mayor grado de solapamiento son, el ácido 3-hidroxifenilacético y el ácido 4-hidroxifenilacético. Existe una longitud de onda de excitación que puede ser utilizada para excitar simultáneamente a tres catabolitos, como solución de compromiso, que es $\lambda = 272$ nm. Los máximos de emisión, se encuentran en torno a 300 nm para el ácido 3-hidroxifenilacético y ácido 4-hidroxifenilacético. Para el ácido siríngico se sitúa en 332 nm y para el protocatecuíco en 320 nm.

Aunque a pH 11 las señales aparecen más intensas para dos de los cuatro catabolitos estudiados, es a pH 6-7 donde todos presentan señales bastante buenas, con menor solapamiento, lo que nos proporciona una mejor resolución para la determinación de los cuatro catabolitos.

Las conclusiones alcanzadas en este punto son las siguientes: debido a que las señales sin modificar el pH son bastante buenas en los cuatro compuestos, teniendo en cuenta el gran descenso que se produce en el 4-HPA y en el 3-HPA, con las pequeñas modificaciones de pH, y el desplazamiento de longitudes de onda en el ácido siríngico y en ácido protocatecuíco, se concluyó trabajar sin realizar cambios en el pH. Se establece utilizar el pH del agua, y no usar ninguna variación de pH ni disoluciones tampón, para los posteriores estudios.

6.3.2. Estudio del efecto de la irradiación externa en la intensidad de cada compuesto

Se estudió el efecto que produce en la fluorescencia, la irradiación de la muestra con una fuente externa de radiación UV. Se prepararon tres disoluciones diluidas a diferente concentración: 0,1, 1 y 2 mg/L de cada catabolito en agua: 4-HPA, 3-HPA, SyA y PCA, después una disolución de cada concentración fue sometida a exposición a irradiación externa durante 10 minutos. Los resultados para el 4-HPA, 3-HPA y PCA fueron los mismos, es decir, se aprecia que la irradiación externa, no produce un mejor valor de la intensidad de fluorescencia. Sin embargo, para el SyA, la exposición a una radiación externa procedente de una lámpara de UV, produce un incremento de la señal fluorescente, registrando posteriormente los correspondientes espectros de excitación y emisión, Figura 6.10, con resultados más favorables con la concentración más alta.

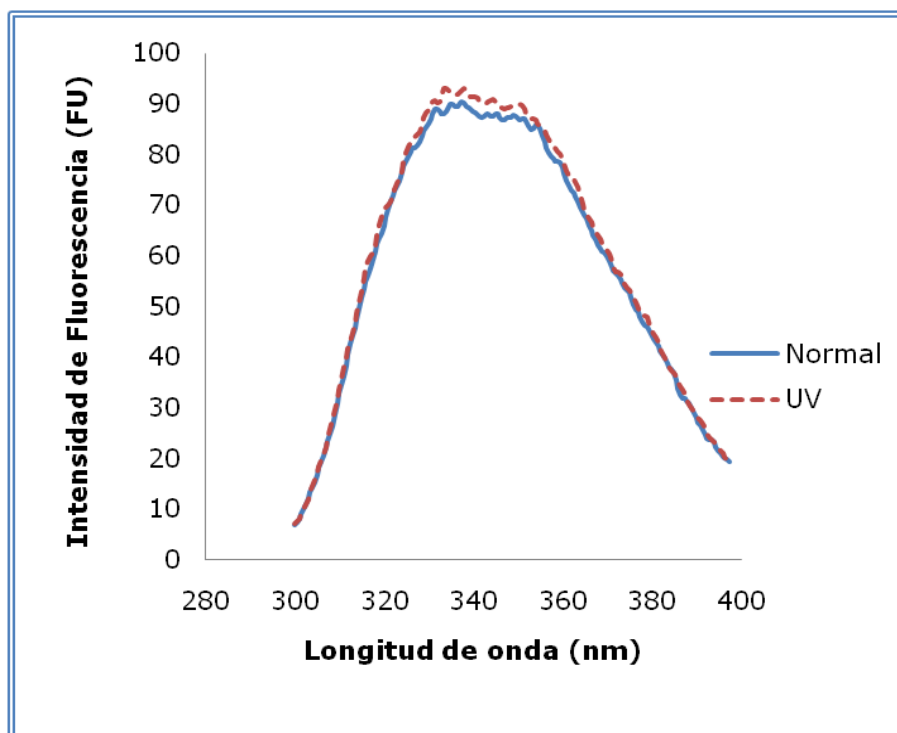


Figura 6.10. Espectro de emisión para el ácido siríntrico, con y sin exposición a la luz ultravioleta, manteniendo la misma longitud de onda de excitación ($\lambda_{exc}=272$ nm) y la misma concentración (2 mg/L).

Usando radiación ultravioleta, se puede observar en la figura anterior un aumento en la señal de fluorescencia de un 3% aproximadamente. Dado que se produce este incremento de la sensibilidad, se pasó a estudiar la influencia del tiempo de irradiación, para de este modo fijar el tiempo de irradiación adecuado, tanto en presencia como en ausencia de SDS. Los resultados obtenidos muestran que no se logra alcanzar una meseta en tiempos cortos. Para hacer esta experiencia se prepararon dos disoluciones de 2 mg/L de ácido sirínico, una en presencia de SDS en concentración 10 mM y otra en ausencia de SDS. Fueron irradiadas cada una durante 10 minutos en intervalos de 5 minutos, registrándose los correspondientes espectros de emisión fluorescente, observándose de nuevo un pequeño aumento de la fluorescencia.

6.3.3. Otros estudios de optimización

Se ha realizado un estudio sobre la estabilidad de las disoluciones patrones y diluidas de cada compuesto, con la presencia de luz y temperatura, procediendo de la siguiente manera: tanto las disoluciones patrón de cada uno de los flavan-3-oles estudiados, como las disoluciones llevadas a cabo en este procedimiento, se han guardado en frigorífico a temperatura de 4 °C y en frascos de color topacio para evitar su posible degradación. Después, antes de ser utilizadas para su análisis, se han dejado a oscuridad hasta alcanzar la temperatura ambiente (Malliaris, 1988).

El trabajo, por tanto, deberá llevarse a cabo en frío y oscuridad. Hay que señalar que todos los catabolitos fluorescentes estudiados, tenían el mismo comportamiento ante las situaciones planteadas. En la Figura 6.11, se representa la evolución de la intensidad de fluorescencia, en base a estos parámetros, utilizando como ejemplo el ácido 4-hidroxifenilacético.

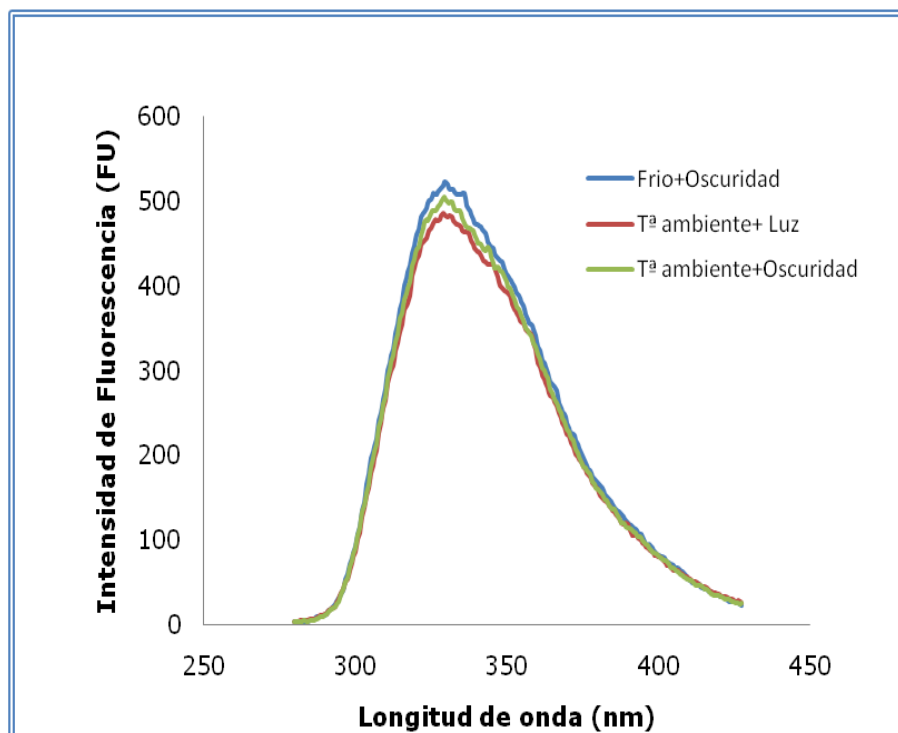


Figura 6.11. Espectro de emisión de los catabolitos de flavan-3-oles fluorescentes estudiados en este trabajo, teniendo en cuenta la presencia de luz y la temperatura y manteniendo la misma concentración.

Otro estudio que se ha realizado, consiste en determinar el comportamiento fluorescente de los catabolitos de flavan-3-oles frente a diferentes disolventes. Se procedió a registrar espectros de excitación y emisión fluorescentes en agua, acetonitrilo y metanol, encontrando comportamientos similares para todos los compuestos estudiados. En la Figura 6.12, se representa la evolución de la intensidad de fluorescencia, con diferentes disolventes, utilizando como ejemplo el ácido 4-hidroxifenilacético.

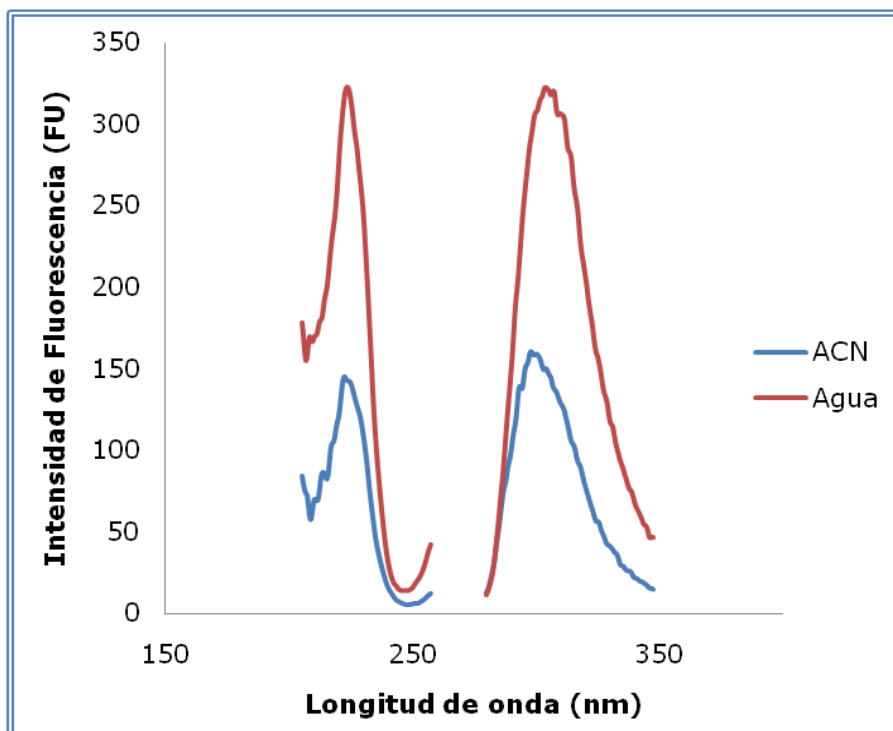


Figura 6.12. Espectros de emisión y excitación del ácido 4-hidroxifenilacético, en diferentes disolventes.

Como se puede observar, es en agua donde la especie presenta mayor señal fluorescente. En ACN, se tiene una señal similar en cuanto a los máximos de excitación y emisión, pero menos intensa que en medio acuoso, de tal manera que en ACN, se tendría que incrementar la concentración dos veces más, que en agua, para tener una señal considerablemente parecida, Figura 6.13. Cuando el estudio se realiza sobre el 3-HPA, se producen idénticos resultados.

Cuando los analitos son SyA y PCA, se observa mayor señal fluorescente en ACN que en agua, esto quiere decir que estos catabolitos son más sensibles en acetonitrilo. La razón de esta diferencia respecto a los compuestos anteriores, radica en que el ácido siríngico y el ácido protocatecuíco presenta en agua una mayor insolubilidad.

También se realizaron estudios con metanol, pero se comprobó que en este medio todos los catabolitos de flavan-3-oles estudiados, apenas presenta fluorescencia (Benosmane, Boutemeur, Hamdi, Hamdi, & Silva, 2017).

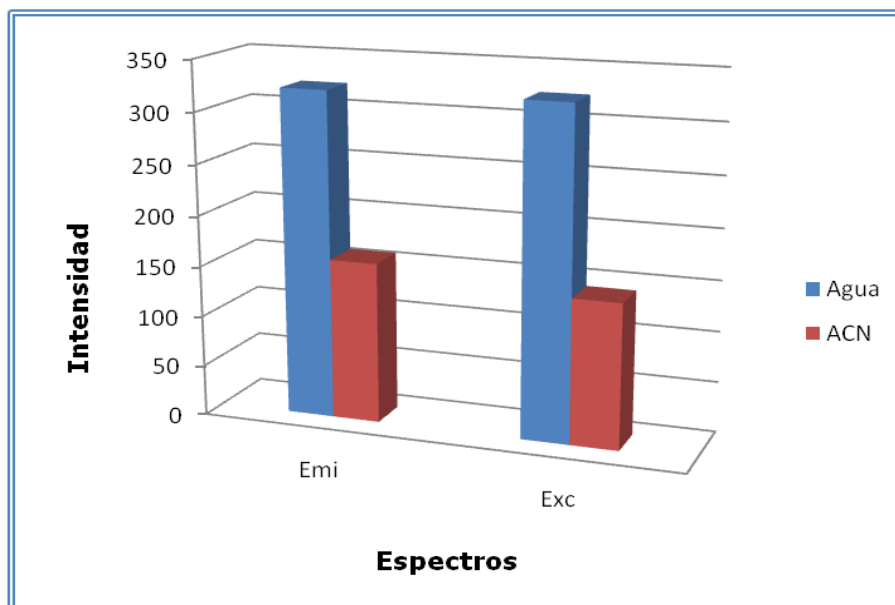


Figura 6.13. Incremento de señal producido en el ácido 4-hidroxifenilacético, utilizando diferentes disolventes. Concentración 100 µg/L.

Para cada disolvente, se realizó también un estudio de la estabilidad de las disoluciones diluidas, comprobándose que en agua es donde presentan una estabilidad mayor, siendo ésta de alrededor de 4 semanas.

Aunque el ácido sirínigico y el ácido protocatecuíco, son más solubles en ACN, en agua presentan mayor estabilidad y por tanto, se decide utilizar agua para preparar las disoluciones concentradas y a partir de éstas preparar las disoluciones de trabajo. Otra razón determinante, por la cual se ha decidido utilizar agua, se debe al desplazamiento de las longitudes de onda de excitación y emisión al usar ACN como disolvente: de 264 a 272 nm (excitación), de 338 a 332 nm (emisión), para el SyA y de 253 a 258 nm (excitación), de 337 a 346 nm (emisión), para PCA.

Para completar nuestro proceso de optimización, se ha realizado un estudio del comportamiento fluorescente de los catabolitos de flavan-3-oles, al añadir un agente surfactante como el dodecil-sulfato sódico (SDS). El SDS en medio acuoso presenta una concentración micelar crítica de 8,1 mM. Para llevar a cabo los ensayos, se han preparado disoluciones de 20 mg/L de cada uno de los cuatro catabolitos estudiados, a partir de

patrones de 100 mg/L, necesitando 5 minutos de ultrasonidos para disolver completamente las muestras. A continuación, se registran espectros de excitación y emisión fluorescentes en presencia de SDS, encontrando comportamientos similares para todos los compuestos estudiados. En la Figura 6.14, se representa la evolución de la intensidad de fluorescencia, en ausencia de surfactante y en presencia de este, utilizando como ejemplo el 4-HPA.

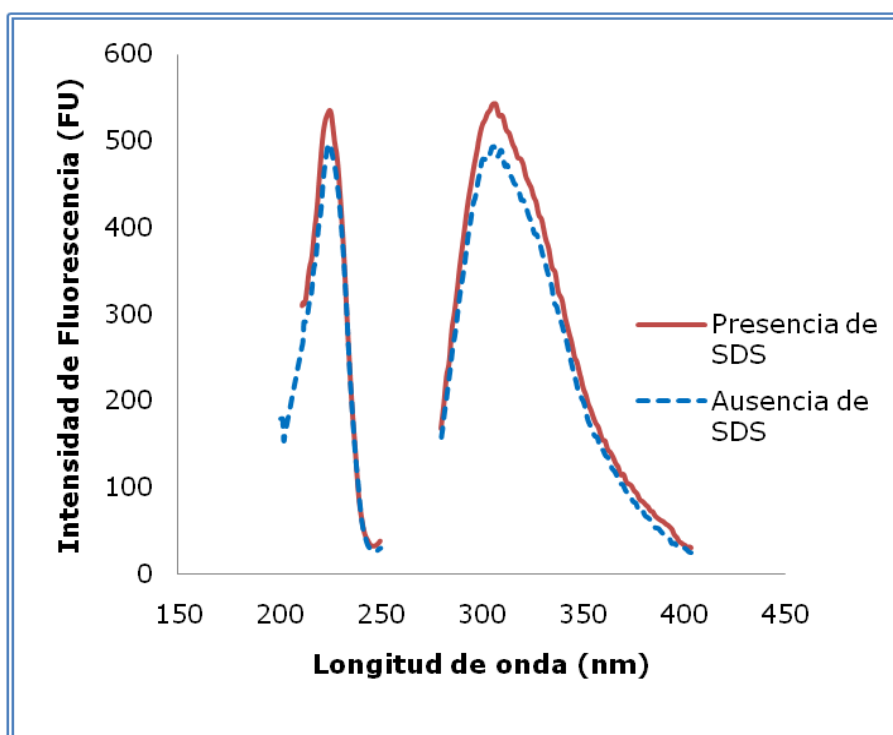


Figura 6.14. Ácido 4-hidroxifenilacético, en presencia y ausencia del agente surfactante, SDS. [NOR]=0,75 mg/L. [SDS]=10,4 mM. (λ_{exc} = 224 nm y λ_{emi} = 306 nm) V=500 V.

En presencia de SDS, para 4-HPA se observó un pequeño incremento de la señal de fluorescencia. Para 3-HPA, SyA y PCA, la fluorescencia se ve incrementada de forma poco importante. En cuanto a la forma de los espectros, no se observa ningún desplazamiento hipsocrómico del máximo de emisión, aunque si se observa un pequeño incremento en el ruido de la señal.

Cuando se determinó la influencia de la concentración de SDS sobre la intensidad de fluorescencia, como se observa en la Figura 6.15, se vio que a medida que se incrementa la concentración de tensioactivo, se produce un incremento de la señal, hasta llegar a un valor de concentración de SDS, superior a la concentración micelar crítica CMC, y a partir del cual la fluorescencia disminuye para los catabolitos 4-HPA y 3-HPA, sin embargo para SyA y PCA la fluorescencia aumenta ligeramente.

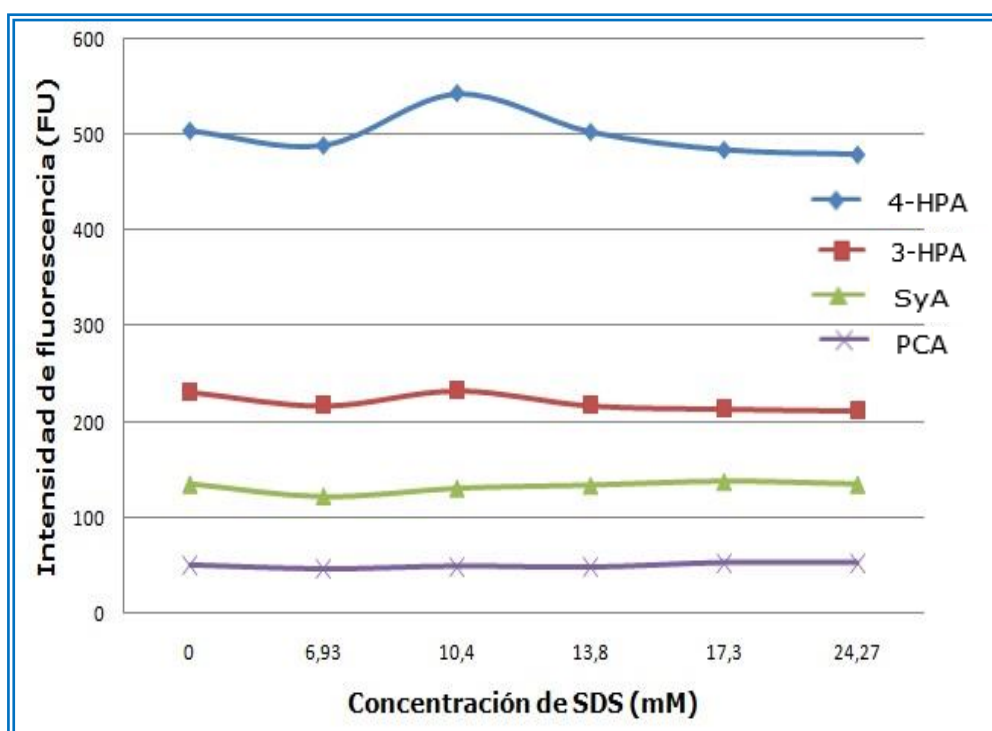


Figura 6.15. Influencia de la concentración de SDS sobre la fluorescencia, para catabolitos de flavan-3-oles. [NOR]=2 mg/L, V=500 V.

El aumento en la fluorescencia observado para los 4 catabolitos no es uniforme, cuando se trabaja con disoluciones en las que se fija la concentración de agente tensioactivo entre 10,4 y 17,3 mM, se producen pérdidas y ganancias en las señales fluorescentes. Se decide al no encontrar una concentración común para los cuatro catabolitos objeto de estudio, trabajar en ausencia de SDS (Malliaris, 1988).

6.4. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS INSTRUMENTALES

En vista de todos los datos anteriores, se elige la longitud de onda de excitación de compromiso de 272 nm, fijando el potencial del detector en un valor de 500 V y las rendijas de los monocromadores en 10 nm para excitación y emisión.

Por otra parte, antes de comenzar a realizar un estudio detallado del análisis simultáneo de los cuatro flavan-3-oles, se analizó el comportamiento de cada uno de ellos por separado, utilizando las condiciones fijadas anteriormente. Es decir, se trabajará con disoluciones acuosas, en las que no se modificará el pH del medio y además se trabajará en ausencia de agentes surfactantes. La longitud de onda de excitación será de 224 nm o 272 nm y el potencial del detector quedará fijado en 500 V.

Se estableció en primer lugar, que concentración máxima podía ser medida sin causar la saturación del detector. Para ello se empieza con una concentración de 3000 ng/mL y se hizo disminuir hasta llegar a un valor de concentración que pudiese ser medido. Este límite superior quedó fijado en 2000 ng/mL.

Para construir la curva de calibración, se establecieron cinco puntos, el menor de ellos correspondiente a una concentración de 100 ng/mL y el mayor, como se ha indicado, de 2000 ng/mL. Las muestras se prepararon por triplicado.

Como se puede observar en la Tabla 6.4, los cuatro catabolitos de flavan-3-oles estudiados, se comportan de manera lineal en el rango de concentraciones representado. El estudio de los rangos de concentración lineales de cada compuesto, nos indica cuales son las concentraciones ideales para poder determinarlos juntos, teniendo en cuenta su proporción en muestras reales.

Tabla 6.4. Parámetros de las curvas de calibración y parámetros analíticos de calidad.

	4-HPA	3-HPA	SyA	PCA
Ordenada Origen	310,5554 (±6,7291)	123,2078 (±1,7893)	28,7680 (±0,7157)	16,5070 (±0,2177)
Pendiente (ng/mL)	0,2440 (±0,0065)	0,1492 (± 0,0017)	0,0315 (±0,0007)	0,0148 (±0,0002)
Coef. Regresión S(R,c)	0,9908 17,5813	0,9982 4,6750	0,9937 1,8698	0,9973 0,5688
Linealidad	97,3212 %	98,8350 %	97,7957 %	98,5694 %
Límite detección Clayton (ng/mL)	173,6373	75,5178	142,8835	92,7349
Límite detección Winefordner y Long (k=3) (ng/mL)	131,5614	64,1323	90,9667	65,1916
Sensibilidad (ng/mL)	72,0579	31,3392	59,2954	38,4841

6.4.1. Optimización de las condiciones experimentales para la determinación simultánea de los catabolitos. Determinación en muestras sintéticas

Para determinar de forma simultánea cada uno de los catabolitos de flavan-3-oles, presentes en diferentes mezclas y en muestras biológicas, se llevaron a cabo diferentes estudios, con el fin de optimizar las condiciones experimentales para su determinación simultánea. La Tabla 6.5, resume las longitudes de onda de excitación y emisión características, para cada uno de los compuestos analizados, es decir, las longitudes de onda de máxima emisión y de máxima excitación, de cada uno de los catabolitos objeto de estudio y de las correspondientes mezclas.

Tabla 6.5. Determinación de las longitudes de onda de excitación y emisión óptimas, en la mezcla de catabolitos de flavan-3-oles.

	$\lambda_{excitación}$ (nm)	$\lambda_{emisión}$ (nm)
Ácido 4-hidroxifenilacético	224/272	306
Ácido 3-hidroxifenilacético	272	299
Ácido Siríngico	264	338
Ácido protocatecuico	253	337
Mezcla (óptimas)	272	320

Determinadas las longitudes de onda de compromiso, se eligen las concentraciones de cada catabolito más adecuadas para obtener una señal parecida en intensidad, y se representa gráficamente. Los resultados de este primer ensayo se muestran en las Figuras 6.16 (mapa de contorno) y 6.17 (espectros), el grado de solapamiento existente entre los espectros de emisión es elevado, lo que justifica la aplicación de métodos multivariantes para su determinación simultánea.

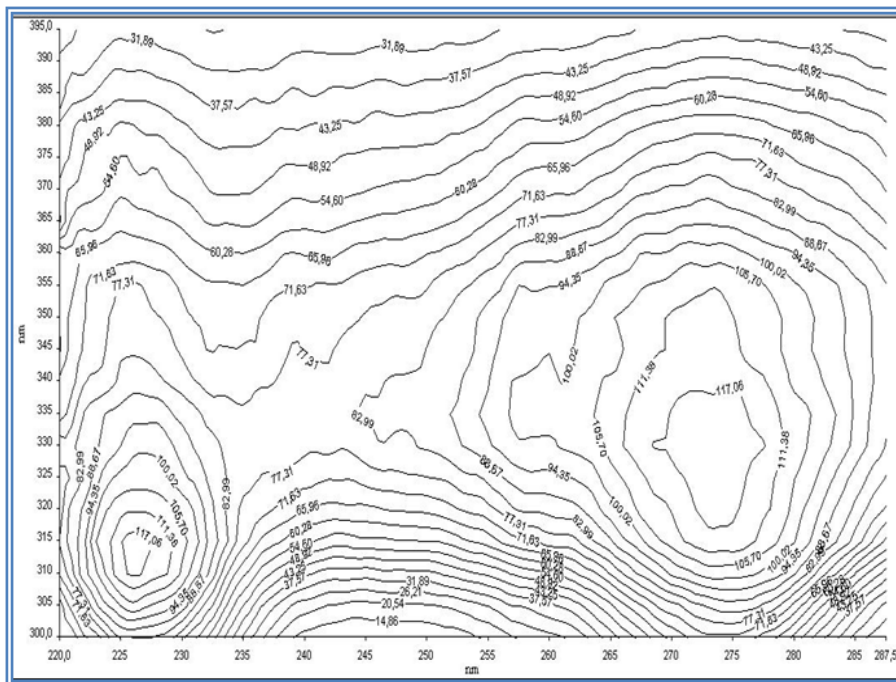


Figura 6.16. Mapa de contorno de la mezcla: [4-HPA]=0,06 mg/L, [3-HPA]=0,2 mg/L, [SyA]=3,5 mg/L, [PCA]=7 mg/L.

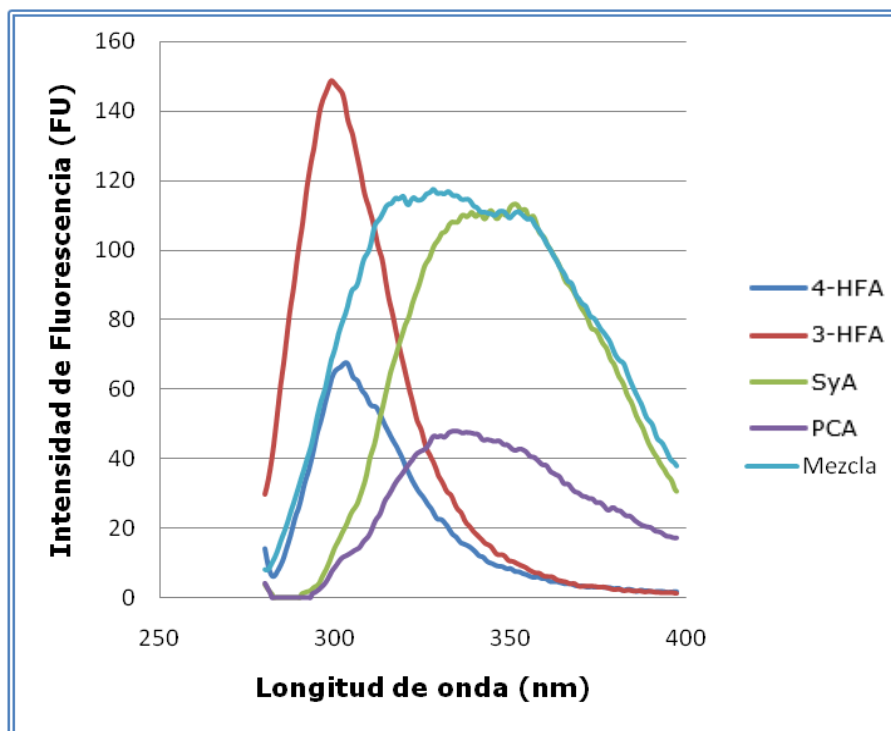


Figura 6.17. Espectros de emisión de los catabolitos de flavan-3-oles estudiados en este trabajo y de su correspondiente mezcla. [4-HPA]=0,06 mg/L, [3-HPA]=0,2 mg/L, [SyA]=3,5 mg/L, [PCA]=7 mg/L, $\lambda_{\text{excitación}}=272$ nm.

6.4.2. Resultados

En este apartado se ha llevado una organización con la siguiente secuencia:

- 1) Se diseña la matriz de calibración.
- 2) Se registran los espectros.
- 3) Se calibra.
- 4) Se valida.
- 5) Se determinan las muestras desconocidas.

Diseño de la matriz

Para la construcción de la matriz de calibración, se utiliza el método de diseño experimental, concretamente se seguirá el modelo

denominado: “*diseño central compuesto*”. Este diseño es un paso fundamental, para posteriormente obtener una matriz de calibrado con una adecuada capacidad de resolución. Es importante evitar la colinealidad, emplear un número suficientemente bajo de patrones y, a la vez, abarcar un amplio rango de concentraciones, que incluyan las relaciones entre las concentraciones de los componentes en las muestras de interés.

Los patrones de la matriz de calibración se distribuyen en torno a un cubo (vértices, centro del cubo, centro de las caras y centro de las aristas). Cada uno de estos patrones, se preparó en matraces de 10 mL a partir de disoluciones concentradas de los analitos en agua. Dada la imposibilidad de prepararlas directamente a partir de las disoluciones madre, fue necesario realizar una disolución de concentración intermedia.

Al aplicar este diseño, el número de patrones que son necesarios para la construcción de la matriz de calibración es de 20. Las concentraciones de cada componente se recogen en Tabla 6.6.

Tabla 6.6. Composición de la matriz de calibración para mezclas sintéticas.

MUESTRA	4-HPA	3-HPA	SyA
	(ng/mL)	(ng/mL)	(ng/mL)
Pt1	9,93	54,5	54,5
Pt2	99,07	54,5	54,5
Pt3	54,5	9,93	54,5
Pt4	54,5	99,07	54,5
Pt5	54,5	54,5	9,93
Pt6	54,5	54,5	99,07
Pt7	28	28	28
Pt8	81	28	28
Pt9	28	81	28
Pt10	81	81	28
Pt11	28	28	81
Pt12	81	28	81

Pt13	28	81	81
Pt14	81	81	81
Pt15	54,5	54,5	54,5
Pt16	54,5	54,5	54,5
Pt17	54,5	54,5	54,5
Pt18	0	0	0
Pt19	0	0	0
Pt20	0	0	0

Registro de espectros

Para cada uno de estos patrones, se registra su correspondiente espectro de emisión, empleando la longitud de excitación de compromiso indicada en la Tabla 6.5. En la Figura 6.18, se puede observar la totalidad de espectros utilizados.

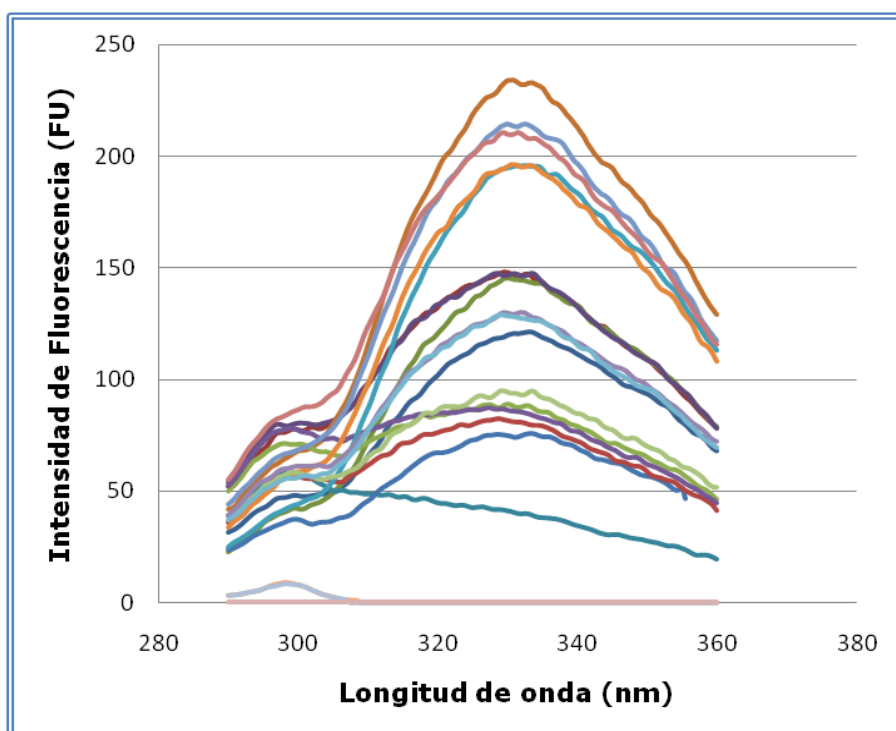


Figura 6.18. Espectros de emisión correspondientes a las muestras que componen la matriz de calibración ($\lambda_{\text{excitación}}=272 \text{ nm}$).

Calibración

A continuación, se procede a determinar la concentración de diferentes muestras mediante el modelo PLS. En primer lugar, se preparó un conjunto de muestras problema, para su predicción, empleándose para ello la matriz de calibración descrita anteriormente, Tabla 6.6. Se hizo uso del paquete informático MATLAB R2013a, y el programa de herramientas MVC1 (Olivieri, Goicoechea, & Iñón, 2004).

El número máximo de variables latentes de cada analito estudiado, viene determinado por el primer valor del PRESS, cuya probabilidad para la razón F es menor que 0,75 de acuerdo con el criterio de Haaland y Thomas (Haaland & Thomas, 1988). En la Tabla 6.7, se recogen los valores obtenidos para el PRESS y el coeficiente de correlación mediante PLS (Cases & Ríos, 1992) y también se representa en las Figuras 6.19, 6.20 y 6.21.

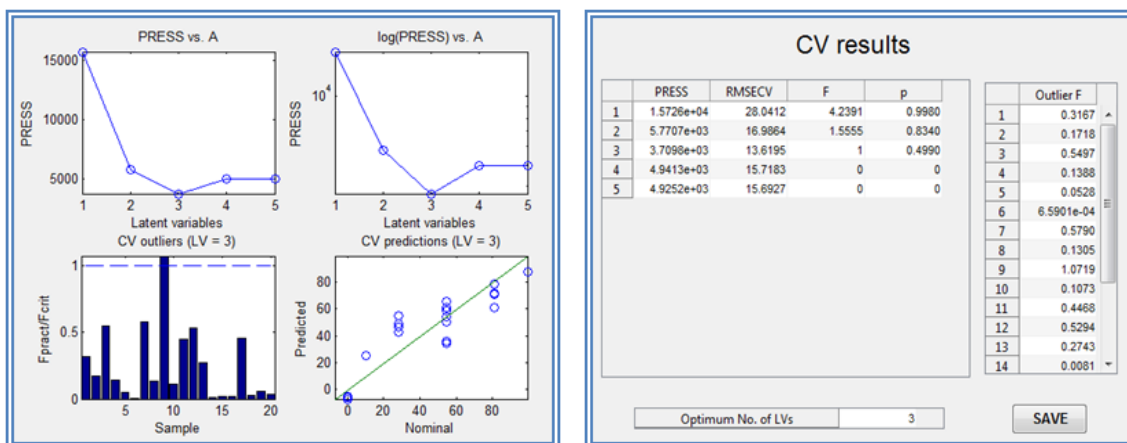


Figura 6.19. Variables latentes para el 4-HPA.

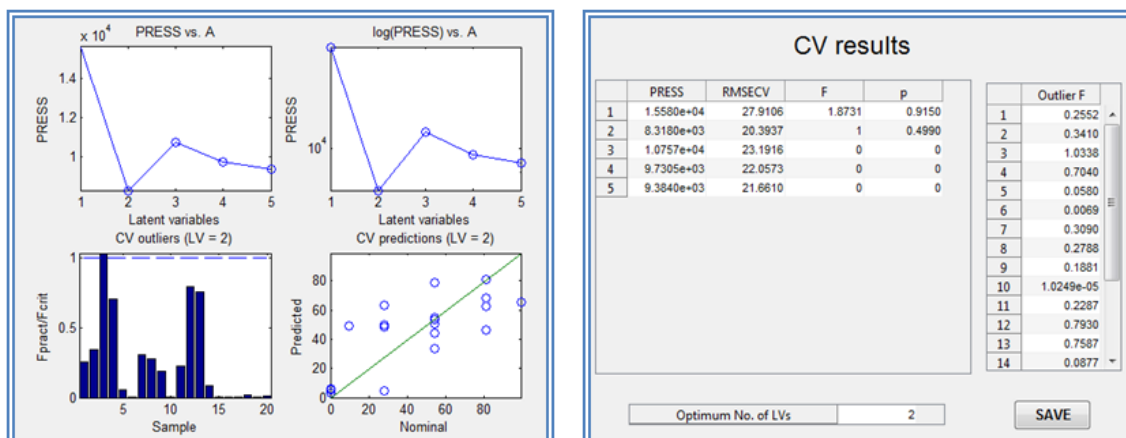


Figura 6.20. Variables latentes para el 3-HPA.

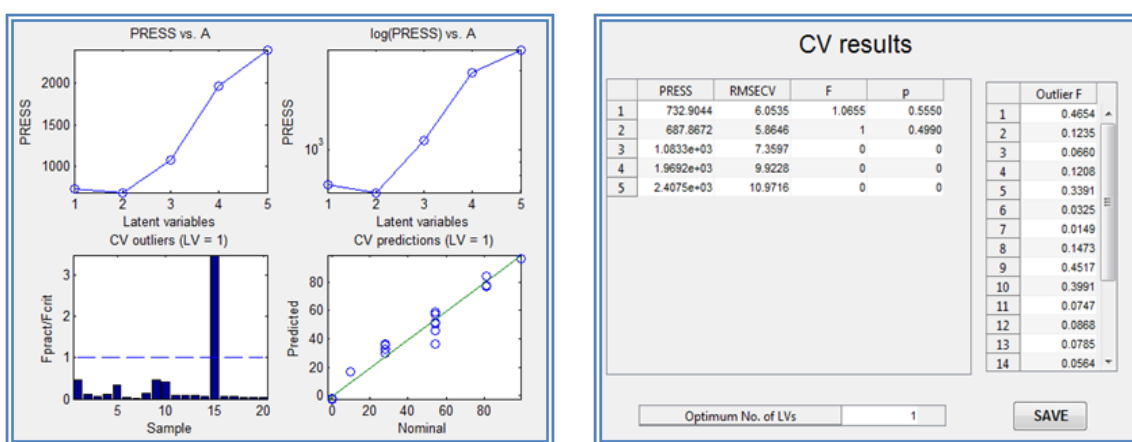


Figura 6.21. Variables latentes para el SyA.

Tabla 6.7. Parámetros estadísticos del modelo PLS en la zona espectral óptima para cada componente en muestras sintéticas.

	PLS-1			
	Rango λ (nm)	Factores	PRESS	Coefficiente de determinación (R^2)
4-HPA	200-280	3	3,7098e+03	0,9641
3-HPA	200-280	2	8,3180e+03	0,9895
SyA	200-280	1	732,9044	0,9961

Como se puede observar, el número de factores óptimos es menor para el ácido sirínico, corresponde con el analito que presenta

menor grado de solapamiento. Se destaca que la longitud de onda de emisión utilizada en este análisis ha sido de 320 nm, la cual favorece el espectro de ácido siríngico, tal y como se puede observar en la Figura 6.17.

Validación

Para llevar a cabo la validación del modelo de predicción, en la pantalla principal del programa, se establece el número de variables latentes y después se realiza la predicción de los resultados. También se puede determinar las predicciones discrepantes (*outliers*), los *scores* de las muestras, los coeficientes de regresión y los *loadings* seleccionados. Se representa en las Figuras 6.22, 6.23 y 6.24.

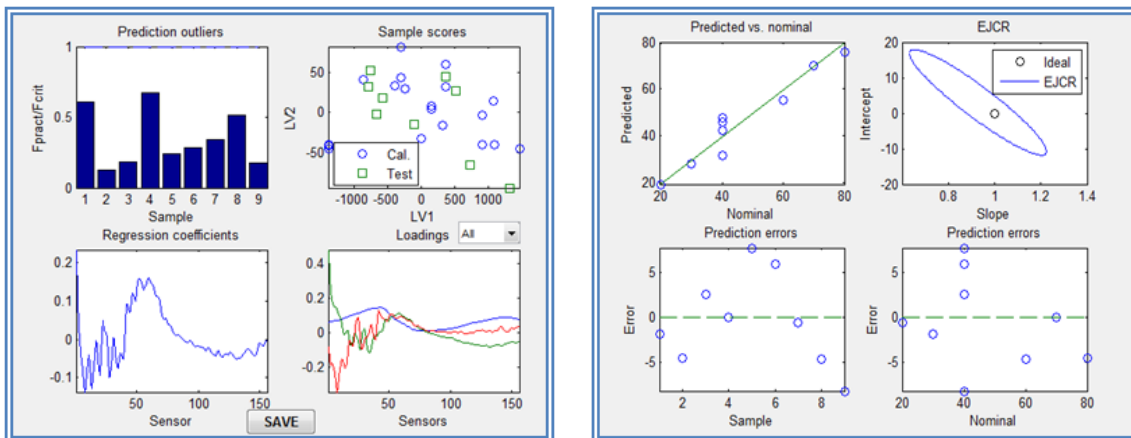


Figura 6.22. Resultados de la predicción para el 4-HPA.

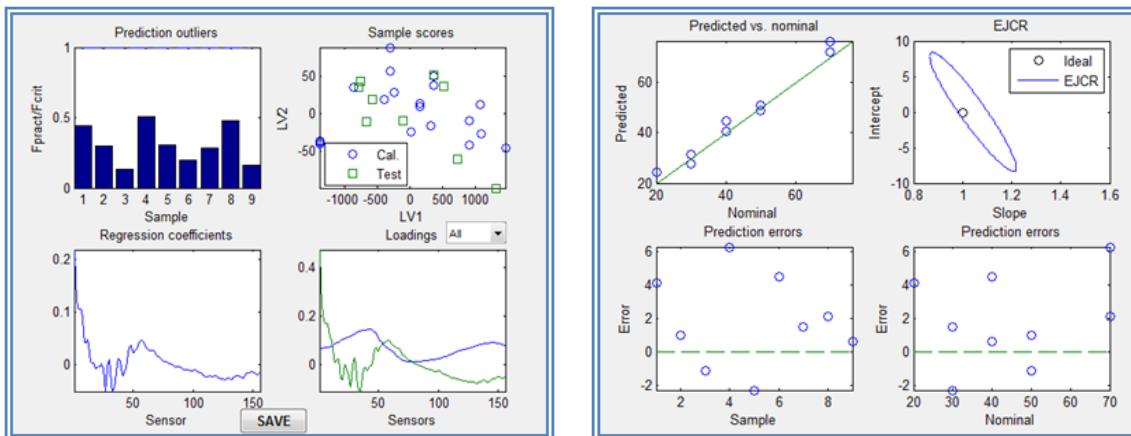


Figura 6.23. Resultados de la predicción para el 3-HPA.

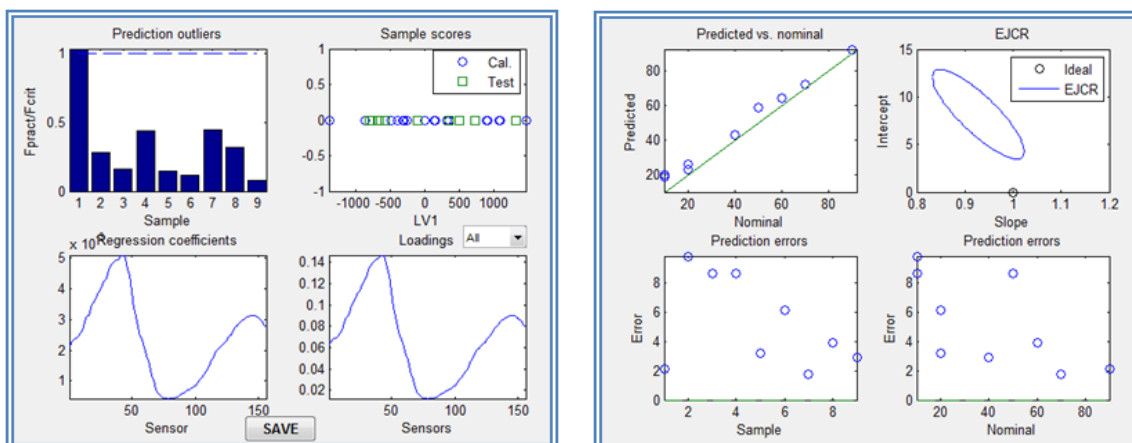


Figura 6.24. Resultados de la predicción para el SyA.

Determinación de muestras desconocidas

La matriz optimizada mediante PLS1, ha sido aplicada a la determinación del componente individual en muestras sintéticas, junto con los otros analitos. La matriz de calibración optimizada, también contempla una serie de blancos con el objetivo de modelar la señal adecuadamente. En las Tablas 6.8, se puede observar las concentraciones teóricas y calculadas, junto con la desviación estándar y el porcentaje de recuperación en cada caso, para 9 mezclas problema.

Tablas 6.8. Aplicación del modelo PLS optimizado a la resolución de mezclas ternarias de ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 3-hidroxifenilacético y ácido siríngico en muestras sintéticas.

	ÁCIDO 4-HIDROXIFENILACÉTICO			
	CT	CC	SD	%R
Muestra 1	30	28,2179	6,7433	94,0596
Muestra 2	80	75,5645	5,0942	94,4556
Muestra 3	40	42,5683	3,5304	106,4207
Muestra 4	70	70,0977	3,909	100,1395
Muestra 5	40	47,7497	4,0942	119,3742
Muestra 6	40	45,9745	2,7677	114,9362

Muestra 7	20	19,4303	4,5948	97,1515
Muestra 8	60	55,4542	4,1916	92,4236
Muestra 9	40	31,8680	2,6963	79,67

ÁCIDO 3-HIDROXIFENILACÉTICO				
	CT	CC	SD	%R
Muestra 1	20	24,1549	11,868	120,7745
Muestra 2	50	51,0339	5,7793	102,0678
Muestra 3	50	48,875	5,3428	97,75
Muestra 4	70	76,3089	5,5439	109,0127
Muestra 5	30	27,7381	3,6469	92,46033
Muestra 6	40	44,5198	3,5668	111,2995
Muestra 7	30	31,5423	7,2278	105,141
Muestra 8	70	72,1209	4,5511	103,0298
Muestra 9	40	40,6312	1,705	101,578

ÁCIDO SIRÍNGICO				
	CT	CC	SD	%R
Muestra 1	90	92,1168	2,0701	102,352
Muestra 2	10	19,7978	1,2055	197,978
Muestra 3	10	18,5902	1,2596	185,902
Muestra 4	50	58,6265	0,5751	117,253
Muestra 5	20	23,2122	1,0532	116,061
Muestra 6	20	26,1107	0,9239	130,5535
Muestra 7	70	71,7326	1,1553	102,4751
Muestra 8	60	63,8738	0,8058	106,4563
Muestra 9	40	42,8644	0,2168	107,161

Después, con objeto de analizar la bondad de la calibración, se ha representado la concentración actual frente a la concentración predicha, de las 9 mezclas, Figura 6.25, 6.26 y 6.27, para cada uno de los analitos, para así, poder observar el error típico para cada medida.

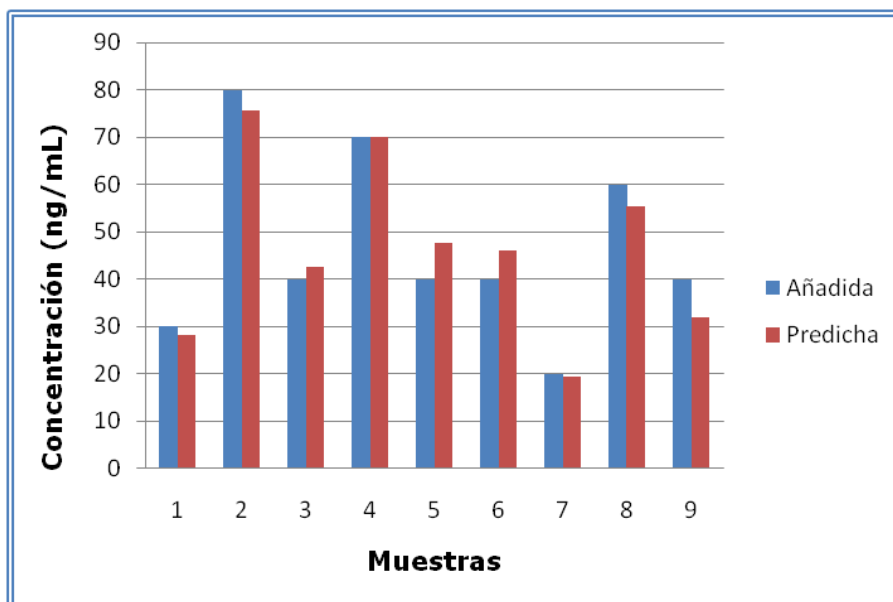


Figura 6.25. Relación entre la concentración teórica y calculada para el ácido 4-hidroxifenilacético en muestras sintéticas.

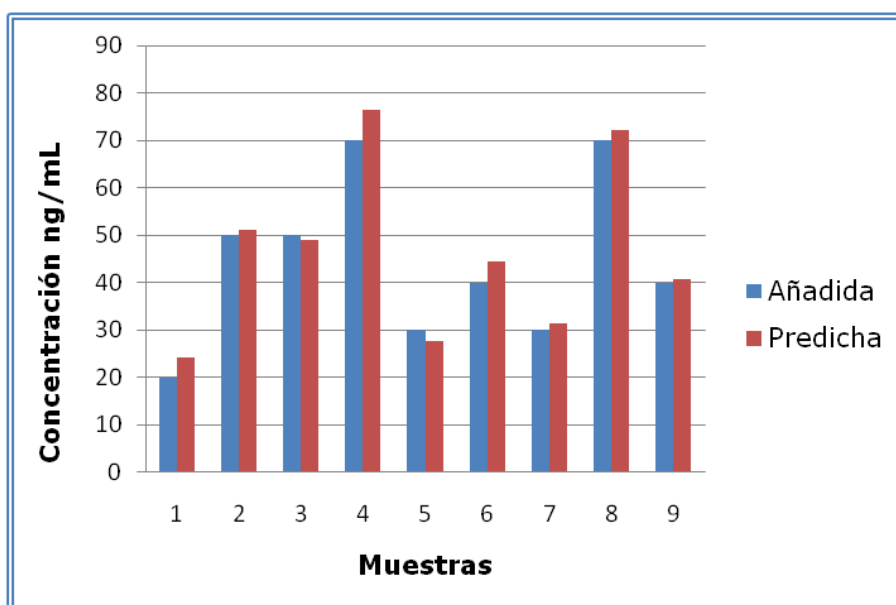


Figura 6.26. Relación entre la concentración teórica y calculada para el ácido 3-hidroxifenilacético en muestras sintéticas.

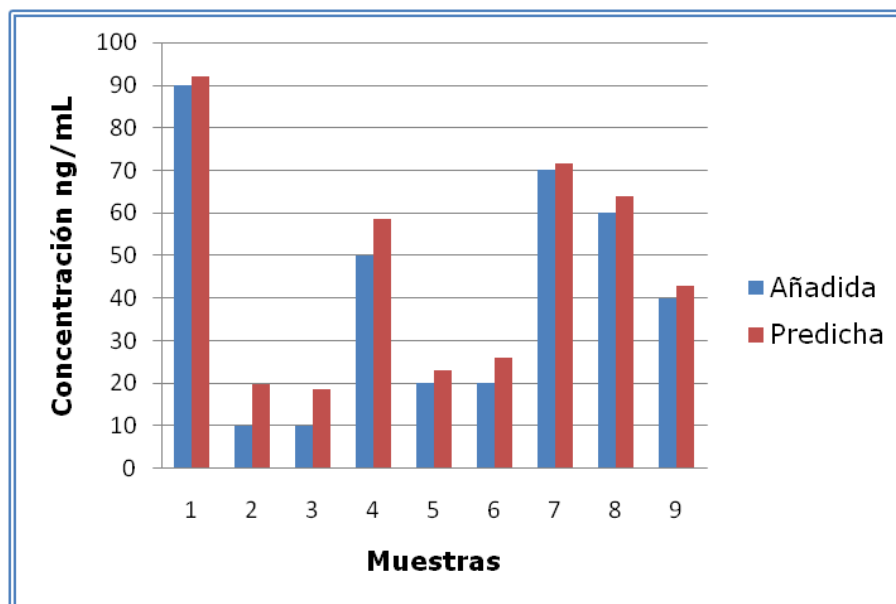


Figura 6.27. Relación entre la concentración teórica y calculada para el ácido siríngico en muestras sintéticas.

Como conclusión de estas pruebas preliminares, se observa que es para el caso del ácido siríngico, para el cual se obtienen resultados menos satisfactorios, ya que el valor de algunas de las recuperaciones se desvía un % más de lo esperado. Para el caso del ácido 4-hidroxifenilacético y el ácido 3-hidroxifenilacético, se obtienen los resultados más favorables, ya que en la mayoría de los casos los valores de recuperación son muy próximos al 100%. Si se analiza de forma individual cada uno de los resultados anteriores, se puede concluir que, independientemente de la concentración que presente tanto el ácido 4-hidroxifenilacético como el ácido 3-hidroxifenilacético, cuando el ácido siríngico se encuentra a muy baja concentración (entre 10,0 y 20,0 ng/mL), los valores de recuperación son superiores al 130%. Para valores de concentración de ácido siríngico superiores a 20,0 ng/mL, los valores de recuperación media se sitúan en un 108%, los cuales son mucho más adecuados.

Para el caso del ácido 4-hidroxifenilacético, no existe ninguna pauta de comportamiento en cuanto a su propio valor de concentración. Parece deducirse que cuanto más concentrado está el ácido siríngico, los valores de recuperación de ácido 4-hidroxifenilacético son más próximos al 100%. En cuanto al ácido 3-hidroxifenilacético, no parece verse influenciado

por el ácido siríngico presente, ya que prácticamente para todas las muestras se obtienen valores adecuados y próximos de recuperación.

Los parámetros de calidad obtenidos tras aplicar el método PLS, para el set de calibración están recogidos en la siguiente tabla.

Tabla 6.9. Parámetros de calidad para cada analito en muestras sintéticas.

	4-HPA	3-HPA	SyA
RMSEP	4,8572	3,2010	5,5856
REP%	10,4849	6,9100	12,9231
R²	0,9641	0,9895	0,9961
Cal. X residuals	2,3746	2,8389	4,3118
Expl. Var. X	100,0000	99,9999	99,9999
Expl. Var. Y	99,5065	98,1795	99,8043
Durbin-Watson p	0,0573	0,0762	0,6572
SEN	1,1304	2,1361	28,6745
Anal. SEN	0,4760	0,7524	6,6502
LODmin	14,7618	24,8639	8,0197
LODmax	23,8905	37,1120	8,3815
LOQmin	44,2855	74,5917	24,059
LOQmax	71,6715	111,3359	25,1444

Como se puede observar, la mayor sensibilidad corresponde al ácido siríngico, con un límite de detección de 8,38 ng/mL, bastante adecuado para la determinación de este componente en fluidos biológicos. Por otro lado, el ácido 4-hidroxifenilacético es el derivado que presenta una menor sensibilidad analítica, aun así, presenta un límite de detección de 23,89 ng/mL.

Como se ha indicado anteriormente, en la matriz de calibración se han introducido los espectros correspondientes a 3 disoluciones blanco, el resto, presenta la variación en la concentración de cada uno de los catabolitos objeto de estudio. Cada una de las muestras fue contaminada de

forma apropiada con tres niveles de concentración de ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 3-hidroxifenilacético y ácido siríngico.

Siguiendo el procedimiento anteriormente descrito, se realizó la predicción de las concentraciones de los tres analitos, utilizando para ello el set de calibración propuesto.

Los porcentajes de recuperación para cada catabolito en muestras sintéticas se representan en la Figura 6.28.

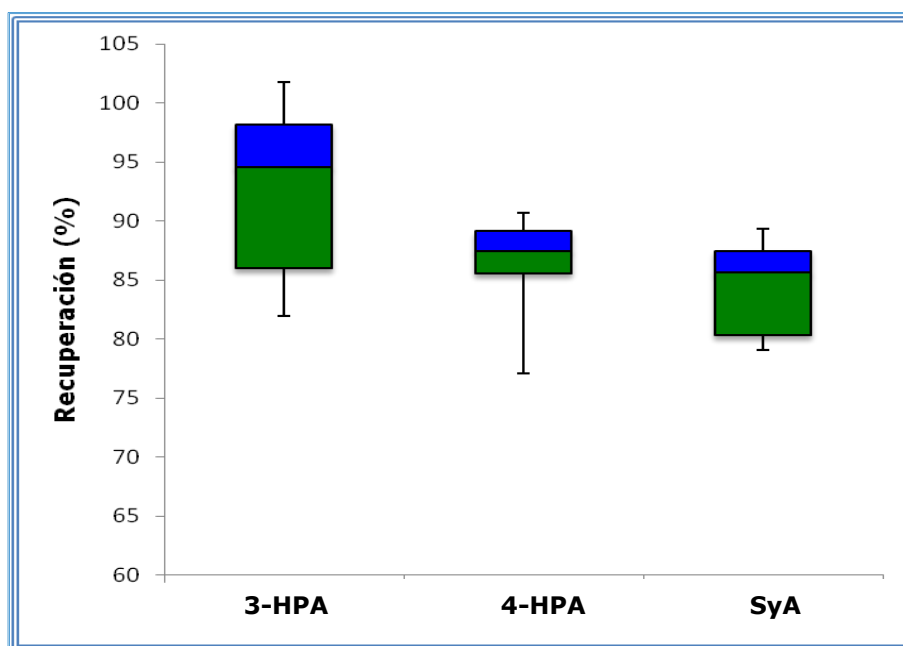


Figura 6.28. Porcentajes de recuperación de la mezcla de analitos obtenidos utilizando PLS.

En función de los resultados anteriores, se observa que tanto para el ácido 4-hidroxifenilacético, como para el ácido 3-hidroxifenilacético, se obtienen valores adecuados, mientras que para el ácido siríngico, el modelo no puede realizar una predicción adecuada.

De acuerdo con los resultados mostrados en las tablas anteriores, se concluye que, cuando se hace uso de matrices de calibración y predicción en muestras sintéticas, se obtienen buenos resultados para el ácido 3-hidroxifenilacético y para el ácido 4-hidroxifenilacético, siendo este último el que presenta una mejor recuperación. El ácido siríngico presenta

las recuperaciones más bajas, con un error superior a lo esperado, para poder observarlo detalladamente, se ha representado en la Figura 6.29.

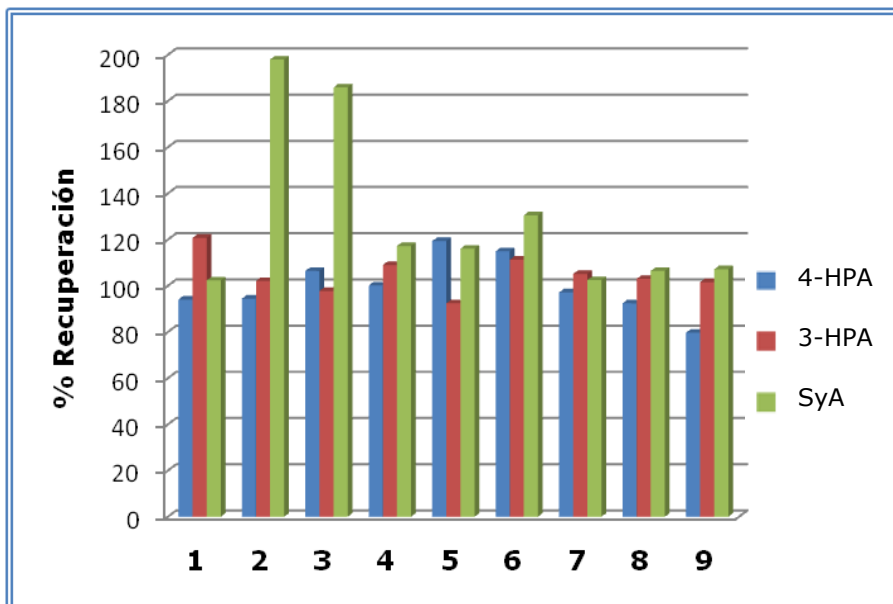


Figura 6.29. Recuperaciones medias de ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 3-hidroxifenilacético y ácido siríngico en muestras sintéticas de nueve muestras problema.

Los parámetros estadísticos del modelo PLS, que se han recogido para muestras sintéticas, han sido aceptables, pero no todo lo que se esperaba. Se tiene la certeza, de poder mejorarlo de manera significativa en el presente capítulo de este trabajo de investigación, con la aplicación de métodos de calibración multivariantes de segundo orden.

6.5. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE CATABOLITOS DE FLAVAN-3-OLES EN ORINA

Para llevar a cabo la determinación de flavan-3-oles en muestras de orina, se eligen también tres de los cuatro compuestos fluorescentes: el ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 3-hidroxifenilacético y el ácido siríngico, posteriormente se determina la longitud de onda de

excitación y emisión más adecuada y el rango de concentración de cada analito, para poder determinarlos en la mezcla de orina.

Se pretende la aplicación del modelo PLS, N-PLS, PARAFAC y otros, optimizados a la determinación simultánea de los catabolitos en estudio, en muestras de orina.

En primer lugar, se realizó una revisión bibliográfica acerca de la presencia de estos compuestos en la orina, encontrando referencias que estiman en 55 μmol , la concentración de ácido 4-hidroxifenilacético en orina humana (Sasot et al., 2017). Esta concentración es 4,18 mg/L aproximadamente, por tanto, se dopará la orina con esa concentración de cada analito.

Las diferentes mezclas orina-agua, aunque se encuentren en ausencia de nuestros analitos, producen diferentes señales en la intensidad de fluorescencia, aumentándola o disminuyéndola en función de la cantidad de orina utilizada. Por tanto, la cantidad de orina será un parámetro de calidad a tener en cuenta. En la Figura 6.30, se puede ver esta variación.

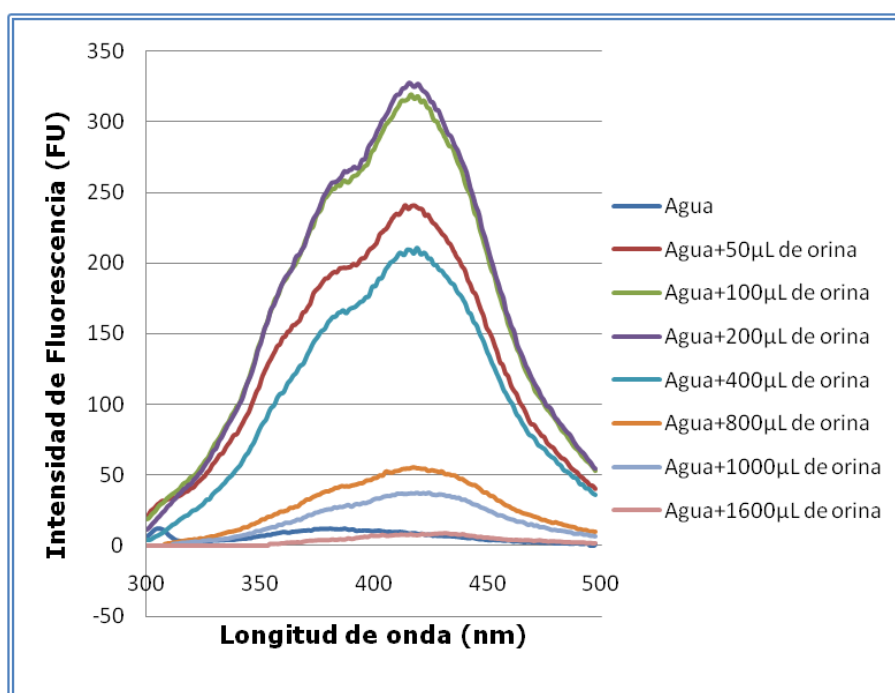


Figura 6.30. Estudio del comportamiento en la señal de fluorescencia de diferentes mezclas orina-agua, en ausencia de nuestros catabolitos. Espectros de emisión ($\lambda_{\text{excitación}}=272 \text{ nm}$).

En la representación gráfica anterior, se ve claramente, como la cantidad de orina presente en la muestra puede dificultar la correcta lectura de la intensidad de fluorescencia. Estos valores de intensidad, van aumentando conforme la concentración de orina es mayor, hasta llegar a un límite, en el cual, se produce un descenso de intensidad.

En la Figura 6.31, se pone de manifiesto la complejidad de la orina como matriz, observando un incremento en la intensidad con concentraciones bajas y un descenso con altas concentraciones. Nuestras muestras, por tanto, deben estar optimizadas en cuanto a la concentración de orina, buscando la dilución más adecuada.

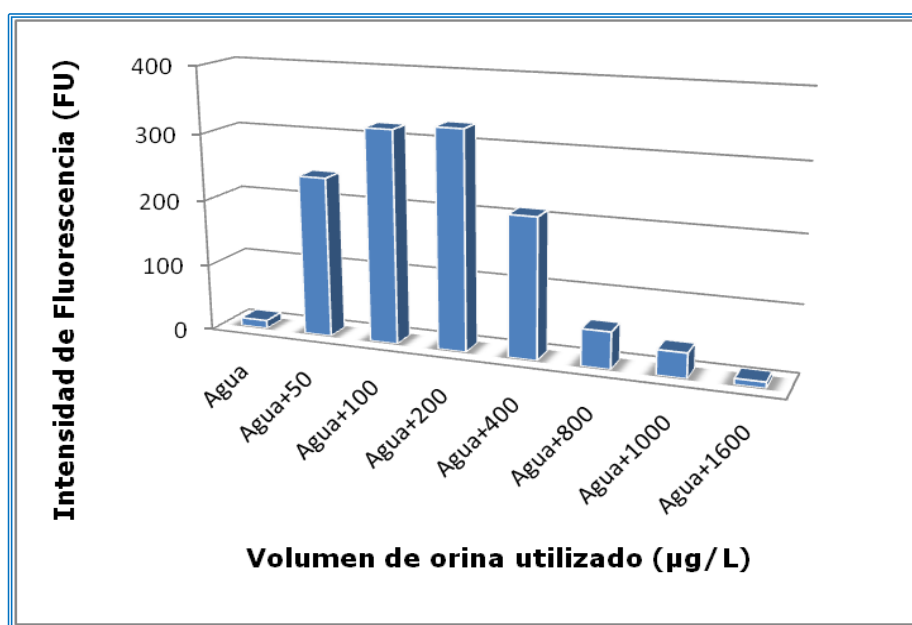


Figura 6.31. Estudio del comportamiento en la señal de fluorescencia de diferentes mezclas orina-agua.

Este comportamiento tan peculiar de la mezcla orina-agua, impide ser precisos en nuestras determinaciones, ya que a bajas concentraciones se produce gran señal, dando lugar a un falso positivo, mientras que, con concentraciones más altas, se produce un enmascaramiento la señal, dificultándonos su lectura. Se puede observar en la Figura 6.32.

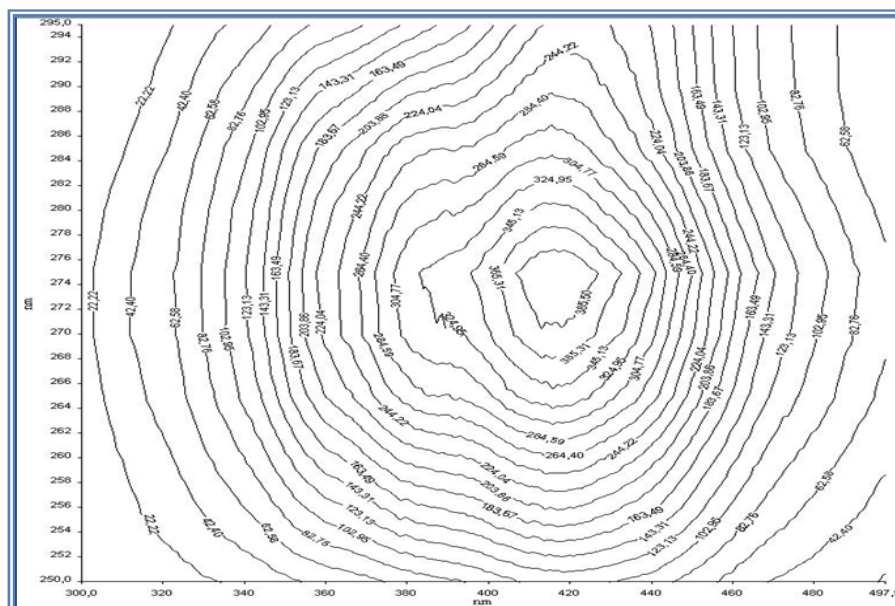


Figura 6.32. Mapa de contorno de la mezcla de 200 μL de orina y agua hasta alcanzar el volumen total de 10 mL.

Con el fin de evitar posibles problemas debidos a la acidez del medio, se ha realizado un estudio comparativo de pH, el cual se ha tenido en cuenta en todas nuestras determinaciones. Los valores para el pH son: 6,46 para el agua, 6,63 para la orina y 6,81 para la mezcla de 200 μL de orina con agua.

Para intentar mejorar el trabajo en esta matriz y resolver los problemas anteriormente expuestos, se ha evaluado la posibilidad de realizar un proceso de desproteización (Godin, Bouzas-Ramos, Fontagné-Dicharry, Bouyssière, & Bueno, 2017), de la orina (Chen, Huang, & Hu, 2018). Este proceso cuenta con las siguientes etapas: se toman 500 μL de orina, y se ajusta a $\text{pH}=8$, mediante la adición de la cantidad necesaria de una disolución de NaOH concentrada, preparada anteriormente. Añadir a la disolución anterior 1,5 mL de MeOH y 1,5 mL de ACN. Centrifugar la mezcla anterior, 5 minutos a 8000 r.p.m. Tomar el líquido sobrenadante y medir. Tomar 200 μL del líquido sobrenadante, mezclar con agua hasta los 10 mL y medir.

Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 6.10.

Tabla 6.10. Resultados del proceso de desproteización de la orina.

MUESTRAS	INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA (FU)
Líquido sobrenadante resultado de la desproteización.	26,37
Mezcla del líquido sobrenadante con agua.	148,44
Mezcla orina + agua sin realizar la desproteización.	327,16

Se observa una disminución en la señal de fluorescencia, cuando se lleva a cabo el proceso de desproteización de la orina, situándose este descenso aproximadamente en un 45%. De todas maneras no es suficiente, porque se sigue teniendo gran intensidad en la señal del blanco de orina, y por tanto, se descarta realizar este proceso (Gilquin et al., 2017).

Se ha comprobado que la orina muy concentrada enmascara la señal de fluorescencia, por tanto y siguiendo la bibliografía, se realiza una dilución inicial de la orina (Xu & Spink, 2007). Se estudió el grado de dilución al que se podría someter a la orina (Jiménez & Kuhn, 2009), de tal forma, que la señal del fondo fuese mínima; y siempre estableciendo como condición, que las concentraciones finales de los analitos quedasen comprendidas en los rangos de la matriz de calibración, teniendo en cuenta las concentraciones biológicas (Li, Wu, Liu, Gu, & Yu, 2013). Se establecen diferentes pruebas, de diluciones de la orina inicial en agua: 2:10; 1,5:10; 1:10; 0,5:10 y 0,1:10 mL respectivamente. Tras este estudio, se fija como dilución óptima la de 0,1 mL en 10 mL (1:100), seguida de una segunda dilución de 200 μ L en 10 mL. Se prepararon muestras de orina fortificadas con los tres analitos procediendo de la siguiente manera: tomar 1 mL de orina en un matraz de 100 mL. Contaminar la orina con los analitos de interés. Dejar transcurrir 30 minutos para favorecer las posibles interacciones entre los analitos y la matriz de la orina. Enrasar con agua suprapura a 100 mL. Tomar 200 μ L y llevarlos a un matraz de 10 mL. Fijar

la concentración de SDS y el pH. Registrar el espectro de emisión a 272 nm, con un potencial de 500 V.

En la Figura 6.33, se representa los resultados obtenidos en el proceso de dilución de la orina, respecto a la orina sin diluir y a la orina diluida dopada con uno de nuestros catabolitos prueba. Este ensayo ha sido determinante para fijar nuestro blanco de orina.

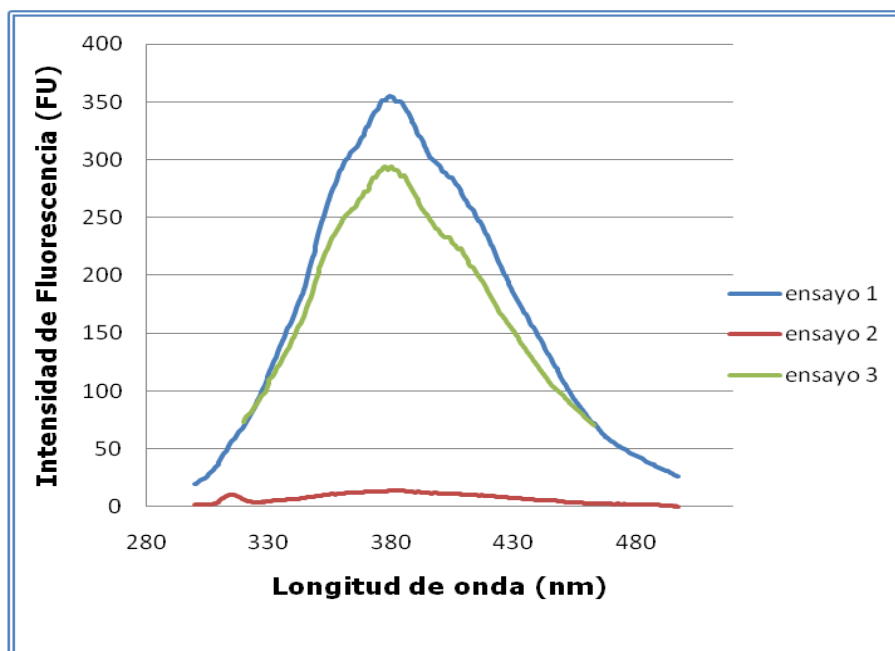


Figura 6.33. Espectros de emisión para conocer el blanco de orina. 1=200 μ L de orina y agua hasta alcanzar el volumen total de 10 mL; 2=200 μ L de orina diluida 0,1:10 (v:v) y agua hasta alcanzar los 10 mL; 3= 200 μ L de orina diluida y dopada con 4 mg/L en 4-HPA y agua hasta alcanzar los 10 mL.

Según la figura anterior, la señal fluorescente que se produce con la mezcla de orina pura y agua, se puede evitar realizando una dilución inicial de la orina 0,1:10 (v:v). De esta manera se ha determinado el blanco de orina para todos los ensayos posteriores, que se recogen en esta investigación (Sánchez-Patán, Monagas, Moreno-Arribas, & Bartolomé, 2011).

Además, siempre que se trabaje con esta matriz, se deberá realizar una centrifugación previa a 4000 r.p.m., durante 10 minutos y posterior doble filtrado a 0,45 μ m. Las disoluciones patrón de orina y las

diluciones realizadas, se guardarán en congelación y antes de su uso se dejarán descongelar lentamente a temperatura ambiente (Huang, Guo, Wan, Pan, & Feng, 2014).

Para conseguir un blanco más puro y lograr disminuir aún más la señal fluorescente de la mezcla orina-agua, se propone utilizar en todas las determinaciones una cantidad fija de orina diluida de 50 µL.

6.5.1. Estudio individual de cada catabolito en orina

Antes de comenzar a realizar un estudio detallado del análisis simultáneo de los tres componentes, se estudió el comportamiento de cada uno de los analitos por separado en muestras de orina, utilizando las condiciones fijadas anteriormente. Es decir, se trabajará con disoluciones acuosas de muestras de orina diluidas 0,1:100 (v:v) (Burns, Yokota, Ashihara, Lean, & Crozier, 2002), en las que no se modificará el pH del medio y además se trabajará en ausencia de agentes surfactantes. La longitud de onda de excitación será de 224 o 272 nm y el potencial del detector quedará fijado en 500 V.

Aunque nuestros estudios se realizan en orina, no hay muchos referentes bibliográficos sobre la concentración más habitual de estos biomarcadores en esta matriz. Debido a esta ausencia de datos, se han tenido en cuenta estudios realizados de estos catabolitos en heces. En la Tabla 6.11, se pueden ver los valores de referencia.

Tabla 6.11. Concentraciones más habituales encontradas en heces de los flavan-3-oles estudiados en este capítulo.

Ácido 4-hidroxifenilacético	2,45 mg/L
Ácido 3-hidroxifenilacético	4,20 mg/L
Ácido siríngico	0,66 mg/L

Para realizar el estudio de la linealidad de cada compuesto en orina, se estableció en primer lugar, que concentración máxima podía ser

medida sin causar la saturación del detector, después se hizo disminuir hasta llegar a un valor de concentración que pudiese ser medido.

Para construir la curva de calibración, se establecieron seis puntos, el menor de ellos correspondiente a la concentración del blanco y el mayor a una concentración de 200 µg/L, para el 4-HPA y 3-HPA, en cambio, para el SyA, la mayor concentración es fijada para 660 µg/L. Las muestras de orina se prepararon por triplicado y se añadió siempre la misma de orina.

El ácido 4-hidroxifenilacético, se comporta de manera lineal en el rango de concentración estudiado y además, se aprecia una gran sensibilidad en la intensidad, con las pequeñas variaciones de concentración.

El proceso se ha llevado a cabo de la siguiente manera:

- Intervalo de excitación: entre 240-290 nm.
- Intervalo de emisión: entre 280-350 nm.
- Óptimos: $\lambda_{\text{excitación}}=272$ nm y $\lambda_{\text{emisión}}=304$ nm.

En la Figura 6.34, está representada la curva de calibración para 4-HPA, obtenida en su intervalo lineal, en muestras de orina para la emisión.

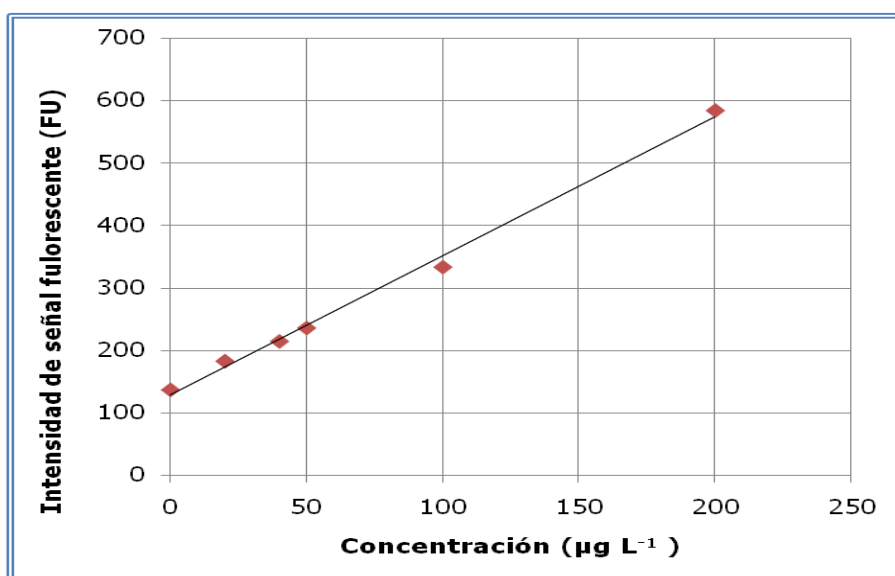


Figura 6.34. Recta de calibrado para la determinación de ácido 4-hidroxifenilacético en muestras de orina. $\lambda_{\text{excitación}}=277$ nm.

Utilizando las mismas condiciones que las indicadas para el analito anterior, el ácido 3-hidroxifenilacético y el ácido sirínico, se comportan de manera lineal en el rango de concentración estudiado, apreciando mayor sensibilidad en el 3-HPA que en el SyA, con las pequeñas variaciones de concentración. El proceso que se ha llevado a cabo se describe en la Tabla 6.12.

Tabla 6.12. Intervalos de longitud de onda y óptimos de excitación y de emisión.

Catabolito flavan-3-oles	Intervalo Excitación (nm)	λ_{exc} (nm)	Intervalo Emisión (nm)	λ_{emi} (nm)
Ácido 4-hidroxifenilacético (4-HPA)	240-290	272	280-350	304
Ácido 3-hidroxifenilacético (3-HPA)		277		300
Ácido sirínico (SyA)		265		337

Por tanto, los tres catabolitos de flavan-3-oles estudiados, se comportan de manera lineal en el rango de concentraciones representado. El estudio de los rangos de concentración lineal de cada compuesto, nos indica cuales son las concentraciones ideales para poder determinarlos juntos, teniendo en cuenta su proporción en muestras reales.

En la Tabla 6.13, se recogen los parámetros estadísticos correspondientes a las curvas de calibración mostradas anteriormente, así como los correspondientes parámetros de calidad, para cada uno de los analitos en muestras de orina.

Tabla 6.13. Parámetros de las curvas de calibración y parámetros analíticos de calidad en muestras de orina.

	4-HPA	3-HPA	SyA
Ordenada Origen	128,6473 (±3,6278)	149,7333 (±4,7854)	134,9839 (±0,9890)
Pendiente (ng/mL)	2,2263 (±0,0381)	2,0101 (± 0,0502)	0,0476 (±0,0029)
Coef. Regresión	0,9953	0,9901	0,9531
S(R,c)	10,7292	14,1529	2,4437
Linealidad	98,2902 %	97,5020 %	93,8500 %
Límite detección Clayton (ng/mL)	11,0937	16,2076	125,8443
Límite detección Winefordner y Long (k=3) (ng/mL)	5,7692	9,0741	526,5955
Sensibilidad (ng/mL)	4,8194	7,0410	51,3073

Finalmente se estudió la aditividad de las señales en las condiciones propuestas, comprobándose la aditividad de las mismas.

6.5.2. Proceso de optimización de mezclas en orina

Realizados todos los ensayos preliminares, se deben establecer las condiciones idóneas para la determinación de la mezcla de los tres compuestos en orina.

Todas las muestras de orina utilizadas, han sido congeladas a -21 °C, para después ser descongeladas hasta alcanzar la temperatura ambiente y luego homogeneizar agitando suavemente, centrifugadas 10 minutos a 4000 r.p.m., y filtradas con filtro de nylon de 0,45 µm de tamaño de poro, dos veces.

Se probaron diferentes disolventes y mezclas, siendo el agua el más adecuado en términos de sensibilidad, estabilidad y selectividad en nuestras muestras.

Se ha preparado 50 mL de blanco de orina, el cual está formado por 0,5 mL de orina centrifugada y filtrada y el resto de agua hasta alcanzar los 50 mL, consiguiendo así la proporción 1:100 (v:v) orina/agua. Esta dilución permite después determinar la concentración de los analitos (Saldanha et al., 2016).

Todas las muestras contienen siempre la misma cantidad de orina con diferente concentración de analito, y se dejarán reposar durante 30 minutos para fomentar la interacción analito-orina.

Las muestras se han obtenido de varios individuos sanos, los cuales han permanecido a dieta de productos vegetales, además se han contrastado los resultados con muestras de orina sin analitos, a través de bebés lactantes sanos recién nacidos, encontrando idénticos resultados.

Se han optimizado las condiciones óptimas de excitación y emisión, las cuales se marcan entre: 240 y 290 nm y entre 280 y 400 nm respectivamente. Las longitudes de onda son: $\lambda_{\text{excitación}}=240$ nm y $\lambda_{\text{emisión}}=315$ nm. Las rendijas de excitación y emisión se mantuvieron abiertas a 10 nm. Las matrices de excitación/emisión se recogieron cada 1 nm en el rango de excitación comprendido entre 240 a 260 nm y en el de emisión comprendido entre 315 a 335 nm, también cada 1 nm. El potencial del equipo fue 500 V y la velocidad de exploración se mantuvo durante todo el proceso a 650 nm/min.

La longitud de onda óptima de excitación de compromiso, para la determinación simultánea de los tres catabolitos queda centrada en 255 nm, mientras que la longitud de onda óptima de emisión de compromiso se sitúa en 325 nm. Teniendo en cuenta el proceso de optimización que se ha desarrollado en este capítulo, se realiza el calibrado de los tres catabolitos objeto de estudio, teniendo en cuenta los parámetros optimizados para orina.

Para construir la curva de calibración, se establecieron cinco puntos, el menor de ellos correspondiente a la concentración del blanco, es decir, la muestra de orina diluida 0,1:10 (v:v) disuelta en agua, mientras que el punto de mayor concentración se sitúa 800 $\mu\text{g/mL}$, ya que se debe tener en cuenta las concentraciones de estos catabolitos en muestras

biológicas, Tabla 6.11. Las muestras de orina se prepararon por triplicado y se añadió siempre la misma cantidad de orina.

El ácido 4-hidroxifenilacético, se comporta de manera lineal en el rango de concentración estudiado. El intervalo de excitación contempla entre 240-290 nm, el de emisión entre 280-400 nm y las longitudes de onda de compromiso seleccionadas son: $\lambda_{\text{excitación}}=255$ nm y $\lambda_{\text{emisión}}=325$ nm.

En la Figura 6.35, están representadas las curvas de calibración obtenidas aplicando el proceso de optimización, tanto para la excitación (derecha), como para la emisión (izquierda).

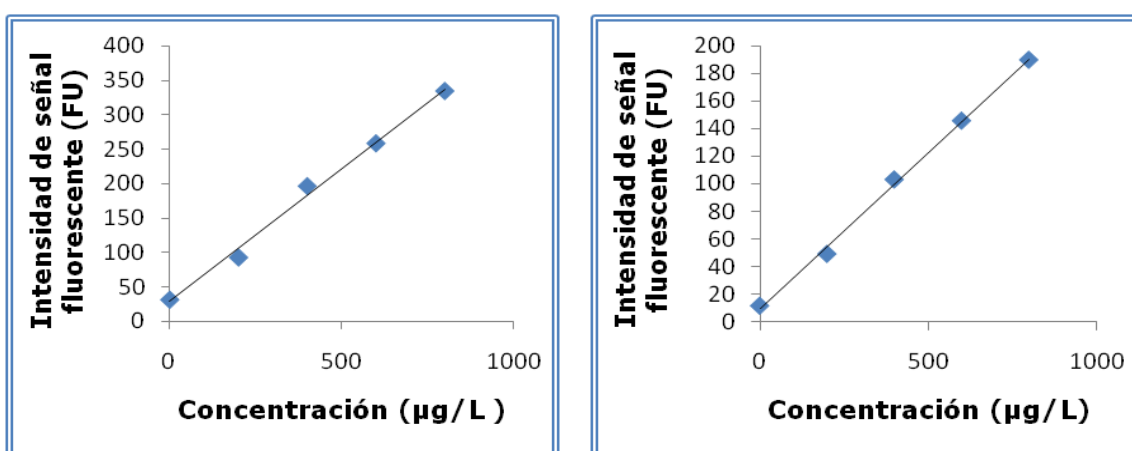


Figura 6.35. Rectas de calibrado para la determinación de ácido 4-hidroxifenilacético en muestras de orina, usando agua como disolvente y teniendo en cuenta las condiciones óptimas del análisis.

Utilizando las mismas condiciones que las utilizadas para el analito anterior, el ácido 3-hidroxifenilacético y el ácido sirínico, se comportan de manera lineal en el rango de concentración estudiado. El intervalo de excitación contempla entre 240-290 nm, el de emisión entre 280-400 nm y las longitudes de onda de compromiso seleccionadas son: $\lambda_{\text{excitación}}=255$ nm y $\lambda_{\text{emisión}}=325$ nm.

Se puede observar que la sensibilidad del SyA, es menor a la de los otros dos catabolitos estudiados.

En la Tabla 6.14, se recogen los parámetros estadísticos correspondientes a las curvas de calibración mostradas anteriormente, así

como los correspondientes parámetros de calidad para cada uno de los analitos en muestras de orina.

Tabla 6.14. Parámetros de las curvas de calibración y parámetros analíticos de calidad en muestras de orina, para mezclas.

	4-HPA	3-HPA	SyA
Ordenada Origen	9,3486 (±1,5143)	15,5533 (±2,4138)	15,1547 (±1,2461)
Pendiente (ng/mL)	0,2263 (±0,0031)	0,2736 (± 0,0049)	0,2030 (±0,0025)
Coef. Regresión	0,9976	0,9958	0,9980
S(R,c)	3,3862	5,3975	2,7863
Linealidad	98,6340 %	98,1990 %	98,7471%
Límite detección Clayton (ng/mL)	38,0168	50,1202	34,8669
Límite detección Winefordner y Long (k=3) (ng/mL)	20,1699	26,6571	18,6263
Sensibilidad (ng/mL)	14,9643	19,7284	72,4413.

Finalmente se estudió la aditividad de las señales en las condiciones propuestas, comprobándose la aditividad de las mismas.

6.5.3. Resultados para muestras en orina

Este punto se ha organizado con la siguiente secuencia:

- 1) Se diseña la matriz de calibración. (Diseño central compuesto).
- 2) Se registran los espectros.
- 3) Se calibra.
- 4) Se valida.
- 5) Se determinan las muestras desconocidas.

Diseño de la matriz para muestras en orina

Para la construcción de la matriz de calibración en mezclas de orina, se utilizará el diseño central compuesto. Este diseño es un paso fundamental para posteriormente obtener una matriz de calibrado con una adecuada capacidad de resolución. Es importante evitar la colinealidad, emplear un número suficientemente bajo de patrones y, a la vez, abarcar un amplio rango de concentraciones, que incluyan las relaciones entre las concentraciones de los componentes en las muestras de interés, sin olvidarnos de las concentraciones más habituales de nuestros catabolitos en muestras biológicas.

Los patrones de la matriz de calibración se distribuyen en torno a un cubo (vértices, centro del cubo, centro de las caras, centro de las aristas, etc.). Cada uno de estos patrones se preparó en matraces de 10 mL a partir de disoluciones concentradas de los analitos. Dada la imposibilidad de prepararlas directamente a partir de las disoluciones madre, fue necesario realizar una disolución de concentración intermedia. Tal y como se ha comprobado, no es necesario modificar el medio micelar de estas disoluciones. Tampoco se modificará el pH, ni se someterá a ninguna disolución a luz ultravioleta. Aunque es muy importante almacenar en refrigeración a temperaturas 4 °C y trabajar con recipientes color topacio para evitar la degradación de las disoluciones.

La matriz de calibración en el proceso optimizado, está formada por un diseño con 23 muestras de calibración. Las concentraciones de cada componente se recogen en Tabla 6.15, dentro de los rangos establecidos previamente de acuerdo con la concentración esperada en muestras de orina y considerando el rango lineal (Sánchez-Patán, Monagas, Moreno-Arribas, & Bartolome, 2011).

Tabla 6.15. Composición de la matriz de calibración optimizada en orina.

MUESTRA	4-HPA	3-HPA	SyA
	(ng/mL)	(ng/mL)	(ng/mL)
Pop1	335	47,7311	350
Pop2	335	552,2689	350
Pop3	57,5042	300	350
Pop4	612,4958	300	350
Pop5	335	300	47,2773
Pop6	335	300	652,7227
Pop7	170	150	170
Pop8	170	450	170
Pop9	500	150	170
Pop10	500	450	170
Pop11	170	150	530
Pop12	170	450	530
Pop13	500	150	530
Pop14	500	450	530
Pop15	335	300	350
Pop16	335	300	350
Pop17	335	300	350
Pop18	335	300	350
Pop19	335	300	350
Pop20	335	300	350
Pop21	0	0	0
Pop22	0	0	0
Pop23	0	0	0

Registro de espectros para muestras en orina

Para cada uno de estos patrones, se registra su correspondiente espectro de emisión, según las condiciones establecidas. En la Figura 6.36, se puede observar la totalidad de espectros utilizados de la mezcla de los tres catabolitos en orina.

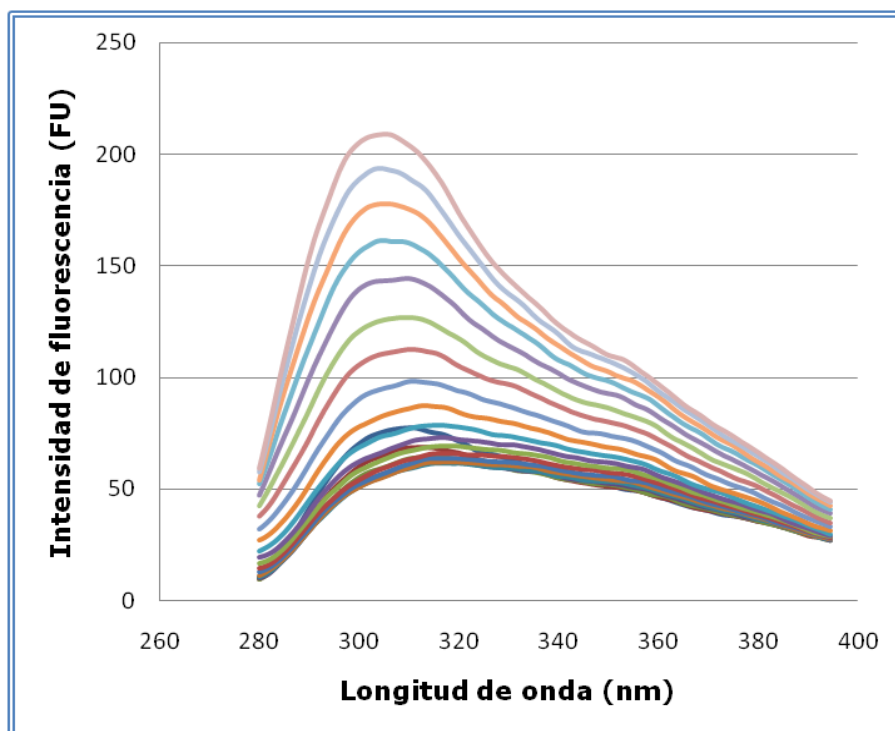


Figura 6.36. Espectros de emisión correspondientes a las muestras que componen la matriz de calibración optimizada en muestras de orina ($\lambda_{\text{excitación}}=255 \text{ nm}$).

Calibración para muestras en orina

A continuación, se procede a predecir dichas muestras mediante el modelo PLS optimizado. En primer lugar, se preparó un conjunto de muestras problemas, para su predicción, empleándose para ello la matriz de calibración optimizada anteriormente. Se hizo uso del paquete informático MATLAB R2013a, y el programa de herramientas MVC1(Olivieri et al., 2004).

MVC1, es un programa que nos permite llevar a cabo calibración multivariante, mediante diversos algoritmos tales como PCR, PLS y otros basados en la señal neta del analito. Permite llevar a cabo validaciones cruzadas, calibración y predicción de muestras desconocidas, proporcionándonos los límites de confianza para las concentraciones calculadas, la sensibilidad y selectividad del método aplicado, los parámetros indicadores de error y residuales. También nos permite obtener la señal neta para el analito, residuos espectrales, factores espectrales, coeficientes de regresión final y *scores*.

La zona de análisis espectral en este caso fue la misma para los 3 analitos, ya que se consideraron las condiciones óptimas, donde la muestra de orina proporcionaba mejores resultados para cada uno de los principios activos. Se hizo la calibración cruzada modificando el rango de los sensores (longitudes de onda). El análisis del coeficiente de regresión y el factor PRESS (suma de los cuadrados de los errores residuales), nos permitió determinar las zonas de análisis espectral (Olivieri 2001).

Se ha seleccionado como óptimo el número de factores para el primer valor del PRESS, cuya probabilidad para la razón F es menor que 0,75 de acuerdo con el criterio de Haaland y Thomas (Haaland & Thomas, 1988). En la Tabla 6.16, se recogen los valores obtenidos para el PRESS y el coeficiente de correlación mediante PLS (Cases & Ríos, 1992).

Tabla 6.16. Parámetros estadísticos del modelo PLS en la zona espectral óptima para cada componente.

PLS-1				
	Rango λ (nm)	Factores	PRESS	Coefficiente de determinación(R^2)
4-HPA	280-400	4	4,0625e+04	0.9957
3-HPA	280-400	3	3,4260 e+04	0.9989
SyA	280-400	5	2,5956 e+04	0.9971

Como se puede observar, el número de factores óptimos es menor para el ácido 3-hidroxifenilacético, corresponde con el analito que presenta menor grado de solapamiento, seguido por el ácido 4-

hidroxifenilacético y el ácido siríngico. Siendo para el ácido siríngico el mayor número, ya que es el analito que aparece en la posición más desplazada del espectro, y además presenta solapamiento con los otros dos compuestos presentes en la orina.

Validación

Para llevar a cabo la validación del modelo de predicción, en la pantalla principal del programa, se establece el número de variables latentes y después se realiza la predicción de los resultados. También se puede determinar las predicciones discrepantes (*outliers*), los *scores* de las muestras, los coeficientes de regresión y los *loadings* seleccionados.

Determinación de las muestras desconocidas en orina

La matriz optimizada mediante PLS, ha sido aplicada a la determinación del componente individual en muestras de orina, junto con los otros analitos objeto de estudio. La matriz de calibración en orina optimizada, también contempla una serie de blancos con el objetivo de modelar la señal adecuadamente. En las Tablas 6.17, se puede observar las concentraciones teóricas y calculadas, junto con la desviación estándar y el porcentaje de recuperación en cada caso, para 8 mezclas problema.

Tabla 6.17. Aplicación del modelo PLS optimizado a la resolución de mezclas ternarias de ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 3-hidroxifenilacético y ácido siríngico en orina.

	ÁCIDO 4-HIDROXIFENILACÉTICO			
	CT	CC	SD	%R
Muestra 1	100	149,8968	9,5705	149,89
Muestra 2	660	591,6048	10,4133	89,63
Muestra 3	100	94,2160	12,0027	94,21

Muestra 4	400	357,1439	6,3498	89,28
Muestra 5	50	80,0612	6,6929	160,12
Muestra 6	400	368,8993	7,852	92,22
Muestra 7	50	58,6593	6,3268	117,31
Muestra 8	660	629,9534	8,4316	95,44

ÁCIDO 3-HIDROXIFENILACÉTICO				
	CT	CC	SD	%R
Muestra 1	100	92,0536	16,3865	92,05
Muestra 2	100	102,9597	17,5478	102,95
Muestra 3	660	556,3047	21,3832	84,28
Muestra 4	400	356,6355	10,6862	89,15
Muestra 5	400	344,7274	11,4	86,18
Muestra 6	50	53,6229	13,2911	107,24
Muestra 7	50	42,438	10,6679	84,87
Muestra 8	660	538,2149	14,4387	81,54

ÁCIDO SIRÍNGICO				
	CT	CC	SD	%R
Muestra 1	660	644,059	10,6754	97,58
Muestra 2	100	129,9464	11,0284	129,94
Muestra 3	100	98,7939	11,0572	98,79
Muestra 4	50	49,6237	7,8755	99,24
Muestra 5	400	398,3795	7,8994	99,59
Muestra 6	400	413,408	7,413	103,35
Muestra 7	50	90,9856	6,6849	181,97
Muestra 8	660	617,5865	8,7192	93,57

A continuación, con objeto de analizar la bondad de la calibración, se ha representado la concentración actual frente a la concentración predicha, de las 8 mezclas, Figuras 6.37, 6.38 y 6.39, para cada uno de los analitos, para así, poder observar el error típico para cada medida.

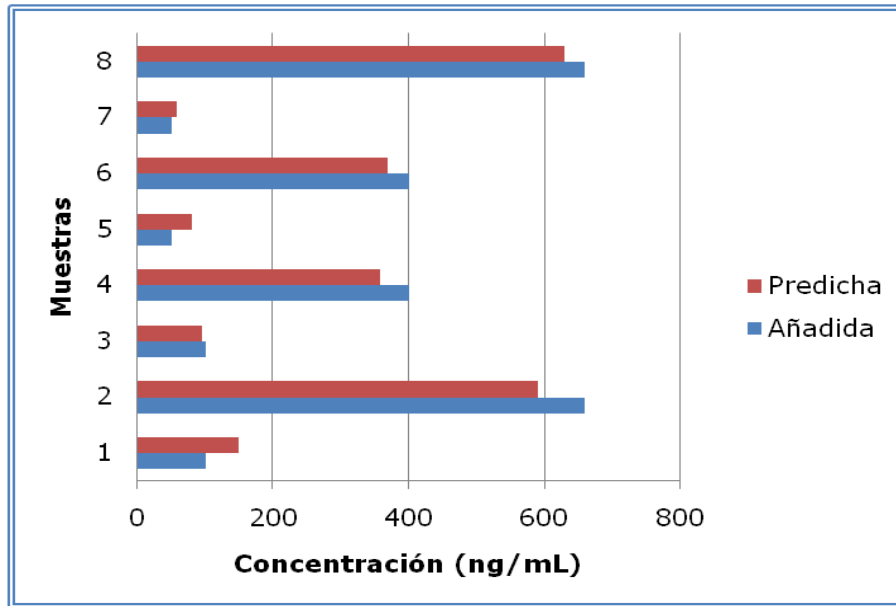


Figura 6.37. Relación entre la concentración añadida y predicha para el ácido 4-hidroxifenilacético en muestras de orina.

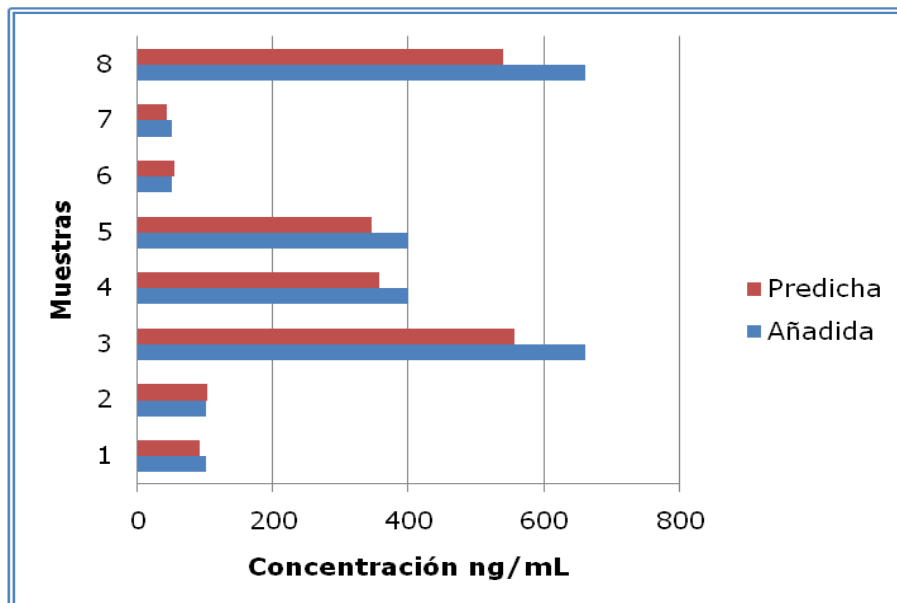


Figura 6.38. Relación entre la concentración añadida y predicha para el ácido 3-hidroxifenilacético en muestras de orina.

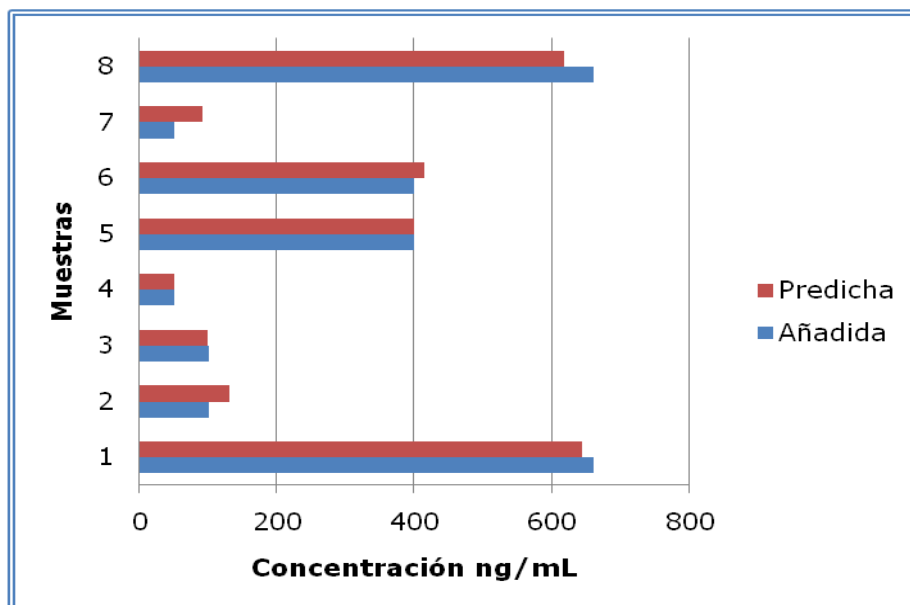


Figura 6.39. Relación entre la concentración añadida y predicha para el ácido sirínigico en muestras de orina.

Como conclusión de estas pruebas, se observa que es para el caso del ácido sirínigico, donde se obtienen peores resultados, ya que el valor medio de las recuperaciones se sitúa alrededor de un 114%. Para el caso del ácido 4-hidroxifenilacético y el ácido 3-hidroxifenilacético, nos ocurre algo muy similar, con recuperaciones medias con error aproximado de un 10%.

Con el fin de encontrar una pauta de comportamiento de los catabolitos estudiados en orina, parece deducirse que, aunque la concentración del catabolito estudiado no varíe en la muestra de orina, existe una fuerte influencia con la concentración de los otros compuestos presentes en la matriz biológica. Se puede observar que, bajo ciertas circunstancias, en algunos casos, se obtienen muestras con valores poco adecuados y no muy buenos porcentajes de recuperación.

Los parámetros de calidad obtenidos tras aplicar el método PLS, para el set de calibración, han sido calculados mediante la aplicación del software MVC1; de este modo se hallaron los parámetros de calidad (Tabla 6.18).

Tabla 6.18. Parámetros de calidad para cada analito en muestras de orina.

	4-HPA	3-HPA	SyA
RMSEP	38,5461	61,9093	24,741
REP%	13,2223	23,7319	8,1292
R²	0,9957	0,9989	0,9971
Cal. X residuals	0,3221	1,3641	0,235
Expl. Var. X	100	100	100
Expl. Var. Y	99,9578	998.381	99,9709
Durbin-Watson p	0,166	0,1261	0,4152
SEN	0,2366	0,5252	0,0922
Anal. SEN	0,7344	0,385	0,3922
LODmin	23,3686	41,2465	21,9298
LODmax	46,4864	674.481	50,2664
LOQmin	70,1059	123,7396	65,7895
LOQmax	139,4593	202,3444	150,7992

Como se puede observar, la mayor sensibilidad corresponde al ácido 3-hidroxifenilacético, con un límite de detección de 41,24 ng/mL, bastante adecuado para la determinación de este componente en fluidos biológicos. Por otro lado, el ácido siríngico es el derivado que presenta una menor sensibilidad analítica, aun así, presenta un límite de detección de 21,49 ng/mL.

Como se ha indicado anteriormente, en la matriz de calibración se han introducido los espectros correspondientes a 3 disoluciones blanco, siendo la orina de estas disoluciones procedente de una misma persona. Se planteó introducir en el set de calibración, además de las tres disoluciones anteriores, que todas las muestras de calibración y predicción tuvieran la misma cantidad de orina y que lo único que variase en cada muestra fuera la concentración de cada uno de catabolitos objeto de estudio.

Con el fin de encontrar el blanco de orina, se tomaron muestras de diferentes personas adultas sanas, las cuales habían sido sometidas a una dieta donde no se incluían alimentos vegetales ricos en

flavonoides, además para comprobar los resultados, se compararon los datos con la orina de un lactante, encontrando idénticos resultados.

Cada una de las muestras, fue adicionada de forma apropiada con tres niveles de concentración de ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 3-hidroxifenilacético y ácido siríngico. Siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, se realizó la predicción de las concentraciones de los tres analitos, utilizando para ello el set de calibración propuesto y los resultados obtenidos en la Tabla 6.17.

A raíz de estos datos se puede observar los porcentajes de recuperación para cada catabolito en muestras de orina, mediante los datos representados en la Figura 6.40.

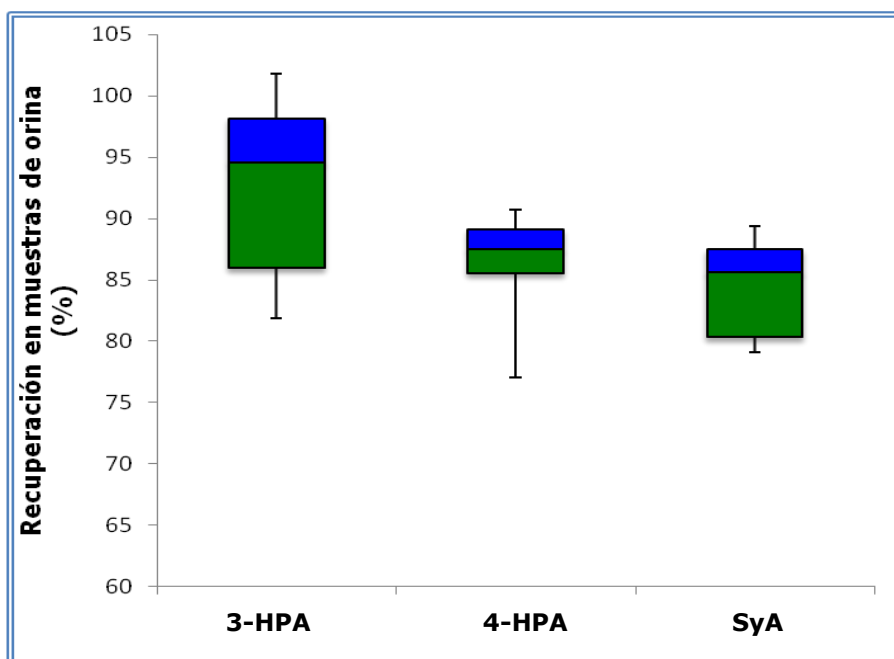


Figura 6.40. Porcentajes de recuperación de ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 3-hidroxifenilacético y ácido siríngico utilizando PLS en muestras de orina.

De acuerdo con los resultados mostrados en las tablas anteriores, se concluye, que cuando se hace uso de matrices de calibración y predicción en muestras reales de orina, se obtienen resultados bastante mejorables, siendo el ácido 3-hidroxifenilacético, el que presenta una mejor recuperación y tanto el ácido 4-hidroxifenilacético, como el ácido siríngico

presentan recuperaciones más bajas y en algunas muestras de predicción, con un error superior a lo esperado, para poder observarlo detalladamente, se ha representado en la Figura 6.41.

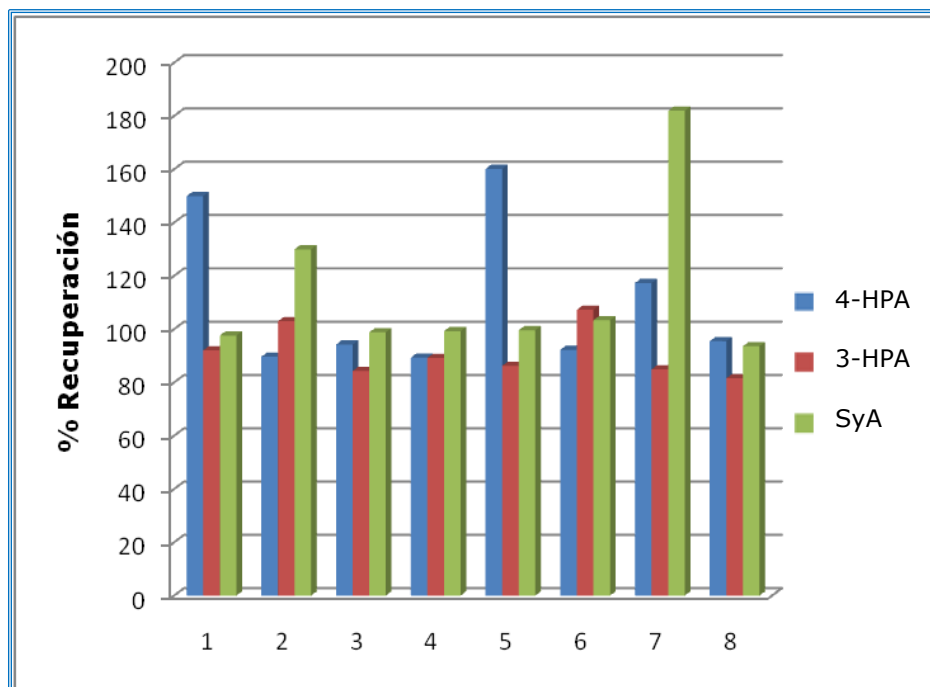


Figura 6.41. Recuperaciones medias de ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 3-hidroxifenilacético y ácido siríngico utilizando PLS en muestras de orina de ocho muestras problema.

Los parámetros estadísticos del modelo PLS que se ha recogido hasta el momento, no han sido todo lo satisfactorios que cabría esperar. Se espera poder mejorarlo de manera significativa, en el siguiente apartado del presente trabajo de investigación, con la aplicación de métodos de calibración multivariantes de segundo orden.

6.6. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE ÁCIDO SIRÍNGICO, ÁCIDO 4-HIDROXIFENILACÉTICO Y ÁCIDO 3-HIDROXIFENILACÉTICO MEDIANTE PARAFAC. UTILIZACIÓN DE MATRICES DE EXCITACIÓN Y EMISIÓN

6.6.1. Condiciones experimentales

Como se ha expuesto anteriormente, los catabolitos de flavan-3-oles estudiados, presentan una importante fluorescencia en disolución. Estas propiedades fluorescentes están muy influenciadas por las condiciones del medio, como es el disolvente empleado, la acidez fijada y, como se pudo demostrar, por el grado de rigidez del mismo. En el presente capítulo, se han optimizado unas condiciones experimentales, que nos permiten llevar a cabo su estudio de forma simultánea, mediante el análisis de sus propiedades fluorescentes.

La posibilidad de determinar estos tres analitos de forma simultánea en orina, se pudo llevar a cabo mediante PLS. Sin embargo, en presencia de orina, y aplicando calibración multivariante de primer orden, dicha resolución no fue del todo fructuosa; ya que el grado de solapamiento entre las señales de los analitos y la orina, es tan elevado que desborda las capacidades resolutivas de metodologías tales como PLS. Hay que recordar, llegados a este punto, que PLS utiliza para la calibración, matrices de calibración compuestas por mezclas patrón de los analitos de interés.

En las condiciones experimentales indicadas anteriormente, la máxima información fluorescente de estos tres flavonoides, se obtiene entre las longitudes de onda de emisión comprendidas entre 280-400 nm, fijando la excitación en 240 nm, y entre las longitudes de onda de excitación comprendidas entre 240-290 nm, fijando la emisión en 315 nm. Cuando se realiza la calibración, se debe especificar el número de componentes que se deseen predecir y la concentración de cada uno de ellos en los patrones. También se debe elegir la zona de señales que se va a usar en el análisis. Una vez creado el modelo (o matriz) de calibración, se pueden resolver muestras de concentración desconocida. No es necesario especificar el contenido, ni la naturaleza, de aquellas sustancias que, acompañando a los

componentes en estudio, pudieran estar presentes como potenciales interferencias, aunque su influencia sobre las correspondientes señales analíticas, quedarán implícitamente recogidas en el modelo de cálculo, siendo posible por tanto la modulación de las mismas, si se encontraran presentes en las muestras reales a analizar (Olivieri, 2001). El procedimiento analítico utilizado en esta investigación tiene como objetivo, poder determinar la concentración de tres catabolitos de flavan-3-oles en muestras de orina, midiendo sus señales de fluorescencia.

Observando la Figura 6.42, nos damos cuenta que el análisis directo de 3-HPA, 4-HPA y SyA por espectrofluorimetría convencional no es posible, ya que los espectros de fluorescencia de estos compuestos, consisten en una banda ancha que se superpone significativamente en el mismo rango de longitud de onda, sobre todo para el ácido 4-hidroxifenilacético y ácido 3-hidroxifenilacético. Además, cuando se agrega orina a las muestras, la intensidad de los componentes de esta matriz se agrega a la de las muestras, aumentando significativamente la fluorescencia.

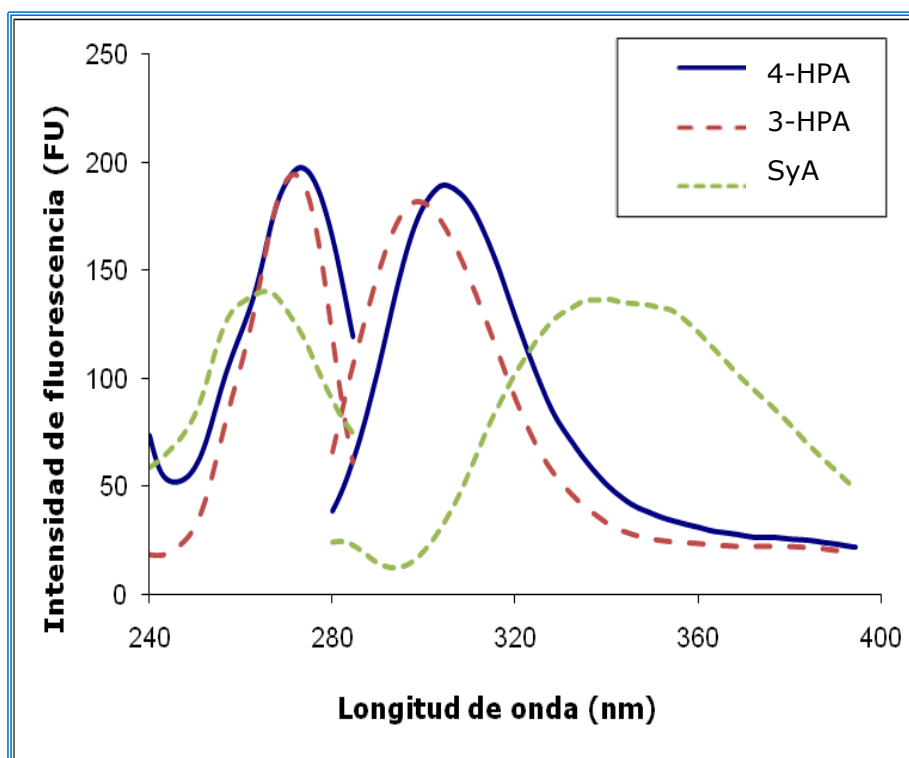


Figura 6.42. Espectros de emisión y excitación para disoluciones estándar de 4-HPA, 3-HPA y SyA. [NOR]=600 µg/L.

Los espectros de emisión se recogieron de 280 a 400 nm, y los espectros de excitación se recogieron de 240 a 290 nm. Todos Los espectros se recogieron cada 1 nm.

6.6.2 Software utilizado

Actualmente, la programación en entorno MATLAB (Li, Lan, Peng, Sun, & Zhu, 2016; Solaguren-Beascoa Fernández, 2018), está teniendo un gran auge dentro de la Química Analítica y, concretamente, dentro del campo de la quimiometría. El nombre MATLAB proviene de la contracción "*Matrix-Laboratory*". Este paquete de software presenta gran poder computacional, gráfico y de programación, todo ello en un lenguaje sencillo, lo que hace que la programación en MATLAB sea fácil de llevar a cabo. MATLAB es un sistema interactivo, donde el elemento básico es el vector, el cual no requiere una dimensionalización previa. Esto permite la resolución de un gran número de problemas computacionales, especialmente aquellos basados en el cálculo matricial y vectorial.

Para todos los cálculos realizados, se ha utilizado el paquete informático MATLAB R2013a y se ejecutó utilizando la interfaz gráfica MVC2, (Esteban-Díez, González-Sáiz, Pizarro, & Forina, 2006; Olivieri et al., 2009). El programa MVC2 (*Multivariate Calibration for Second-Order*), cuya pantalla principal se presenta en la Figura 6.43, programado bajo el entorno MATLAB, nos permite emplear diversos algoritmos tales como N-PLS, U-PLS, PARAFAC, SWATLD, BLLS y RBL (Culzoni, Goicoechea, Pagani, Cabezón, & Olivieri, 2006), permitiéndonos seleccionar las regiones espectrales, optimizar el número de factores, representar los perfiles y visualizar las gráficas de calibración pseudounivariante, (Abdel-Rahman et al., 2017; Monzón, Teglia, Delfino, & Goicoechea, 2018).

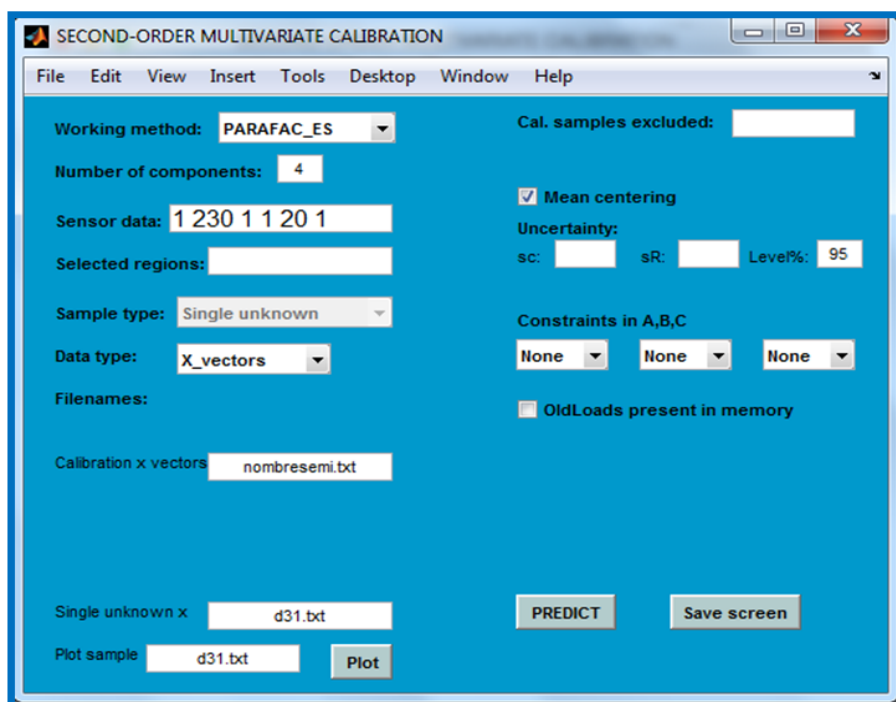


Figura 6.43. Pantalla principal para realizar cálculos de calibración multivariante de segundo orden, utilizando el paquete informático MATLAB R2013a y la interfaz gráfica MVC2.

Fijando las condiciones químicas e instrumentales optimizadas previamente, se registraron los espectros de emisión (excitando a 240 nm), en un intervalo de longitudes de onda comprendido entre 280 y 400 nm, y tomando 1 punto cada nm ($J = 121$). La excitación se registró entre 240 y 290 nm (emitiendo a 315 nm), en intervalos de 1 nm ($K=51$), con lo que se obtenía un total de 6171 puntos espectrales.

6.6.3. Matriz de calibración y set de validación

Para la construcción de la matriz de calibración del modelo, se utilizará el diseño central compuesto, para posteriormente obtener la matriz de calibrado, con una adecuada capacidad de resolución, evitando la colinealidad y abarcando un amplio rango de concentraciones.

El diseño central compuesto, se ha llevado a cabo marcando las concentraciones de cada catabolito más recomendables, según su presencia

en muestras biológicas. También se ha tenido en cuenta el rango lineal de cada compuesto por separado, según la siguiente tabla.

Tabla 6.19. Diseño experimental central, atendiendo a las concentraciones y linealidad de cada catabolito.

Central	Catabolito	Concentraciones biológicas
300 µg/L	Ácido 4-hidroxifenilacético	2,45 mg/L
335 µg/L	Ácido 3-hidroxifenilacético	4,2 mg/L
660 µg/L	Ácido siríngico	0,66 mg/L

Los patrones de la matriz de calibración se distribuyen en torno a un cubo (vértices, centro del cubo, centro de las caras, centro de las aristas, etc.). Cada uno de estos patrones, se preparó en matraces de 10 mL a partir de disoluciones concentradas de los analitos.

La matriz de calibración en el proceso optimizado, está formada por un diseño con 23 patrones de calibración. (Muestras d1-d20) y tres repeticiones del blanco (d21-d23). Las concentraciones de cada componente se recogen en Tabla 6.20, dentro de los rangos establecidos previamente de acuerdo con la concentración esperada en muestras de orina y considerando el rango lineal (Sánchez-Patán et al., 2011).

También se prepararon un total de ocho muestras formadas por mezclas ternarias (d24-d31), construidas con otras concentraciones de analito, diferentes de las empleadas para la calibración, pero dentro de los mismos intervalos de concentraciones. Este grupo de muestras será utilizado para validar el modelo.

Tabla 6.20. Composición de la matriz de calibración y del conjunto de predicción, formado por un conjunto de 23 muestras para calibración y un conjunto total de 8 muestras (d24 a d31).

		3-HPA	4-HPA	SyA
MUESTRAS	Concentración µg/L			
d1	*L:A-a	47,7311	335,0000	350,0000
d2	*H:A-a	552,2689	335,0000	350,0000
d3	*L:B-a	300,0000	57,5042	350,0000
d4	*H:B-a	300,0000	612,4958	350,0000
d5	*L:C-a	300,0000	335,0000	47,2773
d6	*H:C-a	300,0000	335,0000	652,7227
d7	Cube001a	150,0000	170,0000	170,0000
d8	Cube002a	450,0000	170,0000	170,0000
d9	Cube003a	150,0000	500,0000	170,0000
d10	Cube004a	450,0000	500,0000	170,0000
d11	Cube005a	150,0000	170,0000	530,0000
d12	Cube006a	450,0000	170,0000	530,0000
d13	Cube007a	150,0000	500,0000	530,0000
d14	Cube008a	450,0000	500,0000	530,0000
d15	Cent-a	300,0000	335,0000	350,0000
d16	Cent-b	300,0000	335,0000	350,0000
d17	Cent-c	300,0000	335,0000	350,0000
d18	Cent-d	300,0000	335,0000	350,0000
d19	Cent-e	300,0000	335,0000	350,0000
d20	Cent-f	300,0000	335,0000	350,0000
d21	Blanco	0,0000	0,0000	0,0000
d22	Blanco	0,0000	0,0000	0,0000
d23	Blanco	0,0000	0,0000	0,0000
d24	Muestra	100,0000	100,0000	660,0000
d25	Muestra	100,0000	660,0000	100,0000

d26	Muestra	660,0000	100,0000	100,0000
d27	Muestra	400,0000	400,0000	50,0000
d28	Muestra	400,0000	50,0000	400,0000
d29	Muestra	50,0000	400,0000	400,0000
d30	Muestra	50,0000	50,0000	50,0000
d31	Muestra	660,0000	660,0000	660,0000

Para cada uno de estos patrones, se registrará su correspondiente espectro de excitación/emisión, según las condiciones establecidas, para posteriormente predecir dichas muestras mediante el modelo PARAFAC optimizado.

Para llevar a cabo esta calibración multivariante, se deben de tener en cuenta tres puntos importantes, que hay que reseñar a la hora de aplicar el modelo PARAFAC para datos fluorescentes:

- Cómo establecer el número de fluoróforos.
- Cómo identificar un componente fluorescente específico, a partir de la información suministrada por el modelo.
- Cómo calibrar el modelo, de manera que nos permita obtener la concentración absoluta, de un determinado componente en una muestra desconocida.

El número de componentes N , puede estimarse de muy diferentes modos. Uno de ellos, es la consideración de uno de los parámetros internos de PARAFAC, conocido como "*Core Consistency*" (Bro & Kiers, 2003). También es posible llevar a cabo un método alternativo, y más intuitivo basado en la recta de calibración pseudounivariante, que se obtiene representando las concentraciones relativas obtenidas con PARAFAC, con respecto a las muestras de calibración. El valor correcto de N , se localiza fácilmente, cuando el error de este ajuste se estabiliza a partir de un determinado valor, como una función de un número de componentes de prueba.

La identificación de los diferentes componentes objeto de estudio, se realiza a través de los perfiles espectrales de B y C , que son extraídos de toda la información espectral a partir de PARAFAC, y que

pueden ser comparados con los generados por los patrones puros de dichos analitos. Una vez realizada la calibración, se obtiene la concentración absoluta de cada analito. Hay que tener en cuenta que, mediante la descomposición del cubo de datos, tan sólo se obtienen valores relativos A. Experimentalmente, esto se lleva a cabo preparando un conjunto de muestras patrones de concentración conocida.

Existen dos alternativas para realizar la calibración. La primera de ellas conlleva la descomposición del cubo formado por las I mezclas de calibración, y empleando B y C para la predicción de las muestras incógnitas. Este método, no aprovecha de forma completa la ventaja de segundo orden, ya que la muestra incógnita puede contener constituyentes, que no están modelados en las muestras de calibración.

Un segundo método, que ha sido el empleado por nosotros, conlleva la descomposición del cubo de datos formado por la unión de las señales de emisión-excitación de las I muestras de calibración, junto con la muestra desconocida. Este segundo método es el que se ha utilizado en el presente trabajo de investigación; con ello se logra la ventaja de la descomposición única del cubo de datos; lo cual nos permite obtener la concentración del analito de interés en presencia de interferencias no identificadas (Ahmadvand, Parastar, Sereshti, Olivieri, & Tauler, 2017; Muñoz de la Peña, Espinosa Mansilla, González Gómez, Olivieri, & Goicoechea, 2003). Ambos modos se representan en la Tabla 6.21.

Tabla 6.21. Descripción de las dos alternativas de calibración usando PARAFAC (González Gómez, 2005).

PASO	MODO 1	MODO 2
1	Construcción del cubo de datos de dimensiones $I \times J \times K$ con las I EEMs, para las I muestras de calibración	Construcción del cubo de datos de dimensiones $(I+1) \times J \times K$ con las I EEMs, para las I muestras de calibración y con la muestra incógnita
2	Descomposición del cubo para obtener A, B y C	Descomposición del cubo para obtener A, B y C

3	Identificación del analito de interés (n) a partir de los perfiles espectrales de B y C	Identificación del analito de interés (n) a partir de los perfiles espectrales de B y C
4	Determinación de la concentración relativa del analito de interés; $a_{unk} = Z^+ \text{vec}(F_{unk})$, y selección del analito de interés: $a_{unk,n}$	Realizar la regresión con el primer I elemento de la columna A_n con respecto a las concentraciones conocidas C_{cal} del analito $n: [A_{1,n} \dots A_{l,n}] = k \times C_{cal}$ (pseudocalibración univariante)
5	Realizar la regresión de los I elementos de la columna A_n con respecto a la concentración C_{cal} para el analito n: $A_n = k \times C_{cal}$	Convertir las concentraciones relativas a concentraciones absolutas de n en la incógnita, empezando por el último elemento de la columna A_n : $C_{unk} = A_{l+1,n} / k$
6	Convertir las concentraciones relativas a concentraciones absolutas de n en la incógnita: $C_{unk} = A_{unk,n} / k$	

Para el segundo método de calibración, los pasos 1-5, indicados en la Tabla 6.21, deben repetirse para cada una de las nuevas muestras a analizar. En el primer método, en el paso 4, $Z = C | \otimes | B$, donde el símbolo $| \otimes |$ significa el producto Khatri-Rao (Esteban-Díez et al., 2006).

6.6.4. Análisis de las matrices de excitación-emisión fluorescente

En la Figura 6.44, se muestra el espectro tridimensional correspondiente a las intensidades de emisión-excitación fluorescente para el patrón de calibración d1, en el intervalo total de longitudes de onda de emisión y excitación. No se observa la presencia de señales de dispersión Rayleigh, ni Raman, ni armónicos de difracción.

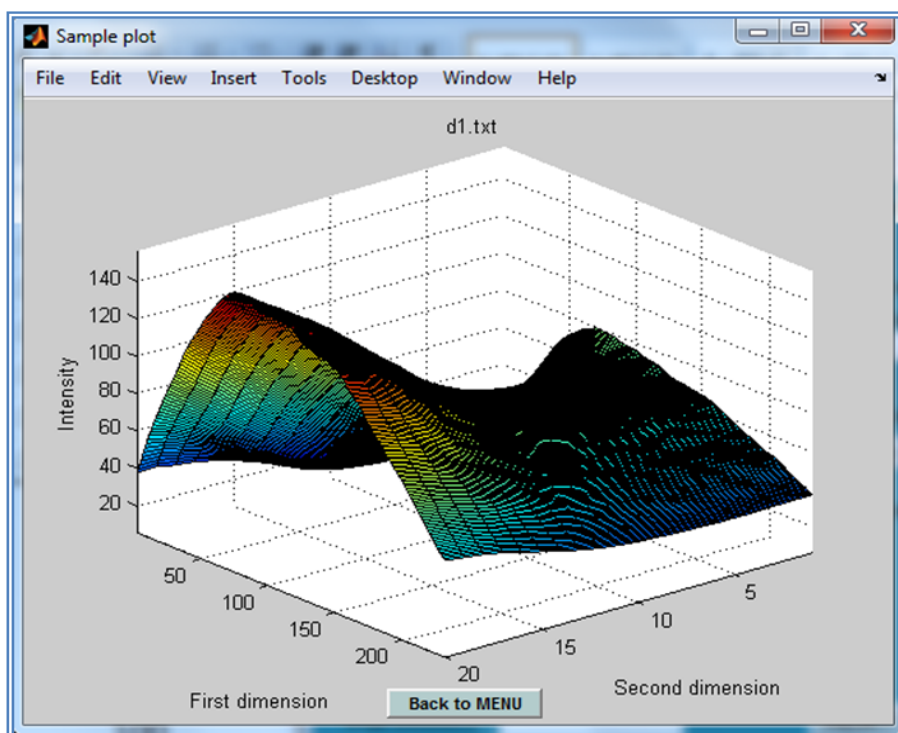


Figura 6.44. Representación tridimensional de emisión-excitación, para la muestra de calibración d1.

En algunas ocasiones, pueden aparecer señales procedentes de procesos que no están relacionados con la concentración de los analitos. Para solventar este hecho, se puede llevar a cabo una reducción del rango de longitudes de onda de emisión y excitación, tanto para la calibración como para la cuantificación de las muestras problemáticas.

En el punto 6.5.3, de este capítulo se registraron los espectros unidimensionales de emisión fluorescente, para el conjunto de muestras de la Tabla 6.20. El modelo PLS desarrollado no fue muy satisfactorio y por tanto, se espera poder mejorarlo de manera significativa, con la aplicación de métodos de calibración multivariante de segundo orden.

Los datos tridimensionales de emisión-excitación para el conjunto de predicción d24-d31, fueron también analizados mediante PARAFAC, utilizando el modo 2, según Tabla 6.21.

6.6.5. Aplicación de PARAFAC al análisis de muestras de orina

Se prepararon un total de 8 muestras (d24-d31), conteniendo contenidos diferentes de los analitos objeto de estudio, en presencia de orina. Además, todas las matrices de calibración contaban con la cantidad adecuada de orina y de cada uno de los tres analitos. Una vez transcurrido un periodo de 30 minutos, con objeto de favorecer las posibles interacciones entre los analitos y el suero, se realizó una dilución (1:100), de manera que la concentración final de los analitos quedase dentro de los rangos de calibración. Además, las muestras en sus condiciones óptimas, no tienen añadido ningún agente surfactante ni tampón, para regular la rigidez y acidez del medio.

Para obtener resultados aceptables en las muestras de orina, se debe tener en cuenta la presencia de componentes fluorescentes en la orina no modelados, ya que la influencia de estos posibles componentes no ha sido tenida en cuenta en la calibración. Estos compuestos fluorescentes de la orina, no sólo presentan emisiones fluorescentes que solapan con las señales fluorescentes de los analitos, sino que además son intrínsecamente variables, presentando distinta composición para individuos diferentes, lo cual dificulta la modelación, a no ser que se emplee la ventaja de segundo orden, indicada anteriormente (Adom & Liu, 2002).

En estas condiciones experimentales, se registraron los diferentes espectros, de emisión/excitación, para aplicar N-PLS, SWATLD y PARAFAC. Tanto los modelos de primer orden, como N-PLS y SWATLD, (modelados con los espectros de emisión fluorescente, y emisión-excitación respectivamente), presentan ciertas limitaciones a la hora de producir resultados aceptables en las muestras de orina d24-d31. Específicamente, son los errores de predicción (REP), los que presentan valores inaceptablemente elevados en algunos casos. Esto es debido, como ya se ha indicado, a la presencia de componentes fluorescentes en la orina no modelados, que producen emisión fluorescente y variable, la cual solapa con la de nuestros catabolitos, dificultando la modelación, y por tanto será necesario la aplicación de modelos que lleven intrínseca la ventaja del segundo orden.

El análisis de los espectros de las matrices de excitación-emisión para estos catabolitos en muestras de orina, se recogieron en el rango de longitudes de onda de: 280 a 395 nm cada 0,5 nm y de 240 a 260 nm cada 1 nm, para la emisión y excitación respectivamente, siempre manteniendo las mismas condiciones y metodología propuesta en este capítulo. En estas condiciones, cada matriz de excitación/emisión, nos proporciona 4600 puntos de datos, dicha representación se puede observar en la Figura 6.45. Esta figura representa los espectros EEMs, para una mezcla estándar libre de orina (Figura 6.45-A) y una muestra enriquecida con orina (Figura 6.45-B), registrada en las regiones espectrales mencionadas.

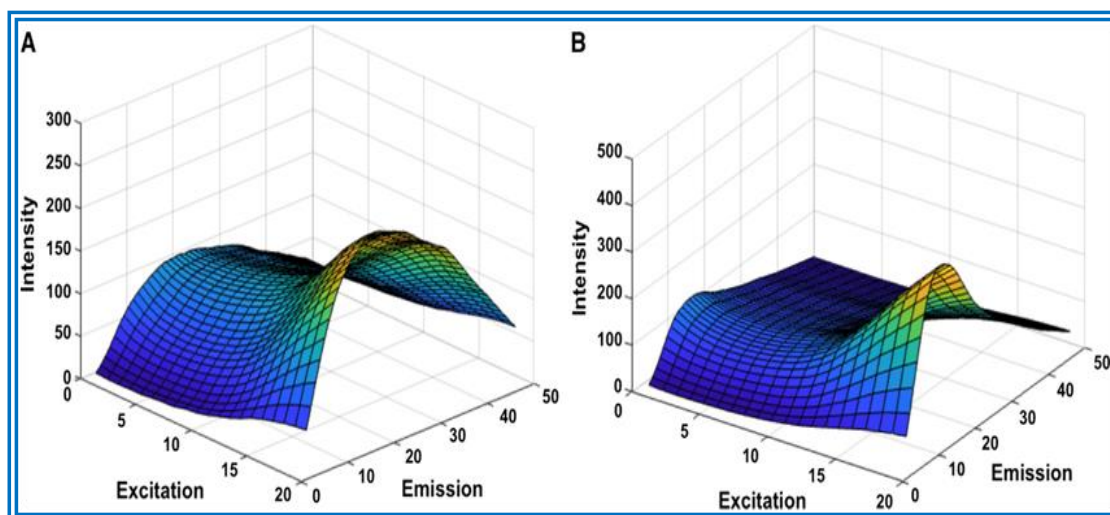


Figura 6.45. (A) Gráfico tridimensional del EEMs para la muestra estándar registrada en rangos de longitud de onda de excitación y emisión. (B) Gráfico de la EEMs para la muestra de orina enriquecida.

La contribución de la señal de fondo (orina), se puede observar en la escala vertical de los espectros de estas muestras, Figura 6.45-A y B. La muestra de orina enriquecida tiene una intensidad de fluorescencia significativamente mayor que la muestra estándar. Además, la presencia de orina en la muestra también altera considerablemente la forma de los espectros EEMs, especialmente la contribución de emisión.

Para completar nuestro estudio, se ha querido representar las diferencias que se aprecian entre dos muestras de orina, una de ellas,

exclusiva de orina, es decir, en ausencia de catabolitos, y la otra en presencia de ellos. En la siguiente Figura 6.46, se comparan los espectros.

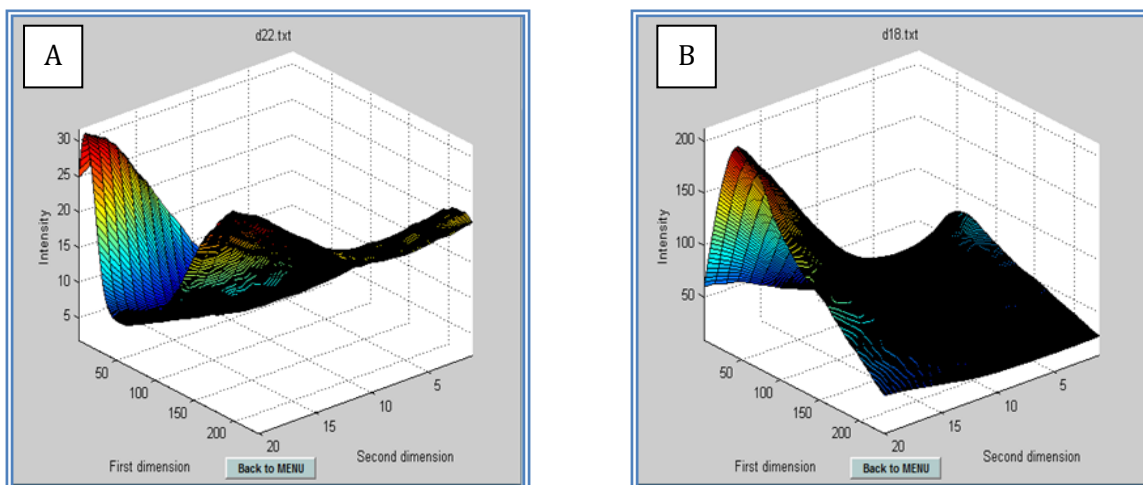


Figura 6.46. Matriz de excitación/emisión de una muestra conteniendo solo el blanco de orina (A) y en presencia de 4-HPA, 3-HPA Y SyA (B) en orina.

Hay que destacar de nuevo, la diferencia existente en la escala de la intensidad de fluorescencia. En la muestra (B) se observa que la intensidad es notablemente mayor. También se puede comprobar, cómo la señal emitida por la orina, solapa y oculta en parte la producida por los analitos.

Para aprovechar al máximo la ventaja de segundo orden, se ha aplicado de forma separada PARAFAC con un conjunto de calibración formado por las señales de emisión-excitación fluorescente de los 23 patrones (d1-d23), junto con cada una de las muestras de orina (d24-d31). Los cubos de calibración formados son para todos los casos de dimensiones 8x121x51 (I x J x K).

6.6.6. Selección del número de factores

Para llevar a cabo la selección del número óptimo de factores, se ha analizado el valor del denominado, "Core Consistency", así como el

error de la regresión puesto/encontrado. En la Figura 6.47, a modo de ejemplo, se muestran los valores obtenidos para el *Core Consistency* y el error de las rectas de regresión puesto/encontrado, para la calibración formada por los veintitrés patrones de calibrado.

Como se puede comprobar, el valor del *Core Consistency*, cae a un valor muy bajo, cuando se utilizan cinco factores espectrales para modelar la calibración, de manera que el número de factores óptimos a utilizar es N=4.

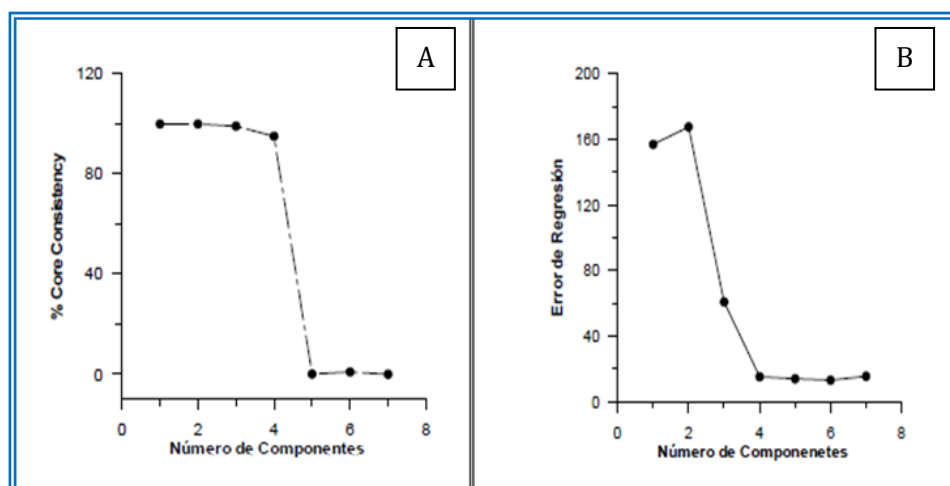


Figura 6.47. Representación del valor del Core Consistency en función del número de componentes modelados (A), y del error de regresión para la relación puesto/encontrado sobre las muestras de calibración (B).

Además de utilizar el criterio descrito anteriormente, también se puede seleccionar el número óptimo de factores, analizando la variación en el error de regresión, en la pseudoregresión univariante, en función del número de factores.

Este método debe aplicarse para cada una de las muestras incógnitas. Como se puede ver en la figura anterior, el error de regresión para los tres analitos, permanece constante cuando el número de factores es superior a cuatro, lo cual está de acuerdo, con el análisis del "*Core Consistency*".

Para todas las muestras problemas, el número de factores sigue siendo cuatro. Las muestras de calibrado se han formado con los

analitos puros en presencia de orina, y por tanto, se cuenta con los mismos elementos fluorescentes en el conjunto de datos, que en las muestras, para que PARAFAC los considere como un único componente extra, permitiendo así su modulación en muestras desconocidas de orina.

La determinación simultánea de 3-HPA, 4-HPA y SyA, mediante PRAFAC, logrará en las muestras de orina, aplicar la ventaja de segundo orden. El algoritmo PARAFAC nos proporciona directamente los perfiles espectrales de excitación y emisión, por deconvolución de las señales de los tres catabolitos y el fondo de orina. La selección del número de componentes, como ya se ha explicado, se realiza como se describe por (Lucci, Saurina, & Núñez, 2017).

6.6.7. Resultados PARAFAC

En la Figura 6.48, se puede observar el espectro de la matriz de excitación/emisión de la muestra problema d31. En la Figura 6.49, se pueden ver los perfiles de las matrices B y C, que se obtienen al procesar la muestra d31 junto con el conjunto de calibración, y tras aplicar PARAFAC. En esta figura, se han etiquetado los componentes de acuerdo con el orden asignado por el modelo en este caso concreto. Los componentes aparecen en orden, en función a su contribución al total de la varianza. En nuestro caso, la interferencia de la orina aparece en cuarto lugar, lo cual indica que no es la principal fuente de fluorescencia. Anteriormente aparecen los demás componentes del cubo de datos.

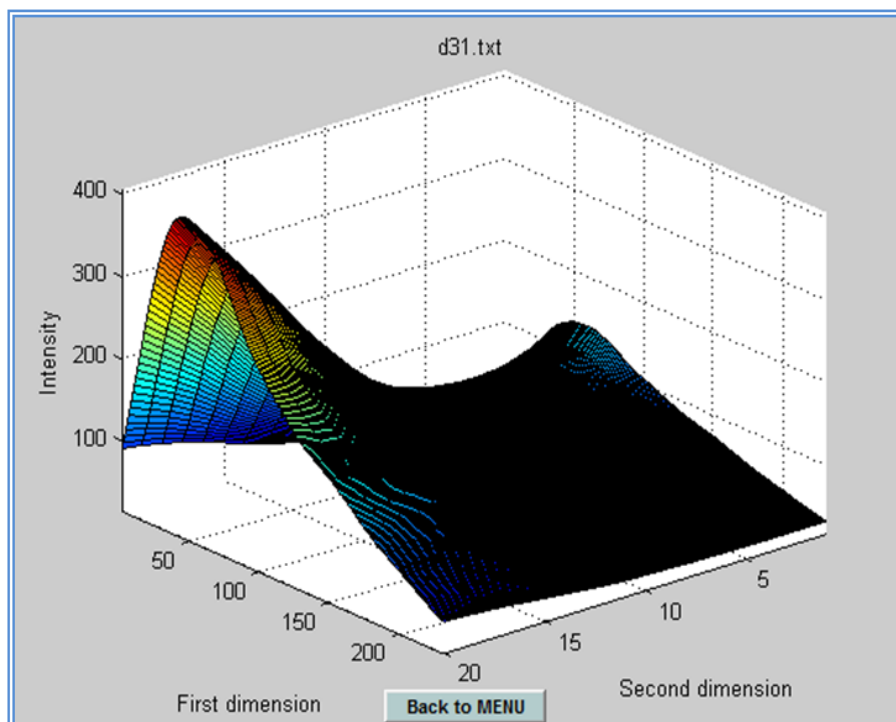


Figura 6.48. Matriz de excitación/emisión de la muestra problema d31. Las concentraciones son 660 ppb para 4-HPA, 3-HPA y SyA en orina.

Si se comparan los espectros dados por PARAFAC, con los espectros de los componentes puros, se puede asignar que el número uno corresponde al ácido sirínico, el número dos corresponde al ácido 3-hidroxifenilacético, el número tres al ácido 4-hidroxifenilacético y finalmente el número cuatro corresponde a la matriz de orina, Figura 6.49.

El hecho de que SyA (1), sea el componente que presenta una mayor semejanza en cuanto al perfil de excitación-emisión con el interferente (4), podría justificar el mayor valor de REP obtenido para ese componente.

Con los datos aportados por PARAFAC en la siguiente figura, se puede observar la deconvolución de las señales EMMs, para las muestras en orina, identificando los perfiles experimentales espectrales de cada catabolito y registrando una curva de calibración para cada uno de ellos, e identificando los espectros de la señal de fondo, Figura 6.49.

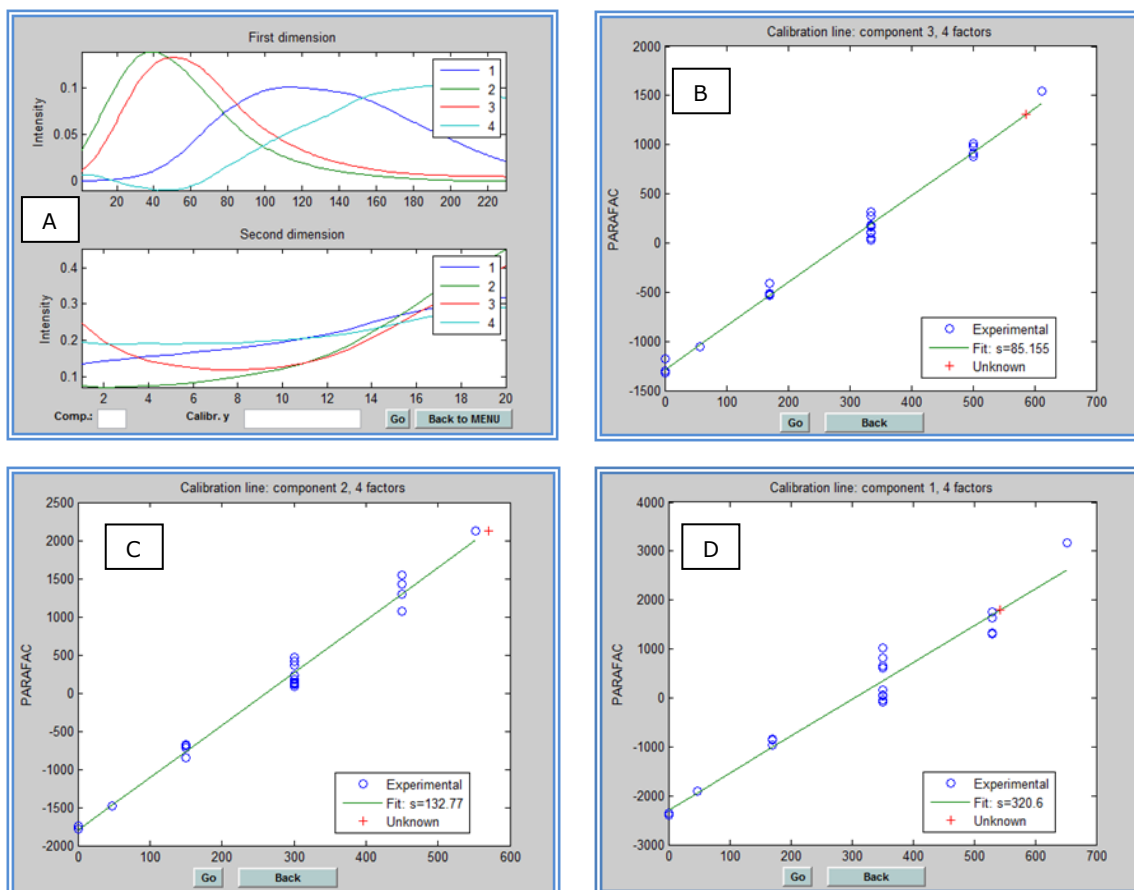


Figura 6.49. Perfiles de excitación emisión de los factores optimizados en muestras de orina y en presencia de 4-HPA, 3-HPA y SyA, utilizando PARAFAC. Calibrados de los patrones: (B) 4-HPA, (C) 3-HPA y (D) SyA, en orina.

Con los datos aportados por el algoritmo PARAFAC, somos capaces de proporcionar buenas estimaciones de concentraciones y perfiles espectrales deconvolucionados, a pesar de la gran superposición de dichos perfiles, Figura 6.50-A.

También se han construido las curvas de calibración, para poder así, poder calcular las figuras de mérito. Después de aplicar PARAFAC, el coeficiente de regresión de la calibración (R^2), para 3-HPA, 4-HPA Y SyA fue respectivamente de 0,982, 0,991 y 0,924. El valor más bajo del coeficiente de regresión es el obtenido para el SyA, debido a su menor sensibilidad y la mayor superposición con la señal de fondo, Figura 6.50-B.

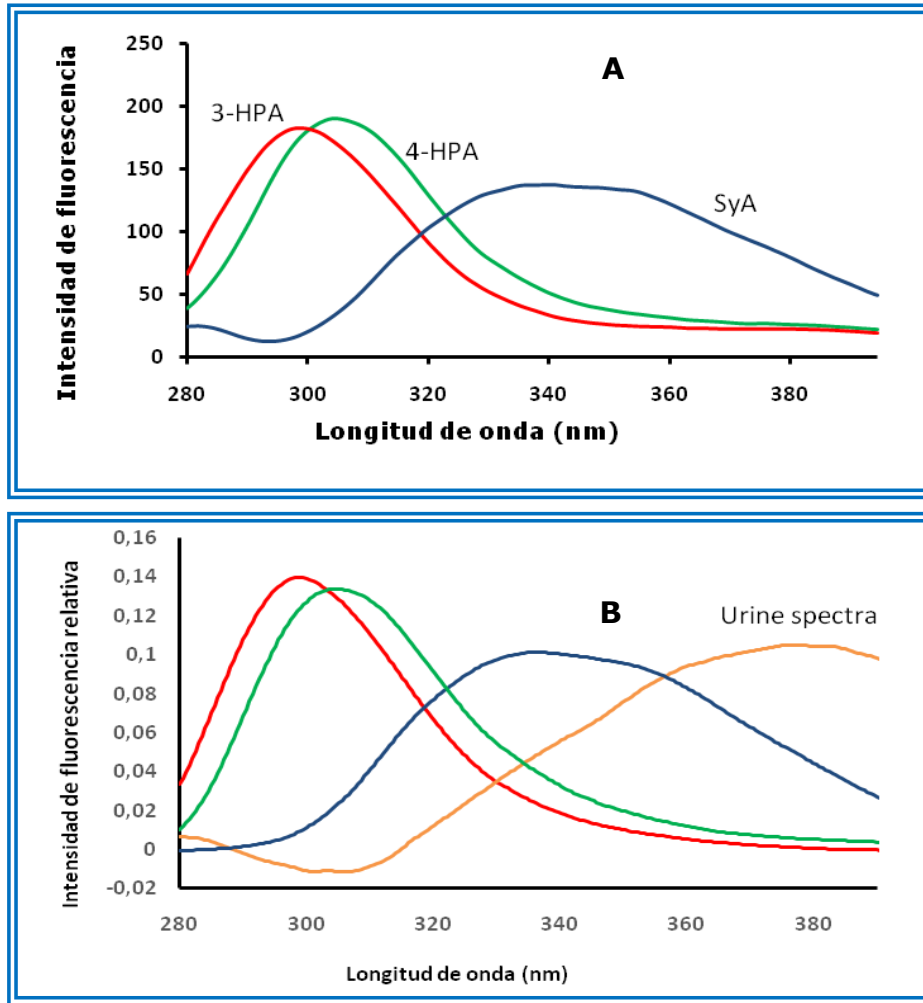


Figura 6.50. Espectros de emisión experimentales para los tres catabolitos estudiados en ausencia de orina (A) y en presencia (B).

La imagen anterior, nos representa de manera muy clara, los perfiles de emisión fluorescente proporcionados por un modelo PARAFAC de cuatro componentes, utilizando en el proceso la calibración multivariante, para la determinación simultánea de 3-HPA, 4-HPA y SyA, en orina según las condiciones experimentales. Con los perfiles espectrales y los parámetros de calibración resueltos, se puede calcular las concentraciones predichas, Tablas 6.22. En las Figuras 6.51, 6.52 y 6.53, se ha representado la concentración actual frente a la concentración predicha, para cada uno de los analitos, así como el error típico para cada medida.

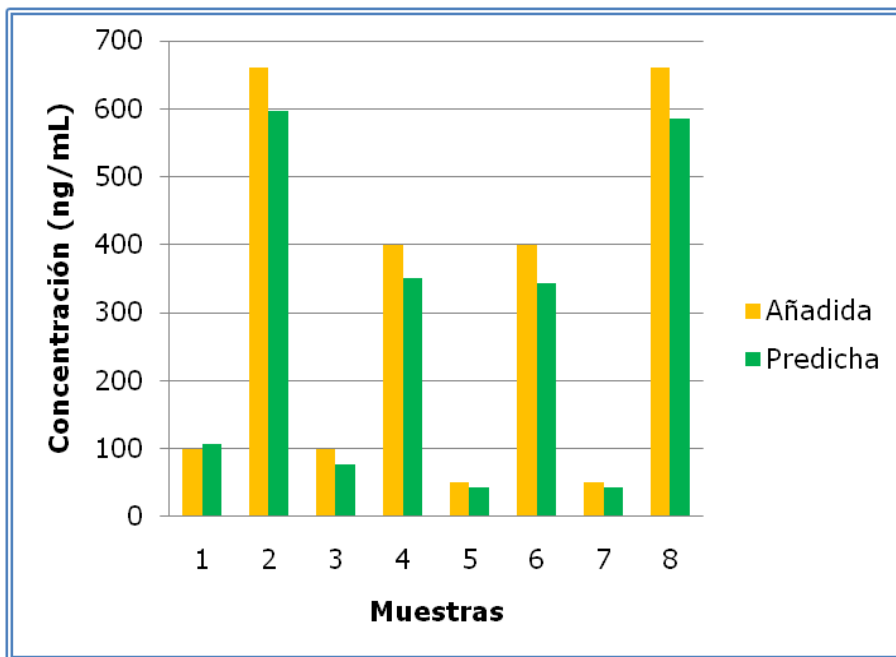


Figura 6.51. Relación entre la concentración añadida y predicha para el ácido 4-hidroxifenilacético en muestras de orina, usando PARAFAC.

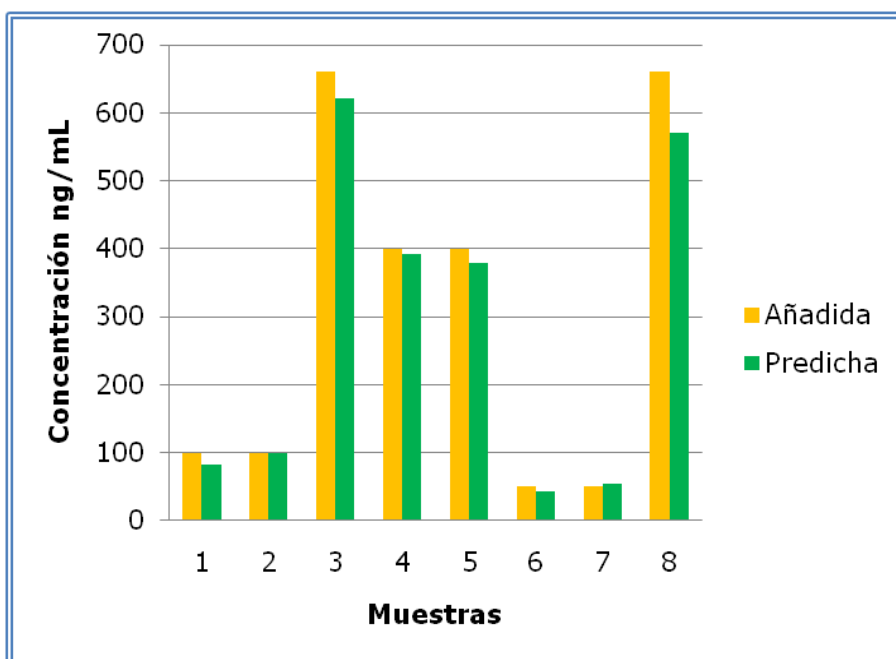


Figura 6.52. Relación entre la concentración añadida y predicha para el ácido 3-hidroxifenilacético en muestras de orina, usando PARAFAC.

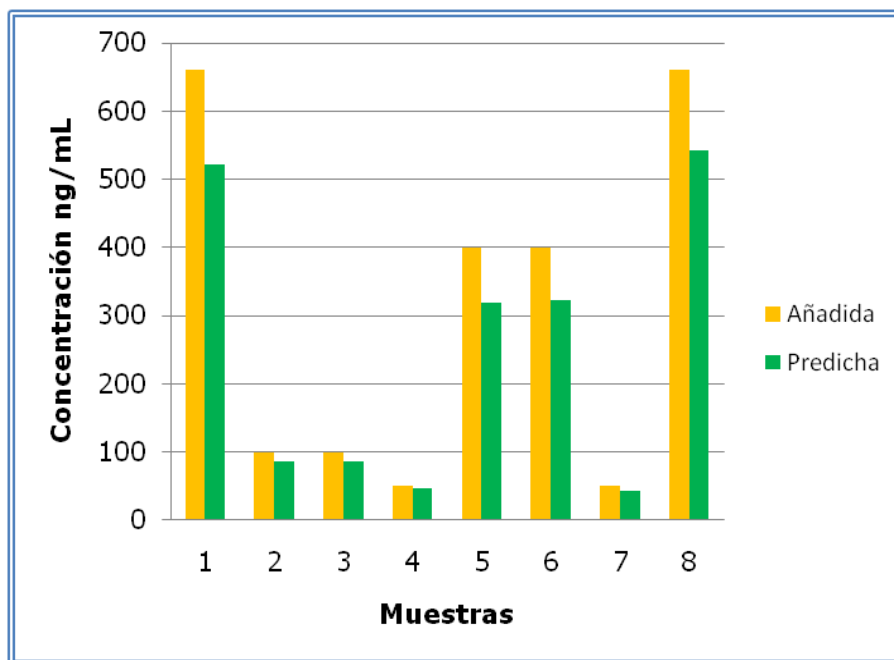


Figura 6.53. Relación entre la concentración añadida y predicha para el ácido síringico en muestras de orina, usando PARAFAC.

La matriz optimizada mediante PARAFAC, ha sido aplicada a la determinación del componente individual en muestras de orina, junto con los otros analitos objeto de estudio.

La matriz de calibración en orina optimizada, también contempla una serie de blancos, con el objetivo de modelar la señal adecuadamente.

En las siguientes tablas, se puede observar las concentraciones teóricas y calculadas, junto con el porcentaje de recuperación en cada caso.

Las Tablas 6.22, resumen los valores de concentración encontrados para los tres componentes, en el conjunto de muestras de orina analizada, utilizando 4 factores.

Tablas 6.22. Aplicación del modelo PARAFAC optimizado a la resolución de mezclas ternarias de ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 3-hidroxifenilacético y ácido siríngico en orina. RMSEP, error de predicción de la raíz cuadrática media; REP%, error relativo de predicción.

Muestras de validación	ÁCIDO 4-HIDROXIFENILACÉTICO		
	CT	CC	%R
d24	100	107,1	107,1
d25	660	596,1	90,31
d26	100	77,08	77,08
d27	400	351,7	87,92
d28	50	43,51	87,02
d29	400	343,1	85,77
d30	50	42,44	84,88
d31	660	585,4	88,69
Recuperación Media %	88,59		
RMSEP	44,5		
REP%	8,43		

Muestras de validación	ÁCIDO 3-HIDROXIFENILACÉTICO		
	CT	CC	%R
d24	100	81,91	81,91
d25	100	98,63	98,63
d26	660	622,0	94,24
d27	400	392	98
d28	400	379,5	94,87
d29	50	42,48	84,96

d30	50	53,71	107,42
d31	660	569,6	86,30
Recuperación Media %	93,29		
RMSEP	36,2		
REP%	8,41		

Muestras de validación	ÁCIDO SIRÍNGICO		
	CT	CC	%R
d24	660	522,1	79,10
d25	100	86,49	86,49
d26	100	85,9	85,9
d27	50	46,05	92,1
d28	400	319,4	79,85
d29	400	321,9	80,47
d30	50	42,64	85,28
d31	660	542,4	82,18
Recuperación Media %	83,92		
RMSEP	66,5		
REP%	4,80		

Como conclusión de estas pruebas, se observa que es para el caso del ácido siríntrico, donde se obtienen peores resultados. Los estudios de recuperación se llevaron a cabo mediante la comparación de la concentración teórica y la concentración predicha por el algoritmo PARAFAC. Las recuperaciones medias para el 3-HPA, 4-HPA y SyA fueron: 93%, 89% y 85% respectivamente, para el rango de concentración marcado entre 50 y

660 µg/L. El estudio de la dispersión de los resultados se representa en la Figura 6.54, donde se puede observar, que la mayor dispersión se produce para el 3-HPA y la menor para el 4-HPA, aun así, los resultados son muy buenos, con dispersiones menores al 10%

Se puede deducir que aplicando PARAFAC, a los catabolitos estudiados en orina, aunque la muestras tengan fuerte influencia con la concentración de los otros compuestos presentes en la matriz biológica, se obtienen muestras con valores adecuados y buenos porcentajes de recuperación.

Los parámetros de calidad, denominados en la bibliografía como figuras de mérito, son empleados normalmente y tienen gran utilidad para la comparación entre métodos. La sensibilidad (SEN) para un analito en concreto, por ejemplo, se estima como la señal neta de ese analito en unidades de concentración. La selectividad (SEL), es calculada como la relación entre la sensibilidad y la señal total (Burns et al., 2002). Más interesante resulta el concepto de sensibilidad analítica, definido, con analogía con la calibración univariante, como la relación entre la sensibilidad y el ruido espectral.

$$\gamma = \text{SEN}/[\text{V(R)}]^{1/2} \quad \text{Ecuación 6.1.}$$

La inversa (γ^{-1}) establece la mínima diferencia en concentración, que puede ser apreciada por el método, teniendo en cuenta la técnica, el equipo y la escala empleada (Lucci et al., 2017). El término V(R) es la varianza de la señal instrumental, que se estima mediante la medida de réplicas del blanco. Los errores estándares, en las concentraciones predichas $[\text{s(c)}]$ han sido calculados según la representación pseudounivariante proporcionada por PARAFAC, Tabla 6.21 (Xu, Wang, Pu, Tao, & Zhang, 2017; Zafrilla, Ferreres, & Tomás-Barberán, 2001).

$$\text{s(c)} = [\text{SEN}^{-2}(1 + h)\text{V(R)} + h\text{V(c)}]^{1/2} \quad \text{Ecuación 6.2.}$$

Donde $V(c)$ es la varianza en la medida de las concentraciones de los patrones de calibración. Finalmente, el parámetro h es el nivel del analito, que nos indica lo alejado que está esa muestra del centro de la calibración, y es la misma que en los modelos clásicos de orden cero.

$$h = (C_{\text{unk}} - \bar{C}_{\text{cal}})^2 / \sum_{i=1}^l (C_{\text{cal},i} - \bar{C}_{\text{cal}})^2 \quad \text{Ecuación 6.3.}$$

Donde c_{unk} es la concentración predicha para la muestra incógnita, $c_{\text{cal},i}$ es la concentración del i -ésimo patrón de calibrado y \bar{c}_{cal} es la media de las concentraciones de los patrones de calibrado. El cálculo de $s(c)$ nos permite calcular el límite de detección del método, como (Xu et al., 2017).

$$\text{LOD} = 3,3 S(0) \quad \text{Ecuación 6.4.}$$

Donde $S(0)$ es la desviación estándar de la concentración predicha del analito de interés, en la muestra del blanco. Esto se calcula fijando $c_{\text{unk}} = 0$ en la ecuación anterior.

Los valores de errores estándar en las concentraciones predichas, que aparecen en la Tabla 6.23, se calcularon utilizando como valor auxiliar de $V(R) = 0,25$ en unidades de fluorescencia al cuadrado, y $V(c)$ se estima del error de propagación en las concentraciones preparadas.

Los parámetros de calidad obtenidos tras aplicar el método PARAFAC, para el set de calibración, han sido calculados mediante la aplicación del software MVC2; de este modo se hallaron, y se representan en la siguiente tabla.

Tabla 6.23. Parámetros de calidad para cada analito en muestras de orina, usando PARAFAC.

FIGURA DE MÉRITO	4-HPA	3-HPA	SyA
LOD (ng/mL)	52,62	39,15	48,82
Sensibilidad (SEN) (FU·ng/mL)	2,37	2,37	3,55
Selectividad (SEL) (ng/mL)	0,348	0,348	0,0971
Sensibilidad Analítica (γ) (ng/mL)	1,93	3,39	5,16
(γ^{-1}) (FU·ng/mL)	0,51	0,29	0,19
Lineal range (ng/mL)	0-670	0-670	0-670

(FU, unidades de fluorescencia arbitrarias.)

El método propuesto resume las cifras de mérito, donde como se puede observar los datos de sensibilidad se mueven en el rango comprendido entre 2,37 y 3,55 $\mu\text{g/L}$; los valores de selectividad fueron de: 0,348 para el 3-HPA y 4-HPA y de 0,971 $\mu\text{g/L}$ para el SyA. Los LOD obtenidos fueron de 39,15 $\mu\text{g/L}$, 52,64 $\mu\text{g/L}$ y 40,82 $\mu\text{g/L}$, para 3-HPA, 4-HPA y SyA, respectivamente.

El analito que presenta menor selectividad es el ácido siríngico, por lo que presenta un mayor límite de detección, con respecto a los ácidos 3 y 4-hidroxifenilacético. Los resultados obtenidos, deben ser considerados como satisfactorios, teniendo en cuenta la complejidad de las muestras estudiadas. La determinación simultánea de estos tres catabolitos de flavan-3-oles en orina humana, no es más que un ejemplo limitado del potencial de estos métodos en el campo del bioanálisis.

Como se ha indicado anteriormente, en la matriz de calibración se han introducido los espectros correspondientes a 3 disoluciones blanco, siendo la orina de estas disoluciones procedente de una misma persona. Se planteó introducir en el set de calibración, además de las tres disoluciones anteriores, que todas las muestras de calibración y predicción tuvieran la misma cantidad de orina y que lo único que variase en cada muestra fuera la concentración de cada uno de catabolitos objeto de estudio.

Se tomaron muestras de diferentes personas adultas sanas, las cuales habían sido sometidas a una dieta, donde no se incluían alimentos vegetales ricos en flavonoides. Para comprobar los resultados obtenidos, se compararon los datos con la orina de un lactante, encontrando idénticos resultados.

Cada una de las muestras fue adicionada de forma apropiada con tres niveles de concentración de ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 3-hidroxifenilacético y ácido siríngico. Siguiendo el procedimiento anteriormente descrito, se realizó la predicción de las concentraciones de los tres analitos, utilizando para ello el set de calibración propuesto y los resultados obtenidos en las Tablas 6.22.

Realizando un cálculo estadístico sencillo, se pueden determinar una serie de parámetros, a partir de los cuales se pueden predecir los porcentajes de recuperación de cada catabolito en orina, Tabla 6.24.

Tabla 6.24. Datos para calcular los porcentajes de recuperación, usando PARAFAC.

	3-HPA	4-HPA	SyA
Average	93,292557	88,599394	84,950133
Min	81,91	77,08	79,106061
Q1	85,967273	85,55125	80,31875
Median	94,558712	87,4725	85,59
Q3	98,1575	89,102273	87,4675
Max	107,42	107,1	92,1
25th	85,967273	85,55125	80,31875

50th	8,5914394	1,92125	5,27125
75th	3,5987879	1,6297727	1,8775
Min	4,0572727	8,47125	1,2126894
Max	3,5987879	1,6297727	1,8775

A raíz de estos datos, se puede observar los porcentajes de recuperación para cada catabolito en muestras de orina, mediante los datos representados en Figura 6.54.

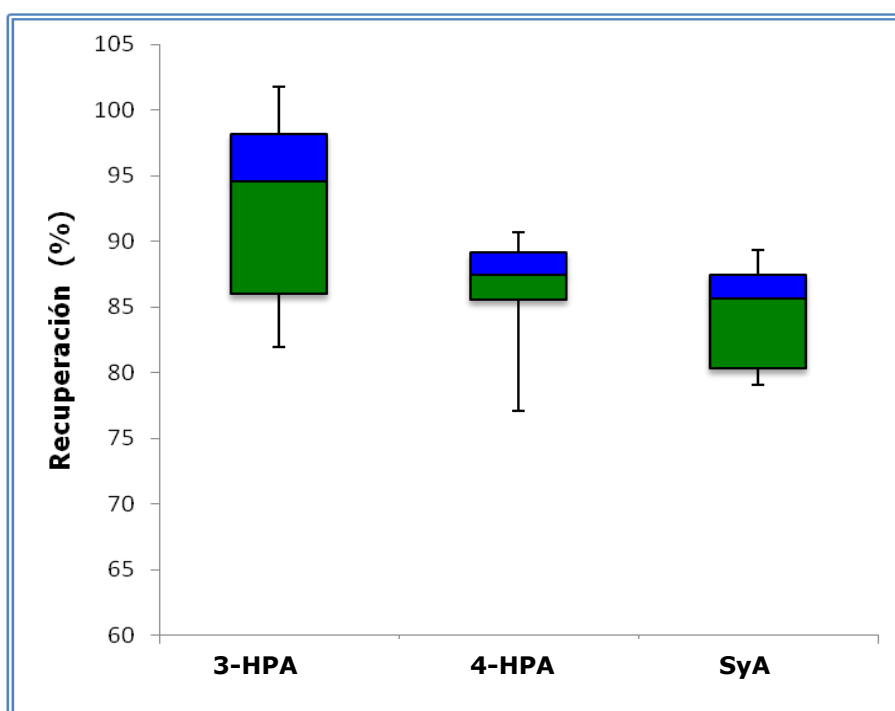


Figura 6.54. Porcentajes de recuperación de 4-HPA, 3-HPA y SyA en muestras de orina, usando PARAFAC.

De acuerdo con los resultados mostrados en las tablas anteriores, se observa que haciendo uso de las matrices de excitación/emisión en muestras reales de orina, se obtienen resultados bastante satisfactorios, siendo el ácido 3-hidroxifenilacético el que presenta una mejor recuperación y tanto el ácido 4-hidroxifenilacético como el ácido siríngico, presentan recuperaciones algo más bajas. En la Figura 6.55, puede observarse más claramente.

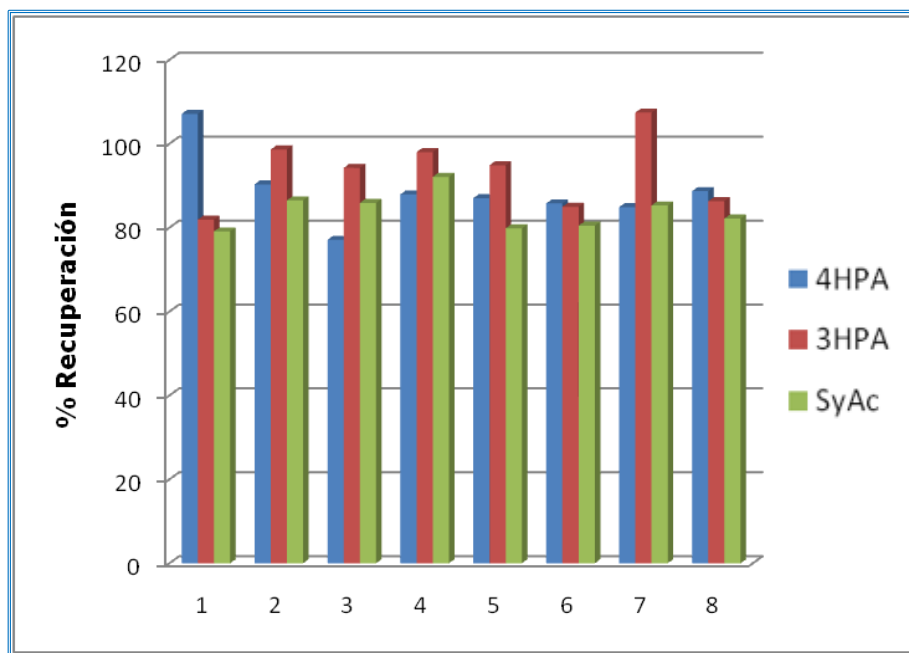


Figura 6.55. Recuperaciones medias de ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 3-hidroxifenilacético y ácido sirínigico en muestras de orina de ocho muestras problema, utilizando PARAFAC.

6.7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En esta investigación, se ha estudiado la viabilidad de la determinación simultánea de tres metabolitos fluorescentes de los flavan-3-oles en muestras de orina, utilizando el análisis de factores paralelos (PARAFAC), de sus matrices de excitación-emisión. El método optimizado ofrece adecuados LOD (39 -53 $\mu\text{g/L}$), para cuantificar estos metabolitos en las muestras de orina, con recuperaciones del 85% y el 93%. Los resultados menos satisfactorios se han obtenido para el 4-HPA y 3-HPA, isómeros con espectros solapados.

En la bibliografía se han encontrado numerosos metabolitos de polifenoles en plasma (Clifford et al., 2013; De Ferrars et al., 2014; Lee et al., 2008; Lee et al., 2012; Pereira-Caro et al., 2016; Urpi-Sarda et al., 2015), en orina (Clifford et al., 2013; Crozier et al., 2009; Crozier et al., 2010; De Ferrars et al., 2014; Hong & Mitchell, 2004; Kalt, McDonald, Liu, & Fillmore, 2017; Lee et al., 2008; Mennen et al., 2006; Monagas et al., 2010; Pereira-Caro et al., 2016; Pérez-Jiménez et al., 2010; Prior et al.,

2010; Ulaszewska et al., 2016; Urpi-Sarda et al., 2015; Urpi-Sarda et al., 2009), en heces (Aura et al., 2002; Dall'Asta et al., 2012; De Ferrars et al., 2014; Muñoz-González et al., 2012; Sánchez-Patán et al., 2011) y en otro tipo de muestras fisiológicas (Andres-Lacueva et al., 2012; Kahle et al., 2011). También en estudios "*in vitro*", se han identificado numerosos ácidos fenólicos pertenecientes a las más importantes familias de flavonoides (Deprez et al., 2000; Muñoz-González et al., 2012; Pereira-Caro et al., 2016). Algunos de estos metabolitos se han propuesto como biomarcadores en estudios de biodisponibilidad (Mennen et al., 2006; Penczynski et al., 2017; Pérez-Jiménez et al., 2010). En todos ellos, los ácidos fenólicos se encuentran en la orina en grandes concentraciones, después del consumo de productos ricos en flavonoides. Así, Ulaszewska y col. (2016) comprueba el aumento de la concentración en la orina de alguno de ellos (sulfato del ácido vanílico, ácido fenilacético y ácido hidroxifenilacético) (Ulaszewska et al., 2016). Los metabolitos del ácido gálico presentes en la orina, han resultado ser buenos biomarcadores después de la ingesta de vino (Urpi-Sarda et al., 2015). También se ha observado el aumento de ácido hipúrico, 4-HPA, 3-HPA y otros ácidos fenólicos en la orina de animales de abasto, después de consumir grandes cantidades de arándanos (Prior et al., 2010). Otros metabolitos fenólicos encontrados en la orina, se han propuestos como biomarcadores después del consumo de cacao (Urpi-Sarda et al., 2009).

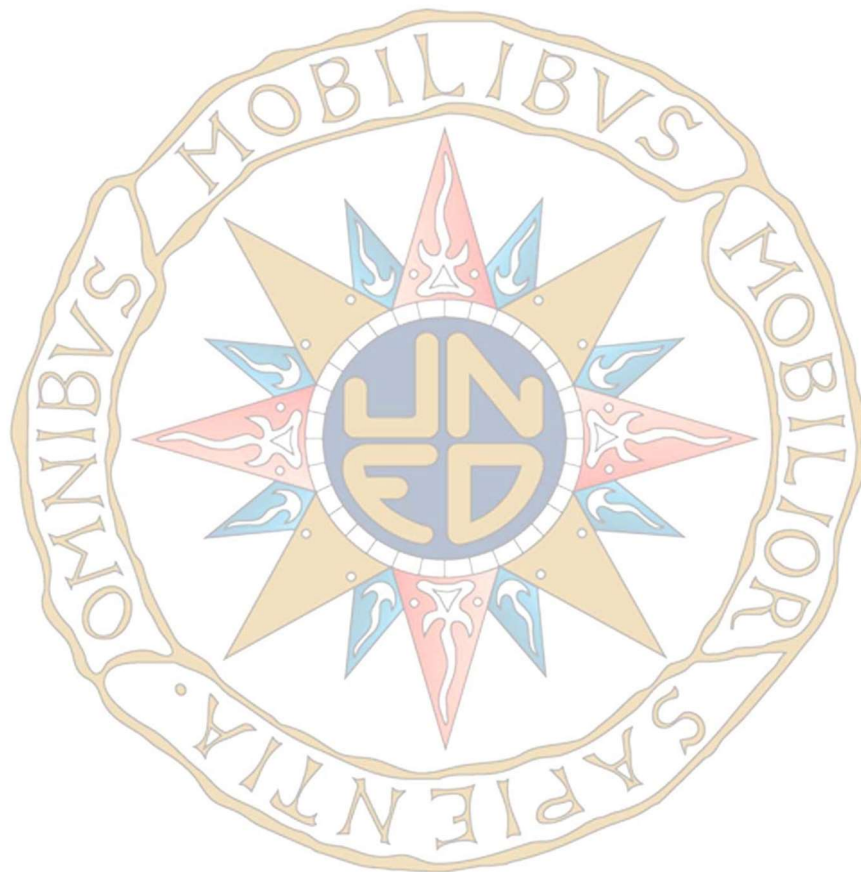
Nuestro estudio ha propuesto tres metabolitos urinarios (3-HPA, 4-HPA y SyA) como biomarcadores, dos son ácidos fenilacéticos y otro es un ácido benzoico. Las propiedades luminiscentes de estos metabolitos, han hecho posible la detección fluorescente, ofreciendo mejores niveles de sensibilidad y especificidad, al ser menos susceptible a interferencias y siendo biomarcadores fácilmente cuantificables de la ingesta de flavonoides.

En definitiva, el procedimiento analítico desarrollado presenta un método asequible y adecuado, para identificar y cuantificar estos biomarcadores en muestras de orina con un tratamiento de muestra sencillo (dilución, centrifugación y filtración). Los resultados obtenidos son muy satisfactorios, si se considera la complejidad de la muestra y las señales superpuestas. Además, PARAFAC aplicado a la determinación y

cuantificación simultánea de multicomponentes en muestras reales con matrices complejas, ha demostrado ser una herramienta interesante, sencilla, rápida, precisa y una alternativa económica a los métodos clásicos de separación. Esta técnica quimiométrica, es una herramienta poderosa y ampliamente validada, quedando demostrada la viabilidad de este procedimiento para la determinación de los tres metabolitos de flavan-3-oles, propuestos en muestra de orina.

En conclusión, múltiples evidencias sugieren que las dietas ricas en flavan-3-oles proporcionan efectos beneficiosos para la salud. Además, estudios epidemiológicos también han establecido la relación entre estos beneficiosos efectos y la ingesta de polifenoles. Aunque en la última década las investigaciones realizadas han aportado mucha información al respecto, los estudios de biodisponibilidad siguen siendo un campo de investigación relevante. En consecuencia, determinados metabolitos se han propuesto como biomarcadores de la ingesta de flavonoides en muestras biológicas, y diferentes métodos y procedimientos para su determinación se han publicado.

En esta investigación se ha propuesto una metodología sencilla y fiable, para determinar simultáneamente tres catabolitos de flavan-3-oles en muestras biológicas, biomarcadores del consumo de flavonoides, con un procedimiento rápido y barato, adecuada para cualquier estudio de biodisponibilidad. Esta metodología, está basada en el análisis de los datos de los espectros de excitación-emisión fluorescente, usando una calibración de segundo orden y el modelo trilinear PARAFAC, y su aplicación a muestras de orina.



Capítulo 7

EXTRACCIÓN SELECTIVA MEDIANTE UN PROCEDIMIENTO MISPE DE CATABOLITOS DE FLAVAN-3-OLES EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

7.1. OBJETIVO DEL ESTUDIO

El objetivo de este capítulo es la síntesis y caracterización de un polímero generado por impresión molecular (MIP), para el desarrollo de un procedimiento de extracción en fase sólida (MISPE), que permita la separación selectiva y determinación de los principales catabolitos de los flavan-3-oles en muestras biológicas.

Este objetivo lleva como primera etapa el diseño del polímero y la selección del analito plantilla y los compuestos análogos, para evaluar la afinidad y selectividad del polímero sintetizado. Posteriormente, se optimizará y validará el procedimiento de extracción en fase sólida en cartucho, utilizando el MIP sintetizado.

7.2. ESTRATEGÍA DE SÍNTESIS, ELECCIÓN DE LA PLANTILLA Y ANALITOS ANÁLOGOS

Los polímeros de impresión molecular (MIP), suponen un nuevo enfoque en la preparación de materiales funcionales. Estos polímeros, se sintetizan mediante técnicas reproducibles, y con una determinada estrategia de polimerización, dando como resultado un polímero cuyas características y comportamiento, será evaluado respecto al analito plantilla y otros compuestos análogos.

Una gran variedad de ácidos fenólicos y otros metabolitos secundarios se han detectado en la orina y heces después de la ingesta de productos ricos en flavonoides (Achaintre et al., 2016; Cortés-Martín, Selma, Espín, & García-Villalba, 2019; de Ferrars et al., 2014; Nash et al., 2018; Sasot et al., 2017; Ulaszewska et al., 2016), siendo algunos de ellos propuestos como biomarcadores en estudios de biodisponibilidad. Para la elección del compuesto plantilla no sólo se ha tenido en cuenta su representatividad del metabolismo de los flavan-3-oles, también su concentración y presencia en la muestra biológica y el tiempo en que la concentración máxima se alcanza después de la ingesta. La máxima

concentración de estos metabolitos fenólicos depende en gran medida del grupo de flavonoides y del tiempo de excreción (de Ferrars et al., 2014).

Por otro lado, en lo que respecta al polímero, la impresión no covalente se ha mostrado eficiente para compuestos de bajo peso molecular, donde las plantillas que contienen grupos ácidos están bien dirigidas utilizando monómeros funcionales básicos como la vinilpiridina (4-VPy), o monómeros de amida como la acrilamida (MA) (Cieplak & Kutner, 2016; Michailof et al., 2008). Por tanto, el monómero debe seleccionarse en función de la capacidad de formar enlaces con la plantilla, en el caso de los ácidos fenólicos, el carácter básico de la 4-Vpy ($pK_a=5,4$), la convierte en el mejor monómero candidato. La eficacia de la impresión molecular cuando se utiliza 4-Vpy como monómero, se relaciona tanto con la rigidez como con la acidez de la molécula plantilla (Michailof et al., 2008; Sun et al., 2001).

En la literatura, varios ácidos fenólicos se han utilizado con éxito como plantilla en polímeros impresos, utilizando principalmente 4-Vpy, acrilamida y ácido metacrílico como monómeros funcionales (Boscari et al., 2017; Chen et al., 2011; Denderz & Lehotay, 2012, 2014; Dmitrienko et al., 2008; Dmitrienko et al., 2006; Karasova et al., 2005; Li et al., 2013; Michailof et al., 2008; Miura et al., 2016; Sun et al., 2001).

Tras revisar la amplia bibliografía existente, se ha elegido el ácido 4-hidroxifenilacético (4-HPA) como plantilla, al ser determinado en altas concentraciones en la orina y presentar más flexibilidad que otras moléculas de ácidos fenólicos. Además, el máximo pico de excreción para el 4-HPA se ha observado a las 4-5 horas de la ingesta (de Ferrars et al., 2014).

Las propiedades de adsorción de los MIP impresos con ácidos fenólicos, varían dependiendo del número y posición de los grupos fenólicos y carboxílicos de las moléculas (Dmitrienko et al., 2008). Acorde con esto, se han elegido otros conocidos metabolitos de flavan-3-oles, presentes en la orina, para evaluar la afinidad y selectividad del MIP sintetizado, utilizando como plantilla el 4-HPA. Se ha elegido un isómero de la molécula plantilla, el ácido 3-hidroxifenilacético (3-HPA). Además, se han elegido 3 compuestos de similar estructura: el ácido 4-hidroxibenzoico (4-HBA), el ácido protocatecuíco o ácido 3,4-dihidroxibenzoico (PCA) y el ácido siríngico

o ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico (SyA). Por otra parte, la elección del 4-HBA, debido a su similitud estructural con el ácido gálico, cafeico y vanílico, dará información extrapolable al posible comportamiento de estos metabolitos respecto al MIP. Por último, también se ha incluido el ácido hipúrico (HA), propuesto por algunos autores como biomarcador de la ingesta de flavonoides (Penczynski et al., 2017).

Por lo tanto, esta investigación se centrará en la síntesis no covalente de un polímero de impronta molecular, utilizando 4-HPA como molécula plantilla y 4-Vpy como monómero funcional. Su afinidad y selectividad será evaluada frente a la molécula plantilla (4-HPA), su isómero (3-HPA), y otros catabolitos presentes en la orina (4-HBA, PCA, SyA y HA).

La utilización del MIP en un procedimiento de extracción en fase sólida puede constituir una herramienta específica, sencilla y barata para los estudios de biodisponibilidad de compuestos fenólicos. El procedimiento MISPE desarrollado, es la primera aplicación para la determinación de ácidos fenólicos en muestras de orina.

7.3. SÍNTESIS DE LOS POLÍMEROS

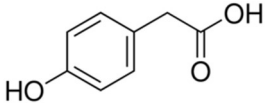
En base a la bibliografía y a experiencias anteriores de nuestro grupo de investigación, la síntesis del polímero se realizó utilizando la plantilla y monómero elegido, 4-HPA y 4-Vpy. Se utilizó etilenglicoldimetacrilato (EGDMA) como entrecruzante, 2-2-Azo-(bis)-isobutironitrilo (AIBN) como iniciador de la polimerización y acetonitrilo (ACN) como porógeno. El polímero se sintetizó en este medio para favorecer las interacciones electrostáticas y los puentes de hidrógeno entre la plantilla y el monómero funcional.

En un tubo de ensayo de 20 mL, se añadió 152 mg de 4-HPA, 431 μ L de 4-Vpy y 3,77 mL de EGDMA, manteniendo la relación molar 1:4:20 (plantilla/monómero /EGDMA). La mezcla se dejó reposar durante 5 minutos, tras los cuales se incorpora un exceso de iniciador, 50 mg de AIBN

y 10 mL de ACN como porógeno. En la Tabla 7.1, se recogen datos y proporciones de los distintos reactivos utilizados en la síntesis del MIP.

Tabla 7.1. Datos y proporciones de los distintos reactivos empleados para la síntesis del MIP en bloque para el ácido 4-hidroxifenilacético.

		Datos	Concentración Molar	Masa	Volumen
Plantilla	4-HPA	p.m.: 152,15 g/mol R: 98%	1 mmol	0,152 g	
Monómero Funcional	4Vpy	p.m.: 105,15 g/mol R: 95% d: 0,975 g/cm ³	4 mmol	0,420 g	431 µL
Entrecruzante	EDGMA	p.m.: 198,21 g/mol R: 98% d: 1,0495 g/cm ³	20 mmol	3,964 g	3,77 mL
Iniciador	AIBN	p.m.: 164,21 g/mol R: 98% d: 1,1 g/cm ³		50 mg	
Disolvente	ACN	Apolar			10 mL



4-HPA

La solución resultante de la mezcla plantilla, monómero y entrecruzante fue purgada 15 minutos con nitrógeno, y mantenida durante otros 15 minutos en un baño de ultrasonidos para eliminar la presencia de oxígeno que pudiese impedir la polimerización. Para finalizar la polimerización, la mezcla de polimerización obtenida se pasa a en un baño de hielo purgada por nitrógeno durante otros 15 minutos. Después la

mezcla se tapa y protege con papel de aluminio, sellándola para evitar la posible fotodegradación de la plantilla. Se prosigue la polimerización en un baño termostatzado de silicona a 60 °C, durante un periodo de 24 horas.

Tras este proceso, se obtiene el polímero en un bloque monolítico que es triturado y tamizado para obtener el tamaño de partícula más adecuado a la aplicación a desarrollar (50-100 μm).

Previamente, y teniendo en cuenta que la cantidad de porógeno condiciona el tamaño de las partículas en la etapa de copolimerización (Ye & Mobsbach, 2001), el volumen de porógeno se optimizó realizando diferentes experimentos variando el volumen de este de 6 a 14 mL (Tabla 7.2).

Según se puede observar en la Tabla 7.2, para volúmenes menores de porógeno (6 y 8 mL) se obtiene menor cantidad de polímero (M). Además, para volúmenes de 6 mL, debido a la dificultad de triturar el monolito no se consigue la fracción de partículas deseada. Con 8 mL de porógeno la cantidad de polímero de la fracción comprendida entre 50-100 μm (Mt) es pequeña, y el rendimiento conseguido en el proceso de tamizado, es muy bajo.

Cuando se utiliza volúmenes de 10 mL o superiores, se obtiene mayor cantidad de polímero y un buen rendimiento de la fracción deseada, comprendida entre 50-100 μm .

Por tanto, el volumen de porógeno óptimo determinado para la síntesis del MIP se fija en 10 mL de ACN, ya que, además de utilizar el volumen más bajo, se obtiene el mayor rendimiento.

Tabla 7.2. Optimización del volumen de porógeno en la síntesis del polímero.

ACN (mL)	M (g)	Partícula (μm)	Mt (g)	Rto (%)
6	3,6801	200-100	1,1123	30,2
8	7,5919	50-100	0,2823	3,7
10	10,9089	50-100	1,669	15,3
12	12,7801	50-100	1,798	14,1
14	13,6406	50-100	1,891	13,9

M: cantidad de polímero obtenida

Mt: cantidad de polímero obtenido en la fracción señalada

Rto (%): rendimiento referido a la fracción señalada

Después de triturar y tamizar el polímero, se realiza la extracción del 4-HPA. La extracción de la plantilla, se ha llevado a cabo empleando un método de extracción por microondas (MAE) utilizando 30 mL de MeOH:AcH, en relación 9:1 (v:v) (Bravo, Fernández, & Durand, 2005). La extracción se programó a una potencia de 400 W, con una rampa de temperatura durante 5 minutos hasta alcanzar los 100 °C. En ese momento, se mantiene al 85% de su potencia durante 20 minutos más. El polímero se recupera por filtración a vacío, eliminado el disolvente. El procedimiento de extracción se repitió tres veces, comprobando y asegurando de esta manera, la extracción completa de la plantilla. Posteriormente, el polímero se deja secar en estufa a 60 °C.

Una vez seca la fracción del polímero tratada, se empaqueta en cartuchos de SPE de polipropileno, con una capacidad de 3 mL entre dos fritas de 20 µm de tamaño de poro, para evitar las pérdidas de polímero durante todo el proceso MISPE.

Igual proceso, salvo la adición de la plantilla, se realizó para la obtención del polímero no impreso (NIP).

7.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS POLÍMEROS

En los últimos años se han empleado numerosas técnicas para caracterizar los polímeros de impresión molecular. Dicha caracterización implica conocer sus propiedades físico-químicas, la morfología de las partículas y la capacidad de producir un reconocimiento selectivo (De Middelmeer, Dubruel, & De Saeger, 2016).

Otras herramientas de caracterización de los polímeros de impronta molecular, que incluimos en este apartado, es su evaluación como material adsorbente mediante la determinación de su capacidad de

adsorción (isotermas de adsorción) (Hua et al., 2018; So et al., 2018), su selectividad hacia determinados adsorbatos y la cinética de adsorción.

7.4.1. Caracterización morfológica

Las técnicas analíticas más importantes, empleadas en la caracterización morfológica de polímeros, se basan principalmente en la observación microscópica de la superficie del polímero y en la medida del tamaño de partícula y la porosidad del mismo.

El estudio morfológico del polímero determinará las posibles aplicaciones del mismo, si las partículas pueden usarse en columnas o en superficies, informando, por ejemplo, sobre los posibles problemas de contrapresión durante aplicaciones SPE (Regal, Díaz-Bao, Barreiro, Cepeda, & Fente, 2012). Cuanto más pequeñas son las partículas, mayor es el volumen de la superficie y por tanto, mayor probabilidad de unión de moléculas objetivo (De Middeleer et al., 2016). Técnicas como la microscopía electrónica (EM) y la absorción de gases (BET), pueden proporcionar información sobre la geometría, porosidad y el tamaño de las partículas que forman el polímero.

SEM

El microscopio electrónico de barrido (SEM o *Scanning Electron Microscope*), es un instrumento capaz de ofrecer una variada información de la superficie del polímero, tanto de materiales orgánicos como inorgánicos. Este tipo de microscopio utiliza un haz de electrones en lugar de un haz luminoso, obteniéndose así una imagen de gran resolución. Es el mejor método adaptado al estudio de la morfología de superficies. La técnica requiere que las muestras sean conductoras, si no lo son, se recubren con una fina capa de metal, como puede ser el oro, para conferirles ese carácter conductor. Esta sencilla técnica de preparación de muestra recibe el nombre de "sputtering" o pulverización catódica.

Una vez preparada la muestra, el SEM barre la superficie con electrones acelerados a través del cañón del instrumento. Este haz, con una energía que va desde unos cientos de eV hasta unas decenas de keV, se focaliza sobre la superficie de la muestra, de forma que realiza un barrido de esta siguiendo una trayectoria de líneas paralelas y detectados mediante lentes basadas en electroimanes, midiendo la cantidad e intensidad de electrones que devuelve la muestra.

Hay dos formas de radiación fundamental, por una parte, los electrones secundarios y por otra, los electrones retrodispersados. Los electrones secundarios son de baja energía, del orden de las decenas de eV, resultantes de la emisión por parte de los átomos que constituyen la muestra, siendo los que están más cercanos a la superficie, debido a la colisión con el haz incidente. Por otro lado, los electrones retrodispersados son electrones del haz incidente, que han interactuado con los átomos de la muestra siendo reflejados. La intensidad de estas emisiones varía en función del ángulo que forma el haz incidente con la superficie del material, es decir, depende de la topografía de la muestra.

La señal emitida por los electrones y la radiación resultante del impacto, se recogen mediante un detector y se amplifican para cada posición de la sonda. Las variaciones en la intensidad de la señal, que se producen conforme la sonda barre la superficie de la muestra, se utiliza para variar la intensidad de la señal en un tubo de rayos catódicos, que se desplaza con la sonda, resultando una relación directa entre la posición del haz de electrones y la fluorescencia producida en el tubo de rayos catódicos. El resultado será una imagen topográfica muy ampliada de la muestra (Krinsley, Pye, Boggs Jr, & Tovey, 2005).

Las partículas de los polímeros sintetizados, MIP y NIP, fueron examinadas con un microscopio electrónico de barrido (SEM S-3000N). Todas las muestras fueron recubiertas por pulverización catódica de Au/Pd (Polaron Range SC7620), debido a la baja conductividad eléctrica de las muestras. En la Figura 7.1, se pueden observar imágenes microscópicas SEM, de las partículas de los polímeros preparados en bloque, después del proceso de triturado y tamizado.

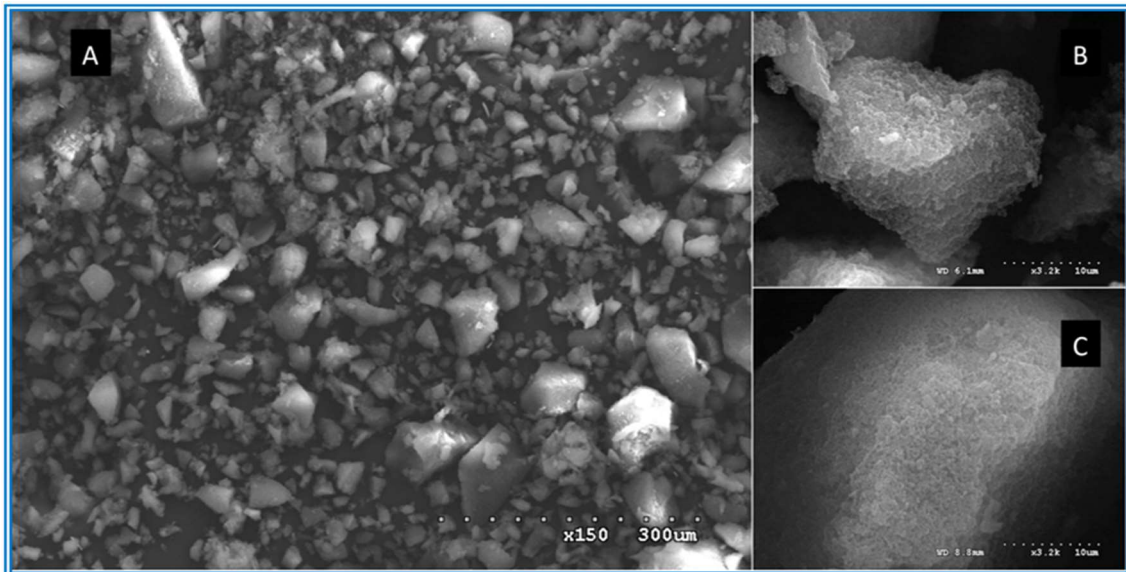


Figura 7.1. Imágenes SEM de los polímeros sintetizados. A y B muestran las partículas del MIP, aumento x150 y x3200, respectivamente. C muestra la superficie de una partícula del NIP, aumento x3200.

Como se puede observar en la Figura 7.1.A, la forma de las partículas del MIP obtenido en bloque es irregular, debido al triturado y cribado del monolito. Similares características se observan en el NIP. Sin embargo, las Figuras 7.1.B y 7.1.C, revelan los típicos patrones de los polímeros impresos y no impreso. Como se puede observar las partículas del MIP (Figura 7.1.B), presenta una superficie más rugosa y porosa, lo cual confirma la formación de sitios de memoria específica, creados durante el proceso de polimerización. Una rugosidad diferente y una superficie más lisa del NIP, exhiben la falta de una estructura porosa comparable (De Middelmeer et al., 2016; Denderz et al., 2012).

La microscopía electrónica es una técnica de análisis rigurosa que facilita información precisa sobre los materiales microestructurados. La imagen obtenida muestra el tamaño y forma de las partículas, su textura y demás características.

BET

El método BET desarrollado por Brunauer, Emmett y Teller (Barret, Joyner & Halenda, 1951), es una técnica de caracterización morfológica ampliamente utilizada, para la determinación de áreas superficiales y distribución de los tamaños de poro mediante fisisorción térmica. El método BET continúa siendo el procedimiento más utilizado para evaluar el área de superficie de materiales porosos y finamente divididos, proporcionando, bajo ciertas condiciones cuidadosamente controladas, una isoterma bien definida, que indica el área efectiva disponible para la adsorción de un adsorbente específico (Thommes et al., 2015).

Cuando una fase de gas o vapor, se pone en contacto con un sólido, parte de él permanece en el exterior unido a la superficie. En la fisisorción (adsorción física), hay uniones débiles debido a fuerzas de Van der Waals, entre el adsorbato y la superficie sólida, útiles para caracterizar materiales porosos, permitiendo la determinación del área de superficie específica, el tamaño, la distribución y el volumen de poro.

El valor calculado del área BET, depende de la temperatura de adsorción y del procedimiento utilizado para ubicar el rango de presión. El nitrógeno (a su temperatura de ebullición, 77 °K), es el adsorbente más utilizado para obtener el área BET, sabiendo que las moléculas de N₂ ocupan un volumen de 0,162 nm³. La adsorción física es completamente reversible, lo que permite que el adsorbato se pueda adsorber y desorber completamente. Las isotermas de adsorción, se obtienen midiendo la cantidad de gas adsorbido, en una amplia gama de presiones relativas a una temperatura constante (típicamente N₂ líquido, 77 °K). Por el contrario, las isotermas de desorción se logran midiendo el gas eliminado a medida que la presión es reducida (Zielinski & Kettle, 2013).

Este método de cálculo basado en la representación de la isoterma BET, se puede representar también según la siguiente ecuación (Ecuación 7.1):

$$\frac{1}{W(P/P_0) - 1} = \frac{1}{W_m C} + \left[\frac{C - 1}{W_m C} \right] \frac{P}{P_0} \quad \text{Ecuación 7.1.}$$

Donde:

W = peso del gas adsorbido.

P/P_0 = presión relativa.

W_m = peso del adsorbato en la monocapa.

C = constante BET.

La Ecuación BET, proporciona una gráfica lineal al representar: $1/[W(P/P_0)-1]$, en función de P/P_0 . A partir de esta representación se pueden obtener los valores de la pendiente (b), de la ordenada en el origen (a) y el peso de la monocapa (W_m) (Ecuaciones 7.2, 7.3 y 7.4).

$$b = \frac{C-1}{W_m C} \quad a = \frac{1}{W_m C} \quad W_m = \frac{1}{A+B} \quad \text{Ecuaciones 7.2, 7.3 y 7.4.}$$

El área de superficie total (S_T) se puede calcular mediante la Ecuación 7.5, aplicando los siguientes datos:

N = Número de Avogadro ($6,023 \times 10^{23}$ moléculas/mol).

M = Peso molecular del adsorbato.

A_{cs} = Área de sección transversal de adsorbato ($16,2 \text{ \AA}^2$ para nitrógeno).

$$S_T = \frac{W_m N A_{cs}}{M} \quad \text{Ecuación 7.5.}$$

El área de superficie específica (S), se determina según la Ecuación 7.6, es decir, el cociente entre el área total de superficie y el peso de muestra. La constante BET, denominada con la letra (C), se calcula según la Ecuación 7.7.

$$S = \frac{S_T}{w} \quad C = \left(\frac{A}{B}\right) + 1 \quad \text{Ecuaciones 7.6 y 7.7.}$$

En este trabajo de investigación, se examinó la morfología de las estructuras poliméricas del MIP y NIP por BET. Las medidas de porosidad de las superficies de los MIP y NIP, se midieron por porosimetría de adsorción

de nitrógeno, utilizando un equipo Micrometrics ASAP 2020. Las áreas de superficie específicas, expresadas en m^2/g , se calcularon utilizando el método Brunauer-Emmett-Teller (BET) (Brunauer, Emmett, & Teller, 1938). Los datos del volumen de poros se calcularon de acuerdo con el método Barret-Joyner-Halenda (BJH) (Barrett, Joyner, & Halenda, 1951).

Antes de la medición BET, se lleva cabo un proceso de desgasificación, que consiste en calentar los polímeros a $120\text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 horas en vacío, para eliminar gases y vapores que pueden haberse adsorbido físicamente en la superficie de las partículas. El volumen de gas adsorbido a la superficie de las partículas se mide en el punto de ebullición del nitrógeno ($-196\text{ }^\circ\text{C}$). La cantidad de gas adsorbido se correlaciona con el área de superficie total de las partículas, incluidos los poros en la superficie. La adsorción de gas también permite la determinación del tamaño y la distribución de volumen de los microporos ($0,35\text{-}2,0\text{ nm}$).

En el experimento BET, se utiliza la isoterma de adsorción de nitrógeno para obtener información sobre el volumen total de poros, el área de superficie y la distribución del tamaño de poro de las partículas (De Middeleer et al., 2016). Los volúmenes de poros de desorción de BJH obtenidos fueron $4,80\text{ cm}^3/\text{g}$ para MIP y $0,75\text{ cm}^3/\text{g}$ para NIP. La superficie específica determinada por BET, se relaciona con el área reactiva (área de superficie total), ya que todas las estructuras porosas adsorben las pequeñas moléculas de gas.

Los experimentos BET se llevaron a cabo a una presión relativa, P/P_0 , de aproximadamente 0,3 a $77\text{ }^\circ\text{K}$, donde P_0 es la presión de saturación. Al realizar el experimento al 30% de la presión de saturación de N_2 a $77\text{ }^\circ\text{K}$ ($\approx 230\text{ torr}$), se produce condensación capilar dentro de la estructura de poros del material, de modo que los poros más pequeños se llenan más fácil y consecutivamente se llenan poros más grandes a medida que aumenta la presión.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran áreas de la superficie BET de: $274,8\text{ m}^2/\text{g}$ y $230,7\text{ m}^2/\text{g}$, para el MIP y NIP respectivamente. Aunque el MIP y el NIP, mostraron isotermas de fisorción y áreas similares, los datos desvelan una mejor adsorción del polímero impreso, respecto al polímero en blanco. Además, al considerar el

volumen de poros, el MIP exhibió 6 veces más volumen de poros que el NIP correspondiente.

En la Figura 7.2, se puede observar la representación lineal obtenida en el proceso BET, de las áreas de superficie, aplicado a las partículas de los polímeros MIP y NIP, para N₂ a 77 °K.

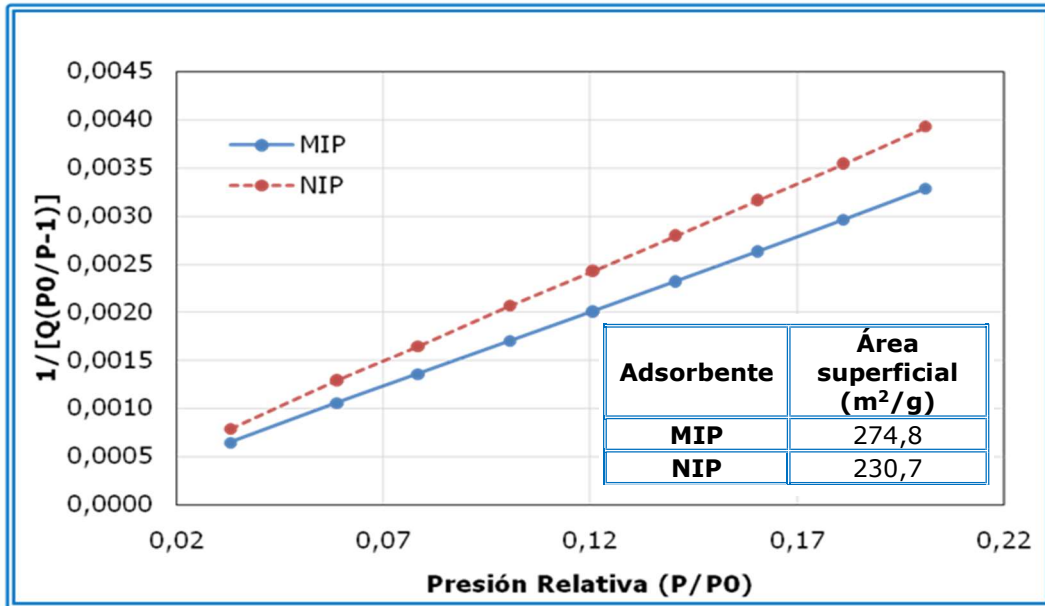


Figura 7.2. Grafica lineal obtenida, a partir de datos BET, de las áreas superficiales para MIP y NIP, utilizando N₂ a 77 °K (Q indica la cantidad adsorbida en cm³/g).

Los datos obtenidos se consideran adecuados, ya que el coeficiente de correlación, R², de la regresión lineal del estudio se sitúa en 0,9999.

7.4.2. Caracterización química

Debido a la baja solubilidad de los polímeros de impresión molecular, las técnicas más empleadas en la caracterización química de este tipo de materiales, son aquellas que permiten el análisis en estado sólido. El análisis de los distintos elementos químicos nos proporciona información

básica sobre el polímero, haciendo una comparación con datos teóricos, estas técnicas pueden utilizarse para determinar, por ejemplo, la cantidad de monómero funcional incorporada a la matriz polimérica, la cantidad de polímero sintetizada sobre una partícula de látex o sílice o la disolución de las partículas de sílica empleadas como molde en la preparación del polímero (Andaç, Say, & Denizli, 2004).

Junto a las técnicas de caracterización morfológica centradas principalmente en la geometría y dimensiones de los MIP, las principales técnicas de caracterización química son la resonancia magnética nuclear (NMR), y la espectroscopía infrarroja (IR) (De Middeleer et al., 2016).

El análisis por NMR es el mejor método para investigar el mecanismo del proceso de impresión molecular, permitiendo evaluar el grado de curación del polímero, estableciendo el número de dobles enlaces presentes en el mismo, caracterizando las interacciones entre el monómero y la plantilla, y lo que es más importante, la estabilidad del complejo de prepolimerización (De Middeleer et al., 2016; O'Mahony, Molinelli, Nolan, Smyth, & Mizaikoff, 2006; Samah et al., 2018). Ocasionalmente, la NMR también se ha utilizado para ilustrar la eliminación exitosa de la molécula plantilla (Batista Braga et al., 2017).

Por otro lado, el análisis mediante espectroscopía infrarroja aporta información sobre los grupos funcionales. La diferente respuesta de los enlaces a la radiación infrarroja muestra las diferentes características de adsorción de la muestra (De Middeleer et al., 2016). Esta última técnica es una de las más utilizadas, al aportar información muy relevante sobre los polímeros y ser la más asequible económicamente. El análisis espectroscópico del polímero, tanto mediante espectroscopia infrarroja (FTIR) como UV-VIS, proporciona información útil acerca del grado de polimerización, los grupos funcionales presentes en el polímero, la formación de enlaces por puentes de hidrógeno y la relación estequiométrica entre el monómero funcional y el analito plantilla (Zhang et al., 2019).

ATR-FTIR

La técnica de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), se utiliza principalmente en el análisis cualitativo y permite la identificación de los grupos funciones de los compuestos presentes en la muestra. En esta técnica, cuando una molécula absorbe radiación infrarroja, la vibración intramolecular con frecuencia igual a la de la radiación, aumenta en intensidad, lo que genera señales con frecuencias que corresponden a la vibración de un enlace específico. La zona de radiación infrarroja del espectro electromagnético se encuentra situada entre los límites de las regiones del espectro visible y de las microondas, es decir entre 14000 cm^{-1} y 10 cm^{-1} . La región infrarroja, se divide en tres regiones, denominadas infrarrojo cercano (NIR), infrarrojo medio (MIR) e infrarrojo lejano (FIR). El infrarrojo medio (región entre 4000 y 400 cm^{-1}), es utilizado para el estudio de las vibraciones fundamentales, coincidiendo con el intervalo que nos interesa para el presente trabajo. El espectrómetro de IR con transformada de Fourier permite la obtención de espectros de forma rápida, precisa y con relaciones señal/ruido elevadas.

La reflectancia total atenuada (ATR, *Attenuated Total Reflectance*) es una técnica de muestreo de FTIR. Esta técnica, se basa en la medición de los cambios que se producen en un haz de infrarrojos reflejado internamente, cuando el haz entra en contacto con la muestra. Para ello el ATR utiliza un diamante, óptimo por su durabilidad y por ser inerte, diseñado para permitir una reflexión interna total que crea una onda evanescente sobre la superficie del cristal, la onda se extiende a la muestra que se mantiene en contacto íntimo con el cristal. En las regiones del espectro infrarrojo, donde la muestra absorbe energía, la onda evanescente será atenuada o alterada. Esta radiación es dirigida hacia el extremo opuesto del cristal y es pasada al detector del espectrómetro, donde el sistema genera un espectro infrarrojo del analito (Rodríguez Montoro, 2013).

La gran ventaja de esta técnica es que no precisa preparación previa de la muestra, es aplicable a muestras sólidas y líquidas, es una

técnica no invasiva, rápida y no destructiva, que permite la evaluación y comparación de materiales.

En la bibliografía, esta técnica no sólo se ha utilizado para la caracterización de los polímeros, se han utilizado también para la determinación de compuestos fenólicos en diferentes muestras, y con muy variados objetivos (control de calidad y adulteraciones, etc.) (Bittner et al., 2013; Csorba, Fodor, Kovacs, & Toth, 2019; Ferrer-Gallego, Hernández-Hierro, Rivas-Gonzalo, & Escribano-Bailón, 2011; Lu et al., 2011; Luypaert, Zhang, & Massart, 2003; Zhang, Luypaert, Pierna, Xu, & Massart, 2004; Kasprzyk, Depciuch, Grabek-Lejko, & Parlinska-Wojtan, 2018).

El análisis ATR-FTIR, además de proporcionar información sobre el estado y grado de la polimerización del MIP y del NIP, nos indica si el proceso de extracción de la plantilla se ha realizado correctamente en los polímeros impresos (Denderz & Lehotay, 2012).

Las medidas de los polímeros sintetizados y de la plantilla se realizaron utilizando un espectrofotómetro FT/IR-4100A, acoplado al accesorio ATR-PRO-ONE, operando en modo ATR, en un intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} , con resolución a 4 cm^{-1} y 64 barridos, con una velocidad de barrido de 2mm/s. La muestra sólida se colocó directamente en el portamuestras sin ningún tratamiento. Para validar las medidas, éstas se han realizado por triplicado, en el mismo día y en días diferentes.

En la Figura 7.3, se superponen los espectros obtenidos para el polímero impreso (MIP), el blanco (NIP) y la platilla (4-HPA).

Como se puede observar, las bandas correspondientes a los dobles enlaces carbono-carbono permiten controlar el grado de polimerización. La ausencia de grupos vinilo en los polímeros (MIP y NIP), confirma su polimerización total. Por otro lado, la plantilla (4-HPA) presenta bandas características a 3200 cm^{-1} y a 1690 cm^{-1} asociadas con el estiramiento de los enlaces O-H y C=O del ácido carboxílico; el pico situado a 1400 cm^{-1} se asigna a las vibraciones del anillo bencénico, y el situado a 1270 cm^{-1} corresponde al estiramiento del O-H fenólico. La ausencia en los espectros del MIP y NIP, de las bandas características de la plantilla, indica que el proceso de extracción de la misma ha sido correcto.

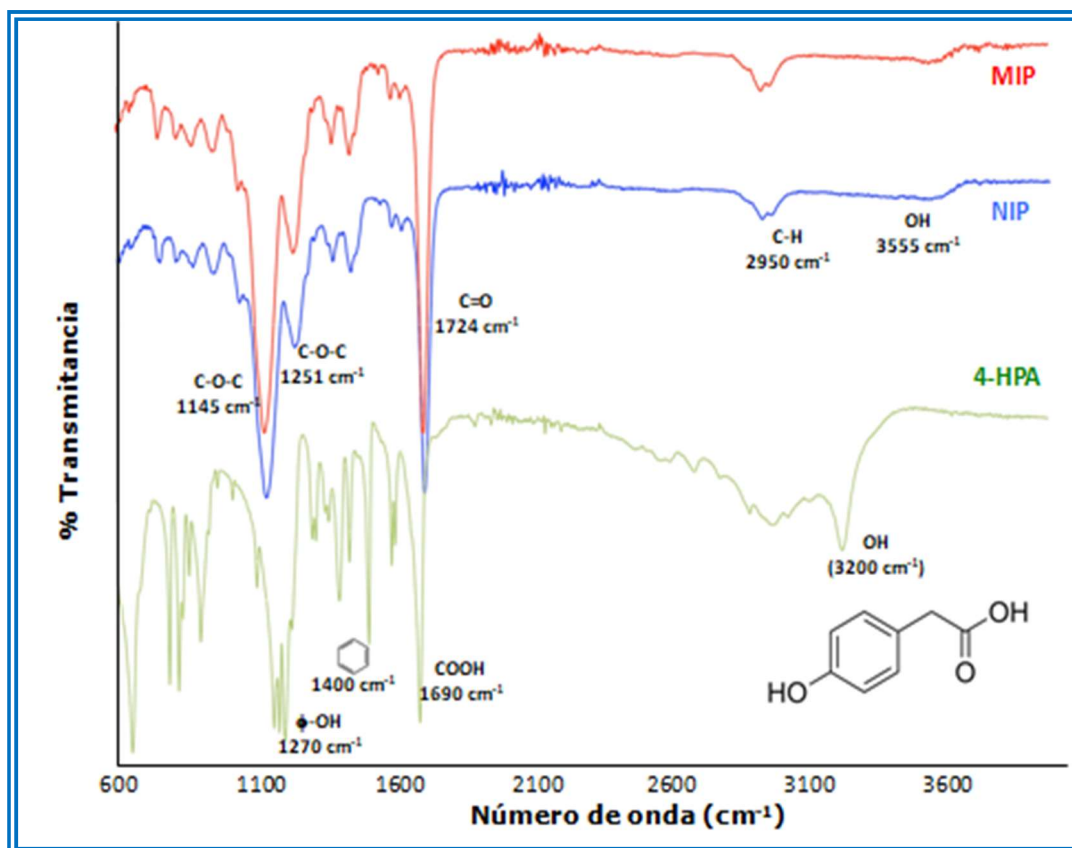


Figura 7.3. Espectros ATR-FTIR para MIP, NIP y 4-HPA.

Así mismo, en el MIP, la banda observada a 3555 cm^{-1} está asociada con el O–H del grupo carboxílico del entrecruzante. Varios picos característicos alrededor de 1724 cm^{-1} , 1251 cm^{-1} y 1145 cm^{-1} están asociados con vibraciones de C=O y C–O–C, y apoyan la existencia de etilenglicoldimetacrilato (EGDMA). Al mismo tiempo, los picos observados incluyen un doblete a 2950 cm^{-1} , que corresponde al estiramiento asimétrico y simétrico del grupo C–H.

Para el NIP, se puede ver claramente que el espectro es similar, excepto por la intensidad del pico que aparece a 1724 cm^{-1} , asociado al grupo carbonilo C=O correspondiente al éster, que se desplaza ligeramente a valores más bajos en el MIP que en el NIP, debido a los dobles enlaces conjugados en el entrecruzante; esto se debe a que la plantilla apoya la formación de cavidades de impresión estables ordenando la distribución de los grupos carbonilo.

Como se ha podido comprobar, el análisis ATR-FTIR ha proporcionado información sobre el estado de la polimerización, tanto del MIP como del NIP, así como del proceso de extracción de la molécula plantilla del MIP. Esta caracterización química, además, ha mostrado diferencias significativas entre ambos polímeros (MIP y NIP).

7.4.3. Propiedades adsortivas

El conocimiento del equilibrio de adsorción para un determinado sistema adsorbato-adsorbente, además de posibilitar el diseño de las condiciones de operación, presión y temperatura, etc., da información de las características del adsorbente. Entre las características principales de un material adsorbente se encuentra la capacidad de adsorción, que se define como la cantidad de adsorbato que puede retenerse en el adsorbente por unidad de masa o volumen. Este parámetro se relaciona directamente con la superficie específica del material, con el volumen de poros, así como con el tamaño de poro. Otra característica importante es la cinética de adsorción, ésta queda determinada por la difusión interna y determina la cantidad de adsorbente óptima en determinadas aplicaciones.

Isotermas de adsorción

En los polímeros en estado sólido, suele ser habitual describir los diferentes mecanismos de adsorción y retención de los compuestos, mediante la evaluación de la isoterma de adsorción, la cual permite obtener información sobre la selectividad, la constante de afinidad y la densidad de los sitios de unión.

La determinación de las isotermas de adsorción, se lleva a cabo realizando diferentes ensayos, destinados a evaluar la cantidad de analito que se une al polímero, en concentraciones crecientes del mismo, cuando se ha alcanzado el equilibrio termodinámico. La relación entre la concentración

inicial y la capacidad de adsorción en el equilibrio, se conoce como isoterma de adsorción para un determinado sistema adsorbato-adsorbente.

Diversas teorías tratan de explicar los mecanismos de adsorción y diferentes modelos se han propuesto para ello, permitiendo ajustar los datos experimentales a las teorías que explican la interacción del adsorbente con el adsorbato.

En la Tabla 7.3, se recogen los modelos de mayor relevancia y más habituales utilizados con este propósito.

Tabla 7.3. Modelos de isotermas de adsorción (Baggiani, Giraudi, Giovannoli, Tozzi, & Anfossi, 2004).

MODELO	FÓRMULA
Freundlich	$Q = K_F \times C_e^{1/n}$
Langmuir	$Q = \frac{Q_{Max} \times K_L \times C_e}{1 + K_L \times C_e}$
Bi-Langmuir	$B = \frac{q_1 K_1 F}{1 + K_1 F} + \frac{q_2 K_2 F}{1 + K_2 F}$
Freundlich- Langmuir	$B = \frac{q K F^n}{1 + K F^n}$
Jovanovic	$B = q(1 - e^{-KF})$
Bi-Jovanovic	$B = q_1(1 - e^{-K_1 F}) + q_2(1 - e^{-K_2 F})$
Freundlich- Jovanovic	$B = q(1 - e^{-KF})$

B representa la cantidad de analito que se une al polímero, F es una medida de la cantidad de analito que permanece en la disolución, q corresponde a la densidad de puntos de unión presentes en la matriz polimérica, a está relacionada con la constante de afinidad media K, a través de la fórmula $K = a^{1/m}$, donde m es el índice de heterogeneidad que toma valores comprendidos entre 0 (material heterogéneo) y 1 (material homogéneo).

De todos estos modelos, el más sencillo es el modelo de Freundlich. Freundlich considera al adsorbente como un sistema heterogéneo, con sitios de unión de afinidad y selectividad variable, en el que se asume que la superficie del adsorbente es energéticamente

heterogénea, conformada por grupos de sitios de adsorción de energía característica, es decir, considera sitios de unión heterogéneos basados en la idea de que la adsorción depende de la energía de los sitios de adsorción. La isoterma de Freundlich se presenta como un modelo empírico donde Q representa la cantidad adsorbida por cantidad de adsorbente en el equilibrio, C_e es la concentración de equilibrio, K_F y n son constantes de Freundlich que dependen de la capacidad de adsorción del adsorbato y la intensidad de adsorción del adsorbente, respectivamente (Tabla 7.3). El valor de n representa el índice de heterogeneidad, donde $n=1$ indica la heterogeneidad de la superficie del adsorbente, aunque la situación más común es $n>1$, debido a la distribución de los sitios en la superficie. Esto hace disminuir la interacción adsorbente-adsorbato con el incremento de la densidad en la superficie (Baggiani et al., 2004). Este modelo es útil en la descripción de materiales heterogéneos, propone una adsorción monosuperficial que tiene en cuenta aquellos comportamientos no lineales entre la cantidad adsorbida y la concentración inicial; proponiendo una relación lineal entre las funciones logarítmicas de Q y C_e (Ecuación 7.8). Además, no establece un valor límite de la cantidad adsorbida según aumenta la concentración.

$$\text{Log}Q = \text{Log}K_F + \frac{1}{n}\text{Log}C_e \quad \text{Ecuación 7.8.}$$

El modelo de Langmuir es uno de los más utilizados y se fundamenta en la teoría cinética de los gases. En esta teoría se supone que el adsorbente tiene un número finito de sitios de adsorción, estando parte de ellos ocupados por moléculas de adsorbato y otra parte libres. Es un modelo de adsorción en monocapa, es decir, no puede formarse más de una monocapa de moléculas adsorbidas. La cantidad adsorbida aumenta con la concentración en equilibrio, hasta alcanzar un valor límite correspondiente al recubrimiento de la superficie por la monocapa. Además, todos los sitios de enlace disponibles son energéticamente equivalentes y pueden acomodar una molécula de analito. La habilidad del analito para adsorberse a un determinado sitio del MIP no depende de la ocupación de los sitios

adyacentes. Cuando el analito ocupa un sitio en el MIP, no hay ninguna adsorción en ese mismo sitio, por lo que se alcanzará el valor de saturación cuando no pueda haber más adsorción de analito, calculándose, por tanto, la capacidad máxima de enlace superficial del polímero.

En la ecuación de Langmuir (Tabla 7.3), K_L es la constante del equilibrio de adsorción. Cuando el adsorbente se ha saturado, la cantidad de adsorbato que recubre su superficie corresponde al llenado de la monocapa ($Q_{m\acute{a}x}$).

El modelo de Langmuir también puede expresarse en forma lineal (Ecuación 7.9):

$$\frac{1}{Q} = \left[\frac{1}{Q_{m\acute{a}x} K_L} \right] \times \frac{1}{C_e} + \frac{1}{Q_{m\acute{a}x}} \quad \text{Ecuación 7.9.}$$

Donde: C_e es la concentración de analito en equilibrio expresado en mg/L, Q capacidad de adsorción expresada en mg/g, $Q_{m\acute{a}x}$ (mg/g) y K_L (L/mg) constantes relacionadas con la energía y entalpia de adsorción, respectivamente.

Por otro lado, los modelos de Langmuir o Jovanovic (Tabla 7.3), se ajustan bien al comportamiento de materiales homogéneos (Baggiani et al., 2004). Cuando se considere que coexisten puntos de unión de alta y baja afinidad, se proponen los modelos de bi-Langmuir o bi-Jovanovic (Tabla 7.3), que en muchas ocasiones son una mejor aproximación que los modelos simples, dónde sólo se considera un tipo de puntos de unión. Por último, el modelo de Langmuir-Freundlich (Tabla 7.3), es capaz de describir el comportamiento de materiales tanto homogéneos como heterogéneos, siendo una buena aproximación a la descripción del mecanismo de adsorción presente en la mayoría de los polímeros de impresión molecular. La elección de uno de estos modelos, debe considerar el estado del sistema en equilibrio termodinámico, para no cometer errores con la capacidad real del polímero (Baggiani et al., 2004).

Para estudiar las propiedades adsorptivas de los polímeros sintetizados, se realizan diferentes ensayos para determinar las correspondientes isothermas de adsorción.

Los experimentos se realizaron en discontinuo (*batch mode*). Para ello, se tomaron 20 mg de cada uno de los polímeros impresos y sus correspondientes no impresos, poniéndose en contacto cada uno de ellos, con 2,5 mL de una disolución que contenía concentraciones crecientes de analito. Estas concentraciones iban desde 0,5 a 1000 mg/L de 4-HPA. La mezcla se mantuvo en frascos de color topacio, para evitar la posible fotodegradación del analito y se incubó durante 24 horas a temperatura ambiente, manteniendo agitación mecánica a 450 r.p.m., para asegurar el equilibrio. El tiempo de incubación en la mayoría de los ensayos, es el tiempo necesario para que se produzca una unión del 90% del analito en el polímero, que dependerá del sistema y que suele oscilar entre las 2-24 horas (García-Calzón & Díaz-García, 2007). Una vez alcanzado el equilibrio, el polímero se separa mediante centrifugación a 2500 r.p.m., durante 5 minutos y filtración, donde la concentración del analito no unida al polímero, puede medirse en el sobrenadante. Se utiliza un filtro Whatman de 0,45 μm de tamaño de poro, para evitar introducir partículas en el sistema cromatográfico.

La concentración de analito libre que queda en disolución se determina por HPLC-DAD-MS, según el procedimiento optimizado recogido en el posterior apartado.

Por diferencia entre la concentración inicial y la que queda libre en el sobrenadante, permite determinar la cantidad de analito que queda unida al polímero, expresándose como capacidad de adsorción Q (mg/g). Según la Ecuación 7.10, puede evaluarse entonces por la diferencia entre la concentración inicial del analito y la medida en el sobrenadante.

$$Q = \frac{(C_0 - C_e)V}{W} \quad \text{Ecuación 7.10.}$$

Siendo C_0 , la concentración inicial, C_e la concentración en el equilibrio, V el volumen de la disolución y W la masa del polímero.

Los experimentos de adsorción fueron llevados a cabo, primeramente, con el analito plantilla, 4-HPA, con la fracción del MIP y del NIP sintetizados en bloque. Posteriormente, estos mismos experimentos se llevaron a cabo con los otros compuestos análogos seleccionados.

Procediendo de igual forma con las distintas concentraciones de 4-HPA, se obtienen las capacidades de adsorción para el MIP y el NIP (Tabla 7.4).

Tabla 7.4. Datos de la isoterma de adsorción del MIP y NIP para el 4-HPA.

C_e (mg/L)	Q_e (mg/g) MIP	Q_e (mg/g) NIP
0	0,000	0,000
5	0,499	0,000
10	0,901	0,000
40	4,365	1,196
100	8,997	1,294
200	18,020	2,738
300	30,013	5,066
500	39,997	8,681
800	45,011	12,279
1000	46,030	13,245

A la vista de estos datos, se observa que la capacidad de adsorción aumenta gradualmente para el MIP llegando a una etapa en la que el aumento es imperceptible, por saturación del polímero. Sin embargo, en el NIP este hecho no sucede, aumentando linealmente la capacidad de adsorción según aumenta la concentración inicial. La máxima capacidad de adsorción de las partículas del MIP tiene un valor de 46,030 mg/g, mucho más alta que la de las partículas del NIP, siendo este último valor de 13,245 mg/g.

Para explicar estos resultados, y caracterizar las propiedades de enlace de los MIP sintetizados se van ajustar los datos experimentales a

los modelos de Langmuir y de Freundlich. Dos de los principales modelos utilizados con este fin (Baggiani et al., 2004). Para evaluar el ajuste de los datos experimentales obtenidos a los modelos propuestos se utilizan las ecuaciones lineales de éstos, el coeficiente de correlación (R^2) y los errores estándar (S.E.) de la ordenada y de la pendiente. Los cálculos de los parámetros correspondientes se realizaron utilizando OriginPro v. 8.0, programa de OriginLab Corp. (Northampton, U.K).

Aplicando el modelo de la isoterma de Langmuir (Ecuación 7.9.), para los datos de adsorción experimentales obtenidos para el 4-HPA se obtiene para la ordenada en el origen (a) un valor de 0,0076, con S.E. de 0,013 y un valor de 10,173 para la pendiente (b), S.E. de 0,179. El R^2 obtenido es de 0,998.

En la Figura 7.4, se han representado los valores experimentales de Q (mg/g) obtenidos frente a C_e (mg/L) tanto para el MIP como para el NIP para el 4-HPA. Así mismo, se ha representado la isoterma de Langmuir.

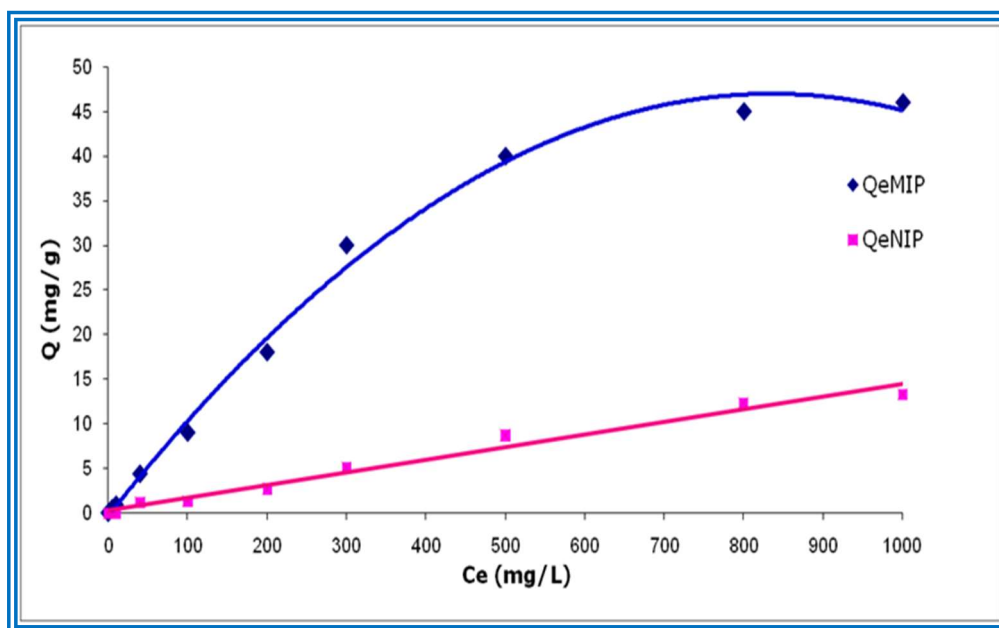


Figura 7.4. Representación gráfica de la Isotherma de Langmuir, de los datos experimentales MIP y NIP para el 4-HPA.

Aplicando el modelo de la isoterma de Freundlich (Ecuación 7.8.), para los datos de adsorción experimentales obtenidos para el 4-HPA

se obtiene para la ordenada en el origen (a) un valor de -0.875, con S.E. de 0,094 y un valor de 0,898 para la pendiente (b), S.E. de 0,042. El R^2 obtenido es de 0,992.

Los resultados obtenidos para los modelos de isotermas aplicados a los datos experimentales sugieren que el modelo de Langmuir es más adecuado para explicar el sistema adsorbente-adsorbato que el de Freundlich.

De igual forma a la anteriormente descrita se determinaron los datos de adsorción del MIP y del NIP para los analitos análogos a la plantilla (3-HPA, 4-HBA, PCA, SyA y HA).

En la Tabla 7.5, se recogen estos datos y se comparan con los obtenidos para el 4-HPA.

Tabla 7.5. Datos experimentales, para las isotermas de adsorción, de todos los catabolitos de flavan-3-oles estudiados.

C_e (mg/L)	MIP 4-HPA Q_e (mg/g)	MIP 3-HPA Q_e (mg/g)	MIP 4-HBA Q_e (mg/g)	MIP PCA Q_e (mg/g)	MIP SyA Q_e (mg/g)	MIP HA Q_e (mg/g)	NIP Q_e (mg/g)
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
5	0,499	0,428	0,402	0,432	0,504	0,290	0,000
10	0,901	0,833	0,844	0,984	1,019	0,526	0,000
40	4,365	3,956	2,919	3,280	3,544	2,792	1,196
100	8,997	7,423	6,007	7,731	8,744	6,044	1,294
200	18,020	13,149	10,523	13,303	15,472	9,433	2,738
300	30,013	17,468	15,169	18,905	20,517	14,531	5,066
500	39,997	27,327	21,858	25,459	32,277	21,511	8,681
800	45,011	41,793	28,790	31,155	37,779	28,030	12,279
1000	46,030	42,266	32,276	33,963	39,129	28,775	13,245

Lo primero que puede deducirse a la vista de estos datos, es que la mayor capacidad de adsorción la presenta el analito plantilla (4-

HPA). Le sigue el 3-HPA, isómero de este, después se encuentran el SyA, PCA, 4-HBA y por último el HA.

Los datos experimentales se ajustan a los modelos de Langmuir y Freundlich. La Tabla 7.6, recogen los parámetros obtenidos para estos modelos y analitos comparándolos con los obtenidos para el 4-HPA.

Tabla 7.6. Parámetros de la isoterma de Langmuir y Freundlich obtenidos para el MIP y los ácidos fenólicos estudiados.

Modelo	Parámetros	4-HPA		3-HPA		4-HBA	
		Valor	S.E.	Valor	S.E.	Valor	S.E.
Langmuir $\frac{1}{Q} = \left[\frac{1}{Q_{\max} K_L} \right] \times \frac{1}{C_e} + \frac{1}{Q_{\max}}$	a=1/Q _{max}	0,007	0,013	0,009	0,008	0,024	0,010
	b= 1/(K _L Q _{max})	10,173	0,179	11,644	0,101	12,186	0,136
	R ²	0,998	-	0,999	-	0,999	-
Freundlich $\log Q = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e$	a=log K _F	-0,875	0,094	-0,914	0,058	-0,908	0,045
	b= 1/n	0,898	0,042	0,872	0,026	0,827	0,020
	R ²	0,992	-	0,993	-	0,995	-
		PCA		SyA		HA	
		Valor	S.E.	Valor	Valor	S.E.	Valor
Langmuir $\frac{1}{Q} = \left[\frac{1}{Q_{\max} K_L} \right] \times \frac{1}{C_e} + \frac{1}{Q_{\max}}$	a=1/Q _{max}	0,025	0,005	0,017	0,004	0,009	0,026
	b= 1/(K _L Q _{max})	10,025	0,068	9,810	0,053	17,492	0,351
	R ²	0,999	-	0,999	-	0,997	-
Freundlich $\log Q = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e$	a=log K _F	-0,809	0,065	-0,822	0,056	-1,096	0,081
	b= 1/n	0,8139	0,029	0,845	0,030	0,891	0,038
	R ²	0,989	-	0,991	-	0,986	-

C_e es la concentración de la solución en equilibrio (mg/L), Q es la capacidad de adsorción correspondiente (mg/g), Q_{max} (mg/g) y K_L (L/mg), son constantes relacionadas con la capacidad de adsorción y la energía o entalpía neta de adsorción, respectivamente. K_F y n son constantes de Freundlich, que corresponden a la capacidad de adsorción y la intensidad de adsorción, respectivamente.

Como ya se hizo anteriormente, los errores estándar (S.E.) y el coeficiente de correlación (R^2), se utilizaron para determinar la isoterma que mejor se ajusta a los datos experimentales, siendo éste, el modelo de Langmuir. Por otra parte, se puede observar que, según Langmuir y en concordancia con los datos experimentales, los analitos que obtienen el mayor valor de capacidad de adsorción (Q_{max}) para el MIP sintetizado son el 4-HPA, la plantilla, y 3-HPA, isómero de éste.

En la Figura 7.5, se representan las isotermas de Langmuir para todos los analitos y los datos experimentales obtenidos para el MIP y el NIP.

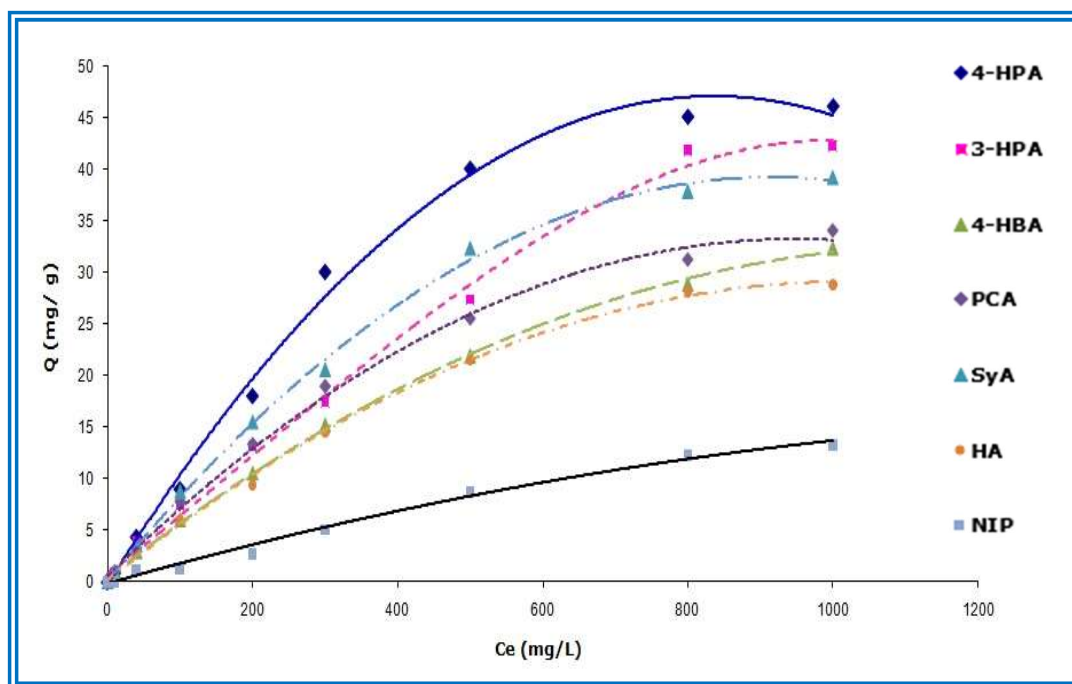


Figura 7.5. Representación gráfica de las isotermas de Langmuir y de los datos experimentales para todos los catabolitos estudiados.

Factores de impresión

Además de las isotermas de adsorción, para evaluar las propiedades de enlace de los polímeros, el grado de impresión y afinidad de los analitos objeto de estudio, se puede calcular el factor de impresión (IF).

El factor de impresión es la relación de la capacidad de adsorción del analito respecto al MIP (Q_{MIP}) y al NIP (Q_{NIP}) (Ecuación 7.11). IF es una medida de la fuerza de interacción del polímero impreso hacia el analito.

$$IF = \frac{Q_{MIP}}{Q_{NIP}} \quad \text{Ecuación 7.11.}$$

Se han calculado los factores de impresión (IF), según la Ecuación 7.11, para el compuesto plantilla y sus compuestos análogos. En la Figura 7.6, se representan los factores de impresión de todos ellos.

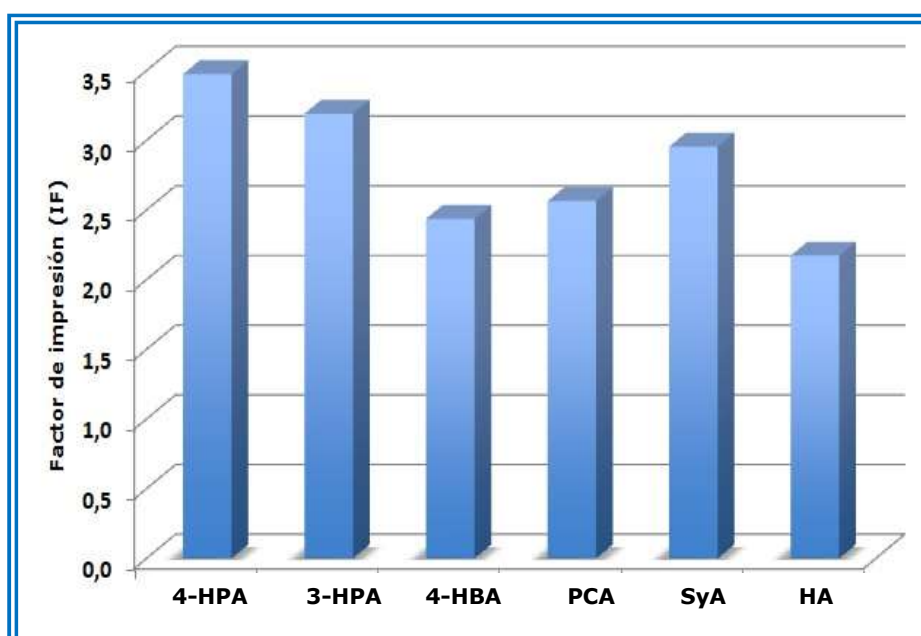


Figura 7.6. Factores de impresión (IF) de los analitos objeto de estudio.

Los resultados indican que la plantilla presenta una mayor capacidad de adsorción y una interacción más fuerte que sus análogos estructurales, con un valor IF de 3,5. Esto indica que los sitios específicos del MIP son complementarios en forma, tamaño y distribución espacial a la plantilla. En consecuencia, el IF más alto es presentado por el 4-HPA (la plantilla del MIP), seguido de su isómero el 3-HPA, con un valor de IF de 3,2. Los valores de IF para los demás analitos fueron: 2,9 para SyA; 2,6 y

2,4 para PCA y 4-HBA. Por último, el HA es el que presenta el menor valor de IF, 2,2.

Se puede observar que todos los valores de IF son mayores a 1,0, lo que indica que el MIP es específico respecto al NIP. Además, según los IF obtenidos, el MIP muestra un efecto de impresión para los compuestos estudiados con estructuras químicas similares a las de la plantilla de impresión, el 4-HPA (Dmitrienko et al., 2008).

En el MIP, la capacidad de adsorción está influenciada por la presencia, el número y la posición de los grupos hidroxilo y carboxilo en el anillo aromático (Dmitrienko et al., 2008; Shi et al., 2014). Por otro lado, la posición del grupo hidroxilo en relación con el grupo carboxilo también influye en la selectividad de MIP (Denderz et al., 2012).

El valor IF obtenido para el 4-HPA demuestra que existe una correlación positiva del factor de impresión, lo que significa, por tanto, un buen rendimiento de impresión, indicando que los sitios formados en la estructura del MIP interactúan fuertemente con la molécula molde, permitiendo una mayor retención en relación con el polímero no impreso (Nantasenamat, Isarankura-Na-Ayudhya, Naenna, & Prachayasittikul, 2007).

Cinética de adsorción

La cinética, describe la velocidad de adsorción del adsorbato en el adsorbente y determina el tiempo en que se alcanza el equilibrio (Osorio-Tobón, Meireles, Osorio-Tobón, & Meireles, 2013). Mediante la cinética de adsorción también se puede obtener información sobre la selectividad, constante de afinidad y densidad de los sitios de unión del polímero con el tiempo (Samah et al., 2018).

El aumento de la adsorción del 4-HPA, frente al MIP y NIP, se evaluó a diferentes tiempos. Los ensayos se llevaron a cabo utilizando una importante concentración de 4-HPA, 1000 mg/L, y durante un intervalo de tiempo entre 0 a 300 minutos. Para ello, se tomaron 20 mg de cada uno de los polímeros, MIP y NIP, poniéndolos en contacto con 2,5 mL de la

disolución de 1000 mg/L de 4-HPA. La mezcla se mantuvo en frascos de color topacio para evitar la posible fotodegradación del analito, midiendo la concentración del analito libre cada 30 minutos. Antes de la medida cromatográfica, se centrifuga y filtra, según el procedimiento descrito para la determinación de las isothermas de adsorción. Con los datos así obtenidos se calcula la capacidad de adsorción en cada momento. La Tabla 7.7, recoge la capacidad de adsorción del MIP y el NIP a los diferentes tiempos.

Tabla 7.7. Cinética MIP y NIP para una concentración inicial de 1000 mg/L de 4-HPA.

t (min)	Q_t NIP (mg/g)	Q_t MIP (mg/g)
0	0	0
30	3,0987	18,2420
60	5,2766	28,5819
90	6,5266	34,4413
120	8,1266	39,5217
150	9,2766	42,5123
180	10,9891	43,9502
210	11,6780	45,2127
240	13,2294	46,0377
270	13,2294	46,0377
300	13,2294	46,0377

Estos ensayos se realizan en condiciones de no equilibrio. Como se puede observar, en el MIP, cuando se llega a las condiciones de equilibrio, la capacidad de adsorción no varía con el tiempo, comportamiento que difiere de la adsorción observada en el NIP. La capacidad de adsorción del 4-HPA en el MIP aumenta con el tiempo, y en estas condiciones, a los 30 minutos ya se ha adsorbido el 40% de la concentración inicial. Posteriormente, la capacidad de adsorción va aumentando lentamente hasta permanecer constante. La Figura 7.7,

muestra la variación de la capacidad de absorción con el tiempo de los polímeros sintetizados, para una concentración de 1000 mg/L de 4-HPA.

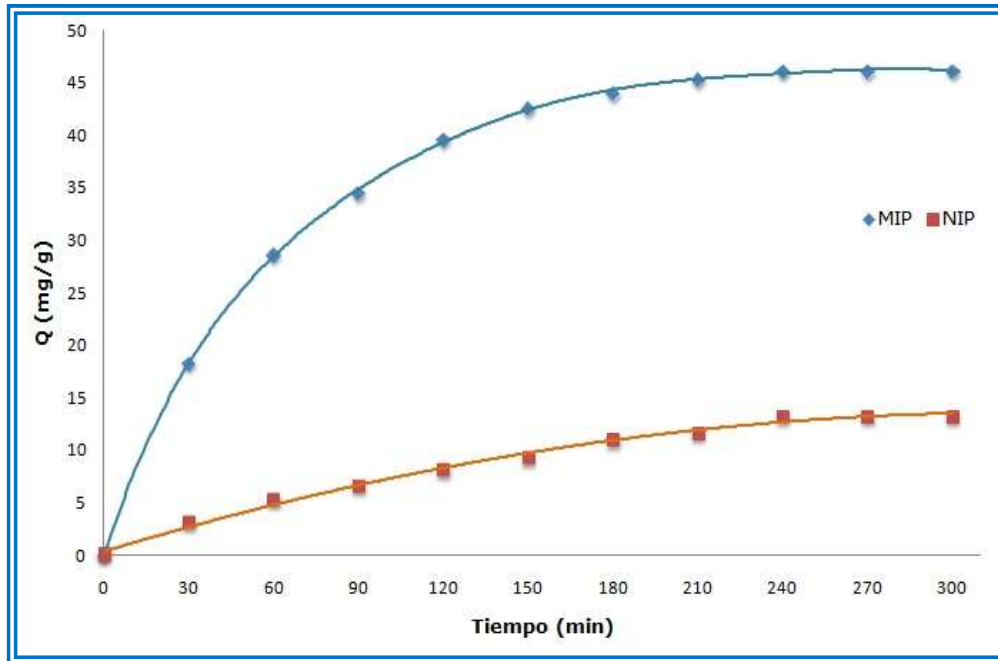


Figura 7.7. Cinética de absorción MIP y NIP para el 4-HPA.

Al igual que para las isotermas de adsorción, los datos cinéticos pueden ajustarse a los modelos teóricos para explicar los procesos de adsorción. Los más frecuentes son el modelo de pseudo-primer orden de Lagergren, el de segundo orden de Ho y el de Elovich (Mohammed, Abu-Zurayk, Hamadneh, & Al-Dujaili, 2018; López et al., 2012).

El modelo de pseudo-primer orden fue propuesto por Lagergren en 1988. Es la primera ecuación que describe la adsorción del sólido relacionando la capacidad de adsorción con la velocidad de adsorción. Este modelo asume que la velocidad de ocupación de los sitios activos del adsorbente es proporcional al número de sitios disponibles del adsorbente. Las Ecuaciones que describen el modelo son las siguientes (Ecuaciones 7.12, 7.13 y 7.14).

$$\frac{dQ_t}{dt} = k_1(Q_e - Q_t) \quad \text{Ecuación 7.12.}$$

Donde Q_e y Q_t son las capacidades de adsorción, expresadas en mg/g, del MIP en el equilibrio y en un determinado tiempo. k_1 , expresada en min^{-1} , es la constante de la Ecuación de Lagergren.

Integrando esta ecuación para $Q_t=0$, $t=0$ y considerando que $Q_t=Q_t$ cuando $t=t$, se obtiene la ecuación lineal de la misma (Ecuación 7.13).

$$\ln(Q_e - Q_t) = \ln Q_e - k_1 t \quad \text{Ecuación 7.13.}$$

Mediante el ajuste lineal de la recta se puede obtener la constante k_1 y la capacidad de adsorción teórica según el modelo (Q_e).

Con los datos obtenidos, también se puede calcular el tiempo al que teóricamente será adsorbida la mitad de la concentración inicial ($t_{1/2}$), (Ecuación 7.14).

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_1} \quad \text{Ecuación 7.14.}$$

El modelo de Ho de segundo orden, presupone que el proceso de adsorción envuelve un mecanismo de quimisorción. La Ecuación 7.15, que describe este modelo es la siguiente:

$$\frac{dQ_t}{dt} = k_2(Q_e - Q_t)^2 \quad \text{Ecuación 7.15.}$$

Donde k_2 , expresada en $\text{g}/(\text{mg} \cdot \text{min})$, es la constante cinética. Integrando la ecuación en los límites anteriormente indicados, se obtiene la relación lineal de la ecuación anterior (Ecuación 7.16.), que permite fácilmente evaluar el ajuste al modelo, calcular la capacidad de adsorción teórica en el equilibrio, el tiempo de adsorción medio y la velocidad inicial de adsorción (h_2), expresada en $\text{mg}/\text{g} \cdot \text{min}$ (Ecuaciones 7.17 y 7.18).

$$\frac{t}{Q_t} = \frac{1}{k_2 Q_e^2} + \frac{1}{Q_e} t \quad \text{Ecuación 7.16.}$$

$$t_{1/2} = \frac{1}{k_2 Q_e} \quad \text{Ecuación 7.17.}$$

$$h_2 = Q_e^2 k_2 \quad \text{Ecuación 7.18.}$$

La ecuación de Elovich (Ecuación 7.19.), ha sido ampliamente utilizada para describir la cinética de quimisorción de gases en superficies sólidas. Describe algunos mecanismos de reacción incluyendo la difusión superficial y algunos procesos de activación y desactivación de superficies catalíticas.

$$\frac{dQ_t}{d_t} = \alpha \exp(-\beta Q_t) \quad \text{Ecuación 7.19.}$$

Donde α se considera la velocidad inicial de adsorción, expresada en mg/(g·min), ya que cuando Q_t tiende a cero dQ_t/d_t tenderá a α . El parámetro β , expresado en g/mg, se conoce como la constante de desorción.

Como en otros casos, la ecuación de Elovich puede transformarse en una expresión lineal que permite evaluar el ajuste del modelo con facilidad (Ecuación 7.20).

$$\frac{1}{Q_t} = \frac{\ln(\alpha\beta)}{\beta} + \frac{\ln(t)}{\beta} \quad \text{Ecuación 7.20.}$$

Las Figuras 7.8 y 7.9, muestran los datos experimentales y el ajuste lineal según las ecuaciones de pseudo-primero orden y segundo orden, en las condiciones de ensayo.

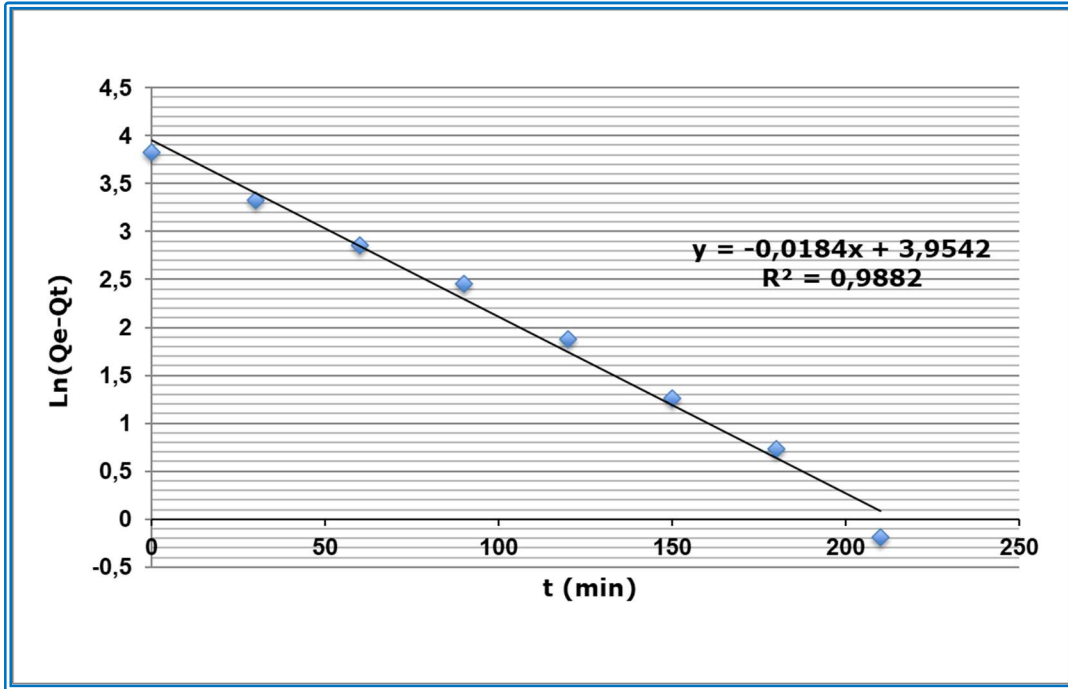


Figura 7.8. Representación del modelo de Lagergren de pseudo-primer orden para el MIP sintetizado y una concentración de 1000 mg/L de 4-HPA.

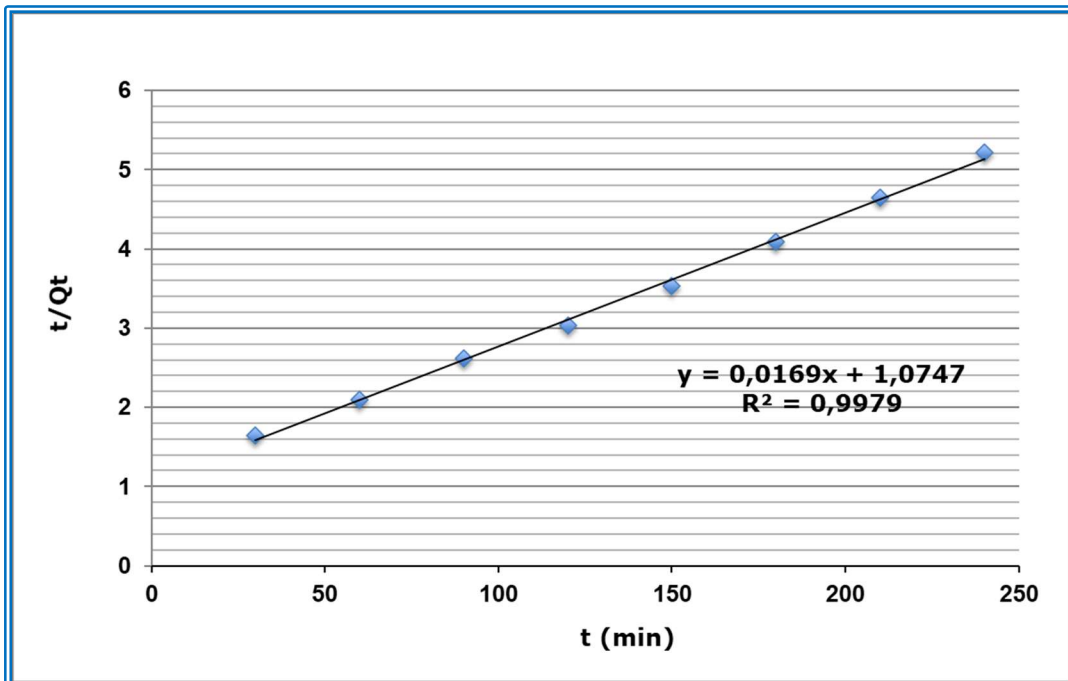


Figura 7.9. Representación del modelo de segundo orden para el MIP sintetizado y una concentración de 1000 mg/L de 4-HPA.

La determinación de la pendiente y la ordenada en el origen permite el cálculo de los parámetros de las Ecuaciones. Para la Ecuación de pseudo-primer orden se obtiene un valor de R^2 de 0,9881, la capacidad de adsorción en el equilibrio (Q_e) obtenida para este modelo es de 52,14 mg/g y la velocidad de adsorción, k_1 de 0,019 min^{-1} ; el $t_{1/2}$ obtenido es de 38 minutos. Para la Ecuación de segundo orden, el R^2 obtenido es 0,9979, la capacidad de adsorción en el equilibrio (Q_e) obtenida para este modelo es de 59,09 mg/g, el valor de k_2 es 0,0003 $\text{g}/(\text{mg}\cdot\text{min})$, el $t_{1/2}$ es 64 minutos y el valor de h_2 es 0,9305 $\text{mg}/(\text{g}\cdot\text{min})$. Considerando los valores de los coeficientes de correlación obtenidos para ambos modelos, los dos se ajustan adecuadamente, sobre todo el de segundo orden. Sin embargo, estos modelos, sobre todo el de segundo orden, no reproducen satisfactoriamente el fenómeno durante el tiempo más bajo de adsorción dando un valor teórico de la capacidad de adsorción en el equilibrio más alto que el experimental.

En la Figura 7.10, se muestra el ajuste de los datos experimentales al modelo de Elovich.

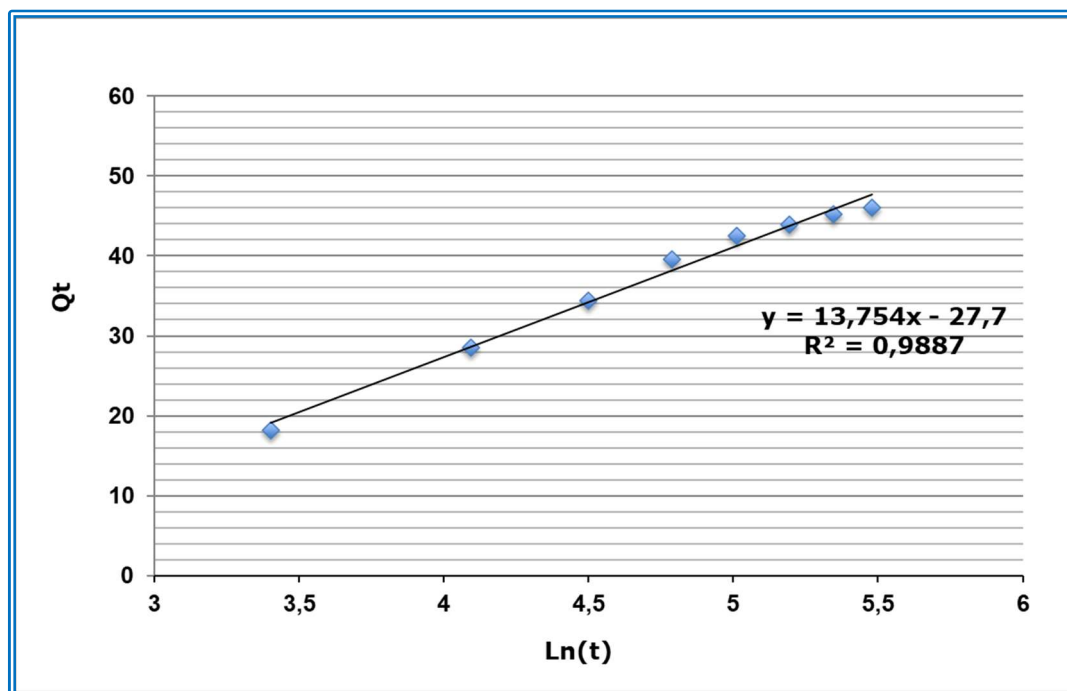


Figura 7.10. Representación del modelo de Elovich para el MIP sintetizado y una concentración de 1000 mg/L de 4-HPA.

Los valores obtenidos para α y β fueron de 27,7 mg/(g·min) y 13,75 g/mg. Utilizando estas constantes se obtuvo una capacidad de adsorción en el equilibrio de 47,7 mg/g, muy parecido al valor experimental. El R^2 obtenido en el ajuste al modelo ha sido de 0,9887.

El ajuste a los modelos de pseudo-primer y segundo orden indicaría una adsorción de naturaleza física. El ajuste al modelo de Elovich indicaría una interacción química con el adsorbente. Además, el modelo de Elovich, al basarse en el control difusivo de la adsorción, puede indicar que la cinética puede estar controlada por la difusión a través de los microporos del adsorbente.

7.5. MÉTODO CROMATOGRÁFICO

La técnica instrumental más utilizada para la determinación de los flavan-3-oles y sus metabolitos en diferentes matrices, es la cromatografía líquida acoplada a diversos detectores. La LC acoplada a detectores de masas (MS, MS/MS, etc.), es la que se está imponiendo como técnica instrumental por los bajos límites de detección y cuantificación alcanzados, y no sólo debido a su sensibilidad también por su selectividad (Stalikas, 2007). Por otro lado, las técnicas cromatográficas permiten la separación y detección simultánea de todos los analitos de interés presentes en la muestra, en una única determinación.

El análisis cromatográfico se ha llevado a cabo con un equipo Agilent LC serie 1200, equipado con un compartimento de columnas termostaticado y muestreador automático. El equipo cromatográfico está acoplado en línea a un detector de diodos (DAD) y a un detector de masas con ionización por electrospray (ESI) (Agilent serie 6100). La separación cromatográfica se ha realizado utilizando una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m), a la que se acopló una pre-columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (12,5 x 4,6 mm, 5 μ m), ambas de Agilent Technologies (España). Las separaciones cromatográficas siempre se realizaron a temperatura constante (25 °C). Los datos cromatográficos se han

registrado e integrado utilizando el programa de Agilent Chemstation (rev. B.04.02).

7.5.1. Estudios preliminares y optimización del método cromatográfico

Para seleccionar el método cromatográfico a optimizar, se ha realizado una amplia búsqueda bibliográfica de los distintos métodos publicados en la determinación de los analitos de interés. Se priorizó la selección de procedimientos rápidos y sencillos, que evitasen los medios salinos en la fase móvil y si fuera posible operando en modo isocrático (ver Tabla 3.3, del capítulo 3).

En los estudios preliminares realizados para la elección de la fase móvil, se ensayaron mezclas de ACN/H₂O y MeOH/H₂O en distintas proporciones y gradientes, en ambos casos con un porcentaje de ácido fórmico para facilitar la ionización en el masas.

Los primeros ensayos se realizaron con disoluciones patrones de 4-HPA, inyectando un volumen de 20 µL, y utilizando el DAD a 280 nm, e intervalos de flujo entre 0,5 y 1 mL/min. Se optó por las mezclas ACN/H₂O y se probaron, en modo isocrático, mezclas en diferentes proporciones (v:v): 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 85:15, 90:10, 100:0. Inicialmente se eligió una fase móvil de acetonitrilo y agua, acidificada con 0,1% v/v de ácido fórmico, en proporción 10:90, operando en modo isocrático, y con un flujo de 0,5 mL/min, flujo adecuado para trabajar con el detector de masas. Estos parámetros cromatográficos se aplicaron en la determinación de los otros analitos y sus mezclas. También se optimizaron las longitudes de ondas en el DAD, ensayando 210, 254 y 280 nm (de Rijke et al., 2006). Finalmente, aunque se registraron los resultados a otras longitudes de ondas, se optó por 280 nm. Los espectros UV se utilizaron, siempre que fue posible, para confirmar la identidad de los ácidos fenólicos (de Oliveira et al., 2013). En la Figura 7.11, se muestra el cromatograma obtenido a 280 nm para los 6 analitos, medidos a una

concentración de 4 mg/L, con la fase móvil indicada anteriormente y a un flujo de 5 mL/min.

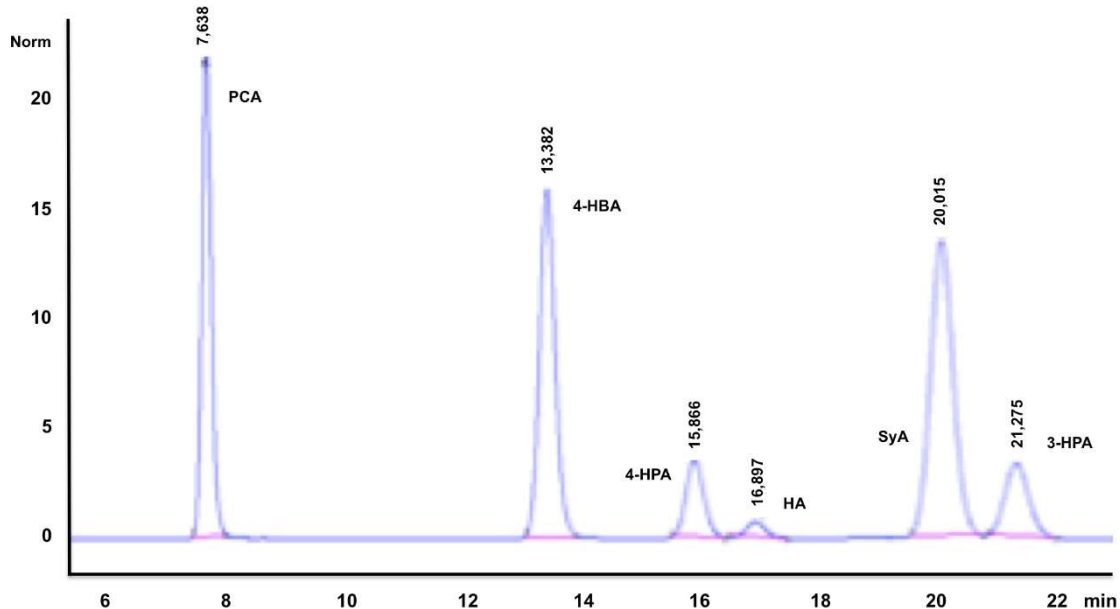


Figura 7.11. Cromatograma obtenido a una longitud de onda de 280 nm de los 6 metabolitos, concentración 4 mg/L, y un flujo de 5 mL/min.

Una vez obtenidas las condiciones cromatográficas óptimas de análisis, para la detección a 280 nm para muestras sintéticas, se procedió a preparar distintas curvas de calibrado de cada catabolito, estudiando la linealidad de cada compuesto en un intervalo de concentración comprendido entre 0 y 100 mg/L (6 niveles de concentración), midiendo por triplicado cada una de las muestras, y representado el área del pico frente a la concentración (Tabla 7.8). Se calculó también los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ). Los valores de LOD y LOQ se calcularon siguiendo las recomendaciones de IUPAC. Estos se definen, como la concentración de analito que produce una señal igual a la media de las señales del blanco, más 3 veces la desviación estándar de la misma (LOD) o más 10 veces la desviación estándar (LOQ). Los límites de confianza para la pendiente (b) y la ordenada (a) en el origen, se obtuvieron para un nivel de confianza del 95%.

Tabla 7.8. Parámetros de las curvas de calibrado, coeficiente de correlación lineal, límite de detección y de cuantificación para los 6 analitos estudiados en muestras sintéticas, determinadas por HPLC-DAD, flujo 0,5 mL/min.

Analito	$b \pm t_{(n-2)}s_b$	$a \pm t_{(n-2)}s_a$	R^2	LOQ (mg/L)	LOD (mg/L)
4-HPA	11,5792 ± 0,0497	4,0933 ± 2,7941	0,999	2,4131	0,7239
PCA	37,6513± 0,8243	-81,3925± 46,2734	0,997	12,29	3,6870
3-HPA	13,0739 ± 0,0830	0,0464 ± 4,6634	0,999	3,567	1,0700
4-HBA	42,0725± 0,9686	51,5897± 54,3716	0,997	12,923	3,8769
HA	2,3151± 0,0394	2,1020± 2,2121	0,998	9,5553	2,8665
SyA	53,2306 ± 0,4391	44,1041 ± 24,6519	0,999	4,6312	1,3893

Los valores obtenidos mostraron una buena linealidad para todo el intervalo de concentraciones, con un coeficiente de correlación lineal (R^2) de más de 0,997. Así mismo se obtuvieron buenos límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) para todos los analitos.

Posteriormente, se optimizaron los parámetros del detector de masas y demás parámetros cromatográficos, para los seis analitos objeto de estudio, en muestras sintéticas. El análisis por MS se lleva a cabo en modo negativo, donde los parámetros del electrospray (ESI) fueron los siguientes: voltaje del capilar (-3 kV), nebulizador de nitrógeno (35 psi) y flujo de gas de secado (12,0 L/min a 350 °C), optimizando para cada analito el voltaje de fragmentación y la ganancia en el análisis cuantitativo de muestras (modo SIM). El voltaje del fragmentador óptimo fue de 30 V y 1 de ganancia para todos los analitos, salvo para el ácido siríngico que se optimizó con 60 V y una ganancia de 2, por la baja abundancia que presentaba en contraposición a los demás. En la Tabla 7.9, se recogen los parámetros experimentales del LC-MS para los seis ácidos fenólicos estudiados en muestras sintéticas, para una fase móvil de acetonitrilo y agua, acidificada con 0,1% v/v de ácido fórmico, en proporción 10:90, operando en modo isocrático, y un flujo de 0,5 mL/min.

Tabla 7.9. Parámetros del detector MS, para los 6 metabolitos de flavan-3-oles en muestras sintéticas, flujo 0,5 mL/min.

Metabolito	Tiempo de retención (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Fragmentación (V)	Ganancia
PCA	7,6	153	30	1
4-HBA	13,3	137	30	1
4-HPA	15,8	151	30	1
HA	16,8	178	30	1
SyA	20,0	197	60	2
3-HPA	21,2	151	30	1

7.5.2. Condiciones cromatográficas

Como la determinación de las concentraciones de los analitos extraídos selectivamente en el MISPE, se calcularán mediante curvas de calibración externas, el procedimiento cromatográfico antes descrito se optimiza adicionando a las muestras de orina, previamente filtradas, las alícuotas adecuadas del analito a cuantificar para obtener la concentración requerida. La optimización de los parámetros cromatográficos se realiza en las mismas condiciones experimentales de las muestras obtenidas en la extracción MISPE (pH=3), procedimiento que se describirá detalladamente en apartados posteriores.

La determinación de las concentraciones de los analitos en muestras de orina, requiere ligeras modificaciones sobre el método cromatográfico optimizado para muestras sintéticas. Por tanto, se revisan nuevamente flujo de la fase móvil y parámetros del masas, los segmentos, fragmentación y ganancia, para poder determinar de manera óptima los 6 catabolitos de flavan-3-oles estudiados en orina, utilizando una fase móvil de acetonitrilo y agua, acidificada con 0,1% v/v de ácido fórmico, en proporción 10:90, operando en modo isocrático.

Se modifica el flujo de la fase móvil a 0,4 mL/min. La utilización de un flujo menor al anteriormente ensayado, permite aumentar los tiempos de retención y separa adecuadamente los analitos en las muestras de orina en las condiciones experimentales optimizadas.

Otro de los estudios realizados tiene como fin obtener un voltaje de fragmentación común para todos los analitos, para evitar distorsiones en el cromatograma debido al cambio del voltaje del fragmentador en un corto intervalo de tiempo. Se optimiza éste para todos los analitos, con el fin de llegar a un valor común para todos ellos. Se han ensayado valores de fragmentación de 30, 35, 40, 50 y 60 V. Finalmente se elige 40 V como potencial de fragmentación. En la Tabla 7.10, se resumen los valores de los parámetros cromatográficos elegidos para la determinación de las muestras de orina.

Tabla 7.10. Parámetros del detector MS, para los 6 metabolitos de flavan-3-oles en muestras de orina, flujo 0,4 mL/min.

Metabolito	Tiempo de retención (min)	[M-H]⁻ (m/z)	Fragmentación (V)	Ganancia
PCA	10.17	153	40	1
4-HBA	17.58	137	40	1
4-HPA	20.70	151	40	1
HA	22.09	178	40	1
SyA	26.47	197	40	2
3-HPA	27.67	151	40	1

Como se puede observar la determinación de la muestra se lleva a cabo en sólo 28 min. En la Figura 7.12, se muestran superpuestos los cromatogramas obtenidos para el 4-HPA, en muestras de orina, adicionadas con una concentración de 4 mg/L, a un flujo de 0,4 mL/min. La longitud de onda y los parámetros del masas son los descritos anteriormente. La fase móvil era acetonitrilo y agua, acidificada con 0,1% v/v de ácido fórmico, en proporción 10:90, operando en modo isocrático.

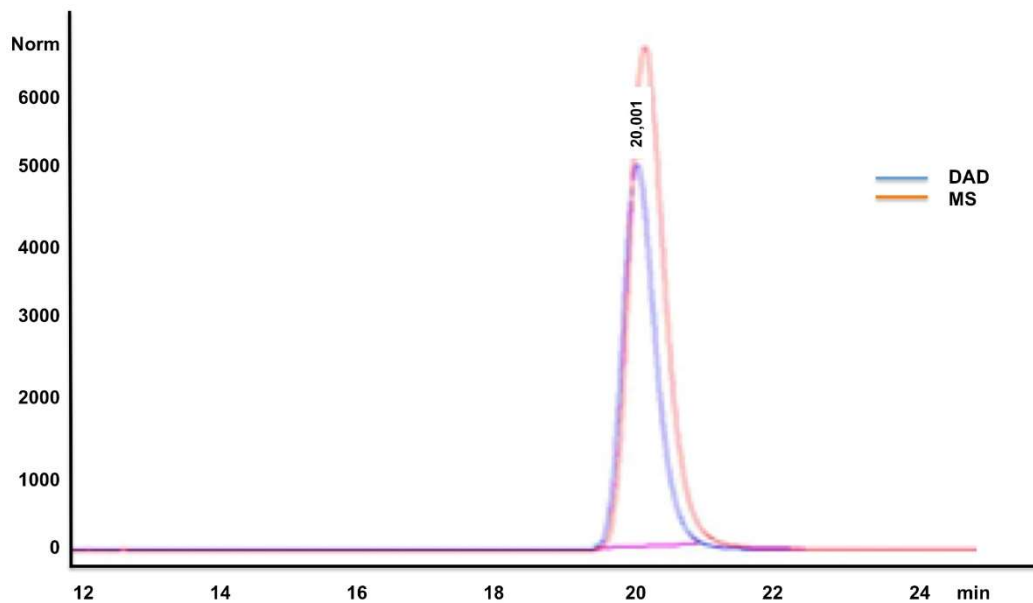


Figura 7.12. Cromatogramas del 4-HPA en concentración 4 mg/L y en las condiciones cromatográficas descritas, en muestras de orina.

Se puede observar el desplazamiento de la señal obtenida en el masas, respecto a la obtenida en el DAD debido a su acoplamiento en línea.

En la Figura 7.13, se muestra el cromatograma obtenido con el detector de masas para los 6 analitos, en concentración 4 mg/L, en muestras de orina en las condiciones cromatográficas optimizadas. Se puede observar en el cromatograma los cinco segmentos programados: de 8 a 16 min, de 16 a 19 min, de 19 a 21,5 min, de 24 a 27 min, y de 27 min al final.

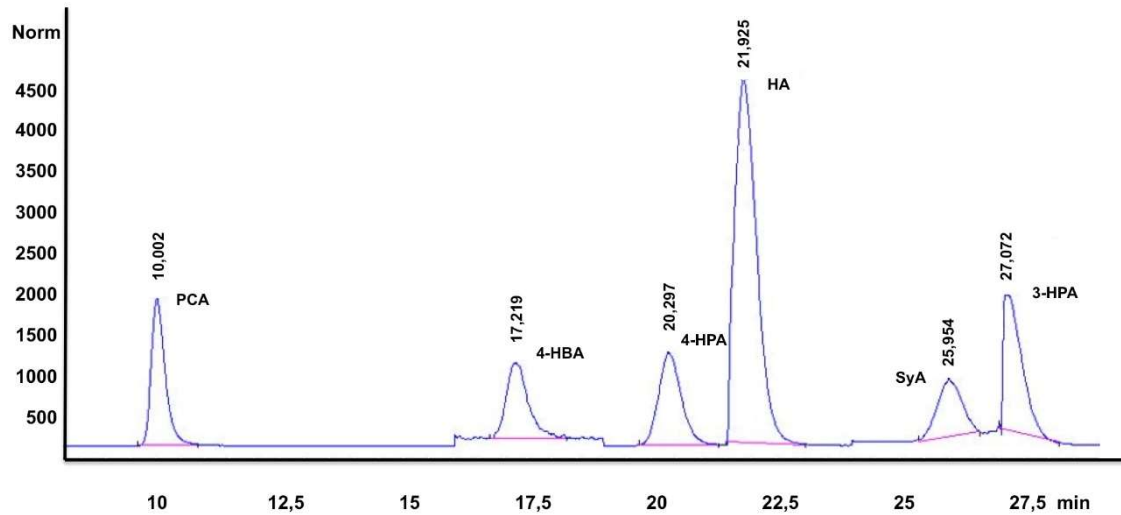


Figura 7.13. Cromatograma de los 6 analitos en concentración 4 mg/L y en las condiciones cromatográficas descritas, en muestras de orina.

Fijadas las condiciones cromatográficas óptimas para la determinación de los 6 analitos estudiados, se procede a preparar curvas de calibrado para cada uno de ellos, dopando muestras de orina. Las curvas se preparan por triplicado y en un intervalo de concentraciones de 0,25 a 40 mg/L (10 niveles de concentración). Así se obtienen los parámetros de las correspondientes rectas, el coeficiente de correlación (R^2) y los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) (Tabla 7.11).

Tabla 7.11. Parámetros de las curvas de calibrado, coeficiente de correlación lineal, límite de detección y de cuantificación para los 6 analitos estudiados en orina, determinadas por HPLC-DAD-MS, flujo 0,4 mL/min, intervalo de concentración de 0,25 a 40 mg/L.

Analito	$b \pm t_{(n-2)}s_b$	$a \pm t_{(n-2)}s_a$	R^2	LOQ (mg/L)	LOD (mg/L)
4-HPA	13136,408 ± 325,371	58725,050 ± 4849,359	0,995	3,691	1,218
PCA	106642,521 ± 1355,448	85435,047 ± 20201,691	0,998	1,894	0,625
3-HPA	23609,996 ± 337,626	17413,743 ± 5032,010	0,998	2,131	0,703
4-HBA	83243,611 ± 1929,128	110755,593 ± 28751,867	0,995	3,453	1,139
HA	95865,606 ± 1933,164	3803880,450 ± 28812,022	0,996	3,005	0,991
SyA	34368,755 ± 1057,443	-29219,470 ± 15760,211	0,992	4,585	1,513

Los valores mostraron una buena linealidad con un coeficiente de correlación lineal (R^2) de más de 0,992 y buenos límites de cuantificación y detección. Los valores de LOD y LOQ se calcularon siguiendo las recomendaciones de IUPAC.

7.6. PROCEDIMIENTO MISPE

Las técnicas de identificación, cuantificación y detección de los flavan-3-oles y sus metabolitos en muestras biológicas, requieren generalmente tratamientos previos de la muestra que aislen los analitos de la matriz, evitando las posibles interferencias.

Los polímeros impresos, por su gran capacidad de reconocimiento y selectividad (Hu et al., 2013; Martín-Esteban, 2013), son materiales ideales para ser utilizados como adsorbentes en procedimientos

de extracción en fase sólida (SPE), para la limpieza de las muestras y/o preconcentración de los analitos, en diferentes formatos (cartucho, columnas, etc.). A pesar de que nuevas estrategias y soportes se han diseñado para la extracción en fase sólida, los cartuchos de extracción siguen siendo el formato más utilizado.

El proceso de extracción en fase sólida sobre MIP (MI-SPE o MISPE) sigue protocolos similares a cualquier otro procedimiento de SPE en cartucho. Es decir, una vez retenido selectivamente el analito en el material adsorbente, los compuestos interferentes pueden ser eliminados mediante la utilización de disolventes o mezclas de disolventes adecuados, siendo el analito posteriormente eluido de igual forma, con otros disolventes que faciliten la desorción, aislando así el analito de la matriz (Figura 7.14).

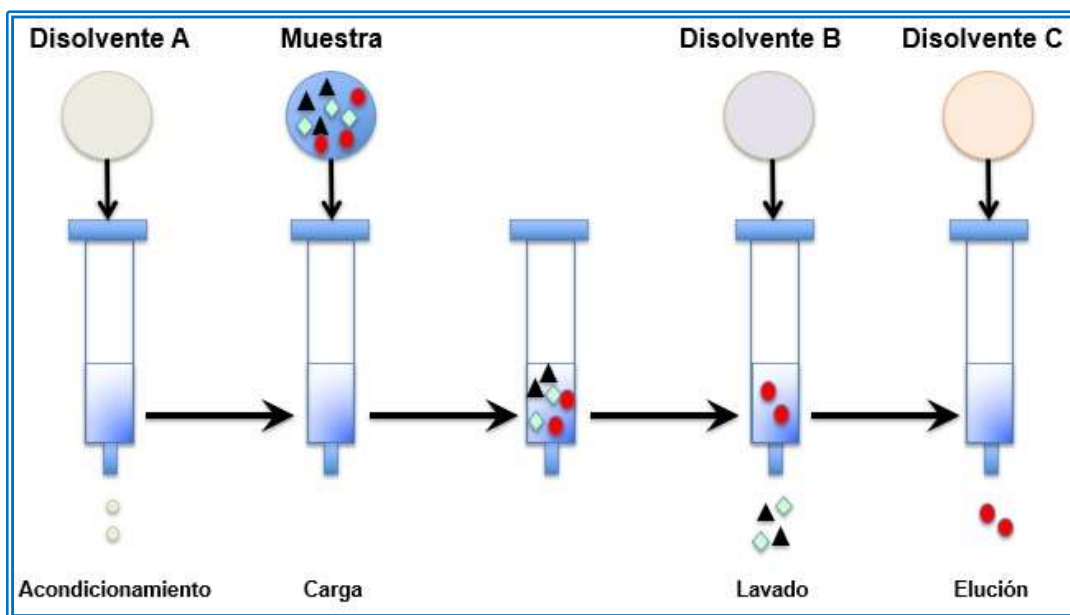


Figura 7.14. Etapas del procedimiento MISPE.

La muestra se hace pasar a través del cartucho SPE donde se encuentra el MIP (material adsorbente), quedando el analito adsorbido sobre él. Una vez retenido selectivamente el analito en el MIP empaquetado, los compuestos interferentes son eliminados en la etapa de lavado mediante los disolventes adecuados. De igual forma, los analitos son arrastrados en la etapa de elución mediante la utilización de disolventes o

mezclas de disolventes, que facilitan esa desorción quedando el analito en el eluato y por tanto, extraído de la matriz.

La eficacia de la extracción puede mejorarse mediante la optimización de las variables experimentales que afectan a dicho proceso. El diseño del protocolo vendrá dado por la optimización de múltiples variables, como pueden ser la selección del empaquetamiento, de la muestra, del volumen de la muestra, los volúmenes de lavado y elución y los disolventes empleados en las distintas etapas.

7.6.1. Preparación de los cartuchos de extracción

Los polímeros sintetizados en bloque (NIP y MIP), fueron empaquetados en cartuchos de polipropileno para SPE de 3 mL de capacidad, entre fritas de 20 μm de tamaño de poro. La cantidad introducida en los cartuchos, tanto de MIP como de NIP, fue de 100 mg. Se escogió una fracción de tamaño de partícula comprendida entre los 50 y 100 μm . Una vez hecho esto, los cartuchos se conectaron a un equipo de vacío, para realizar una limpieza exhaustiva con una mezcla de metanol/ácido acético (9:1 v/v), seguido de un lavado con acetonitrilo para eliminar potenciales contaminantes.

7.6.2. Optimización del procedimiento MISPE

La optimización del proceso MISPE, conllevó la elección de los disolventes más adecuados, la concentración de la muestra y el empleo de los volúmenes óptimos en cada uno de las etapas. En cada etapa del proceso, las fracciones recogidas fueron reacondicionadas, evaporando y reconstituyéndolas con la fase móvil, e inyectándolas en el HPLC-DAD-MS, para determinar la cantidad de analito retenida, por diferencia entre la cantidad inicial total cargada en el cartucho y la fracción recolectada en la etapa de elución (Cacho, Turiel, Martin-Esteban, Ayala, & Perez-Conde, 2006).

La optimización de los procedimientos MISPE, se llevó a cabo para las diferentes etapas, acondicionamiento, carga, lavado, elución y limpieza para la extracción selectiva del analito plantilla, el ácido 4-hidroxifenilacético.

Etapas de acondicionamiento

El acondicionamiento del cartucho se realizó añadiendo primero 2 mL de H₂O y posteriormente, 2 mL de ACN, para permitir la unión entre el analito y los sitios específicos formados en el polímero (Chauhan et al., 2015). De acuerdo con la literatura, esta etapa previa a la carga del analito, generalmente se lleva a cabo en el mismo disolvente empleado en la síntesis del polímero (Caro, Marcé, Borrull, Cormack, & Sherrington, 2006). Buscando la mejor interacción entre las cavidades del polímero y el analito en cuestión, también se puede seleccionar el mismo disolvente en el que va diluida la muestra en la etapa de carga (Chauhan et al., 2015).

Etapas de carga

Para realizar la carga del cartucho se utilizó una disolución acuosa de 4-HPA. Se eligió como disolvente de carga el agua debido a que, en medio acuoso, el enlace del 4-HPA viene determinado por las interacciones no específicas, tales como las interacciones hidrófobas entre el polímero y el analito. El pH de las muestras sintéticas, es decir, de las disoluciones preparadas es ligeramente ácido. Los pKa de los ácidos fenólicos estudiados son menores de 4,9 (Michailof et al., 2008).

Una vez acondicionados el MIP y el NIP, se prepararon diferentes concentraciones del analito, 4-HPA, en agua, para optimizar la concentración adecuada de carga. Se añade 0,5 mL de la disolución de 4-HPA elegida. Las concentraciones ensayadas fueron: 4, 25, 50 y 100 mg/L. Para todas las concentraciones se obtiene una recuperación superior al

95%, por lo que se puede concluir que en estas condiciones no hay pérdida de analito en la carga, ni en el NIP, ni en el MIP.

Posteriormente, se evaluaron diferentes volúmenes de carga en el intervalo de 0,5 - 1 mL en incrementos de 0,25 mL, para una concentración de 4 mg/L de 4-HPA. A partir del volumen 0,75 mL se produjo un efecto lavado del MIP, por lo que el volumen de carga se fijó en 0,5 mL. Lo mismo sucede en el NIP.

Optimizados estos parámetros, la carga se realiza con 0,5 mL de una disolución estándar de 4 mg/L de 4-HPA en agua. Inicialmente se carga el cartucho por gravedad, durante 5 minutos, para permitir que toda la muestra atraviese y pueda estar en contacto con el polímero. Posteriormente, se finaliza la carga con ayuda de un sistema a vacío. La carga permite entonces la fijación selectiva de los analitos en las cavidades, la retención ocurrirá por reconocimiento molecular entre el analito y el polímero.

Etapas de lavado

Tras la etapa de carga, donde se ha producido la retención selectiva de los analitos, se llevará a cabo un proceso de lavado, para eliminar aquellos interferentes que hayan podido quedar retenidos de forma inespecífica en la matriz polimérica, sin que se pierdan en esta etapa los analitos de interés. Se estudiaron varios disolventes en la etapa de lavado, como agua, metanol, acetonitrilo y mezclas de agua/ACN (80:20; 90:10 v/v). La Figura 7.15, muestra las recuperaciones de 4-HPA obtenidas, para 0,5 mL de una disolución acuosa de 4-HPA y concentración 4 mg/L, empleando diferentes disolventes de lavado.

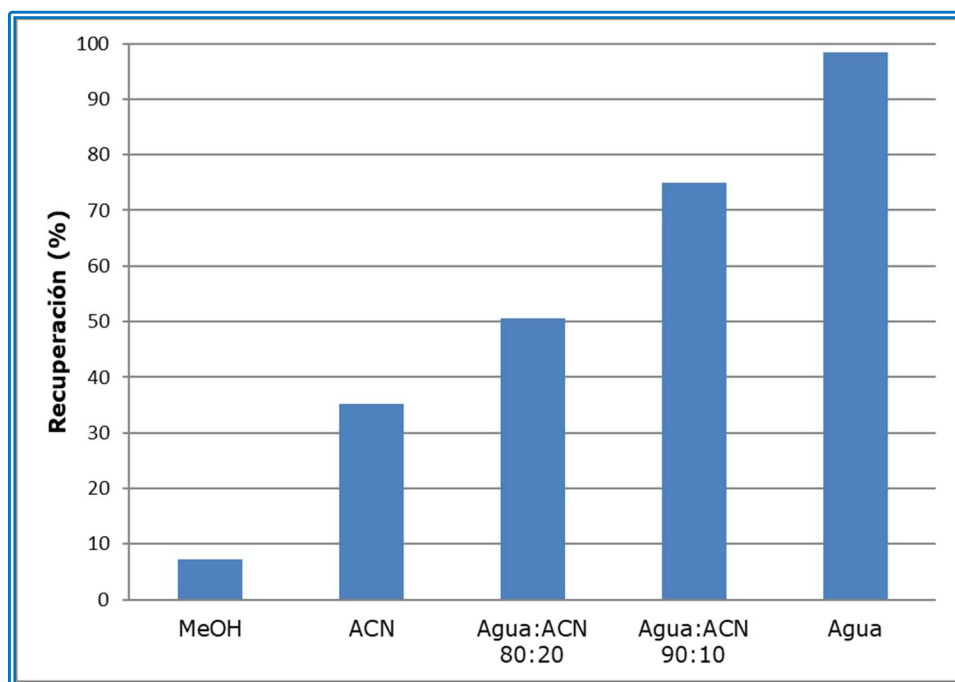


Figura 7.15. Optimización del disolvente de lavado para el polímero impreso MIP.

Como se puede observar, en el MIP, utilizando agua se obtiene la mayor recuperación, es decir, las pérdidas de 4-HPA en el lavado son mínimas si se utiliza agua como reactivo de lavado, quedando retenido en el polímero.

La optimización del volumen de lavado, se realiza de manera análoga a la llevada a cabo en la etapa de carga, probándose volúmenes desde los 1 mL hasta los 4 mL. En la Figura 7.16, se puede observar que los sucesivos lavados, aumentan la cantidad de analito no retenido en la fracción obtenida del NIP y por tanto se produce una bajada del rendimiento en el polímero no impreso. Ni un aumento en el volumen de disolvente, ni la repetición del lavado, aumentaba la cantidad de analito no retenido en la fracción obtenida del MIP, quedando retenido en el cartucho tras esta etapa más del 90% del analito aproximadamente, confirmándose la buena capacidad y selectividad del MIP (Samah et al., 2018).

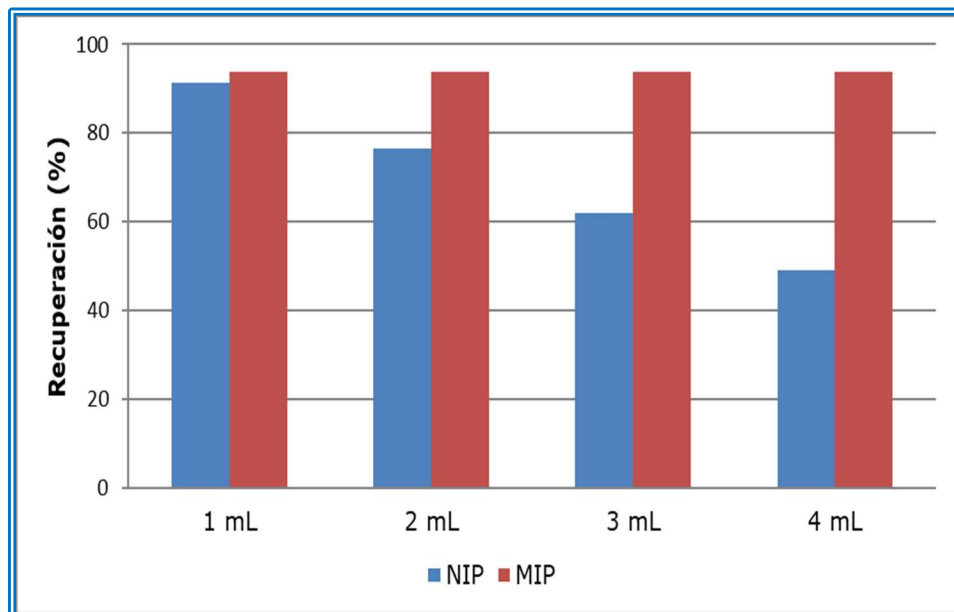


Figura 7.16. Optimización del volumen de lavado.

Además, para asegurar esta etapa, se probaron volúmenes muy superiores, encontrando que el aumento de volumen produce una bajada en la recuperación del NIP, mientras que en el MIP se mantiene constante y cercana al 94%, quedando demostrando así la selectividad del polímero impreso frente al no impreso.

Valorando los resultados obtenidos, y teniendo en cuenta que para un determinado volumen no varían las recuperaciones, se fija como volumen de lavado 1 mL de agua.

Etapa de elución

Por último, se optimiza la etapa de elución, donde el analito debe ser extraído del cartucho con el disolvente más apropiado, capaz de destruir la interacción formada entre el analito y el polímero en las cavidades del mismo. Para ello hay que tener en cuenta la solubilidad del analito, el tipo de adsorbente, la polaridad de los analitos y el tipo de interacción implicada en la unión analito-polímero. También habrá que tener en cuenta, que el disolvente ha de ser compatible con la técnica de

detección y análisis posterior. Para conseguir alcanzar la máxima recuperación de analito, se analizó el comportamiento de distintos disolventes y mezclas de los mismos, en distintas proporciones y volúmenes. Los disolventes utilizados fueron: MeOH, MeOH/ACN 50:50 (v:v), ACN, MeOH/AcH 8:2 (v:v), MeOH-ácido fórmico 1%, ACN-ácido fórmico 1% (Chauhan et al., 2015; Xie et al., 2001). Esta etapa se optimiza con un volumen de 1,5 mL de los disolventes indicados. En la Figura 7.17, se puede observar el porcentaje de recuperación de 4-HPA dependiendo de los disolventes estudiados en esta etapa del proceso.

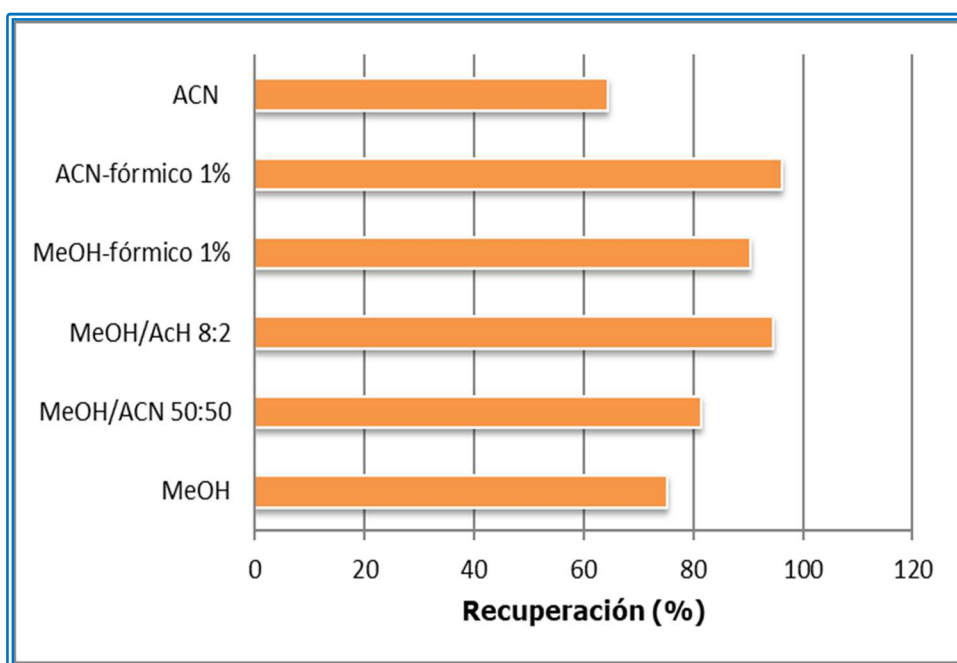


Figura 7.17. Optimización del disolvente de elución.

La mezcla de ACN/ácido fórmico (99:1, v/v) y la mezcla MeOH/AcH (80:20, v/v), fueron capaces de extraer mejor el analito, obteniendo las mejores recuperaciones del 4-HPA. Se optó como eluyente por el ACN con 1% de ácido fórmico.

Para finalizar, se optimizó el volumen del eluyente que se añadió al cartucho MISPE en la última etapa del proceso, con la finalidad de obtener mejores recuperaciones y por tanto, mejores resultados. Esta optimización es llevada a cabo con volúmenes crecientes del eluyente

elegido. Las mayores recuperaciones fueron obtenidas con un volumen de 1,5 mL. Era en estas condiciones cuando se obtenía una recuperación del 94% aproximadamente, tal y como podemos observar en la Figura 7.18.

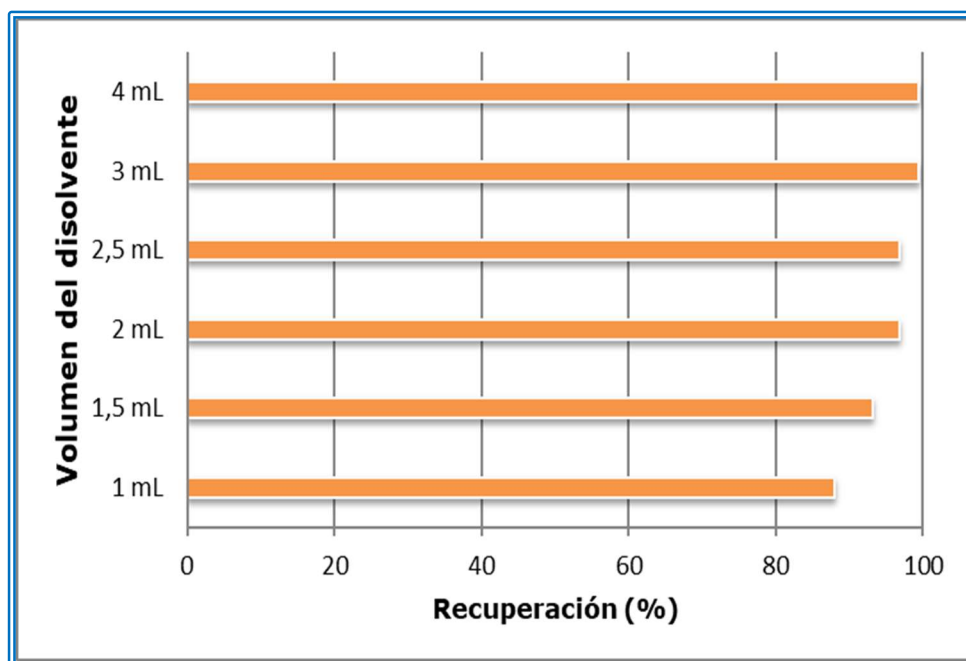


Figura 7.18. Optimización del volumen de elución.

Etapa de limpieza

Posteriormente, el polímero se limpia para permitir su reutilización. La etapa de limpieza se realiza con una mezcla de metanol/ácido acético (90:10, v/v). Finalmente se acondiciona con acetonitrilo.

Protocolo MISPE

Una vez optimizadas todas las etapas del proceso, se ha propuesto el siguiente protocolo MISPE para la extracción selectiva del 4-HPA.

Inicialmente, el cartucho se acondiciona con 2 mL de agua seguido por 2 mL de ACN. El volumen de carga óptimo es de 0,5 mL de la

muestra, tanto patrones como muestras reales de orina pretratada. Seguidamente, se llevó a cabo un lavado con 1 mL de agua. Finalmente, los analitos fueron eluidos del cartucho mediante 1,5 mL de la mezcla ACN con 1% de ácido fórmico.

Las distintas disoluciones fueron añadidas al cartucho, dejando actuar durante un tiempo determinado a la gravedad (5 minutos), para después continuar bajo condiciones de presión (utilizando la bomba de vacío). Este proceder fue determinado en estudios preliminares. Aunque al actuar sólo con gravedad las recuperaciones eran un poco mayores (95% frente al 93% obtenido si se actuaba a presión), el proceso era demasiado largo, debido principalmente a la compactación del polímero en el cartucho. Así, por tanto, se optó por actuar un tiempo en gravedad y finalizar bajo condiciones de presión.

Las fracciones correspondientes fueron recolectadas y evaporadas completamente bajo corriente suave de nitrógeno a temperatura ambiente. Los residuos fueron reconstituidos con el volumen adecuado (0,5 mL), del disolvente empleado en la fase móvil, y 20 µL fueron inyectados en el sistema cromatográfico HPLC-DAD-MS para el análisis.

La determinación cromatográfica fue llevada a cabo con los parámetros especificados en apartados anteriores. La Tabla 7.12, recoge las condiciones optimizadas para llevar a cabo la extracción en fase sólida, con el cartucho preparado con el polímero impreso molecularmente.

Tabla 7.12. Condiciones MISPE optimizadas para el 4-HPA.

ETAPA	DISOLVENTE (mL)
ACONDICIONAMIENTO	H ₂ O (2 mL) + ACN (2 mL)
CARGA	Muestra (0,5 mL)
LAVADO	H ₂ O (1 mL)
ELUCIÓN	ACN:Ácido fórmico (99:1,v/v) (1,5 mL)
LIMPIEZA	MeOH:AcH (9:1,v/v) (4 x 1mL) ACN

7.7. VALIDACIÓN DEL PROCEDIMIENTO MISPE

7.7.1. Estudios de reproducibilidad y repetibilidad

Para validar el método analítico desarrollado, se realizaron ensayos de precisión (reproducibilidad y repetibilidad), para el 4-HPA (precisión inter-día y precisión intra-día), a tres niveles diferentes de concentración: 2 mg/L, 20 mg/L y 40 mg/L en muestras sintéticas.

Los datos obtenidos se recogen en la Tabla 7.13.

Tabla 7.13. Reproducibilidad y repetibilidad del MISPE en muestras sintéticas.

	Concentración (mg/L)	Precisión (%)	Recuperación (%)±SD
Reproducibilidad (inter-día)	2	4,81	94,19±0,09
	20	2,86	96,94±0,55
	40	2,53	98,26±0,99
Repetibilidad (intra-día)	2	0,54	94,87±0,01
	20	2,43	96,66±0,47
	40	2,49	97,75±0,97

En todos los ensayos la recuperación supera el 94%. La precisión intra-día se ha demostrado a los tres niveles de concentración con valores de RSD menores de 2,5%. Los valores RSD para la precisión inter-día fueron cercanos al 3% para los niveles de 20 y 40 mg/L, y 5% para la concentración más baja.

7.7.2. Estudios de selectividad

La confirmación de la capacidad de impresión incluye el estudio de la selectividad del polímero. Para ello se estudió la capacidad de unión

del MIP en presencia de otras sustancias con estructuras análogas al analito plantilla.

Para realizar los estudios de selectividad, se prepararon disoluciones de 4 mg/L de cada uno de los analitos a partir de las disoluciones estándar. El procedimiento optimizado descrito anteriormente fue utilizado para evaluar cada analito y sus mezclas. Los siguientes resultados son el promedio de repetir cuatro veces el procedimiento propuesto.

En la Tabla 7.14, se recogen las recuperaciones obtenidas para cada analito por separado en el proceso MISPE propuesto.

Tabla 7.14. Resultados obtenidos en el procedimiento MISPE en muestras sintéticas de concentración 4 mg/L, para los catabolitos estudiados, por separado.

CATABOLITO	% RECUPERACIÓN	% RSD
4-HPA	94,85	0,52
3-HPA	86,81	4,34
SyA	79,37	3,49
PCA	80,76	4,43
HA	55,79	3,69
4-HBA	71,53	4,17

Como se puede observar todos los compuestos análogos propuestos son retenidos por el MIP, destacando por la mayor especificidad el analito plantilla y su isómero, seguido el por el PCA, SyA y 4-HBA, siendo el ácido hipúrico el que obtiene menor recuperaciones.

Finalmente se ha repetido el procedimiento en muestras sintéticas, para la mezcla de 6 catabolitos, mostrando los resultados obtenidos en la Tabla 7.15.

Tabla 7.15. Resultados obtenidos en el proceso MISPE en muestras sintéticas de 6 catabolitos juntos.

CATABOLITO	% RECUPERACIÓN	% RSD
4-HPA	89,86	3,71
3-HPA	84,42	2,93
SyA	75,4	5,96
PCA	64,70	6,49
HA	55,07	6,45
4-HBA	70,75	6,56

El reconocimiento molecular de los compuestos está influenciado por la presencia, número y posición de los grupos hidroxilo y carboxilo en el anillo aromático (Denderz et al. 2012; Dmitrienko et al. 2008; Shi et al. 2014; Schwarz, Danylec, Harris, Boysen, & Hearn, 2011). Con los resultados obtenidos, se pone de manifiesto que el MIP sintetizado es efectivo para la extracción del 4-HPA y de los compuestos análogos seleccionados.

7.8. APLICACIÓN DEL PROCEDIMIENTO MISPE A MUESTRAS DE ORINA

La aplicación del procedimiento validado a las muestras de orina, ha exigido una adaptación a las características específicas de la muestra y una nueva validación del procedimiento.

7.8.1. Preparación de la muestra y estudio de pH

El pH y la concentración de los ácidos fenólicos afectan a la recuperación de los compuestos fenólicos específicamente retenidos. Según Dmitrienko y col. (2006), para este tipo de compuestos, al aumentar el pH, la adsorción decrece. En las muestras sintéticas el procedimiento se valida

en condiciones ácidas, sin embargo, las muestras de orina inicialmente presentan un pH de 6,8, lo que hace necesario un estudio de pH para optimizar el procedimiento (Dmitrienko et al., 2006).

En la Figura 7.19, se muestran los resultados obtenidos al variar el pH en las muestras de orina.

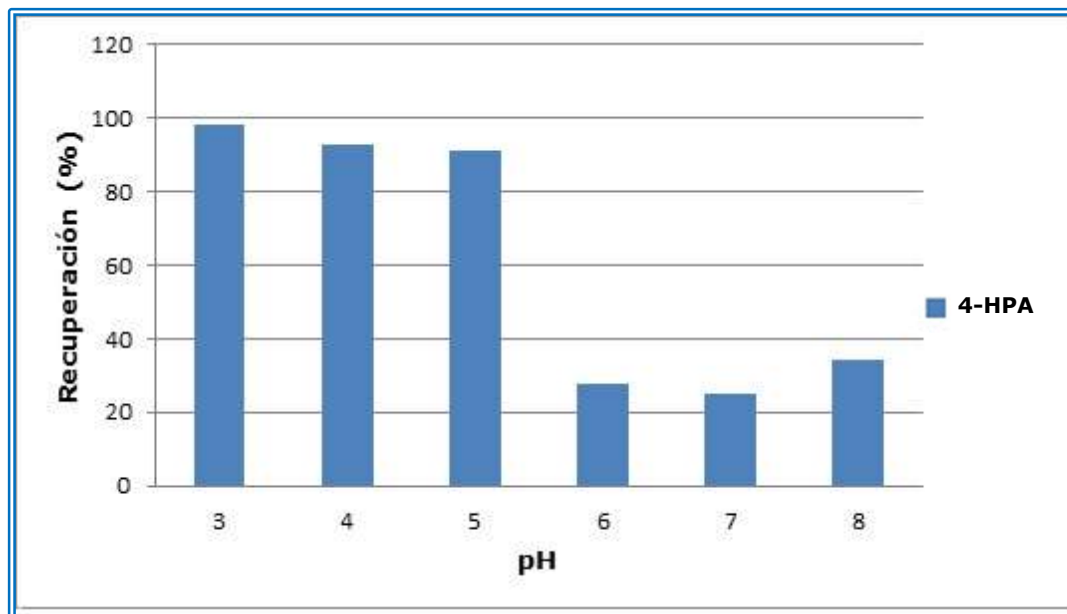


Figura 7.19. Estudios de recuperación en el proceso MISPE en muestras de orina, con respecto a las modificaciones de pH, para el 4-HPA, y una concentración de 4 mg/L.

Los resultados anteriores se han obtenido realizando por triplicado el procedimiento MISPE con muestras de orina dopadas con una concentración de 4 mg/L de 4-HPA a diferentes valores de pH. Como se puede observar las mejores recuperaciones se obtienen a pH ácidos. Por tanto, se fija como valor óptimo de pH para muestras de orina un valor de 3.

Así pues, las muestras de orina libres de ácidos fenólicos, procedentes de lactantes, se centrifugaron a 10.000 r.p.m., durante 10 minutos a fin de eliminar cualquier material precipitado que pudiera bloquear los cartuchos, para después ser filtradas con un filtro Whatman PPW/GMF de polipropileno de 0,45 μm de tamaño de poro, y posteriormente se congelaron sin conservantes a $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Antes del

procesamiento de las muestras, éstas se descongelaron a temperatura ambiente homogeneizándola suavemente. En estas condiciones, el pH de las muestras es de alrededor de 6,8 y por tanto, se ajusta al pH óptimo (pH 3), mediante la adición de HCl 1M. Posteriormente, la orina es adicionada con la correspondiente alícuota de la disolución de trabajo para obtener la concentración requerida, dejándose reposar durante 30 minutos para fomentar la interacción analito-orina. La mezcla fue homogeneizada mediante vórtex durante 1 minuto y una alícuota de 0,5 mL se sometió al procedimiento MISPE.

7.8.2. Resultados y discusión

Al igual que en el proceso de validación del MISPE en muestras sintéticas, se han llevado a cabo estudios de precisión (reproducibilidad, repetibilidad), recuperación y especificidad en muestras de orina.

En la Tabla 7.16, se muestran los resultados de reproducibilidad y repetibilidad, obtenidos en muestras de orina, para el 4-HPA (precisión inter-día y precisión intra-día), a tres niveles diferentes de concentración: 2 mg/L, 20 mg/L y 40 mg/L en muestras de orina.

Tabla 7.16. Reproducibilidad y repetibilidad del MISPE en muestras de orina.

	Concentración (mg/L)	Precisión (%)	Recuperación (%)±SD
Reproducibilidad (inter-día)	2	6,68	94,57±0,12
	20	3,25	94,40±0,61
	40	2,12	98,30±1,22
Repetibilidad (intra-día)	2	1,63	99,92±0,03
	20	2,81	92,40±0,52
	40	2,82	94,05±1,06

En todos los ensayos la recuperación supera el 92%. La precisión intra-día se ha demostrado a los tres niveles de concentración con valores de RSD menores de 2,8%. Los valores RSD para la precisión inter-día fueron menores al 3% para los niveles de 20 y 40 mg/L, y cercanos al 7% para la concentración más baja.

En la Tabla 7.17, se muestran las recuperaciones obtenidas en muestras de orinas adicionadas con una concentración 4 mg/L de cada analito.

Tabla 7.17. Resultados obtenidos en el proceso MISPE, para los 6 catabolitos por separado en muestras de orina para una concentración de 4 mg/L.

CATABOLITO	% RECUPERACIÓN	% RSD
4-HPA	92,62	1,19
3-HPA	88,83	2,19
SyA	76,90	4,32
PCA	80,37	3,73
HA	64,06	3,34
4-HBA	79,56	3,51

Finalmente se aplica el procedimiento MISPE en muestras de orina, adicionada con una mezcla de los 6 catabolitos, obteniéndose los siguientes resultados (Tabla 7.18 y Figura 7.20).

Tabla 7.18. Resultados obtenidos en el proceso MISPE, para la mezcla de 6 catabolitos juntos en orina en concentración 4 mg/L.

CATABOLITO	% RECUPERACIÓN	% RSD
4-HPA	94,04	1,80
3-HPA	87,88	2,83
SyA	81,87	6,46
PCA	77,11	4,07

HA	71,02	7,73
4-HBA	80,09	5,98

La Figura 7.20, muestra las recuperaciones comparativas obtenidas para cada analito en muestras de orina. La concentración de cada metabolito es de 4 mg/L y las barras de error indican la desviación estándar de las réplicas (n=3).

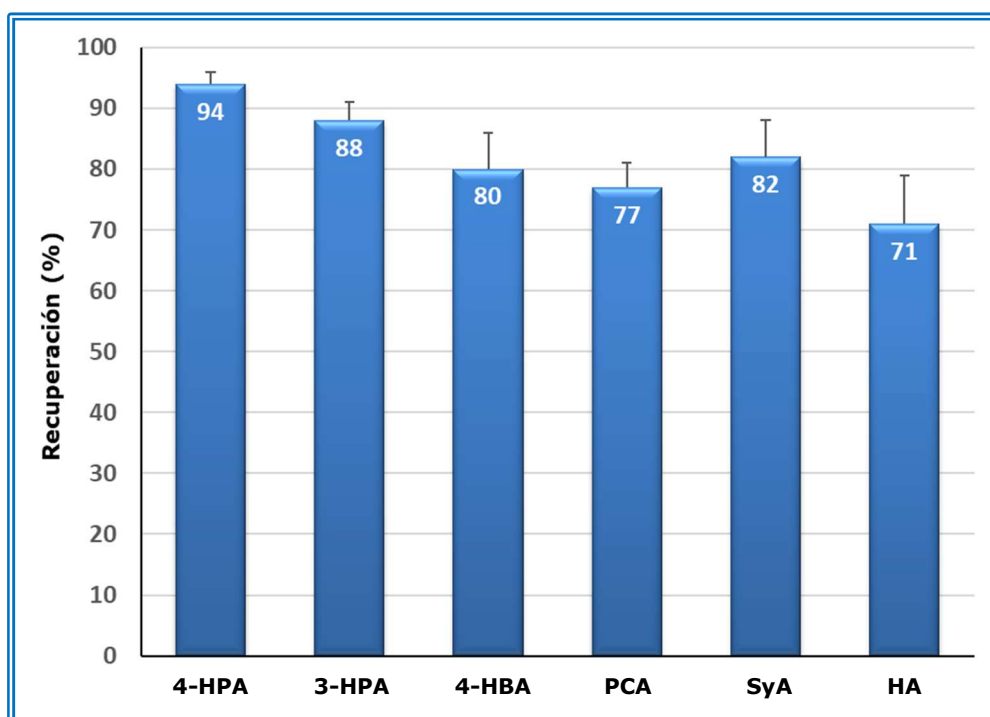


Figura 7.20. Porcentaje de recuperación para análogos de ácidos fenólicos, obtenidos por procedimiento MISPE.

A la vista de los datos anteriores, se observa que el MIP muestra un reconocimiento molecular altamente específico para la plantilla (94% de recuperación), superior a los porcentajes obtenidos para los otros compuestos análogos estudiados. El reconocimiento molecular de los compuestos está influenciado por la presencia, el número y la posición de los grupos hidroxilo, por el tamaño de la molécula y también por la presencia de grupos metoxi y carboxilo en el anillo aromático (Denderz &

Lehotay, 2012; Dmitrienko et al., 2008; Schwarz et al., 2011; Shi et al., 2014). Para el 3-HPA, el isómero del 4-HPA, el valor de recuperación fue del 88%. Todos los compuestos estudiados tienen grupos carboxilo y grupos hidroxilo, salvo el HA, por lo que pueden interactuar con la matriz polimérica. Por consiguiente, aunque existe una fuerte competencia por sitios de unión específicos y no específicos, esto no afecta significativamente los valores de recuperación del 4-HPA. Las características estructurales de las moléculas condicionan por tanto las interacciones y los porcentajes de retención obtenidos para los compuestos estudiados. Después del compuesto plantilla y de su isómero, le sigue en recuperación el ácido siríngico con un 82%, y el 4-HBA con un 80%, tanto el SyA como el 4-HBA se caracterizan por tener grupo hidroxilo en su posición *para*-, además el SyA presenta dos grupos metoxi y una gran simetría en su molécula. Le siguen en recuperación el PCA, que posee dos grupos hidroxilo en su molécula, obteniéndose para él una recuperación del 77%. Por último, el HA, con gran diferencia estructural con la plantilla, es el menos retenido con un 71%.

Estos resultados muestran que el MIP sintetizado para el 4-HPA, es un adsorbente eficaz y selectivo en la preparación de muestras complejas, siendo el procedimiento MISPE desarrollado un método de extracción selectivo para el 4-HPA y para otros ácidos fenólicos, catabolitos de los flavan-3-oles, en muestras de orina. Por otro lado, ha quedado demostrado que el 4-HPA-MIP ofrece gran especificidad comparado con otros adsorbentes. Así mismo, los resultados indican que el procedimiento MISPE propuesto obtiene altas recuperaciones, bajos límites de detección y buena repetibilidad, proporcionando un método específico, fiable y alternativo para determinar estos metabolitos secundarios, posibles biomarcadores, de la ingesta de flavonoides. Además, este procedimiento selectivo ayudará a obtener mejores resultados en procedimientos analíticos que utilicen otro tipo de detectores menos específicos y sensibles. Así mismo, facilitarán el desarrollo de nuevos métodos de screening como sensores electroquímicos, etc.

En nuestro conocimiento, es la primera vez que se aplica un procedimiento MISPE para analizar los catabolitos urinarios de compuestos

polifenólicos, proporcionando un método específico y una alternativa sencilla de análisis a otros métodos ya publicados. Anteriormente, otros ácidos fenólicos se habían utilizado como plantilla para la síntesis de polímeros de impronta molecular. PCA se había utilizado como plantilla para la síntesis de un MIP para la extracción de compuestos fenólicos en plantas mediante un procedimiento MISPE (Karasova et al., 2005), o utilizado como fase estacionaria en el análisis de muestras sintéticas o muestras de vino (Denderz et al., 2012; Denderz et al., 2014). También un 4-HBA-MIP ha sido utilizado como fase estacionaria en otros estudios (Denderz et al., 2012; Dmitrienko et al., 2008; Sun et al., 2001). Utilizando también 4-HBA como plantilla se ha propuesto un procedimiento MISPE para la extracción selectiva de polifenoles en aguas residuales procedentes de los procesos de extracción de aceite (Michailof et al., 2008). Únicamente se ha publicado un trabajo utilizado como plantilla 4-HPA en la síntesis de un polímero, aplicándolo como fase estacionaria en un método cromatográfico o para estudios teóricos de reconocimiento molecular (Sun et al., 2001). Por otro lado, hay escasas aplicaciones de MIP para la determinación o extracción selectiva de compuestos en orina. Únicamente se ha encontrado un estudio realizado para la extracción selectiva de ácido hipúrico y ácido 4-metilhipúrico en orina utilizando un MIP sintetizado para el ácido 4-metilhipúrico, con el objetivo de evaluar la exposición a contaminantes (tolueno y xilenos) (Boscari et al., 2017).

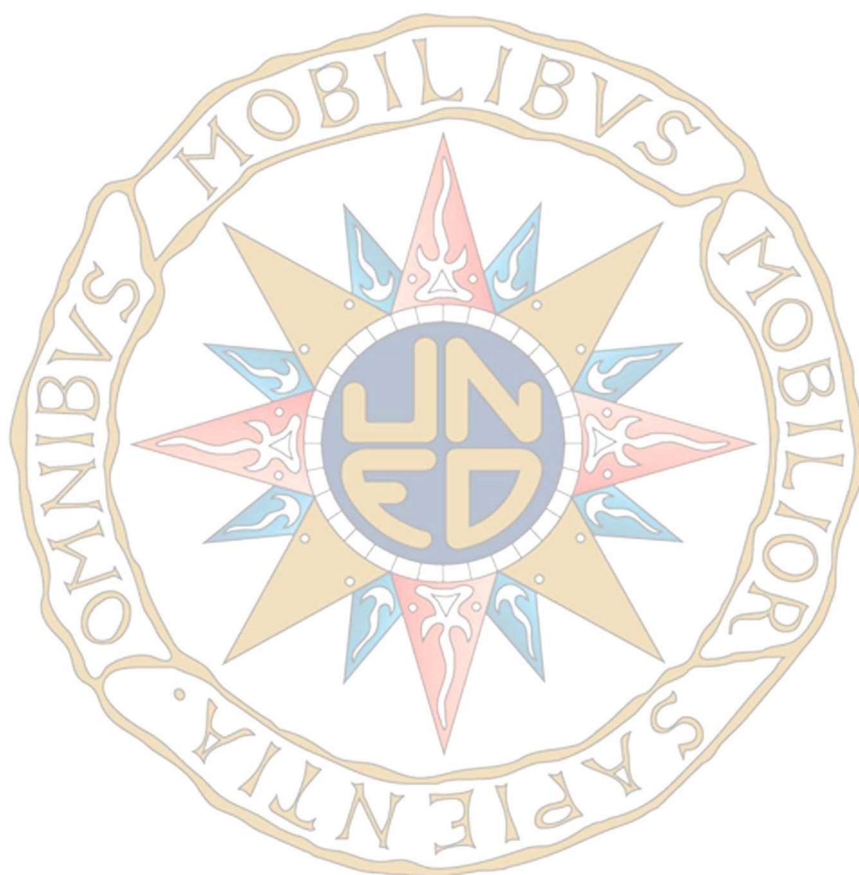
Por tanto, se puede concluir que el procedimiento MISPE propuesto es la primera aplicación publicada para la determinación de ácidos fenólicos, metabolitos secundarios de los flavan-3-oles presentes en orina.

7.9. CONCLUSIONES

Para facilitar el seguimiento y estudio de la biodisponibilidad de los flavan-3-oles se ha propuesto al 4-HPA, catabolito secundario de bajo peso molecular, presente en la orina, como biomarcador de la ingesta de los compuestos de interés. Utilizando el 4-HPA como plantilla se ha sintetizado

un polímero de impresión molecular que se ha utilizado para el desarrollo de un procedimiento de extracción en fase sólida en cartucho. El método ha sido validado en un intervalo de concentraciones de 0,25 a 40 mg/L, obteniendo un $R^2 > 0,995$. En las condiciones óptimas se ha obtenido una recuperación del 94% (RSD 1,2%) del 4-HPA en orina. Así mismo se han obtenidos importantes recuperaciones de otros compuestos análogos, por lo que el MISPE propuesto también sería aplicable para la determinación de otros catabolitos de interés. La validación del método ha dado buenos límites de detección y cuantificación. Estos fueron 1,22 mg/L y 3,69 mg/L, respectivamente.

Por tanto, el procedimiento MISPE propuesto es un procedimiento específico, fiable, rápido y barato de tratamiento de muestras complejas, muy útil para los estudios de biodisponibilidad. Además, es la primera aplicación publicada para la determinación de catabolitos de polifenoles en orina.



Capítulo 8

DESARROLLO DE UN SENSOR ELECTROQUÍMICO COMBINADO CON UN PROCEDIMIENTO MISPE PARA LA DETECCIÓN DE CATABOLITOS DE FLAVAN-3-OLES EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

8.1. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Muchos compuestos fenólicos presentan una electroactividad natural a potenciales bajos, que hace posible su detección y cuantificación por técnicas electroanalíticas. Esta electroactividad está relacionada con la oxidación de los grupos hidroxilo de sus moléculas, y los sustituyentes electroactivos o no-electroactivos ligados al anillo aromático, lo que determina el perfil voltamperométrico del compuesto fenólico (Chiorcea-Paquim, Enache, Gil, & Oliveira-Brett, 2020). Entre las técnicas electroanalíticas, las técnicas voltamperométricas son las más ampliamente utilizadas en el análisis de los compuestos fenólicos, en todo tipo de muestras (Arribas, Martinez-Fernandez, & Chicharro, 2012; Chiorcea-Paquim et al., 2020; Dobes et al., 2013; Kilmartin & Hsu, 2003; Kilmartin, Zou, & Waterhouse, 2001; Prehn, Gonzalo-Ruiz, & Cortina-Puig, 2012; Sousa, da Rocha, Cardoso, Silva, & Zanoni, 2004; Vilas-Boas, Valderrama, Fontes, Geraldo, & Bento, 2019). Estas técnicas presentan grandes ventajas, en comparación con otras técnicas analíticas, destacando su sensibilidad, sencillez y rapidez. También destacan por el mínimo consumo de reactivos y muestra, contribuyendo considerablemente a minimizar los costes del análisis. Las principales técnicas electroquímicas utilizadas son la voltametría cíclica (CV), la voltametría diferencial de pulso (DPV) y la voltametría de onda cuadrada (SWV) (Arribas et al., 2012; Chiorcea-Paquim et al., 2020; Dobes et al., 2013).

En las últimas décadas, las principales líneas de investigación en la determinación electroquímica se han centrado en el desarrollo de nuevos electrodos modificados (Kumar & Adarakatti, 2018; Volikakis & Efstathiou, 2000; Yan, Bo, & Guo, 2020), y en el desarrollo de sensores o biosensores que permitan análisis más sensibles y específicos (Beluomini et al., 2019; Crapnell et al., 2019; Forzato, Vida, & Berti, 2020; Hui, Ambrosi, Pumera, & Bonanni, 2016; Litescu, Eremia, & Radu, 2010; Ye, Ji, Sun, Shen, & Sun, 2020). Por otro lado, la aparición en el mercado de electrodos serigrafados (SPE, *Screen-printing electrode*) ha permitido la miniaturización electroquímica, posibilitando el trabajo con volúmenes del orden de microlitros. Además, este tipo de electrodos permite un diseño

flexible, tienen un bajo coste que los hacen desechables, y sus pequeñas dimensiones hace factible el desarrollo de sistemas portátiles (Cinti & Arduini, 2017; Couto, Lima, & Quinaz, 2016; Renedo, Alonso-Lomillo, & Martinez, 2007; Taleat, Khoshroo, & Mazloum-Ardakani, 2014; Tudorache & Bala, 2007). Sin embargo, en estas condiciones de trabajo, puede presentarse una baja selectividad, que puede ser paliada adicionando un elemento de reconocimiento de alta especificidad en el electrodo (enzimas, ácidos nucleicos, MIP, etc.) o un elemento que modifique la estructura del mismo para mejorar la sensibilidad (nanoestructuras de carbono, grafeno, etc.) (Couto et al., 2016; Forzato et al., 2020). Otra forma de asegurar la selectividad del sensor, es combinar éste (modificado o no), con una extracción y preconcentración selectiva (Long, Wang, Zhang, & Yan, 2016; Prasad, Sharma, & Lakshmi, 2007; Sharma, Lakshmi, & Prasad, 2007).

Muchas de las modificaciones en los electrodos SPE publicadas, se orientan a aumentar el área superficial de los mismos mediante nanomateriales, favoreciendo los procesos electroquímicos, y mejorando la sensibilidad (Apetrei & Apetrei, 2018; Fanjul-Bolado, Queipo, Lamas-Ardisana, & Costa-Garcia, 2007). En los electrodos modificados se mejora la transferencia de carga entre las moléculas electroactivas y el electrodo, mejorando también la inmovilización de algunos analitos. Además, en algunas ocasiones, los materiales utilizados en la modificación pueden actuar como catalizadores de la reacción electroquímica, disminuyendo la energía de reacción y favoreciendo que los procesos sean reversibles, mejorando la sensibilidad. Entre estos materiales destaca el grafeno, cuyas propiedades hacen de éste, un material ampliamente utilizado en el ámbito medioambiental, industrial y electroquímico (Agarwal et al., 2015; Pan, Ji, Zhang, & Xing, 2020).

Diferentes SPE modificados se han utilizado para determinar compuestos fenólicos en alimentos o muestras medioambientales (Tudorache & Bala, 2007), también en fármacos y muestras biológicas (Couto et al., 2016). Utilizando SPE se ha determinado rutina, quercetina u otros polifenoles en fruta, medicamentos o cosméticos (Apetrei & Apetrei, 2018; Bordonaba & Terry, 2012; Bounegru & Apetrei, 2020; Yao et al., 2018).

El objetivo del trabajo que se presenta en este capítulo, es combinar un procedimiento MISPE fácil, barato y rápido, previamente validado, para la extracción selectiva y preconcentración en orina de los catabolitos de los flavan-3-oles, y su posterior detección y cuantificación mediante un electrodo serigrafiado de carbono (SPCE, *Screen-printing carbon electrode*) y voltametría diferencial de pulsos de redisolución adsortiva (AdDPV, *Adsorptive transfer Differential Pulse Voltammetry*). La posibilidad de la activación de los SPE para aumentar su sensibilidad, y la modificación con óxido de grafeno electroquímicamente reducido (ERGO), ha sido estudiada.

El procedimiento propuesto permitirá que el sensor electroquímico de una respuesta fiable, sensible y específica, reduciendo el tiempo y coste del análisis. Los resultados serán validados por otra técnica analítica, la cromatografía líquida HPLC-DAD-MS, según el procedimiento anteriormente descrito.

8.2. ESTUDIO DE LA ELECTROACTIVIDAD DE LOS ANALITOS DE INTERÉS

Todos los polifenoles presentan un comportamiento redox común, debido a la oxidación electroquímica de sus grupos OH, influenciado por los sustituyentes unidos al anillo aromático, así como por otros factores, siendo el pH uno de los más importantes, afectando a la capacidad antioxidante y a la formación de los productos de oxidación (Chiorcea-Paquim et al., 2020). Los principios fundamentales relativos al comportamiento redox de los ácidos fenólicos, polifenoles y otros compuestos análogos han sido revisados por Chiorcea-Paquim y col. (2020) en una reciente publicación (Chiorcea-Paquim et al., 2020).

En la Figura 8.1, se recogen las estructuras de los analitos de interés: el ácido 4-hidroxibenzoico (4-HBA), el ácido 3,4-dihidroxibenzoico o ácido protocatecuico (PCA), el ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico o ácido sirínico (SyA), todos ellos derivados del ácido benzoico. El ácido 4-

hidroxifenilacético (4-HPA), utilizado como plantilla en la síntesis del MIP, el ácido 3-hidroxifenilacético (3-HPA), isómero del anterior, y por último, el ácido hipúrico (HA). Todos ellos, son catabolitos de los flavan-3-oles presentes en la orina después de la ingesta de productos ricos en flavonoides, y para los que se ha validado el procedimiento MISPE desarrollado con el polímero de impronta molecular sintetizado.

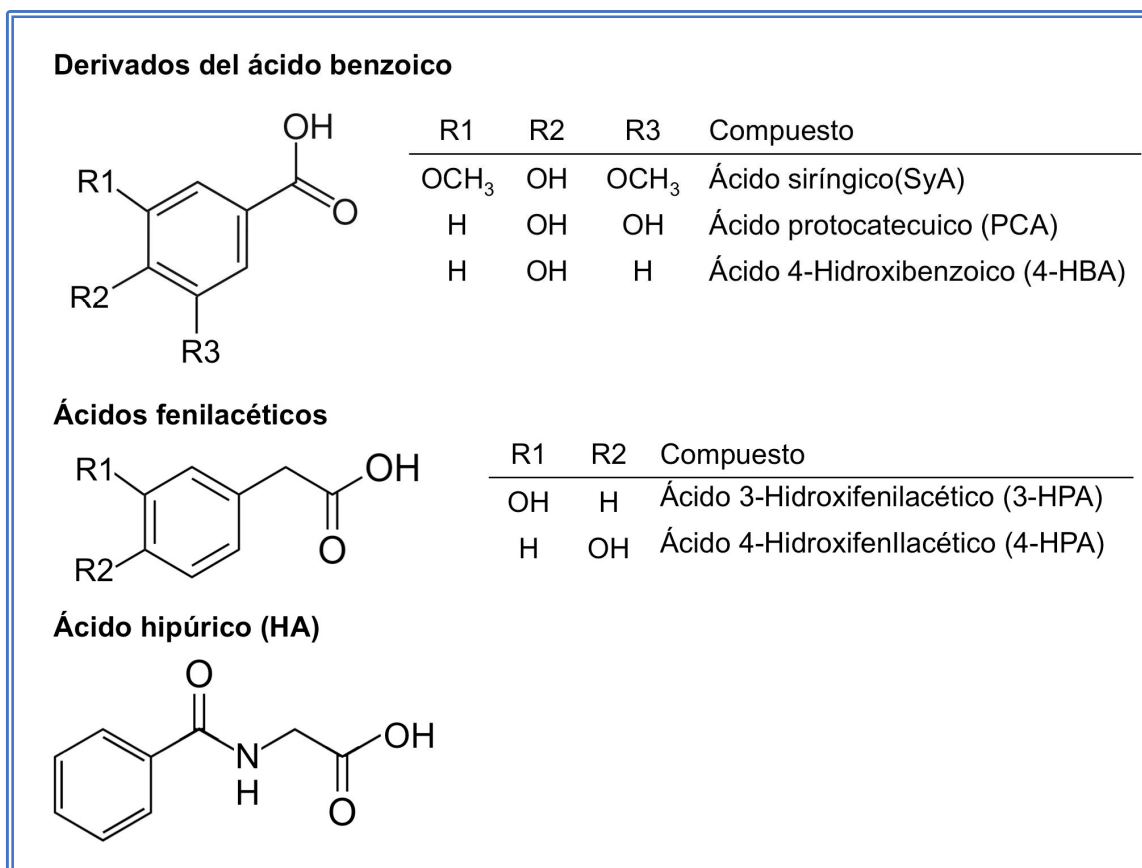


Figura 8.1. Estructuras químicas de los ácidos fenólicos estudiados.

Para estudiar la electroactividad de los analitos, se ha realizado una voltametría cíclica (CV) para cada uno de ellos, utilizando electrodos serigrafados de carbono (SPCE) desechables, de marca DRP-110, fabricados por Metrohm DropSens (España), con un electrodo de trabajo de carbono de 4 mm, un electrodo auxiliar, también de carbono y un electrodo de referencia de plata.

El ensayo se realiza añadiendo sobre el electrodo 20 μ L de una disolución 500 μ M del analito a estudiar, preparada con mezcla acetonitrilo-

ácido fórmico (99:1, v/v), mezcla de elución, dejando que se evapore al aire hasta sequedad. Posteriormente, se añaden 50 μL de tampón Britton-Robinson pH=2 (pH optimizado previamente). Todas las disoluciones son desoxigenadas, antes de ser utilizadas, haciendo burbujear N_2 durante 20 minutos. También se ha realizado la medida del tampón Britton-Robinson (pH 2), a modo de blanco. Todas las medidas se realizan utilizando un potenciostato/galvanostato de un canal (mod. Epsilon Eclipse) de West Lafayette (EE.UU.), una celda para electrolisis (mod. C-3 Cell Stand), también de West Lafayette (EE.UU.), con colector de electrodos serigrafiados comerciales de Metrohm DropSens (España). El equipo es controlado por el programa DigiSim, de Epsilon Eclipse de West Lafayette (EE.UU.). Las medidas se realizan poniendo los parámetros recogidos en la Tabla 8.1, en el equipo.

Tabla 8.1. Parámetros impuestos en el equipo para la realización de la voltametría cíclica.

Potencial inicial (V)	Potencial de inversión (V)	Potencial final (V)	Velocidad de barrido (V/s)	Paso de potencial (V)	Nº de ciclos
-0,3	1	-0,3	0,1	0,001	1

La oxidación anódica de 500 μM de cada ácido fenólico en Britton-Robinson pH 2, muestra que, excepto el ácido hipúrico, que no se oxida, todos los demás analitos son electroactivos, presentando ondas bien definidas con un único pico anódico, donde la forma y el potencial de pico son característicos de cada compuesto (Figura 8.2).

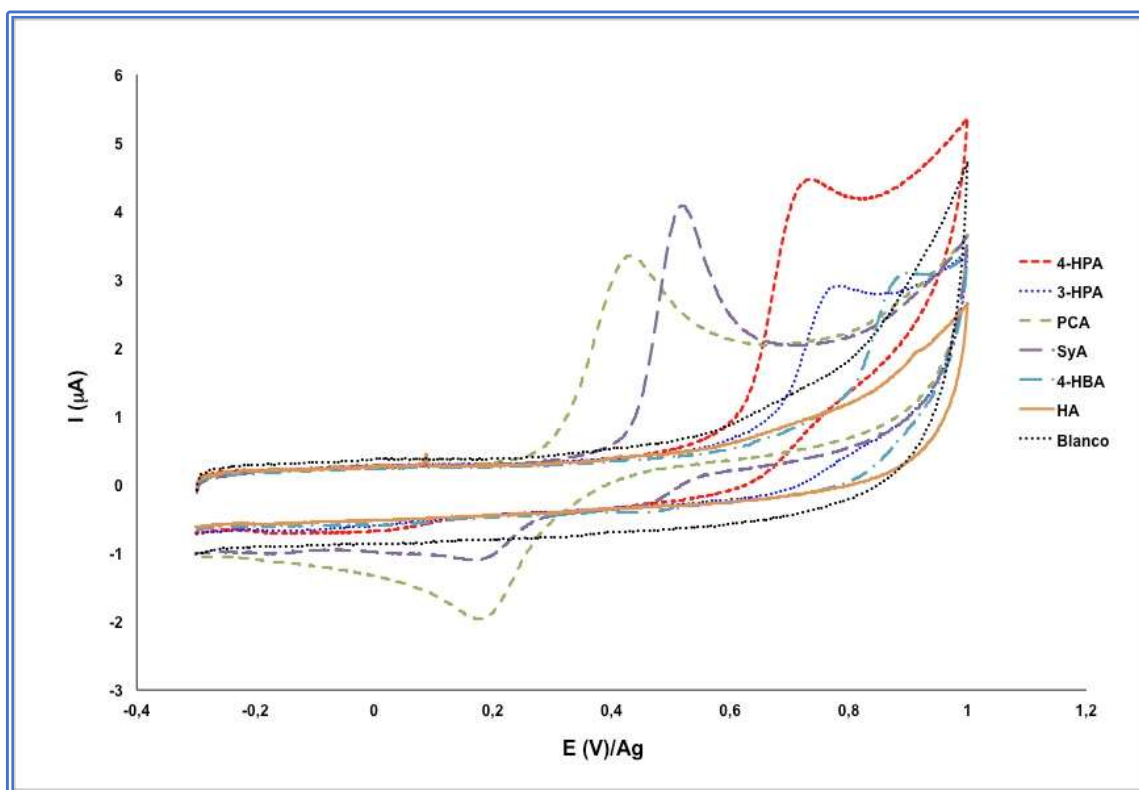


Figura 8.2. Voltamperogramas cíclicos (CV) de 500 μM de los catabolitos estudiados en Britton-Robinson pH 2, y del blanco (sólo el tampón). Velocidad de barrido 100 mV/s.

Como se puede observar en la Figura 8.3, únicamente el ácido siríntrico y el ácido protocatecuico presentan voltamperogramas con picos catódicos. Los demás compuestos electroactivos no presentan este tipo de picos, por lo que se puede suponer que sus picos anódicos corresponden a procesos irreversibles (Sousa et al., 2004). Por otro lado, en concordancia con la bibliografía, los ácidos que presentan más sustituyentes en el anillo bencénico tienen un potencial más bajo, por ejemplo el PCA (ácido 3,4-dihidroxibenzoico) y el SyA (ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico), que los demás compuestos con un único grupo hidroxilo (4-HBA, 4-HPA y 3-HPA). Además, PCA y SyA presentan un reversible par redox que no se observa en la oxidación de los otros compuestos fenólicos (Sousa et al., 2004).

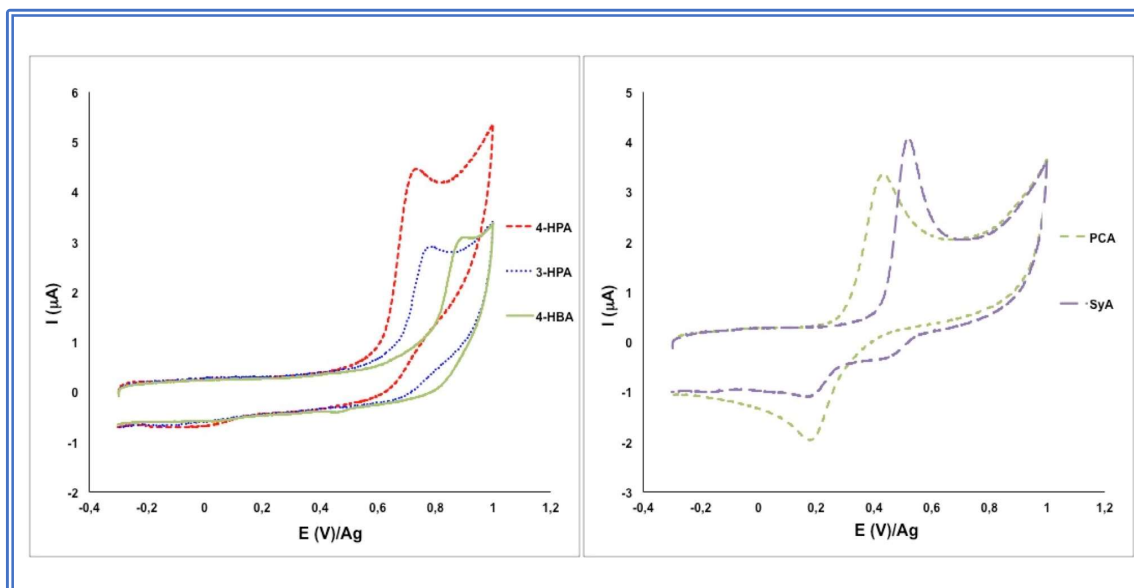


Figura 8.3. Voltamperogramas cíclicos (CV) de 500 μM de los catabolitos electroactivos en Britton-Robinson pH 2. Velocidad de barrido 100 mV/s.

En la Tabla 8.2, se recogen los datos obtenidos en las correspondientes CV, donde E es el potencial de pico anódico, I , la intensidad de pico anódico y Q , la carga.

Tabla 8.2. Datos obtenidos al aplicar CV, a una concentración 500 μM de los catabolitos estudiados en Britton-Robinson pH 2 y velocidad de barrido de 100 mV/s.

Compuesto	E (mV)	I (μA)	Q (μC)
4-HPA	734	3,4028	2,4760
3-HPA	782	1,5320	0,9736
SyA	519	4,0040	2,2822
PCA	429	2,5269	1,8140
4-HBA	902	1,5106	1,0649
HA	---	---	---

El ácido 3-hidroxifenilacético y el 4-hidroxifenilacético, isómeros estructurales, dan una señal cercana a los 780 mV, por lo que se determinarían conjuntamente. En este estudio únicamente se considerará el

4-HPA. La señal del ácido protocatecuico se presenta al potencial más bajo, alrededor de 430 mV, el ácido siríngico aparece a un potencial de 515 mV, y la señal del ácido 4-hidroxibenzoico aparece al potencial más alto, cercano de los 900 mV.

Los voltamperogramas obtenidos (Figura 8.3), muestran ondas anódicas similares para algunos ácidos fenólicos, esto implica que el grupo electroactivo es análogo en ellos, es decir, desde un enfoque electroquímico, el PCA se comporta como el SyA, y 4-HPA, 3-HPA y 4-HBA se comportan de forma similar. Así pues, la estimación total de cada uno de ellos, es posible utilizando una aproximación electroquímica, pudiendo elegir como modelos, al PCA y al 4-HPA, para llevar a cabo el resto de experimentos de optimización.

8.3. PREPARACIÓN DE LOS ELECTRODOS SPCE

La determinación de los ácidos fenólicos se lleva a cabo utilizando electrodos serigrafiados de carbono (SPCE) desechables. Para aumentar la sensibilidad y especificidad de este tipo de electrodos se han considerado dos estrategias, la simple activación electroquímica de los mismos y la modificación de su superficie con óxido de grafeno.

8.3.1. Activación de los electrodos SPCE

Los electrodos serigrafiados (SPE) son ampliamente utilizados en el campo del electroanálisis. Su bajo coste hace que puedan ser desechados, no siendo necesario el pulido u otro tipo de tratamiento para evitar adsorciones indeseables que se dan en los electrodos sólidos convencionales (Kumar & Adarakatti, 2018). El carbono es el material más utilizado en los electrodos serigrafiados (SPCE), debido principalmente a su bajo coste y a ser inerte como electrodo de trabajo. La activación electroquímica de los electrodos mediante la oxidación y reducción de la superficie del electrodo, puede cambiar las características del mismo,

mejorando la sensibilidad y selectividad del procedimiento, debido a la interacción entre los grupos funcionales específicos generados en la superficie y las especies selectivas en disolución (Sousa et al., 2004). El proceso de activación de los SPCE se ha llevado a cabo depositando sobre la superficie del electrodo 50 μL del tampón Britton-Robinson $\text{pH}=2$, y realizando una voltametría cíclica a mucha velocidad, repitiendo este proceso, de forma consecutiva, 100 veces (100 ciclos). En la Tabla 8.3, se recogen los parámetros para realizar las CV de activación.

Tabla 8.3. Parámetros impuestos en el equipo para la realización de la voltametría cíclica de activación de SPCE.

Potencial inicial (V)	Potencial de inversión (V)	Potencial final (V)	Velocidad de barrido (V/s)	Paso de potencial (V)	Nº de ciclos
-1	1	-1	1	0,01	100

Con la activación se consigue aumentar las especies de oxígeno sobre la superficie del electrodo, aumentando la sensibilidad del mismo hacia los compuestos fenólicos. Posteriormente, se deja secar el electrodo bajo corriente suave de nitrógeno.

En la Figura 8.4, se puede observar la diferente respuesta obtenida para la mezcla de los cuatro analitos electroactivos (PCA, SyA, 4-HBA y 4-HPA), en una concentración 125 mg/L, dependiendo de si el electrodo está activado o no. Como se puede observar, simplemente activando electroquímicamente los electrodos se aumenta considerablemente la resolución de los picos y la sensibilidad.

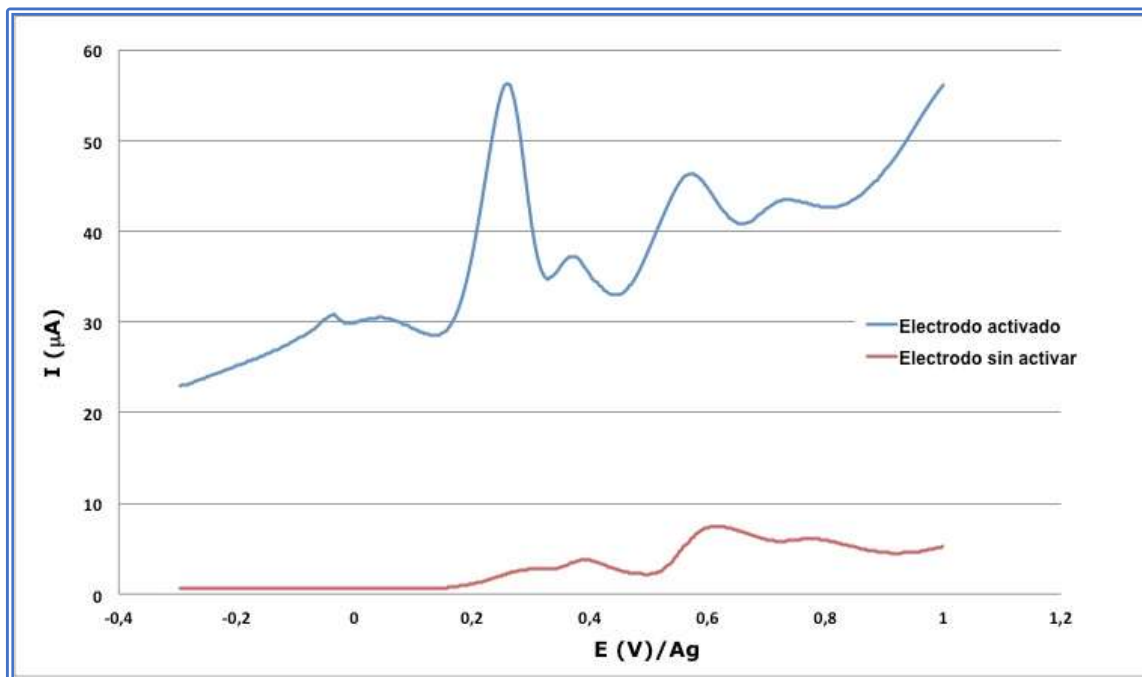


Figura 8.4. AdDPV de una mezcla de PCA, SyA, 4-HBA y 4-HPA en una concentración 125 mg/L en orina. Condiciones: Britton-Robinson pH 2, amplitud del pulso 125 mV, tiempo del pulso 50 ms, potencial del escalón 4 mV, intervalo de tiempo 200 ms.

8.3.2. Modificación del electrodo SPCE con óxido de grafeno

La modificación de la superficie de los electrodos, puede realizarse con distintos enfoques y una gran variedad de procedimientos y estrategias se han propuesto (Kumar & Adarakatti, 2018). Sin embargo, en las últimas décadas los sensores electroquímicos basados en el grafeno y los electrodos serigrafados se han ido imponiendo, y novedosas aplicaciones se han publicado recientemente (Cinti & Arduini, 2017).

Para intentar mejorar la sensibilidad y especificidad de los electrodos en la determinación de los catabolitos, se estudia la posibilidad de utilizar electrodos modificados con óxido de grafeno (GO, *graphene oxide*) (Hui et al., 2016; Jampasa, Siangproh, Duangmal, & Chailapakul, 2016).

Se ha demostrado que el uso de un nanomaterial, como el grafeno, para la detección electroquímica directa, proporciona una alta tasa

de transferencia de electrones, alta relación superficie/volumen y buena sensibilidad (Guo & Dong, 2011). Aprovechando estas características, se han desarrollado múltiples sensores electroquímicos basados exclusivamente en grafeno, para la detección directa de H_2O_2 , ácido ascórbico, ácido úrico, dopamina y varios compuestos fenólicos, proponiéndose diferentes procedimientos para modificar con grafeno electrodos serigrafados (Cinti & Arduini, 2017). Además, la combinación de la tecnología de electrodos serigrafados (SPE) y el grafeno, es una estrategia de vanguardia para el análisis "*in situ*". La tecnología SPE proporciona dispositivos fiables de un sólo uso, que pueden modificarse fácilmente (Taleat et al., 2014), mientras que el grafeno proporciona una mejora del rendimiento electroanalítico (Cinti & Arduini, 2017).

Preparación de la disolución de óxido de grafeno

Se prepara una disolución de 4 mg/L de óxido de grafeno (GO), a partir de la disolución comercial, dispersándola mediante ultrasonidos durante 5 minutos. Posteriormente, en un Eppendorf, se pone 1 mL de la disolución de óxido de grafeno preparada, añadiendo tampón fosfato (pH=7,2), en proporción 1:3 (v:v), 250 μ L de disolución de GO y 750 μ L de tampón fosfato, alcanzando una concentración final de 1 mg/mL (Jampasa et al., 2016). Posteriormente, se mantiene la disolución preparada durante 5 minutos en ultrasonidos. Las disoluciones y el tampón deben someterse a una corriente de nitrógeno para eliminar el oxígeno. Esta disolución preparada, puede utilizarse para modificar hasta 14 electrodos comerciales.

Reducción electroquímica del óxido de grafeno (ERGO)

Aunque existen diferentes formas de modificar con grafeno un electrodo SPE (Cinti & Arduini, 2017). Una forma sencilla es hacerlo por electrodeposición, es decir, depositando grafeno sobre la superficie del electrodo de trabajo. Este proceso de reducción electroquímica suele

realizarse por amperometría catódica o voltametría cíclica. En el presente estudio se ha optado por realizar la modificación del SPCE con GO mediante amperometría catódica (DCPA, *DC Potential Amperometry*) (Cinti & Arduini, 2017). La DCPA es una técnica amperométrica sencilla en la que se impone un potencial constante. Para ello se añade sobre el electrodo 70 μL de la disolución de óxido de grafeno-tampón (pH=7,2) y se impone en el equipo un potencial de -1200 mV durante 300 s (5 min). Una vez realizada la reducción electroquímica, se retira cuidadosamente la disolución del electrodo con una micropipeta, evitando incidir sobre la superficie del electrodo. Posteriormente, se lava el electrodo con agua desionizada, de forma que se deslice suavemente por la superficie. Finalmente, se deja secar el electrodo al aire. En la Figura 8.5, se presenta de forma esquemática, la reducción electroquímica del óxido de grafeno sobre la superficie del electrodo serigrafado (Jampasa et al., 2016).

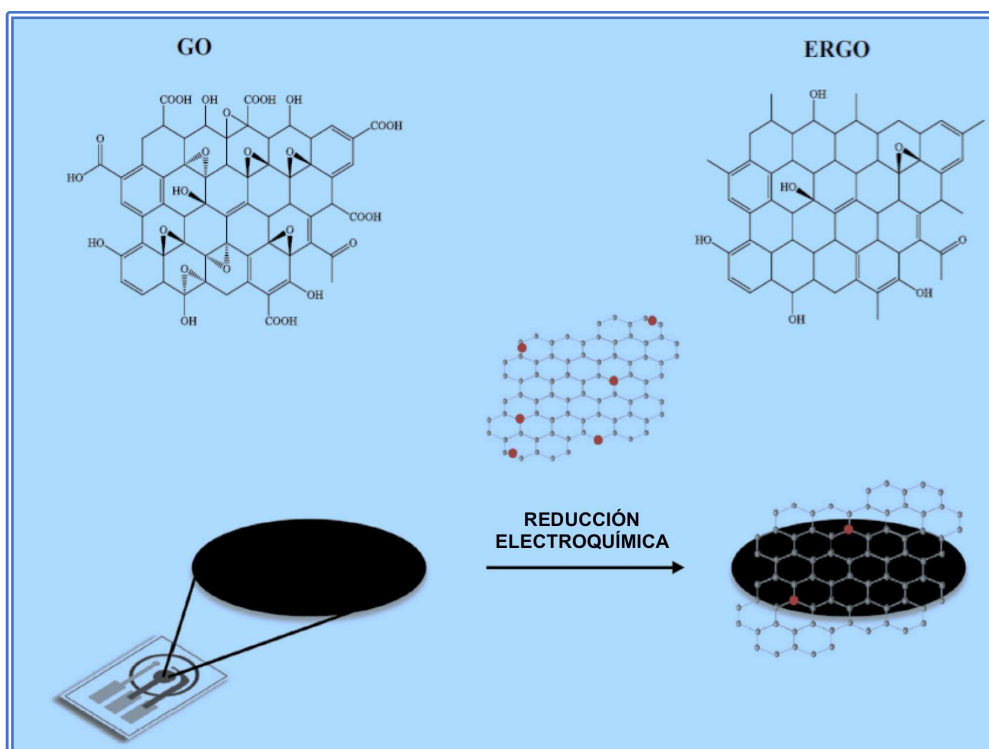


Figura 8.5. Esquema de la modificación ERGO del SPCE (adaptada de Jampasa et al., 2016).

8.4. PROCEDIMIENTO MISPE

Tal y como se ha descrito anteriormente, previo a la detección electroquímica de los catabolitos en orina, éstos se aíslan y se preconcentran mediante una extracción en fase sólida en cartucho, utilizando como adsorbente un polímero de impronta molecular (MISPE). El polímero (MIP) se ha sintetizado utilizando como plantilla el 4-HPA, 4-Vinilpiridina (4-Vpy) como monómero funcional, etilenglicol dimetacrilato (EGDMA) como entrecruzante, y 2,2'-azobis(2-metilpropionitrilo) (AIBN) como iniciador. La polimerización se ha llevado a cabo en una relación molar 1:4:20 (plantilla/monómero/entrecruzante), utilizando como porógeno acetonitrilo. El procedimiento MISPE ha sido validado para un intervalo de concentraciones de 0,25 a 40 mg/L con un R^2 mayor a 0,995. En las óptimas condiciones las recuperaciones superan el 94% con un RSD de 1,2%. Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) fueron de 1,22 y 3,69 mg/L respectivamente. El procedimiento MISPE descrito utiliza pequeños volúmenes de muestra y reactivo. Además, los reactivos necesarios para hacerlo son muy baratos, posibilitando un tratamiento "in situ".

El procedimiento consiste en acondicionar el cartucho MISPE con 2 mL de agua y posteriormente, con 2 mL de acetonitrilo. Seguidamente, se cargan 0,5 mL de muestra. Para eliminar posibles interferentes, se lava el cartucho con 1 mL de agua y finalmente se eluyen los analitos con 1,5 mL de una mezcla acetonitrilo-ácido fórmico (99:1, v/v). El proceso completo se realiza en menos de 10 minutos. El cartucho puede ser reutilizado si se realiza una limpieza con 4 mL (4 x 1 mL) de una mezcla metanol-ácido acético (9:1, v/v).

8.5. AdDPV. OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES ELECTROQUÍMICAS

Para realizar las medidas electroquímicas se ha elegido la voltametría diferencial de pulsos de redisolución adsorptiva (AdDPV). Se ha elegido esta técnica porque permite cambiar de una manera sencilla el medio, pues los analitos, tras la extracción con MISPE, se encuentran en el eluyente, y este medio no es muy adecuado para el análisis electroquímico.

Para proceder a la determinación de los analitos, se optimizaron los parámetros necesarios para ejecutar la voltametría AdDPV. Estos fueron: amplitud del impulso 125 mV, tiempo del impulso 50 ms, potencial del escalón 4 mV, intervalo de tiempo 200 ms. Los barridos se realizaron desde un potencial inicial de -0,3 V a un potencial final de 1,0 V. Todas las medidas se realizan a temperatura ambiente. Además, las variables que más afectan a la respuesta electroquímica, como el pH y el volumen de muestra son también optimizadas.

8.5.1. Optimización del pH

El pH influye directamente en la intensidad de la señal y su optimización es imprescindible para obtener un valor máximo de señal (Apetrei & Apetrei, 2018; Zhang, Xu, & Zheng, 2007). Para realizar el estudio se utilizan disoluciones de los dos analitos elegidos como modelo, el ácido protocatecuíco (PCA) y de ácido 4-hidroxifenilacético (4-HPA). Se preparan disoluciones madre de ambos, de concentración 500 mg/L. A partir de ellas, se preparan las disoluciones de trabajo de concentración 500 μ M, utilizando como disolvente la mezcla de elución del proceso MISPE, acetonitrilo con 1% de ácido fórmico.

Para realizar el estudio de pH, se depositan 10 μ L de la disolución de trabajo, preparada anteriormente, sobre el electrodo SPCE, dejándola secar. Cuando se ha secado completamente, se añaden 50 μ L de tampón Britton-Robinson preparado a pH 2, 5 y 8. Las medidas AdDPV se realizan imponiendo los parámetros electroquímicos optimizados, y

midiendo las disoluciones de PCA y 4-HPA a los tres pH. La Tabla 8.4, y la Figura 8.6, muestran los resultados obtenidos.

Tabla 8.4. Datos obtenidos al aplicar AdDPV, a disoluciones de 500 μM de PCA y 4-HPA a diferentes pH (2, 5 y 8).

pH	PCA			4-HPA		
	E (mV)	I (μA)	Q (μC)	E (mV)	I (μA)	Q (μC)
2	312	0,3693	2,3890	608	1,4527	7,4585
5	212	0,7140	0,9372	456	0,8118	5,9193
8	296	0,3540	1,8479	472	0,0824	0,3546

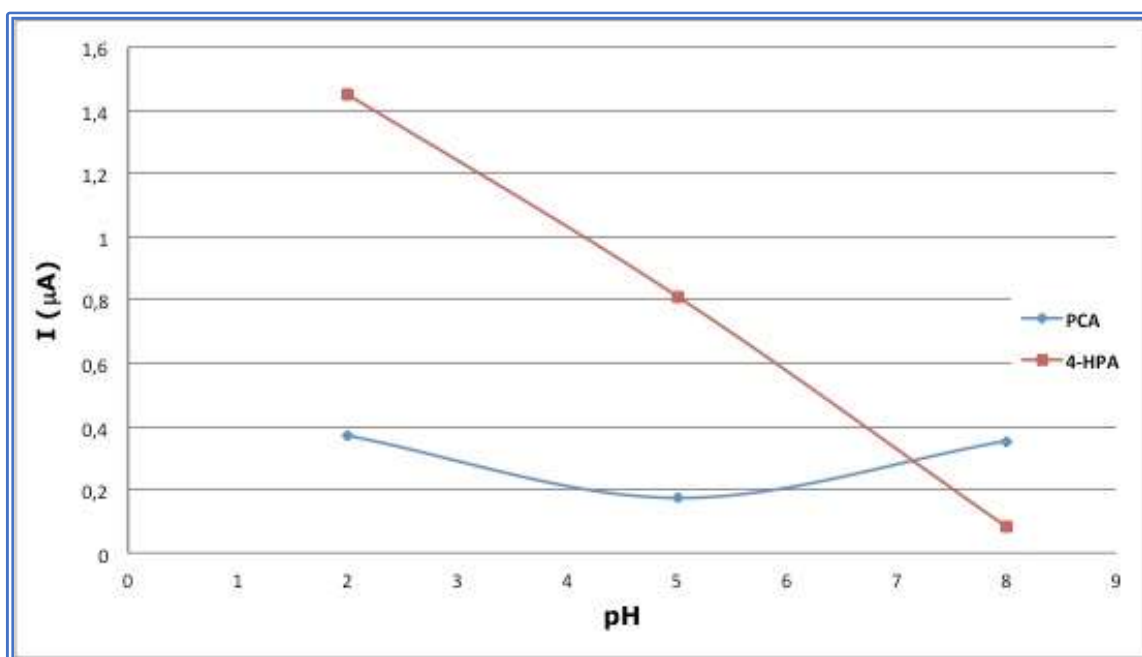


Figura 8.6. Intensidad de pico obtenida por AdDPV para disoluciones de 500 μM de PCA y 4-HPA a diferentes pH. Condiciones: Britton-Robinson (pH 2, 5 y 8), amplitud del impulso 125 mV, tiempo del impulso 50 ms, potencial del escalón 4 mV, intervalo de tiempo 200 ms.

Como se puede observar el valor de pH óptimo para los dos analitos estudiados es 2.

8.5.2. Optimización del volumen de muestra

Al igual que el pH, el volumen de muestra condiciona la intensidad obtenida en AdDPV. Por tanto, la optimización del volumen de muestra es necesaria para conseguir la mejor señal. Para realizar este estudio se preparan disoluciones de los dos analitos elegidos como modelo, el ácido protocatecuico (PCA) y de ácido 4-hidroxifenilacético (4-HPA) de 500 mg/L de concentración. A partir de ellas, se preparan las disoluciones de trabajo de concentración 500 μM utilizando como disolvente la mezcla de elución del proceso MISPE, acetonitrilo con 1% de ácido fórmico. La medida se realiza añadiendo sobre el electrodo SPCE un volumen determinado (5, 10, 20 y 30 μL) y se deja secar. Posteriormente, se fija el pH óptimo (pH=2) mediante 50 μL del tampón Britton-Robinson preparado.

Las medidas AdDPV se realizan imponiendo los parámetros optimizados y midiendo las disoluciones de PCA y 4-HPA, para los cuatro volúmenes ensayados. La Tabla 8.5, y la Figura 8.7, muestran los resultados obtenidos.

Tabla 8.5. Datos obtenidos al aplicar AdDPV, a disoluciones de 500 μM de PCA y 4-HPA (pH=2) a diferentes volúmenes de muestra (5, 10, 20 y 30 μL).

Volumen (μL)	PCA			4-HPA		
	E (mV)	I (μA)	Q (μC)	E (mV)	I (μA)	Q (μC)
5	292	0,1740	1,2040	608	1,1292	5,5586
10	292	0,1740	1,0777	608	1,0254	4,8843
20	276	0,3388	2,2119	592	1,2818	6,4650
30	356	0,2533	1,7821	664	1,1933	5,9593

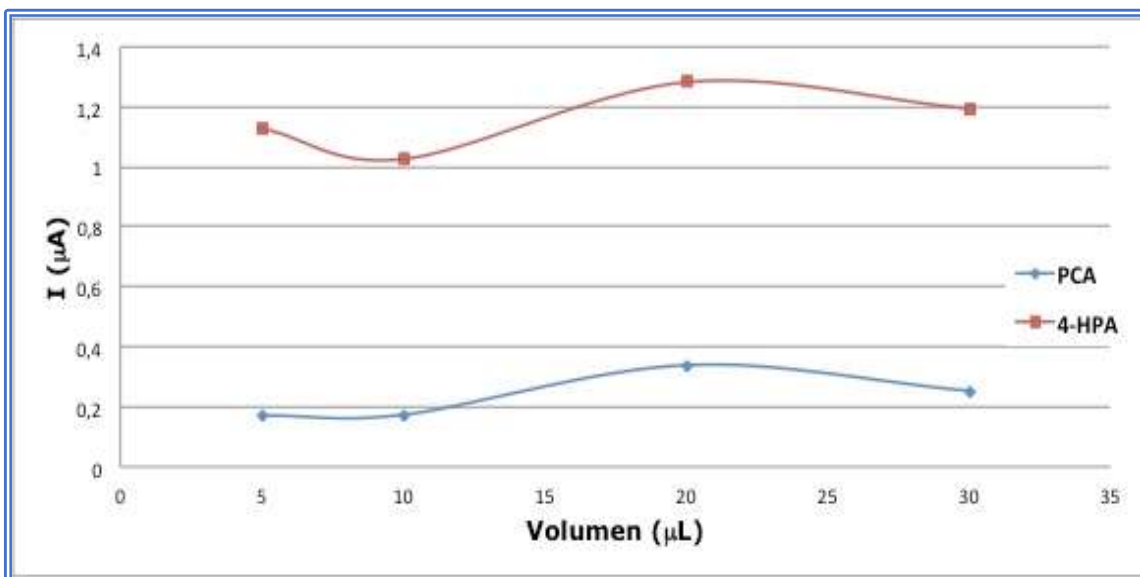


Figura 8.7. Intensidad de pico obtenida por AdDPV para disoluciones de 500 µM de PCA y 4-HPA a diferentes volúmenes de muestra. Condiciones: Britton-Robinson pH 2, amplitud del impulso 125 mV, tiempo del impulso 50 ms, potencial del escalón 4 mV, intervalo de tiempo 200 ms.

Se elige como volumen de adsorción de muestra óptimo para los catabolitos estudiados, el volumen de 20 µL. Por encima de dicho valor, la señal se mantenía constante.

8.6. ESTUDIO DE LINEALIDAD DE MEZCLAS SINTÉTICAS

Una vez optimizadas todas las variables, se miden mezclas sintéticas en concentraciones 10, 50, 100 y 150 mg/L de los analitos modelo (PCA y 4-HPA), procediendo a evaluar la linealidad de las mismas. El estudio se realiza poniendo 20 µL de la concentración molar correspondiente y posteriormente, 50 µL de Britton-Robinson (pH 2). En las condiciones optimizadas se obtienen los siguientes resultados (Tabla 8.6).

Tabla 8.6. Datos obtenidos al aplicar AdDPV, a mezclas sintéticas de PCA y 4-HPA (10, 50, 100 y 150 mg/L). Condiciones: Britton-Robinson pH 2, amplitud del impulso 125 mV, tiempo del impulso 50 ms, potencial del escalón 4 mV, intervalo de tiempo 200 ms.

Concentración (mg/L)	PCA			4-HPA		
	E (mV)	I (µA)	Q (µC)	E (mV)	I (µA)	Q (µC)
10	264	0,0977	0,6162	584	0,2747	1,5888
50	252	0,3510	2,3175	564	0,9888	6,1012
100	244	0,6509	3,9992	556	1,9846	13,5630
150	248	0,9769	6,6826	560	3,0335	22,0421

Como se puede observar en la Figura 8.8, la intensidad (µA) y las concentraciones presentan una relación lineal. Las medidas se han realizado por triplicado (n=3).

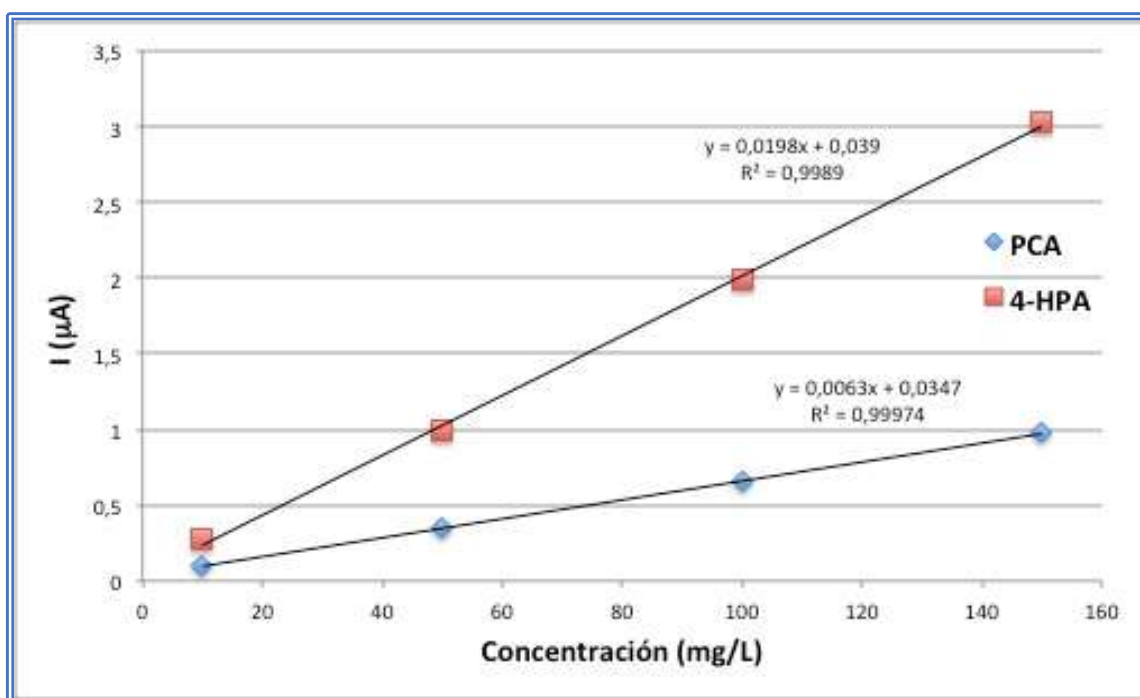


Figura 8.8. Curvas de calibrado para 4-HPA y PCA. Condiciones: Britton-Robinson pH 2, amplitud del impulso 125 mV, tiempo del impulso 50 ms, potencial del escalón 4 mV, intervalo de tiempo 200 ms.

En la Tabla 8.7, se recogen el coeficiente de determinación, el límite de cuantificación y detección. Los valores de LOD y LOQ se calcularon siguiendo las recomendaciones de IUPAC. Estos se definen como la concentración de analito que produce una señal igual a la media de las señales del blanco más 3 veces la desviación estándar de la misma (LOD) o más 10 veces la desviación estándar (LOQ). Los límites de confianza para la pendiente (b) y la ordenada (a) en el origen se obtuvieron para un nivel de confianza del 95%.

Tabla 8.7. Parámetros de las curvas de calibrado, coeficiente de determinación lineal, límite de detección y de cuantificación para PCA y 4-HPA en muestras sintéticas.

Analito	$b \pm t_{(n-2)}S_b$	$a \pm t_{(n-2)}S_a$	R^2	LOQ (mg/L)	LOD (mg/L)
4-HPA	0,0197 ± 0,0004	0,0389 ± 0,0434	0,998	21,98	7,25
PCA	0,0062 ± 0,0001	0,0347 ± 0,0067	0,999	10,76	3,55

Los valores obtenidos mostraron una buena linealidad para todo el intervalo de concentraciones, con un coeficiente de correlación lineal (R^2) de más de 0,998. Así mismo, se obtuvieron buenos límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) para los dos analitos modelo.

8.7. APLICACIÓN DE ERGO-SPCE A LA DETECCIÓN DE LOS CATABOLITOS EN ORINA

Una vez preparados los electrodos modificados se procede a la detección de los dos catabolitos modelo (PCA y 4-HPA), en las condiciones óptimas aplicando diversas técnicas voltamperométricas (CV y AdDPV), para evaluar su respuesta en muestras de orina. Mediante la aplicación ERGO-SPCE, se pretende mejorar la sensibilidad y especificidad de los electrodos en la determinación de catabolitos fenólicos. En la Figura 8.9, se puede observar la respuesta obtenida para la mezcla de dos analitos electroactivos

(PCA y 4-HPA) en orina, con una concentración 4 mg/L y aplicando el procedimiento MISPE antes del análisis (ERGO_2). Además, para comprobar los efectos de la orina sobre el electrodo modificado, se ha realizado la medida sobre la matriz (blanco), realizando previamente el procedimiento MISPE (ERGO_1).

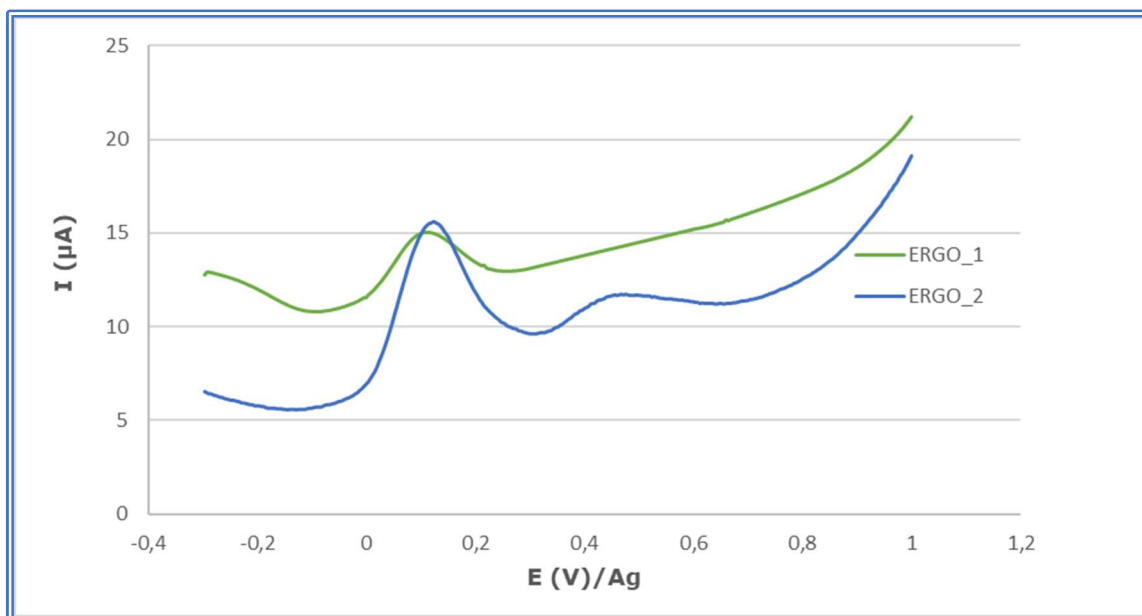


Figura 8.9. Voltamperograma de una mezcla de PCA y 4-HPA, con una concentración 4 mg/L en orina y proceso MISPE (ERGO_2). Medida de la matriz de orina y proceso MISPE (ERGO_1). Condiciones: Britton-Robinson pH 2, amplitud del impulso 125 mV, tiempo del impulso 50 ms, potencial del escalón 4 mV, intervalo de tiempo 200 ms.

Como se puede observar, la matriz de orina proporciona una señal que interfiere con la medida de los catabolitos estudiados, dificultado la resolución de los picos y la sensibilidad. Los resultados no muestran mejora en las señales obtenidas utilizando ERGO-SPCE. Las diferencias con los resultados obtenidos utilizando electrodos no modificados no son significativas. Incluso en algunos casos la respuesta es peor.

Esto puede ser debido a que los ERGO-SPCE, tienen preferencia por adsorber ácido úrico, presente en la orina, interfiriendo la determinación de los analitos de interés. Por tanto, el procedimiento propuesto se llevará a cabo utilizando electrodos SPCE activados.

8.8. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS

La orina es una muestra compleja que contiene compuestos orgánicos hidrofóbicos, así como proteínas, hormonas y múltiples metabolitos (Abellán-Llobregat et al., 2017), por lo que su análisis por cualquier técnica analítica es siempre complicado. Así mismo, cuando se utilizan técnicas electroanalíticas, cualquier compuesto que se pueda oxidar o reducir puede producir una señal no deseada que interfiera con los analitos de interés. Generalmente, el ácido ascórbico, el fenol y el ácido úrico son seleccionados en los estudios de interferencias, al presentar una alta electroactividad y estar presentes en alimentos, muestras medioambientales y biológicas. En este trabajo, se ha considerado como posible interferente presente en las muestras de orina al ácido úrico.

8.8.1. El ácido úrico como interferente

Antes de iniciar la validación del método, se amplía el estudio de interferencias realizado previamente para el MISPE, estudiando la señal del ácido úrico en AdDPV con electrodos SPCE, como principal interferente al ser electroactivo. El ácido úrico (UA) o 7,9-dihidro-1H-purina-2,6,8(3H)-triona, es un ácido débil presente en los fluidos extracelulares como urato sódico (Figura 8.10) (Abellán-Llobregat et al., 2017).

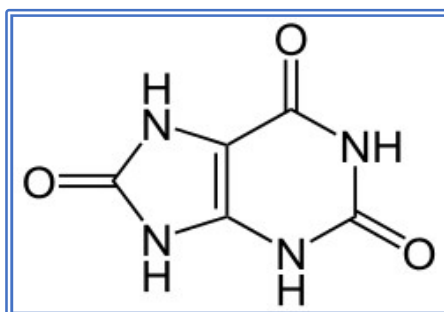


Figura 8.10. Estructura química del ácido úrico.

Para realizar el estudio de interferencias se prepara una disolución de ácido úrico 500 μM , utilizando como disolvente el empleado en la elución del proceso MISPE (ACN-1% de ácido fórmico). La disolución se ha sometido 10 minutos a ultrasonidos y posteriormente, se ha calentado otros 10 minutos hasta la disolución total del ácido úrico.

Para realizar la medida AdDPV, se depositan 20 μL de la disolución de ácido úrico sobre el electrodo de trabajo SPCE, dejándola secar. Cuando se ha secado completamente, se añaden 50 μL de tampón Britton-Robinson ($\text{pH}=2$) obteniéndose los siguientes valores (Tabla 8.8).

Tabla 8.8. Datos obtenidos al aplicar AdDPV, a una disolución de 500 μM de UA y Britton-Robinson $\text{pH}=2$.

E (mV)	I (μA)	Q (μC)
296	0,3754	2,2458

La Figura 8.11, muestra el voltamperograma AdDPV del ácido úrico.

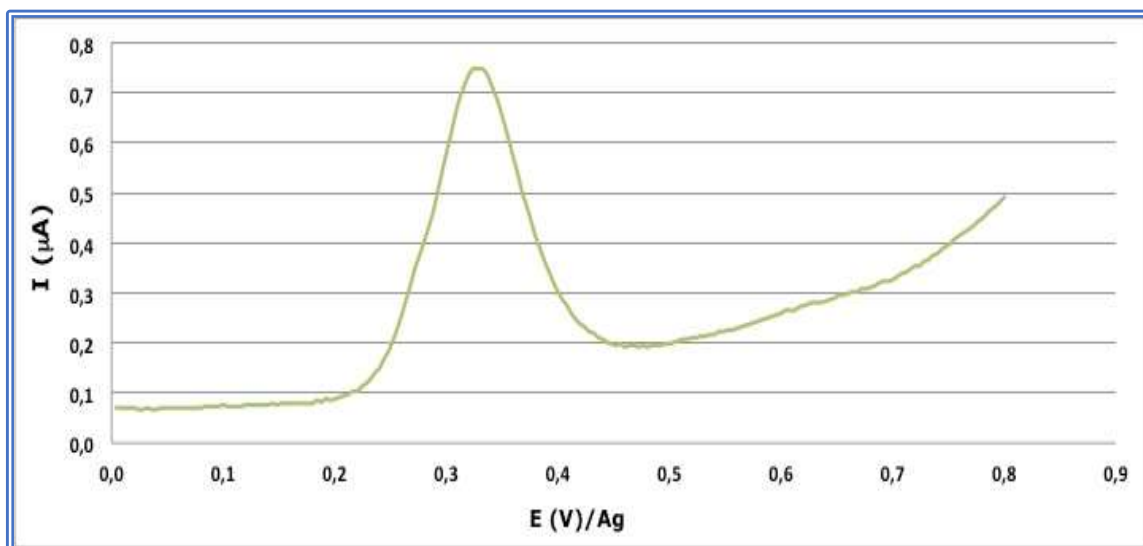


Figura 8.11. Voltamperograma AdDPV de una muestra patrón 500 μM de UA. Condiciones: Britton-Robinson pH 2, amplitud del impulso 125 mV, tiempo del impulso 50 ms, potencial del escalón 4 mV, intervalo de tiempo 200 ms.

Como se puede observar el ácido úrico aparece a un potencial próximo al del PCA, y por tanto interferirá con éste y con el SyA.

8.8.2. Ácido úrico y procedimiento MISPE-AdDPV

Para evaluar el MISPE frente a la técnica AdDPV se pasa la muestra de orina, en las condiciones descritas, por el cartucho preparado relleno del polímero impreso molecularmente frente al 4-HPA. El resultado obtenido evidencia que el procedimiento MISPE, previamente validado, elimina totalmente el ácido úrico. Únicamente se percibe una pequeña señal a potencial 0 mV, que no interfiere en el análisis de los ácidos fenólicos estudiados (Figura 8.12).

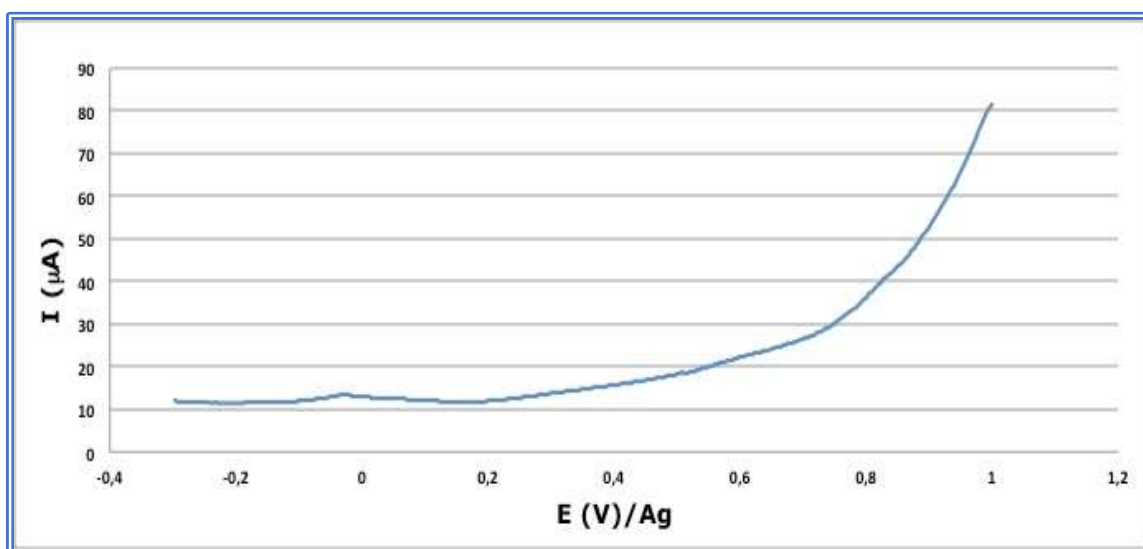


Figura 8.12. AdDPV de una muestra de orina pasada por el MISPE.

Condiciones: Britton-Robinson pH 2, amplitud del impulso 125 mV, tiempo del impulso 50 ms, potencial del escalón 4 mV, intervalo de tiempo 200 ms.

En este ensayo se ha demostrado la importancia del procedimiento MISPE en la medida electroquímica, ya que se consigue eliminar la principal interferencia, el ácido úrico. Incluso añadiendo a la muestra de orina una concentración 500 µM de ácido úrico (concentración

común en orina) (Abellán-Llobregat et al., 2017), los resultados son los mismos. Así pues, se ha confirmado que cuando se pasa la muestra por el MISPE, se elimina el UA y otros compuestos que daban otras señales a potenciales menores de cero. Por tanto, el procedimiento MISPE elimina completamente los posibles interferentes en la detección electroquímica de los compuestos fenólicos, haciendo posible la extracción selectiva de los analitos de interés y su preconcentración.

8.9. VALIDACIÓN DEL PROCEDIMIENTO MISPE-AdDPV EN MUESTRAS DE ORINA

El método desarrollado ha sido validado en términos de linealidad, límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ), y las recuperaciones de los analitos en las condiciones experimentales óptimas. Por otra parte, el estudio de exactitud y precisión del método propuesto, se realizará comparando los resultados con los obtenidos por otra técnica analítica, MISPE-HPLC-DAD-MS, descrita en el capítulo anterior.

8.9.1. Estudio de linealidad

Para realizar este estudio se prepararon distintas curvas de calibrado para los catabolitos PCA, SyA, 4-HBA y 4-HPA, dopando muestras de orina de lactantes, libres de los analitos objeto de estudio. Las muestras fueron tratadas por el procedimiento MISPE descrito. Posteriormente, se depositan 20 μL del eluato sobre el electrodo de trabajo SPCE, dejándola secar. Cuando el electrodo se ha secado completamente, se añaden 50 μL de tampón Britton-Robinson ($\text{pH}=2$), obteniéndose los siguientes valores en el análisis AdDPV, utilizando SPCE activados. El proceso se repitió tres veces. Las medias de los datos obtenidos para las diferentes concentraciones se recogen en las Tablas 8.9, 8.10, 8.11 y 8.12.

Tabla 8.9. Datos obtenidos al aplicar AdDPV, a muestras de orina dopadas con PCA (10, 50, 100, 150 y 200 mg/L).

Condiciones: Britton-Robinson pH 2, amplitud del impulso 125 mV, tiempo del impulso 50 ms, potencial del escalón 4 mV, intervalo de tiempo 200 ms.

Concentración (mg/L)	E (mV)	I (μ A)	Q (μ C)
10	276	0,0014	0,0047
50	272	0,0066	0,0231
100	272	0,0134	0,0475
150	268	0,0199	0,0783
200	268	0,0277	0,1164

Tabla 8.10. Datos obtenidos al aplicar AdDPV, a muestras de orina dopadas con 4-HPA (10, 50, 100, 150 y 200 mg/L).

Condiciones: Britton-Robinson pH 2, amplitud del impulso 125 mV, tiempo del impulso 50 ms, potencial del escalón 4 mV, intervalo de tiempo 200 ms.

Concentración (mg/L)	E (mV)	I (μ A)	Q (μ C)
10	745	0,0001	0,0010
50	690	0,0007	0,0040
100	752	0,0014	0,0081
150	616	0,0021	0,0123
200	676	0,0028	0,0177

Tabla 8.11. Datos obtenidos al aplicar AdDPV, a muestras de orina dopadas con SyA (10, 50, 100, 150 y 200 mg/L).

Condiciones: Britton-Robinson pH 2, amplitud del impulso 125 mV, tiempo del impulso 50 ms, potencial del escalón 4 mV, intervalo de tiempo 200 ms.

Concentración (mg/L)	E (mV)	I (μ A)	Q (μ C)
10	392	0,0003	0,0008
50	424	0,0019	0,0088
100	412	0,0041	0,0240
150	404	0,0063	0,0334
200	456	0,0081	0,0501

Tabla 8.12. Datos obtenidos al aplicar AdDPV, a muestras de orina dopadas con 4-HBA (10, 50, 100, 150 y 200 mg/L).

Condiciones: Britton-Robinson pH 2, amplitud del impulso 125 mV, tiempo del impulso 50 ms, potencial del escalón 4 mV, intervalo de tiempo 200 ms.

Concentración (mg/L)	E (mV)	I (μ A)	Q (μ C)
10	856	0,0001	0,0001
50	792	0,0008	0,0062
100	840	0,0019	0,0125
150	784	0,0028	0,0161
200	768	0,0039	0,0241

En la Figura 8.13, se presentan las curvas de calibrado de los analitos estudiados.

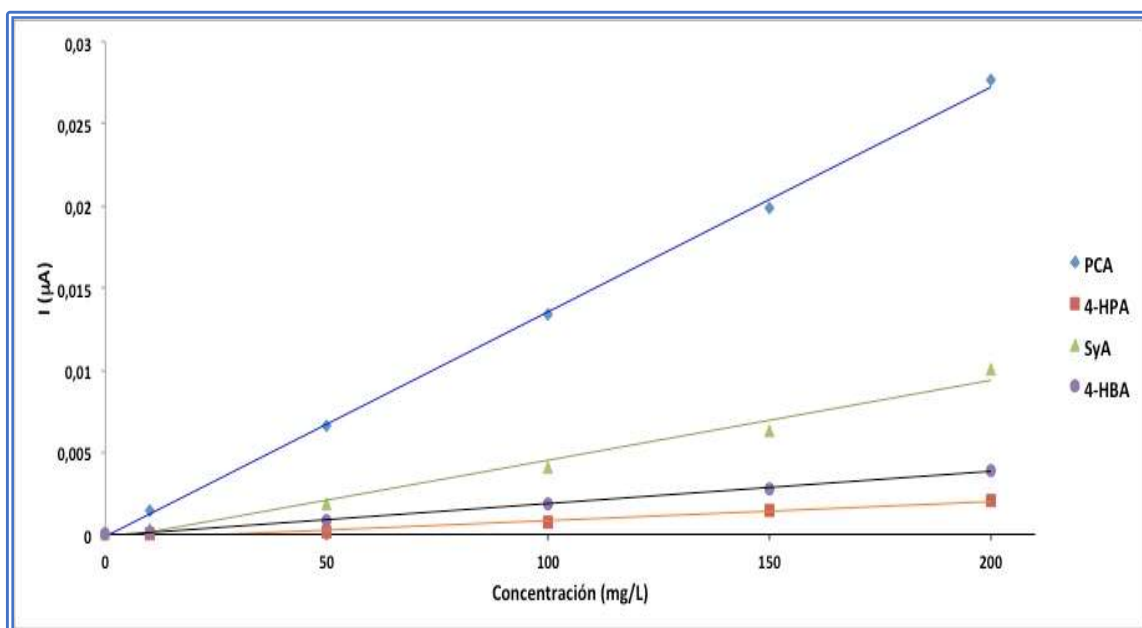


Figura 8.13. Curvas de calibrado de PCA, 4-HPA, SyA y 4-HBA. Intervalo de concentraciones 10 a 200 mg/L (5 niveles de concentración). Condiciones: Britton-Robinson pH 2, amplitud del impulso 125 mV, tiempo del impulso 50 ms, potencial del escalón 4 mV, intervalo de tiempo 200 ms.

En la Tabla 8.13, se recogen los coeficientes de determinación y los valores de los límites de cuantificación y detección. Los valores de LOD y LOQ se calcularon siguiendo las recomendaciones de IUPAC. Estos se definen como la concentración de analito que produce una señal igual a la media de las señales del blanco más 3 veces la desviación estándar de la misma (LOD) o más 10 veces la desviación estándar (LOQ). Los límites de confianza para la pendiente (b) y la ordenada (a) en el origen se obtuvieron para un nivel de confianza del 95%.

Tabla 8.13. Parámetros de las curvas de calibrado, coeficiente de determinación lineal, límite de detección y de cuantificación para PCA, 4-HPA, SyA y 4-HBA en muestras de orina.

Analito	$b \pm t_{(n-2)}s_b$	$a \pm t_{(n-2)}s_a$	R^2	LOQ (mg/L)	LOD (mg/L)
4-HPA	$1,409 \cdot 10^{-5} \pm 9,092 \cdot 10^{-8}$	$-1,469 \cdot 10^{-5} \pm 1,017 \cdot 10^{-5}$	0,999	7,21	2,38
PCA	$0,00013 \pm 2,0596 \cdot 10^{-6}$	$-0,00012 \pm 0,00023$	0,998	16,84	5,55
SyA	$4,137 \cdot 10^{-5} \pm 6,604 \cdot 10^{-7}$	$-6,645 \cdot 10^{-5} \pm 7,389 \cdot 10^{-5}$	0,998	17,86	5,89
4-HBA	$1,963 \cdot 10^{-5} \pm 4,362 \cdot 10^{-7}$	$-8,587 \cdot 10^{-5} \pm 4,880 \cdot 10^{-5}$	0,997	24,85	8,20

Como se puede observar, los datos mostraron una buena linealidad con coeficientes de determinación (R^2) superiores a 0,998. Por otro lado, los LOD y LOQ más bajos se obtienen para el 4-hidroxifenilacético, el analito plantilla, que se eligió como biomarcador de los compuestos fenólicos en orina, debido a su representatividad, alta concentración en la orina y a la mayor flexibilidad en su molécula (Sun, Li, & Chang, 2001). También, por alcanzar el mayor pico de excreción a las 4 o 5 horas de la ingesta, lo que facilita los estudios correspondientes (de Ferrars et al., 2014).

8.9.2. Estudios de recuperación

La diferente respuesta de los analitos al ser medidos por AdDPV, hace que se prepare una muestra ideal para llevar a cabo los estudios de recuperación. Las muestras de orina preparadas contienen las siguientes concentraciones de analito: 200 mg/L de 4-HPA, 50 mg/L de PCA, 150 mg/L de SyA y 200 mg/L de 4-HBA (Figura 8.14).

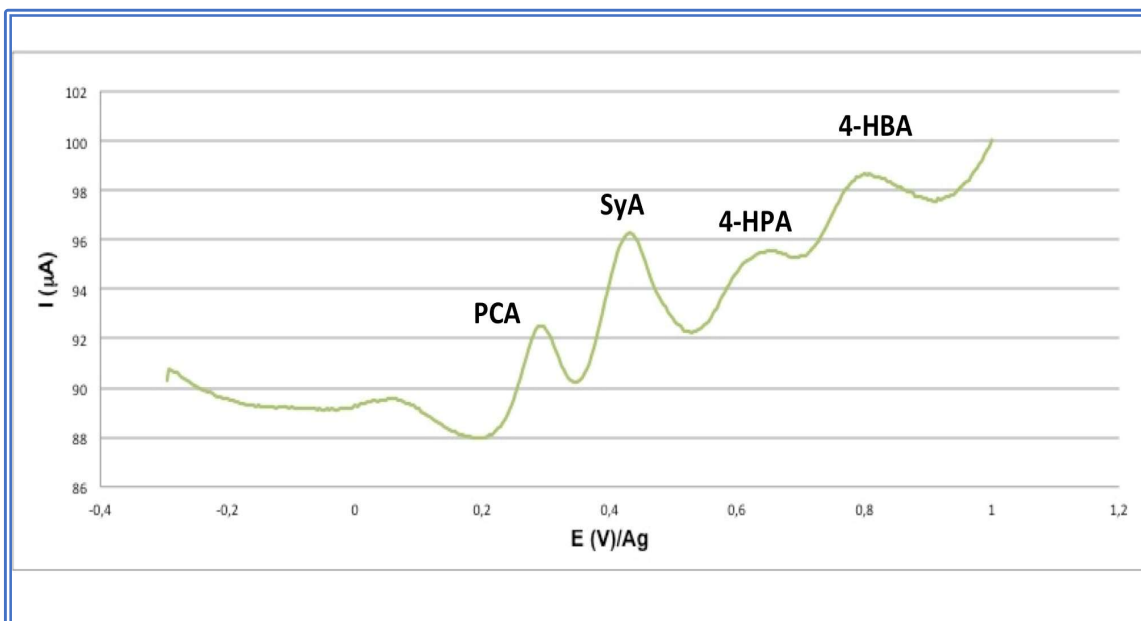


Figura 8.14. Voltamperograma de una mezcla de 200 mg/L de 4-HPA, 50 mg/L de PCA, 150 mg/L de SyA y 200 mg/L de 4-HBA en orina. Condiciones: Britton-Robinson pH 2, amplitud del impulso 125 mV, tiempo del impulso 50 ms, potencial del escalón 4 mV, intervalo de tiempo 200 ms.

En la Figura 8.14, se muestra el voltamperograma de la muestra elegida para realizar los estudios de recuperación. La muestra es sometida al proceso MISPE y posteriormente analizada por AdDPV, en las condiciones óptimas descritas anteriormente.

En la Tabla 8.14, se recogen las recuperaciones obtenidas, que se muestran de una forma gráfica en la Figura 8.15.

Tabla 8.14. Resultados de recuperación de los catabolitos estudiados mediante el procedimiento MISPE-AdDPV, en condiciones óptimas.

CATABOLITO	% RECUPERACIÓN	% RSD
4-HPA	94	8
PCA	85	12
SyA	85	14
4-HBA	89	12

La Tabla 8.14, muestra las recuperaciones comparativas obtenidas para cada analito para las concentraciones indicadas en muestras de orina y la desviación estándar de las réplicas (n=3).

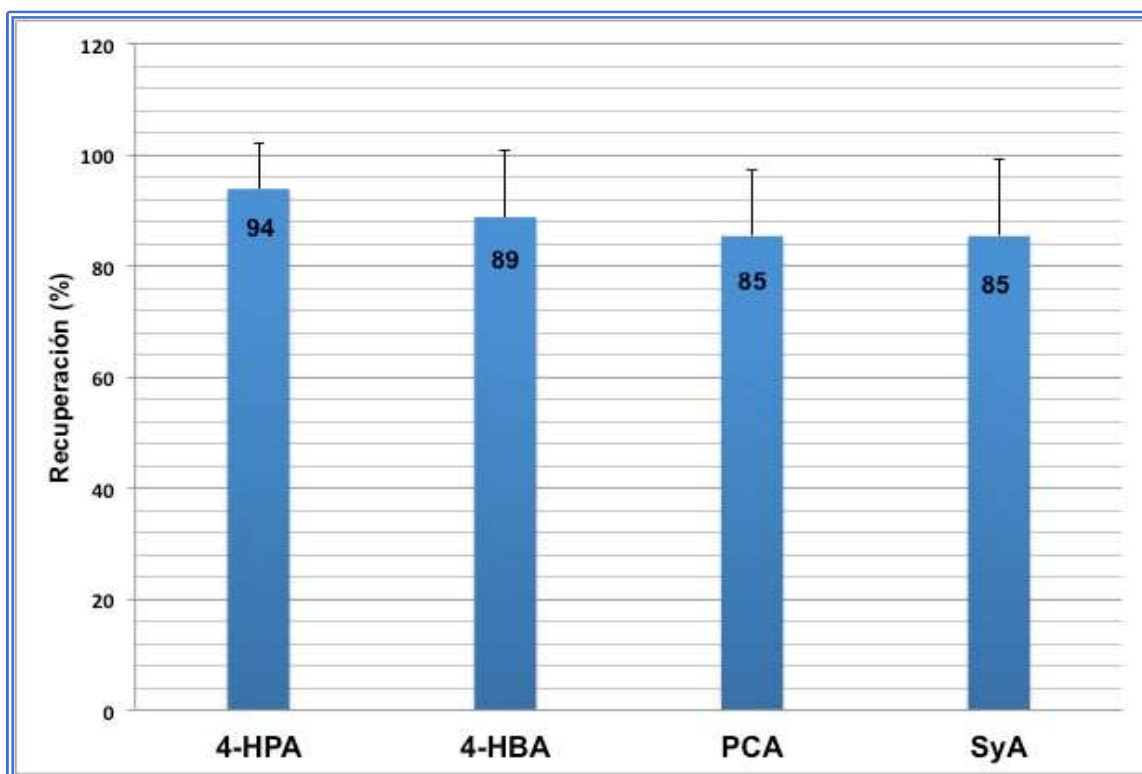


Figura 8.15. Recuperación de los catabolitos estudiados mediante el procedimiento MISPE-AdDPV, en condiciones óptimas.

A la vista de los datos anteriores, se observa que independientemente de la técnica de medida, (AdDPV o HPLC-DAD-MS), la recuperación alcanzada utilizando el procedimiento MISPE es similar en lo que respecta al analito plantilla (94%), el biomarcador elegido. Las recuperaciones para los restantes analitos, son levemente superiores a las determinadas por HPLC-DAD-MS, (PCA 77 %, SyA 82% y 4-HBA 80%).

El estudio de recuperación demuestra que el MIP presenta un reconocimiento molecular altamente específico para la plantilla, 4-HPA (94% de recuperación), superior a los porcentajes obtenidos para los otros compuestos análogos estudiados. Como ya se ha debatido en el capítulo anterior, este reconocimiento molecular de los compuestos está influenciado

por la presencia, el número y la posición de los grupos hidroxilo, por el tamaño de la molécula y también por la presencia de grupos metoxi y carboxilo en el anillo aromático (Denderz & Lehotay, 2012; Dmitrienko, Irkha, Apyari, Klokova, & Zolotov, 2008; Schwarz, Danylec, Harris, Boysen, & Hearn, 2011; Shi, Guo, You, Chen, & Zhang, 2014). Los compuestos electroactivos estudiados poseen grupos carboxilo y grupos hidroxilo, por lo que pueden interaccionar con la matriz polimérica. Por consiguiente, aunque existe una fuerte competencia por sitios de unión específicos y no específicos, esto no afecta significativamente los valores de recuperación del 4-HPA. Después del compuesto plantilla, le sigue en recuperación el 4-HBA con un 89 %, el SyA y el PCA, ambos con un 85 %.

Estos resultados muestran que el MIP sintetizado para el 4-HPA, es un adsorbente eficaz y selectivo en la preparación de muestras complejas, siendo el procedimiento MISPE desarrollado un método de extracción selectivo para el 4-HPA y para otros ácidos fenólicos, catabolitos de los flavan-3-oles, en muestras de orina; haciendo posible un método de screening basado en un sensor electroquímico.

8.9.3. Estudio comparativo entre métodos

Para realizar el estudio de exactitud y precisión del método electroquímico MISPE-AdDPV, los resultados obtenidos para la muestra de orina problema se compararon con los obtenidos con el método MISPE-HPLC-DAD-MS, considerando éstos como valores de referencia (Tabla 8.15).

Tabla 8.15. Comparación del método MISPE-AdDPV con el método MISPE-HPLC-DAD-MS (n=3).

	Técnica	MISPE-AdDPV			MISPE-HPLC-DAD-MS		
Analito	Concentración Añadida (mg/L)	Concentración encontrada, Media± SD, (mg/L)	Recuperación (%)	RSD (%)	Concentración encontrada, Media± SD, (mg/L)	Recuperación (%)	RSD (%)
4-HPA	200	188 ± 15	94	8	186,2 ± 0,6	93,1	0,3
4-HBA	200	178 ± 39	89	12	175,5 ± 0,4	87,7	0,2
PCA	50	43 ± 9	85	12	39,9 ± 0,3	79,7	0,8
SyA	150	128 ± 18	85	14	134,3 ± 1,9	89,5	1,4

Los resultados obtenidos indican que la combinación MISPE-AdDPV permite determinar rápidamente la concentración del 4-HPA. El error obtenido para este analito en comparación con el resultado obtenido por MISPE-HPLC-DAD-MS es de 0,8 %, inferior al 1 %, lo que confirma la validación del procedimiento electroanalítico respecto al método propuesto como referencia. Así, el 4-HPA se detecta a 748 mV y con una excelente linealidad ($R^2=0,999$) en un intervalo de concentraciones de 50 a 200 mg/L, con un LOD de 2,38 mg/L y un % RSD menor de 8 % para ambos métodos.

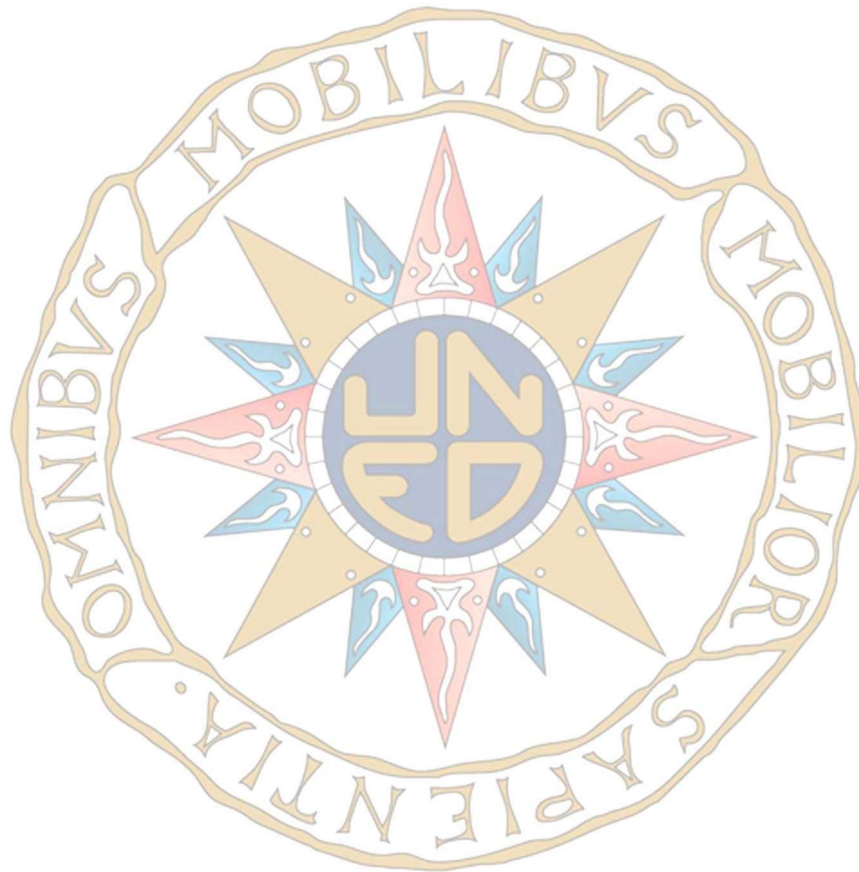
El método MISPE-AdDPV, permite cuantificar separadamente los principales ácidos fenólicos presentes en la orina después de la ingesta de productos ricos en flavonoides, resultando una herramienta rápida y barata aplicable a cualquier estudio de biodisponibilidad. No sólo permite determinar las concentraciones individuales de cada uno de los analitos estudiados, también permitiría la determinación o el *screening* de estos compuestos en muestras ricas en antioxidantes, posibilitando la determinación de la capacidad antioxidante total (TAC), si se expresa el resultado como equivalentes de ácido gálico. La utilización del procedimiento MISPE permite el aislamiento y extracción selectiva de los analitos de interés, preconcentrándolos, a la vez que se elimina el principal interferente en la orina, el ácido úrico.

Por otra parte, la fácil síntesis del polímero, y de preparación de los electrodos SPCE, así como los bajos volúmenes de reactivos y

muestra utilizados en el proceso, hace de la metodología desarrollada un sistema fiable, barato y rápido.

8.10. CONCLUSIONES

En este estudio se ha propuesto un nuevo sistema de detección rápido, sensible, selectivo, económico y con posibilidad de realizar medidas *"in-situ"*, basado en la combinación de un procedimiento MISPE con un sensor electroquímico desechable (SPCE). Esta nueva aplicación hace posible la determinación del biomarcador propuesto, el 4-HPA, con alta sensibilidad, reproducibilidad y linealidad, eliminando interferentes y preconcentrando la muestra en la etapa MISPE, y detectando rápidamente el analito en el electrodo comercial desechable. El método no sólo detecta el analito de interés, también puede cuantificar otros analitos análogos presentes en la orina, pudiendo mostrar el perfil de los catabolitos de los flavan-3-oles electroactivos y cuantificarlos.



Capítulo 9

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES FINALES

Diferentes estudios sugieren que dietas ricas en flavan-3-oles proporcionan efectos beneficiosos para la salud al disminuir el riesgo de padecer algunas enfermedades relacionadas con el envejecimiento celular. Estos efectos positivos están relacionados con la bioactividad que presentan los flavonoides y sus metabolitos. Con objeto de conocer la biodisponibilidad de estos compuestos, es necesario considerar el papel de los compuestos parentales, así como de los metabolitos generados. Dichos metabolitos secundarios son considerados como biomarcadores de la biodisponibilidad y la ingesta dietética humana de compuestos polifenólicos.

En consecuencia, en este trabajo de investigación se ha realizado una extensa revisión bibliográfica y se han estudiado varios metabolitos fenólicos, procedente de la ingesta de flavonoides. Estos metabolitos han sido propuestos como biomarcadores, y en este trabajo se han aplicado diferentes métodos y desarrollando diferentes procedimientos para analizarlos. Así, en esta tesis el problema analítico se ha enfocado desarrollando diferentes estrategias en las principales y más novedosas líneas de investigación: las técnicas quimiométricas, el tratamiento de muestra y el desarrollo de biosensores.

Técnicas quimiométricas

Se ha propuesto una metodología simple y fiable para la determinación simultánea de catabolitos de flavan-3-oles en muestras biológicas, como un procedimiento rápido y barato para detectar polifenoles tras su ingesta, y, por tanto, posibilitando la utilización de estos catabolitos como biomarcadores. La metodología se basa en el análisis de los espectros de emisión-excitación fluorescente usando métodos de calibración multivariante. En esta sección destacamos las siguientes conclusiones:

1. Se han estudiado las propiedades de interés analítico de diferentes catabolitos de flavan-3-oles utilizando técnicas fluorimétricas. Se

concluye que la mayor fluorescencia nativa se obtiene en agua, sin modificar el pH, en ausencia de un agente micelar y sin fuente de irradiación externa.

2. El empleo de métodos de calibración multivariante de primer orden (PLS) para la determinación de catabolitos de flavan-3-oles en muestras sintéticas y en orina humana, permite obtener resultados aceptables, pero con margen para la mejora.
3. La utilización de técnicas de calibración multivariante de segundo orden (PARAFAC), ha permitido obtener resultados de análisis muy satisfactorios, con límites de detección apropiados y altas recuperaciones, y por tanto, puede considerarse como un método asequible y adecuado para la determinación simultánea de catabolitos de flavan-3-oles en muestras de orina.

Técnicas de impresión molecular

Se ha desarrollado un procedimiento para la extracción y preconcentración de catabolitos de flavan-3-oles en muestras de orina mediante la síntesis de un nuevo material adsorbente selectivo, basado en la impresión molecular y validado mediante HPLC/DAD-MS. Se ha demostrado la óptima retención de los catabolitos de la misma familia por parte del polímero, obteniendo resultados muy satisfactorios para la determinación de mezclas de catabolitos de flavan-3-oles en orina humana. En esta parte de la investigación destacamos las siguientes conclusiones:

1. El método MISPE propuesto presenta altas recuperaciones, bajos límites de detección y cuantificación, buena repetibilidad y reproducibilidad, proporcionando un método específico, confiable y alternativo para determinar ácidos fenólicos en muestras de orina humana.
2. De acuerdo con la revisión bibliográfica llevada a cabo, es la primera vez que se aplica un procedimiento MISPE para analizar los catabolitos urinarios proporcionando un método específico y una alternativa de análisis simple.
3. La caracterización morfológica y química de los MIP y NIP (SEM, BET y ATR-FTIR) y el estudio de las propiedades adsorptivas (isotermas y

cinética), muestran alta especificidad con diferencias significativas en texturas, volúmenes de poros y áreas de superficie diferenciadas, con buena distribución del tamaño de poro, adecuada polimerización y exitosa extracción de la molécula plantilla del MIP.

4. Mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), acoplada a un detector de MS, se ha desarrollado un método para la determinación de catabolitos de flavonoides en orina humana, obteniendo resultados adecuados de forma sencilla, rápida y con buenos límites de cuantificación y detección.
5. El trabajo de investigación presentado, abre la oportunidad de poner en funcionamiento la metodología desarrollada para otros compuestos análogos, como pueden ser los metabolitos de otros flavonoides, también presentes en muestras biológicas en personas que han incorporado en su dieta compuestos fenólicos.

Técnicas electroquímicas

Mediante técnicas electroanalíticas, se ha diseñado un sensor específico para la determinación de mezclas de catabolitos de flavan-3-oles en muestra de orina. En esta parte de la investigación destacamos las siguientes conclusiones:

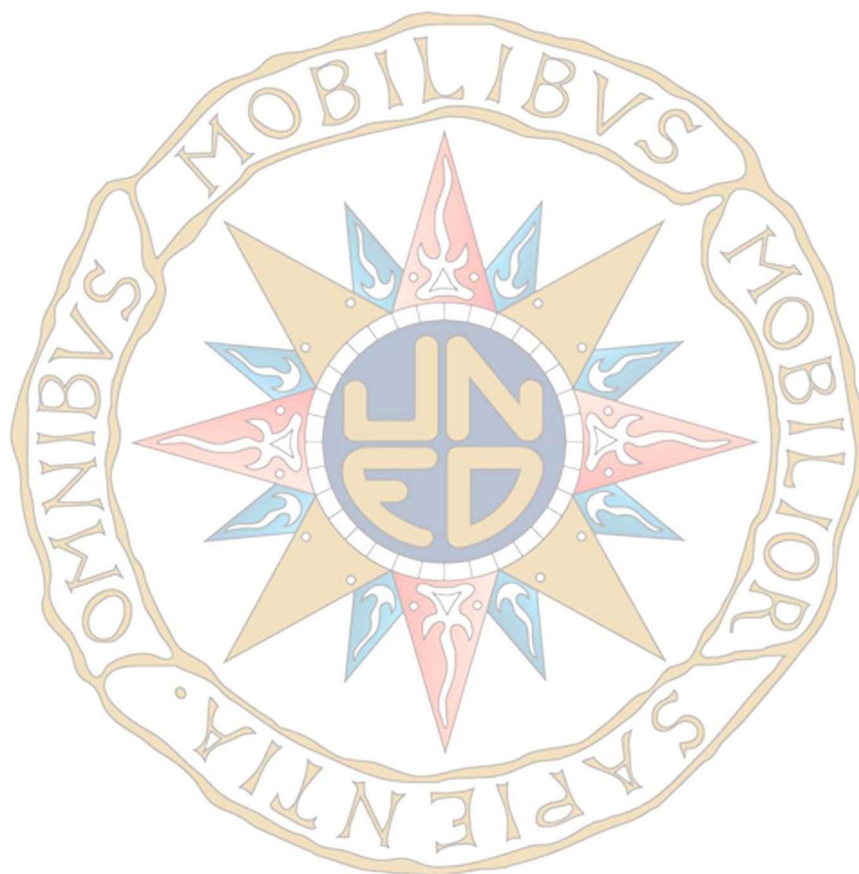
1. El sensor comercial de carbono serigrafiado previamente activado (SPCE-activado) es el más apropiado para la determinación de catabolitos de flavonoides en orina, en comparación con los otros sensores analizados.
2. El estudio voltamperométrico realizado mediante voltamperometría cíclica CV de cada metabolito objeto de estudio, ha permitido determinar cuáles son electroactivos, y la forma y el potencial de pico característico con objeto de llevar a cabo su identificación.
3. La técnica electroquímica utilizada para determinar diversos catabolitos de flavan-3-oles en muestras biológicas, ha sido la voltametría diferencial de pulsos de redisolución adsortiva (AdDPV), usando electrodos serigrafiados de carbono (SPCE) activados, optimizando

previamente parámetros como el pH, el volumen de muestra, la linealidad y los posibles interferentes como el ácido úrico.

4. El sensor electroquímico diseñado, combinado con el procedimiento MISPE y la voltametría diferencial de pulsos de redisolución adsortiva (MISPE-SPCE-AdDPV), ha demostrado ser un método novedoso con grandes ventajas, como la de ser rápido, económico y selectivo, obteniendo altas recuperaciones, bajos límites de detección y buena repetibilidad, demostrando ser una alternativa para la determinación de metabolitos secundarios de compuestos fenólicos en orina humana. Además, proporciona gran especificidad y ventajas como la miniaturización y la portabilidad.
5. El estudio de exactitud y precisión del método electroquímico desarrollado, se ha llevado a cabo a través del método de referencia HPLC/DAD-MS optimizado en este trabajo de investigación. Se observaron recuperaciones en HPLC-MS y AdDPV muy similares, mostrando alta precisión y unos límites de detección y cuantificación adecuados.

En este trabajo de investigación se han conseguido realizar importantes aportaciones, tales como, el diseñando un nuevo sistema de detección de ácidos fenólicos (biomarcadores de flavonoides), basado en un sensor electroquímico; un tratamiento de muestra pionero, basado en un procedimiento MISPE para analizar los catabolitos urinarios de compuestos polifenólicos, proporcionando un método específico y una alternativa sencilla de análisis a otros métodos ya publicados; una novedosa metodología (técnica quimiométrica), basada en el análisis matemático de las matrices de datos, proporcionados por los distintos espectros de excitación-emisión de fluorescencia y usando calibración de segundo orden (modelo trilineal PARAFAC), para determinar y cuantificar de manera simultánea, diferentes catabolitos de compuestos fenólicos (flavan-3-oles), en muestras biológicas con matrices complejas, de manera muy satisfactoria, demostrado ser una herramienta interesante, sencilla, rápida, precisa y una alternativa económica a los métodos clásicos de separación.

A partir de los estudios y discusiones presentados en esta Tesis, las perspectivas futuras que se abren hacen referencia al adecuado tratamiento de muestra con nuevos materiales más selectivos, que posibilitan la automatización y miniaturización de las técnicas analíticas. En este sentido los polímeros de impresión molecular (MIP), son una alternativa de futuro, debido a las mejoras en el aislamiento selectivo de los analitos de las complejas matrices en las que se encuentran. Por otro lado, las técnicas electroquímicas y el desarrollo de sensores portátiles, son una alternativa real de futuro para el análisis de diferentes compuestos. Además, en esta tesis se han combinado los sensores electroquímicos con materiales específicos (MIP), dando un enfoque diferente que puede tener múltiples usos innovadores y prometedores en los próximos años. Otra tendencia que se impone en futuros trabajos e investigaciones, esta relaciona con las técnicas quimiométricas, las cuales son herramientas poderosas, alternativas a los métodos clásicos de análisis, capaces de obtener información a partir del tratamiento de datos, sin necesidad de la separación previa de los componentes a estudiar en una matriz compleja, de manera simple, rápida y económica.



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abdullah, A. A., Yardim, Y., & Senturk, Z. (2018). The performance of cathodically pretreated boron-doped diamond electrode in cationic surfactant media for enhancing the adsorptive stripping voltammetric determination of catechol-containing flavonoid quercetin in apple juice. *Talanta*, *187*, 156-164. doi: 10.1016/j.talanta.2018.05.016.
- Abellán-Llobregat, A., Vidal, L., Rodríguez-Amaro, R., Berenguer-Murcia, Á, Canals, A., & Morallón, E. (2017). Au-IDA microelectrodes modified with Au-doped graphene oxide for the simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid in urine samples. *Electrochimica Acta*, *227*, 275-284. doi:10.1016/j.electacta.2016.12.132.
- Aboul-Enein, H. Y., & Stefan, R-I. (1998). Enantioselective sensors and biosensors in the analysis of chiral drugs. *Critical reviews in analytical chemistry*, *28*(3), 259-266. doi: 10.1080/10408349891194199.
- Abrahamse, Salomon L., Kloots, Willem J., & van Amelsvoort, Johan M. M. (2005). Absorption, distribution, and secretion of epicatechin and quercetin in the rat. *Nutrition Research*, *25*(3), 305-317. doi: 10.1016/j.nutres.2004.10.013.
- Achaintre, D., Buleté, A., Cren-Olivé, C., Li, L., Rinaldi, S., & Scalbert, A. (2016). Differential Isotope Labeling of 38 Dietary Polyphenols and Their Quantification in Urine by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, *88*(5), 2637-2644. doi: 10.1021/acs.analchem.5b03609.
- Achaintre, D., Gicquiau, A., Li, L., Rinaldi, S., & Scalbert, A. (2018). Quantification of 38 dietary polyphenols in plasma by differential isotope labelling and liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1558*, 50-58. doi: 10.1016/j.chroma.2018.05.017.
- Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of agricultural and food chemistry*, *50*(21), 6182-6187. doi: 10.1021/jf0205099.
- Aehle, E., Müller, U., Eklund, P. C., Willför, S. M., Sippl, W., & Dräger, B. (2011). Lignans as food constituents with estrogen and antiestrogen

- activity. *Phytochemistry*, 72(18), 2396-2405. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.08.013.
- Agarwal, R., Sahoo, S., Chitturi, V. R., Williams, J. D., Rest, O., & Katiyar, R. S. (2015). Enhanced photovoltaic properties in graphitic carbon nanospheres networked TiO₂ nanocomposite based dye sensitized solar cell. *Journal of Alloys and Compounds*, 641, 99-105. doi: 10.1016/j.jallcom.2015.03.175.
- Aggarwal, B. B., Surh, Y-J., & Shishodia, S. (2007). The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease (Vol. 595): *Springer Science & Business Media*. ISBN-13:978-0-387-46400-8 e-ISBN-13:978-0-387-46401-5.
- Aherne, S. Aisling, & O'Brien, Nora M. (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 18(1), 75-81. doi: 10.1016/S0899-9007(01)00695-5.
- Ahmadvand, M., Parastar, H., Sereshti, H., Olivieri, A., & Tauler, R. (2017). A systematic study on the effect of noise and shift on multivariate figures of merit of second-order calibration algorithms. *Analytica Chimica Acta*, 952, 18-31. doi: 10.1016/j.aca.2016.11.070.
- Ahmed, Aybh, Wabaidur, S. M., Siddiqui, M. R., Alothman, Z. A., Obeid, M. S., Khan, M. R., & Al-Tamrah, S. A. (2016). Simultaneous determination of twenty-five polyphenols in multifloral and cactus honeys using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *European Food Research and Technology*, 242(6), 943-952. doi: 10.1007/s00217-015-2601-0.
- Airado-Rodríguez, D., Durán-Merás, I., Galeano-Díaz, T., & Wold, J. P. (2011). Front-face fluorescence spectroscopy: A new tool for control in the wine industry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(2), 257-264. doi: 10.1016/j.jfca.2010.10.005.
- Alcaráz, Mirta R., Schenone, Agustina V., Culzoni, María J., & Goicoechea, Héctor C. (2014). Modeling of second-order spectrophotometric data generated by a pH-gradient flow injection technique for the determination of doxorubicin in human plasma. *Microchemical Journal*, 112, 25-33. doi: 10.1016/j.microc.2013.09.012.

- Alexander, Cameron, Andersson, Håkan S, Andersson, Lars I, Ansell, Richard J, Kirsch, Nicole, Nicholls, Ian A, . . . Whitcombe, Michael J. (2006). Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003. *Journal of molecular recognition*, 19(2), 106-180. doi:10.1002/jmr.760.
- Allegrini, F. (2015). Calibración analítica multidimensional: estudio de cifras de mérito y desarrollo de nuevos algoritmos. URI: 2133/13690.
- Allegrini, F., & Olivieri, A. C. (2016). Multi-way figures of merit in the presence of heteroscedastic and correlated instrumental noise: Unfolded partial least-squares with residual multi-linearization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 158, 200-209. doi: 10.1016/j.chemolab.2016.09.001.
- Allegrini, F., Wentzell, P. D., & Olivieri, A. C. (2016). Generalized error-dependent prediction uncertainty in multivariate calibration. *Analytica Chimica Acta*, 903, 51-60. doi: 10.1016/j.aca.2015.11.028.
- Alseekh, S., Perez de Souza, L., Benina, M., & Fernie, A. R. (2020). The style and substance of plant flavonoid decoration; towards defining both structure and function. *Phytochemistry*, 174, 112347. doi: 10.1016/j.phytochem.2020.112347.
- Amatatongchai, M., Laosing, S., Chailapakul, O., & Nacapricha, D. (2012). Simple flow injection for screening of total antioxidant capacity by amperometric detection of DPPH radical on carbon nanotube modified-glassy carbon electrode. *Talanta*, 97, 267-272. doi: 10.1016/j.talanta.2012.04.029.
- Andaç, M., Say, R., & Denizli, A. (2004). Molecular recognition based cadmium removal from human plasma. *Journal of Chromatography B*, 811(2), 119-126. doi: 10.1016/j.jchromb.2004.08.024.
- Andersson, C. A, & Bro, R. (1998). Improving the speed of multi-way algorithms:: Part I. Tucker3. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 42(1-2), 93-103. doi: 10.1016/S0169-7439(98)00010-0.
- Andrei, V., Sharpe, E., Vasilescu, A., & Andreescu, S. (2016). A single use electrochemical sensor based on biomimetic nanoceria for the detection of wine antioxidants. *Talanta*, 156, 112-118. doi: 10.1016/j.talanta.2016.04.067.

- Androutsopoulos, V. P., Papakyriakou, A., Vourloumis, D., Tsatsakis, A. M., & Spandidos, D. A. (2010). Dietary flavonoids in cancer therapy and prevention: Substrates and inhibitors of cytochrome P450 CYP1 enzymes. *Pharmacology & Therapeutics*, *126*(1), 9-20. doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.01.009.
- Ansell, R. J., & Mosbach, K. (1997). Molecularly imprinted polymers by suspension polymerisation in perfluorocarbon liquids, with emphasis on the influence of the porogenic solvent. *Journal of Chromatography A*, *787*(1-2), 55-66. doi: 10.1016/S0021-9673(97)00643-2.
- Antognoni, F., Zheng, S., Pagnucco, C., Baraldi, R., Poli, F., & Biondi, S. (2007). Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. *Fitoterapia*, *78*(5), 345-352. doi: 10.1016/j.fitote.2007.02.001.
- Apetrei, I. M., & Apetrei, C. (2018). A modified nanostructured graphene-gold nanoparticle carbon screen-printed electrode for the sensitive voltammetric detection of rutin. *Measurement*, *114*, 37-43. doi: 10.1016/j.measurement.2017.09.020.
- Appeldoorn, M. M., Vincken, J-P., Aura, A-M., Hollman, P. C-H, & Gruppen, H. (2009). Procyanidin dimers are metabolized by human microbiota with 2-(3, 4-dihydroxyphenyl) acetic acid and 5-(3, 4-dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone as the major metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(3), 1084-1092. doi: 10.1021/jf803059z.
- Arabi, M., Ghaedi, M., & Ostovan, A. (2017). Water compatible molecularly imprinted nanoparticles as a restricted access material for extraction of hippuric acid, a biological indicator of toluene exposure, from human urine. *Microchimica Acta*, *184*(3), 879-887. doi: 10.1007/s00604-016-2063-5.
- Arend, G. D., Adorno, W. T., Rezzadori, K., Di Luccio, M., Chaves, V. C., Reginatto, F. H., & Petrus, J. C. C. (2017). Concentration of phenolic compounds from strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch) juice by nanofiltration membrane. *Journal of Food Engineering*, *201*, 36-41. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2017.01.014.

- Aron, P. M., & Kennedy, J. A. (2008). Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(1), 79–104. doi:10.1002/mnfr.200700137.
- Arranz Martínez, S. (2010). Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: metodología para su determinación e identificación: *Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones*. ISBN: 978-84-693-7843-4.
- Arribas, A. S., Martínez-Fernández, M., & Chicharro, M. (2012). The role of electroanalytical techniques in analysis of polyphenols in wine. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 34, 78-96. doi: 10.1016/j.trac.2011.10.015.
- Arshady, R., & Mosbach, K. (1981). Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 182(2), 687-692. doi: 10.1002/macp.1981.021820240.
- Arthur, C. L., & Pawliszyn, J. (1990). Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical chemistry*, 62(19), 2145-2148. doi: 10.1021/ac00218a019.
- Asadpour-Zeynali, K., Maryam Sajjadi, S., & Taherzadeh, F. (2016). Second order advantage obtained by spectroelectrochemistry along with novel carbon nanotube modified mesh electrode: Application for determination of acetaminophen in Novafen samples. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 153, 674-680. doi: 10.1016/j.saa.2015.09.035.
- Asbaghi, O., Fouladvand, F., Moradi, S., Ashtary-Larky, D., Choghakhori, R., & Abbasnezhad, A. (2020). Effect of green tea extract on lipid profile in patients with type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 14(4), 293-301. doi: 10.1016/j.dsx.2020.03.018.
- Aschoff, J. K., Riedl, K. M., Cooperstone, J. L., Hogel, J., Bosy-Westphal, A., Schwartz, S. J., . . . Schweiggert, R. M. (2016). Urinary excretion of Citrus flavanones and their major catabolites after consumption of fresh oranges and pasteurized orange juice: A randomized cross-over study. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60(12), 2602-2610. doi: 10.1002/mnfr.201600315.

- Auger, C., Mullen, W., Hara, Y., & Crozier, A. (2008). Bioavailability of Polyphenon E Flavan-3-ols in Humans with an Ileostomy. *The Journal of Nutrition*, *138*(8), 1535S-1542S. doi: 10.1093/jn/138.8.1535S.
- Aura, A-M, Martin-Lopez, P., O'Leary, K. A., Williamson, G., Oksman-Caldentey, K-M, Poutanen, K., & Santos-Buelga, C. (2005). In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *European journal of nutrition*, *44*(3), 133-142. doi: 10.1007/s00394-004-0502-2.
- Baggiani, C., Giraudi, G., Giovannoli, C., Tozzi, C., & Anfossi, L. (2004). Adsorption isotherms of a molecular imprinted polymer prepared in the presence of a polymerisable template - Indirect evidence of the formation of template clusters in the binding site. *Analytica Chimica Acta*, *504*(1), 43-52. doi: 10.1016/s0003-2670(03)00671-8.
- Bagheri, H., & Esmaili, M. (2017). Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Unripe Grape (Qora). *Erwerbs-Obstbau*, *59*(3), 221-226. doi: 10.1007/s10341-016-0315-5.
- Bahram, Morteza, & Bro, Rasmus. (2007). A novel strategy for solving matrix effect in three-way data using parallel profiles with linear dependencies. *Analytica Chimica Acta*, *584*(2), 397-402. doi: 10.1016/j.aca.2006.11.070.
- Bai, X-M., Liu, T., Liu, D-L., & Wei, Y-J. (2018). Simultaneous determination of α -asarone and β -asarone in *Acorus tatarinowii* using excitation-emission matrix fluorescence coupled with chemometrics methods. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *191*, 195-202. doi: 10.1016/j.saa.2017.10.011.
- Barathi, P., & Kumar, A. S. (2014). Quercetin tethered pristine-multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode as an efficient electrochemical detector for flow injection analysis of hydrazine in cigarette tobacco samples. *Electrochimica Acta*, *135*, 1-10. doi: 10.1016/j.electacta.2014.05.003.
- Barrett, E. P, Joyner, L. G., & Halenda, P. P. (1951). The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms. *Journal of the American Chemical society*, *73*(1), 373-380. doi: 10.1021/ja01145a126.

-
- Bartolome, B., Monagas, M., Garrido, I., Gomez-Cordoves, C., Martin-Alvarez, P. J., Lebron-Aguilar, R., . . . Andres-Lacueva, C. (2010). Almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) polyphenols: From chemical characterization to targeted analysis of phenolic metabolites in humans. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *501*(1), 124-133. doi: 10.1016/j.abb.2010.03.020.
- Barzegar, A. (2012). The role of electron-transfer and H-atom donation on the superb antioxidant activity and free radical reaction of curcumin. *Food chemistry*, *135*(3), 1369-1376. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.05.070.
- Basu, P., & Maier, C. (2018). Phytoestrogens and breast cancer: In vitro anticancer activities of isoflavones, lignans, coumestans, stilbenes and their analogs and derivatives. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *107*, 1648-1666. doi: 10.1016/j.biopha.2018.08.100.
- Batista B., Jez W., Allegrini, F., & Olivieri, A. C. (2017). Maximum likelihood unfolded principal component regression with residual bilinearization (MLU-PCR/RBL) for second-order multivariate calibration. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, *170*, 51-57. doi: 10.1016/j.chemolab.2017.09.016.
- Baum, A., Hansen, P.W., Meyer, A. S., & Mikkelsen, J. D. (2013). Simultaneous measurement of two enzyme activities using infrared spectroscopy: A comparative evaluation of PARAFAC, TUCKER and N-PLS modeling. *Analytica Chimica Acta*, *790*, 14-23. doi: 10.1016/j.aca.2013.06.039.
- Bedgood, D. R., Bishop, A. G., Prenzler, P. D., & Robards, K. (2005). Analytical approaches to the determination of simple biophenols in forest trees such as *Acer* (maple), *Betula* (birch), *Coniferus*, *Eucalyptus*, *Juniperus* (cedar), *Picea* (spruce) and *Quercus* (oak). *Analyst*, *130*(6), 809-823. doi: 10.1039/b501788b.
- Beebe, Kenneth R., & Kowalski, Bruce R. (1987). An introduction to multivariate calibration and analysis. *Analytical Chemistry*, *59*(17), 1007A-1017A. doi:10.1021/ac00144a001.

- Belkacemi, A., Doggui, S., Dao, L., & Ramassamy, C. (2011). Challenges associated with curcumin therapy in Alzheimer disease. *Expert reviews in molecular medicine*, 13. doi:10.1017/S1462399411002055.
- Beltran, A., Borrull, F., Marcé, R. M., & Cormack, P. A. G. (2010). Molecularly-imprinted polymers: useful sorbents for selective extractions. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(11), 1363-1375. doi: 10.1016/j.trac.2010.07.020.
- Beltrán, J. L., Guiteras, J., & Ferrer, R. (1998). Parallel factor analysis of partially resolved chromatographic data: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *Journal of Chromatography A*, 802(2), 263-275. doi: 10.1016/S0021-9673(97)01160-6.
- Beluomini, M. A., da Silva, J. L., de Sa, A. C., Buffon, E., Pereira, T. C., & Stradiotto, N. R. (2019). Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymer on nanostructured carbon materials: A review. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 840, 343-366. doi: 10.1016/j.jelechem.2019.04.005.
- Ben Y., Amira R., Abdehedi, O., Jridi, M., Elfalleh, W., Nasri, M., & Ferchichi, A. (2018). Flavonoids, phenols, antioxidant, and antimicrobial activities in various extracts from Tossa jute leave (*Corchorus olitorus* L.). *Industrial Crops and Products*, 118, 206-213. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.03.047.
- Benfeito, S., Oliveira, C., Soares, P., Fernandes, C., Silva, T., Teixeira, J., & Borges, F. (2013). Antioxidant therapy: Still in search of the 'magic bullet'. *Mitochondrion*, 13(5), 427-435. doi: 10.1016/j.mito.2012.12.002.
- Benosmane, N., Boutemeur, B., Hamdi, S. M., Hamdi, M., & Silva, A. S. M. (2017). Solvatochromic fluorescence characteristics of cinnamoyl pyrone derivatives. *Journal of Molecular Structure*, 1149, 1-7. doi: 10.1016/j.molstruc.2017.07.089.
- Bernardes, Cristina D., Poppi, Ronei J., & Sena, Marcelo M. (2010). Direct determination of trans-resveratrol in human plasma by spectrofluorimetry and second-order standard addition. *Talanta*, 82(2), 640-645. doi: doi.org/10.1016/j.talanta.2010.05.024.

- Bernatova, I. (2018). Biological activities of (–)-epicatechin and (–)-epicatechin-containing foods: Focus on cardiovascular and neuropsychological health. *Biotechnology Advances*, 36(3), 666-681. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.01.009.
- Bi, W. T., Tian, M. L., & Row, K. H. (2013). Evaluation of molecularly imprinted anion-functionalized poly(ionic liquid)s by multi-phase dispersive extraction of flavonoids from plant. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 913, 61-68. doi: 10.1016/j.jchromb.2012.11.018.
- Bialonska, D., Kasimsetty, S. G, Khan, S. I, & Ferreira, D. (2009). Urolithins, intestinal microbial metabolites of pomegranate ellagitannins, exhibit potent antioxidant activity in a cell-based assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21), 10181-10186. doi: 10.1021/jf9025794.
- Biesaga, M., Ochnik, U., & Pyrzynska, K. (2009). Fast analysis of prominent flavonoids in tomato using a monolithic column and isocratic HPLC. *Journal of separation science*, 32(15-16), 2835-2840. doi:10.1002/jssc.200800730.
- Biffis, A., Dvorakova, G., & Falcimaigne-Cordin, A. (2010). Physical forms of MIPs Molecular Imprinting (pp. 29-82): Springer. doi: 10.1007/128_2010_110.
- Bittner, L. K., Schonbichler, S. A., Bonn, G. K., & Huck, C. W. (2013). Near Infrared Spectroscopy (NIRS) as a Tool to Analyze Phenolic Compounds in Plants. *Current Analytical Chemistry*, 9(3), 417-423. doi: 10.2174/1573411011309030010.
- Blahova, E., Lehotay, J., & Skacani, I. (2004). The use of molecularly imprinted polymer for selective extraction of (+)-catechin. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 27(17), 2715-2731. doi: 10.1081/jlc-200029276.
- Blanco, M., & Cerdà, V. (2007). Temas avanzados de Quimiometría (Vol. 125): *Universitat Illes Balears*. ISBN: 987-84-8384-006-1.
- Bolarinwa, A., & Linseisen, J. (2005). Validated application of a new high-performance liquid chromatographic method for the determination of selected flavonoids and phenolic acids in human plasma using electrochemical detection. *Journal of Chromatography B-Analytical*

- Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 823(2), 143-151. doi: 10.1016/j.jchromb.2005.06.024.
- Bondonno, Nicola P., Bondonno, Catherine P., Ward, Natalie C., Hodgson, Jonathan M., & Croft, Kevin D. (2017). The cardiovascular health benefits of apples: Whole fruit vs. isolated compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 69, 243-256. doi: 10.1016/j.tifs.2017.04.012.
- Booksh, K. S., & Kowalski, B. R. (1994). Theory of analytical chemistry. *Analytical Chemistry*, 66(15), 782A-791A. doi: 10.1021/ac00087a001.
- Bordonaba, J. G., & Terry, L. A. (2012). Electrochemical behaviour of polyphenol rich fruit juices using disposable screen-printed carbon electrodes: Towards a rapid sensor for antioxidant capacity and individual antioxidants. *Talanta*, 90, 38-45. doi: 10.1016/j.talanta.2011.12.058.
- Bortolato, S. A., Lozano, V. A., Muñoz de la Peña, A., & Olivieri, A. C. (2015). Novel augmented parallel factor model for four-way calibration of high-performance liquid chromatography–fluorescence excitation–emission data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 141, 1-11. doi: 10.1016/j.chemolab.2014.11.013.
- Boscari, C. N., Mazzuia, G. R., Wisniewski, C., Borges, K. B., & Figueiredo, E. C. (2017). Molecularly imprinted probe for solid-phase extraction of hippuric and 4-methylhippuric acids directly from human urine samples followed by MEKC analysis. *Electrophoresis*, 38(7), 1083-1090. doi: 10.1002/elps.201600382.
- Bounegru, A. V., & Apetrei, C. (2020). Development of a Novel Electrochemical Biosensor Based on Carbon Nanofibers-Gold Nanoparticles-Tyrosinase for the Detection of Ferulic Acid in Cosmetics. *Sensors*, 20(23). doi: 10.3390/s20236724.
- Braga, L. R., Rosa, A. A., & Dias, A. C. B. (2014). Synthesis and characterization of molecularly imprinted silica mediated by Al for solid phase extraction of quercetin in Ginkgo biloba L. *Analytical Methods*, 6(12), 4029-4037. doi: 10.1039/c4ay00471j.
- Bravo, J. C., Fernandez, P., & Durand, J. S. (2005). Flow injection fluorimetric determination of beta-estradiol using a molecularly imprinted polymer. *Analyst*, 130(10), 1404-1409. doi: 10.1039/b509618a.

- Bravo, L., Abia, R., & Saura-Calixto, F. (1994). Polyphenols as dietary fiber associated compounds. Comparative study on in vivo and in vitro properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *42*(7), 1481-1487. doi: 10.1021/jf00043a017.
- Bravo M., Aguilar, L. F., Quiroz V. W., Olivieri, Al. C., & Escandar, G. M. (2013). Determination of tributyltin at parts-per-trillion levels in natural waters by second-order multivariate calibration and fluorescence spectroscopy. *Microchemical Journal*, *106*, 95-101. doi: 10.1016/j.microc.2012.05.013.
- Bro, R. (1996). Multiway calibration. multilinear PLS. *Journal of chemometrics*, *10*(1), 47-61. doi: 10.1002/(SICI)1099-128X(199601)10:1<47::AID-CEM400>3.0.CO;2-C.
- Bro, R. (1997). PARAFAC. Tutorial and applications. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, *38*(2), 149-171. doi: 10.1016/S0169-7439(97)00032-4.
- Bro, R., & Kiers, H. A-L. (2003). A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models. *Journal of chemometrics*, *17*(5), 274-286. doi: 10.1002/cem.801.
- Bro, R., Workman J-R, Jerome J. M., Paul R., & Kowalski, B. R. (1997). Review of chemometrics applied to spectroscopy: 1985-95, Part 3—Multi-way analysis. *Applied Spectroscopy Reviews*, *32*(3), 237-261. doi:10.1080/05704929708003315.
- Brunauer, S., Emmett, P. H., & Teller, E. (1938). Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American chemical society*, *60*(2), 309-319. doi: 10.1021/ja01269a023.
- Burgos-Edwards, A., Jiménez-Aspee, F., Theoduloz, C., & Schmeda-Hirschmann, G. (2018). Colonic fermentation of polyphenols from Chilean currants (*Ribes* spp.) and its effect on antioxidant capacity and metabolic syndrome-associated enzymes. *Food Chemistry*, *258*, 144-155. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.03.053.
- Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M. E-J, & Crozier, A. (2002). Plant foods and herbal sources of resveratrol. *Journal of agricultural and food chemistry*, *50*(11), 3337-3340. doi: 10.1021/jf0112973.

- Bustamante, L., Pastene, E., Duran-Sandoval, D., Vergara, C., Von Baer, D., & Mardones, C. (2018). Pharmacokinetics of low molecular weight phenolic compounds in gerbil plasma after the consumption of calafate berry (*Berberis microphylla*) extract. *Food Chemistry*, *268*, 347-354. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.06.048.
- Buszewski, B., Szultka, M., & Gadzała-Kopciuch, R. (2012). 2.12 - Sorbent Chemistry, Evolution. In Janusz Pawliszyn (Ed.), *Comprehensive Sampling and Sample Preparation* (pp. 243-256). *Oxford: Academic Press*. doi: 10.1016/B978-0-12-381373-2.00040-5.
- Cabrera-Bañegil, M., Hurtado-Sánchez, M. del C., Galeano-Díaz, T., & Durán-Merás, I. (2017). Front-face fluorescence spectroscopy combined with second-order multivariate algorithms for the quantification of polyphenols in red wine samples. *Food Chemistry*, *220*, 168-176. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.09.152.
- Cabrera-Bañegil, M., Martín-Vertedor, D., Boselli, E., & Durán-Merás, I. (2018). Control of olive cultivar irrigation by front-face fluorescence excitation-emission matrices in combination with PARAFAC. *Journal of Food Composition and Analysis*, *69*, 189-196. doi: 10.1016/j.jfca.2018.01.021.
- Cabrera-Bañegil, M., Valdés-Sánchez, E., Moreno, D., Airado-Rodríguez, D., & Durán-Merás, I. (2019). Front-face fluorescence excitation-emission matrices in combination with three-way chemometrics for the discrimination and prediction of phenolic response to vineyard agronomic practices. *Food Chemistry*, *270*, 162-172. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.07.071.
- Cacho, C., Schweitz, L., Turiel, E., & Pérez-Conde, C. (2008). Molecularly imprinted capillary electrochromatography for selective determination of thiabendazole in citrus samples. *Journal of Chromatography A*, *1179*(2), 216-223. doi: 10.1016/j.chroma.2007.11.097.
- Cacho, C., Turiel, E., Martín-Esteban, A., Ayala, D., & Pérez-Conde, C. (2006). Semi-covalent imprinted polymer using propazine methacrylate as template molecule for the clean-up of triazines in soil and vegetable samples. *Journal of chromatography A*, *1114*(2), 255-262. doi: 10.1016/j.chroma.2006.02.051.

- Calabriso, N., Scoditti, E., Massaro, M., Pellegrino, M., Storelli, C., Ingrosso, I., . . . Carluccio, M. A. (2016). Multiple anti-inflammatory and anti-atherosclerotic properties of red wine polyphenolic extracts: differential role of hydroxycinnamic acids, flavonols and stilbenes on endothelial inflammatory gene expression. *European journal of nutrition*, *55*(2), 477-489. doi: 10.1007/s00394-015-0865-6.
- Calani, L., Dall'Asta, M., Derlindati, E., Scazzina, F., Bruni, R., & Del Rio, D. (2012). Colonic metabolism of polyphenols from coffee, green tea, and hazelnut skins. *Journal of clinical gastroenterology*, *46*, S95-S99. doi: 10.1097/MCG.0b013e318264e82b.
- Cao, Y-Z., Chen, Z-P., Mo, C-Y., Wu, H-L., & Yu, R-Q. (2000). A PARAFAC algorithm using penalty diagonalization error (PDE) for three-way data array resolution. *Analyst*, *125*(12), 2303-2310. doi: 10.1039/B006162J.
- Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Laganà, A., Piovesana, S., & Samperi, R. (2013). Recent trends in matrix solid-phase dispersion. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *43*, 53-66. doi: 10.1016/j.trac.2012.09.021.
- Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F. J., & Queipo-Ortuño, M. I. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *24*(8), 1415-1422. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.05.001.
- Cardoso, Ana R., Tavares, Ana P. M., & Sales, M. Goreti F. (2018). In-situ generated molecularly imprinted material for chloramphenicol electrochemical sensing in waters down to the nanomolar level. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *256*, 420-428. doi: 10.1016/j.snb.2017.10.114.
- Carmona, L., Alquézar, B., Marques, V. V., & Peña, L. (2017). Anthocyanin biosynthesis and accumulation in blood oranges during postharvest storage at different low temperatures. *Food Chemistry*, *237*, 7-14. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.05.076.
- Carneiro, Bruno M., Batista, Mariana N., Braga, Ana Cláudia S., Nogueira, Maurício L., & Rahal, Paula. (2016). The green tea molecule EGCG inhibits Zika virus entry. *Virology*, *496*, 215-218. doi: 10.1016/j.virol.2016.06.012.

- Carey, W. P., Wangen, L. E., & Dyke, J. T. (1989). Spectrophotometric method for the analysis of plutonium and nitric acid using partial least-squares regression. *Analytical Chemistry*, *61*(15), 1667-1669. doi: 10.1021/ac00190a016.
- Caro, E., Marce, R., Borrull, F., Cormack, P., & Sherrington, D. (2006). Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of compounds from environmental and biological samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *25*(2), 143-154. doi: 10.1016/j.trac.2005.05.008.
- Carreau, C., Flouriot, G., Bennetau-Pelissero, C., & Potier, M. (2008). Enterodiol and enterolactone, two major diet-derived polyphenol metabolites have different impact on ER α transcriptional activation in human breast cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, *110*(1-2), 176-185. doi: 10.1016/j.jsbmb.2008.03.032.
- Carroll, J. D., & Chang, J-J. (1970). Analysis of individual differences in multidimensional scaling via an N-way generalization of "Eckart-Young" decomposition. *Psychometrika*, *35*(3), 283-319. doi: 10.1007/BF02310791.
- Casado, N., Morante-Zarcelero, S., Pérez-Quintanilla, D., Câmara, J. S, & Sierra, I. (2018). Two novel strategies in food sample preparation for the analysis of dietary polyphenols: micro-extraction techniques and new silica-based sorbent materials. *Trends in Food Science & Technology*. doi: 10.1016/j.tifs.2018.06.020.
- Casado, N., Morante-Zarcelero, S., Perez-Quintanilla, D., Camara, J. S., & Sierra, I. (2018). Dispersive solid-phase extraction of polyphenols from juice and smoothie samples using hybrid mesostructured silica followed by ultra-high-performance liquid chromatography-ion-trap tandem mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*. doi: 10.1021/acs.jafc.8b05578.
- Casado, N., Morante-Zarcelero, S., Pérez-Quintanilla, D., Câmara, J. S., & Sierra, I. (2020). Two novel strategies in food sample preparation for the analysis of dietary polyphenols: Micro-extraction techniques and

- new silica-based sorbent materials. *Trends in Food Science & Technology*, 98, 167-180. doi: 10.1016/j.tifs.2018.06.020.
- Cases, M. V., & Ríos, A. (1992). La calidad en los laboratorios analíticos: Reverté. ISBN: 84-291-7986-0.
- Cattell, R. B. (1944). "Parallel proportional profiles" and other principles for determining the choice of factors by rotation. *Psychometrika*, 9(4), 267-283. doi: 10.1007/BF02288739.
- Caturla, N., Vera-Samper, E., Villalaín, J., Mateo, C. R., & Micol, V. (2003). The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipid model membranes. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(6), 648-662. doi: 10.1016/S0891-5849(02)01366-7.
- Cerdá, B., Periago, P., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2005). Identification of urolithin A as a metabolite produced by human colon microflora from ellagic acid and related compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(14), 5571-5576. doi: 10.1021/jf050384i.
- Chauhan, A., Bhatia, T., Singh, A., Saxena, P. N., Kesavchandran, C., & Mudiam, M. K. R. (2015). Application of nano-sized multi-template imprinted polymer for simultaneous extraction of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in urine samples followed by ultra-high performance liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography B*, 985, 110-118. doi: 10.1016/j.jchromb.2015.01.011.
- Chen, F. F., Wang, G. Y., & Shi, Y. P. (2011). Molecularly imprinted polymer microspheres for solid-phase extraction of protocatechuic acid in *Rhizoma homalomenae*. *Journal of Separation Science*, 34(19), 2602-2610. doi: 10.1002/jssc.201100463.
- Chen, F. F., Xie, X. Y., & Shi, Y. P. (2013). Magnetic molecularly imprinted polymer for the selective extraction of sildenafil, vardenafil and their analogs from herbal medicines. *Talanta*, 115, 482-489. doi: 10.1016/j.talanta.2013.06.009.
- Chen, G., Jin, M., Du, P., Zhang, C., Cui, X., Zhang, Y., . . . Wang, J. (2017). A sensitive chemiluminescence enzyme immunoassay based on

- molecularly imprinted polymers solid-phase extraction of parathion. *Analytical Biochemistry*, *530*, 87-93. doi: 10.1016/j.ab.2017.05.008.
- Chen, L., Huang, G., & Hu, J. (2018). Preparation, deproteinization, characterisation, and antioxidant activity of polysaccharide from cucumber (*Cucumis sativus* L.). *International Journal of Biological Macromolecules*, *108*, 408-411. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.034.
- Chen, Q. S., Zhao, J. W., Chaitep, S. P., & Guo, Z. M. (2009). Simultaneous analysis of main catechins contents in green tea (*Camellia sinensis* (L.)) by Fourier transform near infrared reflectance (FT-NIR) spectroscopy. *Food Chemistry*, *113*(4), 1272-1277. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.08.042.
- Chen, S., Zhou, N., Zhang, Z., Li, W., & Zhu, W. (2015). Resveratrol induces cell apoptosis in adipocytes via AMPK activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *457*(4), 608-613. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.01.034.
- Chen, W., Zhu, X., Lu, Q., Zhang, L., Wang, X., & Liu, R. (2020). C-ring cleavage metabolites of catechin and epicatechin enhanced antioxidant activities through intestinal microbiota. *Food Research International*, *135*, 109271. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109271.
- Cheng, Y., Nie, J., Liu, H., Kuang, L., & Xu, G. (2020). Synthesis and characterization of magnetic molecularly imprinted polymers for effective extraction and determination of kaempferol from apple samples. *Journal of Chromatography A*, *1630*, 461531. doi: 10.1016/j.chroma.2020.461531.
- Chen, Z. B., Wang, M., Fu, Y., Yu, H., & Di, D. L. (2012). Preparation of Quercetin Molecularly Imprinted Polymers. *Designed Monomers and Polymers*, *15*(1), 93-111. doi: 10.1163/156855511x606173.
- Chen, Z.-., Wu, H-L., Jiang, J-H., Li, Y., & Yu, R-Q. (2000). A novel trilinear decomposition algorithm for second-order linear calibration. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, *52*(1), 75-86. doi: 10.1016/S0169-7439(00)00081-2.
- Chikara, S., Nagaprashantha, L. D., Singhal, J., Horne, D., Awasthi, S., & Singhal, S. S. (2018). Oxidative stress and dietary phytochemicals:

- Role in cancer chemoprevention and treatment. *Cancer Letters*, *413*, 122-134. doi: 10.1016/j.canlet.2017.11.002.
- Chiorcea-Paquim, A. M., Enache, T. A., Gil, E. D., & Oliveira-Brett, A. M. (2020). Natural phenolic antioxidants electrochemistry: Towards a new food science methodology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *19*(4), 1680-1726. doi: 10.1111/1541-4337.12566.
- Choi, J-H., Park, S-E., Kim, S-J., & Kim, S. (2015). Kaempferol inhibits thrombosis and platelet activation. *Biochimie*, *115*, 177-186. doi: 10.1016/j.biochi.2015.06.001.
- Cieplak, M., & Kutner, W. (2016). Artificial Biosensors: How Can Molecular Imprinting Mimic Biorecognition? *Trends in Biotechnology*, *34*(11), 922-941. doi: 10.1016/j.tibtech.2016.05.011.
- Cinti, S., & Arduini, F. (2017). Graphene-based screen-printed electrochemical (bio)sensors and their applications: Efforts and criticisms. *Biosensors and Bioelectronics*, *89*, 107-122. doi: 10.1016/j.bios.2016.07.005.
- Clifford, M. N., van der Hooft, J. J. J., & Crozier, A. (2013). Human studies on the absorption, distribution, metabolism, and excretion of tea polyphenols. *American Journal of Clinical Nutrition*, *98*(6), 1619S-1630S. doi: 10.3945/ajcn.113.058958.
- Coklar, H., & Akbulut, M. (2017). Anthocyanins and phenolic compounds of Mahonia aquifolium berries and their contributions to antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, *35*, 166-174. doi: 10.1016/j.jff.2017.05.037.
- Corell, L., Armenta, S., Esteve-Turrillas, F. A., & de la Guardia, M. (2018). Flavonoid determination in onion, chili and leek by hard cap espresso extraction and liquid chromatography with diode array detection. *Microchemical Journal*, *140*, 74-79. doi: 10.1016/j.microc.2018.04.014.
- Cormack, P. A-G., & Elorza, A. Z. (2004). Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation. *Journal of Chromatography B*, *804*(1), 173-182. doi: 10.1016/j.jchromb.2004.02.013.
- Corradini, E., Foglia, P., Giansanti, P., Gubbio, R., Samperi, R., & Lagana, A. (2011). Flavonoids: chemical properties and analytical

- methodologies of identification and quantitation in foods and plants. *Natural product research*, 25(5), 469-495. doi: 10.1080/14786419.2010.482054.
- Cortés-Martín, A., Selma, M. V., Espin, J. C., & Garcia-Villalba, R. (2019). The Human Metabolism of Nuts Proanthocyanidins does not Reveal Urinary Metabolites Consistent with Distinctive Gut Microbiota Metabotypes. *Molecular nutrition & food research*, 63(2). doi: 10.1002/mnfr.201800819.
- Costa Rama, E. (2016). (Bio)electroanalytical devices based on carbon transducers screen-printed electrodes and pins. *Universidad de Oviedo*. URI: 10651/39080.
- Cotterchio, M., Boucher, B. A., Kreiger, N., Mills, C. A, & Thompson, L. U. (2008). Dietary phytoestrogen intake—lignans and isoflavones—and breast cancer risk (Canada). *Cancer Causes & Control*, 19(3), 259-272. doi: 10.1007/s10552-007-9089-2.
- Couto, R. A. S., Lima, Jlf, & Quinaz, M. B. (2016). Recent developments, characteristics and potential applications of screen-printed electrodes in pharmaceutical and biological analysis. *Talanta*, 146, 801-814. doi: 10.1016/j.talanta.2015.06.011.
- Crapnell, R. D., Hudson, A., Foster, C. W., Eersels, K., Grinsven, B. V., Cleij, T. J., . . . Peeters, Marloes. (2019). Recent Advances in Electrosynthesized Molecularly Imprinted Polymer Sensing Platforms for Bioanalyte Detection. *Sensors*, 19(5). doi: 10.3390/s19051204.
- Crosby, Guy A. (2005). Lignans in food and nutrition. *Food technology*. ISSN: 0015-6639.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26(8), 1001-1043. doi: 10.1039/b802662a.
- Crozier, A., Del Rio, D., & Clifford, M. N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 446-467. doi: 10.1016/j.mam.2010.09.007.
- Csorba, V., Fodor, M., Kovacs, S., & Toth, M. (2019). Potential of Fourier transformed near-infrared (FT-NIR) spectroscopy for rapid analysis of

- elderberry (*Sambucus nigra* L.) fruits. *Czech Journal of Food Sciences*, 37(1), 21-28. doi: 10.17221/144/2018-cjfs.
- Cuadros-Rodríguez, L., Pérez-Castaño, E., & Ruiz-Samblás, C. (2016). Quality performance metrics in multivariate classification methods for qualitative analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 80, 612-624. doi: 10.1016/j.trac.2016.04.021.
- Cui, C., & Fearn, T. (2018). Hierarchical mixture of linear regressions for multivariate spectroscopic calibration: An application for NIR calibration. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 174, 1-14. doi: 10.1016/j.chemolab.2017.12.013.
- Cuparencu, C. S., Andersen, M. B. S., Gurdeniz, G., Schou, S. S., Mortensen, M. W., Raben, A., . . . Dragsted, L. O. (2016). Identification of urinary biomarkers after consumption of sea buckthorn and strawberry, by untargeted LC-MS metabolomics: a meal study in adult men. *Metabolomics*, 12(2). doi: 10.1007/s11306-015-0934-0.
- Dajas, F. (2012). Life or death: neuroprotective and anticancer effects of quercetin. *Journal of ethnopharmacology*, 143(2), 383-396. doi: 10.1016/j.jep.2012.07.005.
- Dall'Asta, M., Calani, L., Tedeschi, M., Jechiu, L., Brighenti, F., & Del Rio, D. (2012). Identification of microbial metabolites derived from in vitro fecal fermentation of different polyphenolic food sources. *Nutrition*, 28(2), 197-203. doi: 10.1016/j.nut.2011.06.005.
- Daniel, S., Prabhakara R. P., & Prasada R. T. (2005). Investigation of different polymerization methods on the analytical performance of palladium(II) ion imprinted polymer materials. *Analytica Chimica Acta*, 536(1), 197-206. doi: 10.1016/j.aca.2004.12.052.
- de Boer, T., Mol, R., de Zeeuw, R. A., de Jong, G. J., Sherrington, D. C., Cormack, P. A-G, & Ensing, K. (2002). Spherical molecularly imprinted polymer particles: a promising tool for molecular recognition in capillary electrokinetic separations. *Electrophoresis*, 23(9), 1296-1300. doi: 10.1002/1522-2683(200205)23:9<1296::AID-ELPS1296>3.0.CO;2-2.
- de Ferrars, R. M., Czank, C., Zhang, Q., Botting, N. P., Kroon, P. A., Cassidy, A., & Kay, C. D. (2014). The pharmacokinetics of anthocyanins and

- their metabolites in humans. *British Journal of Pharmacology*, 171(13), 3268-3282. doi: 10.1111/bph.12676.
- de Mejia, E., Gonzalez, Ramirez-Mares, M. V., & Puangpraphant, S. (2009). Bioactive components of tea: Cancer, inflammation and behavior. *Brain, Behavior, and Immunity*, 23(6), 721-731. doi: 10.1016/j.bbi.2009.02.013.
- De Middeleer, G., Dubruel, P., & De Saeger, S. (2016). Characterization of MIP and MIP functionalized surfaces: Current state-of-the-art. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 76, 71-85. doi: 10.1016/j.trac.2015.11.007.
- de Oliveira, D. M., Pinto, Carolina B., Sampaio, G. R., Yonekura, L., Catharino, R. R., & Bastos, D. H. M. (2013). Development and Validation of Methods for the Extraction of Phenolic Acids from Plasma, Urine, and Liver and Analysis by UPLC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(25), 6113-6121. doi: 10.1021/jf401534d.
- de Rijke, E., Out, P., Niessen, W. M. A., Ariese, F., Gooijer, C., & Brinkman, U. A. T. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112(1-2), 31-63. doi: 10.1016/j.chroma.2006.01.019.
- Del Rio, D., Borges, G., & Crozier, A. (2010). Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. *British Journal of Nutrition*, 104(S3), S67-S90. doi: 10.1017/S0007114510003958.
- Del Rio, D., Calani, L., Cordero, C., Salvatore, S., Pellegrini, N., & Brighenti, F. (2010). Bioavailability and catabolism of green tea flavan-3-ols in humans. *Nutrition*, 26(11), 1110-1116. doi: 10.1016/j.nut.2009.09.021.
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(14), 1818-1892. doi: 10.1089/ars.2012.4581.
- Denderz, N., & Lehotay, J. (2012). Application of the van't Hoff dependences in the characterization of molecularly imprinted polymers for some

- phenolic acids. *Journal of Chromatography A*, 1268, 44-52. doi: 10.1016/j.chroma.2012.10.025.
- Denderz, N., & Lehotay, J. (2014). Using of molecularly imprinted polymers for determination of gallic and protocatechuic acids in red wines by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1372, 72-80. doi: 10.1016/j.chroma.2014.10.070.
- Deng, J., Xu, Z., Xiang, C., Liu, J., Zhou, L., Li, T., . . . Ding, C. (2017). Comparative evaluation of maceration and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from fresh olives. *Ultrasonics Sonochemistry*, 37, 328-334. doi: 10.1016/j.ultsonch.2017.01.023.
- Di, D. L., Zheng, Y. Y., Chen, X. F., Huang, X. Y., & Feng, S. L. (2011). Advance of Application of High Speed Counter-current Chromatography in Separation and Purification of Flavonoids. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 39(2), 269-275. doi: 10.3724/sp.j.1096.2011.00269.
- Dickert, F. L., Achatz, P., & Halikias, K. (2001). Double molecular imprinting—a new sensor concept for improving selectivity in the detection of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 371(1), 11-15. doi: 10.1007/s002160100955.
- Dijsselbloem, N., Berghe, W. V., De Naeyer, A., & Haegeman, G. (2004). Soy isoflavone phyto-pharmaceuticals in interleukin-6 affections: Multi-purpose nutraceuticals at the crossroad of hormone replacement, anti-cancer and anti-inflammatory therapy. *Biochemical Pharmacology*, 68(6), 1171-1185. doi: 10.1016/j.bcp.2004.05.036.
- Ding, L., Li, H., Tang, F., & Yao, S. Z. (2006). Molecularly imprinted solid-phase extraction of epicatechin from tea beverage. *Analytical Letters*, 39(12), 2373-2385. doi: 10.1080/00032710600748780.
- Dmitrienko, S. G., Irkha, V. V., Duisebaeva, T. B., Mikhailik, Y. V., & Zolotov, Y. A. (2006). Synthesis and study of the sorption properties of 4-hydroxybenzoic acid-imprinted polymers. *Journal of Analytical Chemistry*, 61(1), 14-19. doi: 10.1134/s1061934806010047.
- Dmitrienko, S. G., Irkha, V. V., Apyari, V. V., Klokova, E. V., & Zolotov, Y. A. (2008). Recognition of hydroxybenzoic acids and their esters by

- molecularly imprinted polymers. *Mendeleev Communications*, 18(6), 315-317. doi: 10.1016/j.mencom.2008.11.009.
- Dmitrienko, S. G., Kudrinskaya, V. A., & Apyari, V. V. (2012). Methods of extraction, preconcentration, and determination of quercetin. *Journal of Analytical Chemistry*, 67(4), 299-311. doi: 10.1134/s106193481204003x.
- Dixon, R. A. (2004). Phytoestrogens. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 225-261. doi: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141729.
- Dixon, Richard A., Liu, Chenggang, & Jun, Ji Hyung. (2013). Metabolic engineering of anthocyanins and condensed tannins in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(2), 329-335. doi: 10.1016/j.copbio.2012.07.004.
- Dixon, Richard A., & Steele, Christopher L. (1999). Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering. *Trends in Plant Science*, 4(10), 394-400. doi: 10.1016/S1360-1385(99)01471-5.
- Dobes, J., Zitka, O., Sochor, J., Ruttkay-Nedecky, B., Babula, P., Beklova, M., . . . Adam, V. (2013). Electrochemical Tools for Determination of Phenolic Compounds in Plants. A Review. *International Journal of Electrochemical Science*, 8(4), 4520-4542.
- Donato, L., Chiappetta, G., & Drioli, E. (2011). Surface Functionalization of PVDF Membrane with a Naringin-Imprinted Polymer Layer Using Photo-Polymerization Method. *Separation Science and Technology*, 46(10), 1555-1562. doi: 10.1080/01496395.2011.575429.
- Donia, Thoria I. K., Gerges, Maria N., & Mohamed, Tarek M. (2018). Amelioration effect of Egyptian sweet orange hesperidin on Ehrlich ascites carcinoma (EAC) bearing mice. *Chemico-Biological Interactions*, 285, 76-84. doi: 10.1016/j.cbi.2018.02.029.
- Dreyer, Daniel R., Park, Sungjin, Bielawski, Christopher W., & Ruoff, Rodney S. (2010). The chemistry of graphene oxide. *Chemical Society Reviews*, 39(1), 228-240. doi: 10.1039/B917103G.
- Dueñas, M., González-Manzano, S., González-Paramás, A., & Santos-Buelga, C. (2010). Antioxidant evaluation of O-methylated metabolites of catechin, epicatechin and quercetin. *Journal of Pharmaceutical and*

- Biomedical Analysis*, 51(2), 443-449. doi: 10.1016/j.jpba.2009.04.007.
- Duthie, G. G, Gardner, P. T, & Kyle, J. A-M. (2003). Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(3), 599-603. doi: 10.1079/PNS2003275.
- Du, X-W., Zhang, Y-X., She, Y-X., Liu, G-Y., Zhao, F-N., Wang, J., . . . Zheng, L-F. (2016). Fluorescent competitive assay for melamine using dummy molecularly imprinted polymers as antibody mimics. *Journal of Integrative Agriculture*, 15(5), 1166-1177. doi: 10.1016/S2095-3119(16)61357-6.
- Eastment, H.T., & Krzanowski, W.J. (1982). Cross-validators choice of the number of components from a principal component analysis. *Technometrics*, 24(1), 73-77. doi: 10.2307/1267581.
- El Jaouhari, A., Yan, L., Zhu, J., Zhao, D., Khan, M. Z. H., & Liu, X. (2020). Enhanced molecular imprinted electrochemical sensor based on zeolitic imidazolate framework/reduced graphene oxide for highly recognition of rutin. *Analytica Chimica Acta*, 1106, 103-114. doi: 10.1016/j.aca.2020.01.039.
- Escandar, G. M., González Gómez, D., Espinosa Mansilla, A., Muñoz de la Peña, A., & Goicoechea, H. C. (2004). Determination of carbamazepine in serum and pharmaceutical preparations using immobilization on a nylon support and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 506(2), 161-170. doi: 10.1016/j.aca.2003.11.014.
- Escandar, G. M., Olivieri, A. C., Faber, N. K. M., Goicoechea, H. C., Muñoz de la Peña, A., & Poppi, R. J. (2007). Second- and third-order multivariate calibration: data, algorithms and applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(7), 752-765. doi: 10.1016/j.trac.2007.04.006.
- Escandar, G. M., Goicoechea, H. C., Muñoz de la Peña, A., & Olivieri, A.C. (2014). Second- and higher-order data generation and calibration: A tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 806, 8-26. doi: 10.1016/j.aca.2013.11.009.
- Espada-Bellido, E., Ferreiro-González, M., Carrera, C., Palma, M., Barroso, C. G., & Barbero, G. F. (2017). Optimization of the ultrasound-assisted

- extraction of anthocyanins and total phenolic compounds in mulberry (*Morus nigra*) pulp. *Food Chemistry*, *219*, 23-32. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.09.122.
- Espinosa-Mansilla, A, Muñoz de La Pena, A., González Gómez, D., & Salinas, F. (2005). Photoinduced spectrofluorimetric determination of fluoroquinolones in human urine by using three-and two-way spectroscopic data and multivariate calibration. *Analytica Chimica Acta*, *531*(2), 257-266. doi: 10.1016/j.aca.2004.10.039.
- Esteban-Díez, I., González-Sáiz, J-M., Pizarro, C., & Forina, M. (2006). GA-ACE: Alternating conditional expectations regression with selection of significant predictors by genetic algorithms. *Analytica chimica acta*, *555*(1), 96-106. doi: 10.1016/j.aca.2005.08.053.
- Esteves da Silva, J. C. G., Leitão, J. M. M., Costa, F. S., & Ribeiro, J. L. A. (2002). Detection of verapamil drug by fluorescence and trilinear decomposition techniques. *Analytica Chimica Acta*, *453*(1), 105-115. doi: 10.1016/S0003-2670(01)01504-5.
- Esteves da Silva, J. C. G., Tavares, M. J. C. G., & Tauler, R. (2006). Multivariate curve resolution of multidimensional excitation–emission quenching matrices of a Laurentian soil fulvic acid. *Chemosphere*, *64*(11), 1939-1948. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.01.027.
- Faber, N. M., Bro, R., & Hopke, P. K. (2003). Recent developments in CANDECOMP/PARAFAC algorithms: a critical review. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, *65*(1), 119-137. doi: 10.1016/S0169-7439(02)00089-8.
- Falcone Ferreyra, M. L., Rius, S., & Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in plant science*, *3*, 222. doi: 10.3389/fpls.2012.00222.
- Fan, J., Ding, X., & Gu, W. (2007). Radical-scavenging proanthocyanidins from sea buckthorn seed. *Food Chemistry*, *102*(1), 168-177. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.05.049.
- Fan, Y., Lai, K., Rasco, B. A., & Huang, Y. (2015). Determination of carbaryl pesticide in Fuji apples using surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with multivariate analysis. *LWT - Food Science and Technology*, *60*(1), 352-357. doi: 10.1016/j.lwt.2014.08.011.

- Fan, J., Ding, X., & Gu, W. (2007). Radical-scavenging proanthocyanidins from sea buckthorn seed. *Food Chemistry*, *102*(1), 168-177. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.05.049.
- Fanjul-Bolado, P., Queipo, P., Lamas-Ardisana, P. J., & Costa-Garcia, A. (2007). Manufacture and evaluation of carbon nanotube modified screen-printed electrodes as electrochemical tools. *Talanta*, *74*(3), 427-433. doi: 10.1016/j.talanta.2007.07.035.
- Feng, Q. Z., Zhao, L. X., & Lin, J. M. (2009). Molecularly imprinted polymer as micro-solid phase extraction combined with high performance liquid chromatography to determine phenolic compounds in environmental water samples. *Analytica Chimica Acta*, *650*(1), 70-76. doi: 10.1016/j.aca.2009.04.016.
- Feng, Q. Z., Zhao, L. X., Yan, W., Lin, J. M., & Zheng, Z. X. (2009). Molecularly imprinted solid-phase extraction combined with high performance liquid chromatography for analysis of phenolic compounds from environmental water samples. *Journal of Hazardous Materials*, *167*(1-3), 282-288. doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.12.115.
- Fernandes, I., Nave, F., Gonçalves, R., de Freitas, V., & Mateus, N. (2012). On the bioavailability of flavanols and anthocyanins: Flavanol-anthocyanin dimers. *Food Chemistry*, *135*(2), 812-818. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.05.037.
- Ferrer-Gallego, R., Hernández-Hierro, J. M., Rivas-Gonzalo, J. C., & Escribano-Bailón, M. T. (2011). Determination of phenolic compounds of grape skins during ripening by NIR spectroscopy. *LWT - Food Science and Technology*, *44*(4), 847-853. doi: 10.1016/j.lwt.2010.12.001.
- Filippou, O., Bitas, D., & Samanidou, V. (2017). Green approaches in sample preparation of bioanalytical samples prior to chromatographic analysis. *Journal of Chromatography B*, *1043*, 44-62. doi: 10.1016/j.jchromb.2016.08.040.
- Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G., & Saso, L. (2005). Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry. *Biochimica Et*

- Biophysica Acta-General Subjects*, 1721(1-3), 174-184. doi: 10.1016/j.bbagen.2004.11.001.
- Fitó, M., Cladellas, M., de la Torre, R., Martí, J., Alcántara, M., Pujadas-Bastardes, M., . . . Covas, M. I. (2005). Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: a randomized, crossover, controlled, clinical trial. *Atherosclerosis*, 181(1), 149-158. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2004.12.036.
- Formica, J. V., & Regelson, W. (1995). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, 33(12), 1061-1080. doi: 10.1016/0278-6915(95)00077-1.
- Forzato, C., Vida, V., & Berti, F. (2020). Biosensors and Sensing Systems for Rapid Analysis of Phenolic Compounds from Plants: A Comprehensive Review. *Biosensors-Basel*, 10(9). doi: 10.3390/bios10090105.
- Florea, A-M., Iordache, T-V., Branger, C., Brisset, H., Zaharia, A., Radu, A-L., . . . Sârbu, A. (2018). One-step preparation of molecularly imprinted hollow beads for pseudohypericin separation from *Hypericum perforatum* L. extracts. *European Polymer Journal*, 100, 48-56. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2018.01.015.
- Fu, S., Lv, R., Wang, L., Hou, H., Liu, H., & Shao, S. (2018). Resveratrol, an antioxidant, protects spinal cord injury in rats by suppressing MAPK pathway. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(2), 259-266. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.10.019.
- Fu, Y., Chen, Z. B., Yu, H., Yue, Y. M., & Di, D. L. (2012). Preparation and Adsorption Selectivity of Rutin Molecularly Imprinted Polymers. *Journal of Applied Polymer Science*, 123(2), 903-912. doi: 10.1002/app.34525.
- Fumes, B. H., Silva, M. R., Andrade, F. N., Nazario, C. E. D., & Lanças, F. M. (2015). Recent advances and future trends in new materials for sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 9-25. doi: 10.1016/j.trac.2015.04.011.
- Funes, L., Laporta, O., Cerdán-Calero, M., & Micol, V. (2010). Effects of verbascoside, a phenylpropanoid glycoside from lemon verbena, on phospholipid model membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 163(2), 190-199. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2009.11.004.

- Gao, D., Wang, D. D., Zhang, Q., Yang, F. Q., Xia, Z. N., Zhang, Q. H., & Yuan, C. S. (2017). In Vivo Selective Capture and Rapid Identification of Luteolin and Its Metabolites in Rat Livers by Molecularly Imprinted Solid-Phase Microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(6), 1158-1166. doi: 10.1021/acs.jafc.6b05269.
- Gao, Q., Ma, R., Chen, L., Shi, S., Cai, P., Zhang, S., & Xiang, H. (2017). Antioxidant profiling of vine tea (*Ampelopsis grossedentata*): Off-line coupling heart-cutting HSCCC with HPLC-DAD-QTOF-MS/MS. *Food Chemistry*, *225*, 55-61. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.11.122.
- Gao, W. (2015). The Chemistry of Graphene Oxide. In Wei Gao (Ed.), *Graphene Oxide: Reduction Recipes, Spectroscopy, and Applications* (pp. 61-95). Cham: *Springer International Publishing*. doi: 10.1007/978-3-319-15500-5.
- García-Alonso, M., de Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2004). Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chemistry*, *84*(1), 13-18. doi: 10.1016/S0308-8146(03)00160-2.
- García-Calzón, J. A., & Díaz-García, M. E. (2007). Characterization of binding sites in molecularly imprinted polymers. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *123*(2), 1180-1194. doi: 10.1016/j.snb.2006.10.068.
- García, M. (2002). Aplicación de técnicas quimiométricas para el desarrollo de nuevos métodos cinético-espectrofotométricos de análisis. *Universitat Autònoma de Barcelona*. ISBN: 8469981099.
- Geladi, P., & Kowalski, B. R. (1986). Partial least-squares regression: a tutorial. *Analytica Chimica Acta*, *185*, 1-17. doi: 10.1016/0003-2670(86)80028-9.
- Georgé, S., Brat, P., Alter, P., & Amiot, M. J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(5), 1370-1373. doi: 10.1021/jf048396b.
- Ghasemi, S., & Nematollahzadeh, A. (2018). Molecularly imprinted ultrafiltration polysulfone membrane with specific nano-cavities for selective separation and enrichment of paclitaxel from plant extract.

- Reactive and Functional Polymers*, 126, 9-19. doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2018.02.012.
- Giacometti, J., Muhvić, D., Pavletić, A., & Đudarić, L. (2016). Cocoa polyphenols exhibit antioxidant, anti-inflammatory, anticancerogenic, and anti-necrotic activity in carbon tetrachloride-intoxicated mice. *Journal of Functional Foods*, 23, 177-187. doi: 10.1016/j.jff.2016.02.036.
- Gilquin, B., Louwagie, M., Jaquinod, M., Cez, A., Picard, G., El Kholy, L., . . . Brun, V. (2017). Multiplex and accurate quantification of acute kidney injury biomarker candidates in urine using Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ) and targeted proteomics. *Talanta*, 164, 77-84. doi: 10.1016/j.talanta.2016.11.023.
- Giménez-Bastida, J. A., Larrosa, M., González-Sarrías, A., Tomás-Barberán, F., Espín, J. C., & García-Conesa, M-T. (2012). Intestinal ellagitannin metabolites ameliorate cytokine-induced inflammation and associated molecular markers in human colon fibroblasts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(36), 8866-8876. doi: 10.1021/jf300290f.
- Girón, A. M. (2007). Aplicaciones analíticas de métodos basados en luminiscencia molecular en combinación con metodologías dinámicas: *Universidad de Extremadura*. ISBN: 978-84-7723-791-4.
- Glad, M., Reinholdsson, P., & Mosbach, K. (1995). Molecularly imprinted composite polymers based on trimethylolpropane trimethacrylate (TRIM) particles for efficient enantiomeric separations. *Reactive Polymers*, 25(1), 47-54. doi: 10.1016/0923-1137(95)00018-E.
- Godin, S., Bouzas-Ramos, D., Fontagné-Dicharry, S., Bouyssière, B., & Bueno, M. (2017). Deproteinization assessment using isotopically enriched compounds to trace the coprecipitation of low-molecular-weight selenium species with proteins. *Analytical Biochemistry*, 530, 9-16. doi: 10.1016/j.ab.2017.05.002.
- Gomes, A., Alcaraz, M. R., Goicoechea, H. C., & Araújo, M. C. U. (2014). The Successive Projections Algorithm for interval selection in trilinear partial least-squares with residual bilinearization. *Analytica Chimica Acta*, 811, 13-22. doi: 10.1016/j.aca.2013.12.022.

- Gonthier, M-P., Rios, L. Y., Verny, M-A., Rémésy, C., & Scalbert, A. (2003). Novel liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry method for the quantification in human urine of microbial aromatic acid metabolites derived from dietary polyphenols. *Journal of Chromatography B*, 789(2), 247-255. doi: 10.1016/S1570-0232(03)00073-4.
- González, A. & Guardia, L. (2007). Reconocimiento molecular mediante materiales biomiméticos: impresión molecular. *Paper presented at the Anales de Química*. ISSN 1575-3417, ISSN-e 1575-3417.
- Gonzalez-Barrio, R., Truchado, P., Ito, H., Espin, J. C., & Tomas-Barberan, F. A. (2011). UV and MS Identification of Urolithins and Nasutins, the Bioavailable Metabolites of Ellagitannins and Ellagic Acid in Different Mammals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(4), 1152-1162. doi: 10.1021/jf103894m.
- González-Castejón, M., & Rodríguez-Casado, A. (2011). Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: A review. *Pharmacological Research*, 64(5), 438-455. doi: 10.1016/j.phrs.2011.07.004.
- González Gómez, D. (2005). Utilización de señales de primer y segundo orden para el análisis de fluoroquinolonas y carbamacepinas en fluidos biológicos. ISBN: 84-7723-682-8.
- Goodarzi, M., Sharma, S., Ramon, H., & Saeys, W.. (2015). Multivariate calibration of NIR spectroscopic sensors for continuous glucose monitoring. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 67, 147-158. doi: 10.1016/j.trac.2014.12.005.
- Gowd, V., Karim, N., Shishir, M. R. I., Xie, L., & Chen, W. (2019). Dietary polyphenols to combat the metabolic diseases via altering gut microbiota. *Trends in Food Science & Technology*, 93, 81-93. doi: 10.1016/j.tifs.2019.09.005.
- Grippi, F., Crosta, L., Aiello, G., Tolomeo, M., Oliveri, F., Gebbia, N., & Curione, A. (2008). Determination of stilbenes in Sicilian pistachio by high-performance liquid chromatographic diode array (HPLC-DAD/FLD) and evaluation of eventually mycotoxin contamination. *Food chemistry*, 107(1), 483-488. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.07.079.

- Grzesik, M., Naparło, K., Bartosz, G., & Sadowska-Bartosz, I. (2018). Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. *Food chemistry*, *241*, 480-492. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.08.117.
- Guerrero-Sanchez, C., Erdmenger, T., Šereda, P., Wouters, D., & Schubert, U. S. (2006). Water-Soluble Ionic Liquids as Novel Stabilizers in Suspension Polymerization Reactions: *Engineering Polymer Beads. Chemistry-A European Journal*, *12*(35), 9036-9045. doi: 10.1002/chem.200600657.
- Gui, R., Jin, H., Guo, H., & Wang, Z. (2018). Recent advances and future prospects in molecularly imprinted polymers-based electrochemical biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, *100*, 56-70. doi: 10.1016/j.bios.2017.08.058.
- Guillermo Gormaz J., Quintremil, S., & Rodrigo, R. (2015). Cardiovascular disease: a target for the pharmacological effects of quercetin. *Current topics in medicinal chemistry*, *15*(17), 1735-1742. doi: 10.2174/1568026615666150427124357.
- Guo, H-L., Wang, X-F., Qian, Q-Y., Wang, F-B., & Xia, X-H. (2009). A Green Approach to the Synthesis of Graphene Nanosheets. *ACS Nano*, *3*(9), 2653-2659. doi: 10.1021/nn900227d.
- Guo, P., Luo, Z., Xu, X., Zhou, Y., Zhang, B., Chang, R., . . . Fu, Q. (2017). Development of molecular imprinted column-on line-two dimensional liquid chromatography for selective determination of clenbuterol residues in biological samples. *Food Chemistry*, *217*, 628-636. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.09.021.
- Guo, S. J., & Dong, S. J. (2011). Graphene nanosheet: synthesis, molecular engineering, thin film, hybrids, and energy and analytical applications. *Chemical Society Reviews*, *40*(5), 2644-2672. doi: 10.1039/c0cs00079e.
- Guo, T-Y., Xia, Y-Q., Hao, G-J., Zhang, B-H., Fu, G-Q., Yuan, Z., . . . Kennedy, J. F. (2005). Chemically modified chitosan beads as matrices for adsorptive separation of proteins by molecularly imprinted polymer. *Carbohydrate Polymers*, *62*(3), 214-221. doi: 10.1016/j.carbpol.2005.03.012.

- Haaland, David M., & Thomas, Edward V. (1988). Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information. *Analytical Chemistry*, *60*(11), 1193-1202. doi: 10.1021/ac00162a020.
- Haginaka, J., Takehira, H., Hosoya, K., & Tanaka, N. (1998). Molecularly imprinted uniform-sized polymer-based stationary phase for naproxen: Comparison of molecular recognition ability of the molecularly imprinted polymers prepared by thermal and redox polymerization techniques. *Journal of Chromatography A*, *816*(2), 113-121. doi: 10.1016/S0021-9673(98)00474-9.
- Haimovich, A., Orselli, R., Escandar, G. M., & Olivieri, A. C. (2006). Spectroscopic bilinear least-squares methods exploiting the second-order advantage. Theoretical and experimental study concerning accuracy, sensitivity and prediction error. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, *80*(1), 99-108. doi: 10.1016/j.chemolab.2005.08.004.
- Hakeem S., Inamullah, G., Selin, U., Matthias S., & Kuhnert, N. (2018). Tea and coffee time with bacteria – Investigation of uptake of key coffee and tea phenolics by wild type E. coli. *Food Research International*, *108*, 584-594. doi: 10.1016/j.foodres.2018.03.023.
- Halliwell, B. (2012). Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition reviews*, *70*(5), 257-265. doi: 10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x.
- Han, X., Shen, T., & Lou, H. (2007). Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*, *8*(9), 950-988. doi: 10.3390/i8090950.
- Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, *55*(6), 481-504. doi: 10.1016/S0031-9422(00)00235-1.
- Hardcastle, A. C., Aucott, L., Reid, D. M., & Macdonald, H. M. (2011). Associations between dietary flavonoid intakes and bone health in a Scottish population. *Journal of Bone and Mineral Research*, *26*(5), 941-947. doi:10.1002/jbmr.285.

-
- Harnly, J. M., Bhagwat, S., & Lin, L. Z. (2007). Profiling methods for the determination of phenolic compounds in foods and dietary supplements. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(1), 47-61. doi: 10.1007/s00216-007-1424-7.
- Harshman, R. A. (1970). Foundations of the PARAFAC procedure: Models and conditions for an " explanatory" multimodal factor analysis. *UCLA Working Papers in Phonetics* (1970) 1--84. <https://escholarship.org/uc/item/0410x385>.
- Hashemi, B., Zohrabi, P., & Shamsipur, M. (2018). Recent developments and applications of different sorbents for SPE and SPME from biological samples. *Talanta*, 187, 337-347. doi: 10.1016/j.talanta.2018.05.053.
- Haupt, K., Dzgoev, A., & Mosbach, K. (1998). Assay system for the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid using a molecularly imprinted polymer as an artificial recognition element. *Analytical chemistry*, 70(3), 628-631. doi: 10.1021/ac9711549.
- Haupt, K., & Mosbach, K. (2000). Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors. *Chemical reviews*, 100(7), 2495-2504. doi:10.1021/cr990099w.
- He, C., Long, Y., Pan, J., Li, K., & Liu, F. (2007). Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 70(2), 133-150. doi: 10.1016/j.jbbm.2006.07.005.
- He, J., Shen, Y. Z., Chen, S., Wei, H. L., Zhu, J., You, L. Q., & Lu, K. (2011). Preparation and evaluation of molecularly imprinted microspheres for solid-phase extraction of 1,4-hydroxybenzoic acid esters in soy. *Journal of Separation Science*, 34(19), 2739-2744. doi: 10.1002/jssc.201100452.
- He, M., Yan, P., Yang, Z-Y., Zhang, Z-M., Yang, T-B., & Hong, L.. (2018). A modified multiscale peak alignment method combined with trilinear decomposition to study the volatile/heat-labile components in *Ligusticum chuanxiong Hort - Cyperus rotundus* rhizomes by HS-SPME-GC/MS. *Journal of Chromatography B*, 1079, 41-50. doi: 10.1016/j.jchromb.2018.01.040.

- Hogendoorn, E., & Van Zoonen, P. (2000). Recent and future developments of liquid chromatography in pesticide trace analysis. *Journal of Chromatography A*, 892(1-2), 435-453. doi: 10.1016/S0021-9673(00)00151-5.
- Holst, B., & Williamson, G. (2008). Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(2), 73-82. doi: 10.1016/j.copbio.2008.03.003.
- Hong, Y. S., & Chen, L. G. (2013). Extraction of quercetin from *Herba Lysimachiae* by molecularly imprinted-matrix solid phase dispersion. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 941, 38-44. doi: 10.1016/j.jchromb.2013.10.002.
- Hong, Y.-J., & Mitchell, A. E. (2004). Metabolic profiling of flavonol metabolites in human urine by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(22), 6794-6801. doi: 10.1021/jf040274w.
- Hosny, H., El Gohary, N., Saad, E., Handoussa, H., & El Nashar, R. M. (2018). Isolation of sinapic acid from broccoli using molecularly imprinted polymers. *Journal of Separation Science*, 41(5), 1164-1172. doi: 10.1002/jssc.201701120.
- Hosoya, K., Yoshizako, K., Tanaka, N., Kimata, K., Araki, T., & Haginaka, J. (1994). Uniform-size macroporous polymer-based stationary phase for HPLC prepared through molecular imprinting technique. *Chemistry letters*, 23(8), 1437-1438. doi: 10.1246/cl.1994.1437.
- Hou, X., Liu, S., Zhou, P., Li, J., Liu, X., Wang, L., & Guo, Y. (2016). Polymeric ionic liquid modified graphene oxide-grafted silica for solid-phase extraction to analyze the excretion-dynamics of flavonoids in urine by Box-Behnken statistical design. *Journal of Chromatography A*, 1456, 10-18. doi: 10.1016/j.chroma.2016.05.096.
- Hrobonova, K., Spevak, A., Spisska, L., Lehotay, J., & Cizmarik, J. (2013). Application of umbelliferone molecularly imprinted polymer in analysis of plant samples. *Chemical Papers*, 67(5), 477-483. doi: 10.2478/s11696-013-0320-1.
- Hu, B., Liu, X., Zhang, C., & Zeng, X. (2017). Food macromolecule based nanodelivery systems for enhancing the bioavailability of polyphenols.

- Journal of Food and Drug Analysis*, 25(1), 3-15. doi: 10.1016/j.jfda.2016.11.004.
- Hu, Y., Wu, H-L., Yin, X-L., Gu, H-W., Liu, Z., Xiao, R., . . . Yu, R-Q. (2018). A flexible and novel strategy of alternating trilinear decomposition method coupled with two-dimensional linear discriminant analysis for three-way chemical data analysis: Characterization and classification. *Analytica Chimica Acta*, 1021, 28-40. doi: 10.1016/j.aca.2018.03.050.
- Hu, Y., Pan, J., Zhang, K., Lian, H., & Li, G. (2013). Novel applications of molecularly-imprinted polymers in sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 43, 37-52. doi: 10.1016/j.trac.2012.08.014.
- Hua, S., Zhao, L., Cao, L., Wang, X., Gao, J., & Xu, C. (2018). Fabrication and evaluation of hollow surface molecularly imprinted polymer for rapid and selective adsorption of dibenzothiophene. *Chemical Engineering Journal*, 345, 414-424. doi: 10.1016/j.cej.2018.03.128.
- Huang, L., Guo, L., Wan, Y., Pan, P., & Feng, L. (2014). Simultaneous determination of three potential cancer biomarkers in rat urine by synchronous fluorescence spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 120, 595-601. doi: 10.1016/j.saa.2013.12.001.
- Huang, J., Wu, Y., Cong, J., Luo, J., & Liu, X. (2018). Selective and sensitive glycoprotein detection via a biomimetic electrochemical sensor based on surface molecular imprinting and boronate-modified reduced graphene oxide. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 259, 1-9. doi: 10.1016/j.snb.2017.12.049.
- Hui, K. H., Ambrosi, A., Pumera, M., & Bonanni, A. (2016). Improving the Analytical Performance of Graphene Oxide towards the Assessment of Polyphenols. *Chemistry-a European Journal*, 22(11), 3830-3834. doi: 10.1002/chem.201503852.
- Hurtado-Sánchez, M. C., Durán-Merás, I., Rodríguez-Cáceres, M. I., Jiménez-Girón, A., & Olivieri, A. C. (2012). Comparison of the predictive ability of several second-order multivariate methods in the simultaneous determination of two therapeutic drugs in human urine. *Talanta*, 88, 609-616. doi: 10.1016/j.talanta.2011.11.045.

- Hutabarat, L.S., Greenfield, H., & Mulholland, M. (2001). Isoflavones and coumestrol in soybeans and soybean products from Australia and Indonesia. *Journal of Food Composition and Analysis*, *14*(1), 43-58. doi: 10.1006/jfca.2000.0948.
- Iswaldi, I., Arráez-Román, D., Gómez-Caravaca, A M., Contreras, M. del M., Uberos, J., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2013). Identification of polyphenols and their metabolites in human urine after cranberry-syrup consumption. *Food and Chemical Toxicology*, *55*, 484-492. doi: 10.1016/j.fct.2013.01.039.
- Jabeen, E., Janjua, N. K., Ahmed, S., Murtaza, I., Ali, T., & Hameed, S. (2017). Radical scavenging propensity of Cu^{2+} , Fe^{3+} complexes of flavonoids and in-vivo radical scavenging by Fe^{3+} -primuletin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *171*, 432-438. doi: 10.1016/j.saa.2016.08.035.
- Jalalvand, A. R., Gholivand, M-B., & Goicoechea, H. C. (2015). Multidimensional voltammetry: Four-way multivariate calibration with third-order differential pulse voltammetric data for multi-analyte quantification in the presence of uncalibrated interferences. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, *148*, 60-71. doi: 10.1016/j.chemolab.2015.09.003.
- Jampasa, S., Siangproh, W., Duangmal, K., & Chailapakul, O. (2016). Electrochemically reduced graphene oxide-modified screen-printed carbon electrodes for a simple and highly sensitive electrochemical detection of synthetic colorants in beverages. *Talanta*, *160*, 113-124. doi: 10.1016/j.talanta.2016.07.011.
- Jara-Palacios, M. J., Escudero-Gilete, M. L., Hernandez-Hierro, J. M., Heredia, F. J., & Hernanz, D. (2017). Cyclic voltammetry to evaluate the antioxidant potential in winemaking by-products. *Talanta*, *165*, 211-215. doi: 10.1016/j.talanta.2016.12.058.
- Jiao, Y., Kilmartin, P. A., Fan, M. T., & Quek, S. Y. (2018). Assessment of phenolic contributors to antioxidant activity of new kiwifruit cultivars using cyclic voltammetry combined with HPLC. *Food Chemistry*, *268*, 77-85. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.06.046.

-
- Jiménez-Aguilar, D. M., & Grusak, M. A. (2017). Minerals, vitamin C, phenolics, flavonoids and antioxidant activity of Amaranthus leafy vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, *58*, 33-39. doi: 10.1016/j.jfca.2017.01.005.
- Jiménez-Aliaga, K., Bermejo-Bescós, P., Benedí, J., & Martín-Aragón, S. (2011). Quercetin and rutin exhibit antiamyloidogenic and fibril-disaggregating effects in vitro and potent antioxidant activity in APPswe cells. *Life sciences*, *89*(25-26), 939-945. doi: 10.1016/j.lfs.2011.09.023.
- Jiménez Girón, A., Durán-Merás, I., Espinosa-Mansilla, A., Muñoz de la Peña, A., Cañada Cañada, F., & Olivieri, A. C. (2008). On line photochemically induced excitation–emission-kinetic four-way data: Analytical application for the determination of folic acid and its two main metabolites in serum by U-PLS and N-PLS/residual trilinearization (RTL) calibration. *Analytica Chimica Acta*, *622*(1), 94-103. doi: 10.1016/j.aca.2008.05.079.
- Jiménez, M. R., & Kuhn, G. R. (2009). *Toxicología fundamental: Ediciones Díaz de Santos*. ISBN: 978-84-7978-898-8.
- Johnson, I. T. (2004). New approaches to the role of diet in the prevention of cancers of the alimentary tract. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *551*(1), 9-28. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2004.02.017.
- Julsing, Mattijs K., Koulman, Albert, Woerdenbag, Herman J., Quax, Wim J., & Kayser, O. (2006). Combinatorial biosynthesis of medicinal plant secondary metabolites. *Biomolecular Engineering*, *23*(6), 265-279. doi: 10.1016/j.bioeng.2006.08.001.
- Kahle, K., Kempf, M., Schreier, P., Scheppach, W., Schrenk, D., Kautenburger, T., . . . Richling, E. (2011). Intestinal transit and systemic metabolism of apple polyphenols. *European Journal of Nutrition*, *50*(7), 507-522. doi: 10.1007/s00394-010-0157-0.
- Kalt, W., McDonald, J. E., Liu, Y., & Fillmore, S. A-E. (2017). Flavonoid metabolites in human urine during blueberry anthocyanin intake. *Journal of agricultural and food chemistry*, *65*(8), 1582-1591. doi: 10.1021/acs.jafc.6b05455.

- Kamada, C., da Silva, E. L., Ohnishi-Kameyama, M., Moon, J-H., & Terao, J. (2005). Attenuation of lipid peroxidation and hyperlipidemia by quercetin glucoside in the aorta of high cholesterol-fed rabbit. *Free radical research*, 39(2), 185-194. doi: 10.1080/10715760400019638.
- Karabin, M., Hudcova, T., Jelinek, L., & Dostalek, P. (2015). Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. *Biotechnology Advances*, 33(6, Part 2), 1063-1090. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.02.009.
- Karasova, G., Lehotay, J., Sadecka, J., Skacani, I., & Lachova, M. (2005). Selective extraction of derivates of p-hydroxy-benzoic acid from plant material by using a molecularly imprinted polymer. *Journal of Separation Science*, 28(18), 2468-2476. doi: 10.1002/jssc.200500190.
- Kasprzyk, I., Depciuch, J., Grabek-Lejko, D., & Parlinska-Wojtan, M. (2018). FTIR-ATR spectroscopy of pollen and honey as a tool for unifloral honey authentication. The case study of rape honey. *Food Control*, 84, 33-40. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.07.015.
- Katsnelson, M. I. (2007). Graphene: carbon in two dimensions. *Materials Today*, 10(1-2), 20-27. doi: 10.1016/s1369-7021(06)71788-6.
- Kempe, H., & Kempe, M. (2004). Novel method for the synthesis of molecularly imprinted polymer bead libraries. *Macromolecular Rapid Communications*, 25(1), 315-320. doi: 10.1002/marc.200300189.
- Khan, N., & Mukhtar, H. (2007). Tea polyphenols for health promotion. *Life sciences*, 81(7), 519-533. doi: 10.1016/j.lfs.2007.06.011.
- Kharadze, M., Japaridze, I., Kalandia, A., & Vanidze, M. (2018). Anthocyanins and antioxidant activity of red wines made from endemic grape varieties. *Annals of Agrarian Science*. doi: 10.1016/j.aasci.2018.04.006.
- Khasanah, M., Darmokoesoemo, H., Sari, N. M., Kadmi, Y., Elmsellem, H., & Kusuma, H. S. (2017). Development of electrode carbon paste modified by molecularly imprinted polymer as sensor for analysis of creatinine by potentiometric. *Results in Physics*, 7, 1808-1817. doi: 10.1016/j.rinp.2017.05.012.

- Kiers, H. AL, & Harshman, R. A. (1997). Relating two proposed methods for speedup of algorithms for fitting two-and three-way principal component and related multilinear models. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 36(1), 31-40. doi: 10.1016/S0169-7439(96)00074-3.
- Kilmartin, P. A., & Hsu, C. F. (2003). Characterisation of polyphenols in green, oolong, and black teas, and in coffee, using cyclic voltammetry. *Food Chemistry*, 82(4), 501-512. doi: 10.1016/s0308-8146(03)00066-9.
- Kilmartin, P., Zou, H., & Waterhouse, A. (2001). A Cyclic Voltammetry Method Suitable for Characterizing Antioxidant Properties of Wine and Wine Phenolics. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49, 1957-1965. doi: 10.1021/jf001044u.
- Kim, K. H., Lee, D., Lee, H. L., Kim, C-E., Jung, K., & Kang, K. S. (2018). Beneficial effects of Panax ginseng for the treatment and prevention of neurodegenerative diseases: past findings and future directions. *Journal of Ginseng Research*, 42(3), 239-247. doi: 10.1016/j.jgr.2017.03.011.
- Kong, J-M., Chia, L-S., Goh, N.-K., Chia, T-F., & Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64(5), 923-933. doi: 10.1016/S0031-9422(03)00438-2.
- Koo, Sung I., & Noh, Sang K. (2007). Green tea as inhibitor of the intestinal absorption of lipids: potential mechanism for its lipid-lowering effect. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(3), 179-183. doi: 10.1016/j.jnutbio.2006.12.005.
- Kościelniak, P., & Wieczorek, M. (2016). Univariate analytical calibration methods and procedures. A review. *Analytica Chimica Acta*, 944, 14-28. doi: 10.1016/j.aca.2016.09.024.
- Kozyra, M., Biernasiuk, A., & Malm, A. (2017). Analysis of phenolic acids and antibacterial activity of extracts obtained from the flowering herbs of *carduus acanthoides* L. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 74(1), 161-172. ISSN 0001-6837.
- Krinsley, D. H., Pye, K., Boggs Jr. S., & Tovey, N. K. (2005). Backscattered scanning electron microscopy and image analysis of sediments and

- sedimentary rocks: *Cambridge University Press*. ISBN: 9780521019743.
- Kroger, S., & Turner, A. P. F. (1997). Solvent-resistant carbon electrodes screen printed onto plastic for use in biosensors. *Analytica Chimica Acta*, 347(1-2), 9-18. doi: 10.1016/s0003-2670(96)00634-4.
- Kruskal, J.B. (1977). Three-way arrays: rank and uniqueness of trilinear decompositions, with application to arithmetic complexity and statistics. *Linear Algebra and its Applications*, 18(2), 95-138. doi: 10.1016/0024-3795(77)90069-6.
- Kschonsek, J., Wiegand, C., Hipler, U-C., & Böhm, V. (2019). Influence of polyphenolic content on the in vitro allergenicity of old and new apple cultivars: A pilot study. *Nutrition*, 58, 30-35. doi: 10.1016/j.nut.2018.07.001.
- Kudolo, George B., Delaney, D., & Blodgett, J. (2005). Short-term oral ingestion of Ginkgo biloba extract (EGb 761) reduces malondialdehyde levels in washed platelets of type 2 diabetic subjects. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 68(1), 29-38. doi: 10.1016/j.diabres.2004.08.007.
- Kumar, N., Bansal, A., Sarma, G-S, & Rawal, R. K. (2014). Chemometrics tools used in analytical chemistry: An overview. *Talanta*, 123, 186-199. doi: 10.1016/j.talanta.2014.02.003.
- Kumar, S., & Adarakatti, P. (2018). Modified electrodes for sensing. *Electrochemistry: Volume 15*. doi: 10.1039/9781788013895-00058.
- Kwon, Y. (2017). Luteolin as a potential preventive and therapeutic candidate for Alzheimer's disease. *Experimental Gerontology*, 95, 39-43. doi: 10.1016/j.exger.2017.05.014.
- Lakshmi, D., Prasad, B. B., & Sharma, P. S. (2006). Creatinine sensor based on a molecularly imprinted polymer-modified hanging mercury drop electrode. *Talanta*, 70(2), 272-280. doi: 10.1016/j.talanta.2006.02.038.
- Landete, J. M. (2011). Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *FoodResearch International*, 44(5), 1150-1160. doi: 10.1016/j.foodres.2011.04.027.

- Lanza, F., Hall, A. J., Sellergren, B., Bereczki, A., Horvai, G., Bayoudh, S., . . . Sherrington, D. C. (2001). Development of a semiautomated procedure for the synthesis and evaluation of molecularly imprinted polymers applied to the search for functional monomers for phenytoin and nifedipine. *Analytica Chimica Acta*, *435*(1), 91-106. doi: 10.1016/S0003-2670(01)00905-9.
- Larrosa, M., Llorach, R., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2002). Increase of Antioxidant Activity of Tomato Juice Upon Functionalisation with Vegetable Byproduct Extracts. *LWT - Food Science and Technology*, *35*(6), 532-542. doi: 10.1006/fstl.2002.0907.
- Lee, C. Y., Sim, S. M., & Cheng, H. M. (2008). Phenylacetic acids were detected in the plasma and urine of rats administered with low-dose mulberry leaf extract. *Nutrition Research*, *28*(8), 555-563. doi: 10.1016/j.nutres.2008.05.001.
- Lee, H C., Jenner, A. M., Low, C S., & Lee, Y. K. (2006). Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Research in Microbiology*, *157*(9), 876-884. doi: 10.1016/j.resmic.2006.07.004.
- Lee, J., Ebeler, S. E., Zweigenbaum, J. A., & Mitchell, A. E. (2012). UHPLC-(ESI)QTOF MS/MS Profiling of Quercetin Metabolites in Human Plasma Postconsumption of Applesauce Enriched with Apple Peel and Onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(34), 8510-8520. doi: 10.1021/jf302637t.
- Lei, Q. F., Zhong, S. A., Xiang, H. Y., Zhou, C. S., & Yu, D. (2005). Molecular recognition characteristics and solid-phase extraction in epigallocatechin gallate imprinted polymer. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, *33*(6), 857-860. http://journal.9med.net/upload/pdf/132/1427/86087_7661.pdf.
- Leitão, João M. M., & Esteves da Silva, Joaquim C. G. (2006). PARAFAC and PARAFAC2 calibration models for antihypertensor Nifedipine quantification. *Analytica Chimica Acta*, *559*(2), 271-280. doi: 10.1016/j.aca.2005.11.062.
- Leite, F. R. F., Santos, W. D. R., & Kubota, L. T. (2014). Selective determination of caffeic acid in wines with electrochemical sensor

- based on molecularly imprinted siloxanes. *Sensors and Actuators B-Chemical*, *193*, 238-246. doi: 10.1016/j.snb.2013.11.028.
- Lenhardt, L., Bro, R., Zeković, I., Dramićanin, T., & Dramićanin, M. D. (2015). Fluorescence spectroscopy coupled with PARAFAC and PLS DA for characterization and classification of honey. *Food Chemistry*, *175*, 284-291. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.11.162.
- Lenhardt, L., Zeković, I., Dramićanin, T., Milićević, B., Burojević, J., & Dramićanin, M. D. (2017). Characterization of cereal flours by fluorescence spectroscopy coupled with PARAFAC. *Food Chemistry*, *229*, 165-171. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.02.070.
- Li, H., Lan, R., Peng, N., Sun, J., & Zhu, Y. (2016). High resolution melting curve analysis with MATLAB-based program. *Measurement*, *90*, 178-186. doi: 10.1016/j.measurement.2016.04.057.
- Li, J., Lu, J., Qiao, X., & Xu, Z. (2017). A study on biomimetic immunoassay-capillary electrophoresis method based on molecularly imprinted polymer for determination of trace trichlorfon residue in vegetables. *Food Chemistry*, *221*, 1285-1290. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.11.028.
- Li, N., Ng, T. B., Wong, J. H., Qiao, J. X., Zhang, Y. N., Zhou, R., . . . Liu, F. (2013). Separation and purification of the antioxidant compounds, caffeic acid phenethyl ester and caffeic acid from mushrooms by molecularly imprinted polymer. *Food Chemistry*, *139*(1-4), 1161-1167. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.01.084.
- Li, F., Li, S., Li, H-B., Deng, G-F., Ling, W-H., Wu, S., . . . Chen, F. (2013). Antiproliferative activity of peels, pulps and seeds of 61 fruits. *Journal of Functional Foods*, *5*(3), 1298-1309. doi: 10.1016/j.jff.2013.04.016.
- Li, S-S, Wu, H-L., Liu, Y-J., Gu, H-W., & Yu, R-Q. (2013). Simultaneous determination of tyrosine and dopamine in urine samples using excitation-emission matrix fluorescence coupled with second-order calibration. *Chinese Chemical Letters*, *24*(3), 239-242. doi: 10.1016/j.cclet.2013.01.044.
- Li, Y., Wu, H-L., Qing, X-D., Zuo, Q., Chen, Y., & Yu, R-Q. (2013). A novel method to estimate the chemical rank of three-way data for second-

- order calibration. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, *127*, 177-184. doi: 10.1016/j.chemolab.2013.07.002.
- Liang, Z. X., Zhai, H. Y., Chen, Z. G., Wang, S. Q., Wang, H. H., & Wang, S. M. (2017). A sensitive electrochemical sensor for flavonoids based on a multi-walled carbon paste electrode modified by cetyltrimethyl ammonium bromide-carboxylic multi-walled carbon nanotubes. *Sensors and Actuators B-Chemical*, *244*, 897-906. doi: 10.1016/j.snb.2016.12.108.
- Liao, W., Chen, L., Ma, X., Jiao, R., Li, X., & Wang, Y. (2016). Protective effects of kaempferol against reactive oxygen species-induced hemolysis and its antiproliferative activity on human cancer cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *114*, 24-32. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.02.045.
- Lim, S. S., Vos, Theo, F., Abraham D., Danaei, G., Shibuya, K., Adair-Rohani, H., . . . Ezzati, M. (2012). A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, *380*(9859), 2224-2260. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61766-8.
- Lin, X., Lin, C-H., Zhao, T., Zuo, D., Ye, Z., Liu, L., & Lin, M-T. (2017). Quercetin protects against heat stroke-induced myocardial injury in male rats: Antioxidative and antiinflammatory mechanisms. *Chemico-Biological Interactions*, *265*, 47-54. doi: 10.1016/j.cbi.2017.01.006.
- Linder, M., & Sundberg, R. (1998). Second-order calibration: bilinear least squares regression and a simple alternative. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, *42*(1), 159-178. doi: 10.1016/S0169-7439(98)00032-X.
- Litescu, S. C., Eremia, S., & Radu, G. L. (2010). Biosensors for the Determination of Phenolic Metabolites. In Maria Teresa Giardi, Giuseppina Rea & Bruno Berra (Eds.), *Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors* (pp. 234-240). Boston, MA: Springer US.
- Liu, J., Deng, J. C., Zhang, K., Wu, H. J., Yang, C. Q., Zhang, X. W., . . . Yang, W. Y. (2016). Pod Mildew on Soybeans Can Mitigate the Damage

- to the Seed Arising from Field Mold at Harvest Time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(48), 9135-9142. doi: 10.1021/acs.jafc.6b03561.
- Liu, J., Wang, X., Yong, H., Kan, J., & Jin, C. (2018). Recent advances in flavonoid-grafted polysaccharides: Synthesis, structural characterization, bioactivities and potential applications. *International journal of biological macromolecules*, 116, 1011-1025. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.149.
- Liu, K., da Costa, J. P. C-L., So, H. C., Huang, L., & Ye, J. (2016). Detection of number of components in CANDECOMP/PARAFAC models via minimum description length. *Digital Signal Processing*, 51, 110-123. doi: 10.1016/j.dsp.2016.01.003.
- Liu, X., Wei, Z-H., Huang, Y-P., Yang, J-R., & Liu, Z-S. (2012). Molecularly imprinted nanoparticles with nontailing peaks in capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, 1264, 137-142. doi: 10.1016/j.chroma.2012.09.055.
- Liu, Y., Cai, W., & Shao, X. (2016). Linear model correction: A method for transferring a near-infrared multivariate calibration model without standard samples. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 169, 197-201. doi: 10.1016/j.saa.2016.06.041.
- Liu, Z-S., Xu, Y-L., Yan, C., & Gao, R-Y. (2005). Mechanism of molecular recognition on molecular imprinted monolith by capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, 1087(1), 20-28. doi: 10.1016/j.chroma.2005.05.107.
- Liu, Z-S., Zheng, C., Yan, C., & Gao, R-Y. (2007). Molecularly imprinted polymers as a tool for separation in CEC. *Electrophoresis*, 28(1-2), 127-136. doi: 10.1002/elps.200600544.
- Liu, Z., Zou, H., Ye, M., Ni, J., & Zhang, Y. (1999). Effects of organic modifiers on retention mechanism and selectivity in micellar electrokinetic capillary chromatography studied by linear solvation energy relationships. *Journal of Chromatography A*, 863(1), 69-79. doi: 10.1016/S0021-9673(99)00949-8.

-
- Long, F., Wang, J., Zhang, Z. H., & Yan, L. (2016). Magnetic imprinted electrochemical sensor combined with magnetic imprinted solid-phase extraction for rapid and sensitive detection of tetrabromobisphenol S. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, *777*, 58-66. doi: 10.1016/j.jelechem.2016.07.027.
- López, M. I., Callao, M. P., & Ruisánchez, I. (2015). A tutorial on the validation of qualitative methods: From the univariate to the multivariate approach. *Analytica Chimica Acta*, *891*, 62-72. doi: 10.1016/j.aca.2015.06.032.
- Lopez, M. D. C., Perez, M. C. C., Garcia, M. S. D., Vilarino, J. M. L., Rodriguez, M. V. G., & Losada, L. F. B. (2012). Preparation, evaluation and characterization of quercetin-molecularly imprinted polymer for preconcentration and clean-up of catechins. *Analytica Chimica Acta*, *721*, 68-78. doi: 10.1016/j.aca.2012.01.049.
- Lu, B. Y., Chen, J. Y., Huang, W. S., Wu, D., Xu, W., Xie, Q., . . . Li, L. J. (2011). Determination of flavonoids and phenolic acids in the extract of bamboo leaves using near-infrared spectroscopy and multivariate calibration. *African Journal of Biotechnology*, *10*(42), 8448-8455. doi: 10.5897/AJB11.320.
- Lucci, P., Saurina, J., & Núñez, O. (2017). Trends in LC-MS and LC-HRMS analysis and characterization of polyphenols in food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *88*, 1-24. doi: 10.1016/j.trac.2016.12.006.
- Lund, J. A., Brown, P. N., & Shipley, P. R. (2020). Quantification of North American and European Crataegus flavonoids by nuclear magnetic resonance spectrometry. *Fitoterapia*, *143*, 104537. doi: 10.1016/j.fitote.2020.104537.
- Luypaert, J., Zhang, M. H., & Massart, D. L. (2003). Feasibility study for the use of near infrared spectroscopy in the qualitative and quantitative analysis of green tea, *Camellia sinensis* (L.). *Analytica Chimica Acta*, *478*(2), 303-312. doi: 10.1016/s0003-2670(02)01509-x.
- McNaught, K. S., Thull, U., Carrupt, P. A., Altomare, C., Cellamare, S., Carotti, A., . . . Marsden, C. D. (1996). Effects of isoquinoline derivatives structurally related to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on mitochondrial respiration. *Biochemical*

- Pharmacology*, 51(11), 1503-1511. doi: 10.1016/0006-2952(96)00091-3.
- Mahdavi-Roshan, M., Salari, A., Ghorbani, Z., & Ashouri, A. (2020). The effects of regular consumption of green or black tea beverage on blood pressure in those with elevated blood pressure or hypertension: A systematic review and meta-analysis. *Complementary Therapies in Medicine*, 51, 102430. doi: 10.1016/j.ctim.2020.102430.
- Mahedero, M. C., Díaz, N. Mora, Muñoz de la Peña, A., Espinosa Mansilla, A., González Gómez, D., & Bohoyo Gil, D. (2005). Strategies for solving matrix effects in the analysis of sulfathiazole in honey samples using three-way photochemically induced fluorescence data. *Talanta*, 65(3), 806-813. doi: 10.1016/j.talanta.2004.08.055.
- Makhotkina, O., & Kilmartin, P. A. (2010). The use of cyclic voltammetry for wine analysis: Determination of polyphenols and free sulfur dioxide. *Analytica Chimica Acta*, 668(2), 155-165. doi: 10.1016/j.aca.2010.03.064.
- Makhotkina, O., & Kilmartin, P. A. (2012). The phenolic composition of Sauvignon blanc juice profiled by cyclic voltammetry. *Electrochimica Acta*, 83, 188-195. doi: 10.1016/j.electacta.2012.07.101.
- Maleki, S. J., Crespo, J. F., & Cabanillas, B. (2019). Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chemistry*, 299, 125124. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125124.
- Malliaris, A. (1988). Fluorescence probing in aqueous micellar systems: an overview. *International Reviews in Physical Chemistry*, 7(2), 95-121. doi: 10.1080/01442358809353208.
- Maloney, T. D., & Colón, L. A. (2002). Comparison of column packing techniques for capillary electrochromatography. *Journal of separation science*, 25(15-17), 1215-1225. doi: 10.1002/1615-9314(20021101)25:15/17<1215::AID-JSSC1215>3.0.CO;2-O.
- Manach, C., & Donovan, J. L. (2004). Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free radical research*, 38(8), 771-785. doi: 10.1080/10715760410001727858.

- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727-747. doi: 10.1093/ajcn/79.5.727.
- Marć, M., Panuszko, A., Namieśnik, J., & Wiczorek, P. P. (2018). Preparation and characterization of dummy-template molecularly imprinted polymers as potential sorbents for the recognition of selected polybrominated diphenyl ethers. *Analytica Chimica Acta*, 1030, 77-95. doi: 10.1016/j.aca.2018.05.022.
- Markovic, R., Baltic, M. Z., Pavlovic, M., Glisic, M., Radulovic, S., Djordjevic, V., & Sefer, D. (2015). Isoflavones - from Biotechnology to Functional Foods. *Procedia Food Science*, 5, 176-179. doi: 10.1016/j.profoo.2015.09.050.
- Martin, A., Hernandez-Ferrer, J., Martinez, M. T., & Escarpa, A. (2015). Graphene nanoribbon-based electrochemical sensors on screen-printed platforms. *Electrochimica Acta*, 172, 2-6. doi: 10.1016/j.electacta.2014.11.090.
- Martín-Esteban, A. (2013). Molecularly-imprinted polymers as a versatile, highly selective tool in sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 45, 169-181. doi: 10.1016/j.trac.2012.09.023.
- Martin, M. A., Goya, L., & Ramos, S. (2017). Protective effects of tea, red wine and cocoa in diabetes. Evidences from human studies. *Food and Chemical Toxicology*, 109, 302-314. doi: 10.1016/j.fct.2017.09.015.
- Martín, M. A., & Ramos, S. (2016). Cocoa polyphenols in oxidative stress: Potential health implications. *Journal of Functional Foods*, 27, 570-588. doi: 10.1016/j.jff.2016.10.008.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*, 17(6), 271-278. ISSN 0212-1611.
- Martínez, J. L., Saulo, H., Escobar, H. B., & Leao, J. (2017). A new model selection criterion for partial least squares regression. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 169, 64-78. doi: 10.1016/j.chemolab.2017.08.006.
- Martins, R. O., Gomes, I. C., Telles, A. D. M., Kato, L., Souza, P. S., & Chaves, A. R. (2020). Molecularly imprinted polymer as solid phase extraction

- phase for condensed tannin determination from Brazilian natural sources. *Journal of Chromatography A*, 1620, 460977. doi: 10.1016/j.chroma.2020.460977.
- Marx, S., Zaltsman, A., Turyan, I., & Mandler, D. (2004). Parathion sensor based on molecularly imprinted sol– gel films. *Analytical Chemistry*, 76(1), 120-126. doi: 10.1021/ac034531s.
- Masqué, N., Marcé, R. M., Borrull, F., Cormack, P. A-G, & Sherrington, D. C. (2000). Synthesis and evaluation of a molecularly imprinted polymer for selective on-line solid-phase extraction of 4-nitrophenol from environmental water. *Analytical chemistry*, 72(17), 4122-4126. doi: 10.1021/ac0000628.
- Mattsson, L., Xu, J., Preininger, C., Bui, B. T. S., & Haupt, K. (2018). Competitive fluorescent pseudo-immunoassay exploiting molecularly imprinted polymers for the detection of biogenic amines in fish matrix. *Talanta*, 181, 190-196. doi: 10.1016/j.talanta.2018.01.010.
- Mayes, A. G., & Whitcombe, M. J. (2005). Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(12), 1742-1778. doi: 10.1016/j.addr.2005.07.011.
- Mazina, J., Vaher, M., Kuhtinskaja, M., Poryvkina, L., & Kaljurand, M. (2015). Fluorescence, electrophoretic and chromatographic fingerprints of herbal medicines and their comparative chemometric analysis. *Talanta*, 139, 233-246. doi: 10.1016/j.talanta.2015.02.050.
- Meischl, F., Kirchler, C. G., Jager, M. A., Huck, C. W., & Rainer, M. (2018). Determination of the clean-up efficiency of the solid-phase extraction of rosemary extracts: Application of full-factorial design in hyphenation with Gaussian peak fit function. *Journal of Separation Science*, 41(3), 704-712. doi: 10.1002/jssc.201701008.
- Méndez Medrano, M. G., Rosu, H. C., & Torres González, L.A. (2012). Grafeno el alótropo más prometedor del carbono. *Acta Universitaria*, 22(3), 20-23. ISSN: 0188-6266.
- Meng, M. J., Bao, L. L., He, M. Q., Sun, K. Y., Li, W. B., Zhao, D. X., . . . Yan, Y. S. (2014). Preparation, Characterization, and Adsorption Performance of p-Hydroxybenzoic Acid Imprinted Polymer and

- Selective Catalysis of Toluene to para-Chlorotoluene. *Journal of Applied Polymer Science*, 131(8). doi: 10.1002/app.40118.
- Meng, S., Cao, J., Feng, Q., Peng, J., & Hu, Y. (2013). Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. doi: 10.1155/2013/801457.
- Messina, M., & Bennink, M. (1998). 10 Soyfoods, isoflavones and risk of colonic cancer: a review of the in vitro and in vivo data. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 12(4), 707-728. doi: 10.1016/S0950-351X(98)80012-8.
- Michailof, C., Manesiotis, P., & Panayiotou, C. (2008). Synthesis of caffeic acid and p-hydroxybenzoic acid molecularly imprinted polymers and their application for the selective extraction of polyphenols from olive mill waste waters. *Journal of Chromatography A*, 1182(1), 25-33. doi: 10.1016/j.chroma.2008.01.001.
- Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4), 673-751. doi: 0031-6997/00/5204-0673\$03.00/0.
- Miltonprabu, S., Tomczyk, M., Skalicka-Woźniak, K, Rastrelli, L., Daglia, M., Nabavi, S. F., . . . Nabavi, S. M. (2017). Hepatoprotective effect of quercetin: From chemistry to medicine. *Food and Chemical Toxicology*, 108, 365-374. doi: 10.1016/j.fct.2016.08.034.
- Miura, C., Matsunaga, H., & Haginaka, J. (2016). Molecularly imprinted polymer for caffeic acid by precipitation polymerization and its application to extraction of caffeic acid and chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* leaves. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 127, 32-38. doi: 10.1016/j.jpba.2015.12.052.
- Moberg, Ludvig, Karlberg, Bo, Blomqvist, Sven, & Larsson, Ulf. (2000). Comparison between a new application of multivariate regression and current spectroscopy methods for the determination of chlorophylls and their corresponding pheopigments. *Analytica Chimica Acta*, 411(1), 137-143. doi: 10.1016/S0003-2670(00)00783-2.

-
- Mocciaro, G., Bresciani, L., Tsiountsioura, M., Martini, D., Mena, P., Charron, M., . . . Ray, S. (2019). Dietary absorption profile, bioavailability of (poly)phenolic compounds, and acute modulation of vascular/endothelial function by hazelnut skin drink. *Journal of Functional Foods*, *63*, 103576. doi: 10.1016/j.jff.2019.103576.
- Mohammed, N. A. S., Abu-Zurayk, R. A., Hamadneh, I., & Al-Dujaili, A. H. (2018). Phenol adsorption on biochar prepared from the pine fruit shells: Equilibrium, kinetic and thermodynamics studies. *Journal of Environmental Management*, *226*, 377-385. doi: 10.1016/j.jenvman.2018.08.033.
- Mohan, S., & Nandhakumar, L. (2014). Role of various flavonoids: Hypotheses on novel approach to treat diabetes. *Journal of Medical Hypotheses and Ideas*, *8*(1), 1-6. doi: 10.1016/j.jmhi.2013.06.001.
- Molinelli, A., Weiss, R., & Mizaikoff, B. (2002). Advanced solid phase extraction using molecularly imprinted polymers for the determination of quercetin in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(7), 1804-1808. doi: 10.1021/jf011213q.
- Moller, K., Nilsson, U., & Crescenzi, C. (2004). Investigation of matrix effects of urine on a molecularly imprinted solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *811*(2), 171-176. doi: 10.1016/j.jchromb.2004.08.036.
- Monagas, M., Urpi-Sarda, M., Sanchez-Patan, F., Llorach, R., Garrido, I., Gomez-Cordoves, C., . . . Bartolome, B. (2010). Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food & Function*, *1*(3), 233-253. doi: 10.1039/c0fo00132e.
- Monago-Maraña, O., Durán-Merás, I., Galeano-Díaz, T., & Muñoz de la Peña, A. (2016). Fluorescence properties of flavonoid compounds. Quantification in paprika samples using spectrofluorimetry coupled to second order chemometric tools. *Food Chemistry*, *196*, 1058-1065. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.10.041.
- Montemurro, M., Siano, G. G., Alcaráz, M. R., & Goicoechea, H. C. (2017). Third order chromatographic-excitation-emission fluorescence data: Advances, challenges and prospects in analytical applications. *TrAC*

- Trends in Analytical Chemistry*, 93, 119-133. doi: 10.1016/j.trac.2017.05.011.
- Monzón, C. M., Teglia, C. M., Delfino, M. R., & Goicoechea, H. C. (2018). Multiway calibration strategy with chromatographic data exploiting the second-order advantage for quantitation of three antidiabetic and three antihypertensive drugs in serum samples. *Microchemical Journal*, 136, 185-192. doi: 10.1016/j.microc.2016.11.019.
- Mortera, P., Zuljan, F. A., Magni, C., Bortolato, S. A., & Alarcón, S. H. (2018). Multivariate analysis of organic acids in fermented food from reversed-phase high-performance liquid chromatography data. *Talanta*, 178, 15-23. doi: 10.1016/j.talanta.2017.09.005.
- Mosbach, K. (2001). Toward the next generation of molecular imprinting with emphasis on the formation, by direct molding, of compounds with biological activity (biomimetics). *Analytica chimica acta*, 435(1), 3-8. doi: 10.1016/S0003-2670(01)00800-5.
- Mosbach, K., & Haupt, K. (1998). Some new developments and challenges in non-covalent molecular imprinting technology. *Journal of molecular recognition*, 11(1-6), 62-68. doi: 10.1002/(SICI)10991352-(199812)11:1/6<62::AID-JMR391>3.0.CO;2-5.
- Mosbach, K., & Ramström, O. (1996). The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology. *Nature Biotechnology*, 14(2), 163. doi: 10.1038/nbt0296-163.
- Mulder, T. P., Rietveld, A. G., & van Amelsvoort, J. M. (2005). Consumption of both black tea and green tea results in an increase in the excretion of hippuric acid into urine. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 256S-260S. doi: 10.1093/ajcn/81.1.256S.
- Mullen, W., Boitier, A., Stewart, A. J., & Crozier, A. (2004). Flavonoid metabolites in human plasma and urine after the consumption of red onions: analysis by liquid chromatography with photodiode array and full scan tandem mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1058(1-2), 163-168. doi: 10.1016/j.chroma.2004.08.117.
- Mullett, W. M., Martin, P., & Pawliszyn, J. (2001). In-tube molecularly imprinted polymer solid-phase microextraction for the selective

- determination of propranolol. *Analytical chemistry*, 73(11), 2383-2389. doi: 10.1021/ac0100502.
- Muñoz de la Peña, A., Mora Díez, N., Bohoyo Gil, D., Olivieri, A. C., & Escandar, G. M. (2006). Simultaneous determination of flufenamic and meclofenamic acids in human urine samples by second-order multivariate parallel factor analysis (PARAFAC) calibration of micellar-enhanced excitation–emission fluorescence data. *Analytica Chimica Acta*, 569(1), 250-259. doi: 10.1016/j.aca.2006.03.077.
- Muñoz de la Peña, A., Espinosa Mansilla, A., González Gómez, D., Olivieri, A. C., & Goicoechea, H. C. (2003). Interference-free analysis using three-way fluorescence data and the parallel factor model. Determination of fluoroquinolone antibiotics in human serum. *Analytical chemistry*, 75(11), 2640-2646. doi: 10.1021/ac026360h.
- Murphy, K. J., Walker, K. M., Dyer, K. A., & Bryan, J. (2019). Estimation of daily intake of flavonoids and major food sources in middle-aged Australian men and women. *Nutrition Research*, 61, 64-81. doi: 10.1016/j.nutres.2018.10.006.
- Nabavi, S. A., Vladisavljević, G. T., Wicaksono, A., Georgiadou, S., & Manović, V. (2017). Production of molecularly imprinted polymer particles with amide-decorated cavities for CO₂ capture using membrane emulsification/suspension polymerisation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 521, 231-238. doi: 10.1016/j.colsurfa.2016.05.033.
- Nabavi, S. M., Šamec, D., Tomczyk, M., Milella, L., Russo, D., Habtemariam, S., . . . Shirooie, S. (2020). Flavonoid biosynthetic pathways in plants: Versatile targets for metabolic engineering. *Biotechnology Advances*, 38, 107316. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.005.
- Naczki, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 95-111. doi: 10.1016/j.chroma.2004.08.059.
- Nantasenamat, C., Isarankura-Na-Ayudhya, C., Naenna, T., & Prachayasittikul, V. (2007). Quantitative structure-imprinting factor relationship of molecularly imprinted polymers. *Biosensors & Bioelectronics*, 22(12), 3309-3317. doi: 10.1016/j.bios.2007.01.017.

-
- Nash, V., Ranadheera, C. S., Georgousopoulou, E. N., Mellor, D. D., Panagiotakos, D. B., McKune, A. J., . . . Naumovski, Nenad. (2018). The effects of grape and red wine polyphenols on gut microbiota – A systematic review. *Food Research International*, *113*, 277-287. doi: 10.1016/j.foodres.2018.07.019.
- Nemulenzi, O., Mhaka, B., Cukrowska, E., Ramström, O., Tutu, H., & Chimuka, L. (2009). Potential of combining of liquid membranes and molecularly imprinted polymers in extraction of 17 β -estradiol from aqueous samples. *Journal of separation science*, *32*(11), 1941-1948. doi: 10.1002/jssc.200800659.
- Neto, J. J. L., de Almeida, T. S., de Medeirosa, J. L., Vieira, L. R., Moreira, T. B., Maia, A. I. V., . . . Carvalho, A. F. U. (2017). Impact of bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in biological systems upon the antioxidant activity of the ethanolic extract of *Triplaris gardneriana* seeds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *88*, 999-1007. doi: 10.1016/j.biopha.2017.01.109.
- Nicholls, I. A., Adbo, K., Andersson, H. S., Andersson, P. O., Ankarloo, J., Hedin-Dahlström, J., . . . Rosengren, J. (2001). Can we rationally design molecularly imprinted polymers? *Analytica chimica acta*, *435*(1), 9-18. doi: 10.1016/S0003-2670(01)00932-1.
- Nogueira, J. M. F. (2012). Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques. *Analytica Chimica Acta*, *757*, 1-10. doi: 10.1016/j.aca.2012.10.033.
- Nolvachai, Y., Kulsing, C., Boysen, R. I., Hearn, M. T. W., & Marriott, P. J. (2014). Miniaturized molecularly imprinted polymer extraction method for the gas chromatographic analysis of flavonoids. *Journal of Separation Science*, *37*(8), 1018-1025. doi: 10.1002/jssc.201301009.
- Nolvachai, Y., & Marriott, P. J. (2013). GC for flavonoids analysis: Past, current, and prospective trends. *Journal of Separation Science*, *36*(1), 20-36. doi: 10.1002/jssc.201200846.
- Ohfuji, K., Sato, N., Hamada-Sato, N., Kobayashi, T., Imada, C., Okuma, H., & Watanabe, E. (2004). Construction of a glucose sensor based on a screen-printed electrode and a novel mediator pyocyanin from

- Pseudomonas aeruginosa*. *Biosensors & Bioelectronics*, 19(10), 1237-1244. doi: 10.1016/j.bios.2003.11.010.
- Olivieri, A. C. (2005). On a versatile second-order multivariate calibration method based on partial least-squares and residual bilinearization: Second-order advantage and precision properties. *Journal of Chemometrics*, 19(4), 253-265. doi: 10.1002/cem.927.
- Olivieri, A. C. (2001). Calibración Multivariada–Introducción a la programación con MATLAB, Ediciones Científicas Argentinas. *Buenos Aires*.
- Olivieri, A. C. (2015). Practical guidelines for reporting results in single- and multi-component analytical calibration: A tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 868, 10-22. doi: 10.1016/j.aca.2015.01.017.
- Olivieri, A. C., Goicoechea, H. C., & Iñón, F. A. (2004). MVC1: an integrated MatLab toolbox for first-order multivariate calibration. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 73(2), 189-197. doi: 10.1016/j.chemolab.2004.03.004.
- Olivieri, A. C., Wu, H-L., & Yu, R-Q. (2009). MVC2: A MATLAB graphical interface toolbox for second-order multivariate calibration. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 96(2), 246-251. doi: 10.1016/j.chemolab.2009.02.005.
- O'Mahony, J., Molinelli, A., Nolan, K., Smyth, M. R., & Mizaikoff, B. (2006). Anatomy of a successful imprint: Analysing the recognition mechanisms of a molecularly imprinted polymer for quercetin. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(7), 1383-1392. doi: 10.1016/j.bios.2005.05.015.
- Ongkowijoyo, P., Luna-Vital, D. A., & Gonzalez de Mejia, E. (2018). Extraction techniques and analysis of anthocyanins from food sources by mass spectrometry: An update. *Food Chemistry*, 250, 113-126. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.01.055.
- Õpik, A., Menaker, A., Reut, J., & Syritski, V. (2009). Molecularly imprinted polymers: a new approach to the preparation of functional materials. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*, 58(1). doi: 10.3176/proc.2009.1.01.

- Orellana Ruiz, I. (2016). Reconocimiento molecular en macromoléculas sintéticas. URI: 11441/50477.
- Orihara, K., Hikichi, A., Arita, T., Muguruma, H., & Yoshimi, Y. (2018). Heparin molecularly imprinted polymer thin film on gold electrode by plasma-induced graft polymerization for label-free biosensor. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 151, 324-330. doi: 10.1016/j.jpba.2018.01.012.
- Oroian, M., & Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74, 10-36. doi: 10.1016/j.foodres.2015.04.018.
- Ortiz, M. C., Sarabia, L. A., Sánchez, M. S., & Giménez, D. (2009). Identification and quantification of ciprofloxacin in urine through excitation-emission fluorescence and three-way PARAFAC calibration. *Analytica Chimica Acta*, 642(1), 193-205. doi: 10.1016/j.aca.2009.01.040.
- Osorio-Tobón, J F., Meireles, M.A., Osorio-Tobón, J.F., & Meireles, M.A.A. (2013). Recent applications of pressurized fluid extraction: curcuminoids extraction with pressurized liquids. *Food Public Health*, 3(6), 289-303. doi:10.5923/j.fph.20130306.05.
- Othman, A., Norton, L., Finny, A. S., & Andreescu, S. (2020). Easy-to-use and inexpensive sensors for assessing the quality and traceability of cosmetic antioxidants. *Talanta*, 208, 120473. doi: 10.1016/j.talanta.2019.120473.
- Ottaviani, J. I., Heiss, C., Spencer, J. P. E., Kelm, M., & Schroeter, H. (2018). Recommending flavanols and procyanidins for cardiovascular health: Revisited. *Molecular Aspects of Medicine*. doi: 10.1016/j.mam.2018.02.001.
- Ottaviani, J. I., Momma, T. Y., Kuhnle, G. K., Keen, C. L., & Schroeter, H. (2012). Structurally related (–)-epicatechin metabolites in humans: Assessment using de novo chemically synthesized authentic standards. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(8), 1403-1412. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.12.010.
- Owolabi, M. A., Coker, H. A. B., & Jaja, S. I. (2007). Flavonoid metabolites in urine after oral administration of aqueous extract of *Persea americana*

- to rats. *Journal of Natural Medicines*, 61(2), 200-204. doi: 10.1007/s11418-006-0122-7.
- Pakade, V., Cukrowska, E., Lindahl, S., Turner, C., & Chimuka, L. (2013). Molecular imprinted polymer for solid-phase extraction of flavonol aglycones from *Moringa oleifera* extracts. *Journal of Separation Science*, 36(3), 548-555. doi: 10.1002/jssc.201200576.
- Pan, X. R., Ji, J. H., Zhang, N. N., & Xing, M. Y. (2020). Research progress of graphene-based nanomaterials for the environmental remediation. *Chinese Chemical Letters*, 31(6), 1462-1473. doi: 10.1016/j.ccllet.2019.10.002.
- Papaj, K., Kasprzycka, A., Góra, A., Grajoszek, A., Rzepecka, G., Stojko, J., . . . Rusin, A.. (2020). Structure–bioavailability relationship study of genistein derivatives with antiproliferative activity on human cancer cell. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 185, 113216. doi: 10.1016/j.jpba.2020.113216.
- Pardo, A., Mespouille, L., Blankert, B., Trouillas, P., Surin, M., Dubois, P., & Duez, P. (2014). Quercetin-imprinted chromatographic sorbents revisited: Optimization of synthesis and rebinding protocols for application to natural resources. *Journal of Chromatography A*, 1364, 128-139. doi: 10.1016/j.chroma.2014.08.064.
- Park, H. E., Tian, M. L., & Row, K. H. (2014). Molecularly Imprinted Polymer for Solid-Phase Extraction of Phenolic Acids from *Salicornia herbacea* L. *Separation Science and Technology*, 49(9), 1401-1406. doi: 10.1080/01496395.2013.879479.
- Pearson, D. A., Paglieroni, T. G., Rein, D., Wun, T., Schramm, D. D., Wang, J. F., . . . Keen, Carl L. (2002). The effects of flavanol-rich cocoa and aspirin on ex vivo platelet function. *Thrombosis Research*, 106(4), 191-197. doi: 10.1016/S0049-3848(02)00128-7.
- Penczynski, K. J., Krupp, D., Bring, A., Bolzenius, K., Remer, T., & Buyken, A. E. (2017). Relative validation of 24-h urinary hippuric acid excretion as a biomarker for dietary flavonoid intake from fruit and vegetables in healthy adolescents. *European Journal of Nutrition*, 56(2), 757-766. doi: 10.1007/s00394-015-1121-9.

- Peng, D., Li, Z., Wang, Y., Liu, Z., Sheng, F., & Yuan, Z. (2017). Enzyme-linked immunoassay based on imprinted microspheres for the detection of sulfamethazine residue. *Journal of Chromatography A*, *1506*, 9-17. doi: 10.1016/j.chroma.2017.05.016.
- Pereira-Caro, G., Ludwig, I. A., Polyviou, T., Malkova, D., García, A., Moreno-Rojas, J. M., & Crozier, A. (2016). Identification of plasma and urinary metabolites and catabolites derived from orange juice (Poly) phenols: Analysis by high-performance liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, *64*(28), 5724-5735. doi: 10.1021/acs.jafc.6b02088.
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., & Saura-Calixto, F. (2009). Proanthocyanidin content in foods is largely underestimated in the literature data: An approach to quantification of the missing proanthocyanidins. *Food Research International*, *42*(10), 1381-1388. doi: 10.1016/j.foodres.2009.07.002
- Pérez-Moral, N., & Mayes, A.G. (2004). Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerisation methods. *Analytica Chimica Acta*, *504*(1), 15-21. doi: 10.1016/S0003-2670(03)00533-6.
- Perez-Vizcaino, F., & Fraga, C. G. (2018). Research trends in flavonoids and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *646*, 107-112. doi: 10.1016/j.abb.2018.03.022.
- Petersen, M., & Simmonds, M. S.J. (2003). Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, *62*(2), 121-125. doi: 10.1016/S0031-9422(02)00513-7.
- Piljac-Zegarac, J., Valek, L., Stipcevic, T., & Martinez, S. (2010). Electrochemical determination of antioxidant capacity of fruit tea infusions. *Food Chemistry*, *121*(3), 820-825. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.12.090.
- Piletsky, S. A., Panasyuk, T. L., Piletskaya, E. V., Nicholls, I. A., & Ulbricht, M. (1999). Receptor and transport properties of imprinted polymer membranes – a review. *Journal of Membrane Science*, *157*(2), 263-278. doi: 10.1016/S0376-7388(99)00007-1.
- Piletsky, S.A, Karim, K., Piletska, E.V., Day, C.J., Freebairn, K.W., Legge, C., & Turner, A.P.F. (2001). Recognition of ephedrine enantiomers by

- molecularly imprinted polymers designed using a computational approach Electronic Supplementary Information available. *Analyst*, 126(10), 1826-1830. doi: 10.1039/B102426B.
- Piletsky, S. A., Alcock, S., & Turner, A. P. F. (2001). Molecular imprinting: at the edge of the third millennium. *Trends in Biotechnology*, 19(1), 9-12. doi: 10.1016/s0167-7799(00)01523-7.
- Pingarrón Carrazón, J. M., & Sánchez Batanero, P. . . (1999). Química electroanalítica: *Fundamentos y aplicaciones: síntesis*. ISBN: 978-84-7738-663-6.
- Plaza, M., Domínguez-Rodríguez, G., Castro-Puyana, M., & Marina, M. L. (2018). 6 - Polyphenols analysis and related challenges. In *Charis M. Galanakis* (Ed.), *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications* (pp. 177-232): Woodhead Publishing. ISBN: 9780128135730.
- Prakash, M., Basavaraj, B.V., & Murthy, K.N C. (2019). Biological functions of epicatechin: Plant cell to human cell health. *Journal of functional foods*, 52, 14-24. doi: 10.1016/j.jff.2018.10.021.
- Prasad, B. B., Sharma, P. S., & Lakshmi, D. (2007). Molecularly imprinted polymer-based solid-phase extraction combined with molecularly imprinted polymer-based sensor for detection of uric acid. *Journal of Chromatography A*, 1173(1-2), 18-26. doi: 10.1016/j.chroma.2007.10.024.
- Preethi Soundarya, S., Sanjay, V., Haritha Menon, A., Dhivya, S., & Selvamurugan, N. (2018). Effects of flavonoids incorporated biological macromolecules based scaffolds in bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 110, 74-87. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.09.014.
- Prehn, R., Gonzalo-Ruiz, J., & Cortina-Puig, M. (2012). Electrochemical Detection of Polyphenolic Compounds in Foods and Beverages. *Current Analytical Chemistry*, 8(4), 472-484. doi: 10.2174/157341112803216717.
- Prior, R. L., Rogers, T. R., Khanal, R. C., Wilkes, S. E., Wu, X., & Howard, L. R. (2010). Urinary excretion of phenolic acids in rats fed cranberry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(7), 3940-3949. doi: 10.1021/jf9028392.

-
- Probst, Y., Guan, V., & Kent, K. (2018). A systematic review of food composition tools used for determining dietary polyphenol intake in estimated intake studies. *Food Chemistry*, 238, 146-152. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.11.010.
- Procházková, D., Boušová, I., & Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4), 513-523. doi: 10.1016/j.fitote.2011.01.018.
- Punyasiri, P.A.N., Abeysinghe, I.S.B., Kumar, V., Treutter, D., Duy, D., Gosch, C., . . . Fischer, TC. (2004). Flavonoid biosynthesis in the tea plant *Camellia sinensis*: properties of enzymes of the prominent epicatechin and catechin pathways. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 431(1), 22-30. doi: 10.1016/j.abb.2004.08.003.
- Putzbach, W., & Ronkainen, N. J. (2013). Immobilization Techniques in the Fabrication of Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review. *Sensors*, 13(4), 4811-4840. doi: 10.3390/s130404811.
- Pyrzyska, K., & Biesaga, M. (2009). Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 28(7), 893-902. doi: 10.1016/j.trac.2009.03.015.
- Quaglia, M., Sellergren, B., & De Lorenzi, E. (2004). Approaches to imprinted stationary phases for affinity capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, 1044(1), 53-66. doi: 10.1016/j.chroma.2004.05.055.
- Qiu, H. M., Luo, C. N., Sun, M., Lu, F. G., Fan, L. L., & Li, X. J. (2012). A novel chemiluminescence sensor for determination of quercetin based on molecularly imprinted polymeric microspheres. *Food Chemistry*, 134(1), 469-473. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.02.102.
- Qiu, X. Z., Liang, Y., Guo, H. S., Wang, X. B., & Lin, C. X. (2015). Determination of Phenolic Compounds in Environmental Water by HPLC Combination with On-Line Solid-Phase Extraction Using Molecularly Imprinted Polymers. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 15(12), 9578-9584. doi: 10.1166/jnn.2015.10495.
- Qureshi, M. N., Stecher, G., Huck, C., & Bonn, G. K. (2011). Preparation of polymer based sorbents for solid phase extraction of polyphenolic

- compounds. *Central European Journal of Chemistry*, 9(2), 206-212. doi: 10.2478/s11532-011-0006-x.
- Rady, I., Mohamed, H., Rady, M., Siddiqui, I. A., & Mukhtar, H. (2018). Cancer preventive and therapeutic effects of EGCG, the major polyphenol in green tea. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(1), 1-23. doi: 10.1016/j.ejbas.2017.12.001.
- Raffa, D., Maggio, B., Raimondi, M. V., Plescia, F., & Daidone, G. (2017). Recent discoveries of anticancer flavonoids. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 142, 213-228. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.07.034.
- Rahimi, M., Bahar, S., Heydari, R., & Amininasab, S. M. (2019). Determination of quercetin using a molecularly imprinted polymer as solid-phase microextraction sorbent and high-performance liquid chromatography. *Microchemical Journal*, 148, 433-441. doi: 10.1016/j.microc.2019.05.032.
- Raks, V., Al-Suod, H., & Buszewski, B. (2018). Isolation, Separation, and Preconcentration of Biologically Active Compounds from Plant Matrices by Extraction Techniques. *Chromatographia*, 81(2), 189-202. doi: 10.1007/s10337-017-3405-0.
- Ramesova, S., Sokolova, R., Tarabek, J., & Degano, I. (2013). The oxidation of luteolin, the natural flavonoid dye. *Electrochimica Acta*, 110, 646-654. doi: 10.1016/j.electacta.2013.06.136.
- Ramos, L. (2012). Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. *Journal of Chromatography A*, 1221, 84-98. doi: 10.1016/j.chroma.2011.11.011.
- Ramström, O., & Ansell, R. J. (1998). Molecular imprinting technology: challenges and prospects for the future. *Chirality*, 10(3), 195-209. doi: 10.1002/(SICI)1520-636X(1998)10:3<195::AID-CHIR1>3.0.CO;2-9.
- Raof, S. F. A., Mohamad, S., & Abas, M. R. (2013). Synthesis and Evaluation of Molecularly Imprinted Silica Gel for 2-Hydroxybenzoic Acid in Aqueous Solution. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 5952-5965. doi: 10.3390/ijms14035952.

-
- Rattan, S., Kumar, S., & Goswamy, J. K. (2020). Graphene oxide reduction using green chemistry. *Materials Today-Proceedings*, 26, 3327-3331. doi: 10.1016/j.matpr.2019.09.168.
- Raut, N., Wicks, S. M., Lawal, T. O., & Mahady, G. B. (2019). Epigenetic regulation of bone remodeling by natural compounds. *Pharmacological Research*, 147, 104350. doi: 10.1016/j.phrs.2019.104350.
- Rechner, A. R., Smith, M. A, Kuhnle, G., Gibson, G. R., Debnam, E. S., Srail, S. K. S., . . . Rice-Evans, C. A. (2004). Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(2), 212-225. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2003.09.022.
- Regal, P., Díaz-Bao, M., Barreiro, R., Cepeda, A., & Fente, C. (2012). Application of molecularly imprinted polymers in food analysis: clean-up and chromatographic improvements. *Open Chemistry*, 10(3), 766-784. doi: 10.2478/s11532-012-0016-3.
- Regazzoni, L., Arlandini, E., Garzon, D., Santagati, N. A., Beretta, G., & Facino, R. M. (2013). A rapid profiling of gallotannins and flavonoids of the aqueous extract of *Rhus coriaria* L. by flow injection analysis with high-resolution mass spectrometry assisted with database searching. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 72, 202-207. doi: 10.1016/j.jpba.2012.08.017.
- Renedo, O. D., Alonso-Lomillo, M. A., & Martinez, M. J. A. (2007). Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. *Talanta*, 73(2), 202-219. doi: 10.1016/j.talanta.2007.03.050.
- Rezaei, B., Khayamian, T., & Mokhtari, A. (2009). Simultaneous Determination of codeine and noscapine by flow-injection chemiluminescence method using N-PLS regression. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49(2), 234-239. doi: 10.1016/j.jpba.2008.10.036.
- Ribeiro, M., Silveira, D., & Ferreira-Dias, S. (2002). Selective adsorption of limonin and naringin from orange juice to natural and synthetic adsorbents. *Eur Food Res Technol*, 215, 462-471. doi: 10.1007/s00217-002-0592-0.

- Robards, K. (2003). Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1000(1-2), 657-691. doi: 10.1016/s0021-9673(03)00058-x.
- Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(10), 2866-2887. doi: 10.1021/jf026182t.
- Rodríguez Montoro, O. (2013). Estudio espectroscópico de la formación de análogos de resinas fósiles. *Universidad Complutense de Madrid*.
- Rodríguez-Ramiro, I., Ramos, S., López-Oliva, E., Agis-Torres, A., Gómez-Juaristi, M., Mateos, R., . . . Martín, M. A. (2011). Cocoa-rich diet prevents azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in rats by restraining oxidative stress and cell proliferation and inducing apoptosis. *Molecular nutrition & food research*, 55(12), 1895-1899. doi: 10.1002/mnfr.201100363.
- Román, G. C., Jackson, R. E., Reis, J., Román, A. N., Toledo, J. B., & Toledo, E. (2019). Extra-virgin olive oil for potential prevention of Alzheimer disease. *RevueNeurologique*, 175(10), 705-723. doi: 10.1016/j.neurol.2019.07.017.
- Rosa, L. N., Coqueiro, A., Março, P. H., & Valderrama, P. (2018). Thermal rice oil degradation evaluated by UV-Vis-NIR and PARAFAC. *Food Chemistry*. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.03.065.
- Roura, E., Almajano, M. P., Bilbao, M. L. M., Andres-Lacueva, C., Estruch, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (2007). Human urine: Epicatechin metabolites and antioxidant activity after cocoa beverage intake. *Free Radical Research*, 41(8), 943-949. doi: 10.1080/10715760701435236.
- Routray, W., & Orsat, V. (2012). Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2), 409-424. doi: 10.1007/s11947-011-0573-z.
- Rubio, L., Sarabia, L. A., & Ortiz, M. C. (2015). Standard addition method based on four-way PARAFAC decomposition to solve the matrix interferences in the determination of carbamate pesticides in lettuce using excitation–emission fluorescence data. *Talanta*, 138, 86-99. doi: 10.1016/j.talanta.2015.01.042.

-
- Russo, G. L., Tedesco, I., Spagnuolo, C., & Russo, M. (2017). Antioxidant polyphenols in cancer treatment: Friend, foe or foil? *Seminars in Cancer Biology*, *46*, 1-13. doi: 10.1016/j.semcan.2017.05.005.
- Russo, M., Spagnuolo, C., Tedesco, I., Bilotto, S., & Russo, G. L. (2012). The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. *Biochemical pharmacology*, *83*(1), 6-15. doi: 10.1016/j.bcp.2011.08.010.
- Rutkowska, M., Płotka-Wasyłka, J., Morrison, C., Wieczorek, P. P., Namieśnik, J., & Marć, M. (2018). Application of molecularly imprinted polymers in analytical chiral separations and analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *102*, 91-102. doi: 10.1016/j.trac.2018.01.011.
- Saeed, M., Naveed, M., Arif, M., Kakar, M. U., Manzoor, R., Abd E-H., Mohamed E., . . . Sun, C. (2017). Green tea (*Camellia sinensis*) and l-theanine: Medicinal values and beneficial applications in humans—A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *95*, 1260-1275. doi: 10.1016/j.biopha.2017.09.024.
- Sahebkar, A., Ferri, C., Giorgini, P., Bo, S., Nachtigal, P., & Grassi, D. (2017). Effects of pomegranate juice on blood pressure: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacological Research*, *115*, 149-161. doi: 10.1016/j.phrs.2016.11.018.
- Saija, A., Scalese, M., Lanza, M., Marzullo, D., Bonina, F., & Castelli, F. (1995). Flavonoids as antioxidant agents: Importance of their interaction with biomembranes. *Free Radical Biology and Medicine*, *19*(4), 481-486. doi: 10.1016/0891-5849(94)00240-K.
- Sajjadi, S. M., Abdollahi, H., Rahmanian, R., & Bagheri, L. (2016). Quantifying aflatoxins in peanuts using fluorescence spectroscopy coupled with multi-way methods: Resurrecting second-order advantage in excitation–emission matrices with rank overlap problem. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *156*, 63-69. doi: 10.1016/j.saa.2015.11.022.
- Saldanha, A. A., de Siqueira, J. M., Castro, A. Hortência F., de Azambuja Ribeiro, R. I. M., de Oliveira, F. M., de Oliveira Lopes, D., . . . Soares, A. C. (2016). Anti-inflammatory effects of the butanolic fraction of *Byrsonima verbascifolia* leaves: Mechanisms involving inhibition of

- tumor necrosis factor alpha, prostaglandin E2 production and migration of polymorphonuclear leucocyte in vivo experimentation. *International Immunopharmacology*, 31, 123-131. doi: 10.1016/j.intimp.2015.12.031.
- Salmi, Z., Benmehdi, H., Lamouri, A., Decorse, P., Jouini, M., Yagci, Y., & Chehimi, M. M. (2013). Preparation of MIP grafts for quercetin by tandem aryl diazonium surface chemistry and photopolymerization. *Microchimica Acta*, 180(15-16), 1411-1419. doi: 10.1007/s00604-013-0993-8.
- Samah, N. A., Sánchez-Martín, M. J., Sebastián, R. M., Valiente, M., & López-Mesas, M. (2018). Molecularly imprinted polymer for the removal of diclofenac from water: Synthesis and characterization. *Science of The Total Environment*, 631-632, 1534-1543. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.03.087.
- Sánchez-Barragán, I., Karim, K., Costa-Fernández, J. M., Piletsky, S. A., & Sanz-Medel, A. (2007). A molecularly imprinted polymer for carbaryl determination in water. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 123(2), 798-804. doi: 10.1016/j.snb.2006.10.026.
- Sánchez-Patán, F., Cueva, C., Monagas, M., Walton, G. E., Gibson, G. R., Martín-Álvarez, P. J., . . . Bartolomé, B. (2012). Gut microbial catabolism of grape seed flavan-3-ols by human faecal microbiota. Targetted analysis of precursor compounds, intermediate metabolites and end-products. *Food Chemistry*, 131(1), 337-347. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.08.011.
- Sánchez-Patán, F., Monagas, M., Moreno-Arribas, M. V., & Bartolome, B. (2011). Determination of Microbial Phenolic Acids in Human Faeces by UPLC-ESI-TQ MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2241-2247. doi: 10.1021/jf104574z.
- Santhakumar, A. B., Battino, M., & Alvarez-Suarez, J. M. (2018). Dietary polyphenols: Structures, bioavailability and protective effects against atherosclerosis. *Food and Chemical Toxicology*, 113, 49-65. doi: 10.1016/j.fct.2018.01.022.
- Sasot, G., Martinez-Huelamo, M., Vallverdu-Queralt, A., Mercader-Marti, M., Estruch, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (2017). Identification of

- phenolic metabolites in human urine after the intake of a functional food made from grape extract by a high resolution LTQ-Orbitrap-MS approach. *Food Research International*, 100, 435-444. doi: 10.1016/j.foodres.2017.01.020.
- Saura-Calixto, F., & Díaz-Rubio, M. E. (2007). Polyphenols associated with dietary fibre in wine: A wine Polyphenols gap?. *Food Research International*, 40(5), 613-619. doi: 10.1016/j.foodres.2006.11.005.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., & Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101(2), 492-501. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.02.006.
- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition*, 130(8), 2073S-2085S. doi: 10.1093/jn/130.8.2073S.
- Schroeter, H., Heiss, C., Balzer, J., Kleinbongard, P., Keen, C. L., Hollenberg, N. K., . . . Kelm, M. (2006). (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(4), 1024-1029. doi: 10.1073/pnas.0510168103.
- Schwarz, L. J., Danylec, B., Harris, S. J., Boysen, R. I., & Hearn, M. T. W. (2011). Preparation of molecularly imprinted polymers for the selective recognition of the bioactive polyphenol, (E)-resveratrol. *Journal of Chromatography A*, 1218(16), 2189-2195. doi: 10.1016/j.chroma.2011.02.043.
- Sellergren, B., & Andersson, L. (1990). Molecular recognition in macroporous polymers prepared by a substrate analog imprinting strategy. *The Journal of Organic Chemistry*, 55(10), 3381-3383. doi: 10.1021/jo00297a074.
- Sellergren, B. (2001). Imprinted chiral stationary phases in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 906(1-2), 227-252. doi: 10.1016/S0021-9673(00)00929-8.
- Sellergren, B., & Allender, C. J. (2005). Molecularly imprinted polymers: A bridge to advanced drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(12), 1733-1741. doi: 10.1016/j.addr.2005.07.010.

- Sena, M. M., Fernandes, J. C. B., Rover, Laércio, P., Ronei J., & Kubota, L. T. (2000). Application of two- and three-way chemometric methods in the study of acetylsalicylic acid and ascorbic acid mixtures using ultraviolet spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*, *409*(1), 159-170. doi: 10.1016/S0003-2670(00)00707-8.
- Serrano, M., Bartolomé, M., Bravo, J. C., Paniagua, G., Gañan, J., Gallego-Picó, Al., & Garcinuño, R. M. (2017). On-line flow injection molecularly imprinted solid phase extraction for the preconcentration and determination of 1-hydroxypyrene in urine samples. *Talanta*, *166*, 375-382. doi: 10.1016/j.talanta.2016.01.048.
- Shaheen, N., Lu, Y., Geng, P., Shao, Q., & Wei, Y. (2017). Isolation of four phenolic compounds from *Mangifera indica* L. flowers by using normal phase combined with elution extrusion two-step high speed countercurrent chromatography. *Journal of Chromatography B*, *1046*, 211-217. doi: 10.1016/j.jchromb.2017.01.018.
- Shamsipur, M., Fasihi, J., & Ashtari, K. (2007). Grafting of ion-imprinted polymers on the surface of silica gel particles through covalently surface-bound initiators: a selective sorbent for uranyl ion. *Analytical chemistry*, *79*(18), 7116-7123. doi: 10.1021/ac070968e.
- Shan, J. J., & Wang, B. (2011). Preparation of quercetin-Cu(II) complex molecularly imprinted polymer and its binding characteristics. *Acta Polymerica Sinica*(1), 100-106. doi: 10.3724/sp.j.1105.2011.10012.
- Shao, Y., & Bao, J. (2015). Polyphenols in whole rice grain: Genetic diversity and health benefits. *Food Chemistry*, *180*, 86-97. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.02.027.
- Sharma, A., Joshi, N., Kumar, R. A., Agrawal, P. K., & Prasad, S. (2017). High performance liquid chromatographic analysis of phenolic compounds and their antioxidant properties from different cultivars of *Cyamopsis tetragonaloba* (L.) Taub. *Microchemical Journal*, *133*, 622-628. doi: 10.1016/j.microc.2017.04.020.
- Sharma, P. S., Lakshmi, D., & Prasad, B. B. (2007). Molecularly imprinted solid-phase extraction combined with molecularly imprinted polymer-sensor: a diagnostic tool applicable to creatine deficiency syndrome. *Biomedical Chromatography*, *21*(9), 976-986. doi: 10.1002/bmc.842.

- Shen, C-L., Yeh, J. K., Cao, J. J., Chyu, M-C., & Wang, J-S. (2011). Green tea and bone health: Evidence from laboratory studies. *Pharmacological Research*, 64(2), 155-161. doi: 10.1016/j.phrs.2011.03.012.
- Shi, S. Y., Guo, J. F., You, Q. P., Chen, X. Q., & Zhang, Y. P. (2014). Selective and simultaneous extraction and determination of hydroxybenzoic acids in aqueous solution by magnetic molecularly imprinted polymers. *Chemical Engineering Journal*, 243, 485-493. doi: 10.1016/j.cej.2014.01.035.
- Sibrian-Vazquez, M., & Spivak, D. A. (2004). Molecular imprinting made easy. *Journal of the American Chemical Society*, 126(25), 7827-7833. doi: 10.1021/ja038961b.
- Silva, L. B. A. R., Pinheiro-Castro, N., Novaes, G. M., Pascoal, G. de F. L., & Ong, T. P. (2019). Bioactive food compounds, epigenetics and chronic disease prevention: Focus on early-life interventions with polyphenols. *Food Research International*, 125, 108646. doi: 10.1016/j.foodres.2019.108646.
- Simpson, J. V., Burke, M., & Jiji, R. D. (2011). Application of EEM fluorescence in combination with PARAFAC analysis to simultaneously monitor quercetin in its deprotonated, aggregated, and protein bound states. *Journal of Chemometrics*, 25(3), 101-108. doi: 10.1002/cem.1325.
- Sims, M. J., Li, Q., Kachoosangi, R. T., Wildgoose, G. G., & Compton, R. G. (2009). Using multiwalled carbon nanotube modified electrodes for the adsorptive stripping voltammetric determination of hesperidin. *Electrochimica Acta*, 54(22), 5030-5034. doi: 10.1016/j.electacta.2008.10.056.
- Singh, A., Demont, A., Actis-Goretta, L., Holvoet, S., Lévêques, A., Lepage, M., . . . Mercenier, A. (2014). Identification of epicatechin as one of the key bioactive constituents of polyphenol-enriched extracts that demonstrate an anti-allergic effect in a murine model of food allergy. *British journal of nutrition*, 112(3), 358-368. doi: 10.1017/S0007114514000877.
- Singleton, V. L. (1981). Naturally Occurring Food Toxicants: Phenolic Substances of Plant Origin Common in Foods. In C. O. Chichester, E. M. Mrak & G. F. Stewart (Eds.), *Advances in Food Research* (Vol. 27,

- pp. 149-242): Academic Press. doi: 10.1016/S0065-2628(08)60299-2.
- Smoliga, James M., Baur, J. A., & Hausenblas, H. A. (2011). Resveratrol and health—a comprehensive review of human clinical trials. *Molecular nutrition & food research*, 55(8), 1129-1141. doi: 10.1002/mnfr.201100143.
- So, J., Pang, C., Dong, H., Jang, P., Juhyok, U., Ri, K., & Yun, C. (2018). Adsorption of 1-naphthyl methyl carbamate in water by utilizing a surface molecularly imprinted polymer. *Chemical Physics Letters*, 699, 199-207. doi: 10.1016/j.cplett.2018.03.059.
- Sökmen, M., Demir, E., & Alomar, S. Y. (2018). Optimization of sequential supercritical fluid extraction (SFE) of caffeine and catechins from green tea. *The Journal of Supercritical Fluids*, 133, 171-176. doi: 10.1016/j.supflu.2017.09.027.
- Solaguren-Beascoa F. M. (2018). MATLAB implementation for evaluation of measurements by the generalized method of least squares. *Measurement*, 114, 218-225. doi: 10.1016/j.measurement.2017.09.039.
- Solanki, R. B., Kulkarni, Harshavardhan D., Singh, Suneet, Verma, A. K., & Varde, P. V. (2018). Optimization of regression model using principal component regression method in passive system reliability assessment. *Progress in Nuclear Energy*, 103, 126-134. doi: 10.1016/j.pnucene.2017.11.012.
- Song, J. F., He, P., & Guo, W. (2002). Study on the polarographic catalytic wave of vitamin P in the presence of persulfate and its application. *Analytical Biochemistry*, 304(2), 212-219. doi: 10.1006/abio.2001.5605.
- Song, X. L., Li, J. H., Wang, J. T., & Chen, L. X. (2009). Quercetin molecularly imprinted polymers: Preparation, recognition characteristics and properties as sorbent for solid-phase extraction. *Talanta*, 80(2), 694-702. doi: 10.1016/j.talanta.2009.07.051.
- Sönmez, U., Sönmez, A., Erbil, G., Tekmen, I., & Baykara, B. (2007). Neuroprotective effects of resveratrol against traumatic brain injury in

- immature rats. *Neuroscience letters*, 420(2), 133-137. doi: 10.1016/j.neulet.2007.04.070.
- Sophocleous, M., & Atkinson, J. K. (2017). A review of screen-printed silver/silver chloride (Ag/AgCl) reference electrodes potentially suitable for environmental potentiometric sensors. *Sensors and Actuators a-Physical*, 267, 106-120. doi: 10.1016/j.sna.2017.10.013.
- Sosa Gómez, V. R. (2015). Aplicación de técnicas voltamperométricas con electrodos serigrafiados a la especiación de metales pesados en muestras naturales., *Universitat de Barcelona*. URI: 2445/66124.
- Sousa, E. S., Pinto, L., & de Araujo, M. C. U. (2017). A chemometric cleanup using multivariate curve resolution in liquid chromatography: Quantification of pesticide residues in vegetables. *Microchemical Journal*, 134, 131-139. doi: 10.1016/j.microc.2017.05.017.
- Sousa, W. R., da Rocha, C., Cardoso, C. L., Silva, D. H. S., & Zanoni, M. V. B. (2004). Determination of the relative contribution of phenolic antioxidants in orange juice by voltammetric methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17(5), 619-633. doi: 10.1016/j.jfca.2003.09.013.
- Speltini, A., Scalabrini, A., Maraschi, F., Sturini, M., & Profumo, A. (2017). Newest applications of molecularly imprinted polymers for extraction of contaminants from environmental and food matrices: A review. *Analytica Chimica Acta*, 974, 1-26. doi: 10.1016/j.aca.2017.04.042.
- Spencer, J. P. E., Chaudry, F., Pannala, A. S., Srai, S. K., Debnam, E., & Rice-Evans, C. (2000). Decomposition of Cocoa Procyanidins in the Gastric Milieu. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 272(1), 236-241. doi: 10.1006/bbrc.2000.2749.
- Sridevi, G., Srividya, S., Sembulingam, K., & Sembulingam, Prema. (2018). An evaluation of invitro and invivo free radical scavenging and antioxidant potential of ethanolic extract of perularia daemia. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. doi: 10.1016/j.bcab.2018.05.007.
- Srividhya, R., Jyothilakshmi, V., Arulmathi, K., Senthilkumaran, V., & Kalaiselvi, P. (2008). Attenuation of senescence-induced oxidative exacerbations in aged rat brain by (-)-epigallocatechin-3-gallate.

- International Journal of Developmental Neuroscience*, 26(2), 217-223. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2007.12.003.
- Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30(18), 3268-3295. doi: 10.1002/jssc.200700261.
- Steiakaki, M. A., Chatzidakis, G., Kefalopoufos, D., & Ververidis, F. (2008). An insight into the recognition mechanisms of Molecularly Imprinted Polymers (MIPs) for flavonoids quercetin, kaempferol and hydroxytyrosol. *Planta Medica*, 74(9), 1152-1152. doi: 10.1055/s-0028-1084774.
- Stervbo, U., Vang, O., & Bonnesen, C. (2007). A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chemistry*, 101(2), 449-457. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.01.047.
- Sugita, M., Kapoor, M. P., Nishimura, A., & Okubo, T. (2016). Influence of green tea catechins on oxidative stress metabolites at rest and during exercise in healthy humans. *Nutrition*, 32(3), 321-331. doi: 10.1016/j.nut.2015.09.005.
- Sun, B. W., Li, Y. Z., & Chang, W. B. (2001). Molecularly imprinted polymer using p-hydroxybenzoic acid, p-hydroxyphenylacetic acid and p-hydroxyphenylpropionic acid as templates. *Journal of Molecular Recognition*, 14(6), 388-392. doi: 10.1002/jmr.550.
- Sun, S., Zhang, M. Q., Li, Y. J., & He, X. W. (2013). A Molecularly Imprinted Polymer with Incorporated Graphene Oxide for Electrochemical Determination of Quercetin. *Sensors*, 13(5), 5493-5506. doi: 10.3390/s130505493.
- Sytar, O., Hemmerich, I., Zivcak, M., Rauh, C., & Brestic, M. (2018). Comparative analysis of bioactive phenolic compounds composition from 26 medicinal plants. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(4), 631-641. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.01.036.
- Szewczyk, K., & Olech, M. (2017). Optimization of extraction method for LC-MS based determination of phenolic acid profiles in different *Impatiens* species. *Phytochemistry Letters*, 20, 322-330. doi: 10.1016/j.phytol.2017.02.005.

- Takeuchi, T., Mukawa, T., & Asanuma, H. (2003). *Molecular Imprinting. From fundamentals to Applications*: Wiley-VCH: Weinheim, Germany. ISBN: 978-3-527-30569-8.
- Taleat, Z., Khoshroo, A., & Mazloum-Ardakani, M. (2014). Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008–2013). *Microchimica Acta*, *181*(9), 865-891. doi: 10.1007/s00604-014-1181-1.
- Taleb, A., Ahmad, K. A., Ihsan, A. U., Qu, J., Lin, N., Hezam, K., . . . Qilong, D. (2018). Antioxidant effects and mechanism of silymarin in oxidative stress induced cardiovascular diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *102*, 689-698. doi: 10.1016/j.biopha.2018.03.140.
- Tang, Y., Gao, J., Liu, X., Gao, X., Ma, T., Lu, X., & Li, J. (2017). Ultrasensitive detection of clenbuterol by a covalent imprinted polymer as a biomimetic antibody. *Food Chemistry*, *228*, 62-69. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.01.102.
- Tao, C., Nichols, T. E., Hua, X., Ching, C. R. K., Rolls, E. T., Thompson, P. M., & Feng, J. (2017). Generalized reduced rank latent factor regression for high dimensional tensor fields, and neuroimaging-genetic applications. *NeuroImage*, *144*, 35-57. doi: 10.1016/j.neuroimage.2016.08.027.
- Tashakkori, P., Erdem, P., & Bozkurt, S. S. (2017). Molecularly imprinted polymer based on magnetic ionic liquid for solid-phase extraction of phenolic acids. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, *40*(13), 657-666. doi: 10.1080/10826076.2017.1343732.
- Tasselli, F., Donato, L., & Drioli, E. (2008). Evaluation of molecularly imprinted membranes based on different acrylic copolymers. *Journal of Membrane Science*, *320*(1-2), 167-172. doi: 10.1016/j.memsci.2008.03.071.
- Terao, J. (2017). Factors modulating bioavailability of quercetin-related flavonoids and the consequences of their vascular function. *Biochemical Pharmacology*, *139*, 15-23. doi: 10.1016/j.bcp.2017.03.021.
- Tesarova, E., Baldrianova, L., Hocevar, S. B., Svancara, I., Vytras, K., & Ogorevc, B. (2009). Anodic stripping voltammetric measurement of

- trace heavy metals at antimony film carbon paste electrode. *Electrochimica Acta*, *54*(5), 1506-1510. doi: 10.1016/j.electacta.2008.09.030.
- Thevenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., & Wilson, G. S. (2001a). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors & Bioelectronics*, *16*(1-2), 121-131. doi: 10.1351/pac199971122333.
- Thevenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., & Wilson, G. S. (2001b). Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Analytical Letters*, *34*(5), 635-659. doi: 10.1081/al-100103209.
- Thommes, M., Kaneko, K., Neimark, A. V., Olivier, J. P., Rodriguez-Reinoso, F., Rouquerol, J., & Sing, K. S-W. (2015). Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, *87*(9-10), 1051-1069. doi: 10.1515/pac-2014-1117.
- Tian, X., Liu, Y., Feng, X., Khaskheli, A. A., Xiang, Y., & Huang, W. (2018). The effects of alcohol fermentation on the extraction of antioxidant compounds and flavonoids of pomelo peel. *LWT*, *89*, 763-769. doi: 10.1016/j.lwt.2017.11.049.
- Tohma, H., Gulcin, I., Bursal, E., Goren, A. C., Alwasel, S. H., & Koksal, E. (2017). Antioxidant activity and phenolic compounds of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) determined by HPLC-MS/MS. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *11*(2), 556-566. doi: 10.1007/s11694-016-9423-z.
- Tokuyama, H., Naohara, S., Fujioka, M., & Sakohara, S. (2008). Preparation of molecular imprinted thermosensitive gels grafted onto polypropylene by plasma-initiated graft polymerization. *Reactive and Functional Polymers*, *68*(1), 182-188. doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2007.09.010.
- Tomás-Barberán, F. A., & Espin, J. C. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *81*(9), 853-876. doi: 10.1002/jsfa.885.

- Thomas, E. V., & Haaland, D. M. (1990). Comparison of multivariate calibration methods for quantitative spectral analysis. *Analytical Chemistry*, 62(10), 1091-1099. doi: 10.1021/ac00209a024.
- Tresserra-Rimbau, A., Medina-Remón, A., Pérez-Jiménez, J., Martínez-González, M. A., Covas, M. I., Corella, D., . . . Lamuela-Raventós, R. M. (2013). Dietary intake and major food sources of polyphenols in a Spanish population at high cardiovascular risk: The PREDIMED study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 23(10), 953-959. doi: 10.1016/j.numecd.2012.10.008.
- Trojanowicz, M. (2014). Enantioselective electrochemical sensors and biosensors: A mini-review. *Electrochemistry Communications*, 38, 47-52. doi: 10.1016/j.elecom.2013.10.034.
- Tudorache, M., & Bala, C. (2007). Biosensors based on screen-printing technology, and their applications in environmental and food analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388(3), 565-578. doi: 10.1007/s00216-007-1293-0.
- Tura, D., & Robards, K. (2002). Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. *Journal of Chromatography A*, 975(1), 71-93. doi: 10.1016/s0021-9673(02)00879-8.
- Turiel, E., & Martín-Esteban, A. (2010). Molecularly imprinted polymers for sample preparation: A review. *Analytica Chimica Acta*, 668(2), 87-99. doi: 10.1016/j.aca.2010.04.019.
- Turiel, E., & Martín-Esteban, A. (2005). Molecular imprinting technology in capillary electrochromatography. *Journal of separation science*, 28(8), 719-728. doi: 10.1002/jssc.200400076.
- Turnbull, J. J., Nakajima, J-I., Welford, R. W-D, Yamazaki, M., Saito, K., & Schofield, C. J. (2004). Mechanistic studies on three 2-oxoglutarate-dependent oxygenases of flavonoid biosynthesis anthocyanidin synthase, flavonol synthase, and flavanone 3 β -hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(2), 1206-1216. doi: 10.1074/jbc.M309228200.
- Ulaszewska, M. M., Trost, K., Stanstrup, J., Tuohy, K. M., Franceschi, P., Chong, M. F-F., . . . Mattivi, F. (2016). Urinary metabolomic profiling

- to identify biomarkers of a flavonoid-rich and flavonoid-poor fruits and vegetables diet in adults: the FLAVURS trial. *Metabolomics*, 12(2), 32. doi: 10.1007/s11306-015-0935-z.
- Urpi-Sarda, M., Monagas, M., Khan, N., Lamuela-Raventos, R. M., Santos-Buelga, C., Sacanella, E., . . . Andres-Lacueva, C. (2009). Epicatechin, procyanidins, and phenolic microbial metabolites after cocoa intake in humans and rats. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 394(6), 1545-1556. doi: 10.1007/s00216-009-2676-1.
- Urpi-Sarda, M., Monagas, M., Khan, N., Llorach, R., Lamuela-Raventos, R. M., Jauregui, O., . . . Andres-Lacueva, C. (2009). Targeted metabolic profiling of phenolics in urine and plasma after regular consumption of cocoa by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(43), 7258-7267. doi: 10.1016/j.chroma.2009.07.058.
- Urpi-Sarda, M., Boto-Ordóñez, M., Queipo-Ortuño, M. I., Tulipani, S., Corella, D., Estruch, R., . . . Andres-Lacueva, C. (2015). Phenolic and microbial-targeted metabolomics to discovering and evaluating wine intake biomarkers in human urine and plasma. *Electrophoresis*, 36(18), 2259-2268. doi: 10.1002/elps.201400506.
- Vacek, J., Klejdus, B., Lojkova, L., & Kuban, V. (2008). Current trends in isolation, separation, determination and identification of isoflavones: A review. *Journal of Separation Science*, 31(11), 2054-2067. doi: 10.1002/jssc.200700569.
- Valentini, F., Romanazzo, D., Carbone, M., & Palleschi, G. (2012). Modified Screen-Printed Electrodes Based on Oxidized Graphene Nanoribbons for the Selective Electrochemical Detection of Several Molecules. *Electroanalysis*, 24(4), 872-881. doi: 10.1002/elan.201100415.
- Vallano, P. T., & Remcho, V. T. (2000). Highly selective separations by capillary electrochromatography: molecular imprint polymer sorbents. *Journal of Chromatography A*, 887(1-2), 125-135. doi: 10.1016/S0021-9673(99)01199-1.
- Veenuttranon, K., & Nguyen, L. T. (2018). Programmable electrochemical flow system for high throughput determination of total antioxidant capacity. *Talanta*, 186, 286-292. doi: 10.1016/j.talanta.2018.04.073.

-
- Vega-Gálvez, A., López, J., Torres-Ossandón, M. J., Galotto, M. J., Puente-Díaz, L., Quispe-Fuentes, I., & Di S. K. (2014). High hydrostatic pressure effect on chemical composition, color, phenolic acids and antioxidant capacity of Cape gooseberry pulp (*Physalis peruviana* L.). *LWT-Food Science and Technology*, *58*(2), 519-526. doi: 10.1016/j.lwt.2014.04.010.
- Vigneron, V., Kodewitz, A., da Costa, M. N., Tome, A. M., & Langlang, E. (2018). Non-negative sub-tensor ensemble factorization (NsTEF) algorithm. A new incremental tensor factorization for large data sets. *Signal Processing*, *144*, 77-86. doi: 10.1016/j.sigpro.2017.09.012.
- Vilas-Boas, A., Valderrama, P., Fontes, N., Geraldo, D., & Bento, F. (2019). Evaluation of total polyphenol content of wines by means of voltammetric techniques: Cyclic voltammetry vs differential pulse voltammetry. *Food Chemistry*, *276*, 719-725. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.10.078.
- Vlatakis, G., Andersson, L. I., Müller, R., & Mosbach, K. (1993). Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting. *Nature*, *361*(6413), 645. doi: 10.1038/361645a0.
- Volikakis, G. J., & Efstathiou, C. E. (2000). Determination of rutin and other flavonoids by flow-injection/adsorptive stripping voltammetry using nujol-graphite and diphenylether-graphite paste electrodes. *Talanta*, *51*(4), 775-785. doi: 10.1016/s0039-9140(99)00352-5.
- Volikakis, G. J., & Efstathiou, C. E. (2005). Fast screening of total flavonols in wines, tea-infusions and tomato juice by flow injection/adsorptive stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta*, *551*(1-2), 124-131. doi: 10.1016/j.aca.2005.07.019.
- Vovk, I., Simonovska, B., Andrenšek, S., Vuorela, H., & Vuorela, P. (2003). Rotation planar extraction and rotation planar chromatography of oak (*Quercus robur* L.) bark. *Journal of Chromatography A*, *991*(2), 267-274. doi: 10.1016/S0021-9673(03)00271-1.
- Wach, A., Pyrzyńska, K., & Biesaga, M. (2007). Quercetin content in some food and herbal samples. *Food chemistry*, *100*(2), 699-704. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.10.028.

- Wang, J., Tian, B. M., Nascimento, V. B., & Angnes, L. (1998). Performance of screen-printed carbon electrodes fabricated from different carbon inks. *Electrochimica Acta*, *43*(23), 3459-3465. doi: 10.1016/s0013-4686(98)00092-9.
- Wan, L., & Jiang, J.-G. (2018). Protective effects of plant-derived flavonoids on hepatic injury. *Journal of Functional Foods*, *44*, 283-291. doi: 10.1016/j.jff.2018.03.015.
- Wang, N., Zhou, X., & Cui, B. (2019). Synthesis of a polymeric imidazolium-embedded octadecyl ionic liquid-grafted silica sorbent for extraction of flavonoids. *Journal of Chromatography A*, *1606*, 460376. doi: 10.1016/j.chroma.2019.460376.
- Wang, T-Y., Li, Q., & Bi, K-S. (2018). Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *13*(1), 12-23. doi: 10.1016/j.ajps.2017.08.004.
- Wang, T., Chen, Y., Ma, J., Jin, Z., Chai, M., Xiao, X., . . . Zhang, Y. (2018). A polyethyleneimine-modified attapulgite as a novel solid support in matrix solid-phase dispersion for the extraction of cadmium traces in seafood products. *Talanta*, *180*, 254-259. doi: 10.1016/j.talanta.2017.12.059.
- Wang, X-Z., Liang, J.-Y., Wen, H-M., Shan, C-X., & Liu, R. (2014). Qualitative and quantitative analyses of bioactive secolignans from folk medicinal plant *Peperomia dindygulensis* using UHPLC-UV/Q-TOF-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *94*, 1-11. doi: 10.1016/j.jpba.2014.01.024.
- Wang, Y. J., & Wang, B. (2013). Preparation of Quercetin-Ni²⁺ Metal-complexing Imprinted Polymer and Its Recognition Performance Evaluation. In G. Li & C. Chen (Eds.), *Applied Mechanics and Materials I*, Pts 1-3 (Vol. 275-277, pp. 1697-1700). doi: 10.4028/www.scientific.net/AMM.275-277.1697.
- Wei, S., & Mizaikoff, B. (2007). Binding site characteristics of 17 β -estradiol imprinted polymers. *Biosensors and Bioelectronics*, *23*(2), 201-209. doi: 10.1016/j.bios.2007.03.031.
- Wei, X. D., Meng, Z. X., Ruiz, L., Xia, W. J., Lee, C., Kysar, J. W., . . . Espinosa, H. D. (2016). Recoverable Slippage Mechanism in Multilayer

- Graphene Leads to Repeatable Energy Dissipation. *Acs Nano*, *10*(2), 1820-1828. doi: 10.1021/acsnano.5b04939.
- Weiss, R., Molinelli, A., Jakusch, M., & Mizaikoff, B. (2001). Molecular imprinting and solid phase extraction of flavonoid compounds. *Bioseparation*, *10*(6), 379-387. doi: 10.1023/a:1021554106297.
- Weng, C-J., & Yen, G-C. (2012). Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: Phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer Treatment Reviews*, *38*(1), 76-87. doi: 10.1016/j.ctrv.2011.03.001.
- Whitcombe, M. J., Rodriguez, M. E., Villar, P., & Vulfson, E. N. (1995). A new method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting: synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol. *Journal of the American Chemical Society*, *117*(27), 7105-7111. doi: 10.1021/ja00132a010.
- Whitcombe, M.J., & Vulfson, E.N. (2001). Imprinted polymers. *Advanced Materials*, *13*(7), 467-478. doi: 10.1002/1521-4095(200104)13:7<467::AID-ADMA467>3.0.CO;2-T.
- Wiedemair, V., Ramoner, R., & Huck, C. W. (2019). Investigations into the total antioxidant capacities of cultivars of gluten-free grains using near-infrared spectroscopy. *Food Control*, *95*, 189-195. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.07.045.
- Williams, R. J., Spencer, J. P. E., & Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology and Medicine*, *36*(7), 838-849. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.001.
- Williamson, G., Kay, C. D., & Crozier, A. (2018). The Bioavailability, Transport, and Bioactivity of Dietary Flavonoids: A Review from a Historical Perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *17*(5), 1054-1112. doi: 10.1111/1541-4337.12351.
- Wilson, I. D., & Brinkman, U. A. Th. (2003). Hyphenation and hypernation: The practice and prospects of multiple hyphenation. *Journal of Chromatography A*, *1000*(1), 325-356. doi: 10.1016/S0021-9673(03)00504-1.

- Winklhofer-Roob, B. M., Faustmann, G., & Roob, J. M. (2017). Low-density lipoprotein oxidation biomarkers in human health and disease and effects of bioactive compounds. *Free Radical Biology and Medicine*, *111*, 38-86. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.345.
- Wittemer, S. M., Ploch, M., Windeck, T., Müller, S. C., Drewelow, B., Derendorf, H., & Veit, M. (2005). Bioavailability and pharmacokinetics of caffeoylquinic acids and flavonoids after oral administration of Artichoke leaf extracts in humans. *Phytomedicine*, *12*(1), 28-38. doi: 10.1016/j.phymed.2003.11.002.
- Włodarska, K., Pawlak-Lemańska, K., Khmelinskii, I., & Sikorska, E. (2017). Multivariate curve resolution – Alternating least squares analysis of the total synchronous fluorescence spectra: An attempt to identify polyphenols contribution to the emission of apple juices. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, *164*, 94-102. doi: 10.1016/j.chemolab.2017.02.011.
- Wolfender, J-L., Ndjoko, K., & Hostettmann, K. (2003). Liquid chromatography with ultraviolet absorbance–mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectrometry: a powerful combination for the on-line structural investigation of plant metabolites. *Journal of Chromatography A*, *1000*(1), 437-455. doi: 10.1016/S0021-9673(03)00303-0.
- Wu, C. C., Wu, R. G., Huang, J. G., Lin, Y. C., & Chang, H. C. (2003). Three-electrode electrochemical detector and platinum film decoupler integrated with a capillary electrophoresis microchip for amperometric detection. *Analytical Chemistry*, *75*(4), 947-952. doi: 10.1021/ac025912t.
- Wu, J., Xiao, D., Zhao, H., He, H., Peng, J., Wang, C., . . . He, J. (2015). A nanocomposite consisting of graphene oxide and Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for the extraction of flavonoids from tea, wine and urine samples. *Microchimica Acta*, *182*(13), 2299-2306. doi: 10.1007/s00604-015-1575-8.
- Wu, T., He, M., Zang, X., Zhou, Y., Qiu, T., Pan, S., & Xu, X. (2013). A structure–activity relationship study of flavonoids as inhibitors of *E. coli* by membrane interaction effect. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* -

- Biomembranes*, 1828(11), 2751-2756. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.07.029.
- Wulff, G. (1972). The use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemates. *Angew. Chem. Internat. Edit.*, 11(4), 341. doi: 10.4236/ajac.2019.105017.
- Wulff, G., Sarhan, A., & Zabrocki, K. (1973). Enzyme-analogue built polymers and their use for the resolution of racemates. *Tetrahedron Letters*, 14(44), 4329-4332. doi: 10.1016/S0040-4039(01)87213-0.
- Wulff, G., Vesper, W., Grobe-Einsler, R., & Sarhan, A. (1977). Enzyme-analogue built polymers, 4. On the synthesis of polymers containing chiral cavities and their use for the resolution of racemates. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 178(10), 2799-2816. doi: 10.1002/macp.1977.021781004.0.
- Wulff, G. (1995). Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates—a way towards artificial antibodies. *Angewandte Chemie International Edition*, 34(17), 1812-1832. doi: 10.1002/anie.199518121.
- Wulff, G. (2002). Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers. *Chemical reviews*, 102(1), 1-28. doi: 10.1021/cr980039a.
- Xia, Y. F., Zhang, J. H., Xu, Z. F., & Deng, X. M. (2015). Pycnogenol, a compound isolated from the bark of pinus maritime mill, attenuates ventilator-induced lung injury through inhibiting NF-kappa B-mediated inflammatory response. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(2), 1824-1833. PMID: PMC4402757.
- Xia, Y. Q., Guo, T. Y., Zhao, H. L., Song, M. D., Zhang, B. H., & Zhang, B. L. (2007). A novel solid phase for selective separation of flavonoid compounds. *Journal of Separation Science*, 30(9), 1300-1306. doi: 10.1002/jssc.200600376.
- Xiao, L., Liu, L., Guo, X., Zhang, S., Wang, J., Zhou, F., . . . Yao, P. (2017). Quercetin attenuates high fat diet-induced atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice: A critical role of NADPH oxidase. *Food and Chemical Toxicology*, 105, 22-33. doi: 10.1016/j.fct.2017.03.048.
- Xie, J. C., Zhu, L. L., Luo, H. P., Zhou, L., Li, C. X., & Xu, X. J. (2001). Direct extraction of specific pharmacophoric flavonoids from ginkgo leaves

- using a molecularly imprinted polymer for quercetin. *Journal of Chromatography A*, 934(1-2), 1-11. doi: 10.1016/s0021-9673(01)01294-8.
- Xie, J. C., Luo, H. P., Zhu, L. L., Zhou, L., Li, C. X., & Xu, X. J. (2001). Extracting active compounds from herbs using molecular imprinting technology. *Acta Physico-Chimica Sinica*, 17(7), 582-585. doi: 10.3866/pku.whxb20010702.
- Xie, J., Chen, L., Li, C., & Xu, X. (2003). Selective extraction of functional components derived from herb in plasma by using a molecularly imprinted polymer based on 2,2-bis(hydroxymethyl)butanol trimethacrylate. *Journal of Chromatography B*, 788 (2), 233-242. doi: 10.1016/S1570-0232(02)00796-1.
- Xie, L., Lee, S. G., Vance, T. M., Wang, Y., Kim, B., Lee, J-Y., . . . Bolling, B. W. (2016). Bioavailability of anthocyanins and colonic polyphenol metabolites following consumption of aronia berry extract. *Food Chemistry*, 211, 860-868. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.05.122.
- Xie, L-X., Wu, H-L., Fang, Y., Kang, C., Xiang, S-X., Zhu, L., . . . Yu, R-Q. (2015). Simultaneous determination of tyrosine and levodopa in human plasma using enzyme-induced excitation-emission-kinetic third-order calibration method. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 148, 9-19. doi: 10.1016/j.chemolab.2015.08.023.
- Xie, L., Su, H., Sun, C., Zheng, X., & Chen, W. (2018). Recent advances in understanding the anti-obesity activity of anthocyanins and their biosynthesis in microorganisms. *Trends in Food Science & Technology*, 72, 13-24. doi: 10.1016/j.tifs.2017.12.002.
- Xu, C-C., Wang, B., Pu, Y-Q., Tao, J-S., & Zhang, T. (2017). Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 15(10), 721-731. doi: 10.1016/S1875-5364(17)30103-6.
- Xu, J-J., Yang, R., Ye, L-H., Cao, J., Cao, W., Hu, S-S., & Peng, L-Q. (2016). Application of ionic liquids for elution of bioactive flavonoid glycosides from lime fruit by miniaturized matrix solid-phase dispersion. *Food Chemistry*, 204, 167-175. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.02.012.

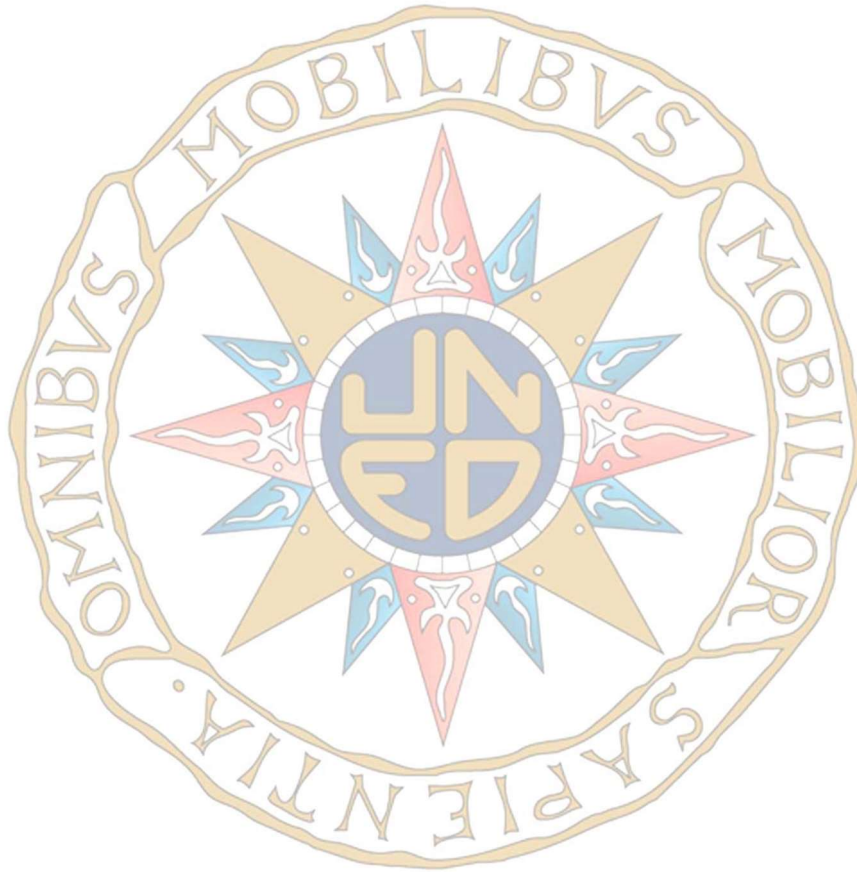
-
- Xu, L., & Spink, D. C. (2007). 1, 2-Dimethylimidazole-4-sulfonyl chloride, a novel derivatization reagent for the analysis of phenolic compounds by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry: Application to 1-hydroxypyrene in human urine. *Journal of chromatography B*, *855*(2), 159-165. doi: 10.1016/j.jchromb.2007.04.039.
- Yan, H. Y., & Row, K. H. (2006). Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer. *International Journal of Molecular Sciences*, *7*(5-6), 155-178. doi: 10.3390/i7050155.
- Yan, Y., Bo, X., & Guo, L. (2020). MOF-818 metal-organic framework-reduced graphene oxide/multiwalled carbon nanotubes composite for electrochemical sensitive detection of phenolic acids. *Talanta*, *218*, 121123. doi: 10.1016/j.talanta.2020.121123.
- Yang, R., Dong, G., Sun, X., Yang, Y., Yu, Y., Liu, H., & Zhang, W. (2018). Feasibility of the simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbons based on two-dimensional fluorescence correlation spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *190*, 342-346. doi: 10.1016/j.saa.2017.09.061.
- Yang, S. L., Li, G., Wang, G. F., Zhao, J. H., Qiao, Z. H., & Qu, L. B. (2015). Decoration of chemically reduced graphene oxide modified carbon paste electrode with yttrium hexacyanoferrate nanoparticles for nanomolar detection of rutin. *Sensors and Actuators B-Chemical*, *206*, 126-132. doi: 10.1016/j.snb.2014.09.027.
- Yao, Z., Yang, X., Liu, X., Yang, Y., Hu, Y., & Zhao, Z. (2018). Electrochemical quercetin sensor based on a nanocomposite consisting of magnetized reduced graphene oxide, silver nanoparticles and a molecularly imprinted polymer on a screen-printed electrode. *Microchimica Acta*, *185*(1). doi: 10.1007/s00604-017-2613-5.
- Yasui, T., Ideno, Y., Onizuka, Y., Nakajima-Shimada, J., Lee, J-S., Shinozaki, H., . . . Hayashi, Kunihiko. (2019). The association of urinary estrogen levels with urinary isoflavone levels: Difference between premenopausal women and postmenopausal women. *Maturitas*, *121*, 41-47. doi: 10.1016/j.maturitas.2018.12.010.

- Ye, H., & Shaw, I. C. (2019). Food flavonoid ligand structure/estrogen receptor- α affinity relationships – toxicity or food functionality? *Food and Chemical Toxicology*, 129, 328-336. doi: 10.1016/j.fct.2019.04.008.
- Ye, L., Cormack, P. AG., & Mosbach, K. (2001). Molecular imprinting on microgel spheres. *Analytica Chimica Acta*, 435(1), 187-196. doi: 10.1016/S0003-2670(00)01248-4.
- Ye, L., & Mosbach, K. (2001). Molecularly imprinted microspheres as antibody binding mimics. *Reactive and Functional Polymers*, 48(1-3), 149-157. doi: 10.1016/S1381-5148(01)00050-5.
- Ye, Y., Ji, J., Sun, Z., Shen, P., & Sun, X. (2020). Recent advances in electrochemical biosensors for antioxidant analysis in foodstuff. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 122, 115718. doi: 10.1016/j.trac.2019.115718.
- Yin, L., Han, H., Zheng, X., Wang, G., Li, Y., & Wang, W. (2019). Flavonoids analysis and antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of crude and purified extracts from *Veronicastrum latifolium*. *Industrial Crops and Products*, 137, 652-661. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.04.007.
- Yin, S-T., Tang, M-L., Su, L., Chen, L., Hu, P., Wang, H-L., . . . Ruan, D-Y. (2008). Effects of Epigallocatechin-3-gallate on lead-induced oxidative damage. *Toxicology*, 249(1), 45-54. doi: 10.1016/j.tox.2008.04.006.
- Youdim, K. A., Qaiser, M. Z., Begley, D. J., Rice-Evans, C. A., & Abbott, N. J. (2004). Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(5), 592-604. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.023.
- Yun, Y-H., Wang, W-T., Deng, B-C., Lai, G-B., Liu, X-B., Ren, D-B., . . . Xu, Q-S. (2015). Using variable combination population analysis for variable selection in multivariate calibration. *Analytica Chimica Acta*, 862, 14-23. doi: 10.1016/j.aca.2014.12.048.
- Zafrilla, P., Ferreres, F., & Tomás-Barberán, F. A. (2001). Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3651-3655. doi: 10.1021/jf010192x.

-
- Zamora-Ros, R., Urpi-Sarda, M., Lamuela-Raventos, R. M., Estruch, R., Martinez-Gonzalez, M. A., Bullo, M., . . . Andres-Lacueva, C. (2009). Resveratrol metabolites in urine as a biomarker of wine intake in free-living subjects: The PREDIMED Study. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(12), 1562-1566. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.12.023.
- Zamora-Ros, R., Forouhi, N. G., Sharp, S. J., González, C. A., Buijsse, B., Guevara, M., . . . Bredsdorff, L. (2013). The association between dietary flavonoid and lignan intakes and incident type 2 diabetes in European populations: the EPIC-InterAct study. *Diabetes care*, 36(12), 3961-3970. doi: 10.2337/dc13-0877.
- Zamora-Ros, R., Touillaud, M., Rothwell, J. A., Romieu, I., & Scalbert, A. (2014). Measuring exposure to the polyphenol metabolome in observational epidemiologic studies: current tools and applications and their limits. *The American journal of clinical nutrition*, 100(1), 11-26. doi: 10.3945/ajcn.113.077743.
- Zanotti, I., Dall'Asta, M., Mena, P., Mele, L., Bruni, R., Ray, S., & Del Rio, D. (2015). Atheroprotective effects of (poly) phenols: a focus on cell cholesterol metabolism. *Food & function*, 6(1), 13-31. doi: 10.1039/C4FO00670D.
- Zeng, H., Wang, Y., Liu, X., Kong, J., & Nie, C. (2012). Preparation of molecular imprinted polymers using bi-functional monomer and bi-crosslinker for solid-phase extraction of rutin. *Talanta*, 93, 172-181. doi: 10.1016/j.talanta.2012.02.008.
- Zhang, H. F., Xu, L. F., & Zheng, J. B. (2007). Anodic voltammetric behavior of resveratrol and its electroanalytical determination in pharmaceutical dosage form and urine. *Talanta*, 71(1), 19-24. doi: 10.1016/j.talanta.2006.03.017.
- Zhang, J-W., Tan, L., Zhang, Y-Z., Zheng, G-C., Xia, Z-N., Wang, C-Z., . . . Yuan, C-S. (2019). Debitting of lemon juice using surface molecularly imprinted polymers and the utilization of limonin. *Journal of Chromatography B*, 1104, 205-211. doi: 10.1016/j.jchromb.2018.11.025.

- Zhang, M. H., Luypaert, J., Pierna, J. A. F., Xu, Q. S., & Massart, D. L. (2004). Determination of total antioxidant capacity in green tea by near-infrared spectroscopy and multivariate calibration. *Talanta*, *62*(1), 25-35. doi: 10.1016/s0039-9140(03)00397-7.
- Zhang, Q. Y., & Ye, M. (2009). Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-Cao (licorice). *Journal of Chromatography A*, *1216*(11), 1954-1969. doi: 10.1016/j.chroma.2008.07.072.
- Zhang, R., Khan, S. A., Chi, J., Wei, Z., Zhang, Y., Deng, Y., . . . Zhang, M. (2018). Different effects of extrusion on the phenolic profiles and antioxidant activity in milled fractions of brown rice. *LWT - Food Science and Technology*, *88*, 64-70. doi: 10.1016/j.lwt.2017.09.042.
- Zhang, X., Yang, S., Jiang, R., Sun, L., Pang, S., & Luo, A. (2018). Fluorescent molecularly imprinted membranes as biosensor for the detection of target protein. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *254*, 1078-1086. doi:10.1016/j.snb.2017.07.205.
- Zhang, Y. Q., Shan, X., & Gao, X. Q. (2011). Development of a molecularly imprinted membrane for selective separation of flavonoids. *Separation and Purification Technology*, *76*(3), 337-344. doi: 10.1016/j.seppur.2010.10.024.
- Zhang, Y. Y., Gao, B. J., An, F. Q., Xu, Z. Q., & Zhang, T. T. (2014). Adsorption and recognition characteristics of surface molecularly imprinted polymethacrylic acid/silica toward genistein. *Journal of Chromatography A*, *1359*, 26-34. doi: 10.1016/j.chroma.2014.07.025.
- Zhang, Y., Liu, R., Hu, Y., & Li, G. (2009). Microwave heating in preparation of magnetic molecularly imprinted polymer beads for trace triazines analysis in complicated samples. *Analytical Chemistry*, *81*(3), 967-976. doi: 10.1021/ac8018262.
- Zhou, D., Liu, AL., & Du, GH. (2011). Advance in pharmacological research of rosmarinic acid. *Chin. J. New Drugs*, *20*, 594-598. (*Institute of Materia Medica*, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China).
- Zhou, L., Wang, Y., & Peng, Z. (2011). Molecular characterization and expression analysis of chalcone synthase gene during flower

- development in tree peony (*Paeonia suffruticosa*). *African Journal of Biotechnology*, 10(8), 1275-1284. doi: 10.5897/AJB10.599.
- Zhou, T., Ding, L., Che, G., Jiang, W., & Sang, L. (2019). Recent advances and trends of molecularly imprinted polymers for specific recognition in aqueous matrix: Preparation and application in sample pretreatment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 114, 11-28. doi: 10.1016/j.trac.2019.02.028.
- Zhu, L., & Xu, X. (2003). Selective separation of active inhibitors of epidermal growth factor receptor from *Caragana Jubata* by molecularly imprinted solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 991(2), 151-158. doi: 10.1016/S0021-9673(03)00207-3.
- Zhu, X., Cai, J., Yang, J., Su, Q., & Gao, Y. (2006). Films coated with molecular imprinted polymers for the selective stir bar sorption extraction of monocrotophos. *Journal of Chromatography A*, 1131(1), 37-44. doi: 10.1016/j.chroma.2006.07.041.
- Zielinski, J. M., & Kettle, L. (2013). Physical characterization: surface area and porosity. London: *Intertek*. <https://www.intertek.com/>.



PUBLICACIONES



Feasibility of the determination of three flavan-3-ols metabolites in urine samples via parallel factor analysis of fluorescence emission matrices



Marco Mora-Granados^a, David González-Gómez^{b,*}, Alejandrina Gallego-Picó^a

^a Department of Analytical Sciences, Universidad Nacional de Educación a Distancia, Pº Senda del Rey 9, 2804 Madrid, Spain

^b Department of Science and Mathematics Education, Universidad de Extremadura, Avd. Universidad SN, 10003 Cáceres, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 May 2017

Received in revised form 28 July 2017

Accepted 2 August 2017

Available online 8 August 2017

Chemical compounds studied in this article:

3-hydroxyphenylacetic acid (PubChem CID: 12122)

4-hydroxyphenylacetic acid (PubChem CID: 127)

Syringic acid (PubChem CID: 10742)

Keywords:

3-Hydroxyphenylacetic acid

4-Hydroxyphenylacetic acid

Syringic acid

Flavan-3-ols

PARAFAC

Biomarker

ABSTRACT

Flavan-3-ols are the most abundant flavonoids in diet and the analysis and quantification of flavan-3-ol metabolites could report valuable information to assess their absorption mechanisms and bioavailability. In our research, we have studied the feasibility of the determination of three flavan-3-ols metabolites (3-hydroxyphenylacetic acid, 4-hydroxyphenylacetic acid and syringic acid) in urine samples using parallel factor analysis of fluorescence excitation emission matrices. In the optimised conditions, urine samples were directed analysed after diluting in water, centrifuged and filtered. The procedure was successfully applied to quantify the concentration of the selected flavan-3-ols catabolites in urine samples with recoveries ranging between 85 and 93%. For instance, multivariate analytical figures of merit show low sensitivity and selectivity and LOD between 39 µg/L and 53 µg/L. The proposed procedure is fast, simple, reliable and cheap method to quantify flavan-3-ols metabolites in urine and constitutes a powerful tool for screening their abundance in different food matrices after consumption.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Research and epidemiological studies have provided evidence for protective effects of long-term consumption of polyphenol-rich foods against diseases, such as cardiovascular disorders, cancer or neurodegeneration (Crozier, Jaganath, & Clifford, 2009; Del Rio et al., 2013). These health effects have increased consumer nutritional interest on phenolic compounds and thus the food industries are continually developing new products, defined as “functional

food”. Polyphenols compounds are widely found in all plant organs and consequently, in all food with vegetal origin (fruit, vegetables, seeds, etc). On a global scale, tea, wine, coffee, cocoa, onions, apples and berries are common sources of polyphenols in the human diet (Crozier et al., 2009). Polyphenols chemical structure is very diverse and complex, and the reported polyphenol structures shall exceed 8000 in plant (Oroian & Escriche, 2015). These compounds are characterized by the presence at least one aromatic ring with one or more hydroxyl functional groups attaches (Crozier, Del Rio, & Clifford, 2010). According to their chemical structure, polyphenols can be classified into two important groups: flavonoids and non-flavonoid compounds (Crozier et al., 2009). Flavan-3-ols represent the most common flavonoid consumed in diet and they are also regarded as functional ingredients, mostly due to their antioxidant characteristics, in processed foods, beverages, herbal remedies and food supplements (Aron & Kennedy, 2008; De Pascual-Teresa, Santos-Buelga, & Rivas-Gonzalo, 2000). A study about flavan-3-ols

Abbreviations: 3-HPA, 3-hydroxyphenylacetic acid; 4-HPA, 4-hydroxyphenylacetic acid; EEM, excitation-emission matrices; LOD, limit of detection; PARAFAC, parallel factor analysis; RMSEP, root-mean-square error of prediction; SyA, syringic acid.

* Corresponding author at: Department of Science and Mathematics Education, Universidad de Extremadura, Avda. de la Universidad, s/n, 10071 Cáceres, Spain.

E-mail addresses: marcomoragra@gmail.com (M. Mora-Granados), dggomez@unex.es (D. González-Gómez), agallego@ccia.uned.es (A. Gallego-Picó).

content analysed 56 different kinds of Spanish foodstuffs and beverages (De Pascual-Teresa et al., 2000). This study showed that fruit, vegetables, legumes, beverages (cider, coffee, beer, tea and wine), and chocolate contain significant quantities of catechins and proanthocyanidins. In fruit, plum, apple Renette and strawberry tree fruit contain around 50, 38 and 21 mg/100 g fresh weight, respectively. Aubergine broad bean presents higher content of flavan-3-ols (155 mg/100 g fresh weight) of the studies vegetables. Tea presents higher content between the nine beverages studied. Black tea and green tea present 27 and 44 mg/100 mL of flavan-3-ols. On the other hand, the content of these compounds was around 7 mg/100 g in chocolate. Despite the increasing amount of data available, bioavailability studies of most polyphenols are not conclusive and other researches ought to be carried out. Bioavailability studies of flavan-3-ols suggested that upon ingestion and reaction with proline-rich protein, they cross the intestinal barrier travel to the liver, where they further degrade into metabolites and can reach all tissues within hours following consumption (Clifford, Van der Hooft, & Crozier, 2013). Colon is an active site for polyphenol metabolism and involves the biotransformation of polyphenols compounds to simple phenols, phenolic acids, aromatics and lactones with different degrees of hydroxylation (Lee, Sim, & Cheng, 2008; Neto et al., 2017; Sanchez-Patan, Monagas, Moreno-Arribas, & Bartolome, 2011; Selma, Espin, & Tomas-Barberan, 2009). On the other hand, studies considering phenolic metabolite excretion in the urine and faeces revealed that these metabolites represent the largest proportion of polyphenol intake (Aron & Kennedy, 2008; Neto et al., 2017; Penczynski et al., 2017; Pereira-Caro et al., 2016; Ulaszewska et al., 2016; Urpi-Sarda et al., 2009). In recent years, several metabolites are suggested as biomarkers for monitoring the bioavailability and dietary intake of polyphenol compounds in urine and faeces after consumption (Aura et al., 2002; Crozier et al., 2010; Dall'Asta et al., 2012; Del Rio, Borges, & Crozier, 2010; Kalt, McDonald, Liu, & Fillmore, 2017; Neto et al., 2017; Penczynski et al., 2017; Pereira-Caro et al., 2016; Perez-Jimenez et al., 2010; Ulaszewska et al., 2016; Urpi-Sarda et al., 2015) and low-molecular-weight phenolic acids have been mostly proposed for this purpose. A large number of analytical procedures have been used in epidemiological and clinical studies for determination of polyphenol compounds and their metabolites (Corradini et al., 2011; De Rijke et al., 2006; Nolvachai & Marriott, 2013; Oroian & Escriche, 2015), but currently chromatographic techniques coupled to mass spectrometry are being widely used (Kalt et al., 2017; Motilva, Serra, & Macia, 2013; Neto et al., 2017; Penczynski et al., 2017; Pereira-Caro et al., 2016; Prasain, Wang, & Barnes, 2004; Urpi-Sarda et al., 2015). However, these techniques are very expensive and not always available in routine laboratories, and it is, therefore, important that other new procedures and chemometric tools were researched (Meras, Diaz, & Rodriguez, 2008; Song & Hou, 2002; Suarez-Rodriguez & Diaz-Garcia, 2000; Toyooka, Kashiwazaki, & Kato, 2003; Volikakis & Efstathiou, 2005; Wang & Zhang, 2007).

In this work, we proposed a fast, simple, reliable and cheap methodology to quantify phenolic metabolites in urine as a powerful tool for screening polyphenol intake. Three fluorescent flavan-3-ols metabolites (3-hydroxyphenylacetic acid, 4-hydroxyphenylacetic acid and syringic acid) were chosen as a representative target compounds (Fig. 1) and the feasibility of their determination in urine samples using parallel factor analysis (PARAFAC) of fluorescence excitation-emission matrices (EEM) was studied. Fluorescent detection offers high levels of sensitivity and specificity, because it is less susceptible to interferences. To achieve this goal, the luminescent properties of these flavan-3-ols metabolites were reviewed with the aim of establishing the most appropriate conditions in terms of sensitivity and stability.

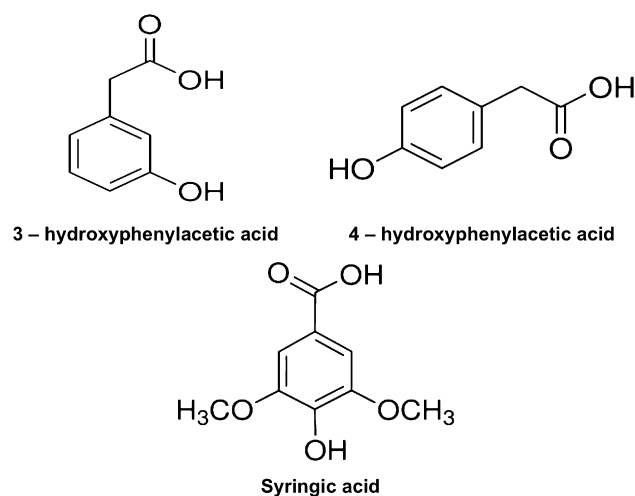


Fig. 1. Molecular structures of the studied analytes: 3-hydroxyphenylacetic acid, 4-hydroxyphenylacetic acid and syringic acid.

2. Material and methods

2.1. Regents and instruments

The analytes, 3-hydroxyphenylacetic acid (3-HPA), 4-hydroxyphenylacetic acid (4-HPA) and syringic acid (SyA), were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Ultrapure water (18.2 MΩ/cm quality) was obtained using a Milli-Q water system (Millipore Ibérica, Madrid, Spain) and used for all dilutions. Other reagents used were of analytical grade or higher quality. Standard stock solutions of each compound (100 µg/mL) were prepared by solving commercial reagents in water and were stored at 4 °C and in amber-coloured flasks to prevent photodegradation. All working solutions were daily prepared by dilution in water of the standard stock solutions.

Fluorescence intensity was measured using a model LS-50B luminescence spectrometer (Perkin-Elmer, Beaconsfield, Buckinghamshire, UK). Instrumental parameter and processing data were controlled by FL Winlab software. For all measurement, 1.00 cm quartz cells were used.

2.2. Urine samples

The main sources of polyphenol are food and diet; this is why analyte free urine samples were collected from healthy breastfed new-borns and stored without preservatives at -20 °C until use. Before processing, samples were allowed to thaw at room temperature and then homogenised by gently shaking. For the analysis, urine appropriated spiked with the three analytes was diluted in water (1:100 v/v). This dilution allowed for determining the analytes considering their reported concentration in urine samples (Sanchez-Patan et al., 2011). Before diluting, spiked urine samples were stored for 30 min to foster analyte-urine interaction. Stability tests were conducted in order to ensure that the samples were stable for at least this time. In these conditions, pH of samples was 6.8. Previous pH studies were carried out for each analyte, and demonstrated that the method improved when pH of samples was 6.8, and in addition good fluorescence yield were obtained. More acidic or basic media produced a reduction of the fluorescence intensity and increase of fluorescence band overlap. Also, other solution preparation with different solvents and mixtures was tested being water the most appropriate in terms of sensitivity and selectivity and sample stability.

2.3. Analytical procedure

The analytical procedure used in this research aims to determine the concentration of three flavan-3-ols metabolites in urine samples by measuring their fluorescence signals. The direct analysis of 3-HPA, 4-HPA and SyA by conventional spectrofluorimetry is not feasible, since the fluorescence spectra of these compounds consist of a broad band that significantly overlap in the same wavelength range (Fig. 2) particularly 3-HPA and 4-HPA. Furthermore, when urine is added to the samples, a significantly large fluorescence intensity of the urine components is added to the emission spectra. As can be seen, the overlapping is very strong in the useful spectral regions, posing significant challenges to the direct analysis. In both cases, the emission fluorescence scans were collected in the region $\lambda_{em} = 280 - 400$ nm ($\lambda_{ex} = 240$) and the excitation spectra were collected in the range $\lambda_{ex} = 240 - 290$ nm ($\lambda_{em} = 315$). The emission and excitation slits were maintained at 10 nm and spectra were collected every 1 nm.

2.4. Multivariate calibration with three-way data

Three-way fluorescence data and multivariate calibration based on parallel factor analysis (PARAFAC) are combined for the simultaneous quantitation of chosen catabolites of flavan-3-ol in urine samples. PARAFAC trilinear model is a powerful chemometric method and second-order tensors of data are particularly useful for the quantitative analysis of complex multicomponent samples and today it is a widely accepted analytical tool when separation is difficult or time-consuming (Muñoz de la Peña, Espinosa Mansilla, González Gómez, Olivieri, & Goicoechea, 2003; Simpson, Burke, & Jiji, 2011). In PARAFAC model, the individual matrices (data slices) are arranged in three-way data array (data cube) and the cube can be written as a sum of tensor product of three vectors for each component. Theoretically, this property of data cube is that it can be uniquely decomposed, providing access to spectral profiles and relative concentrations of individual components in the complex mixtures (Ahmadvand, Parastar, Sereshti, Olivieri, & Tauler, 2017; Muñoz de la Peña et al., 2003), that constitute the most useful advantage of the PARAFAC model and the basis of the so-called second-order advantage, which allow the quantification of analytes even in presence of unexpected sample constituents. Thus, for this work, the three vectors were relative concentration and spectra of emission and excitation in wavelengths intervals. The multivariate method calibration was achieved by means of a calibration set, consisting of 23 samples in the concentration range of 0.00–552 $\mu\text{g/L}$, 0.00–612 $\mu\text{g/L}$ and 0.00–652 $\mu\text{g/L}$ for 3-HPA, 4-HPA and SyA respectively. A three-component central composite design was used to establish the analyte concentration in the calibration set within the concentra-

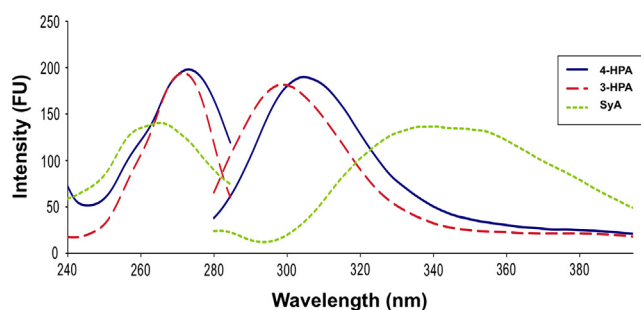


Fig. 2. Emission and excitation spectra of 600 $\mu\text{g/L}$ of 3-HPA, 600 $\mu\text{g/L}$ of 4-HPA and 600 $\mu\text{g/L}$ of SyA standard solutions. The emission spectra were collected from 280 to 400 nm, and the excitation spectra were collected from 240 to 290 nm. All spectra were collected every 1 nm.

tion ranges established previously according to the expected concentration in the urine samples and considering the lineal range (Sanchez-Patan et al., 2011). According to that, the calibration matrix allowed to quantify the flavan-3-ols catabolites in the expected concentrations. The set was formed by 21 samples (8 samples from the full-factorial design at 2 levels, 6 samples for the star design, 6 replicas of the central point and 3 blank samples). Table 1 shows the calibration design and sample concentrations.

2.5. Software

EEM spectra were analysed using PARAFAC in the MATLAB environment (MATLAB R2013a), and were executed using graphical interface MVC2 (Olivieri, Wu, & Yu, 2009), which are integrated MATLAB toolboxes for second-order calibration and provides an easy data manipulation and graphics presentation. MVC2 program is freely available from the authors (Olivieri et al., 2009).

2.6. Analytical figures of merit

Sensitivity, selectivity and limit of detection (LOD) have been used as figures of merit to describe the quality of the analytical procedure (Ahmadvand et al., 2017; Muñoz de la Peña et al., 2003). Sensitivity was estimated as the net analyte signal at unit concentration, whereas selectivity was computed as the ratio between the sensitivity and the total signal. Standard error in predicted concentrations have been calculated according to the pseudo-univariate representation provided by PARAFAC (Ahmadvand et al., 2017; Boque, Ferre, Faber, & Rius, 2002; Faber & Bro, 2002; Muñoz de la Peña et al., 2003). The calculation of predicted concentrations provides access to the limit of detection of method, because LOD is directly proportional of the standard deviation in the predicted concentration of the analyte of interest in a blank sample (Ahmadvand et al., 2017; Boque et al., 2002; Muñoz de la Peña et al., 2003).

3. Results and discussion

3.1. Metabolite analysis in urine samples

For the EEM, spectra were collected in the range 280–395 nm every 0.5 nm and 240–260 nm every 1 nm for the emission and excitation respectively, keeping the same spectra conditions as listed methodology section. In these conditions, each emission-excitation matrix provided 4600 data points. Fig. 3 represents the

Table 1

Experimental design and sample concentrations. 23 calibration samples formed by 21 samples (8 samples from the full-factorial design at 2 levels, 6 samples for the star design, 6 replicas of the central point and 3 blank samples).

	3-HPA ($\mu\text{g/L}$)	4-HPA ($\mu\text{g/L}$)	SyA ($\mu\text{g/L}$)
*L:A-a	47.73	335.00	350.00
*H:A-a	552.27	335.00	350.00
*L:B-a	300.00	57.50	350.00
*H:B-a	300.00	612.49	350.00
*L:C-a	300.00	335.00	47.28
*H:C-a	300.00	335.00	652.72
Cube001a	150.00	170.00	170.00
Cube002a	450.00	170.00	170.00
Cube003a	150.00	500.00	170.00
Cube004a	450.00	500.00	170.00
Cube005a	150.00	170.00	530.00
Cube006a	450.00	170.00	530.00
Cube007a	150.00	500.00	530.00
Cube008a	450.00	500.00	530.00
Cent-a (3 replicas)	300.00	335.00	350.00
Blank (3 replicas)	0.00	0.00	0.00

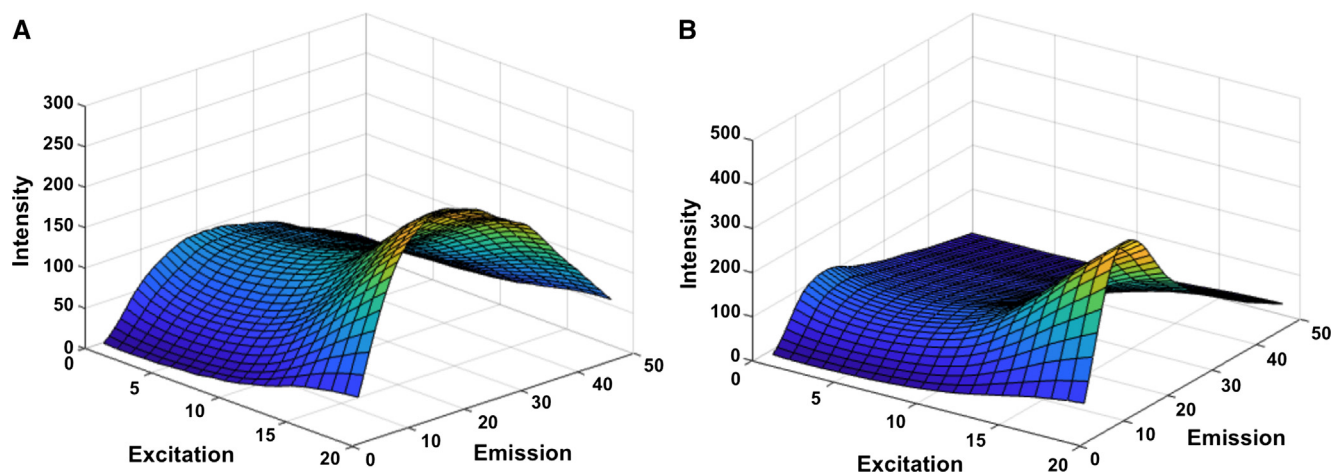


Fig. 3. (A) Three-dimensional plot of the EEM for standard sample recorded in excitation and emission wavelength ranges. (B) Plot of the EEM for the spiked urine sample.

EEM spectra for a standard sample mixture (Fig. 3a) and spiked urine sample (Fig. 3b) recorded in the spectral regions mentioned. The contribution of the background signal (urine) to the sample spectra can be noticed by observing the vertical scale of the Fig. 3a and b. The spiked urine sample has a significantly larger fluorescence intensity than the standard sample. In addition, the presence of urine in the sample does also alter considerably the shape of the EEM spectra, especially the emission contribution.

The simultaneous determination of 3-HPA, 4-HPA and SyA in urine samples was achieved by PARAFAC, in order to exploit the second-order advantage. The PARAFAC algorithm provided directly the excitation and emission spectral profiles by deconvolution of the three analytes and the urine background. The selection of the number of spectral components in the calibration stage was determined by analysing the PARAFAC core consistency as described by Muñoz de la Peña et al. (2003). Fig. 4 shows the de-convolved emission spectra obtained after applying PARAFAC to the EEM spiked urine spectra. In order to identify of profiles provided by PARAFAC, Fig. 4a also represents the experimental spectra recorded in the experimental conditions for the three studied analytes. From this figure, it can be noticed how PARAFAC is not only able to appropriate de-convolute the spectra of the three analytes, but also identify the spectra of the background signal (Fig. 4b). The PARAFAC algorithm with four factors has been capable to provide good estimate concentrations and spectral profiles despite the fact that the spectral profiles of the components were heavily overlapped.

The PARAFAC de-convolute profiles were used to build pseudo-univariate calibration curves and to calculate the analytical figure of merit values. The calibration regression coefficient (r^2) of the pseudo-calibration curve calculated after applying the PARAFAC calibration methodology for 3-HPA, 4-HPA and SyA were respectively 0.982, 0.991 and 0.924. The lower value of regression coefficient is obtained by the SyA because of its lower sensitivity and the higher background signal overlap (Fig. 4b).

Using the resolved spectral profiles and calibration parameters, predicted concentrations were calculated. The results obtained by implementing the calibration and prediction steps are shown in Tables 2a–2c. Recovery studies were carried out through the comparison of spiked concentration added to the urine sample and the concentration predicted by PARAFAC algorithm. Mean recoveries for 3-HPA were 93%, for 4-HPA and SyA, were 89% and 85%, respectively in a concentration range of 50 to 660 $\mu\text{g/L}$. In order to evaluate the dispersion of the results, a box-and-whisker diagram is represented in Fig. 5. The higher dispersion of the results is

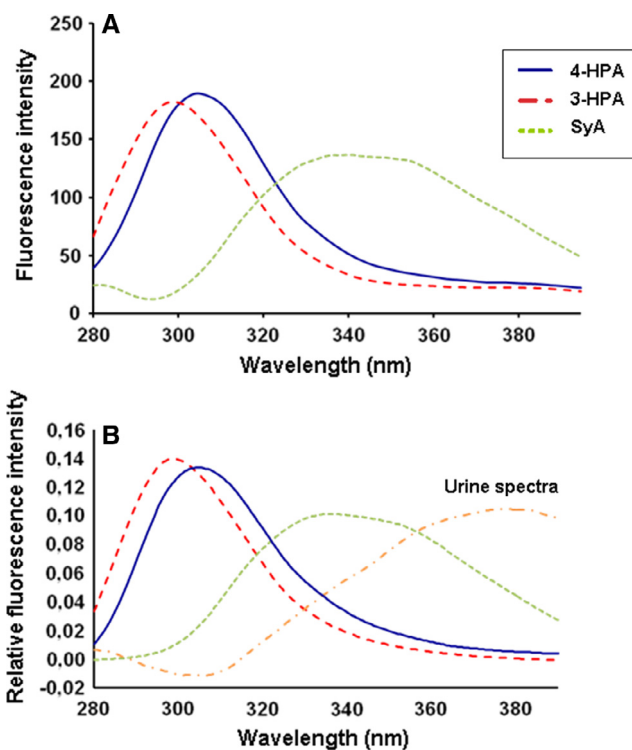


Fig. 4. (A) Experimental emission spectra for the three studied catabolites registered in the experimental conditions described before in absence of urine (B) Emission profiles provided by a four-component PARAFAC model used in the multivariate calibration process for the simultaneous determination of 3-HPA, 4-HPA and SyA in urine according to the experimental conditions. The fluorescence intensity in these profiles has been normalized.

observed for the 3-HPA and the lower for the 4-HPA, but in all cases the results has less or around 10% of dispersion.

Finally, in order to establish the analytical quality parameters of the proposed method, multivariate figures of merit were calculated. These figures are based on PARAFAC pseudo univariate calibration. Table 3 summarizes the figures of merit such as sensitivity, selectivity and limit of detection. Analytical sensitivity data were in the range of 2.37–3.55 $\mu\text{g/L}$; values of selectivity were 0.348 for 3-HPA and 4-HPA, and 0.971 $\mu\text{g/L}$ for SyA. For instance, obtained LOD were 39.15 $\mu\text{g/L}$, 52.62 $\mu\text{g/L}$ and 40.82 $\mu\text{g/L}$ for 3-HPA, 4-HPA and SyA, respectively.

Table 2a

Recovery study and resolved concentrations of prediction samples of 3-HPA, in spiked urine samples using PARAFAC model calibration.

Sample	3-HPA		
	Nominal concentration ($\mu\text{g/L}$)	Concentration predicted ($\mu\text{g/L}$)	Recovery (%)
SU-1	100	81.91	82
SU-2	100	98.63	99
SU-3	660	622.0	94
SU-4	400	392.0	98
SU-5	400	379.5	95
SU-6	50	42.48	85
SU-7	50	53.71	107
SU-8	660	569.6	86
Mean recovery			93
RMSEP	36.2		
REP%	8.41		

RMSEP, root-mean-square error of prediction; REP%, relative error of prediction.

Table 2b

Recovery study and resolved concentrations of prediction samples of 4-HPA in spiked urine samples using PARAFAC model calibration.

Sample	4-HPA		
	Nominal concentration ($\mu\text{g/L}$)	Concentration predicted ($\mu\text{g/L}$)	Recovery (%)
SU-1	100	107.1	107
SU-2	660	596.1	90
SU-3	100	77.08	77
SU-4	400	351.7	88
SU-5	50	43.51	87
SU-6	400	343.1	86
SU-7	50	42.44	85
SU-8	660	585.4	89
Mean recovery			89
RMSEP	44.5		
REP%	8.43		

RMSEP, root-mean-square error of prediction; REP%, relative error of prediction.

Table 2c

Recovery study and resolved concentrations of prediction samples of SyA in spiked urine samples using PARAFAC model calibration.

Sample	SyA		
	Nominal concentration ($\mu\text{g/L}$)	Concentration predicted ($\mu\text{g/L}$)	Recovery (%)
SU-1	660	522.1	79
SU-2	100	86.49	86
SU-3	100	85.90	86
SU-4	50	46.05	92
SU-5	400	319.4	80
SU-6	400	321.9	80
SU-7	50	42.64	85
SU-8	600	542.4	90
Mean recovery			85
RMSEP	66.5		
REP%	4.80		

RMSEP, root-mean-square error of prediction; REP%, relative error of prediction.

It is important to highlight that the method offers adequate LOD to quantify these catabolites in urine samples, according to the expected concentrations. On the other hand, the lower sensibility and selectivity, and consequently higher LOD, are reported for 4-HPA and 3-HPA, for being those catabolites with higher spectra overlap.

The sensitivity and recovery obtained in this research well indicated that the proposed procedure is a fast, reliable and cheap

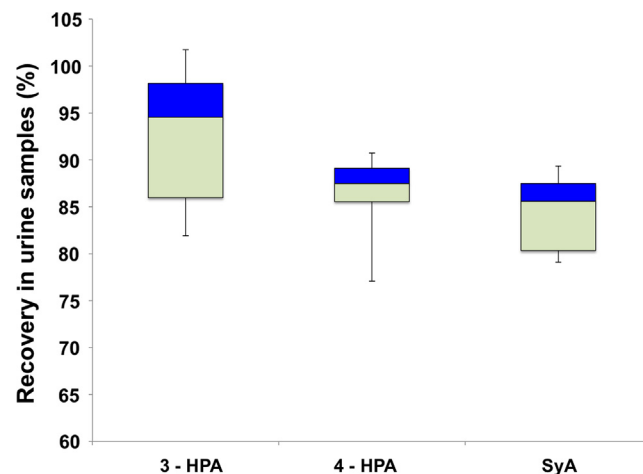


Fig. 5. Data of recoveries obtained in analyte mixtures using PARAFAC. The box and whisker plots describe the data sets: the median, the box indicates the range 25–75% of the distribution and the whiskers represent minimum and maximum values.

Table 3

Analytical figures of merit.

Figure of merit	3-HFA	4-HFA	SyA
LOD ($\mu\text{g/L}$)	39.15	52.62	48.82
Sensitivity ^a (FU· $\mu\text{g/L}$)	2.37	2.37	3.55
Selectivity ($\mu\text{g/L}$)	0.348	0.348	0.971
Lineal range ($\mu\text{g/L}$)	0–670	0–670	0–670

^a FU, arbitrary fluorescence units.

method for quantify phenolic metabolites in urine samples or for screening polyphenol intake in epidemiological and clinical studies.

In the literature, numerous metabolites have been identified in plasma (Clifford et al., 2013; De Ferrars et al., 2014; Lee et al., 2008; Lee et al., 2012; Pereira-Caro et al., 2016; Urpi-Sarda et al., 2015), urine (Clifford et al., 2013; Crozier et al., 2009; Crozier et al., 2010; De Ferrars et al., 2014; Hong & Mitchell, 2004; Kalt et al., 2017; Lee et al., 2008; Mennen et al., 2006; Monagas et al., 2010; Pereira-Caro et al., 2016; Perez-Jimenez et al., 2010; Prior et al., 2010; Ulaszewska et al., 2016; Urpi-Sarda et al., 2015; Urpi-Sarda et al., 2009), faecal (Aura et al., 2002; Dall'Asta et al., 2012; De Ferrars et al., 2014; Muñoz-Gonzalez et al., 2012; Sanchez-Patan et al., 2011) and other tissue samples (Andres-Lacueva et al., 2012; Kahle et al., 2011) collected post-consumption of polyphenol-rich foods in human and animal. In vitro studies, numerous phenolic acids belonging to different chemical structure families, were also identified as microbial-derived metabolites (Deprez et al., 2000; Muñoz-Gonzalez et al., 2012; Pereira-Caro et al., 2016). Some of these metabolites have been proposed as biomarker for dietary flavonoid intake in human urine samples (Mennen et al., 2006; Penczynski et al., 2017; Perez-Jimenez et al., 2010). Metabolomic studies showed that a number of phenolic acids were found to be higher in urine samples when diets enriched in flavonoid were intake. Vanillic acid sulfate, phenylacetic acid and hydroxyphenylacetic acid concentrations increased (Ulaszewska et al., 2016). Gallic acid metabolites group in urine samples also resulted a good biomarker of wine intake (Urpi-Sarda et al., 2015). Hippuric acid being excreted in the highest quantities and amounts of 4-hydroxyphenylacetic acid, 3-hydroxyphenylacetic acid and other phenolic acid were observed in urine of animals fed the highest level of cranberry powder (Prior et al., 2010). Other phenolic microbial metabolites after cocoa intake in humans and rats' urine were proposed as biomarker (Urpi-Sarda et al., 2009).

Our study proposed three urinary metabolites (3-HPA, 4-HPA and SyA) as biomarker, two phenylacetic acids and one benzoic acid. The luminescent properties of these metabolites make possible fluorescent detection and offer best levels of sensitivity and specificity, because it is less susceptible to interferences and they represent easily measurable biomarker of flavonoid intake. In conclusion, the analytical procedure developed represents a suitable and affordable method to identify and quantify these biomarkers in urine samples without a complex treatment. Overall, the results should be considered as satisfactory in view of the complexity of the studied samples and the highly-overlapped signal. Furthermore, PARAFAC applied to simultaneous monitoring and quantification of multicomponent in real samples with complex matrices has proved to be an interesting, simple, fast, accurate, and economical alternative to separation methods, and is a powerful and validated chemometric method and the feasibility of the determination of three flavan-3-ols metabolites in urine samples via parallel factor analysis of fluorescence emission matrices has been demonstrated.

4. Conclusions

Considerable evidences suggest that diets rich in flavan-3-ols provide several health beneficial effects by acting as antioxidant, anticarcinogen, cardiopreventive, antimicrobial and playing a significant role in neurological health. Further epidemiological studies are also required to find out more about the links between these beneficial effect and polyphenol intake. Although the increasing amount of data available, other researches ought to be carried out. Consequently, a number of phenolic metabolites have been proposed as biomarker for dietary flavonoid intake in human excretions and tissues, and different method and procedure have been developed to analyse them.

In this research, a simple and reliable methodology is proposed to simultaneously determine three flavan-3-ols catabolites in biological samples, as a fast and cheap procedure to screen polyphenol intake and biomarkers. The methodology is based on the excitation-emission fluorescence data array analysis using second order calibration based on trilinear PARAFAC model, and its application to urine samples.

Acknowledgements

Authors thank the Comunidad Autónoma of Madrid and European funding from FEDER programme (project S2013/ABI-3028, AVANSECAL). David González-Gómez thanks Junta de Extremadura and European Social Funds for the financial support (Proyecto de ayuda de grupos de la Junta de Extremadura GR15009).

References

Ahmadvand, M., Parastar, H., Sereshti, H., Olivieri, A., & Tauler, R. (2017). A systematic study on the effect of noise and shift on multivariate figures of merit of second-order calibration algorithms. *Analytica Chimica Acta*, 952, 18–31.

Andres-Lacueva, C., Macarulla, M. T., Rotches-Ribalta, M., Boto-Ordóñez, M., Urpi-Sarda, M., Rodríguez, V. M., & Portillo, M. P. (2012). Distribution of Resveratrol Metabolites in Liver, Adipose Tissue, and Skeletal Muscle in Rats Fed Different Doses of This Polyphenol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(19), 4833–4840.

Aron, P. M., & Kennedy, J. A. (2008). Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(1), 79–104.

Aura, A. M., O'Leary, K. A., Williamson, G., Ojala, M., Bailey, M., Puupponen-Pimia, R., ... Poutanen, K. (2002). Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), 1725–1730.

Boque, R., Ferre, J., Faber, N. M., & Rius, F. X. (2002). Limit of detection estimator for second-order bilinear calibration. *Analytica Chimica Acta*, 451(2), 313–321.

Clifford, M. N., Van der Hoof, J. J. J., & Crozier, A. (2013). Human studies on the absorption, distribution, metabolism, and excretion of tea polyphenols. *American Journal of Clinical Nutrition*, 98(6), 1619S–1630S.

Corradini, E., Foglia, P., Giansanti, P., Gubbio, R., Samperi, R., & Lagana, A. (2011). Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. *Natural Product Research*, 25(5), 469–495.

Crozier, A., Del Rio, D., & Clifford, M. N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 446–467.

Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26(8), 1001–1043.

Dall'Asta, M., Calani, L., Tedeschi, M., Jechiu, L., Brighenti, F., & Del Rio, D. (2012). Identification of microbial metabolites derived from in vitro fecal fermentation of different polyphenolic food sources. *Nutrition*, 28(2), 197–203.

De Ferrars, R. M., Czank, C., Zhang, Q., Botting, N. P., Kroon, P. A., Cassidy, A., & Kay, C. D. (2014). The pharmacokinetics of anthocyanins and their metabolites in humans. *British Journal of Pharmacology*, 171(13), 3268–3282.

De Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2000). Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5331–5337.

De Rijke, E., Out, P., Niessen, W. M. A., Ariese, F., Gooijer, C., & Brinkman, U. A. Th. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112(1–2), 31–63.

Del Rio, D., Borges, G., & Crozier, A. (2010). Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. *British Journal of Nutrition*, 104, S67–S90.

Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(14), 1818–1892.

Deprez, S., Brezillon, C., Rabot, S., Philippe, C., Mila, I., Lapiere, C., & Scalbert, A. (2000). Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *Journal of Nutrition*, 130(11), 2733–2738.

Faber, N. M., & Bro, R. (2002). Standard error of prediction for multiway PLS 1. Background and a simulation study. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 61(1–2), 133–149.

Hong, Y., & Mitchell, A. E. (2004). Metabolic profiling of flavonol metabolites in human urine by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(22), 6794–6801.

Kahle, K., Kempf, M., Schreier, P., Scheppach, W., Schrenk, D., Kautenburger, T., ... Richling, E. (2011). Intestinal transit and systemic metabolism of apple polyphenols. *European Journal of Nutrition*, 50(7), 507–522.

Kalt, W., McDonald, J. E., Liu, Y., & Fillmore, S. A. E. (2017). Flavonoid metabolites in human urine during blueberry anthocyanin intake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(8), 1582–1591.

Lee, J., Ebeler, S. E., Zweigenbaum, J. A., & Mitchell, A. E. (2012). UHPLC-(ESI)QTOF MS/MS profiling of quercetin metabolites in human plasma postconsumption of appleauce enriched with apple peel and onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(34), 8510–8520.

Lee, C. Y., Sim, S. M., & Cheng, H. M. (2008). Phenylacetic acids were detected in the plasma and urine of rats administered with low-dose mulberry leaf extract. *Nutrition Research*, 28(8), 555–563.

Mennen, L. L., Sapinho, D., Ito, H., Bertrais, S., Galan, P., Hercberg, S., & Scalbert, A. (2006). Urinary flavonoids and phenolic acids as biomarkers of intake for polyphenol-rich foods. *The British Journal of Nutrition*, 96(1), 191–198.

Meras, I. D., Diaz, T. G., & Rodriguez, D. A. (2008). Determination of piceid by photochemically induced fluorescence and second-derivative – response surface methodology for the optimization of a liquid-liquid extraction procedure for its analysis in wine samples. *Talanta*, 74(4), 675–682.

Monagas, M., Urpi-Sarda, M., Sanchez-Patan, F., Llorach, R., Garrido, I., Gomez-Cordoves, C., ... Bartolome, B. (2010). Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food & Function*, 1(3), 233–253.

Motiva, M. J., Serra, A., & Macia, A. (2013). Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: an overview. *Journal of Chromatography A*, 1292, 66–82.

Muñoz de la Peña, A., Espinosa Mansilla, A., González Gómez, D., Olivieri, A. C., & Goicoechea, H. C. (2003). Interference-free analysis using three-way fluorescence data and the parallel factor model. Determination of fluoroquinolone antibiotics in human serum. *Analytical Chemistry*, 75(11), 2640–2646.

Muñoz-Gonzalez, C., Moreno-Arribas, M. V., Rodriguez-Bencomo, J. J., Cueva, C., Alvarez, P. J. M., Bartolome, B., & Pozo-Bayon, M. A. (2012). Feasibility and application of liquid-liquid extraction combined with gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of phenolic acids from grape polyphenols degraded by human faecal microbiota. *Food Chemistry*, 133(2), 526–535.

Neto, J. J. L., de Almeida, T. S., de Medeiros, J. L., Vieira, L. R., Moreira, T. B., Maia, A. I. V., ... Carvalho, A. F. U. (2017). Impact of bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in biological systems upon the antioxidant activity of the ethanolic extract of *Triplaris gardneriana* seeds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 88, 999–1007.

Nolvachai, Y., & Marriott, P. J. (2013). GC for flavonoids analysis: past, current, and prospective trends. *Journal of Separation Science*, 36(1), 20–36.

Olivieri, A. C., Wu, H. L., & Yu, R. Q. (2009). MVC2: A MATLAB graphical interface toolbox for second-order multivariate calibration. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 96(2), 246–251.

Oroian, M., & Escriche, I. (2015). Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74, 10–36.

- Penczynski, K. J., Krupp, D., Bring, A., Bolzenius, K., Remer, T., & Buyken, A. E. (2017). Relative validation of 24-h urinary hippuric acid excretion as a biomarker for dietary flavonoid intake from fruit and vegetables in healthy adolescents. *European Journal of Nutrition*, *56*(2), 757–766.
- Pereira-Caro, G., Ludwig, I. A., Polyviou, T., Malkova, D., Garcia, A., Moreno-Rojas, J. M., & Crozier, A. (2016). Identification of plasma and urinary metabolites and catabolites derived from orange juice (poly)phenols: analysis by high-performance liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(28), 5724–5735.
- Perez-Jimenez, J., Hubert, J., Hooper, L., Cassidy, A., Manach, C., Williamson, G., & Scalbert, A. (2010). Urinary metabolites as biomarkers of polyphenol intake in humans: a systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *92*(4), 801–809.
- Prasain, J. K., Wang, C., & Barnes, S. (2004). Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free Radical Biology and Medicine*, *37*(9), 1324–1350.
- Prior, R. L., Rogers, T. R., Khanal, R. C., Wilkes, S. E., Wu, X. L., & Howard, L. R. (2010). Urinary excretion of phenolic acids in rats fed cranberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(7), 3940–3949.
- Sanchez-Patan, F., Monagas, M., Moreno-Arribas, M. V., & Bartolome, B. (2011). Determination of microbial phenolic acids in human faeces by UPLC-ESI-TQ MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(6), 2241–2247.
- Selma, M. V., Espin, J. C., & Tomas-Barberan, F. A. (2009). Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(15), 6485–6501.
- Simpson, J. V., Burke, M., & Jiji, R. D. (2011). Application of EEM fluorescence in combination with PARAFAC analysis to simultaneously monitor quercetin in its deprotonated, aggregated, and protein bound states. *Journal of Chemometrics*, *25*(3), 101–108.
- Song, Z. H., & Hou, S. (2002). Sensitive determination of sub-nanogram amounts of rutin by its inhibition on chemiluminescence with immobilized reagents. *Talanta*, *57*(1), 59–67.
- Suarez-Rodriguez, J. L., & Diaz-Garcia, M. E. (2000). Flavonol fluorescent flow-through sensing based on a molecular imprinted polymer. *Analytica Chimica Acta*, *405*(1–2), 67–76.
- Toyo'oka, T., Kashiwazaki, T., & Kato, M. (2003). On-line screening methods for antioxidants scavenging superoxide anion radical and hydrogen peroxide by liquid chromatography with indirect chemiluminescence detection. *Talanta*, *60*(2–3), 467–475.
- Ulaszewska, M. M., Trost, K., Stanstrup, J., Tuohy, K. M., Franceschi, P., Chong, M. F., ... Mattivi, F. (2016). Urinary metabolomic profiling to identify biomarkers of a flavonoid-rich and flavonoid-poor fruits and vegetables diet in adults: the FLAVURS trial. *Metabolomics*, *12*(32).
- Uрпи-Sarda, M., Boto-Ordóñez, M., Queipo-Ortuno, M. I., Tulipani, S., Corella, D., Estruch, R., ... Andres-Lacueva, C. (2015). Phenolic and microbial-targeted metabolomics to discovering and evaluating wine intake biomarkers in human urine and plasma. *Electrophoresis*, *36*(18), 2259–2268.
- Uрпи-Sarda, M., Monagas, M., Khan, N., Lamuela-Raventos, R. M., Santos-Buelga, C., Sacanella, E., ... Andres-Lacueva, C. (2009). Epicatechin, procyanidins, and phenolic microbial metabolites after cocoa intake in humans and rats. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *394*(6), 1545–1556.
- Volikakis, G. J., & Efstathiou, C. E. (2005). Fast screening of total flavonols in wines, tea-infusions and tomato juice by flow injection/adsorptive stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta*, *551*(1–2), 124–131.
- Wang, L., & Zhang, Z. J. (2007). Molecular imprinted polymer-based chemiluminescence imaging sensor for the detection of trans-resveratrol. *Analytica Chimica Acta*, *592*(2), 115–120.

**Impact Factor****3.701** **4.178**

2019

5 year

<i>JCR ® Category</i>	<i>Rank in Category</i>	<i>Quartile in Category</i>
FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY	31 of 139	Q1
NUTRITION & DIETETICS	29 of 89	Q2

*Data from the 2019 edition of Journal Citation Reports***Publisher**

ELSEVIER SCIENCE BV, PO BOX 211, 1000 AE AMSTERDAM, NETHERLANDS

ISSN: 1756-4646**Research Domain**

Food Science & Technology

Nutrition & Dietetics

Article

A Molecularly Imprinted Polymer for Selective Extraction of Phenolic Acids from Human Urine

Marco Mora-Granados ¹, David González-Gómez ², Jin Su Jeong ^{2,*} and Alejandrina Gallego-Picó ¹

¹ Department of Analytical Sciences, Faculty of Sciences, National University of Distance Education (UNED), 28040 Madrid, Spain; marcomoragra@gmail.com (M.M.-G.); agallego@ccia.uned.es (A.G.-P.)

² Department of Didactic of Experimental Sciences and Mathematics Education, University of Extremadura (UNEX), 10071 Cáceres, Spain; dggomez@unex.es

* Correspondence: jin@unex.es

Featured Application: In this research, a procedure to prepare a molecular imprinted polymer is presented for the selective extraction of phenolic acids from human urine samples.

Abstract: Studies for monitoring the bioavailability of dietary flavonoid compounds generate great interest. Among them, low-molecular-weight phenolic acids, secondary metabolites present in colonic catabolism and urinary excretion, have been proposed as biomarkers of polyphenol intake. Using 4-hydroxyphenylacetic acid as a template, a molecularly imprinted polymer (MIP) was synthesized for selective extraction of these hydroxylated metabolites from human urine samples and posterior analysis in an HPLC-DAD-MS system. Polymers were characterized by Scanning electron microscopy (SEM), Attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR), Brunauer-Emmett-Teller (BET) method, and binding experiments. MIP presents specific recognition ability for template and analogues molecules. This capacity of recognition and the pH dependence of the binding strength was also studied. The method was validated over a concentration range of 0.25–40 mg/L, $r^2 > 0.995$. In the optimized conditions, the recovery value was 94% with RSD 1.2%. The Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ) were 1.22 and 3.69 mg/L, respectively. In our knowledge, it is the first time that this methodology is applied to analyze urinary catabolites of the polyphenol compound and to provide a specific method and simple analysis alternative. The selective extraction of these metabolites improves the application and results obtained by other less sensitive analysis methods than the validation method. It also facilitates the development of new screening methods.

Keywords: molecularly imprinted polymer; polyphenol metabolites; solid phase extraction; human urine; phenolic acids; HPLC-DAD-MS



Citation: Mora-Granados, M.; González-Gómez, D.; Jeong, J.S.; Gallego-Picó, A. A Molecularly Imprinted Polymer for Selective Extraction of Phenolic Acids from Human Urine. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 1577. <https://doi.org/10.3390/app11041577>

Academic Editor: Alberto Milani
Received: 11 January 2021
Accepted: 5 February 2021
Published: 9 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Diets rich in fruits and vegetables are related to positive effects on health and a lower risk of diseases (cardiovascular disorders, cancer, or neurodegeneration) [1]. Flavan-3-ols are the most common group of flavonoids in the human diet and the analysis and quantification of these metabolites could report valuable information to assess their absorption mechanisms and bioavailability. Flavan-3-ols can be found in fruit, vegetables, legumes, beverages (cider, coffee, beer, tea, and wine), or chocolate, and also are added as functional ingredients in processed foods or dietary supplements. In the colon, dietary phenolic compounds can be converted into smaller phenolic acid by microorganisms and may contribute to health benefits. These benefit effects, previously related to the simple direct antioxidant hypothesis of an understanding of the complex effects on molecular targets and enzymes in specific cell types, now have undergone and the importance of the microbiome is inherently integrated with flavonoid metabolism and bioactivity [1]. In the literature, several metabolites are proposed as biomarkers for monitoring the bioavailability and human dietary

intake of polyphenol compounds after consumption, and low-molecular-weight phenolic acids, secondary metabolites present in colonic catabolism and urinary excretion, have been mostly suggested for this purpose in urine and feces [2–5]. Consequently, the grand interest in knowing the bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds has stimulated analytical methods development. In the last years, many methods have been published for determination of polyphenol and its hydroxylated metabolites in plants, animal, and human samples [6], but currently chromatographic techniques coupled to mass spectrometry are being widely used [2,7]. Furthermore, other new strategies based on chemometric tools have been developed [8]. Nevertheless, the most important challenge in the analysis of polyphenols and its metabolites is the extraction and isolation of compounds from the complex matrices. Recent trends in sample preparation and purification include the development of advanced adsorbent materials and accordingly, several analytical methodologies have been proposed to improve the sensitivity and specificity in the polyphenol compound determination [9–13]. Molecular imprinted polymers (MIP) have attracted wide attention and attained significant applications in selective extraction of polyphenols compounds and hydroxylated metabolites in plants, natural products, foodstuffs, or biological and environmental samples. However, MIP applications in the analytical determination of polyphenols metabolites have been limited and few of us used phenolic acid as a template [10,13–20]. PCA has been used as template for the synthesis of an MIP for the extraction analogues compounds from plant in an Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction (MISPE) procedure [13,14] or used as High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) stationary phase to analyze synthetic samples of red wine [15,16]. 4-HBA-MIP has also been used in the stationary phase [16,19] and imprinting studies were carried out [17]. The 4-HBA MISPE procedure has also been proposed for the selective extraction of polyphenols from olive mill waste waters [18]. In our knowledge, only one work has reported a MIP synthesis using 4-HPA as a template and HPLC columns application and mechanism of recognition was discussed theoretically [19,21]. On the other hand, only one study has applied MIP for the analysis in urine. 4-methylhippuric acid has been used as a template for the synthesis of an MIP for the extraction of hippuric and 4-methylhippuric acids for the assessment exposure of toluene and xylenes [22]. Main functional monomers used in these molecular imprinting procedures were 4-Vpy, acrylamide, and methacrylic acid [10,13–22]. To our knowledge, only one work reported the application of MIP for the phenolic acid analysis in urine, but with a different purpose, the assessment exposure of toluene and xylenes [22]. In our study, 4-hydroxyphenylacetic acid (4-HPA), excreted catabolite of polyphenols compounds, was chosen as a template of molecularly imprinted polymers. Synthesized MIP was used as sorbent in a SPE procedure (MISPE) for extraction and isolation of 4-HPA and analogues. Once the MISPE parameters were optimized, the procedure was validated using spiked human urine samples.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and Solutions

Standards of phenolic acid, 3-hydroxyphenylacetic acid (3-HPA), 4-hydroxyphenylacetic acid (4-HPA), protocatechuic acid (PCA), 4-hydroxybenzoic acid (4-HBA), syringic acid (SyA), and hippuric acid (HA) were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain), Acros Organics (Geel, Belgium), and HWI Analytik (Rülzheim, Germany). Other reagents used for polymerization as ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA), 2,2'-azobis(2-methylpropionitrile) (AIBN) were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) and 4-vinylpyridin (4-Vpy) were purchased from Merck-Schuchardt (Hohenbrunn, Germany). HPLC-grade solvents used were acetonitrile (ACN) and methanol (MeOH), they were purchased from Scharlau (Barcelona, Spain). Ultrapure water (18.2 M Ω /cm quality) was obtained using a Milli-Q water system (Millipore Ibérica, Spain) and used for all dilutions. All other reagents used were of analytical grade or better.

Stock solution of 6 metabolites (1000 mg/L) was prepared in water and stored at 4 °C till their usage. Ultrasonic bath was used in preparation solutions to aid analyte dissolution.

All working solutions of analytes were daily prepared by dilution in water of stock solutions. All solutions were stored in amber-colored flasks to prevent photodegradation.

2.2. Samples

Phenolic free urine samples were collected from healthy breastfed newborns. After centrifugation and filtration using Whatman PPW/GMF polypropylene filters (0.45 μm), the samples were stored without preservatives at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. Before processing, samples were allowed to thaw at room temperature and then homogenized by gently shaking. For the analysis, urine was appropriated spiked with the working solutions to cover the calibration range: 0.25 to 40 mg/L. Spiked urine samples were stored for 30 min to foster analyte–urine interaction. In these conditions, pH of samples was around 6.8. Previous pH studies were carried out for each analyte, demonstrating that the MISPE procedure improved when the pH of samples was 3, and in addition, good recovery was obtained. More acidic or basic media produced a reduction of the recovery and consequently, the pH of the urine was adjusted to 3, using hydrochloric acid.

2.3. Chromatographic Conditions

Chromatographic analysis was performed on an Agilent LC 1200 series equipped with a thermostatted column compartment and a standard autosampler coupled to a diode array detector on-line with a mass detector (Agilent 6100 series). UV spectra were used to confirm the identity of phenolic acid.

Separation was achieved on a Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 \times 4.6 mm, 5 μm) linked to a security guard cartridge Zorbax Eclipse XDB-C18 (12.5 \times 4.6 mm, 5 μm) from Agilent Technologies (Spain). The chromatographic separation was carried out at constant temperature (25 $^{\circ}\text{C}$). Mobile phase was constituted with acetonitrile and water acidified with 0.1% formic acid (10:90) in isocratic mode. The flow rate was 0.4 mL/min and the injection volume, 20 μL . MS analyses were performed in the negative mode and the ESI parameters were as follows: capillary voltage, -3 kV ; nitrogen nebulizer (35 psi) and drying gas flow (12.0 L/min) at 350 $^{\circ}\text{C}$. First, a solution with all of standards was infused in scan mode, so the deprotonated molecule and the most intense product ion of each compound were recorded and selected for optimization and quantitative analysis of samples (SIM mode). The optimized cone voltage for all analytes was 40 V. The chromatographic procedure was optimized to analyze the six analytes. The DAD was operated in 280 nm wavelength. Mass spectrometric data were collected between 10 and 28 min. Chromatographic data were recorded and integrated using Chemstation (rev. B.04.02) for LC Agilent system.

2.4. Synthesis of Molecularly Imprinted Polymers

MIP was synthesized using 152 mg 4-HPA as template, 4-Vpy (431 μL) as functional monomer, EGDMA (3.77 mL) as crosslinker, AIBN (50 mg) as polymerization reaction initiator, and ACN (10 mL) as porogen. Porogen volume influences polymer morphology, and according to some authors, dilution conditions lead the size of the gel particles in a crosslinking copolymerization [23]. The porogen volume has been determined by preliminary study (70.4 vol % relative to the total volume). The polymerization was carried out in a 20 mL glass vial, and a molar ratio of 1:4:20 (template/4-Vpy/EGDMA) was maintained in excess of AIBN. The pre-polymerization mixture was purged with nitrogen during 15 min and then was sonicated during 15 min in an ultrasonic bath (Selecta Ultrasons, Barcelona, Spain). The solution was cooled on an ice bath and purged with nitrogen for 15 min, in order to remove oxygen and establish an inert atmosphere. Afterwards, the glass vial was sealed and placed in a thermostatted bath. The polymerization process was thermally initiated and maintained at 60 $^{\circ}\text{C}$ for a period of 24 h. The monolithic polymer obtained was crushed and sieved to give particles of size between 100 and 50 μm , suitable for SPE applications. An ETHOS SEL microwave oven (Milestone, Sorisole, Italy) was used to remove the template from the imprinted polymer. Standard microwave-assisted extraction (MAE) conditions were as follows: MIP and 30 mL of washing solution (methanol

containing 10% *v/v* acetic acid) were placed in the extraction vessels and exposed to MAE over a 5 min heating ramp period up to 100 °C. This temperature was then maintained for 20 min. After extraction, the vessel content was transferred to a vacuum filtration system for removal of the solvent. This process was performed three times in order to ensure the total extraction of the template and washing solutions were kept for posterior extraction efficiency studies. Finally, the polymer particles were dried at 60 °C in a hot air oven and stored at room temperature prior to use. Non-imprinted polymers (NIP) were prepared in the same manner as the MIP polymer but in the absence of template (4-HPA).

2.5. MIP and NIP Characterizations

In this work, the morphology of polymers was examined. Porosity measurements surface areas of MIP and NIP were measured by nitrogen sorption porosimetry using Micrometrics ASAP 2020 equipment (Micrometrics Instruments, Norcross, GA, USA). The specific surface areas were calculated using the Brunauer–Emmett–Teller (BET) method, and pore volume data were calculated according to the Barret–Joyner–Halenda (BJH) method. Before the BET measurement, the particles were heated at 120 °C for 2 h in vacuum for remove gases and vapors that may have become physically adsorbed onto the particle surface. Surface characterization of polymer particles is of high importance to investigate the surface area and the size/volume characteristics of the pores since these parameters affect the binding of analytes. Scanning electron microscopy (SEM) is performed for MIP and NIP particles visualization (SEM, S-3000N, Hitachi, Japan). All samples were sputter-coated with Au/Pd before SEM analysis (Polaron Range SC7620). Chemical structure of polymers was characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) from 7000 to 400 cm^{-1} , operating in the ATR mode, with 64 scans resolution at 4 cm^{-1} , using an FT/IR-4100A spectrophotometer with the accessory ATR PRO ONE (JASCO, Spain). The sample was directly added on the device without any treatments.

2.6. Batch Mode Binding Experiments

An adsorption experiment was carried out to study binding properties of MIP and NIP. In this batch experiment, 20 mg of MIP or NIP were added to 2.5 mL of standard solution of 4-HPA and analogues with various concentrations ranging from 0.5 to 1000 mg/L. All solutions of analytes were prepared by dilution in water of stock solutions. The mixture was incubated for 24 h at room temperature stirring at 450 rpm. The supernatants and polymer were isolated by centrifugation and filtration (0.45 μm). The concentration of unbound analytes in the supernatant was analyzed by HPLC-DAD-MS. All the model parameters were evaluated by both non-linear regression and linear least-squares method using OriginPro v. 8.0 software of OriginLab Corp. (Northampton, UK).

2.7. MISPE Cartridge Preparation and Extraction Conditions

MISPE cartridge was prepared packing the resulting microparticles polymer (100 mg) into an empty SPE polypropylene cartridge of 3 mL between two frits with 20 μm pore size (Agilent Technologies). A similar procedure was used to prepare the NIP-SPE cartridge. Before conditioning, cartridges were washed and dried. A vacuum SPE manifold system (Varian Technologies, Palo Alto USA) with vacuum control press-pump (Selecta, Spain) was used in the SPE procedure.

For optimum conditions, the MISPE cartridge was conditioning with 2.0 mL of water and then 2.0 mL of acetonitrile and loading with 0.5 mL of a 4-HPA standard solution (4 mg/L) in water. The washing step was carried out using 1.0 mL of water. The analyte retained in the cartridge was eluted using 1.5 mL of acetonitrile with 1% formic acid. Solutions were added to the cartridge and then allowed to pass through the column under vacuum conditions. Both the washing and elution fractions were collected and dried under a gentle nitrogen stream at room temperature. The residues were reconstituted with the adequate volume of mobile phase previous HPLC-DAD-MS analysis.

2.8. Analytical Figure of Merit

The MISPE-LC-DAD-MS method developed was validated in terms of linearity, reproducibility, and detection and quantification limits (LOD and LOQ). Linearity was expressed by means of the coefficient of determination (r^2). The LOD and LOQ values were calculated at signal-to-noise ratios of 3 and 10 respectively, following International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) recommendations. Finally, the reproducibility of the method was evaluated with the relative standard deviation parameter RSD in term of reproducibility (inter-day precision and intra-day precision) at three levels of fortification: 2, 20, and 40 mg/L.

3. Results and Discussion

3.1. MIP Design, Template, and Analogues Selection

MIPs are highly reticulated network polymers consisting of a common matrix structure and binding sites formed by a template present during polymer synthesis and monomers are chosen in order to complement functional groups of a template molecule. After remove of the template, binding sites remain that are capable of rebinding the template with high affinity and selectivity. These sites can interact with the template molecules in a non-covalent way, such as via coulombic interactions, hydrogen bonding, ion coordinating, π - π stacking, hydrophobic and van der Waals forces, or by reversible formation of covalent bonds [24]. Non-covalent imprinting is efficient for low-molecular-weight compounds and templates containing acids are often well targeted using basic functional monomers such as vinylpyridine (4-Vpy), or amide monomers such as acrylamide (MA) [18,24]. Some authors suggested that the best recognition ability depended on the pKa relationship between monomer and template. The basic character of 4-Vpy (pKa = 5.4) makes it a good candidate for phenolic acid templates [10,18,22]. Sun et al. also related the rigid structure of templates to the recognition ability of synthesized MIP [19]. Templates with high molecular rigidity (e.g., 4-HBA or 4-HPA) showed a much stronger imprinting effects. Therefore, MIP was synthesized using 4-HPA as a template, 4-Vpy as a functional monomer, ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) as a crosslinker, 2,2'-azobis(2-methyl-propionitrile (AIBN) as polymerization reaction initiator. The polymerization was carried out in a molar ratio of 1:4:20 (template/4-Vpy/EGDMA). Porogen plays an important role in the polymer morphology and also affects the ionic interactions and hydrogen bonds between target and the functional monomer [23]. An aprotic and polar solvent such as ACN was chosen as porogen. The optimized volume of porogen was 10 mL.

Recently, a large number of phenolic acids and other catabolites have been detected in urine after flavonoid intake [2,5,25–27]. Maximum concentration of phenolic metabolites depends of the parent flavonoid and the excretion time [25]. We chose 4-HPA as the target and template analyte because it is determined in higher concentration in urine and presents more flexibility than other phenolic acid molecules. Additionally, maximum peak excretions by 4-HPA were observed between 4–5 h post-consumption [25]. On the other hand, the sorption properties of molecularly imprinted polymers with imprints of phenolic acids and their derivatives were found to depend on the number and location of hydroxyl and carboxyl groups [17]. In order to assess the MIP, we chose other well-known metabolites as analogues present in urine (Figure 1). We chose an isomer of a template, 3-hydroxyphenylacetic acid (3-HPA). Furthermore, we chose three compounds with structural similarity: 4-hydroxybenzoic acid (4-HBA), 3,4-dihydroxybenzoic acid (protocatechuic acid, PCA), and 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid (syringic acid, SyA). Further, 4-HBA also has structural similarity with gallic acid, caffeic acid, and vanillic acid, which are well-known metabolites. The last, hippuric acid (HA), proposed as a biomarker for dietary flavonoid intake [3], was included.

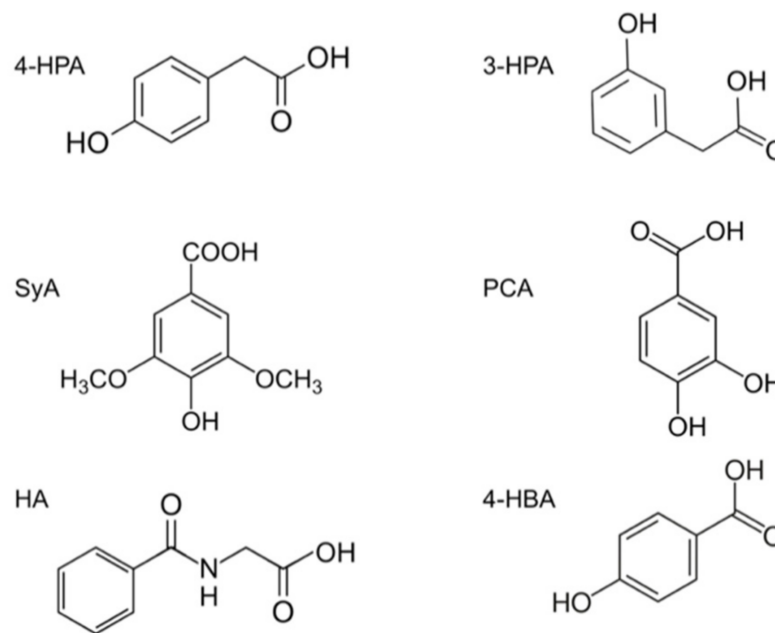


Figure 1. Chemical structures of the template (4-HPA) and its analytes analogues (3-HPA, PCA, 4-HBA, SyA, and HA).

3.2. Polymer Characterizations

Polymer structures (MIP and NIP) were studied by BET and SEM. In the BET procedure, nitrogen adsorption isotherm determination is used to obtain information about the total pore volume and the surface area [26]. BJH desorption pore volumes obtained were 4.80 cm³/g for MIP and 0.75 cm³/g for NIP. The specific surface determined by BET relates to the reactive area (total surface area) as all porous structures adsorb the small gas molecules. BET surface areas were found to be 274.8 and 230.7 m²/g for MIP and NIP, respectively. MIP and NIP showed a similar physisorption isotherms and similar surface areas, which could indicate that MIP had a similar structure to NIP. However, when considering the pore volume, the MIP exhibited 6 time more pore volume than the corresponding NIP. Figure 2 shows BET data of surface areas and the linear plot obtained for MIP and NIP for N₂ at 77 K.

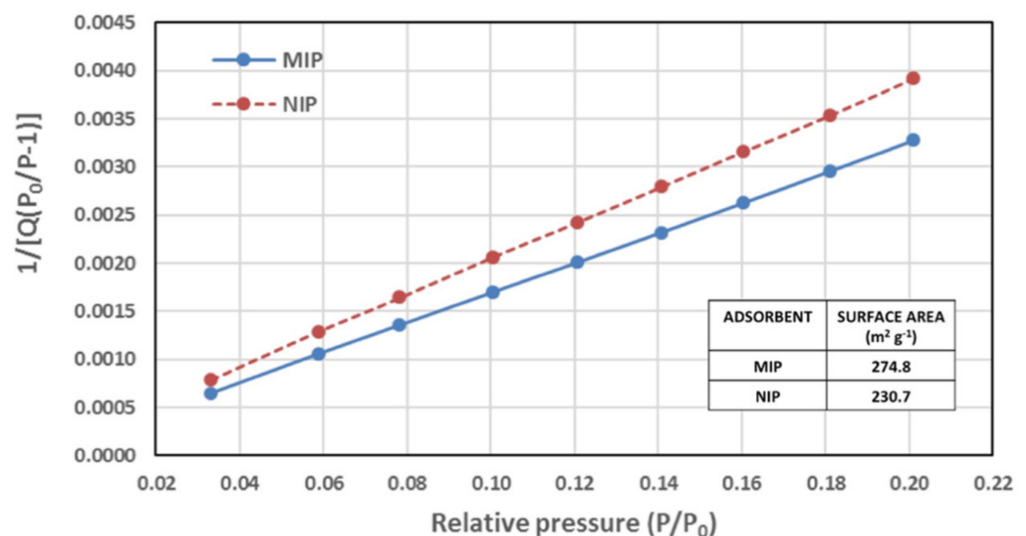


Figure 2. BET data of surface areas and linear plot obtained for molecularly imprinted polymer (MIP) and nonimprinted polymers (NIP) for N₂ at 77 K (Q is quantity adsorbed in cm³/g).

MIP and NIP particles morphology were explored by SEM. SEM is especially useful for convenient inspections of grain structures. Figure 3 presents the SEM microscopic images of the MIP particles by crushed polymer monolith obtained by bulk polymerization, displaying a non-spherical shape (Figure 3A). The textural surface of polymers revealed a typical pattern on the imprinted (Figure 3B) and non-imprinted surfaces (Figure 3C). A different roughness and smoother surface of the NIP was observed [16,28].

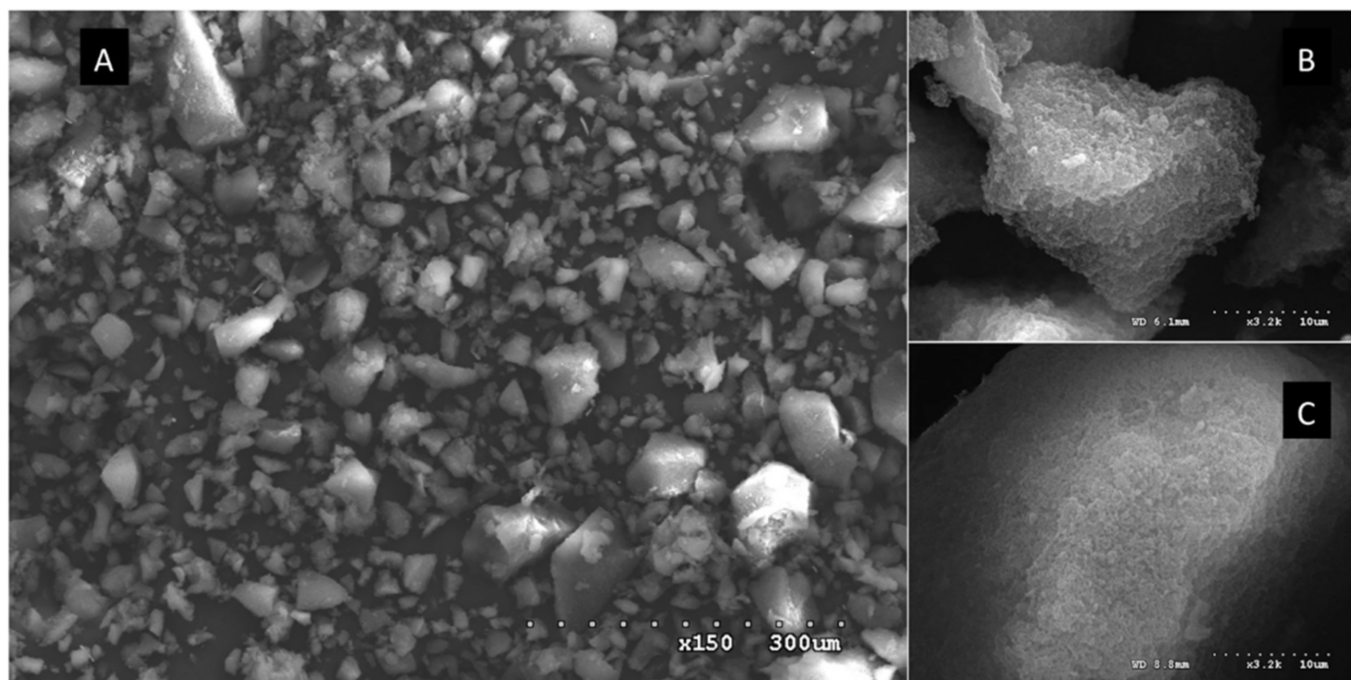


Figure 3. SEM microscopic images of crushed polymers produced by bulk polymerization method. (A) and (B) show MIP particles, magnification $\times 150$ and $\times 3200$, respectively, while (C) shows NIP particles, magnification $\times 3200$.

Figure 4 presents ATR-FTIR spectra of the MIP, NIP, and the template (4-HPA). ATR-FTIR analysis provides information about the state of the polymerization [15,16]. The non-existence of bands in the region $1680\text{--}1640\text{ cm}^{-1}$ indicates the absence of vinyl group in the polymers, and confirms their total polymerization. 4-HPA presents characteristic bands at 3200 and 1690 cm^{-1} associated with the O–H and C=O stretching of carboxylic acid; 1400 cm^{-1} is assigned to vibrations of the benzene ring, and 1270 cm^{-1} corresponds to O–H stretching of phenols. The absence of characteristic bands for template also indicates a successful extraction process [15,16]. Some authors are associated other characteristic MIP and NIP bands to crosslinker or the existence of poly(EGDMA) [14,22]. MIP and NIP present similar spectra, except for the intensity of the C=O stretching vibration band (1724 cm^{-1}). In NIP, this band is lower than that of MIP [14,22].

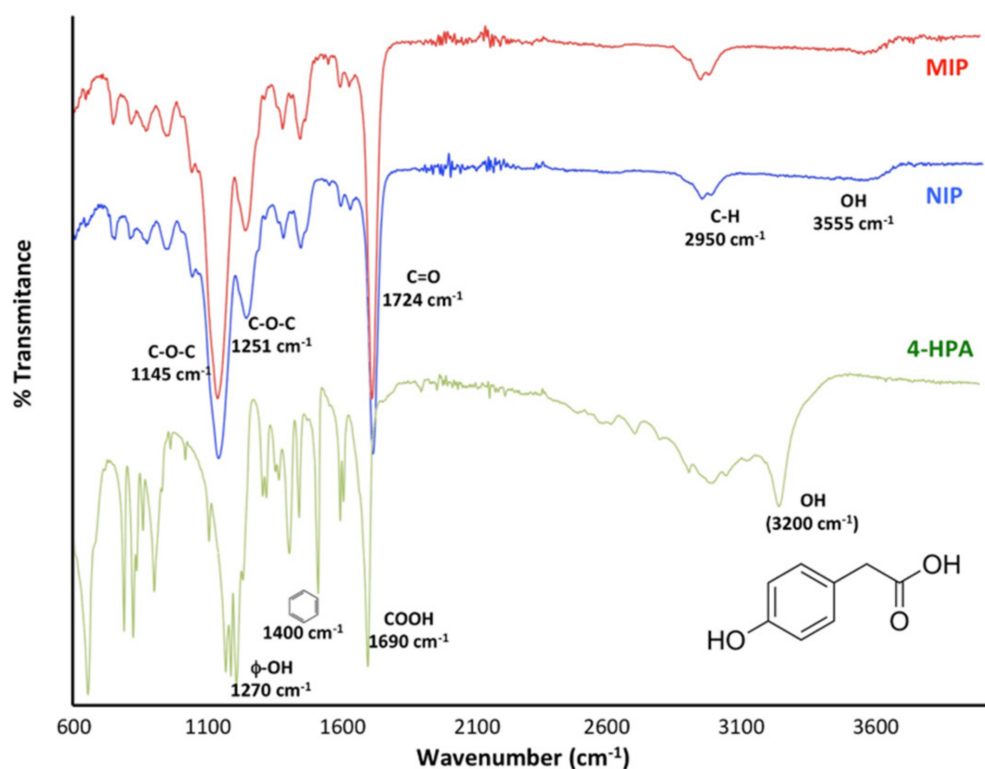


Figure 4. ATR-FTIR spectra for MIP, NIP, and 4-HPA.

3.3. Binding Properties and Adsorption Isotherms

For evaluation of the imprinting ability of phenolic acids, its imprinting factors (IF) were evaluated. IF compares the adsorption ability of MIP to NIP and was obtained from the ratio of the adsorption capacity of MIP (Q_{MIP}) to NIP (Q_{NIP}). Results indicate that the template presents higher adsorption capacity and stronger interaction than its structural analogues because the MIP specific sites are complementary in shape, size, and spatial distribution to template. Consequently, the highest IF is presented by 4-HPA (the template), followed by its isomer (3-HPA), IF values were 3.5 and 3.2. Other analogues show intermediate IF values. SyA IF value was 2.9, PCA and 4-HBA IF values were 2.6 and 2.4, respectively. On the other hand, the lowest IF is presented by HA, IF was 2.2. It can also be seen that IF values are more than 1.0, and MIPs exhibit an imprinting effect for studied compounds with chemical structures similar to that of the 4-HPA imprinting template [17]. In MIP, adsorption capacities were influenced by the presence, number, and position of hydroxyl and carboxyl groups in the aromatic ring [17,29]. On the other hand, the position of the hydroxyl group in relation to the carboxyl group also influences selectivity of MIP [16].

Modeling the adsorption isotherm data is an essential way for predicting and comparing the adsorption performance. In this work, Langmuir and Freundlich isotherm models were used to analyze the adsorption data of MIP [30]. Table 1 resume Langmuir and Freundlich isotherm parameters for MIP and the different phenolic acids. Standard deviation (SD) and the correlation coefficient (R) were used to determine the best-fitting isotherm to the experimental data. Results suggest that Langmuir model was more applicable to estimate the affinity distributions than the Freundlich model according to the correlation coefficients (R). These clearly show that the MIP values of Q_{max} , obtained in the Langmuir model, were higher for 4-HPA and 3-HPA.

Table 1. Langmuir and Freundlich isotherm parameters obtained by non-linear fitting for the MIP polymer.

Model	Parameters	4-HPA		3-HPA		4-HBA		PCA		SyA		HA	
		Value	S.D.	Value	S.D.	Value	S.D.	Value	S.D.	Value	S.D.	Value	S.D.
Langmuir $\frac{1}{Q} = \left[\frac{1}{Q_{\max} K_L} \right] \times \frac{1}{C_e} + \frac{1}{Q_{\max}}$	A = 1/Q _{max}	0.0076	0.013	0.009	0.008	0.024	0.010	0.025	0.005	0.017	0.004	0.009	0.026
	B = 1/(K _L Q _{max})	10.173	0.179	11.644	0.101	12.186	0.136	10.025	0.068	9.810	0.053	17.492	0.351
	R	0.998	-	0.999	-	0.999	-	0.999	-	0.999	-	0.997	-
Freundlich $\log Q = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e$	A = log K _F	-0.875	0.094	-0.914	0.058	-0.908	0.045	-0.809	0.065	-0.822	0.056	-1.096	0.081
	b = 1/n	0.898	0.042	0.872	0.026	0.827	0.020	0.8139	0.029	0.845	0.030	0.891	0.038
	R	0.992	-	0.993	-	0.995	-	0.989	-	0.991	-	0.986	-

C_e is the concentration of solution at equilibrium (mg/L), Q is the corresponding adsorption capacity (mg/g), Q_{max} (mg/g) and K_L (L/mg) are constants which are related to adsorption capacity and energy or net enthalpy of adsorption, respectively. K_F and n are Freundlich constants which correspond to adsorption capacity and adsorption intensity, respectively.

3.4. Optimization of MISPE Procedure

In this study, volume and concentration of sample, loading, washing, and elution solvents and volumes were optimized. Before the sample loading, the cartridge was conditioning with 2 mL of water and then 2 mL of ACN. The loading solvent is chosen in order to allow rebinding of the analyte to specific sites, whereas the elution solvent has to be optimized according to its ability to disrupt the analyte–polymer interaction. In accordance with the literature, the solvent used as porogen during polymerization was chosen as the loading solvent. Then, different concentrations of 4-HPA (4 to 100 mg/L) in water were prepared to assess loading concentration. In this concentration range, results obtained did not show significant difference in the recovery. Therefore, lower concentration of 4 mg/L was chosen as the working concentration. Loading was carried out maintaining the sample onto the cartridge during 5 min and then it was passed through the column under vacuum conditions. Subsequently, different sample volumes (0.5–2 mL) were tested to evaluate the loading. The retained 4-HPA was evaluated and calculated as the difference between 4-HPA total amounts loaded onto the cartridge initially, and collected 4-HPA in the fractions from the loading and washing steps. In each process, the obtained extracts were injected into the HPLC-DAD-MS system to evaluate the best procedure.

Before the elution, the washing step was carried out in order to remove the interfering compounds non-specifically retained. The presence of non-specific binding sites is attributed to the high amount of monomer used during MIP synthesis by the non-covalent approach, and it was well known that polar and protic solvents weakened the non-covalent specific interactions between template and MIP. In this step, different washing solvents and volumes were investigated in this study: water, acetonitrile, methanol, and mixtures of water:ACN (80:20 and 90:10). The results indicated that best MIP recoveries and purification effect were achieved when water was used as the washing solvent (see Figure 5). Washing volume was also optimized and a volume of 1 mL of water was used as the optimum washing condition. On the other hand, the different recoveries obtained for NIP and MIP indicated that the interactions between the template and MIP were specific. In the wash step, analyte is lost when NIP is used as an adsorbent.

To ensure complete elution of the adsorbed analyte from the MISPE procedure, it is necessary to find out the appropriate solvent. Consequently, the efficacy of various solvents for the elution of 4-HPA was evaluated. The solvents tested were MeOH and ACN, with or without 1% formic, mixtures of both in different proportions (20:80; 50:50; 80:20). MeOH with acetic acid in proportion (8:2) was also tested. The best recovery was obtained using acetonitrile with 1% formic acid. Different volumes of elution have also been tested. These studies revealed that the optimum volume of elution was 1.5 mL. In urine samples, the recovery obtained from 4-HPA under the MISPE optimized conditions were of 94% (RSD 1.2).

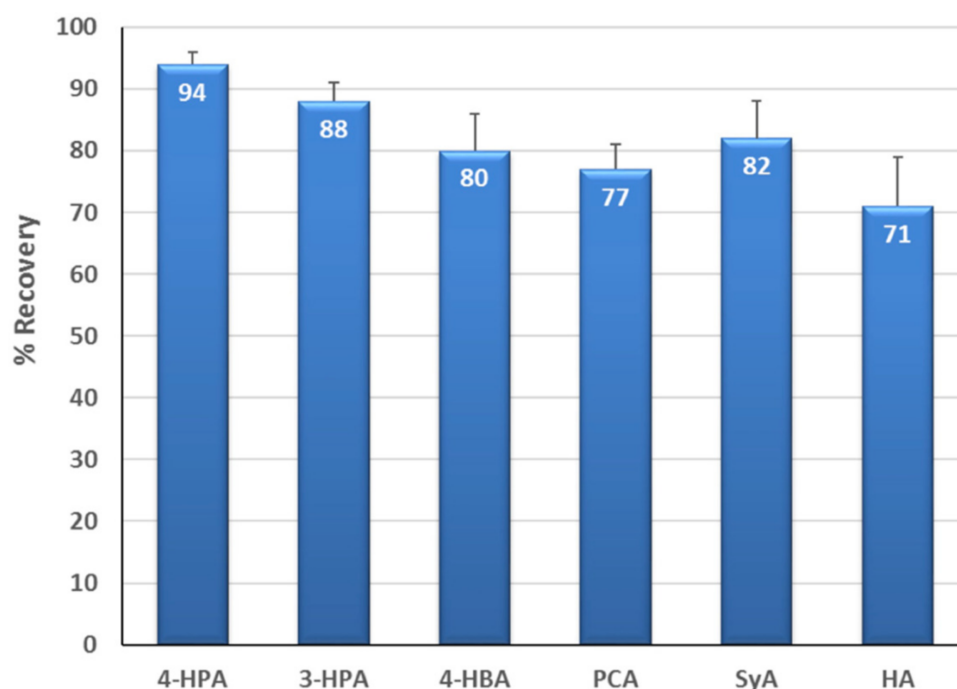


Figure 5. Recoveries percentage of the phenolic acid analogues obtained from the MISPE procedure. In the urine sample, the concentration of each phenolic acid was 4 mg/L. Error bars indicate the standard deviation of replicates ($n = 3$).

3.5. Validation of the MISPE Procedure

The MISPE-LC-DAD-MS method developed was validated in terms of linearity, reproducibility, and detection and quantification limits (LOD and LOQ), and average recoveries for 4-HPA under the optimized experimental conditions. Those were determined using spiked blank urine samples, prepared as previously has been described. Calibration curves were obtained using ten different concentrations (range from 0.25–40 mg/L). The reproducibility of method, which was evaluated with the relative standard deviation parameter (RSD) in term of reproducibility (inter-day precision and intra-day precision) at three levels of fortification: 2 mg/L, 20 mg/L, and 40 mg/L. The intra-day precision was demonstrated at these three levels and RSD as well. Results are summarized in Table 2. Finally, the recovery values were more than 94% (RSD 1.2%) over the range of concentrations tested.

Table 2. Validation parameter of the MISPE procedure.

Method	r^2	LOD mg/L	LOQ mg/L	Reproducibility (RSD)					
				Inter-Day Precision			Intra-Day Precision		
				2 mg/L	20 mg/L	40 mg/L	2 mg/L	20 mg/L	40 mg/L
MISPE-LC-DAD-MS	0.990	1.22	3.69	1.6%	2.8%	2.8%	6.7%	3.2%	3.1%

3.6. Selectivity of MIP

The complete confirmation of the imprinting performance involves the study of the selectivity of the MIP. This was accomplished by determination of binding capacity of the MIP in presence of other structural analogues of the 4-HPA.

The MISPE procedure was assessed mixing all studies analytes. In the urine sample, the concentration of each phenolic acid was 4 mg/L. Figure 5 shows the comparative recoveries obtained for each. Experiments studying the retention on the NIP in the same conditions than the MIP were done, but the result on NIP were inconsiderable in comparison to MIP.

MIP shows a highly specific molecular recognition for the template (94% of recovery, RSD 1.2%) over similar analogues. Molecular recognition of the compounds was influenced by the presence, number, and position of hydroxyl and carboxyl groups in the aromatic ring [16,17,29,31]. From the compounds tested 3-HPA, isomer of 4-HPA, shows the best structural resemblance, as its only difference is the hydroxyl group position, and recovery value was 88%. All the compounds bear carboxyl and multiple hydroxyl groups being for this reason prone to forming hydrogen bonds with the polymer matrix. Accordingly, strong competition for specific and non-specific binding sites is expected. Moreover, this did not significantly affect the recoveries values of 4-HPA. The retention order of the compounds is associated with their potency to form strong hydrogen bonds and therefore follows the order of the number of hydroxyl and carboxyl groups. Syringic acid (82%) and 4-HBA (80%) are strongly retained, followed by PCA (77%), and HA as the less retained (71%). In addition, the molecular size also conditioned the recoveries values [16,17,29,31].

These results show that 4-HPA-MIP is an effective sorbent and was successfully applied to the extraction of 4-HPA and other phenolic acids. On the other hand, the advantages of MIP as the selective sorbent was demonstrated because it provides greater specificity compared to other sorbents.

The selective extraction of these metabolites helps improve the application and results obtained by other less sensitive analysis methods than the validation method. It also facilitates the development of new screening methods as electrochemical sensors to estimate polyphenol excretion (unpublished authors work).

4. Conclusions

In this study, a molecularly imprinted polymer against 4-HPA was synthesized and applied as the selective sorbent in SPE for the treatment of human urine samples prior analysis. The results indicated that the MISPE proposed method had high recoveries, low detection limit, and good repeatability, providing a specific, reliable, and alternative method to determine phenolic acid, secondary metabolites of dietary flavonoid compounds, in human urine samples. In light of the above, we have developed a rapid and straightforward sample preparation. The proposed MISPE procedure can be seen as a specific and simple tool for the studies of bioavailability of dietary flavonoid compounds. MIP applications in the analytics determination of phenolic acid have been limited. In our knowledge, it is the first time that a MISPE procedure is applied to analyze urinary catabolites of a polyphenol compound.

Author Contributions: Research design, D.G.-G., J.S.J. and A.G.-P.; measurements and experiments, M.M.-G.; development, analysis of data, and presentation for results, M.M.-G. and A.G.-P.; writing—original draft preparation, M.M.-G.; writing—review and editing, D.G.-G., J.S.J. and A.G.-P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: Authors thank Ángel Maroto from the Department of Inorganic Chemistry and Technical Chemistry, and Department of Mathematical Physics and Fluids, Faculty of Sciences, National University of Distance Education (UNED), for the SEM and BET studies.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Williamson, G.; Kay, C.D.; Crozier, A. The bioavailability, transport, and bioactivity of dietary flavonoids: A review from a historical perspective. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2018**, *17*, 1054–1112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Achaintre, D.; Buleté, A.; Cren-Olivé, C.; Li, L.; Rinaldi, S.; Scalbert, A. Differential isotope labeling of 38 dietary polyphenols and their quantification in urine by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 2637–2644. [[CrossRef](#)]
3. Penczynski, K.J.; Krupp, D.; Bring, A.; Bolzenius, K.; Remer, T.; Buyken, A.E. Relative validation of 24-h urinary hippuric acid excretion as a biomarker for dietary flavonoid intake from fruit and vegetables in healthy adolescents. *Eur. J. Nutr.* **2017**, *56*, 757–766. [[CrossRef](#)]
4. Pérez-Jiménez, J.; Hubert, J.; Hooper, L.; Cassidy, A.; Manach, C.; Williamson, G.; Scalbert, A. Urinary metabolites as biomarkers of polyphenol intake in humans: A systematic review. *Am. J. Clin. Nutr.* **2010**, *92*, 801–809. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Ulaszewska, M.M.; Trost, K.; Stanstrup, J.; Tuohy, K.M.; Franceschi, P.; Chong, M.F.F.; George, T.; Minihane, A.M.; Lovegrove, J.A.; Mattivi, F. Urinary metabolomic profiling to identify biomarkers of a flavonoid-rich and flavonoid-poor fruits and vegetables diet in adults: The FLAVURS trial. *Metabolomics* **2016**, *12*. [[CrossRef](#)]
6. De Rijke, E.; Out, P.; Niessen, W.M.A.; Ariese, F.; Gooijer, C.; Brinkman, U.A.T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1112*, 31–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Pereira-Caro, G.; Ludwig, I.A.; Polyviou, T.; Malkova, D.; Garcia, A.; Moreno-Rojas, J.M.; Crozier, A. Identification of plasma and urinary metabolites and catabolites derived from orange juice (poly)phenols: Analysis by high-performance liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 5724–5735. [[CrossRef](#)]
8. Mora-Granados, M.; González-Gómez, D.; Gallego-Picó, A. Feasibility of the determination of three flavan-3-ols metabolites in urine samples via parallel factor analysis of fluorescence emission matrices. *J. Funct. Foods* **2017**, *37*, 303–309. [[CrossRef](#)]
9. Casado, N.; Morante-Zarcaro, S.; Pérez-Quintanilla, D.; Cámara, J.S.; Sierra, I. Two novel strategies in food sample preparation for the analysis of dietary polyphenols: Micro-extraction techniques and new silica-based sorbent materials. *Trends Food Sci. Tech.* **2020**, *98*, 167–180. [[CrossRef](#)]
10. Dmitrienko, S.G.; Irkha, V.V.; Duisebaeva, T.B.; Mikhailik, Y.V.; Zolotov, Y.A. Synthesis and study of the sorption properties of 4-hydroxybenzoic acid-imprinted polymers. *J. Anal. Chem.* **2006**, *61*, 14–19. [[CrossRef](#)]
11. Dmitrienko, S.G.; Kudrinskaya, V.A.; Apyari, V.V. Methods of extraction, preconcentration, and determination of quercetin. *J. Anal. Chem.* **2012**, *67*, 299–311. [[CrossRef](#)]
12. Karasova, G.; Lehotay, J.; Klodzinska, E.; Gadzala-Kopciuch, R.; Buszewski, B. Comparison of several extraction methods for the isolation of benzoic acid derivatives from *Melissa officinalis*. *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.* **2006**, *29*, 1633–1644. [[CrossRef](#)]
13. Karasova, G.; Lehotay, J.; Sadecka, J.; Skacani, I.; Lachova, M. Selective extraction of derivatives of p-hydroxybenzoic acid from plant material by using a molecularly imprinted polymer. *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 2468–2476. [[CrossRef](#)]
14. Chen, F.F.; Wang, G.Y.; Shi, Y.P. Molecularly imprinted polymer microspheres for solid-phase extraction of protocatechuic acid in *Rhizoma homalomenae*. *J. Sep. Sci.* **2011**, *34*, 2602–2610. [[CrossRef](#)]
15. Denderz, N.; Lehotay, J. Using of molecularly imprinted polymers for determination of gallic and protocatechuic acids in red wines by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1372*, 72–80. [[CrossRef](#)]
16. Denderz, N.; Lehotay, J. Application of the van't Hoff dependences in the characterization of molecularly imprinted polymers for some phenolic acids. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1268*, 44–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Dmitrienko, S.G.; Irkha, V.V.; Apyari, V.V.; Klokov, E.V.; Zolotov, Y.A. Recognition of hydroxybenzoic acids and their esters by molecularly imprinted polymers. *Mendeleev Commun.* **2008**, *18*, 315–317. [[CrossRef](#)]
18. Michailof, C.; Manesiotis, P.; Panayiotou, C. Synthesis of caffeic acid and p-hydroxybenzoic acid molecularly imprinted polymers and their application for the selective extraction of polyphenols from olive mill waste waters. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1182*, 25–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Sun, B.W.; Li, Y.Z.; Chang, W.B. Molecularly imprinted polymer using p-hydroxybenzoic acid, p-hydroxyphenylacetic acid and p-hydroxyphenylpropionic acid as templates. *J. Mol. Recognit.* **2001**, *14*, 388–392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Li, N.; Ng, T.B.; Wong, J.H.; Qiao, J.X.; Zhang, Y.N.; Zhou, R.; Chen, R.R.; Liu, F. Separation and purification of the antioxidant compounds, caffeic acid phenethyl ester and caffeic acid from mushrooms by molecularly imprinted polymer. *Food Chem.* **2013**, *139*, 1161–1167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Sun, B.W.; Wu, L.Q.; Li, Y.Z. Experimental and theoretical study on p-hydroxybenzoic acid imprinted polymers with different functional monomers. *Acta Chim. Sin.* **2004**, *62*, 598–602.
22. Boscarì, C.N.; Mazzuina, G.R.; Wisniewski, C.; Borges, K.B.; Figueiredo, E.C. Molecularly imprinted probe for solid-phase extraction of hippuric and 4-methylhippuric acids directly from human urine samples followed by MEKC analysis. *Electrophoresis* **2017**, *38*, 1083–1090. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Ye, L.; Mosbach, K. Molecularly imprinted microspheres as antibody binding mimics. *React. Funct. Polym.* **2001**, *48*, 149–157. [[CrossRef](#)]
24. Cieplak, M.; Kutner, W. Artificial Biosensors: How Can Molecular Imprinting Mimic Biorecognition? *Trends Biotechnol.* **2016**, *34*, 922–941. [[CrossRef](#)]
25. De Ferrars, R.M.; Czank, C.; Zhang, Q.; Botting, N.P.; Kroon, P.A.; Cassidy, A.; Kay, C.D. The pharmacokinetics of anthocyanins and their metabolites in humans. *Br. J. Pharmacol.* **2014**, *171*, 3268–3282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Nash, V.; Ranadheera, C.S.; Georgousopoulou, E.N.; Mellor, D.D.; Panagiotakos, D.B.; McKune, A.J.; Kellett, J.; Naumovski, N. The effects of grape and red wine polyphenols on gut microbiota—A systematic review. *Food Res. Int.* **2018**, *113*, 277–287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Sasot, G.; Martínez-Huelamo, M.; Vallverdu-Queralt, A.; Mercader-Martí, M.; Estruch, R.; Lamuela-Raventós, R.M. Identification of phenolic metabolites in human urine after the intake of a functional food made from grape extract by a high resolution LTQ-Orbitrap-MS approach. *Food Res. Int.* **2017**, *100*, 435–444. [[CrossRef](#)]
28. De Middeleer, G.; Dubruel, P.; De Saeger, S. Characterization of MIP and MIP functionalized surfaces: Current state-of-the-art. *Trac-Trends Anal. Chem.* **2016**, *76*, 71–85. [[CrossRef](#)]
29. Shi, S.Y.; Guo, J.F.; You, Q.P.; Chen, X.Q.; Zhang, Y.P. Selective and simultaneous extraction and determination of hydroxybenzoic acids in aqueous solution by magnetic molecularly imprinted polymers. *Chem. Eng. J.* **2014**, *243*, 485–493. [[CrossRef](#)]
30. Baggiani, C.; Giraudi, G.; Giovannoli, C.; Tozzi, C.; Anfossi, L. Adsorption isotherms of a molecular imprinted polymer prepared in the presence of a polymerisable template—Indirect evidence of the formation of template clusters in the binding site. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *504*, 43–52. [[CrossRef](#)]
31. Schwarz, L.J.; Danylec, B.; Harris, S.J.; Boysen, R.I.; Hearn, M.T.W. Preparation of molecularly imprinted polymers for the selective recognition of the bioactive polyphenol, (E)-resveratrol. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 2189–2195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Applied Sciences Statistics

Overview

Applied Sciences in Numbers

Applied Sciences (ISSN: 2076-3417)

Founded: 2011 (Volumes: 11)

23,152 articles published so far

2280 articles have been cited 10 times or more (h-10 index)

Impact Factor

Current Impact Factor: 2.474

5-year Impact Factor: 2.458

JCR category rank: 88/177 (Q2) in 'Chemistry, Multidisciplinary'; 62/154 (Q2) in 'Physics, Applied'; 32/91 (Q2) in 'Engineering, Multidisciplinary' and 161/314 (Q3) in 'Materials Science, Multidisciplinary'

Impact Factor of *Applied Sciences*

