



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**  
**TESIS DOCTORAL**

TÉCNICAS MINIATURIZADAS DE TRATAMIENTO DE MUESTRA  
PARA EL ANÁLISIS DIRIGIDO Y NO DIRIGIDO DE FLUIDOS  
BIOLÓGICOS HUMANOS

**D.<sup>a</sup> María Consolación Rodríguez Palazón**  
**2023**





**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO  
TESIS DOCTORAL

TÉCNICAS MINIATURIZADAS DE TRATAMIENTO DE MUESTRA  
PARA EL ANÁLISIS DIRIGIDO Y NO DIRIGIDO DE FLUIDOS  
BIOLÓGICOS HUMANOS

Autor: D.<sup>a</sup> María Consolación Rodríguez Palazón

Director/es: D.<sup>a</sup> Natalia Arroyo Manzanares y Natalia Campillo  
Seva







**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD  
DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

*Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022*

D./Dña. María Consolación Rodríguez Palazón

doctorando del Programa de Doctorado en

Química Básica y Aplicada

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Técnicas miniaturizadas de tratamiento de muestra para el análisis dirigido y no dirigido de fluidos biológicos humanos

y dirigida por,

D./Dña. Natalia Arroyo Manzanares

D./Dña. Natalia Campillo Seva

D./Dña.

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

*Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:*

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 22 de Junio de 2023

Firmado por **MARÍA CONSOLACIÓN  
RODRIGUEZ PALAZÓN - 48452568D**  
Fdo.:

*Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.*

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia



## CERTIFICADO DE LA COMISIÓN DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

Jaime Peris Riera, Catedrático de Universidad y Secretario de la Comisión de  
Ética de Investigación de la Universidad de Murcia,

CERTIFICA: Que la Tesis Doctoral titulada *"Técnicas miniaturizadas de  
tratamiento de muestra para el análisis dirigido y no dirigido de fluidos biológicos  
humanos"*, presentada por D<sup>a</sup> María Consolación Rodríguez Palazón, está  
enmarcada en el proyecto titulado *"Nuevos retos de las técnicas de  
microextracción acopladas al análisis cromatográfico dirigidos a la mejora de la  
salud humana: control alimentario y monitorización de biomarcadores"*, siendo la  
investigadora D.<sup>a</sup> Natalia Campillo Seva la responsable del mismo, con número  
de registro CEI 2908/2020, y que fue informado, en la Comisión del quince de  
mayo de dos mil veinte, favorablemente.

Y para que conste y tenga los efectos que correspondan, firmo esta certificación,  
con el visto bueno de la Presidenta de la Comisión.

V<sup>o</sup> B<sup>o</sup>

LA PRESIDENTA DE LA COMISIÓN  
DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN DE LA  
UNIVERSIDAD DE MURCIA

Fdo.: María Senena Corbalán García

ID: 4696/2023







UNIVERSIDAD DE  
**MURCIA**

D<sup>a</sup>. Natalia Arroyo Manzanares, Profesora Titular de Universidad del Área de Química Analítica en el Departamento de Química Analítica, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Técnicas miniaturizadas de tratamiento de muestra para el análisis dirigido y no dirigido de fluidos biológicos humanos", realizada por D<sup>a</sup>. María Consolación Rodríguez Palazón, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 25 de junio de 2023

Firmado por ARROYO MANZANARES NATALIA -  
\*\*\*1640\*\* el día 25/06/2023 con un  
certificado emitido por AC FNMT  
Usuarios





UNIVERSIDAD DE  
**MURCIA**

D<sup>a</sup>. Natalia Campillo Seva, Catedrática de Universidad del Área de Química Analítica en el Departamento de Química Analítica, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Técnicas miniaturizadas de tratamiento de muestra para el análisis dirigido y no dirigido de fluidos biológicos humanos", realizada por D<sup>a</sup>. María Consolación Rodríguez Palazón, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 25 de junio de 2023

**CAMPILLO**  
**SEVA**  
**NATALIA** -  
**27478084F**

Firmado  
digitalmente por  
CAMPILLO SEVA  
NATALIA -  
27478084F  
Fecha: 2023.06.25  
14:03:22 +02'00'





## **AGRADECIMIENTOS**

Hace cuatro años que decidí embarcarme en esta aventura. En aquel momento nada hacía presagiar todo lo que estaba a punto de suceder. Han sido cuatro años intensos, llenos de altibajos emocionales, pero también de momentos únicos, tan únicos que hasta que hemos vivido una pandemia a lo largo de ellos. Pero, ahora que esta etapa llega a su fin, toca echar la vista atrás y hacer balance de todas las experiencias vividas. Una Tesis, como cualquier otra etapa de la vida no se recorre en solitario. Son muchas las personas que me han acompañado en estos años, por eso, llegados a este punto me gustaría dar las gracias a todas aquellas personas que, de una forma u otra, han hecho posible que hoy esté aquí.

Como no podía ser de otra forma, en primer lugar, me gustaría dar las gracias a mis dos Natalias, Dña. Natalia Campillo Seva y Dña. Natalia Arroyo Manzanares, con las que he tenido la suerte de trabajar día a día y de las que ha aprendido tanto. Sois el tándem perfecto. Gracias por el apoyo y la confianza que me habéis brindado siempre.

Al resto de profesores del departamento de Química Analítica, con D. Manuel Hernández Córdoba a la cabeza, cuya sabiduría nos guía todos los días. Tenemos muchísimo que aprender de ti, como científico, pero sobre todo, como persona.

A Elena y Miguel Ángel, dos personas fundamentales en el departamento. Gracias por estar siempre ahí, ayudándonos en todo momento. En mí quedan los largos momentos de charla y las risas entre muestra y muestra.

En estos años, son muchas las compañeras y compañeros que han pasado por los laboratorios. Todos y cada uno de ellos han ido dejando su huella en el departamento y de todos me llevo algo bueno. En especial me gustaría dar las gracias a Beatriz y Amanda, con las que tuve la suerte de pasar un año genial. Fue un año de mucho trabajo, pero el esfuerzo mereció completamente la pena. Una parte de vosotras siempre estará conmigo.

Pero si hay una persona que no podía faltar en estas líneas es Carmen María. Aunque la vida nos lleve por caminos diferentes, al final siempre acabamos remando juntas y en la misma dirección. Si hay una persona a la que tenga que dar las gracias esa eres tú. Gracias por ser una persona extraordinaria y sobre todo, una gran amiga. Coincidir en esta etapa contigo ha sido un regalo.

A Belén, cuando éramos pequeñas soñábamos en el patio del instituto con ser científicas y al final lo hemos conseguido.

A Jessica, ya he perdido la cuenta de cuantos trabajos te he dedicado, pero creo que lo bonito es precisamente eso, que avancemos juntas en la vida y nos tengamos la una a la otra en cada paso que demos. Quién me iba a decir que el primer día de clase de la carrera, al pasarte los apuntes, no solo iba a ganar una amiga, sino también una hermana. Gracias.

A Mario, Cristina y Aarón por vuestra compañía y apoyo incondicional. Es una suerte teneros siempre cerca.

Clara, hace cuatro años no solo comencé esta Tesis, también te conocí. En estos cuatro años te he visto crecer y cómo te convertías en una persona alegre, divertida, responsable, con mucho talento y una bondad infinita. Te miro y me recuerdas a mi yo de diecisiete años. Eres una persona excepcional y a las buenas personas solo le pasan cosas buenas. Me siento muy afortunada de ser parte de tu vida.

Y por último, quiero dar las gracias a las personas más importantes de mi vida, mis padres. Os debo todo lo que soy. Gracias por la confianza que siempre habéis tenido en mí, por apoyarme en todos los pasos que he decidido dar en la vida. Y gracias también a mi abuela, que lo es todo para mí.

En estos cuatro años ha habido momentos de todo tipo. Se que no siempre he estado de humor y que a veces, en los momentos de frustración, no ha sido fácil estar conmigo. Por eso, una vez más, GRACIAS. Espero haber estado a la altura.

*"There are going to be people along the way who will try to undercut your success, but if you just focus on the work and you don't let those people sidetrack you, someday when you get where you're going, you'll look around and you'll know that it was you and the people who love you who put you there and that will be the greatest feeling in the world"*

*Taylor Swift*



# ÍNDICE





---

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>SUMMARY</b> .....	5
<b>OBJETIVOS</b> .....	9
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	15
1. ALCALOIDES .....	17
1.1. Características generales.....	17
1.2. Propiedades fisicoquímicas.....	19
1.3. Clasificación general de los alcaloides .....	20
1.4. Capsaicinoides.....	23
1.4.1. Propiedades farmacológicas de los capsaicinoides .....	28
1.4.2. Toxicidad de los capsaicinoides .....	33
1.5. Aminas biogénicas y derivados de la efedrina .....	34
1.5.1. Biosíntesis de las aminas biogénicas aromáticas .....	38
1.5.2. Sinefrina. Estereoisomería y actividad biológica .....	42
2. ANÁLISIS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS .....	47
3. LA DERIVATIZACIÓN EN EL PROCESO ANALÍTICO .....	50
3.1. Derivatización de aminas biogénicas. Reacción con cloruro de dansilo ....	52
4. QUÍMICA VERDE Y QUÍMICA ANALÍTICA VERDE .....	54
5. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA Y MINIATURIZACIÓN .....	57
5.1. Técnicas de microextracción .....	61
5.1.1. Microextracción en fase líquida (LPME).....	62
5.1.1.1. Microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) .....	63
5.1.2. Técnicas de microextracción en fase sólida.....	69
5.1.2.1. Microextracción dispersiva en fase sólida magnética (DMSPE) ...	70
6. ESPECTROMETRÍA DE MASAS .....	82
6.1. Acoplamiento LC-MS .....	82
6.2. Fuentes de ionización en LC-MS .....	83
6.2.1. Ionización por electrospray (ESI).....	83
6.2.2. Ionización química a presión atmosférica (APCI).....	84

---

6.2.3. Ionización fotoquímica a presión atmosférica (APPI) .....	85
6.3. Analizadores de masas .....	85
6.3.1. Cuadripolo simple (Q).....	85
6.3.2. Trampa de iones (IT).....	86
6.3.3 Triple cuadripolo (QqQ).....	86
6.3.4 Tiempo de vuelo (TOF) .....	86
7. ANÁLISIS DEL METABOLOMA: METABOLÓMICA .....	88
8. BIBLIOGRAFÍA.....	92
<b>CAPÍTULO I. ESTUDIO METABOLÓMICO DE CAPSAICINOIDES EN ORINA HUMANA MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN .....</b>	<b>109</b>
I.1. INTRODUCCIÓN.....	113
I.2. PARTE EXPERIMENTAL .....	115
I.2.1. Reactivos .....	115
I.2.2. Preparación de las disoluciones estándar .....	116
I.2.3. Instrumentación.....	116
I.2.4. Preparación de la muestra.....	118
I.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	120
I.3.1. Optimización de la separación UHPLC.....	120
I.3.2. Optimización del procedimiento DLLME .....	121
I.3.3. Validación del método .....	124
I.3.4. Análisis no dirigido.....	129
I.4. CONCLUSIONES .....	136
I.5. BIBLIOGRAFÍA.....	136
<b>CAPÍTULO II. EXTRACCIÓN DISPERSIVA EN FASE SÓLIDA MAGNÉTICA PARA LA PRECONCENTRACIÓN DE CAPSAICINOIDES EN SUERO HUMANO MEDIANTE LC-HRMS.....</b>	<b>141</b>
II.1. INTRODUCCIÓN.....	145
II.2. PARTE EXPERIMENTAL .....	147



---

II.2.1. Reactivos .....	147
II.2.2. Instrumentación.....	148
II.2.3. Síntesis de los materiales magnéticos utilizados.....	149
II.2.4. Caracterización de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @MWCNTs .....	152
II.2.5. Tratamiento de la muestra.....	153
II.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	154
II.3.1. Optimización de la etapa DMSPE .....	154
II.3.2. Caracterización del material magnético.....	160
II.3.3. Validación del método y análisis de muestras de suero.....	162
II.3.4. Estudio no dirigido para la identificación de compuestos derivados de capsaicinoides .....	167
II.4. CONCLUSIONES .....	179
II.5. BIBLIOGRAFÍA.....	179
<b>CAPÍTULO III. DETERMINACIÓN DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ORINA HUMANA MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO Y CROMATOLOGRAFÍA LÍQUIDA CON ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN.....</b>	<b>183</b>
III.1. INTRODUCCIÓN.....	187
III.2. PARTE EXPERIMENTAL.....	191
III.2.1. Reactivos .....	191
III.2.2. Instrumentación.....	191
III.2.3. Análisis UHPLC-HRMS .....	192
III.2.4. Muestras .....	193
III.2.5. Tratamiento de la muestra.....	194
III.2.6. Análisis de creatinina y muestras de orina.....	195
III.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	196
III.3.1. Optimización de la separación cromatográfica .....	196
III.3.2. Optimización del tratamiento de la muestra.....	196
III.3.3. Validación del método .....	201

---

III.3.4. Análisis de las muestras de orina .....	204
III.3.5. Análisis no dirigido.....	207
III.4. CONCLUSIONES .....	217
III.5. BIBLIOGRAFÍA.....	217
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>223</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>229</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>237</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>245</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>251</b>

# RESUMEN





El desarrollo de un nuevo método analítico implica numerosas etapas, de entre las cuales, el tratamiento de la muestra es, posiblemente, la más compleja a la vez que decisiva para el éxito del método. Por ello, en los últimos años, la investigación en el campo de la Química Analítica se ha centrado en el desarrollo de técnicas miniaturizadas de preparación de muestra que, además de simplificar la matriz y preconcentrar los analitos, van en consonancia con los principios de la Química Analítica Verde.

Los procesos miniaturizados han dado lugar a las técnicas conocidas como técnicas de microextracción que permiten la extracción y concentración de los analitos tanto en fases líquidas como sólidas, utilizando cantidades de fase extractante del orden de los microlitros o microgramos. Los métodos analíticos desarrollados en esta Tesis Doctoral siguen las pautas marcadas por los principios de la Química Analítica Verde ya que los tratamientos de muestra utilizados se basan en procedimientos de microextracción, tanto en fase líquida como en fase sólida magnética, y han permitido mejorar la sensibilidad de los métodos propuestos en comparación con la aplicación de metodologías convencionales. Además, las técnicas de microextracción proporcionan de forma simultánea una limpieza de la matriz de la muestra, lo que resulta en una mejora de la selectividad del método.

El uso de las técnicas de separación cromatográficas resulta de gran utilidad ya que permite la separación de compuestos químicos estrechamente relacionados con estructuras moleculares y propiedades fisicoquímicas muy similares. La combinación de las técnicas de microextracción con cromatografía líquida acoplada a detección por espectrometría de masas de alta resolución (LC-HRMS) ha permitido el desarrollo de métodos analíticos sensibles, selectivos y precisos de acuerdo con los principios de la Química Analítica Verde, debido a que tanto el consumo de disolventes orgánicos tóxicos como la generación de residuos es muy reducido.

La detección de los analitos una vez separados se ha llevado a cabo utilizando HRMS, concretamente la combinación híbrida de analizadores tipo cuadrupolo y tiempo de vuelo (Q-TOF), que permite no solo la identificación y cuantificación de los analitos estudiados en análisis dirigido, sino que también posibilita ampliar la búsqueda de otras especies químicas al llevar a cabo el análisis desde un enfoque no dirigido. Así, aplicando las mismas condiciones experimentales optimizadas para análisis dirigido se ha estudiado la presencia de posibles metabolitos y otros compuestos relacionados con la familia química de los analitos objeto de estudio.

Los métodos analíticos desarrollados en esta Tesis Doctoral se centran en el análisis de protoalcaloides en muestras biológicas de origen humano, concretamente orina y suero. De entre las diferentes matrices biológicas, orina y suero son las más utilizadas en bioanálisis debido a que de forma general es posible detectar un gran número de compuestos orgánicos que proporcionan información sobre el estado de salud del individuo. Además, ambos tipos de muestra se recolectan de forma relativamente sencilla y de forma mínimamente invasiva. El trabajo desarrollado a lo largo de esta Tesis Doctoral se ha estructurado en tres capítulos en los que se describen los tres métodos analíticos desarrollados y que ponen de manifiesto los buenos resultados que proporciona la combinación de las técnicas de microextracción con LC-HRMS.

Así, en el Capítulo I se ha propuesto la determinación de capsaicinoides (capsaicina, dihidrocapsaicina y pseudocapsaicina) mediante microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) en orina humana procedente de pacientes tratados con cremas analgésicas a base de capsaicina. Los resultados del análisis de las muestras se estudiaron mediante enfoque no dirigido, ampliándose la búsqueda a la detección de posibles metabolitos derivados de los capsaicinoides estudiados en análisis dirigido y a especies conjugadas formadas por unión de los analitos a biomoléculas.

En el Capítulo II, y siguiendo con la familia de los capsaicinoides, se ha propuesto un nuevo método analítico para su determinación en suero humano aplicando la técnica de microextracción dispersiva en fase sólida magnética (DMSPE) y LC-HRMS. En este capítulo también se presenta el análisis no dirigido de las muestras y, además, y gracias a los datos proporcionados por los espectros de masas se han podido dilucidar los patrones de fragmentación de los analitos, así como de algunos de los metabolitos derivados de los capsaicinoides y proponer una estrategia para la identificación de posibles metabolitos derivados de la metabolización.

Por último, en el Capítulo III, se propone un método para la determinación de aminas biogénicas (octopamina, tiramina, sinefrina y fenilefrina) en orina humana haciendo uso de la técnica DLLME y llevando a cabo el análisis de los extractos preconcentrados mediante LC-HRMS. De forma previa a la microextracción de los analitos se incluye una etapa de derivatización que mejora la sensibilidad y la selectividad del método propuesto, ya que se disminuye la polaridad de las aminas, incrementando así la eficiencia del proceso DLLME. También en este capítulo, se ha planteado un estudio no dirigido de las muestras orientado a la búsqueda de compuestos relacionados con las aminas biogénicas, así como posibles metabolitos y conjugados con otras biomoléculas, cuya vía de excreción más probable es la orina.

# SUMMARY







The development of a new analytical method involves numerous stages, among which is sample treatment, probably the most crucial and complex one to ensure the success of the new method. Therefore, in the last years, the research in the field of Analytical Chemistry has been focused on the development of miniaturized techniques for sample treatment which has led to both the simplification of the sample and the preconcentration of the analytes contained in the samples. The application of these procedures is also in accordance with the Green Analytical Chemistry Guidelines. The development of the miniaturized techniques has brought about the beginning of what is known as microextraction techniques which allow the extraction and preconcentration of analytes contained in both liquid and solid phases in a reduced volume of extractant phase on the order of microliters. The Green Analytical Chemistry guidelines and principles were followed in the development of the analytical methods proposed in the present Doctoral thesis, as the sample treatment techniques applied are based on microextraction procedures, both in liquid and in magnetic solid phases, leading to an improvement in method sensitivity in comparison with the results obtained when traditional extraction techniques are used. Additionally, a cleaning matrix step is achieved simultaneously, also providing an improvement in the method selectivity.

Chromatographic techniques prove highly useful as they are capable of providing the separation of closely related chemical compounds due to the similar molecular structures and physicochemical properties they show. The combination of microextraction techniques and liquid chromatography with high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) are responsible for the development of more accurate, sensitive, selective analytical methods, which are in accordance with Green Chemistry as far as the decrease in the use of toxic organic solvents and waste generation are concerned.

Once separated, analyte detection was carried out by HRMS, more specifically by a hybrid combination of quadrupole with time-of-flight mass spectrometry (Q-TOF-MS). Not only does this combination allow the identification and quantification of analytes under targeted approach, but also the possibility of carrying out a wider search for compounds under non-targeted approach is also allowed. Therefore, the presence of possible metabolites and other structurally related compounds with the target analytes has been studied by applying the same experimental conditions optimized for targeted analysis.

The analytical methods developed in this Doctoral Thesis are focused on the analysis of different families of protoalkaloids in biological samples, namely, serum and urine human samples. Among the different types of biological matrices, urine and serum are widely used due to their possibility to detect a large number of organic compounds in them which provide

information about the health state of individuals. Another reason for their use is the fact that its collection is relatively easy and minimally invasive.

The research carried out in this Doctoral Thesis has been organized in three chapters in which the three analytical methods developed has been described as well as presenting the successful results obtained when the microextraction techniques and LC-HRMS are combined.

Therefore, in the first chapter, an analytical method for the determination of three capsaicinoids (capsaicin, dihydrocapsaicin and N-vanillylnonanamide also known as pseudocapsaicin) by dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) in human urine collected from patients who have been previously treated with capsaicin-based analgesic creams has been proposed. The results obtained were also studied under non-targeted approach with the purpose of expanding the search to the detection of possible metabolites derived from the capsaicinoids studied under the targeted approach and to a conjugated compounds resulting from the binding of the analytes to other biomolecules.

In the second chapter, the knowledge of the three capsaicinoids studied in the previous chapter is expanded under another methodology. Thus, a new analytical method for its determination has been used, which consists in applying dispersive magnetic solid phase microextraction (DMSPE) and LC-HRMS. In this chapter, the non-targeted approach is also addressed. Additionally, thanks to the spectrum data provided by the mass spectrum, the fragmentation patterns of both the analytes and some metabolites derived from the capsaicinoids have been able to be elucidated.

Finally, in the third chapter, a new method for the determination of four biogenic amines (octopamine, tyramine, synephrine and phenylephrine) in human urine by DLLME has been proposed. The analysis of the enrichment extract has been carried out by LC-HRMS. Prior to analysis, a derivatization step was applied in order to improve the sensitivity and selectivity of the method, which is responsible for a decrease in the polarity of the selected amines while an increase in the efficiency of the DLLME procedure is also achieved. In this chapter, a non-targeted analysis of the samples was also carried out to focus on the search for amine-related compounds as well as possible metabolites and bioconjugates whose most likely route of excretion is urine.

# OBJETIVOS





El trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral se enmarca en la línea de trabajo que el grupo de investigación “Métodos Instrumentales Aplicados” ha ido desarrollando en los últimos años en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Murcia. El objetivo principal de esta línea de investigación es el desarrollo y aplicación de nuevos procedimientos analíticos orientados a la determinación de compuestos orgánicos en una amplia variedad de muestras, haciendo uso de diferentes técnicas instrumentales y procedimientos para el tratamiento de las muestras, que proporcionen características adecuadas de sensibilidad y selectividad a los métodos de análisis desarrollados.

El objetivo fundamental de esta Tesis Doctoral ha sido la propuesta de metodologías de análisis innovadoras para la determinación de compuestos de interés en muestras biológicas de origen humano. Para ello, diferentes técnicas de microextracción, tanto en fase líquida como en fase sólida, se han optimizado con el objetivo de garantizar un aislamiento eficiente de los compuestos de interés con simplificación simultánea de la muestra. En consecuencia, se ha perseguido el desarrollo de nuevos métodos analíticos alineados con los principios de la Química Analítica Verde en cuanto a la miniaturización del sistema analítico y la reducción en el uso de disolventes orgánicos y de residuos generados en el proceso. El análisis de los extractos de las muestras se ha llevado a cabo mediante la combinación de la cromatografía líquida con la espectrometría de masas de alta resolución (LC-HRMS), bajo condiciones de adquisición de datos que permiten llevar a cabo análisis dirigido y no dirigido de las muestras.

La Memoria de esta Tesis Doctoral se divide en tres capítulos cuyo nexo de unión es la determinación de diferentes tipos de protoalcaloides en muestras biológicas, de gran utilidad en los ámbitos biosanitario y forense, ya que estos compuestos se consideran marcadores de ciertos trastornos de la salud o indicativos del consumo de sustancias controladas por determinados organismos internacionales para ciertas actividades. A su vez, los capítulos primero y tercero tienen en común el uso de la técnica de microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME), mientras que el segundo capítulo presenta la aplicación de la técnica de microextracción dispersiva en fase sólida magnética (DMSPE) en la preparación de las muestras. Por otro lado, y desde el punto de vista de los analitos determinados, los dos primeros capítulos abordan la determinación de capsaicinoides en orina y en suero, mientras que el tercer capítulo se centra en la determinación de aminas biogénicas en orina.

Los objetivos específicos establecidos para la realización de esta Tesis Doctoral se estructuraron como se describe a continuación:

1. Identificación del problema analítico y selección de los compuestos de interés y de la matriz objeto de análisis, incluyendo un estudio previo de las propiedades fisicoquímicas de los analitos y la muestra.
2. Estudio de las condiciones de separación cromatográfica mediante LC, comparando diferentes fases estacionarias y móviles para la selección las condiciones experimentales que proporcionen la mejor resolución de los picos cromatográficos.
3. Selección de las condiciones de detección mediante HRMS tras la separación cromatográfica. En este punto se estudian distintos modos de ionización y condiciones de fragmentación, así como el modo de adquisición de datos que permita aplicar análisis dirigido y no dirigido de las muestras.
4. Selección y optimización del tratamiento de la muestra enfocado hacia la aplicación de la técnica de microextracción más adecuada en base a las características de los analitos y de la muestra.
5. Evaluación de la derivatización química de los analitos en aras de mejorar la eficiencia del pretratamiento de las muestras, así como la resolución cromatográfica y detección mediante HRMS. Para ello, se procede a la selección del reactivo derivatizante y de las condiciones experimentales de reacción en función de la naturaleza de los compuestos bajo estudio.
6. Validación de los métodos analíticos propuestos en base a los criterios establecidos por la normativa europea, obteniendo las características analíticas de intervalos de linealidad, sensibilidad en términos de los límites de detección y cuantificación, repetitividad y veracidad en base a los estudios de recuperación.
7. Análisis de las muestras con las metodología desarrollada y validada y aplicación de estrategias dirigidas para detección y cuantificación de los analitos de interés. La identificación de los compuestos se lleva a cabo mediante la comparación de los datos cromatográficos proporcionados previamente por análisis de patrones comerciales, los valores de masa exacta obtenidos y la presencia de los iones cualificadores en los espectros de masas. La cuantificación implica la aplicación del método más adecuado considerando la presencia o ausencia de efecto matriz en las muestras.

8. Aplicación de estrategias no dirigidas para ampliar la información sobre la composición de las muestras, orientándolo a la búsqueda de posibles compuestos relacionados con los analitos, así como de posibles metabolitos generados en los organismos.





# INTRODUCCIÓN





## 1. ALCALOIDES

El término alcaloide fue acuñado e introducido por el químico alemán Wilhelm Meissner en 1819 para designar, en términos generales, a aquellas sustancias naturales que reaccionan como bases. Etimológicamente, la palabra alcaloide deriva del árabe, *al kaly* (sosa) y del griego, *eidos* (aspecto) [1].

Su descubrimiento surgió a raíz de investigaciones llevadas a cabo con plantas utilizadas en medicina tradicional. Sin embargo, la química de los alcaloides empezó a desarrollarse unos años antes, cuando en 1805 Sertürner aisló la morfina. Desde entonces y hasta la primera mitad del siglo XIX se sucedieron una serie de hitos históricos en este campo que sentaron las bases para el establecimiento de un nuevo campo de estudio: la química de los alcaloides. Entre estos hechos destaca el aislamiento de la estricnina por parte de Pelletier y Caveto (1817); la extracción de quinina, principio activo de la cinchona, por Gomes (1820) o el aislamiento de la narcotina y la codeína (1832) por Runge y Mein, respectivamente [2].

Más recientemente, el avance de las técnicas instrumentales ha permitido abordar el estudio, la síntesis y la caracterización de estructuras más complejas. Este hecho se intensificó cuando, en los años cincuenta del pasado siglo, se aisló la reserpina, que resultó ser un éxito como agente terapéutico. Todo ello ha propiciado la realización de una exploración sistemática de los alcaloides en la que el número de compuestos descritos no ha dejado de aumentar, así como los estudios realizados acerca de su uso farmacológico como consecuencia de su actividad biológica [3].

### 1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Inicialmente, los alcaloides se definieron como "*sustancias nitrogenadas, básicas, de origen natural, de distribución restringida y que poseen una estructura compleja*". Actualmente, los alcaloides forman el grupo más amplio de metabolitos secundarios de plantas y se definen como compuestos heterocíclicos principalmente derivados de aminoácidos que contienen uno o más átomos de nitrógeno en su estructura [4]. En su mayoría, responden a una serie de características generales y comunes:

- ◆ Son compuestos orgánicos nitrogenados.
- ◆ Se obtienen mayoritariamente de aminoácidos.
- ◆ Presentan un átomo de nitrógeno heterocíclico en su estructura.
- ◆ Tienen un origen fundamentalmente vegetal.
- ◆ Presentan una estructura química compleja.

- ◆ Tienen carácter básico o alcalino, debido al par de electrones desapareado del átomo de nitrógeno.
- ◆ Presentan cierto grado de toxicidad.
- ◆ Muestran actividad fisiológica incluso a dosis bajas.

Sin embargo, y dado el amplio catálogo de alcaloides conocidos, existen algunas excepciones a estas generalidades citadas. Entre ellas, por ejemplo, que los alcaloides esteroídicos y diterpénicos no se biosintetizan a partir de aminoácidos; que existen también, aunque de forma minoritaria, alcaloides de origen animal y de algunas familias de bacterias y hongos; que algunos no presentan carácter básico; que no todos son tóxicos o con estructura compleja y, por último, que no todos presentan un átomo de nitrógeno heterocíclico, sino que éste se puede encontrar fuera del anillo.

En cuanto a su distribución en la naturaleza, los alcaloides son compuestos que se encuentran fundamentalmente en el reino vegetal, y más concretamente, se localizan de forma mayoritaria en plantas Angiospermas. Dentro de este grupo, son las familias de las monocotiledóneas y las dicotiledóneas las que presentan una tendencia más pronunciada a la producción de alcaloides. Los vegetales suelen producir una mezcla compleja de alcaloides, aunque esta mezcla suele estar dominada por uno de ellos, al que se le denomina alcaloide mayoritario, como por ejemplo la quinina, el alcaloide principal en la corteza del árbol de la quina (cinchona). En este sentido, cabe destacar que, de forma general, el origen biosintético de todos los alcaloides de una planta es el mismo a pesar de que sus estructuras químicas presenten diferencias notables [5].

En la naturaleza, los alcaloides se presentan en forma de sales solubles como citratos, malatos, tartratos o benzoatos, o bien, en combinación con taninos. A nivel fisiológico, los alcaloides se localizan habitualmente en tejidos periféricos del vegetal pese a que su biosíntesis tiene lugar en células especializadas de otras partes de las plantas, y posteriormente se transportan hasta esa periferia donde se acaban almacenando. Es posible encontrar alcaloides en las hojas, como el tabaco (nicotina); en las semillas, como es el caso del cacao (teobromina); en los frutos, como en la cicuta (coniína) o en el látex, como en la amapola real (morfina o codeína) [6].

Como ocurre con otros muchos metabolitos secundarios en plantas, su función no está del todo determinada. Algunos autores consideran que pueden intervenir en los mecanismos de defensa de la planta frente a la agresión de especies depredadoras. Además, también se postula que, dado el bajo peso molecular de algunos alcaloides, estos pueden ser lo suficientemente volátiles como para actuar como señalizadores químicos tanto como elemento de defensa (alomonas), como elementos de comunicación (feromonas).

## 1.2. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

Como se ha citado anteriormente, la amplia variedad de alcaloides conocida en la actualidad permite encontrar desde compuestos volátiles hasta otros de elevada complejidad estructural y baja volatilidad. De hecho, presentan un rango de pesos moleculares bastante amplio, comprendido generalmente entre 100-900 Da.

En cuanto a su estado de agregación, los alcaloides oxigenados (que representan casi la totalidad de los alcaloides conocidos) se presentan normalmente como sólidos incoloros e inodoros y cristalizables a temperatura ambiente, mientras que aquellos que no presentan átomos de oxígeno en su estructura (más bien pocos) son líquidos a temperatura ambiente.

Los alcaloides presentan propiedades ópticas, es decir, tienen la capacidad de desviar el plano de la luz polarizada, lo que indica que se trata de compuestos enantioméricos que contienen al menos un centro quiral en su estructura química. Además, la forma levógira posee una mayor actividad en comparación con la forma dextrógira.

La mayoría de los alcaloides presentan carácter básico debido al par de electrones libres que posee el átomo de nitrógeno. Esta es una propiedad que varía dependiendo del alcaloide y que se encuentra estrechamente relacionada con la disponibilidad de ese par de electrones, es decir, de si el par electrónico libre participa o no de la aromaticidad, y también del impedimento estérico consecuencia de la conformación espacial de la molécula, especialmente en el caso de las moléculas policíclicas complejas. El átomo de nitrógeno hace que los alcaloides puedan protonarse en medio ácido y formar sales, pero, si el alcaloide presenta grupos funcionales adyacentes que cedan electrones, la disponibilidad de electrones aumenta y el compuesto resulta más básico. Algunos alcaloides son neutros porque en su estructura se presentan grupos funcionales que atraen electrones, haciendo que los del nitrógeno se deslocalicen y no formen sales.

Por lo general, los alcaloides en su forma orgánica son muy poco solubles o incluso insolubles en agua, mientras que sí presentan cierta solubilidad en disolventes orgánicos apolares o poco polares. Sin embargo, las sales de alcaloides obtenidas tanto de ácidos minerales como orgánicos, como consecuencia de su carácter básico, son generalmente solubles en agua e insolubles en disolventes orgánicos, salvo contadas excepciones [2].

### 1.3. CLASIFICACIÓN GENERAL DE LOS ALCALOIDES

Considerando la amplia extensión de compuestos que se incluyen dentro de la familia de los alcaloides, se han establecido diferentes criterios para su clasificación. La Figura 1 muestra un esquema de la clasificación general de los alcaloides en base a los tres criterios principales: origen biosintético, precursor biosintético y estructura química [7]. El criterio más genérico se realiza en base a su origen biosintético y en él se incluyen los tres grupos centrales que se describen a continuación:

- ◆ Alcaloides verdaderos. Responden a la definición tradicional de alcaloide, es decir, son compuestos que sintéticamente derivan de aminoácidos y que presentan un átomo de nitrógeno heterocíclico.
- ◆ Protoalcaloides. Derivan de aminoácidos, pero su átomo de nitrógeno no forma parte del sistema heterocíclico, por lo que son, aminas simples. Los principales precursores de este tipo de alcaloides son los aminoácidos L-triptófano y L-tirosina.
- ◆ Pseudoalcaloides. Dentro de este grupo se encuentran aquellos compuestos que no derivan sintéticamente de aminoácidos, pero sí poseen las características comunes de los alcaloides verdaderos, como la presencia del nitrógeno heterocíclico o la complejidad estructural.

Los alcaloides también se pueden clasificar según el precursor biosintético del que derivan, ya sea aminoácido o cualquier otro compuesto. En base a esta categoría, se definen cinco grupos:

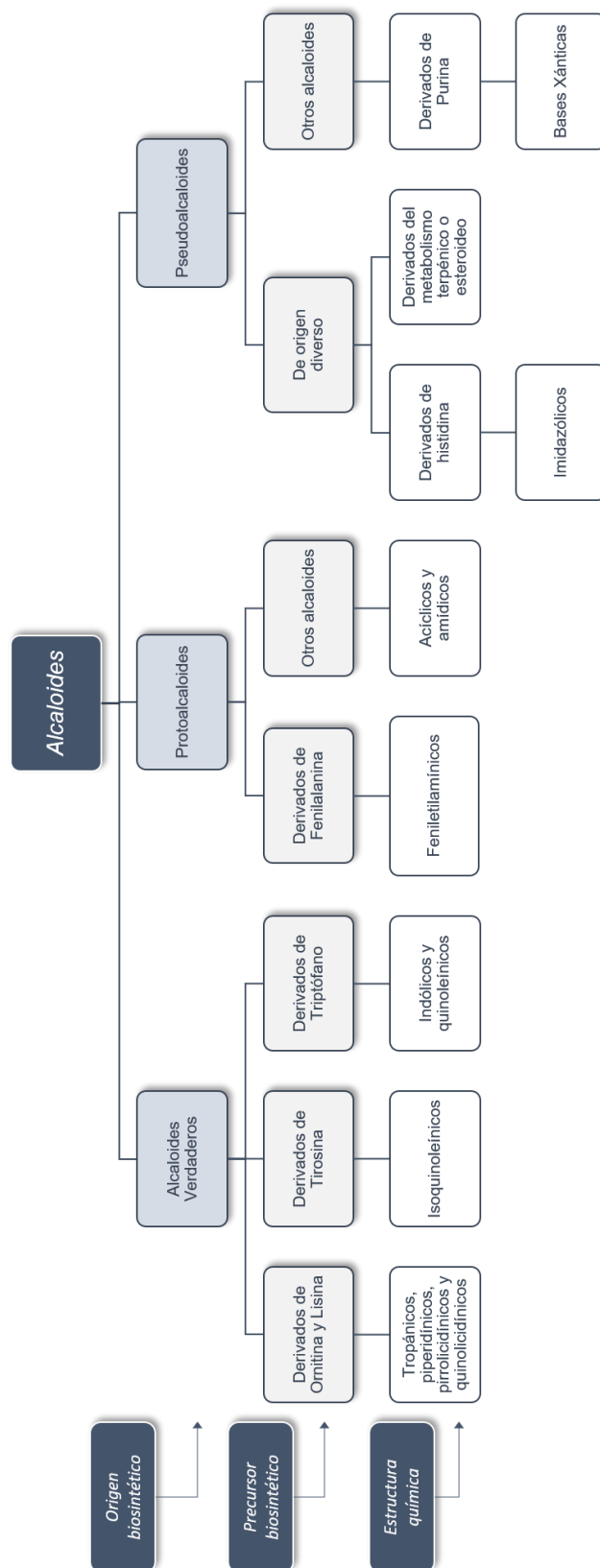
- ◆ Derivados de ornitina y lisina.
- ◆ Derivados de tirosina.
- ◆ Derivados de triptófano.
- ◆ Derivados de fenilalanina.
- ◆ De origen diverso.

Cabe destacar que todas las categorías mencionadas, a excepción de la última, se corresponden con derivados de aminoácidos. Sin embargo, solo conducen a la formación de alcaloides verdaderos los derivados de ornitina, lisina, tirosina y triptófano, mientras que los derivados del aminoácido fenilalanina y los de origen diverso, conducen a la obtención de aminas simples o protoalcaloides, y pseudoalcaloides, respectivamente.

Por otro lado, el tercer y último criterio utilizado en la clasificación de los alcaloides es el relativo a su estructura química o núcleo básico, criterio que, además, se encuentra estrechamente ligado al relativo al grupo biosintético. Como muestra la Figura 1, es posible encontrar, para cada una de las categorías anteriores, diferentes tipos de derivados en función de cuál sea su núcleo químico. Así, se definen las siguientes categorías:

- ◆ Tropánicos, piperidínicos, pirrolicidínicos y quinolicidínicos.
- ◆ Feniletilamínicos e isoquinoleínicos.
- ◆ Indólicos y quinoleínicos.
- ◆ Derivados de histidina (imidazólicos), terpénicos y esteroideos.
- ◆ Derivados de purina.

Por lo que respecta a esta última clasificación, los alcaloides feniletilamínicos (derivados del aminoácido fenilalanina) se englobarían dentro de los protoalcaloides mientras que los derivados de histidina y purina lo harían dentro de los pseudoalcaloides.



**Figura 1.** Esquema de clasificación de los alcaloides en base a los tres criterios establecidos.



A continuación, se dedican los dos siguientes apartados de la Introducción (1.4 y 1.5) a dos grupos de alcaloides (capsaicinoides y aminas biogénicas) que han sido objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral, con objeto de ofrecer una descripción más detallada de estos compuestos.

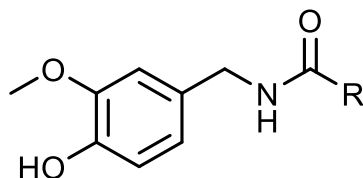
#### 1.4. CAPSAICINOIDES

Las frutas del género *Capsicum* se llevan cultivando desde hace 9000 años principalmente en las zonas de América Central y del Sur. Sin embargo, no fue hasta la llegada de Cristóbal Colón a América a finales del siglo XV cuando los españoles y portugueses exportaron estos alimentos a Europa, desde donde se extendió su uso alrededor del mundo [8]. Los capsaicinoides forman una familia de compuestos que se halla mayoritariamente en los frutos del género *Capsicum* y su estudio se remonta a principios de 1800, aunque no fue hasta 1876, cuando Tresh *et al.*, aislaron por vez primera el extracto crudo a partir de los pimientos picantes, llamándolo capsaicina (CAP) [9]. Su estructura química fue establecida en 1919 por Nelson y Dawson, siendo sintetizada químicamente por primera vez en 1930, por Spath y Darling [10, 11].

La característica más notable de los capsaicinoides es su poder pungente o picante. Este poder picante se mide por medio de la escala de Scoville, en unidades de picante de Scoville (*Scoville Heat Units*, SHU), en la que la CAP pura alcanza el valor más elevado de dicha escala, con 16 millones de unidades SHU. La capacidad pungente del fruto varía de forma proporcional con su concentración de CAP. De entre los diferentes tipos de compuestos que componen esta familia, CAP y dihidrocapsaicina (DCAP) son los compuestos mayoritarios, con una abundancia del 69 y 22%, respectivamente. Además, también es posible encontrar otros capsaicinoides minoritarios como nordihidrocapsaicina (7%), homocapsaicina (1%) y homodihidrocapsaicina (1%) [12].

Por ser el componente mayoritario, CAP es el capsaicinoide más estudiado, tratándose de un alcaloide con aspecto de sólido cristalino, incoloro e inodoro. Se trata de una sustancia lipofílica, no demasiado soluble en agua, pero fácilmente soluble en disolventes no polares como etanol o dimetilsulfóxido [13]. La pungencia que proporciona a los alimentos se debe a las características estructurales de los capsaicinoides y está asociada a la presencia de un enlace amida que conecta ambas partes de la molécula, el anillo de vanililo y la cadena lateral de acilo. Químicamente, los capsaicinoides son vanillamidas de los ácidos nonanoico y decanoico principalmente, y se obtienen a partir de rutas biosintéticas secundarias derivadas de los aminoácidos fenilalanina, valina y leucina [8, 14]. En total, se conocen más de veinte

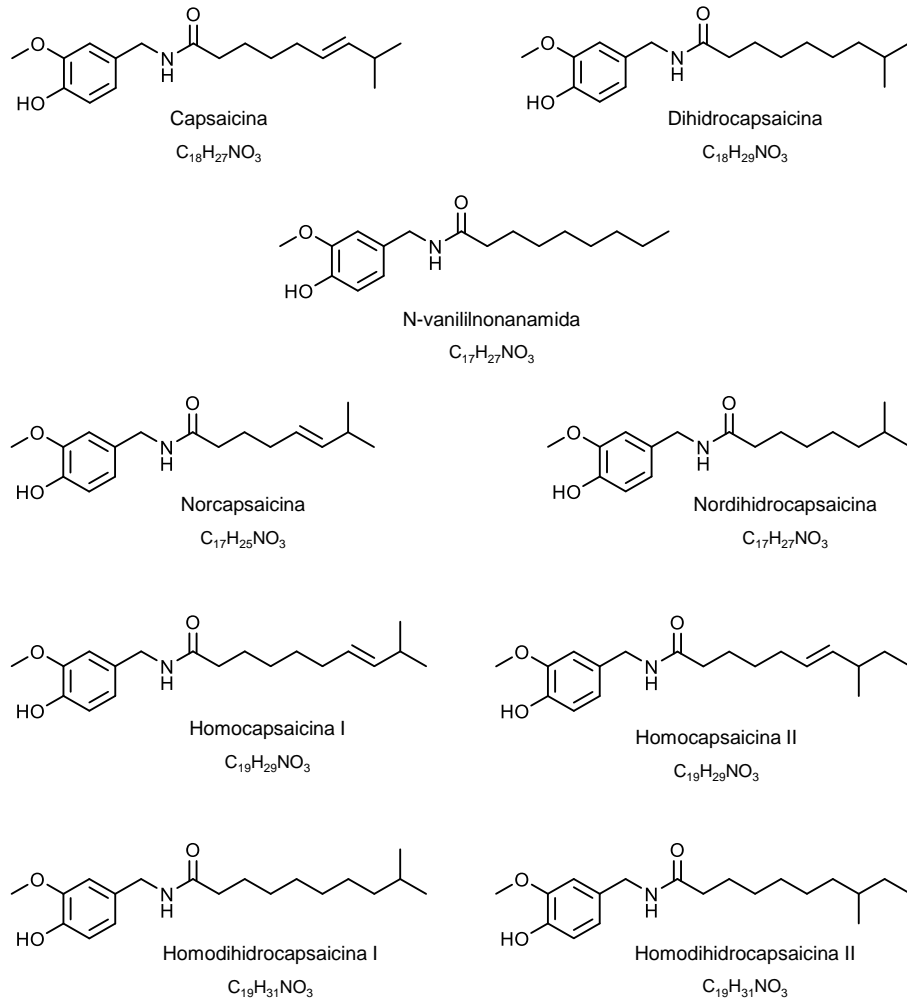
capsaicinoides diferentes y todos ellos poseen una estructura química básica que consiste en un núcleo fenólico unido a una cadena alquílica mediante un enlace de tipo amida (Figura 2).



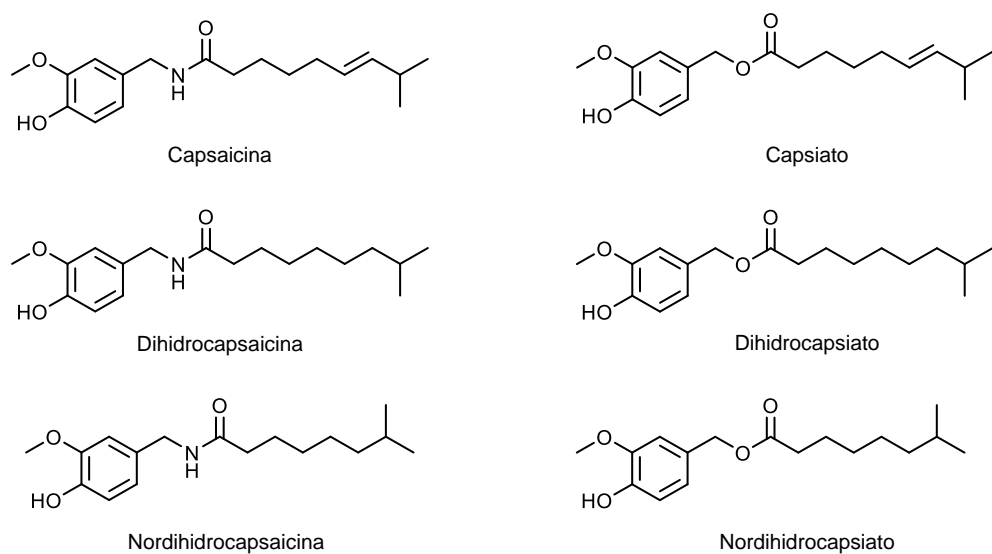
**Figura 2.** Estructura general de los capsaicinoides.

El núcleo fenólico de la estructura se corresponde con el anillo de vanililo, que se forma a partir de la fenilalanina a través de la ruta de los fenilpropanoides. Por otro lado, la cadena alquílica se forma a partir de aminoácidos de cadena lateral ramificada, bien de valina o de leucina. Las diferencias estructurales entre los diferentes capsaicinoides se localizan en esa cadena lateral alquílica, que presenta una extensión de átomos de carbono de entre 9 y 11 unidades, así como un número variable de dobles enlaces colocados en diferentes posiciones de la misma [15]. La Figura 3 muestra las estructuras químicas y la fórmula molecular de los principales capsaicinoides.

Por otro lado, cabe destacar también la existencia de una familia de compuestos análogos a los capsaicinoides, pero extraídos de los pimientos dulces, denominados capsinoides. Esta familia incluye entre otros a capsiato, dihidrocapsiato y nordihidrocapsiato, que son los análogos no picantes de capsaicina, dihidrocapsaicina y nordihidrocapsaicina, respectivamente. La principal diferencia estructural de los capsaicinoides con los capsinoides se encuentra en que estos últimos presentan un grupo éster como nexo entre la fracción aromática y la cadena lateral, en lugar del enlace amida característico de los capsaicinoides (Figura 4). La formación de estos análogos no picantes se debe a unas mutaciones específicas en la enzima aminotransferasa responsable de la aminación reductora de la vanilina. En ausencia de esta aminotransferasa, se produce alcohol vanilínico en lugar de vanililamina, por lo que finalmente se genera un enlace de tipo éster en vez del de tipo amida, dando lugar a los capsinoides [8, 13].



**Figura 3.** Estructura química y fórmula molecular de los principales capsaicinoides.



**Figura 4.** Comparación estructural entre capsaicinoides (izquierda) y capsinoides (derecha).

Los capsaicinoides se sintetizan en la placenta del fruto de los pimientos picantes por condensación enzimática de la vanililamina con diferentes cadenas laterales de ácidos grasos. Por ello, la mayor parte de la capsaicina se encuentra en el tejido placentario del fruto, aunque también se han detectado cantidades más pequeñas en las semillas y en el pericarpio (parte externa que recubre las semillas de un fruto) [13].

La ruta biosintética general para la obtención de los capsaicinoides se estableció a finales de la década de 1960 e involucra dos rutas paralelas, una para el anillo aromático de vanililamina y otra para la cadena alquílica (Figura 5). El aminoácido fenilalanina es el punto de partida en la síntesis de la fracción aromática. Así, el anillo de vanililamina se obtiene mediante transformaciones sucesivas de la fenilalanina en los ácidos *trans*-cinámico, cumárico, cafeico y ferúlico para finalmente conducir a la formación de vanilina y vanililamina. Cada una de las etapas mencionadas está a su vez catalizada por la acción de una enzima específica. Así, en la síntesis de vanililamina intervienen, por este orden, fenilalanina amonio liasa (PAL), cinamato 4-hidroxilasa (C4H), 4-cumarato-CoA ligasa (4CL), hidroxicinamoil transferasa (HCT), cafeil-CoA 3-O-metiltransferasa (CCoAOMT), cafeato O-metiltransferasa (COMT), hidroxicinamoil-CoA hidratasa/liasa (HCML) y aminotransferasa putativa (pAMT) [15, 16].

La síntesis de la cadena de acilo a partir de valina se inicia con la desaminación de este aminoácido a  $\alpha$ -cetoisovalerato por acción de una aminotransferasa específica (BCAT) para, a continuación, transformarse en isobutiril-CoA gracias a la isovalerato deshidrogenasa (IVDH). Para la conversión de isobutiril-CoA en ácido 8-metil-6-nonenoico se requiere la participación del complejo multienzimático Ácido graso sintasa (*Fatty Acid Synthase*, FAS) que está formado por tres componentes: una  $\beta$ -acil sintasa; la cetoacil-ACP sintasa (KAS), que cataliza la condensación del isobutiril-CoA con grupos malonilo; una proteína transportadora de acilo (ACL), que transporta esos grupos malonilo perdiendo una molécula de CO<sub>2</sub> en cada ciclo de elongación, y una tioesterasa, la acilo-ACP tioesterasa (FAT), que tras tres ciclos sucesivos de elongación, libera el ácido graso formado [15, 16].

Finalmente, la última etapa en la síntesis de capsaicinoides es una reacción de condensación entre el anillo de vanililamina y la cadena de 8-metil-6-nonenoil-CoA catalizada por la acción de la enzima capsaicinoide sintasa (CS), cuya actividad está íntimamente relacionada con el grado de picor de los alimentos que contienen estos compuestos [15].

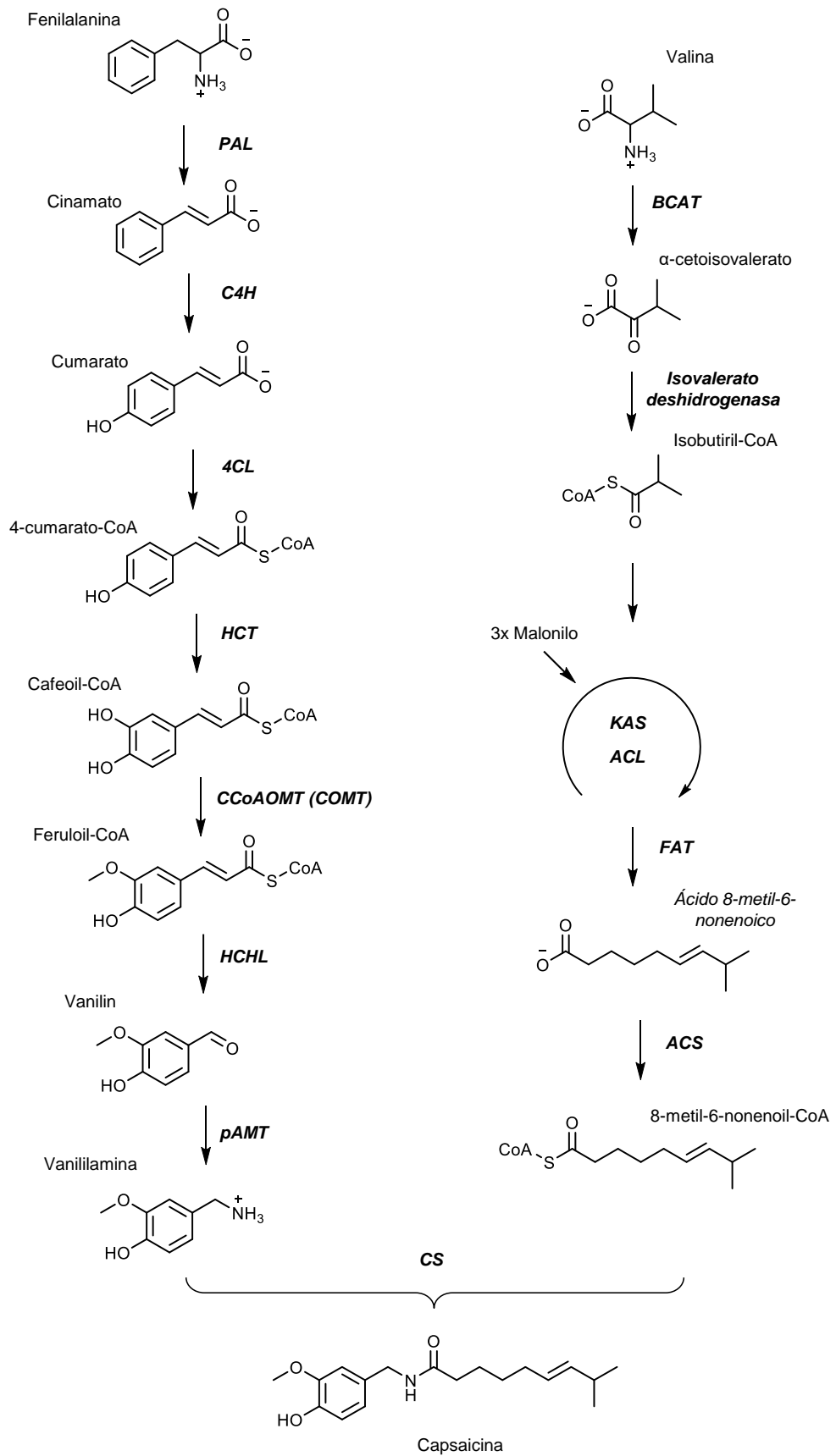


Figura 5. Ruta biosintética para la obtención de capsaicinoides.

### 1.4.1. Propiedades farmacológicas de los capsaicinoides

Pese a que la elucidación de su estructura química y su posterior síntesis química no tuvo lugar hasta principios del siglo XX, el primer registro que se tiene del uso de los capsaicinoides, en forma de chili, para el tratamiento del dolor se remonta al año 4000 a.C. Sin embargo, la primera referencia occidental del uso del extracto de chili por sus propiedades para reducir el dolor data de 1850 [17].

De entre los diferentes capsaicinoides, la CAP se conoce tradicionalmente por su efecto analgésico en el tratamiento tópico del dolor muscular, de articulaciones y del dolor neuropático crónico como consecuencia de la osteoartritis, artritis reumatoide, neuropatía diabética, neuropatía periférica no diabética y neuralgia post-herpética. Su acción analgésica la ejerce a través de su unión al receptor de potencial transitorio vaniloide de subtipo 1 (TRPV1) localizado en los nociceptores neuronales del sistema nervioso periférico [18]. Las numerosas actividades de la CAP, incluida la analgésica, y propiedades biológicas se describen a continuación.

#### Acción analgésica

El dolor neuropático se define como un daño o disfunción del tejido nervioso percibido por el cerebro como dolor y que generalmente está causado por una lesión o enfermedad del sistema somatosensorial. La etiología de esta enfermedad es muy amplia y abarca causas tanto genéticas como metabólicas, vasculares, inmunológicas e infecciosas. Al ser una dolencia de tipo crónico, conlleva una pérdida de la calidad de vida del paciente que la sufre. Dependiendo del sitio de la lesión o de la enfermedad subyacente causante de esta dolencia, este tipo de dolor se puede clasificar como central o periférico. Las causas predominantes del dolor neuropático periférico (PNP) son la neuropatía diabética periférica dolorosa, neuralgia post-herpética, neuropatía asociada al VIH y la neuropatía periférica inducida por el tratamiento con quimioterapia. Los pacientes con PNP experimentan diversos síntomas como quemazón, hormigueo, entumecimiento, alodinia e hiperalgesia [19].

Actualmente, los tratamientos existentes se basan en controlar la enfermedad subyacente, así como en el alivio sintomático mediante el uso de analgésicos de uso tópico y otras intervenciones. Los tratamientos farmacológicos de primera línea consisten en anti-epilépticos y anti-depresivos. Sin embargo, el uso de estos medicamentos conlleva diferentes efectos secundarios por lo que su uso se ha visto restringido, limitando su efectividad. Por otro lado, los tratamientos de segunda línea incluyen analgésicos de uso tópico como los parches de CAP y lidocaína. En este sentido, las cremas y lociones a base de CAP de baja concentración (0,025-0,075% m/m) han mostrado una eficacia moderada en el tratamiento tópico de PNP. El principal

inconveniente que presenta el uso de estas cremas es que se precisa de varias aplicaciones a lo largo del día y la sensación de quemazón inicial que provocan tiene una tolerancia escasa entre los pacientes afectados. Se han desarrollado parches dérmicos comerciales conteniendo niveles de CAP del 8% m/m con el objetivo de aportar un alivio más duradero a este tipo de dolor, con la ventaja de que solo se precisa de una aplicación. Su uso está aprobado en la Unión Europea ya sea como medicamento único o en combinación con otros fármacos para el tratamiento del PNP en adultos [20].

La CAP ejerce su acción analgésica por medio de un mecanismo que involucra a los receptores de potencial termo-transitorio (TRPs), que son un tipo de receptores que aportan información acerca de los cambios térmicos en un determinado entorno y que se expresan en pequeñas terminaciones de los nervios sensoriales primarios. Hasta la fecha, se han caracterizado 6 TRPs (TRPV1-TRPV6), de los cuáles TRPV1 y TRPV2 son los que se activan cuando el nivel de dolor experimentado es elevado. TRPV1 actúa como un nociceptor térmico y juega un papel fundamental en la detección de numerosos estímulos dolorosos, activando la expresión de los nociceptores en la piel y provocando la aparición de dolor y eritemas. La CAP actúa como un potente, a la vez que altamente selectivo, agonista de dicho receptor TRPV1 [18].

El mecanismo de acción sugiere que CAP se une selectivamente al receptor TRPV1 y actúa como un canal catiónico no-selectivo, pero con elevada permeabilidad hacia los iones  $Ca^{2+}$ . Después de la exposición a CAP, los receptores TRPV1 se desensibilizan, lo que resulta en una reducción de la función del receptor, disminuyendo la cantidad de fibras nerviosas de la piel que responden a los estímulos dolorosos e induciendo así la acción analgésica. Esta desfuncionalización es la consecuencia celular de la entrada de calcio desencadenada por la activación del receptor TRPV1 inducida por CAP. Además de activar el receptor TRPV1 aumentando la cantidad de  $Ca^{2+}$  intracelular, la presencia de CAP también provoca la liberación de la sustancia P, un neuropéptido que transmite las señales de dolor desde la zona afectada hasta el cerebro y que está involucrada en la activación de citoquinas inflamatorias. A través de este proceso dependiente de calcio, la sustancia P se agota provocando la insensibilización de las fibras aferentes primarias de manera que dejan de funcionar frente a los estímulos dolorosos, incluidos los estímulos nocivos térmicos, mecánicos y químicos, lo que finalmente se traduce en la aparición de la función analgésica.

### Acción antioxidante

La presencia de especies de oxígeno reactivas (ROS) y lípidos peroxidados está asociada a diferentes patologías. La molécula de CAP actúa como agente inhibitorio en la peroxidación de lípidos en diferentes modelos como los eritrocitos humanos o la membrana liposomal. En cuanto a su mecanismo de acción, se cree que la fracción fenólica de la CAP podría proporcionar hidrógeno a los radicales peroxi y alcoxi como agentes intermediarios iniciadores y propagadores de cadenas de polimerización radicalarias, formando un complejo con metales de transición reducidos, que se inserta en la molécula de oxígeno. El carbono C7-bencilo en la molécula de CAP y el grupo metoxi del anillo de fenol son grupos funcionales importantes, responsables de la fuerte acción antioxidante y eliminadora de radicales libres ejercida por CAP [11, 18].

### Efecto antiinflamatorio

Además de influir en los procesos oxidativos del organismo, la peroxidación de lípidos inducida por ROS está fuertemente ligada a la aparición de la patogénesis inflamatoria, así como a la carcinogénesis. La enzima ciclooxigenasa (COX) es un mediador proinflamatorio clave que cataliza la velocidad de la biosíntesis de prostaglandinas (PG) y que se induce rápidamente en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias. CAP reprime la producción de la prostaglandina E2 (PGE2) al inhibir la actividad de las enzimas ciclooxigenasa-2 (COX-2) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Estas enzimas están consideradas como los mediadores proinflamatorios clave en el desarrollo de problemas inflamatorios. En este sentido, CAP presenta un efecto protector de ciertas heridas, como las de la mucosa gástrica, ya que inhibe significativamente la peroxidación de lípidos y la expresión de la enzima COX-2 [18, 21, 22].

### Acción antimicrobiana

Se ha descrito actividad antimicrobiana de CAP frente a varios tipos de microorganismos, lo que hace que su campo de acción no se limite solo al ámbito sanitario, sino que también se aplica en agricultura o ingeniería química. Su efecto inhibitorio sobre las bacterias se cree que puede estar relacionado con su estructura química. Así, el grupo fenólico reprime el crecimiento de bacterias mediante una disminución de la estabilidad de la membrana debido a su hidrofobicidad [9].



### Efecto antihipertensivo

En la actualidad, la hipertensión está considerada como uno de los desafíos en salud pública más importantes debido a su cada vez más elevada incidencia entre la población y a que, paralelamente, supone un factor de riesgo adicional de padecer enfermedades cardiovasculares. Se estima que para 2025, el número de afectados supere los 1,5 billones en todo el mundo. Aunque el mecanismo por el que CAP induce una respuesta en la presión sanguínea no está del todo claro, se cree que involucra a determinadas proteínas. Las endotelinas, unos péptidos que actúan como vasoconstrictores, actúan mediante dos tipos de receptores denominados ET-A y ET-B y cuya activación produce vasoconstricción y vasodilatación, respectivamente. CAP estimula los receptores TRPV1 presentes en las fibras pulmonares vagas de tipo C para producir reflejos cardiorrespiratorios, que se manifiestan en forma de bradicardia (frecuencia cardíaca baja), bradipnea y respuesta de presión trifásica. Además, la estimulación de estos receptores TRPV1 en los aferentes viscerales o somáticos puede provocar variaciones en la presión sanguínea. La respuesta hipertensiva intermedia inducida por CAP involucra la acción de la endotelina-1 a través de los receptores ET-A. Sin embargo, la respuesta hipotensora retardada inducida por CAP es independiente de los receptores ET-B, así como a los mecanismos que involucra al óxido nítrico (nitrérgicos), prostaglandinas (prostaglandinérgicos) o a las cininas (cininérgicos) [23].

### Actividad antiobesidad

Generalmente, la obesidad es una enfermedad causada por un desajuste entre una elevada ingesta calórica y un bajo consumo de ese exceso de energía ingerido, lo que conlleva no solo a un aumento de masa corporal sino también a una amplia variedad de desórdenes metabólicos como diabetes, hígado graso, enfermedades cardiovasculares, apoplejía, hipertensión e hiperlipidemia (aumento de las fracciones lipídicas de la sangre, como el colesterol o los triglicéridos). Se ha comprobado que la CAP inhibe la adipogénesis e incrementa la oxidación lipídica en los adipocitos, regulando a su vez la sensación de saciedad en el hipotálamo y, por tanto, reprimiendo el apetito. El mecanismo antiobesidad de la CAP se basa en que esta molécula actúa sobre el receptor TRPV1, activando el reclutamiento de tejido adiposo pardo, para así aumentar el gasto de energía metabólica a la vez que disminuye la consistencia de la grasa corporal [11, 24].

### Actividad antidiabética

La Federación Internacional de Diabetes estima que, en la actualidad, aproximadamente 537 millones de adultos conviven con esta enfermedad y que para el año 2045, esta cifra rondará los 629 millones. La Diabetes *Mellitus* de tipo 2 se produce cuando el páncreas no genera suficiente insulina o cuando esta insulina producida no es utilizada por el organismo de forma adecuada. Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la CAP tiene un papel importante en la mejora del metabolismo de la glucosa. Por otro lado, los pacientes con diabetes son más susceptibles de sufrir otras complicaciones médicas, como la neuropatía diabética, debido a que su sistema de regulación de glucosa está dañado, y también como consecuencia de tener en sangre unos niveles de glucosa e insulina anormales. Esta situación de hiperglucemia puede provocar daños en tejidos u órganos vitales como el corazón, el hígado, el músculo esquelético o las neuronas. Es precisamente este daño a las neuronas o a las terminaciones nerviosas lo que se conoce como neuropatía diabética y que provoca en los pacientes, dolencias de tipo crónico, que como se ha citado en párrafos anteriores, puede tratarse por vía tópica, entre otros fármacos, con cremas y lociones a base de CAP [11, 25].

### Actividad anticancerígena

De acuerdo con los datos proporcionados por el informe GLOBOCAN de 2020, solo en España, cada año se diagnostican casi 300.000 nuevos casos de cáncer y se certifican cerca de 115.000 defunciones por esta enfermedad. Numerosos estudios han demostrado que la CAP es una sustancia con bastante potencial como agente antitumoral en el tratamiento de una amplia variedad de tumores, entre ellos, mama, pulmón, gástrico, hígado o vejiga. Así, se ha demostrado que esta sustancia puede inducir una respuesta apoptótica en la línea celular HCT116 de carcinomas de colon humano mediante la estimulación de la producción de óxido nítrico endógeno en las células tumorales, a través de mecanismos tanto extrínsecos como intrínsecos [26].

El mecanismo anticancerígeno de la CAP está relacionado con la activación del receptor TRPV1, siendo el responsable de estos efectos antiproliferativos y pro-apoptóticos. El influjo de calcio activado por TRPV1 activa la proteína quinasa MAPK y posteriormente bloquea también la vía de Hedgehog para inhibir así la proliferación celular. La entrada de calcio también induce la apoptosis de las células tumorales. Un posible mecanismo que lo justifique es aquel en el que la CAP, como agonista del receptor TRPV1, haga que disminuya tanto la producción de peróxido de hidrógeno mitocondrial como el potencial de la membrana mitocondrial. A partir de ahí, se produce la inhibición de la fosforilación oxidativa mitocondrial, lo que finalmente conduce a la apoptosis celular. Por otro lado, la metástasis tumoral es un proceso multietapa en el que las

células malignas se esparcen desde el tumor primario a diferentes órganos, siendo esta una de las principales causas de muerte en pacientes con cáncer. En este sentido, la CAP puede inhibir el factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Factor Growth*, EFG) que es el responsable de la invasión y migración de las células tumorales [11, 27].

La CAP puede administrarse en combinación con otros medicamentos quimioterapéuticos o incluso con radioterapia para así conseguir resultados sinérgicos que incrementen la actividad antitumoral de estos medicamentos. Así, CAP se ha combinado con 5-fluorouracilo (5-FU), un agente antimetabolito cuya función es imitar a las moléculas endógenas necesarias en el progreso del ciclo celular, pero que al no ser la molécula necesaria, conduce a errores en el material genético, que a su vez provoca daños en el ADN/ARN y, subsecuentemente provoca la muerte celular; camptotecina y etopósido (VH-16), que inhiben las enzimas topoisomerasa I y II, respectivamente; cisplatino (DDP) y pirarubicina (THP), que actúan ambos como agentes intercalantes del ADN, inhibiendo la función de la enzima topoisomerasa II, evitando la replicación del material genético (ADN y ARN) e induciendo, por tanto, la muerte de las células cancerosas, y por último, erlotinib, cuya acción se basa en la inhibición de la actividad de la proteína receptor del factor de crecimiento epidérmico, encargada del crecimiento y propagación de las células tumorales [28].

#### **1.4.2. Toxicidad de los capsaicinoides**

Debido a su característica pungencia, la aplicación de CAP por vía tópica puede causar una serie de efectos adversos. Entre ellos, el más común es la sensación de ardor suave que aparece en la zona de aplicación, así como posibles eritemas. Otros posibles efectos adversos descritos en la bibliografía son hinchazón, hiperalgesia, náuseas, vómitos, diarreas, conjuntivitis y dolor abdominal. Sin embargo, el consumo de CAP como parte de la dieta, parece no provocar mayores complicaciones que la sensación de picor o alguna molestia estomacal.

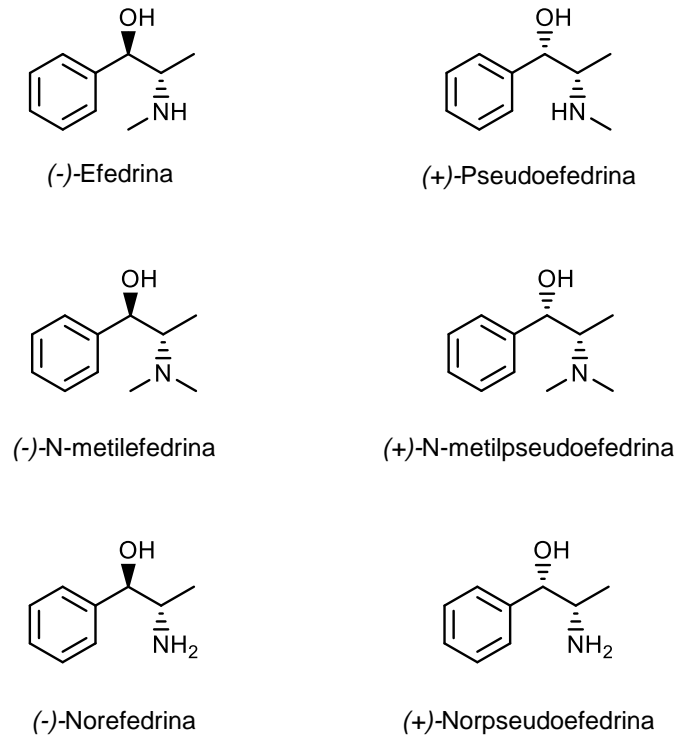
Este tipo de preparaciones de uso tópico también puede provocar efectos adversos más específicos dependiendo de la zona con la que entre en contacto. Así, en contacto con la vista puede provocar, además de dolor, visión borrosa, lagrimeo y fotofobia, mientras que, por inhalación, puede provocar tos, sibilancia y disnea, especialmente cuando los pacientes ya están diagnosticados previamente con asma. Pese a todos estos efectos descritos, la aplicación de cremas a base de CAP presenta muy pocas contraindicaciones, entre ellas, una posible reacción de hipersensibilidad cuando se administran sobre heridas, zonas infectadas o pieles abrasadas, lo que puede provocar un incremento en la absorción del fármaco. Como se ha citado en el epígrafe anterior, los parches dérmicos presentan mayor concentración de CAP que las cremas

o lociones, y sus efectos adversos más comunes están relacionados con la zona de aplicación y consisten, generalmente, en reacciones cutáneas como sequedad, eritema, edema, dolor, urticarias papilares y prurito [18-20].

## 1.5. AMINAS BIOGÉNICAS Y DERIVADOS DE LA EFEDRINA

Las plantas de la familia *Ephedraceae*, cuya formulación original recibe el nombre de *ma huang*, se han utilizado en la medicina tradicional china como estimulante circulatorio y como remedio diaforético y antipirético durante más de 5.000 años [29]. Esta familia es originaria de las zonas templadas y subtropicales de Asia, Europa y de la zona Norte y Sur del continente americano. Se trata de plantas herbáceas de hoja perenne que proporcionan olor a pino y sabor astringente, es decir, que genera una sensación de amargor y aspereza en la boca. En total, el género *Ephedra* cuenta con casi 70 especies, en las que se han encontrado una amplia variedad de compuestos, no solo alcaloides sino también compuestos fenólicos, incluidos los flavonoides, derivados de aminoácidos y, en sus aceites esenciales, también se han identificado numerosos compuestos orgánicos volátiles (VOCs) [30]. El interés de este género se centra en la presencia de alcaloides derivados de la efedrina, tales como pseudoefedrina, norefedrina o metilefedrina (Figura 6) ya que presentan actividad biológica de tipo antiinflamatoria, antivírica, hepatoprotectora, antibacteriana o antifúngica entre otras [31].

*Ephedra* es el término general con el que se designa al grupo de compuestos que aparecen en la Figura 6 y que funcionan como agentes simpaticomiméticos, esto es, sustancias naturales o fármacos que actúan como agonistas del sistema nervioso simpático. Como se observa en la Figura 6, efedrina y sus derivados N-metilefedrina y norefedrina presentan isomería óptica, por lo que cada uno de ellos se encuentra en la naturaleza como dos enantiómeros *R*-(-) o *S*-(+). Así, el alcaloide efedrina se aisló por primera vez en el año 1885 aunque no fue hasta 1926, casi medio siglo más tarde, cuando comenzó a comercializarse. Estos alcaloides se consideran agonistas de los adrenoreceptores  $\alpha$  y  $\beta$  que estimulan la liberación de catecolaminas endógenas. Entre los principales efectos cardiovasculares de estos compuestos se encuentran el aumento de la presión sanguínea, tanto sistólica como diastólica, el aumento de la frecuencia cardíaca y la constricción de los vasos sanguíneos [32].



**Figura 6.** Estructura química de las dos formas enantioméricas de efedrina y sus principales derivados.

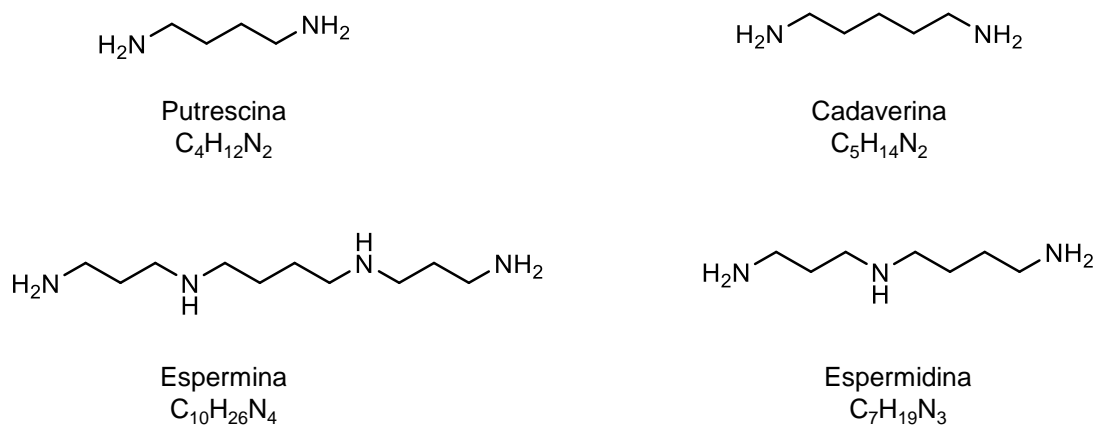
Además, se han estudiado las propiedades terapéuticas y farmacológicas de estos compuestos, encontrándose un amplio rango de acción como complementos alimenticios y frente a diversas enfermedades [33]:

- ◆ Suplementos nutricionales.
- ◆ Estimulantes del sistema nervioso central.
- ◆ Actividad antimicrobiana.
- ◆ Actividad anticancerígena y antioxidante.
- ◆ Actividad antidiabética.
- ◆ Actividad anti-artritis reumatoide.
- ◆ Agente hipertensivo.
- ◆ Actividad anti-Alzheimer.
- ◆ Inhibición de las quimiocinas.
- ◆ Actividad anti-neuroinflamatoria.
- ◆ Actividad anti-hiperlipidemia.
- ◆ Actividad anti-asma.
- ◆ Acción frente a la insuficiencia hepática aguda.

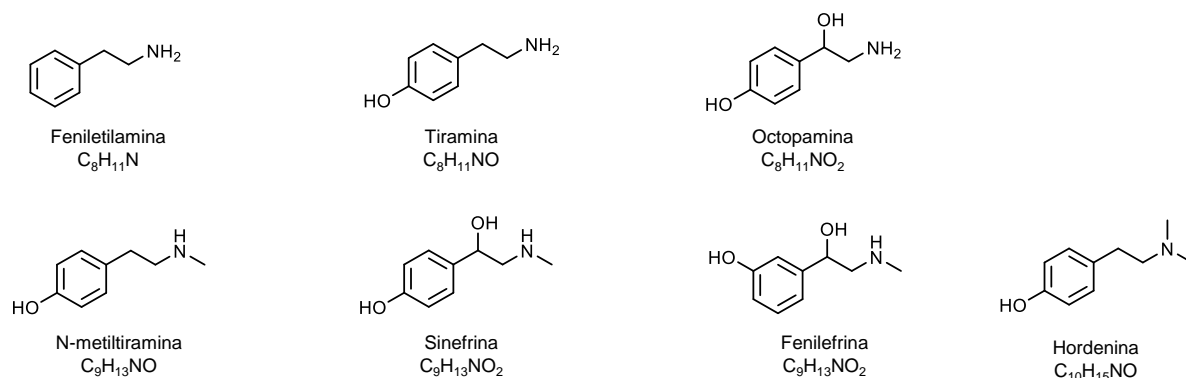
Como se ha citado en la sección 1.3, los protoalcaloides son un tipo de alcaloides no verdaderos puesto que derivan biosintéticamente de un aminoácido, pero no contienen en su estructura un átomo de nitrógeno heterocíclico. Así, en esta Tesis se ha trabajado con aminas biogénicas (BAs), que, al igual que los alcaloides de la familia *Ephedra*, derivan del aminoácido fenilalanina, por lo que la estructura, propiedades y actividad de ambos tipos de compuestos está relacionada.

Las BAs son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular y biológicamente activos, que pueden formarse o metabolizarse en las células de los organismos vivos (animales, plantas y microorganismos) y que contienen uno o más grupos amino conectados a su esqueleto que puede ser alifático, aromático o heterocíclico. Estos compuestos se originan principalmente a partir de la descarboxilación de aminoácidos libres mediante la acción de enzimas específicas (descarboxilasas) o bien por transaminación de aldehídos y cetonas. Al no contener el átomo de nitrógeno como parte del anillo aromático, se consideran protoalcaloides. Además, en lo que a alimentación se refiere, es posible encontrarlas tanto en alimentos crudos como procesados, por lo que a menudo se usan también como un indicador de su frescura y calidad. La presencia de BAs en el organismo humano es esencial en diferentes funciones fisiológicas como el crecimiento, renovación, metabolismo y funcionamiento del sistema inmunitario intestinal, la regulación de la temperatura corporal, absorción de nutrientes y la homeostasis de la presión arterial. Además, constituyen una fuente de nitrógeno y son los precursores de muchos otros componentes del organismo como es el caso de hormonas, ácidos nucleicos y proteínas [34].

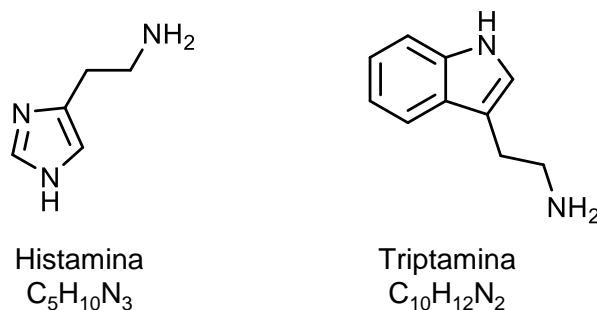
La clasificación de las BAs se puede llevar a cabo en base a dos criterios. Uno de ellos es la estructura química que poseen. Así, es posible encontrar BAs de tipo alifático (Figura 7), aromático (Figura 8) y heterocíclicas (Figura 9). En esta Tesis, nos centraremos en las de tipo aromático.



**Figura 7.** Estructura química y fórmula molecular de las principales BAs alifáticas.



**Figura 8.** Estructura química y fórmula molecular de las principales BAs aromáticas.



**Figura 9.** Estructura química y fórmula molecular de las BAs heterocíclicas.

Por otro lado, las BAs también se pueden clasificar como *mono-* o *poliaminas* (PAs) dependiendo de su contenido en grupos amino. De forma general, las PAs se sintetizan en las plantas del género *Citrus* a partir del aminoácido proteínogénico arginina mediante dos rutas diferentes dependientes de arginina. Las PAs están involucradas prácticamente en casi todas las etapas de la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. Sin embargo, algunas PAs como putrescina, cadaverina, espermina y espermidina pueden reaccionar con nitritos para dar lugar a nitrosaminas volátiles, las cuales están consideradas como sustancias carcinogénicas [35, 36].

Al igual que la efedrina y sus derivados, algunas BAs (octopamina, tiramina y sinefrina) también se consideran sustancias adrenérgicas ya que actúan como agonistas de los adrenoreceptores de tipo  $\alpha$  y  $\beta$ , pero con la ventaja de que no incrementan la presión sanguínea diastólica. Es por ello que, en los últimos años su uso se ha visto intensificado como sustituyente de la efedrina en suplementos dietéticos para la pérdida de peso [37].

### 1.5.1. Biosíntesis de las aminas biogénicas aromáticas

Además de tener un papel fundamental en la síntesis de proteínas, otra de las funciones de los aminoácidos aromáticos en el cerebro es la de actuar como precursores en la biosíntesis de diferentes sustancias químicas como neurotransmisores de tipo monoamínico, serotonina, y catecolaminas como dopamina, norepinefrina y epinefrina. Así, las BAs objeto de estudio en esta Tesis Doctoral (OCT, TYR, SNP y PEP) derivan biosintéticamente de la misma ruta, puesto que todas tienen como precursores a los aminoácidos fenilalanina y tirosina, de ahí que también se les conozca como alcaloides fenilalanínicos (Figura 10). A su vez, comparten precursores con otro tipo de familia de compuestos químicos, las catecolaminas (también conocidas como aminohormonas). Las catecolaminas son un tipo de neurohormonas que se liberan desde las neuronas o células nerviosas y cuya función consiste en enviar señales a otras células para responder a estímulos fisiológicos [38].

El sistema nervioso de los animales usa una amplia variedad de sustancias químicas, denominadas neuroactivas, con la finalidad de generar comportamientos integrados y coordinados. Estas sustancias neuroactivas pueden actuar como neurotransmisores, neurohormonas o neuromoduladores. Algunas de estas sustancias pertenecen a la familia de las BAs, fundamentalmente a dos grupos: feniletilaminas y catecolaminas. Así, en vertebrados las BAs predominantes son las catecolaminas adrenalina y noradrenalina, mientras que, en invertebrados, las predominantes son las feniletilaminas tiramina y octopamina [39].

La octopamina (OCT) fue descubierta por primera vez por Vittorio Erspamer en 1948 en las glándulas salivares del pulpo (*Octopus vulgaris*). En los invertebrados, OCT es el análogo estructural de la norepinefrina (catecolamina también conocida como noradrenalina) de los vertebrados. Estructuralmente, OCT difiere de norepinefrina en la ausencia de un grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo aromático. Además, OCT existe como tres posibles isómeros de posición (*orto-*, *meta-* y *para-*) y a su vez, cada uno de estos isómeros se presenta como dos posibles enantiómeros, *d*-(-) y *l*-(+). Sin embargo, la forma natural de la OCT es el enantiómero (-) del isómero *p*-OCT. La OCT actúa como una amina simpaticomimética y se la conoce también como falso neurotransmisor ya que puede almacenarse en vesículas, reemplazando a las aminas clásicas endógenas como norepinefrina, dopamina y serotonina. En invertebrados, especialmente en insectos, OCT se encuentra a elevadas concentraciones en los sistemas nervioso central y periférico, y entre sus funciones se encuentran la de inducir y modular una señal de transducción similar a la que proporciona su análogo norepinefrina en vertebrados [40].

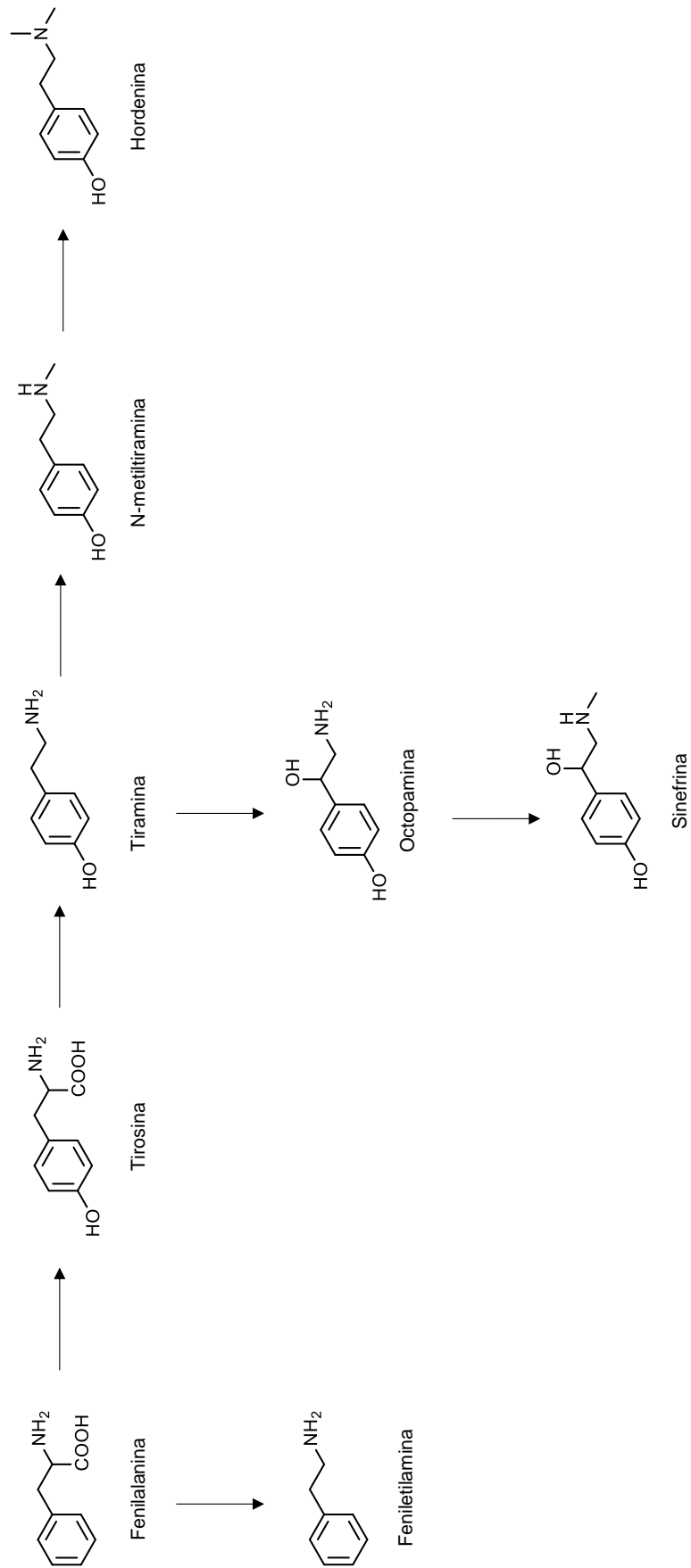
Inicialmente, tiramina (TYR) fue identificada como una amina del sistema nervioso de los vertebrados a nivel de traza y asociada al sistema dopaminérgico. Al igual que ocurre con OCT, en el caso de los invertebrados, esta situación es completamente opuesta, y TYR está presente



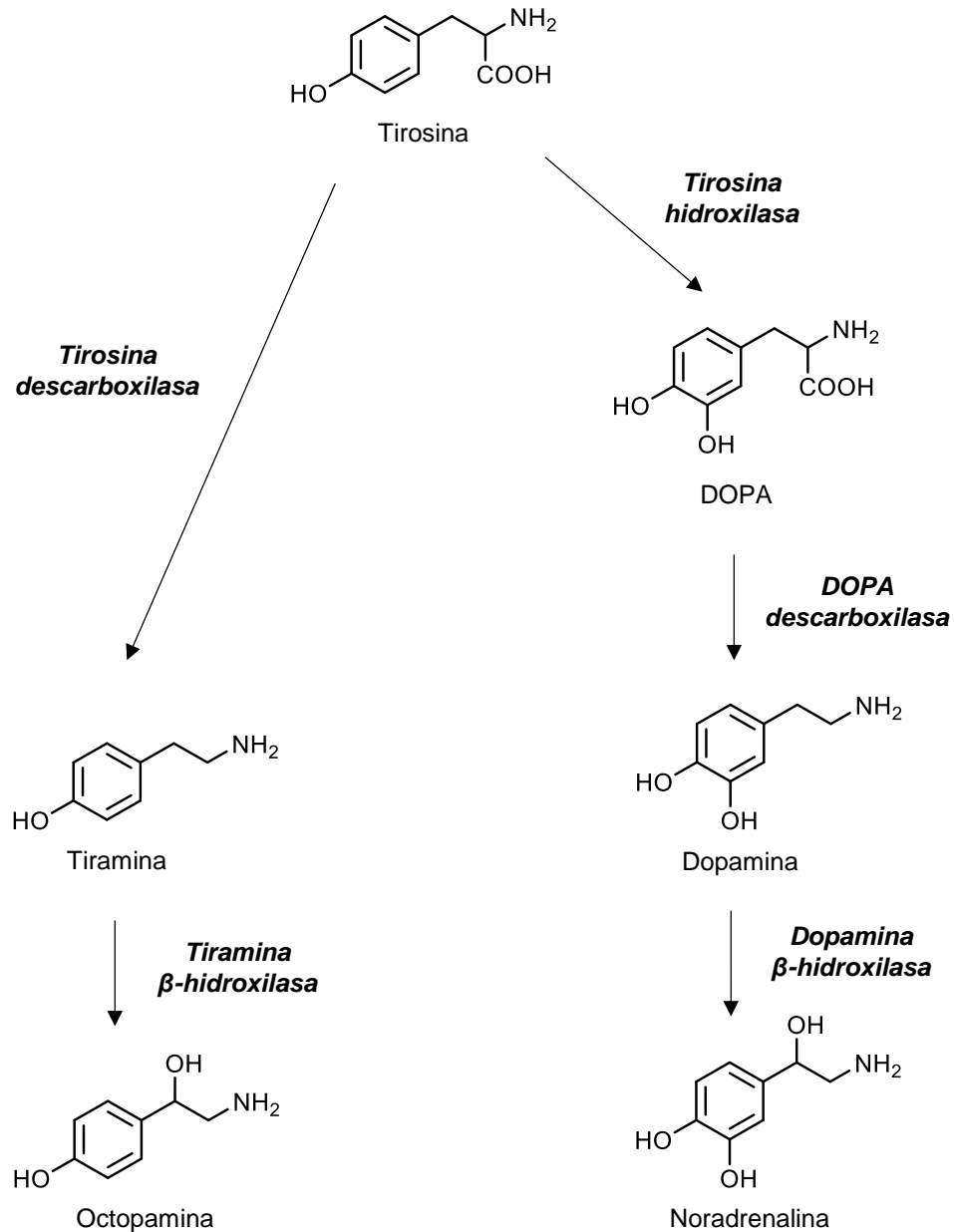
a elevadas concentraciones. El hecho de que su presencia en vertebrados sea mucho más baja, dio lugar a que originalmente se la considerase solo como un intermediario de la síntesis de OCT y no como un agente neuroactivo de pleno derecho. Sin embargo, con los años, los estudios han puesto de manifiesto que, tanto en vertebrados como en invertebrados, TYR es un verdadero agente neuroactivo atribuyéndosele, entre otros, efectos tiraminérgicos específicos en algunos procesos fisiológicos [39].

En lo que respecta a la obtención de las BAs mencionadas anteriormente y al resto de las estudiadas en esta Tesis Doctoral, su síntesis se inicia a partir del aminoácido tirosina. Como puede apreciarse en la Figura 10, la síntesis de TYR y OCT se produce de forma consecutiva a partir de la descarboxilación del aminoácido tirosina, gracias a la acción de la enzima tirosina descarboxilasa. Por tanto, el primer paso en la biosíntesis de OCT a partir de tirosina es precisamente la citada descarboxilación del aminoácido tirosina para producir TYR.

A continuación, en una segunda etapa, esta TYR sintetizada sufre una hidroxilación en el átomo de carbono  $\beta$  de la cadena lateral, por la acción de la enzima tiramina  $\beta$ -hidroxilasa para así conducir a la producción de OCT. La acción de esta enzima  $\beta$ -hidroxilasa es la limitante de la velocidad de esta parte de la ruta biosintética. La disponibilidad y concentración de los sustratos y cosustratos son los factores de los que depende la actividad de estas dos enzimas implicadas en el proceso. La enzima tirosina descarboxilasa requiere de tirosina y de piridoxal fosfato como sustratos, mientras que tiramina  $\beta$ -hidroxilasa requiere de TYR, ascorbato y cobre para poder catalizar la reacción de obtención de OCT. Es de destacar, que la síntesis de estas dos feniletilaminas está relacionada con la de algunas catecolaminas, como se muestra en la Figura 11. Tirosina puede hidroxilarse por la acción de la tirosina hidroxilasa para producir 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA). Tanto DOPA como tirosina pueden sufrir sendas descarboxilaciones para producir dopamina y TYR, respectivamente. A su vez, estos compuestos pueden hidroxilarse para producir, respectivamente, noradrenalina y OCT [39-41].



**Figura 10.** Esquema de la ruta biosintética para la obtención de las BAs estudiadas a partir de los aminoácidos fenilalanina y tirosina.



**Figura 11.** Comparación de las rutas biosintéticas derivadas del aminoácido tirosina e implicadas en la obtención de feniletilaminas y catecolaminas.

Como se deduce de la Figura 10, TYR no solo actúa como precursor de OCT, sino que también lo es de otras dos BAs, N-metiltiramina (NMT) y hordenina (HOR), ambas obtenidas también a partir del aminoácido tirosina, pero mediante otra ruta paralela que involucra también la presencia de TYR. Estas dos BAs no han sido objeto directo de estudio en esta Tesis, pero sí que se han tenido en cuenta en la búsqueda no dirigida en el capítulo dedicado a la determinación de BAs, de ahí que se hayan incluido en el esquema biosintético.

### 1.5.2. Sinefrina. Estereoisomería y actividad biológica

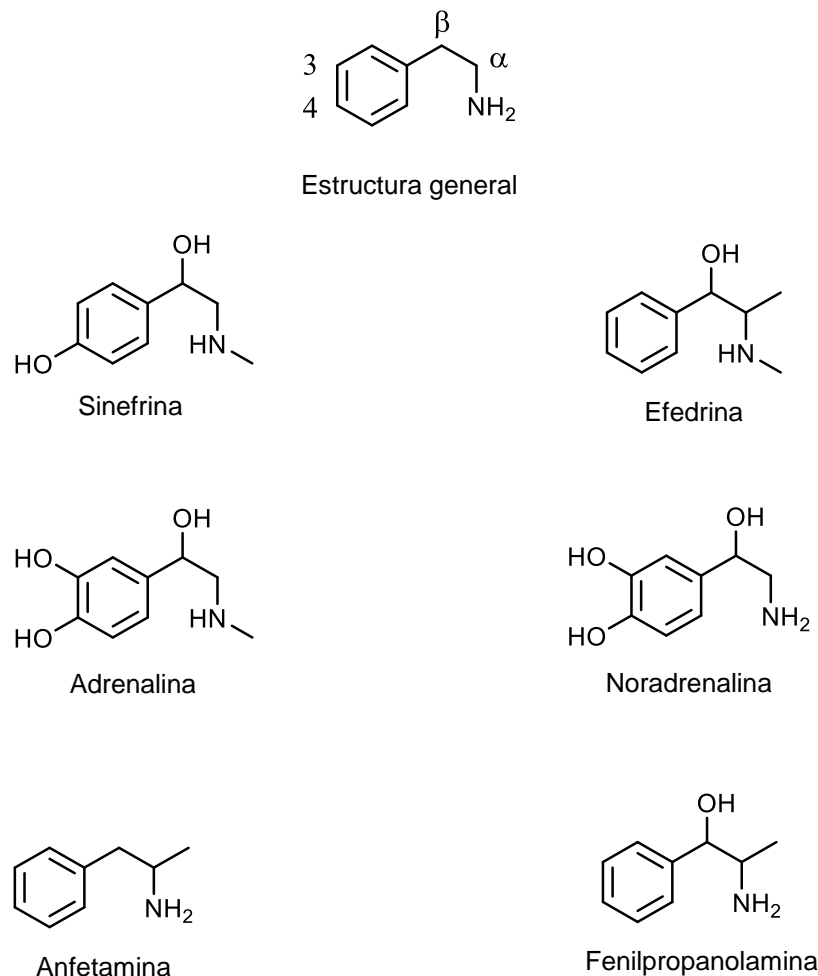
En la actualidad, la obesidad está considerada como uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial que, además, supone un factor de riesgo grave de padecer otras enfermedades como Diabetes *Mellitus* de tipo 2, hipertensión arterial, problemas cardiovasculares e incluso algunos tipos de cáncer. En base a los datos publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2014, casi dos billones de la población adulta sufrían de sobrepeso, mientras que 600 millones estaban diagnosticados con obesidad. Sin embargo, las previsiones no son esperanzadoras y se estima que para el año 2030, la cantidad de personas afectadas con sobrepeso u obesidad ronde los 2,16 y los 1,12 billones de personas mayores de dieciocho años, respectivamente, en todo el mundo [42]. Por ello, desde hace varios años, existe en la sociedad una elevada demanda de medicamentos o complementos dietéticos con efecto anoréxico (supresor del apetito) o bien que incrementen la velocidad del metabolismo energético favoreciendo la termogénesis [43].

La sinefrina (SNP) es el protoalcaloide mayoritario en los árboles de la familia *Rutaceae* como la naranja amarga (*Citrus aurantium*), naranja de Sevilla y algunas variedades de naranja procedentes de China. En su estado natural, este protoalcaloide se encuentra en las frutas del género *Citrus* en el rango de concentraciones de 0,10 a 0,35% m/m, un valor que asciende hasta el 3,00–3,08% m/m en el caso de los extractos secos de esta fruta [44]. Este compuesto se ha identificado a menudo como el “componente activo” utilizado en la preparación de productos naturales para la pérdida de peso, ya que se cree que, a largo plazo, la ingesta crónica de *p*-SNP puede reducir la cantidad de grasa del organismo mediante un aumento de la termogénesis y la oxidación lipídica, aunque, al menos recientemente no existen evidencias clínicas que apoyen este hecho [45].

En este sentido, la popularidad del uso de *p*-SNP en los suplementos dietéticos para la pérdida de peso se vio incrementada cuando, en 2004, la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA) prohibió el uso de efedrina y del resto de las sustancias derivadas de la *Ephedra*, que hasta entonces eran las sustancias habituales en dichos complementos. Sin embargo, en 2009, la SNP fue incluida en el Programa de Monitoreo de la Agencia Mundial Anti-dopaje (WADA). Este programa se diseñó con el objetivo de localizar sustancias que por su potencial de peligrosidad pudieran ser incluidas más tarde en la Lista de Sustancias Prohibidas de la misma agencia. En este programa se incluyen entre otras familias de compuestos, estimulantes como cafeína o fenilpropanolamina, que, aunque aún no ostentan el estado de prohibidas, sí que la WADA las pretende monitorizar para evitar su uso indebido en las competiciones deportivas de más alto nivel. En este año 2023, tanto SNP como fenilefrina

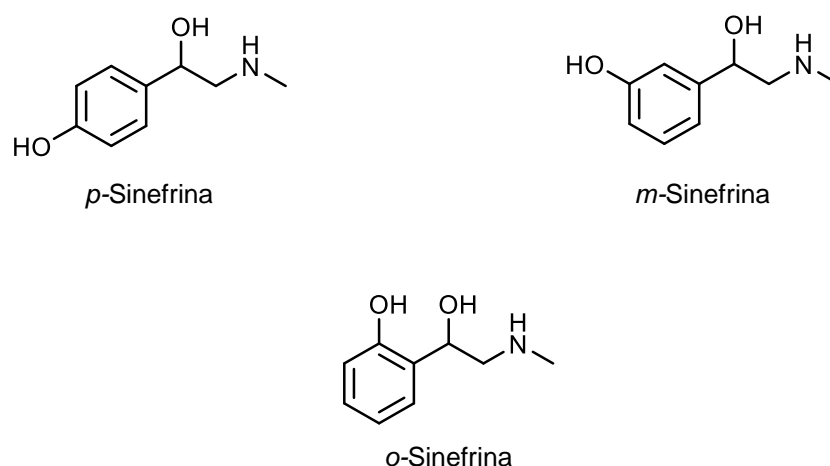
(PEP), siguen apareciendo en el Programa de Monitoreo de la WADA como dos de los estimulantes sujetos a vigilancia en el ámbito deportivo [44, 46, 47].

A nivel químico, SNP es un protoalcaloide ya que deriva biosintéticamente del aminoácido fenilalanina, pero no contiene ningún átomo de nitrógeno heterocíclico. Puede existir como tres isómeros de posición diferentes (*orto*-, *meta*- y *para*-), cuyas propiedades no son equivalentes. A su vez, cada uno de estos isómeros de posición presenta dos formas enantioméricas como consecuencia de la presencia de un carbono quiral en la cadena alquílica de la molécula. La SNP presenta una estructura química similar a otros agonistas adrenérgicos como efedrina, anfetamina, fenilpropanolamina, adrenalina y noradrenalina, cuyas estructuras se muestran en la Figura 12. Todas estas sustancias tienen en común la presencia de un anillo aromático en el que una de sus posiciones está sustituida por una cadena de etilamina. La actividad biológica de estos compuestos depende de los sustituyentes tanto del anillo aromático como de los que ocupan las posiciones de los carbonos  $\alpha$  y  $\beta$  de la cadena lateral [48].



**Figura 12.** Estructura química de compuestos con una estructura similar a SNP.

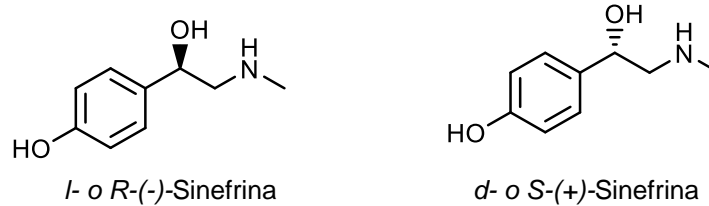
El isómero *p*-SNP es el derivado fenilalanínico que contiene el grupo hidroxilo en la posición *para*- del anillo aromático de la molécula, mientras que el isómero *meta*-, también conocido como fenilefrina, contiene este grupo hidroxilo en la posición meta (Figura 13). De todos los isómeros, *o*-SNP es el menos conocido, aunque se sabe que no exhibe efectos farmacológicos en el ser humano. Tanto *m*-SNP como *o*-SNP no se encuentran de forma natural en las frutas del género *Citrus aurantium* por lo que su presencia no es habitual en los extractos de estas plantas, lo que explican que no se encuentren en los productos naturales destinados a la pérdida de peso [49, 50].



**Figura 13.** Estructura química de los tres isómeros de posición de SNP.

Las sutiles diferencias estructurales y estereoquímicas entre *p*-SNP y *m*-SNP conducen a diferentes mecanismos de unión a los receptores adrenérgicos. Esta diferencia está detrás de la ausencia de efectos cardiovasculares nocivos de *p*-SNP en comparación con *m*-SNP, a la que sí se le considera un alcaloide potencialmente dañino para el sistema cardiovascular [51].

En cuanto a la enantiomería de la molécula de SNP (Figura 14), el isómero *p*-SNP existe en la naturaleza (en las frutas del género *Citrus*) en la forma enantiomérica R(-), también conocida como *l*-, mientras que la *p*-SNP sintetizada en laboratorio existe como mezcla racémica de los dos enantiómeros *R* y *S*, a los que también se puede nombrar como formas *l*- y *d*-, respectivamente. Esto se debe a que, de forma natural, los aminoácidos están presentes en las plantas sólo en la forma *l*-, siendo esta forma la que se incorpora después a los mamíferos. La ruta de biosíntesis de la forma *l*-*p*-SNP a partir del aminoácido *l*-tirosina es la responsable de que sólo sea posible encontrar la forma *l*- de la *p*-SNP de forma natural en lugar de la mezcla racémica que aparece cuando se obtiene de forma sintética [52].

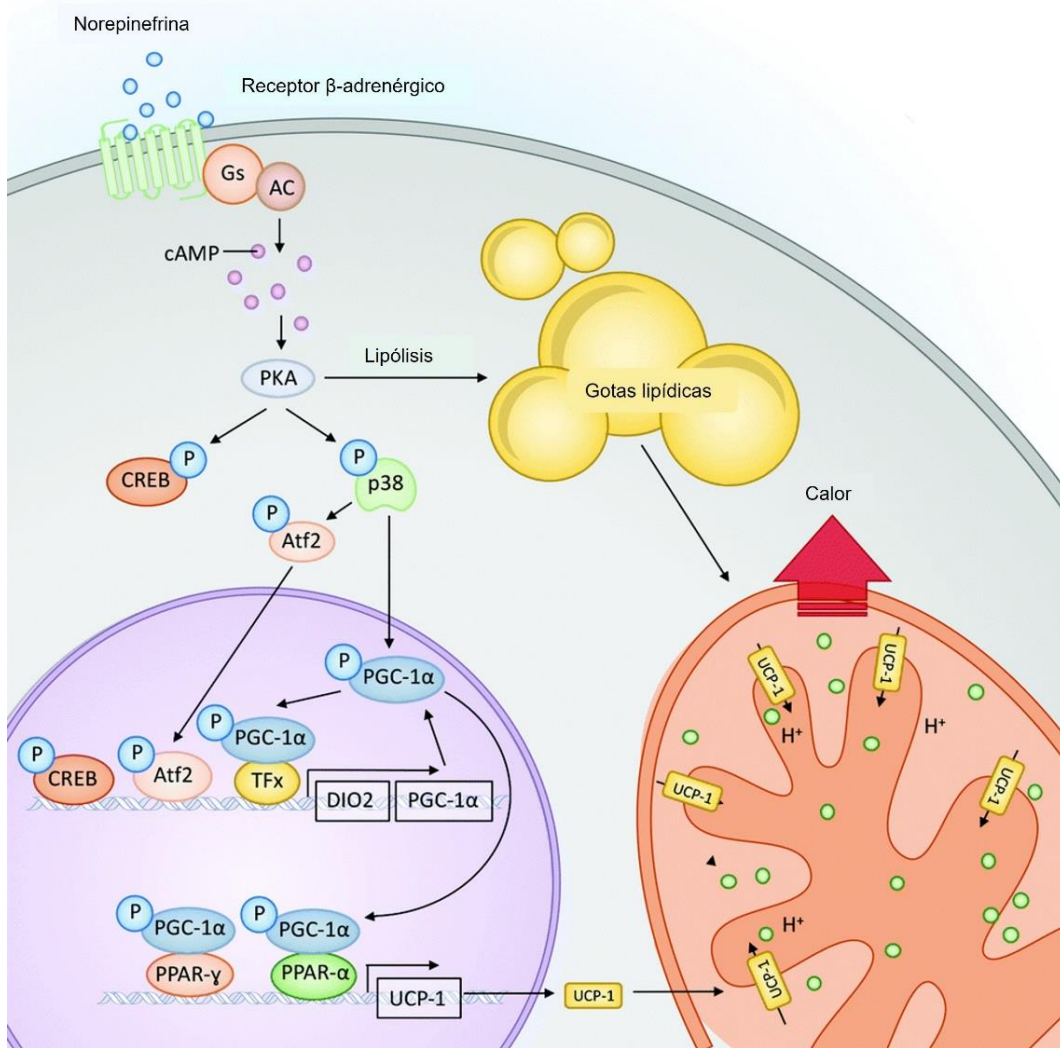


**Figura 14.** Enantiómeros *R* y *S* de *p*-SNP.

El mecanismo de acción de *p*-SNP en la potenciación de la termogénesis y del mecanismo oxidativo de los lípidos se puede describir considerando la habilidad de *p*-SNP para unirse a los adrenoreceptores  $\beta_3$ . En el ser humano, estos adrenoreceptores se expresan tanto en el tejido adiposo (blanco y pardo) como en el músculo esquelético y tienen un papel fundamental en el balance energético del metabolismo, así como en la regulación de la glucosa y de las grasas. La unión de *p*-SNP a los receptores adrenérgicos  $\beta_3$ , localizados en los adipocitos, promueve la liberación de adenosín monofosfato cíclico (cAMP), que a su vez activa la liberación de triglicéridos al torrente sanguíneo, en un proceso que se conoce como estimulación adrenérgica. La Figura 15 muestra un esquema general del mecanismo descrito.

Por otro lado, *p*-SNP muestra una baja afinidad de unión a los adrenoreceptores  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  y  $\beta_2$ . De hecho, se ha comprobado que dicha unión es unas cien veces menos eficiente que la del isómero *m*-SNP. En resumen, el isómero *p*-SNP presenta buena afinidad hacia los adrenoreceptores  $\beta_3$ , no tan buena para los  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  y  $\beta_2$ , mientras que el isómero *m*-SNP, exhibe una afinidad de unión inversa o contraria a *p*-SNP, es decir, tendrá preferencia por unirse a los adrenoreceptores  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  y  $\beta_2$  [44, 53, 54].

La selectividad en la afinidad de unión a los diferentes adrenoreceptores es la responsable, como ya se citó en párrafos anteriores, de que el enantiómero *l*-*p*-SNP no produzca efectos cardiovasculares dañinos que afecten al ritmo cardíaco o la presión sanguínea, mientras que para *m*-SNP sí se han descrito estos efectos adversos. Además, basándose únicamente en la unión a los adrenoreceptores  $\beta_3$ , la *p*-SNP sintética (en forma de mezcla racémica) ejerce aproximadamente la mitad de la actividad biológica de la forma natural *l*-*p*-SNP. Esta diferencia se explica porque el enantiómero *d*- o *S*-(+)-SNP muestra una unión muy baja o casi nula a los receptores adrenérgicos en comparación con la forma *l*- [52].



**Figura 15.** Esquema del proceso de estimulación adrenérgica en los adipocitos [54].

Finalmente, *p*-SNP también puede estimular receptores específicos en el cerebro, ya que actúa como un agonista potente y selectivo de los receptores conocidos como neuromedin U2 (NMU2R). Más específicamente, estos receptores destacan en regiones del hipotálamo y se conocen por estar asociados con la regulación de muchas funciones fisiológicas de elevada importancia, entre las que se incluyen la ingesta de comida, el balance energético o la respuesta al estrés. La activación conjunta de los receptores adrenérgicos β3 y NMU2R puede contribuir a la actividad lipolítica de *p*-SNP, por lo que se cree que ésta, también puede estar involucrada en la regulación de la ingesta de comida y en la homeostasis energética mediante la activación de los receptores NMU2R del sistema nervioso central [55].



## 2. ANÁLISIS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

En la actualidad, el análisis de muestras de origen biológico, también conocido como bioanálisis, es una pieza fundamental en la evaluación toxicológica y en estudios de farmacocinética y farmacodinámica ligados al desarrollo de nuevos fármacos, así como en otras disciplinas biosanitarias, análisis forense, control antidopaje o la identificación de biomarcadores para el diagnóstico de diferentes enfermedades. Los procedimientos bioanalíticos constan de una serie de etapas entre las que se incluyen el muestreo, la preparación de la muestra, análisis, calibración y el análisis de los datos obtenidos [56].

El bioanálisis de sustancias químicas y bioquímicas requiere la identificación y elucidación estructural de los compuestos de interés, seguido de su cuantificación, siendo los analitos más comúnmente estudiados fármacos, metabolitos y biomarcadores. Estos análisis suponen todo un desafío debido principalmente a la complejidad de las matrices biológicas, que incluyen sangre, suero, plasma, orina, tejidos, saliva y otros fluidos del organismo como el cerebroespinal o el gástrico [57].

El término "*biomarcador*" se usa en medicina para referirse a la medida de una proteína en sangre cuya concentración indique la respuesta normal o patológica del organismo. Pero desde una perspectiva más amplia, en 1998, el Grupo de Trabajo de Definiciones de Biomarcadores estableció que un biomarcador es toda aquella sustancia que se mide y evalúa de forma objetiva como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica [58, 59]. Para seleccionar el biomarcador adecuado debe considerarse su perfil de eliminación del organismo, su estabilidad química y sus características para ser monitorizado a bajos niveles de concentración.

Las numerosas ventajas que presenta el análisis de fluidos biológicos han propiciado que se extienda de forma generalizada el estudio de los metabolitos como una herramienta más en la práctica clínica. La variación de metabolitos como indicador primario de una enfermedad ha hecho posible el diagnóstico de enfermedades, por lo que su determinación se ha convertido en una parte fundamental de los análisis en ámbitos sanitarios [60].

Como se ha indicado con anterioridad, los principales inconvenientes asociados al análisis de muestras biológicas se deben a su inherente complejidad y a los bajos niveles de concentración a los que habitualmente se encuentran las especies de interés. Así, la mayoría de las determinaciones se hallan condicionadas por el efecto matriz como consecuencia de la presencia de macromoléculas, tanto endógenas como exógenas, pequeñas moléculas y sales que pueden interferir en el análisis. El efecto matriz, junto con las bajas concentraciones de los

analitos impide que las muestras puedan ser analizadas sin incluir una etapa previa de preconcentración y eliminación de interferentes [61].

La orina como matriz biológica en bioanálisis presenta numerosas ventajas que la convierten en uno de los fluidos más comúnmente monitorizados. Se trata de un tipo de muestra de fácil accesibilidad en cuanto a cantidad disponible, y su recolección, de carácter no invasivo, no requiere de personal especializado. Además, las etapas de preparación previa al análisis suelen ser menos complejas respecto a otras muestras biológicas por sus bajos contenidos en proteínas, lípidos y otras biomoléculas de elevado peso molecular. Otra ventaja a tener en cuenta es que, para algunos analitos, los niveles de concentración en orina son más altos que en otros fluidos, lo que facilita su detección y cuantificación [62].

La orina se halla compuesta en un 95% de agua, y además contiene iones inorgánicos como sodio, amonio, fosfatos o sulfatos, y moléculas orgánicas como urea, creatinina, proteínas y otras sustancias de desecho procedentes del hígado y los riñones, tales como fármacos o metabolitos. En personas sanas, la orina presenta cierto carácter ácido en la mañana (pH 6,5-7,0), mientras que su pH se eleva ligeramente (pH 7,5-8,0) durante la noche debido a la ausencia de ingesta de alimentos o bebidas. En cuanto a la toma de muestra, el tiempo que pasa desde su recolección hasta el análisis es fundamental y tiene gran influencia en la calidad y fiabilidad de los resultados ya que pueden producirse cambios en la concentración de los analitos y también pueden formarse compuestos endógenos de la orina. Para evitar estos problemas y garantizar la correcta preservación de las muestras de orina hasta el momento del análisis, lo ideal es refrigerarlas entre 0 y 4 °C si se van a utilizar en un máximo de dos días, o congelarlas a -20 °C durante un periodo de tiempo no superior a los seis meses [57].

Por otro lado, una gran variedad de estudios clínicos y biológicos usan muestras de suero o plasma en lugar de sangre, ya que, al ser esta última una matriz más compleja, la interpretación de los resultados de los análisis realizados puede acarrear ciertas complicaciones. Tanto el suero como el plasma derivan de la sangre completa sometida a diferentes procesos bioquímicos. En los vertebrados, la sangre se compone de células sanguíneas suspendidas en plasma. A su vez, el plasma representa el 55% del total de la sangre y está formado mayoritariamente por agua (un 92% en volumen), las propias células sanguíneas, proteínas, glucosa, iones minerales, hormonas y dióxido de carbono, debido a que el plasma es el principal medio de transporte de los productos de desecho del organismo [57].

La separación del plasma y el suero de la sangre es de máxima importancia ya que, en la práctica, se requiere para llevar a cabo el análisis de los componentes sanguíneos disueltos sin perturbaciones. La recolección de las muestras de suero y plasma se lleva a cabo tomando una muestra de sangre venosa de primera hora de la mañana, que inmediatamente se separa en

dos alícuotas. Una de ellas se coloca en un tubo vacío para recolectar el suero, mientras que la otra se deposita en otro tubo que contiene un anticoagulante como, por ejemplo, ácido etileno diaminotetraacético o anión citrato, para proceder a la recolección del plasma. Tanto suero como plasma se aíslan por centrifugación y después se almacenan a la temperatura adecuada según el propósito del análisis [57].

Las muestras de suero y plasma requieren una etapa de preparación previa al análisis que simplifique la matriz. En este sentido, la precipitación de las proteínas resulta imprescindible en la mayoría de los casos, habiéndose llevado a cabo mediante la adición de disolventes orgánicos solubles en agua (acetonitrilo, acetona o metanol), sales (cloruro de aluminio), iones metálicos (sulfato de cinc) o provocando un cambio en el pH del medio que altere la naturaleza química de estos interferentes [63].

En aquellos casos en los que las especies de interés se hallan tanto en plasma como en suero, suele seleccionarse esta última matriz porque ofrece diversas ventajas como: menor contaminación de células, ya que después de la centrifugación el suero está técnicamente libre de componentes celulares, mientras que sí es posible encontrar algunos en el plasma; mejor estabilidad para algunos tipos de medidas, por ejemplo en el caso de la glucosa, cuya estabilidad es mayor en suero cuando la muestra ha de almacenarse a temperatura ambiente; ausencia de anticoagulantes, puesto que su obtención a partir de la sangre no implica el uso de estos reactivos que pueden provocar interferencias en las determinaciones analíticas, y, por último, ofrece la posibilidad de usar las muestras para electroforesis de proteínas en suero [64].

La combinación de cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) se ha convertido en la actualidad en la principal herramienta para bioanálisis. La gran variedad de columnas analíticas disponibles en el mercado proporciona un amplio rango de selectividad, con lo que se garantiza que sea posible encontrar la fase estacionaria adecuada en función de las propiedades fisicoquímicas de los fármacos, metabolitos, biomarcadores y demás analitos que se deseen determinar. Por otro lado, la LC de ultra-alta resolución (UHPLC) ha permitido mejorar la eficiencia y resolución de las separaciones cromatográficas debido al empleo de columnas cuya fase estacionaria presenta un tamaño de partícula considerablemente menor que en LC convencional [56].

### 3. LA DERIVATIZACIÓN EN EL PROCESO ANALÍTICO

La derivatización química como etapa previa al análisis mediante LC se lleva aplicando desde los años 1980 ya que proporciona una estrategia capaz de resolver muchos problemas analíticos [65]. La inclusión de una etapa de derivatización supone un paso añadido en el análisis de las muestras, cuya aplicación está justificada cuando facilita el aislamiento, separación y detección del analito, pero también cuando proporciona resultados de mayor robustez. Todo ello es posible dado que la derivatización puede mejorar la estabilidad de los analitos, reducir el nivel de interferencias de la matriz y mejorar también la reproducibilidad del método analítico, ya que, en muchos casos, aunque implique una etapa adicional, supone una simplificación de la matriz, lo que finalmente repercute positivamente en los resultados obtenidos [66].

Son muchos los compuestos químicos cuya estructura carece de grupos cromóforos para su detección mediante UV-Visible; fluoróforos, para la detección por fluorescencia o quimioluminiscencia; electróforos, para la detección electroquímica, o bien, presentan una baja eficiencia de ionización, lo que les impide ser detectados mediante MS. Mediante reacciones químicas sencillas, aquellos compuestos que presenten en su estructura grupos funcionales reactivos pueden mejorar sus características de detección al modificar su estructura química, lo que conlleva también a una modificación de sus propiedades físicas y químicas. La etapa de derivatización también puede utilizarse con la finalidad de minimizar la interferencia generada por la matriz de la muestra, ya que puede alterar la posición del analito en el cromatograma, desplazando su señal cromatográfica con respecto a la de las sustancias interferentes [66, 67].

En muy diversas aplicaciones es fundamental la disponibilidad de métodos analíticos que sean elevadamente sensibles y selectivos, como es el caso de la determinación de compuestos a nivel de trazas en matrices complejas como las muestras biológicas. En este sentido, la combinación de LC con espectrometría de masas (MS) se ha convertido, gracias a sus inherentes características de sensibilidad y selectividad, en una de las técnicas analíticas más destacadas y prometedoras para este fin. Sin embargo, muchos compuestos presentan dificultad para su ionización o fragmentación, lo que se traduce en una detección con una sensibilidad muy baja [68]. La integración del proceso de derivatización en el análisis mediante LC-MS presenta las siguientes ventajas [69]:

- ◆ Mejora de la selectividad y separación cromatográfica.
- ◆ Mejora de la eficiencia de ionización.
- ◆ Mejora en la elucidación estructural.
- ◆ Eliminación de interferencias endógenas.
- ◆ Mejora la eficiencia de separación de isómeros.

Sin embargo, en la actualidad aún existen muchos desafíos frente a las posibilidades de la derivatización química, ya que esta etapa no está exenta de problemas. Entre las dificultades más importantes se incluyen la formación de subproductos en el transcurso de la reacción, la aplicación, en ocasiones, de condiciones de reacción relativamente severas, largos tiempos de reacción, reacciones no cuantitativas y también la degradación de los aductos formados [69]. Son muchos los reactivos derivatizantes disponibles comercialmente, así la selección del más adecuado para cada grupo de analitos resulta crucial para el éxito del proceso. Un buen agente derivatizante debe incluir [66]:

- ◆ Un grupo funcional reactivo que controle la velocidad, extensión y selectividad de la reacción.
- ◆ Una unidad estructural que proporcione al aducto formado una buena respuesta en el método de detección seleccionado.

Otras consideraciones a tener en cuenta a la hora de seleccionar el mejor reactivo derivatizante son el tiempo de reacción, si la reacción se completa en su totalidad o no, las condiciones necesarias para llevarla a cabo, la estabilidad de los productos derivatizados y también, si el exceso de reactivo puede ser eliminado con facilidad de la muestra [66].

Cuando la separación por LC se acopla a MS, los sistemas de ionización más empleados son los basados en ionización por electrospray (ESI) e ionización química a presión atmosférica (APCI), aunque el uso de la etapa de derivatización con el objetivo de mejorar la eficiencia de ionización es más común con ESI. Para ello, el aducto derivatizado debe contener en su estructura, bien un grupo iónico o un grupo funcional que se cargue con facilidad bajo las condiciones aplicadas en ESI. Para el caso de compuestos de bajo peso molecular, como son los analitos estudiados en esta Tesis Doctoral, se prefieren agentes derivatizantes de elevado peso molecular para así formar aductos voluminosos cuya ionización se produce en un rango de masas del espectro en el que el ruido de fondo es bajo y por tanto la señal obtenida es más limpia [66]. Teniendo esto en cuenta, es preferible que el reactivo cumpla también con las siguientes indicaciones [70]:

- ◆ La reacción del agente derivatizante con los analitos debe transcurrir bajo unas condiciones suaves, así como generar los aductos derivatizados con un rendimiento alto.
- ◆ El agente derivatizante debe estar disponible comercialmente o bien, debe poder sintetizarse de forma sencilla.
- ◆ El aducto derivatizado formado debe tener una proporción iónica o ionizable en su estructura y la hidrofobicidad apropiada.

Por último, la reacción de derivatización se puede llevar a cabo en dos modalidades, denominadas derivatización pre-columna y post-columna. Como su nombre indica, la derivatización pre-columna se realiza antes de la separación cromatográfica y afecta a la separación de los compuestos, mientras que la derivatización post-columna, se realiza una vez que se ha producido la separación de los analitos afectando en este caso, a la etapa de detección [66].

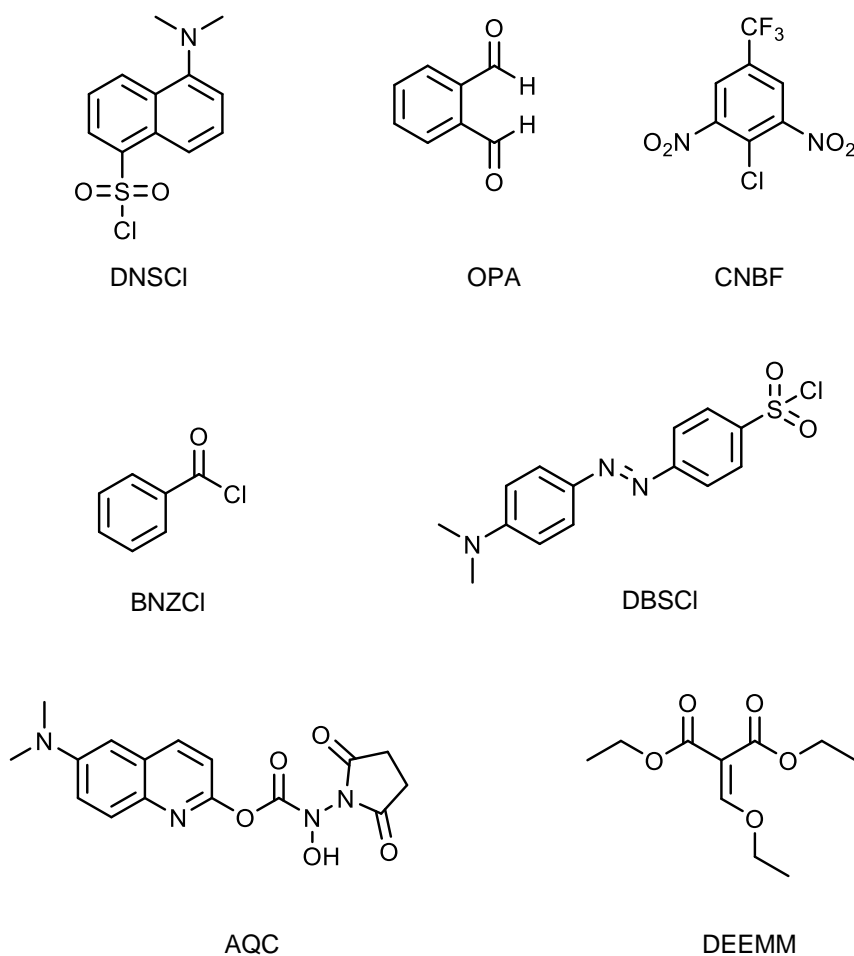
En la presente Tesis Doctoral, se ha aplicado la etapa de derivatización a compuestos de bajo peso molecular, concretamente a aminas biogénicas (BAs), bajo la modalidad pre-columna. A continuación, se dedica un subapartado a estas reacciones de derivatización.

### **3.1 DERIVATIZACIÓN DE AMINAS BIOGÉNICAS. REACCIÓN CON CLORURO DE DANSILO**

De forma general, las BAs se ionizan eficientemente en ESI en modo positivo. Sin embargo, su análisis en muestras biológicas mediante LC-MS presenta el inconveniente de la presencia de interferencias procedentes de la matriz, además de que los contenidos en estas muestras suelen ser bastante bajos. Para tratar de solventar estos problemas, la derivatización se presenta como una solución que permite mejorar su comportamiento cromatográfico, la selectividad del método mediante la reducción del efecto matriz y la co-elución de especies interferentes, así como el incremento de su eficiencia de ionización [71].

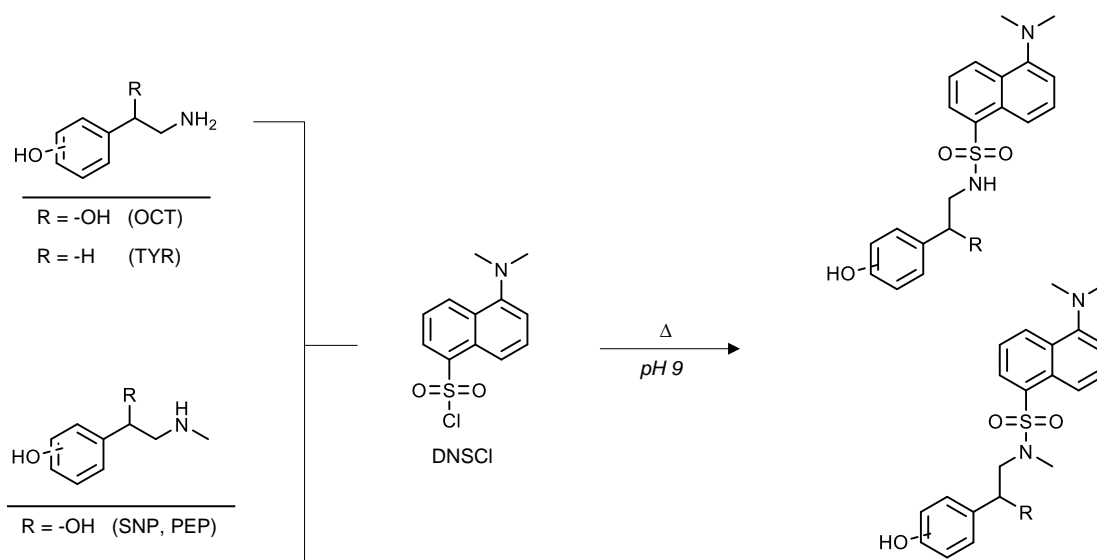
Además, estas aminas suelen ser compuestos de elevada polaridad y muy hidrofílicos, por lo que su solubilidad en agua es también bastante alta. Todas estas características, unido a su carácter básico hace que su separación en una columna de fase reversa (RP) sea un desafío. Mediante la etapa de derivatización las aminas se transforman en otros compuestos más hidrofóbicos. Esta conversión puede facilitar su separación ya que un aumento del peso molecular hace que disminuya el ruido de fondo de la matriz ya que, por lo general, el fondo es menor cuanto mayor es el rango de masas [69, 70].

Actualmente, los reactivos derivatizantes más empleados para análisis de aminas se pueden dividir en diferentes clases: haluros de sulfonilo, haluros de acilo, isotiocianatos, N-hidroxisuccinimidias, aldehídos, ácidos fosfónicos y halógenos activos. De todos ellos, los más utilizados son o-ftalaldehído (OPA), 4-cloro-3,5-dinitrobenzotrifluoruro (CNBF), cloruro de benzoilo (BNZCl), cloruro de dabsilo (DBSCI), cloruro de dansilo (DNSCI), carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo (AQC) y etoximetilnomalonato de dietilo (DEEMM) (Figura 16). Estos compuestos reaccionan con los grupos amino y requieren un medio de reacción de pH básico [72].



**Figura 16.** Estructuras químicas de los principales reactivos empleados en la derivatización de aminas.

De todos los reactivos citados, DNSCI es el que se utiliza más ampliamente ya que da lugar a la formación de aductos estables capaces de ser detectados por absorción UV-Visible y fluorescencia. Además, para los derivados dansilados se observa una mejora de la ionización y de la retención cromatográfica, ya que se introduce el grupo amina terciaria fácilmente ionizable y el grupo hidrofóbico de naftilo. Sin embargo, DNSCI es un reactivo inespecífico ya que además de reaccionar con el grupo amino también lo hace con fenoles y alcoholes alifáticos. DNSCI propicia tanto la derivatización de aminas primarias como secundarias, pero no reacciona con las terciarias (Figura 17). La reacción tiene lugar a pH 9 y en ella se elimina una molécula de ácido clorhídrico, dando lugar a la formación de un enlace azufre-nitrógeno [71, 73].



**Figura 17.** Esquema de reacción de DNSCI con la estructura general de las aminas estudiadas en esta Tesis.

#### 4. QUÍMICA VERDE Y QUÍMICA ANALÍTICA VERDE

La Revolución Industrial provocó un desarrollo exponencial de la actividad industrial en todos los sectores. El crecimiento de la industrialización supuso también todo un hito para la evolución de la economía mundial. Los residuos generados por estas actividades se vertían deliberadamente al medioambiente afectando a terrenos, reservas hídricas y a la atmósfera. Así fue como el término “Química” fue asociándose cada vez más al de contaminación. Esta idea, aunque cada vez más debilitada, aún perdura en el pensamiento colectivo actual, lo que hace que la Química se perciba como una ciencia peligrosa y a menudo como un sinónimo de actividades tóxicas o dañinas.

Aunque el primer signo de preocupación por el medio ambiente se puso de manifiesto en 1949, en la “Conferencia Científica de Naciones Unidas para la Conservación y Uso de los Recursos” (UNSCCUR), no fue hasta el año 1968, cuando el foco de atención se dirigió hacia los problemas medioambientales. Unos años más tarde, en 1972, en la Conferencia de Estocolmo, se consideró la tramitación, dentro del plano legal, de una legislación medioambiental. Tras 10 años de evaluación de las acciones propuestas en la Conferencia de Estocolmo, las Naciones Unidas crearon en 1983 la “Comisión Mundial sobre Medioambiente y Desarrollo” con el objetivo de elaborar un informe, conocido como Informe Brundtland y publicado en 1987, en el que se definía por primera vez el concepto de desarrollo sostenible como “*un desarrollo que permite satisfacer las necesidades de las generaciones presentes sin comprometer las de las generaciones futuras*” [74].



En la actualidad, la Química juega un papel fundamental para garantizar que las futuras formas de generación de productos químicos, materiales y fuentes de energía sean más sostenibles de lo que lo son en la actualidad. La demanda mundial de procesos y productos químicos más respetuosos con el medioambiente requiere a su vez del desarrollo de nuevos enfoques orientados a prevenir posibles fuentes de contaminación ambiental, así como a una mayor rentabilidad desde el punto de vista económico. Afortunadamente, el auge tanto de políticas orientadas a la protección medioambiental junto con el desarrollo de la Química Verde han hecho posible que ese estigma negativo que se cernía sobre la Química vaya desapareciendo paulatinamente, y se vea como una disciplina aliada para afrontar los desafíos en materia medioambiental y energética a los que la sociedad tiene que hacer frente [75].

La Química Verde se define como *“el diseño de productos y procesos químicos orientados a la reducción o eliminación del uso y generación de sustancias peligrosas”*. El concepto de Química Verde fue acuñado por Paul Anastas y John Warner por primera vez en el año 1998. En línea con este concepto, se postularon 12 principios (Tabla 1), que abogan por la minimización o eliminación del uso de disolventes tóxicos en procesos y análisis químicos, así como la no generación de residuos en estos procesos. Estos principios se consideran “reglas de diseño” y sirven como guía para el diseño de nuevos productos y procesos químicos aplicadas a todas las etapas del proceso industrial, considerando desde las materias primas de partida hasta la eficiencia y seguridad de la transformación, e incluyendo también la toxicidad y biodegradabilidad de los productos y reactivos utilizados, para así alcanzar el objetivo de la sostenibilidad.

El enfoque de la Química Verde se esfuerza en conseguir la sostenibilidad a nivel molecular, por lo que se ha aplicado a muy diversos sectores industriales tales como el aeroespacial, automovilístico, cosmético, electrónica, energía, e incluso en agricultura, demostrando el éxito en la aplicación de tecnologías económicamente más competitivas. Los aspectos principales en los que se enmarca la Química Verde se pueden resumir en tres puntos [76]:

- i. Aplicación de los principios de diseño de la Química Verde en todas las etapas del ciclo de vida de un producto químico.
- ii. El diseño de productos químicos que de forma inherente no sean perjudiciales, para así reducir su riesgo intrínseco.
- iii. Su actuación como sistema de cohesión entre los principios y criterios de diseño.

**Tabla 1.**

Enunciados de los 12 principios de la Química Verde [77].

Número	Principio
1	Prevenir la generación de residuos.
2	Maximizar la economía atómica.
3	Diseñar síntesis químicas más seguras.
4	Diseñar reactivos y productos químicos más seguros.
5	Usar reactivos y condiciones de reacción más seguras.
6	Aumentar la eficiencia energética.
7	Usar materias primas renovables.
8	Evitar el uso de etapas previas de derivatización.
9	Aumentar el uso de catalizadores frente a reactivos en cantidades estequiométricas.
10	Diseñar reactivos y productos químicos degradables.
11	Analizar en tiempo real para prevenir la contaminación.
12	Minimizar el riesgo de accidentes.

Por otro lado, la Química Analítica Verde (QAV) es un concepto que, pese a llevar utilizándose más de veinte años, no se materializó hasta 2013, cuando Galuszka *et al.* [78] adaptaron los 12 principios de la Química Verde a la Química Analítica Verde. Estos 12 nuevos principios, expresan la buena disposición a velar por la seguridad humana y medioambiental durante el desarrollo y la aplicación de procedimientos analíticos. La QAV se define como “*el uso de técnicas de la química analítica y las metodologías que reducen o eliminan disolventes, reactivos, preservantes y otros productos químicos que son peligrosos para la salud humana o el medioambiente y que pueden permitir también análisis más rápidos y eficientes energéticamente sin comprometer los criterios de rendimiento*” [79].

Por lo que respecta a la QAV, una correcta implementación de estos principios incluye prácticas como la minimización en el consumo de reactivos, ahorro energético, reducción de productos de desecho, eliminación de factores que puedan causar daños al analista, y un incremento del grado de integración, automatización, miniaturización y portabilidad de las herramientas y procedimientos analíticos. La Tabla 2 recoge los 12 principios de la QAV [80].

**Tabla 2.**

Enunciados de los 12 principios de la QAV.

Número	Principio
1	Aplicar técnicas analíticas directas para evitar el tratamiento de la muestra.
2	Minimizar el tamaño y el número de muestras.
3	Realizar medidas <i>in situ</i> .
4	Integrar operaciones y procesos analíticos para ahorrar energía y reducir el uso de reactivos.
5	Seleccionar métodos automatizados y miniaturizados.
6	Evitar etapas previas de derivatización siempre que sea posible.
7	Evitar la generación de un gran volumen de desechos y gestionar de forma adecuada los residuos generados.
8	Aplicar métodos multianalíticos o multiparamétricos frente a métodos que solo determinan analitos de uno en uno.
9	Minimizar el uso de energía.
10	Priorizar el uso de reactivos procedentes de fuentes naturales.
11	Eliminar o reemplazar los reactivos tóxicos.
12	Incrementar la seguridad del operador.

## 5. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA Y MINIATURIZACIÓN

Históricamente, la determinación precisa de un analito a nivel de trazas sin la aplicación previa de tratamiento de muestra ha sido, y sigue siendo, todo un desafío para los químicos analíticos. En muy variadas ocasiones no es posible el análisis directo por incompatibilidad de la muestra y/o analito con el sistema de medida, siendo necesaria la conversión apropiada de analitos y/o muestra para la aplicación de la técnica analítica seleccionada [81].

La preparación de la muestra está considerada como la etapa más crítica y que mayor tiempo consume dentro de un análisis químico. Es por tanto, una etapa crucial, que en las últimas dos décadas ha alcanzado cierta madurez. Resulta imprescindible desarrollar métodos fiables que proporcionen adecuados parámetros de sensibilidad, precisión, exactitud y recuperación, entre otros [82]. De hecho, la preparación de la muestra requiere que se aborden las siguientes cuestiones [83]:

- i. La concentración de los analitos, que muchas veces se encuentran por debajo del límite de detección del método de análisis elegido.
- ii. El grado de complejidad de la matriz, que puede interferir con la separación o detección de los analitos.
- iii. Compatibilidad de la muestra con la instrumentación empleada.
- iv. En el caso de que los analitos sean incompatibles con el sistema de medida es necesario llevar a cabo su conversión química.

En este sentido, las técnicas de tratamiento de la muestra tienen como objetivo proporcionar soluciones a los problemas anteriormente citados, por lo que es necesario considerar tres acciones principales [81]:

- i. Preconcentración de los analitos para mejorar su detección.
- ii. Simplificación de la matriz.
- iii. Transformación del analito a una forma que sea compatible con el equipo de medida.

De entre los diferentes tipos de matrices de muestra, las biológicas están clasificadas como unas de las más complejas y difíciles de trabajar. Por lo general, son directamente incompatibles con los análisis cromatográficos debido a su complejidad y a su elevado contenido en proteínas, ya que éstas se adsorben de forma irreversible a la fase estacionaria de la columna cromatográfica, lo que conlleva a una pérdida sustancial de la eficiencia de la columna y a un aumento de la presión del sistema. Por ello, el tratamiento de la muestra constituye una parte clave e integral de los métodos bioanalíticos [84].

Además de su complejidad, también hay que tener en cuenta el estado de agregación en que se encuentran las muestras a analizar. Los analitos pueden estar contenidos bien en muestras sólidos o líquidas. Tradicionalmente, la extracción de analitos contenidos en muestras líquidas se llevaba a cabo bien por partición en un disolvente inmiscible, atrapamiento en una columna o en algún tipo de matriz de fase sólida, o bien, como último recurso, evaporando la muestra y disolviendo los analitos nuevamente en un disolvente adecuado [85]. A continuación, se describen los métodos utilizados para la extracción de analitos contenidos en muestras líquidas.

#### Extracción líquido-líquido (liquid-liquid extraction, LLE)

La técnica LLE es una de las técnicas tradicionales aplicadas para el pretratamiento de muestras líquidas, en la que los analitos se aíslan en un disolvente de carácter apolar. Esta técnica permite aumentar la selectividad del método, ya que permite el aislamiento de los analitos de otras posibles interferencias contenidas en la matriz, y también mejora la

sensibilidad, al conseguir la preconcentración de los analitos que inicialmente están contenidos en grandes volúmenes de muestra [86]. LLE se basa en la transferencia de los analitos desde la muestra acuosa hacia otra fase que contiene un disolvente inmiscible con el agua. Sin embargo, LLE presenta ciertas deficiencias como por ejemplo la posibilidad de que se formen emulsiones que dificulten la separación de fases, el uso de elevados volúmenes de disolvente orgánicos, en su mayoría tóxicos, así como la generación de grandes volúmenes de residuos contaminantes ambientales. Todo ello junto con su elevado coste, los largos tiempos de aplicación y su inadecuación para compuestos hidrofílicos ha hecho que se busquen otras alternativas que eliminen los inconvenientes mencionados [84].

#### Extracción en fase sólida (solid-phase extraction, SPE)

La fase extractante en SPE es un adsorbente sólido, por lo que el proceso involucra una partición líquido-sólido. Esta técnica se ha utilizado extensamente para eliminar y concentrar trazas de materiales orgánicos contenidos en muestras líquidas. Existe un amplio rango de materiales adsorbentes entre los que se incluyen fases enlazadas de octil- (C8) y octadecilsililo (C18), resinas poliméricas (poliestireno/copolímero de divinilbenceno), Florisil (silicato de magnesio activado) o adsorbentes polares como alúmina. Estas fases actúan mediante interacciones basadas en adsorción, puentes de hidrógeno, interacciones polares y no polares, exclusión por tamaño e intercambio aniónico o catiónico. Sin embargo, uno de los inconvenientes que presenta la técnica de SPE es que el empaquetamiento debe ser uniforme para alcanzar altas eficiencias de extracción y, aunque los cartuchos comerciales ya empaquetados son bastante fiables, los sistemas automatizados aún presentan dificultades en cuanto a la reproducibilidad de aplicación del proceso. Además, la matriz de la muestra también puede afectar a la habilidad del adsorbente para extraer el analito debido a la competencia por la retención [87].

#### Extracción líquido-líquido asistida con sal (salting-out assisted liquid-liquid extraction, SALLE).

Esta técnica es un tipo de LLE homogénea que hace uso del efecto *salting-out* para la extracción de compuestos orgánicos desde matrices acuosas hacia disolventes miscibles en agua como el acetonitrilo. El efecto *salting-out* se puede describir como un fenómeno en el que cuando la concentración de sal de la disolución acuosa es elevada, la solubilidad de las moléculas orgánicas disminuye y por ello se produce la separación de disolventes miscibles en ausencia de sal. La técnica SALLE ha mostrado ser capaz de extraer un amplio rango de analitos de matrices biológicas, incluyendo compuestos de elevada polaridad que normalmente son

difíciles de extraer haciendo uso de LLE y SPE convencional. En comparación con LLE convencional, SALLE presenta las ventajas de un menor consumo de disolventes extractantes y la ausencia de una etapa de agitación vigorosa que promueva la recuperación de los analitos, ya que el disolvente orgánico es completamente soluble en agua. Además, en muchos casos, los extractos obtenidos se pueden inyectar directamente en los sistemas instrumentales de medida como es el caso de análisis mediante RP-LC [88, 89].

#### Extracción dispersiva en fase sólida (dispersive solid-phase extraction, DSPE)

La popularidad de DSPE aumentó a partir de 2003 apareciendo como una alternativa atractiva por su efectividad en la extracción, así como en la limpieza y simplificación de matrices complejas [90]. La aplicación de DSPE consiste en la adición y dispersión del material adsorbente directamente sobre la disolución de la muestra, viéndose favorecido el contacto entre adsorbente y analitos. Una vez completado el proceso de dispersión, se separa de forma mecánica el adsorbente enriquecido con los analitos. La principal ventaja de esta técnica es su capacidad para analizar un gran número de muestras en tiempos cortos. Su simplicidad, fácil manejo y adaptabilidad son otras de sus ventajas en comparación con las técnicas tradicionales como SPE. Los principales materiales adsorbentes utilizados están basados en sílice con diferentes grupos funcionales incrustados en su estructura [91].

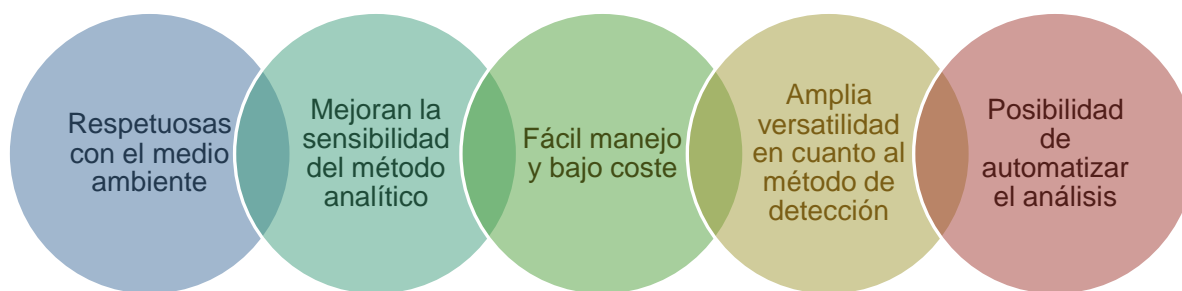
El concepto de miniaturización en el laboratorio analítico se remonta a 1970, siendo en la actualidad todavía un reto para el desarrollo de nuevos métodos de análisis [92]. En líneas generales, la miniaturización implica la producción de sistemas cuyo tamaño se ve reducido en comparación con el de los sistemas convencionales. Centrándonos en el ámbito de la Química Analítica, el término miniaturización hace referencia a una reducción del tamaño de los sistemas analíticos y persigue el objetivo de desarrollar procesos más rentables y respetuosos con el medioambiente mediante la miniaturización de cada componente o etapa del método analítico, incluyendo la etapa de preparación de la muestra y la de medida instrumental, valorando su posible automatización, de manera que se puedan reducir a cantidades mínimas el consumo de muestra, reactivos, disolventes y residuos generados [93]. La Figura 18 resume las ventajas que ofrecen los sistemas miniaturizados en el campo de la Química Analítica.



**Figura 18.** Ventajas ofrecidas por los sistemas miniaturizados de análisis.

## 5.1. TÉCNICAS DE MICROEXTRACCIÓN

Las desventajas de los métodos clásicos de tratamiento de muestra determinaron la necesidad de desarrollar nuevas técnicas más eficientes y respetuosas con el medioambiente. Así, desde hace algunas décadas, los nuevos métodos de análisis están orientados hacia la miniaturización, simplificación y automatización con el objetivo de alcanzar un elevado grado de enriquecimiento del analito y una buena eficiencia en el proceso de extracción desde la matriz [94]. En los últimos años, las técnicas de microextracción se han postulado como una alternativa que responde a los inconvenientes presentados por los métodos de análisis convencionales, haciendo referencia a procedimientos analíticos que implican el uso de fases extractantes en cantidades mínimas. Entre las numerosas ventajas que presentan las técnicas de microextracción destacan sus altas capacidades de extracción, mejorando la sensibilidad de los métodos de análisis, su sencilla y rápida aplicación con bajos costes, la posibilidad de ser automatizadas y el hecho de ser más respetuosas con el medioambiente (Figura 19) [95].



**Figura 19.** Principales ventajas de las técnicas de microextracción.

Las técnicas de microextracción pueden dividirse en dos grandes grupos dependiendo de si los compuestos de interés se aíslan de una fase líquida o sólida. Así, hablamos de microextracción en fase líquida (LPME) y microextracción en fase sólida (SPME), respectivamente. A continuación, se explican ambos grupos haciendo especial hincapié en las metodologías aplicadas en esta Tesis Doctoral.

### 5.1.1. Microextracción en fase líquida (LPME)

Las técnicas LPME surgieron de la necesidad de superar los inconvenientes de la LLE convencional como el uso de grandes volúmenes de disolventes orgánicos potencialmente tóxicos y peligrosos, los largos tiempos implicados o las numerosas etapas de operación, en muchos casos tediosas. Así, LPME se considera una versión miniaturizada de LLE, ya que se utilizan volúmenes de fase aceptora del orden de microlitros [96]. Desde su introducción, LPME ha ido evolucionando en diferentes modalidades de aplicación, que principalmente difieren en la forma en la que el disolvente extractante entra en contacto con la fase dadora. Seguidamente, se describen las metodologías LPME más destacadas:

La microextracción en gota simple (*single-drop microextraction*, SDME) es la técnica LPME más antigua y se basa en la partición de los analitos entre la disolución de la muestra y la gota de extractante sostenida en la punta de la aguja de una jeringa. La fase extractante puede entrar en contacto directo con la muestra o bien exponerse a la muestra en espacio de cabeza. Sin embargo, la estabilidad de la gota es algo limitada, especialmente cuando la disolución de muestra se agita a gran velocidad o contiene partículas en suspensión. Una variante de SDME es la microextracción en gota directamente suspendida (*directly suspended drop microextraction*, DSDME), en la que la gota extractante es depositada en la superficie de la disolución de muestra que es mantenida en agitación. Sin embargo, cuando el disolvente extractante presenta un punto de fusión cercano a temperatura ambiente, una vez concluida la



extracción, se enfría la mezcla consiguiendo la solidificación de la gota extractante lo que conduce a una muy fácil recuperación para su posterior análisis. Esta modalidad de LPME se conoce como microextracción en gota orgánica flotante solidificada (*solidified floating organic drop microextraction*, SFODME) [97].

Otra variante de LPME es aquella en la que la fase extractante es albergada en el interior de fibras poliméricas y se denomina microextracción en fase líquida con fibra hueca (*hollow fiber liquid phase microextraction*, HF-LPME). La naturaleza porosa de la fibra estabiliza al disolvente extractante evitando su fuga durante el proceso, lo que la convierte en una técnica más reproducible y precisa que SDME. La bibliografía muestra aplicaciones HF-LPME con fibras en forma de varilla y de "U". HF-LPME es adecuada para el análisis de matrices complicadas o en aquellos casos en los que solo se dispone de un volumen de muestra muy limitado [98].

La extracción en punto de nube (*cloud point extraction*, CPE) se basa en el comportamiento de las disoluciones acuosas de agentes surfactantes no iónicos al incrementar su temperatura, generándose una turbidez debida a la rápida agregación de las micelas del surfactante.

La microextracción dispersiva líquido-líquido (*dispersive liquid-liquid microextraction*, DLLME) es por diferentes motivos la técnica LPME más aplicada y, dado que ha sido empleada en la presente Tesis, se explica con más detalle en la siguiente sección.

#### **5.1.1.1. Microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME)**

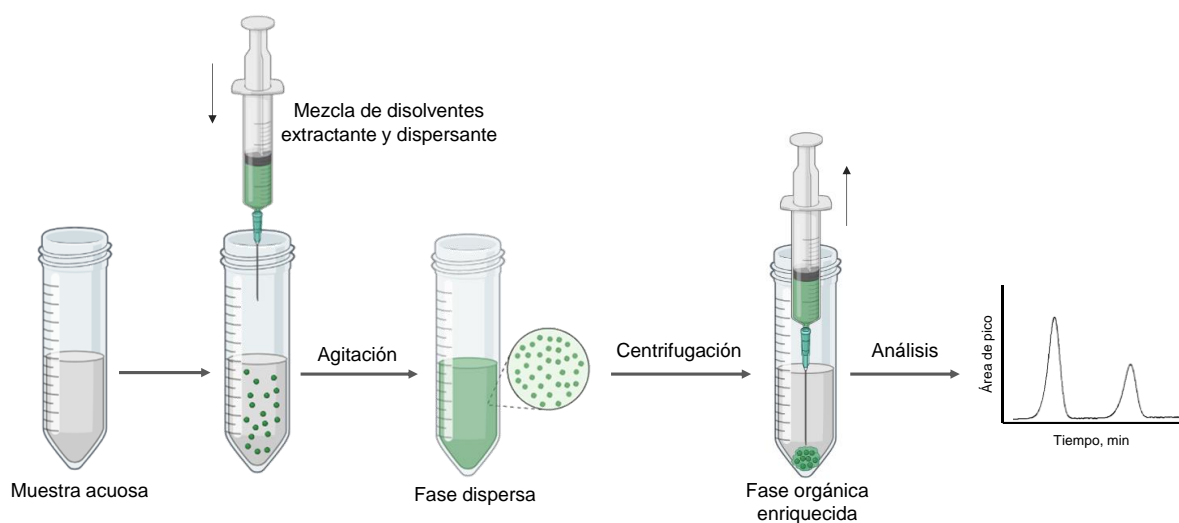
La técnica DLLME fue descrita por primera vez en 2006 por Rezaee *et al.*, para la preconcentración y determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras de agua, y rápidamente se convirtió en una de las técnicas de microextracción más utilizadas debido a las muchas ventajas que aporta como su simplicidad, rapidez, bajo coste, elevada recuperación y a los elevados factores de preconcentración que se alcanzan [99].

DLLME se basa en un sistema ternario de disolventes: la fase acuosa conteniendo los analitos, un disolvente orgánico inmiscible con el agua y generalmente más denso que ella y un disolvente dispersante, miscible tanto en la fase acuosa como en la extractante y cuya función es la de romper en microgotas al disolvente extractante en el seno de la muestra acuosa. La disgregación generada supone un incremento de la superficie de contacto entre las fases dadora y aceptora, aumentando la eficiencia de extracción y reduciendo drásticamente el tiempo de extracción, ya que tiene lugar casi instantáneamente. Por tanto, la extracción se basa en el equilibrio de distribución de los analitos entre la fase dadora y el disolvente extractante. El coeficiente de distribución ( $K$ ) se define como la relación entre la concentración del analito en la

fase extractante y en la disolución de la muestra. Esta técnica sólo es aplicable para analitos con propiedades lipofílicas, esto es  $K > 500$ . A su vez, el tiempo de extracción se define como el intervalo de tiempo que transcurre entre la inyección de la mezcla de los disolventes extractante y dispersante y antes de la centrifugación, siendo este el momento en el que se alcanza un área superficial infinitamente grande entre la fase acuosa y el disolvente extractante, permitiendo que el estado de equilibrio se alcance rápidamente [100]. El proceso global de extracción implica dos pasos [101]:

- i. Una rápida inyección de la mezcla de los disolventes extractante y dispersante en la fase acuosa, de manera que se forme una dispersión que facilite la extracción de los analitos contenidos en la muestra acuosa.
- ii. La eliminación de la dispersión por centrifugación y la posterior recogida de la fase orgánica sedimentada con una microjeringa para someterla a análisis.

La Figura 20 muestra un esquema del procedimiento descrito para la aplicación de la técnica DLLME.



**Figura 20.** Procedimiento experimental DLLME.

Con objeto de evaluar la eficiencia de un proceso DLLME se define el factor de preconcentración (EF) como la relación entre la concentración del analito en la fase sedimentada ( $C_{sed}$ ) y su concentración inicial en la disolución de muestra ( $C_0$ ):

$$EF = \frac{C_{sed}}{C_0} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Asimismo, se define la recuperación de la extracción (ER) como el porcentaje que relaciona la cantidad total de analito en la disolución de muestra ( $n_0$ ) y la cantidad extraída en la fase sedimentada ( $n_{sed}$ ), siendo  $V_{sed}$  y  $V_{aq}$  los volúmenes de la fase sedimentada y acuosa, respetivamente.

$$ER = \frac{n_{sed}}{n_0} \times 100 = \frac{C_{sed} \times V_{sed}}{C_0 \times V_{aq}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$ER = \left( \frac{V_{sed}}{v_{aq}} \right) EF \times 100 \quad (\text{Ecuación 3})$$

La miscibilidad de los disolventes implicados juega un papel esencial en la aplicación de DLLME, por lo que su selección es un factor determinante en la eficiencia del proceso [102]. Siendo determinante la naturaleza de los disolventes extractante y dispersante en el éxito de los procedimientos DLLME, otros factores también han de ser considerados y serán detallados a continuación.

El disolvente extractante es el principal factor a tener en cuenta y ha de satisfacer ciertas condiciones: buena capacidad de extracción de los analitos, ser por lo general más denso que el agua, baja solubilidad en la fase acuosa y compatibilidad con la instrumentación seleccionada para el análisis. Si bien, en caso de no cumplirse esta condición de compatibilidad, puede considerarse la transferencia de los analitos a otro disolvente o su evaporación y posterior reconstitución del residuo seco. Los disolventes más utilizados son los hidrocarburos halogenados como clorobenceno, cloroformo y tetracloruro de carbono.

El agente dispersante, como se ha citado anteriormente, tiene que ser soluble en el disolvente extractante y en agua, siendo los más comúnmente utilizados metanol, etanol, acetonitrilo y acetona.

Los volúmenes empleados para los disolventes extractante y dispersante también afectan considerablemente a la eficiencia de extracción. De forma general, a medida que se aumenta el volumen de agente extractante, aumenta también la fase orgánica obtenida tras la centrifugación, lo que se traduce en una disminución de la concentración del analito en la fase orgánica. Aunque el valor de ER se mantiene constante, el de EF sí que se ve afectado a la baja, lo que provoca una pérdida de sensibilidad en la determinación. De manera que el volumen de extractante debe ser suficientemente alto como para conseguir la extracción en un alto porcentaje, pero no demasiado elevado para evitar el efecto de dilución. Además, teniendo en

cuenta que los extractantes usados con mayor frecuencia son hidrocarburos halogenados, por su toxicidad es recomendable reducir al máximo la cantidad empleada. Este volumen suele hallarse en el rango 5-100  $\mu\text{L}$ , dependiendo de cada aplicación particular.

Por otro lado, el volumen de disolvente dispersante afecta directamente a la formación de la dispersión y por tanto a la eficiencia global del proceso. La variación en el volumen de agente dispersante genera cambios en la cantidad de fase sedimentada, por lo que es necesario modificar de forma simultánea tanto el volumen de extractante como de dispersante para mantener constante la cantidad de fase orgánica sedimentada. El volumen de dispersante adecuado depende entre otros factores de los volúmenes de fase acuosa y extractante usados. Habitualmente la cantidad de dispersante es mayor que la de extractante y suele oscilar entre 0,5-1,5 mL.

En la eficacia del proceso DLLME, el tiempo de extracción influye relativamente poco. Esto se debe a la gran superficie de contacto alcanzada entre las fases dadora y aceptora gracias al fenómeno de dispersión, proporcionando una rapidísima transferencia de los analitos y, por tanto, alcanzando el equilibrio de distribución de forma instantánea.

Por último, el efecto salino es otro factor a tener en cuenta. Por lo general, la solubilidad de los analitos y del disolvente orgánico extractante en la fase acuosa decrece a medida que aumenta la fuerza iónica del medio, lo cual es favorable para conseguir una buena recuperación. Sin embargo, al mismo tiempo, el volumen de fase extractante obtenido se incrementa, lo que se traduce en una disminución tanto de la concentración del analito como del EF.

Aunque son muy numerosas las ventajas de DLLME, con el objetivo de reducir el volumen de disolventes orgánicos empleados se han propuesto ciertas modificaciones al procedimiento convencional, como por ejemplo la eliminación del agente dispersante, siendo la disgregación del extractante asistida por fuentes de energía externa.

En este sentido destaca la microextracción dispersiva líquido-líquido asistida por agitación vórtex (*vortex assisted DLLME, VA-DLLME*), descrita por primera vez por Yiantzi *et al.*, en 2010 [103]; la microextracción dispersiva líquido-líquido asistida por ultrasonidos (*ultrasound assisted DLLME, UA-DLLME*) desarrollada por Regueiro *et al.*, en 2008 [104] y la microextracción dispersiva líquido-líquido asistida por surfactantes (*surfactant assisted DLLME, SA-DLLME*). El comportamiento anfílico de los surfactantes disminuyen la tensión superficial entre la fase acuosa y la extractante facilitando la dispersión de la muestra en SA-DLLME [105].

Sin embargo, el principal inconveniente del procedimiento DLLME convencional es el uso de disolventes halogenados. Pese a que el volumen utilizado se encuentra en el rango de los

microlitros, su uso en análisis rutinarios hace que se lleven a cabo cientos de análisis diarios, por lo que no es muy recomendable desde un punto de vista medioambiental. Con el fin de reducir y eliminar el uso de disolventes orgánicos halogenados, en los últimos años se han propuesto diversas alternativas basadas en los conocidos como disolventes verdes, considerados menos perjudiciales no solo para los operarios sino también para el medioambiente [106]. Destacan las siguientes opciones:

- Disolventes de baja densidad (*low-density solvents*, LDSs), tales como 1-octanol, 1-undecanol o 2-hexanona, que a diferencia de los disolventes halogenados, no sedimentan tras la etapa de centrifugación, quedando como una fina capa superficial cuya recogida puede resultar tediosa. Para corregir esta situación, Huang *et al.*, aplicaron una modificación con el enfoque de la solidificación de la gota orgánica flotante (SFOD-DLLME) [107]. Bajo esta modalidad, tanto dispersante como el LDS se añaden al igual que en el método DLLME convencional, pero, una vez separadas las fases, se somete la mezcla a baja temperatura de modo que la fase extractante solidifica y se puede recolectar más fácilmente.

- Disolventes de hidrofiliidad intercambiable (*switchable hydrophilicity solvents*, SHSs). Son un tipo de LDS, que aunque en DLLME no se han usado exactamente como agente extractante, vienen a realizar la misma función que los agentes extractantes típicos. Suelen ser aminas, tanto secundarias como terciarias, o ácidos grasos con capacidad para modificar su hidrofiliidad y, por tanto, cambiar su solubilidad, pasando de ser poco miscibles a totalmente miscibles en agua por medio de una simple variación en el medio acuoso, cambio que suele producirse por medio de un equilibrio ácido-base después de la adición de  $\text{CO}_2$  o  $\text{CO}_3^{2-}$  según sean SHSs básicos o ácidos, respectivamente [108].

- Líquidos iónicos (*ionic liquids*, ILs). Presentan ciertas propiedades que les hacen idóneos como disolventes de extracción, entre ellas, una elevada estabilidad térmica y una presión de vapor baja. Además, también es posible modular otras de sus propiedades como la viscosidad, densidad y solubilidad mediante la combinación adecuada de cationes y aniones disponibles, siendo posible también su funcionalización para conferirle interacciones específicas con el analito, con el objetivo de conseguir un proceso de extracción más eficaz. El uso de ILs en DLLME se aplicó por primera vez en 2009 por Liu *et al.*, quienes usaron 1-hexil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato  $[\text{C}_6\text{MIM}][\text{PF}_6]$  para la determinación de insecticidas en aguas [109]. Sin embargo, tienen la limitación de que presentan ciertos problemas al inyectarlos en sistemas cromatográficos y de absorción atómica ya que su baja volatilidad les hace incompatible con GC, por ejemplo, y su alta viscosidad les hace incompatibles con LC-MS, ya que afecta seriamente a la ionización por ESI.

- Disolventes supramoleculares (*supramolecular solvents*, SUPRAs). Su primera aplicación como extractantes en DLLME tuvo lugar en 2009 cuando Ballesteros-Gómez *et al.*, emplearon un SUPRA formado por ácido decanoico, organizado en micelas invertidas, y tetrahidrofurano como agente coacervante para la determinación de benzo[a]pireno, bisfenol A y ocratoxina en bebidas [110]. Estos disolventes se generan después de la coacervación de las micelas formadas previamente. En primer lugar, se agregan las moléculas anfifílicas a la disolución y cuando se alcanza la concentración crítica, los grupos anfifílicos se organizan en micelas. Una vez formadas, tiene lugar un cambio en el entorno para reducir la repulsión entre las moléculas anfifílicas que forman dichas micelas. Estos disolventes SUPRAs presentan una excelente capacidad de extracción debido a su gran superficie y a la diferencia de polaridad con el entorno. Otra ventaja de su uso es que se pueden sintetizar *in situ* durante el análisis y no necesitan de un tratamiento previo a su análisis en sistemas de LC.

- Disolventes eutécticos profundos (*deep eutectic solvents*, DESs). Están formados por dos o tres componentes unidos mediante interacciones de tipo enlace de hidrógeno, dando lugar a una mezcla eutéctica cuyo punto de fusión es menor que el de cada uno de los componentes originales. Su primera incursión como agentes extractantes tuvo lugar en 2016 por Farajzadeh *et al.*, para la determinación de pesticidas en zumos de frutas y hortalizas [111]. Los DESs comparten algunas propiedades con los ILs, como la estabilidad térmica, baja presión de vapor y baja inflamabilidad. Sin embargo y dado que los materiales de partida son diferentes, su obtención resulta más barata y segura debido a su baja toxicidad y carácter biodegradable, lo que los convierte en disolventes ideales en microextracción.

La bibliografía muestra combinaciones de DLLME con diferentes sistemas de medida instrumental, incluidas las separaciones cromatográficas, tanto de LC como de cromatografía de gases (GC), ya que incluso en el caso de que los analitos no sean compatibles con el tipo de separación o detección, se puede llevar a cabo su derivatización de forma previa, simultánea o con posterioridad a la preconcentración ampliando así enormemente el rango de aplicaciones [112]. Además de a técnicas cromatográficas, DLLME también se ha acoplado a otras como la espectroscopia de absorción atómica en horno de grafito (GFAAS) para el análisis de elementos metálicos en diferentes matrices de muestra [113]. En estos casos, es necesario inyectar junto con los disolventes extractante y dispersante un agente quelatante para la complejación de los analitos. Con todo esto, queda por tanto puesto de manifiesto la amplitud de posibilidades de la técnica DLLME en cuanto a analitos, tipos de muestras y sistemas de medida aplicables.

### 5.1.2. Técnicas de microextracción en fase sólida

Dentro de este grupo de técnicas, la más representativa es la SPME con fibras, introducida por primera vez a principios de la década de 1990 por Pawliszyn *et al.*, en la que se minimiza el uso de disolventes y proporciona de forma simultánea la separación y preconcentración de analitos volátiles y no volátiles en muestras complejas. La forma tradicional de SPME consiste en una fina fibra de sílice recubierta de una capa de material adsorbente que actúa como fase extractante y que se expone a la matriz de la muestra durante un periodo de tiempo concreto. Una vez alcanzado el equilibrio de distribución de los analitos se procede a su desorción, bien colocando la fibra en el sistema de inyección del cromatógrafo de gases o bien poniéndola en contacto con un disolvente de desorción [113].

SPME presenta numerosas ventajas, siendo catalogada como una técnica casi universal ya que permite el análisis de diversos tipos de muestras en diferentes estados, cuantificando las especies de interés a nivel de trazas. En comparación con LPME reduce la cantidad de disolvente orgánico empleado, lleva a cabo la extracción en una única etapa y es válida para analitos tanto polares como apolares.

Como alternativa a la fibra de sílice recubierta, existen otras modalidades de SPME, entre las que destaca la extracción por adsorción sobre barras agitadoras (*stir bar sorptive extraction*, SBSE), basada en los mismos principios que SPME, pero en lugar de fibras utiliza barras agitadoras recubiertas con una fase polimérica. Dado que la cantidad de fase extractante es mayor en SBSE con respecto a la contenida en fibras de SPME, la sensibilidad alcanzada también es mucho mayor. Además, la comercialización de fases extractantes para SBSE de diferentes polaridades (polidimetilsiloxano, poliacrilato, divinilbenceno, etc.) amplió notablemente el rango de compuestos que podían ser aislados de la muestra [114].

La dispersión de la fase adsorbente en el seno de la disolución de la muestra dio lugar a la técnica SPE dispersiva (DSPE), que fue introducida por Anastassiades *et al.*, en 2003 [115] como una etapa de limpieza de la muestra, empleando una pequeña cantidad de fase sólida adsorbente e incrementando la selectividad y la sensibilidad del método al eliminar interferencias de la matriz y preconcentrar los analitos. Esta técnica ha sido aplicada ampliamente debido a sus ventajas sobre SPE convencional, como son su bajo coste de aplicación, elevados valores de EF alcanzados y bajo consumo de disolventes orgánicos. La extracción en fase sólida microdispersiva ( $\mu$ DSPE) es la forma miniaturizada de DSPE, en la que una masa del nanomaterial adsorbente del orden de los microgramos es dispersada en la disolución bajo análisis. Tras la centrifugación de la suspensión, la fase sólida sedimenta, se decanta la fase

sobrenandante y se procede a la desorción de los analitos empleando un disolvente adecuado, para su posterior determinación.

De entre los diferentes tipos de nanomateriales usados en  $\mu$ DSPE destacan los nanomateriales, cuyo uso se ha visto recientemente incrementado debido a que permiten la preconcentración de los analitos y la eliminación de las interferencias, así como por sus rápidas cinéticas de adsorción. Entre los nanomateriales más utilizados destacan los nanomateriales magnéticos, los polímeros de impresión molecular (MIPs) y los nanomateriales basados en carbono, como nanotubos de carbono (CNTs), grafeno (G) y óxido de grafeno (GO) por las eficientes extracciones que proporcionan para muy diferentes tipos de analitos [116, 117].

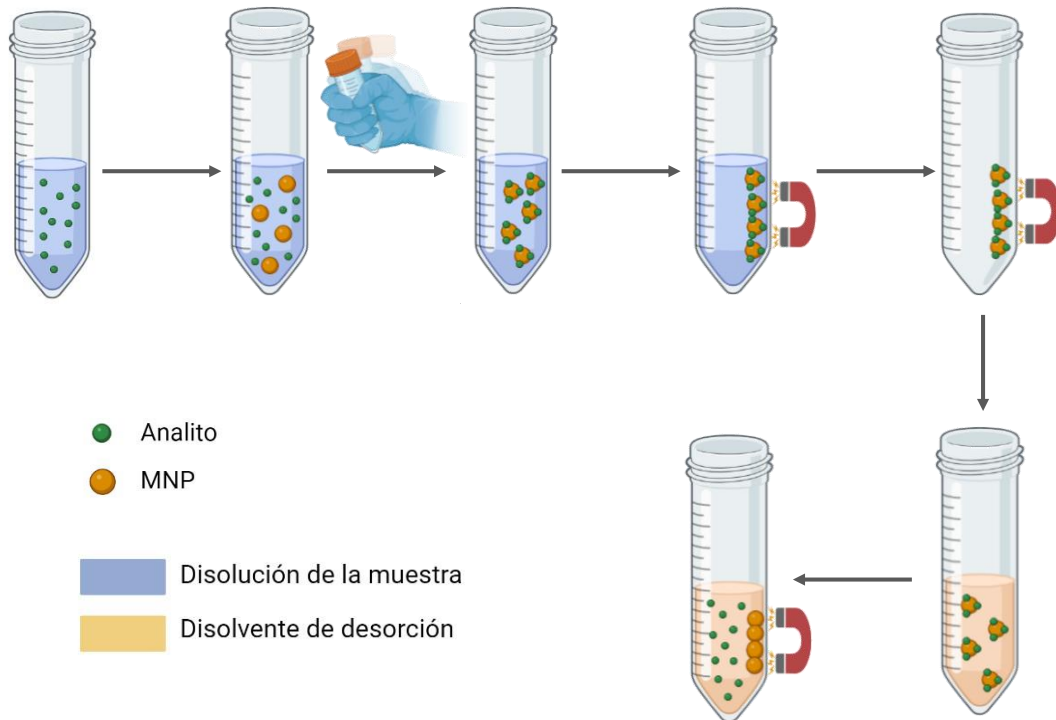
Cuando la fase sólida adsorbente son nanomateriales magnéticos, la técnica se conoce como microextracción dispersiva en fase sólida magnética (*magnetic dispersive solid-phase microextraction*, DMSPE), a la que dedicamos una explicación más detallada a continuación ya que ha sido objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral.

### **5.1.2.1 Microextracción dispersiva en fase sólida magnética (DMSPE)**

La introducción de DMSPE se remonta por vez primera al año 1999, cuando Šafaříková y Šafařík llevaron a cabo la extracción de diferentes colorantes de naturaleza orgánica haciendo uso de nanopartículas magnéticas (MNPs) de magnetita silanizada recubiertas de colorante de ftalocianina de cobre y carbono magnetizado [118]. Las MNPs han resultado ser un material muy interesante para la comunidad científica, gracias a sus propiedades físicas y químicas únicas (naturaleza superparamagnética, dispersabilidad, gran área superficial relativa y elevada relación área/volumen) que se traducen en altas capacidades de adsorción.

DMSPE se basa en la adición de una determinada cantidad de MNPs a la disolución acuosa de la muestra para la adsorción de los analitos sobre la superficie del nanomaterial adsorbente, todo ello bajo una continua agitación que favorezca dicha adsorción. Seguidamente, las MNPs con los analitos retenidos en su superficie son retiradas con ayuda de un campo magnético externo proporcionado por un imán. En la etapa de desorción las MNPs son dispersadas en el disolvente de desorción adecuado, procediéndose a la determinación de los analitos desorbidos [119]. La Figura 21 muestra un esquema del procedimiento general de aplicación de la técnica DMSPE.





**Figura 21.** Procedimiento experimental de aplicación de DMSPE.

Para conseguir un aislamiento eficaz de los analitos es necesario hacer una buena elección del material adsorbente, y para ello, es fundamental tener en cuenta la naturaleza química de los analitos, así como sus propiedades fisicoquímicas tales como polaridad o solubilidad. Otros factores a considerar son la complejidad de la matriz de la muestra y la posible presencia de sustancias indeseadas que puedan interferir tanto en el proceso de microextracción como en la posterior etapa de análisis. Al igual que la técnica SPE clásica, el mecanismo de separación de los analitos retenidos sobre la superficie de las MNPs depende tanto de la naturaleza del disolvente orgánico utilizado en la etapa de desorción como del tipo de interacción que se genere entre las moléculas de los analitos y los grupos funcionales del material adsorbente. De entre los diferentes tipos de interacciones, se han descrito la de puente de hidrógeno, dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido, de carácter iónico y las interacciones de Van der Waals [120].

El uso de materiales magnéticos presenta diversas ventajas frente a la aplicación tradicional de la técnica SPE. Una de ellas es que, la funcionalización de estos núcleos magnéticos permite llevar a cabo una extracción selectiva de los analitos de interés. Además, dado que la fase extractante se separa fácilmente (incluso con grandes volúmenes de muestra) con la ayuda de un imán externo, no es necesario mantener la fase adsorbente empaquetada. Por otro lado, dada la naturaleza superparamagnética de las MNPs, éstas no retienen el magnetismo residual una vez retirado el campo magnético externo. Otra de las ventajas que presenta reside en que la elevada relación existente entre la superficie de las MNPs y el volumen de muestra se traduce

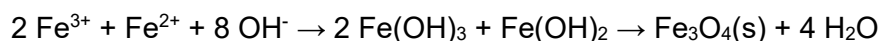
en una mayor eficiencia en el proceso de extracción que cuando se utiliza cualquier otro tipo de material adsorbente de naturaleza no magnética [121].

Sin embargo, el uso de este tipo de materiales también presenta ciertos inconvenientes. Entre ellos, destaca como uno de los principales problemas el hecho de que las MNPs, debido a su inestabilidad intrínseca, tienden a formar aglomerados para así reducir su energía asociada a esa relación entre el volumen y su elevada área superficial. Por otro lado, y como consecuencia de su elevada reactividad química, las MNPs se oxidan con facilidad en contacto con el aire, lo que conduce a una pérdida de magnetismo. Todo ello conlleva a que sea necesario recubrirlas de un material adecuado para la mayoría de las aplicaciones analíticas. Este recubrimiento, no solo estabiliza el núcleo de las MNPs, sino que también puede proporcionar una adsorción selectiva [122].

### **Síntesis de MNPs**

Para la generación de MNPs se consideran, por lo general, tres etapas: la síntesis del núcleo magnético, su recubrimiento y la modificación de la estructura resultante al ser recubiertas. Para la síntesis del núcleo magnético se han probado diferentes fases y composiciones incluyendo óxidos de hierro, metales puros, aleaciones y ferritas tipo espinela. En los últimos años se han propuesto diferentes métodos de síntesis cuyo objetivo es siempre el de obtener MNPs altamente estables y con un tamaño controlado. Existen tres métodos generales de síntesis: físicos, químicos y biológicos [123, 124].

En esta sección se describen con más detalle los métodos químicos debido a que las MNPs utilizadas en esta Tesis se han obtenido mediante el método de coprecipitación química, que se clasifica como uno de los citados métodos químicos. La coprecipitación química se basa en la adición de una disolución básica a una disolución acuosa conteniendo sales de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  en la proporción 1:2 a temperatura ambiente o a altas temperaturas (70-100 °C), bajo agitación continua y atmósfera inerte para evitar así la oxidación de los cationes  $\text{Fe}^{2+}$ . En la síntesis de magnetita, la adición de una disolución de carácter básico como  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $\text{NaOH}$  o  $\text{KOH}$  conduce a la precipitación de iones de hierro según la siguiente reacción química:



El tamaño, forma y composición de las MNPs obtenidas por este método va a depender del tipo de sales empleadas, de la proporción  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ , de la temperatura, el pH y la fuerza iónica del medio de reacción. Una de las ventajas que presenta este método es que una vez se han fijado todas las variables experimentales, el método es bastante reproducible [125]. El principal

problema de estas MNPs obtenidas por coprecipitación es que presentan bastante variabilidad en su tamaño, por lo que se dice que son polidispersas.

Además del método de coprecipitación, a continuación se describen más resumidamente, otros métodos de síntesis químicos bastante utilizados.

Descomposición térmica. La descomposición térmica de compuestos organometálicos en disolventes orgánicos de elevado punto de ebullición da lugar a la obtención de nanomateriales magnéticos utilizando surfactantes como estabilizantes [125].

Reducción metálica. Este método consiste en reducir sales del metal seleccionado con agentes reductores en presencia de surfactantes o mediante reducción electroquímica. La ventaja de este método es la amplia variedad de precursores metálicos y agentes reductores existentes.

Microemulsión. Las microemulsiones formadas por líquidos inmiscibles en presencia de surfactantes se usan como medio de reacción para la formación de materiales magnéticos en el interior de las micelas. Por lo general, este método de síntesis requiere de otros como la coprecipitación o reducción química. Además, se obtienen MNPs con un tamaño y forma que varía dentro de un amplio intervalo, requiriéndose también grandes volúmenes de disolventes para que la cantidad de MNPs sintetizada sea apreciable. Todo ello hace que las posibilidades de trabajo sean menores que con otros métodos [126].

Síntesis solvotérmica. Este es un tipo de síntesis en el que tanto el precursor como el disolvente se calientan conjuntamente por encima de la temperatura de ebullición del disolvente en un sistema cerrado, de manera que se genera un aumento de presión que facilita la interacción entre ambos integrantes [124].

### **Funcionalización de MNPs**

La estabilización de las MNPs constituye un paso fundamental una vez finalizada la etapa de síntesis, especialmente para aquellas que contienen hierro o cobre como núcleo metálico, ya que son más susceptibles de sufrir oxidación por el aire. Para evitarlo, la estrategia más utilizada se basa en recubrir la superficie de las MNPs con una capa protectora que puede ser de carácter inorgánico, como sílice, carbono o algún tipo de óxido, o bien de tipo orgánico, mediante el uso de surfactantes o polímeros. A continuación, se describen algunas de las estrategias más habituales para la estabilización del núcleo magnético de las MNPs [127].

♦ MNPs recubiertas de sílice (MNP@SiO<sub>2</sub>)

Las MNP@SiO<sub>2</sub> son estables en medio acuoso y las interacciones entre partículas se pueden controlar con cierta facilidad. Por ello, el recubrimiento con óxido de silicio es uno de los más utilizados no solo por su bajo coste sino también porque proporciona una elevada estabilidad química y térmica. Este material protege el núcleo magnético y aumenta su área superficial gracias a su carácter mesoporoso. Además, también actúa como soporte de otros agentes adicionales que si se unieran directamente sobre el núcleo magnético producirían interacciones no deseadas. Así, una vez recubiertas de sílice, estas partículas pueden modificarse nuevamente con otros materiales como octadecilsililo (ODS), C18, grupos amino, (3-aminopropil)-trimetoxisilano (APTS), ciclodextrinas (CD), polímeros y también con ILs [128].

♦ MNPs recubiertas de surfactantes

El recubrimiento con surfactantes tiene como finalidad pasivar la superficie de las MNPs después de la síntesis, pero también durante ella para evitar su posible aglomeración. La unión del surfactante sobre la superficie de la partícula puede producirse tanto por enlace químico como por adsorción física formando una capa sencilla o doble que crea fuerzas de repulsión que equilibran las fuerzas de atracción magnéticas y de Van der Waals, de manera que las MNPs se estabilizan en suspensión por repulsiones estéricas. Algunos surfactantes iónicos como dodecilsulfato sódico (SDS) o bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) se adsorben sobre óxidos como alúmina o sílice y conducen a la formación de hemimicelas normales o mixtas [129]. Además, también se ha descrito el uso de ácidos grasos (decanoico, undecanoico u oleico) y carboxilatos de alquilo (sales de ácidos grasos) como surfactantes proporcionando buenos resultados en la determinación de diversos analitos [130].

♦ MNPs recubiertas de polímeros

El interés que recientemente ha despertado el uso de polímeros se debe a su gran estabilidad y a su fácil síntesis a partir del monómero correspondiente, aunque presentan cierta sensibilidad a altas temperaturas, especialmente en MNPs con núcleos metálicos. Al igual que los surfactantes, los polímeros se usan para pasivar la superficie de las MNPs y evitar su aglomeración. Por lo general, y aunque también pueden unirse por adsorción física, la unión de estos polímeros a las MNPs es de tipo químico, generando fuerzas repulsivas estéricas que contrarrestan las fuerzas magnéticas y de Van der Waals responsables de su agregación. Algunos de los polímeros utilizados como recubrimiento de MNPs son polipirrol (PPy), polianilina (PANI), polidopamina (PDA), polialquilcianoacrilatos y poliésteres como el ácido poliláctico o

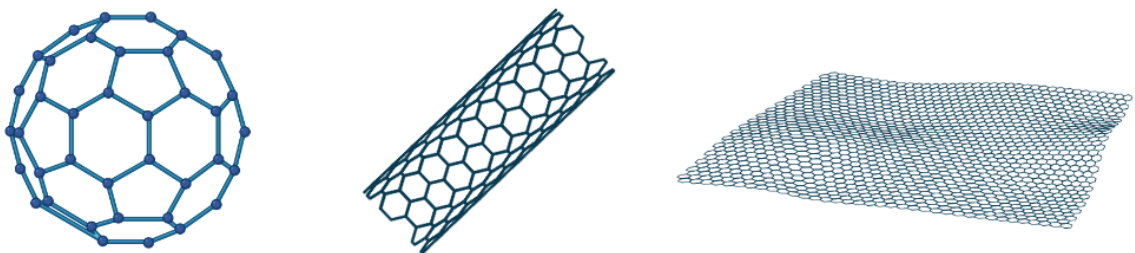
poliglicólico, aunque también se ha descrito el uso de biopolímeros como polisacáridos de celulosa.

♦ MNPs recubiertas con polímeros de impresión molecular (MIPs)

La aplicación de MIPs como recubrimiento de MNPs es relativamente reciente. Un MIP es un material con estructura macromolecular tridimensional que presenta cavidades para albergar de forma específica ciertos tipos de compuestos. Su síntesis implica el uso de la molécula de la sustancia objeto de análisis como plantilla, por lo que presentan una gran selectividad hacia dicha sustancia. Además, cuando se preparan con más de una molécula diana se amplía su efectividad de aplicación hacia más analitos [131].

♦ MNPs basadas en carbono

El recubrimiento de MNPs con materiales basados en carbono ha suscitado un gran interés como consecuencia, principalmente, de las ventajas que aportan, entre ellas: elevada estabilidad térmica y química, gran área superficial, alta porosidad, biocompatibilidad y una gran capacidad de extracción hacia una amplia variedad de compuestos orgánicos en un amplio rango de pH. En la naturaleza, es posible encontrar carbono en distintas formas alotrópicas como grafito, fullereno, CNTs, G y GO [132]. La Figura 22 recoge las estructuras de fullereno, CNTs y G que se corresponden con estructuras cero-, uni- y bi-dimensional, respectivamente.



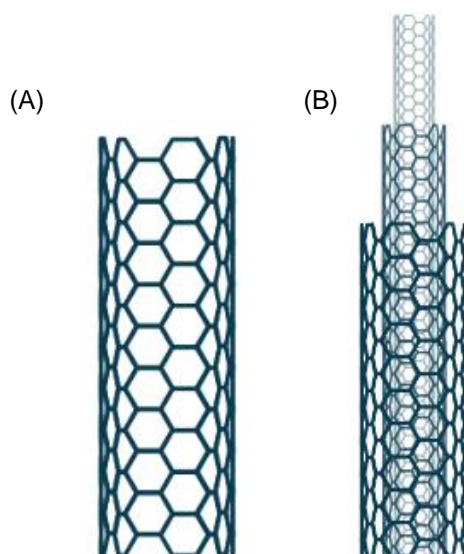
**Figura 22.** Nanoestructuras de fullereno, CNTs y G.

Nanotubos de carbono

Los CNTs son estructuras tubulares formadas por redes hexagonales de carbono, sintetizados por primera vez en 1991 [133], aunque no fue hasta 1996 cuando se describieron sus excepcionales propiedades físicas y químicas. Pueden presentarse con estructura de pared única (*single walled carbon nanotubes*, SWCNTs) o de pared múltiple o multicapa (*multi-walled*

carbon nanotubes, MWCNTs), que consisten en una serie de nanotubos concéntricos para los que, lógicamente los diámetros son crecientes desde el centro hacia la periferia (Figura 23).

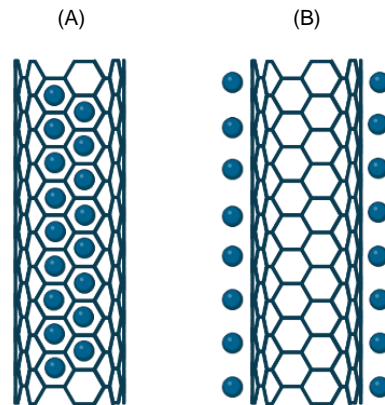
Los MWCNTs han despertado gran interés en el campo de la química analítica ya que presentan mayores áreas superficiales que los SWCNTs, lo que les hace idóneos para la preconcentración de compuestos orgánicos, especialmente para moléculas con anillos aromáticos ya que se generan interacciones de tipo  $\pi$ - $\pi$  de gran intensidad entre el analito y los CNTs, demostrando una elevada eficiencia de extracción con este tipo de compuestos [134].



**Figura 23.** Estructura de (A) SWCNTs y (B) MWCNTs.

Los CNTs presentan unas excelentes propiedades como área superficial muy elevada, gran resistencia mecánica y alta conductividad térmica y eléctrica.

En la bibliografía aparecen descritos dos procedimientos para la síntesis de CNTs magnéticos, dependiendo de si ésta se lleva a cabo en una o en dos etapas. En el primer caso, tanto la formación como la funcionalización de las MNPs tiene lugar a la vez mientras que, en la síntesis en dos etapas, primero se obtienen las MNPs, y en un segundo paso, se funcionalizan. Independientemente del tipo de síntesis aplicada la funcionalización se puede llevar a cabo por dos vías: endoédrica y exoédrica (Figura 24).



**Figura 24.** Tipos de funcionalización de las MNPs con CNTs: (A) endoédrica y (B) exoédrica.

Como se aprecia en la Figura 24, en la funcionalización endoédrica, las MNPs se introducen en el interior de las cavidades que presenta la estructura de los CNTs previamente sintetizados, mientras que en la funcionalización exoédrica, las MNPs se fijan a la superficie de los CNTs mediante interacciones ya sean de tipo físico o químico [135].

Aunque los CNTs ya suponen un recubrimiento del núcleo de las MNPs, éstos se pueden funcionalizar a su vez con diferentes grupos funcionales como carboxilo, hidroxilo o amino, para así conseguir que la superficie de los CNTs interactúe con compuestos polares e iónicos, ya que sin la presencia de estos grupos no sería posible, dado que los CNTs carecen de sitios activos que interactúen con este tipo de moléculas.

La gran versatilidad de estos nanomateriales hace posible su uso en una amplia variedad de aplicaciones analíticas como la preconcentración de numerosos compuestos orgánicos en matrices biológicas, productos farmacéuticos, muestras medioambientales y de alimentos, e incluso para el aislamiento de compuestos de naturaleza inorgánica.

### ***Factores que afectan al proceso de DMSPE***

La aplicación de DMSPE tiene lugar, generalmente, en modo discontinuo, esto es, adicionando una pequeña cantidad de un material adsorbente magnético a un determinado volumen de fase acuosa que contiene los analitos, seguido de una etapa de desorción del material adsorbente enriquecido con dichos analitos. Para conseguir la máxima eficiencia de preconcentración es necesario tener en cuenta los diferentes parámetros que influyen en cada una de las etapas del procedimiento [136], que a continuación son discutidas.

*Naturaleza de la fase adsorbente.* Es posiblemente el factor más influyente en la eficacia del proceso de microextracción. Es necesario que exista una elevada afinidad entre los analitos y

la fase extractante, por lo que su selección depende principalmente de las características y propiedades fisicoquímicas de los analitos. Las principales interacciones que determinan el aislamiento de los compuestos de interés son fuerzas iónicas, de Van der Waals, dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido y puentes de hidrógeno. Que tenga lugar un tipo u otro de interacción dependerá de los grupos funcionales en la superficie de las MNPs.

Masa de MNPs y Volumen de la fase dadora. Estos dos parámetros se encuentran estrechamente relacionados. Los estudios experimentales reflejan que, por lo general, cuanto menor es la masa de nanopartículas utilizada, la mejor opción es agregarlas en forma de suspensión a la fase dadora, para alcanzar una mayor repetitividad en el proceso. Hay que tener en cuenta también que, puesto que el equilibrio del sistema depende del área superficial de las MNPs, cuanto mayor sea esta, menor será también la cantidad de MNPs que será necesario adicionar a la fase dadora para poder alcanzar dicho equilibrio.

Tiempo y Temperatura de extracción. Como ya se ha citado, esta técnica se basa en un equilibrio, de manera que parece lógico que exista una relación directa entre la cantidad de analito extraído y el tiempo de contacto entre la fase dadora y el nanomaterial adsorbente, así como con el área superficial del mismo. Así, el porcentaje de analito extraído aumenta a la vez que lo hace el tiempo de extracción, hasta alcanzar la situación de equilibrio. A su vez, una reducción del tiempo de extracción es posible al aumentar el área superficial del adsorbente. Por otro lado, la temperatura es un parámetro algo menos relevante ya que, en el mejor de los casos, proporciona una mejora de la eficiencia, aunque por lo general, no suele afectar a la eficacia del proceso.

Efecto del pH. El valor del pH del medio será un factor crítico en la eficiencia del proceso cuando se usen materiales adsorbentes sensibles a él y siempre que la forma química de los analitos varíe en función de su valor.

Efecto salino en la fase dadora. La adición de cloruro sódico a la disolución de muestra puede afectar tanto positiva como negativamente al porcentaje de recuperación. La presencia de sal disminuye la solubilidad de analitos polares en la fase acuosa, mejorando su adsorción, mientras que una muy elevada concentración de sal produce un aumento de la viscosidad del medio, reduciendo la transferencia de masa hacia la superficie del material adsorbente.

Naturaleza del disolvente de desorción. Es necesario emplear disolventes que proporcionen una desorción cuantitativa de los analitos en el mínimo volumen posible. Los disolventes orgánicos más utilizados para este fin son acetona, acetonitrilo y metanol, aunque también resulta muy efectivo el uso de mezclas de disolventes tanto polares como apolares para la desorción de analitos de baja polaridad. La modificación del pH del medio de desorción también puede afectar a la eficiencia de preconcentración.



Volumen de desorbente. Tal y como se ha indicado anteriormente, el volumen de disolvente de desorción utilizado será la mínima cantidad que permita la máxima desorción de los analitos, aunque, teniendo en cuenta que éste viene condicionado por la masa de MNPs utilizada en la etapa de adsorción. Sin embargo, la realidad pone de manifiesto que, para conseguir la total desorción de los analitos, generalmente se necesitan volúmenes relativamente grandes, siendo esto, por tanto, una desventaja. Para suplir este inconveniente se suele recurrir a una etapa de secado bajo una corriente de gas bajo condiciones controladas para evitar la pérdida de analitos, y la posterior reconstitución del residuo seco en un pequeño volumen de disolvente.

Tiempo de desorción. Se elige el mínimo tiempo que proporcione la máxima eficiencia. Además, la aplicación de una fuente de energía externa durante la etapa de desorción, como por ejemplo los ultrasonidos, permite acelerar el proceso, reduciendo así su duración.

La optimización de las diferentes variables puede llevarse a cabo mediante estudios univariantes, pero, dado que muchas de ellas están relacionadas entre sí, es posible y además resulta de gran utilidad la aplicación de métodos de optimización multivariantes, ya que así se consideran las interacciones entre dichas variables.

Por último, otro factor importante a tener en cuenta es la posibilidad de regenerar las MNPs utilizadas. Para ello, lo habitual es realizar lavados sucesivos a las MNPs usadas y a continuación, comprobar la ausencia de efecto memoria. Estos estudios de recuperación del material magnético han demostrado que es posible reusarlas durante varios ciclos de extracción con pérdidas mínimas de capacidad de extracción, que varían dependiendo del tipo de nanomaterial magnético y los parámetros seleccionados para su aplicación en MSPE.

### **Caracterización de las MNPs**

Cuando se lleva a cabo la síntesis de MNPs no se puede garantizar la homogeneidad del material obtenido. Por ello, para conocer con exactitud las propiedades y características morfológicas de las nanopartículas preparadas es necesario recurrir a diferentes técnicas experimentales.

Caracterizar un material implica conocer cuáles son las propiedades fisicoquímicas del material y, a su vez, relacionar su comportamiento con sus propiedades morfológicas, ya que éstas pueden modularse durante la etapa de síntesis (modificando, por ejemplo, el tiempo de reacción, la temperatura o la concentración de los reactivos) [137]. La Figura 25 muestra las cuatro categorías en las que se pueden clasificar las técnicas utilizadas para la caracterización de MNPs.

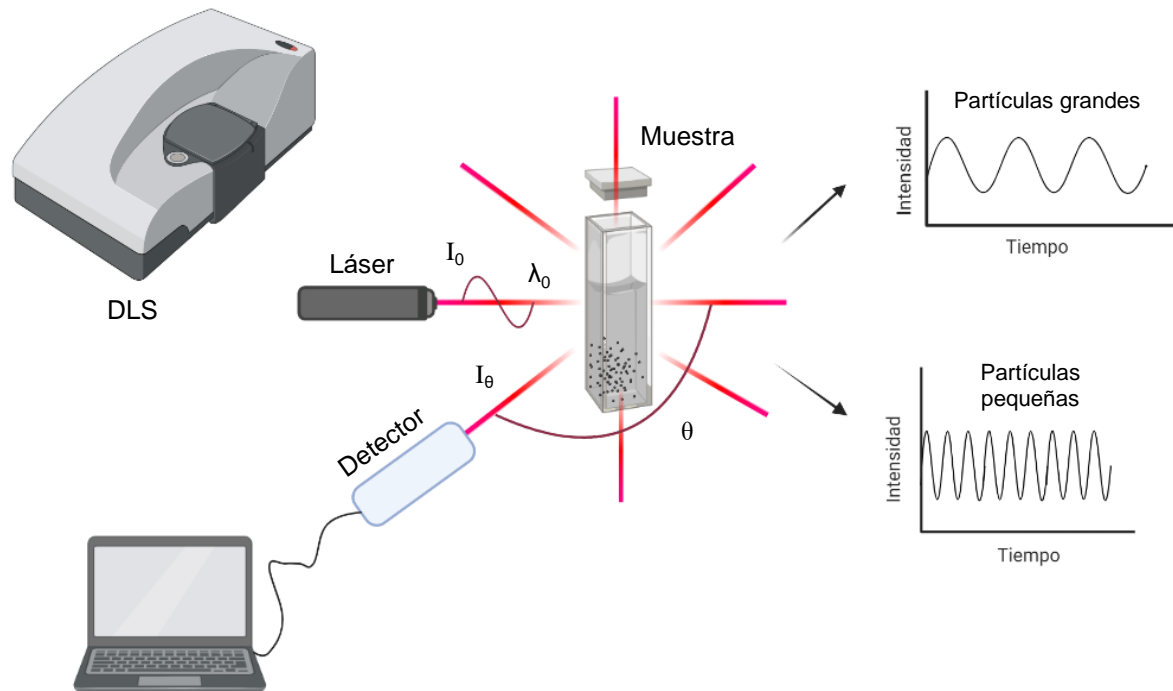


**Figura 25.** Principales técnicas utilizadas en la caracterización de MNPs.

Mediante las técnicas de microscopía es posible determinar el tamaño y la forma del material magnético. Para este propósito, destacan la microscopía electrónica de transmisión (*transmission electron microscopy*, TEM) y la microscopía electrónica de barrido (*scanning electron microscopy*, SEM). La aplicación de TEM consiste en detectar las diferencias de densidad electrónica mediante el cambio de contraste experimentado en las imágenes obtenidas, mientras que la aplicación de SEM tiene como objetivo determinar las características morfológicas del material [138].

La difracción de rayos X (*X-ray diffraction*, RXD) permite comprobar la presencia de magnetita en el núcleo de la nanopartícula. Para el caso de las partículas de ferrita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), que son las utilizadas en esta Tesis, RXD muestra seis picos característicos, marcados cada uno de ellos, por sus respectivos índices [138].

La técnica espectroscópica conocida como dispersión de luz dinámica (*dynamic light scattering*, DLS) ofrece información de gran interés en el estudio de MNPs. Haciendo uso de una instrumentación relativamente sencilla, se puede medir la distribución promedio del tamaño de partícula y el potencial zeta. La Figura 26 muestra un esquema del proceso de medida mediante DLS [139].



**Figura 26.** Esquema de funcionamiento de un sistema DLS.

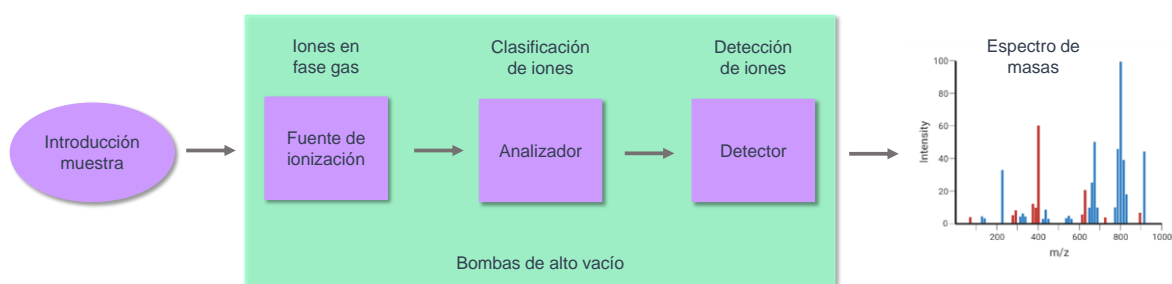
El potencial zeta mide el potencial electrocinético en sistemas coloidales, esto es, el potencial eléctrico que experimenta la interfase en la doble capa. También se puede definir como la diferencia de potencial entre el medio de dispersión y la capa estacionaria unida a la partícula dispersada. La carga adquirida por la NP en un determinado medio es su potencial zeta y aparece como consecuencia de la carga de su superficie, así como de la concentración y tipo de iones presentes en la disolución. Teniendo en cuenta que las partículas de igual carga se repelen entre sí, aquellas que presenten cargas más altas, serán más resistentes frente a la agregación. Esto implica que la estabilidad de las MNPs puede modificarse mediante la aplicación de cambios en el pH, la concentración iónica, el tipo de iones o añadiendo aditivos como surfactantes y polielectrolitos.

La medida del potencial zeta proporciona información sobre el grado de repulsión entre partículas adyacentes. Así, en el caso de partículas pequeñas y alto potencial zeta, la tendencia a agregarse será pequeña, mientras que, si su potencial es lo suficientemente bajo como para superar la repulsión, entonces las partículas tendrán tendencia a agregarse [137].

## 6. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas (MS) es una técnica que permite el análisis tanto cuantitativo como cualitativo para la determinación de la estructura de los compuestos orgánicos. El principio general de la MS es la generación de iones en estado gaseoso a partir de compuestos neutros o cargados y su separación en base a su relación masa/carga ( $m/z$ ) para finalmente ser detectados. De forma general, un espectrómetro de masas consta de cuatro componentes principales (Figura 27):

Un *sistema de introducción de muestra*, que, en el caso de ser un sistema cromatográfico, aporta la ventaja adicional de que los analitos ya entran al sistema MS separados previamente. En la zona de alto vacío se encuentran la *fuentes de ionización*, encargada de generar los iones a partir de las moléculas neutras en fase gas; el *analizador*, encargado de separar los iones generados en función de su  $m/z$  y, por último, el *detector*, cuya función es recoger y caracterizar los fragmentos clasificados en el analizador.



**Figura 27.** Esquema general del funcionamiento de un espectrómetro de masas.

### 6.1. ACOPLAMIENTO LC-MS

El acoplamiento de las técnicas cromatográficas a la MS surge de la necesidad de identificar y cuantificar los componentes que se encuentran a nivel de trazas en matrices complejas, debido entre otras cosas a que combina la capacidad de separación de la cromatografía con la sensibilidad e información de tipo estructural ofrecida por MS. Por ello, este acoplamiento es con toda probabilidad la combinación analítica instrumental más utilizada en los últimos años y con unas perspectivas futuras bastante interesantes [140].

Por otro lado, la combinación de las técnicas cromatográficas con MS no solo se aplica en análisis dirigido, sino que también ha demostrado un gran potencial en la identificación de compuestos bajo enfoque no dirigido, ampliando notablemente la información obtenida de las muestras [141].

El primer acoplamiento de este tipo comercializado fue GC-MS en 1967, considerado en la actualidad como una herramienta para análisis de rutina y de relativa sencillez. Sin embargo, el acoplamiento LC-MS es algo más complejo debido por un lado a que el sistema LC trabaja en fase condensada y por otro, a que el equipo MS lo hace a alto vacío. Para superar esta incompatibilidad es necesario incorporar una interfase que sea capaz de eliminar la fase móvil y que, a la vez, ionice los analitos antes de llegar al analizador MS. A continuación, se describen las fuentes de ionización más empleadas en LC-MS.

## **6.2. FUENTES DE IONIZACIÓN EN LC-MS**

Las fuentes de ionización más utilizadas en LC-MS son la de ionización por electrospray (ESI), ionización química a presión atmosférica (APCI) y fotoionización a presión atmosférica (APPI); todas ellas englobadas dentro de las denominadas técnicas de ionización a presión atmosférica (API), que proporcionan “ionización débil”.

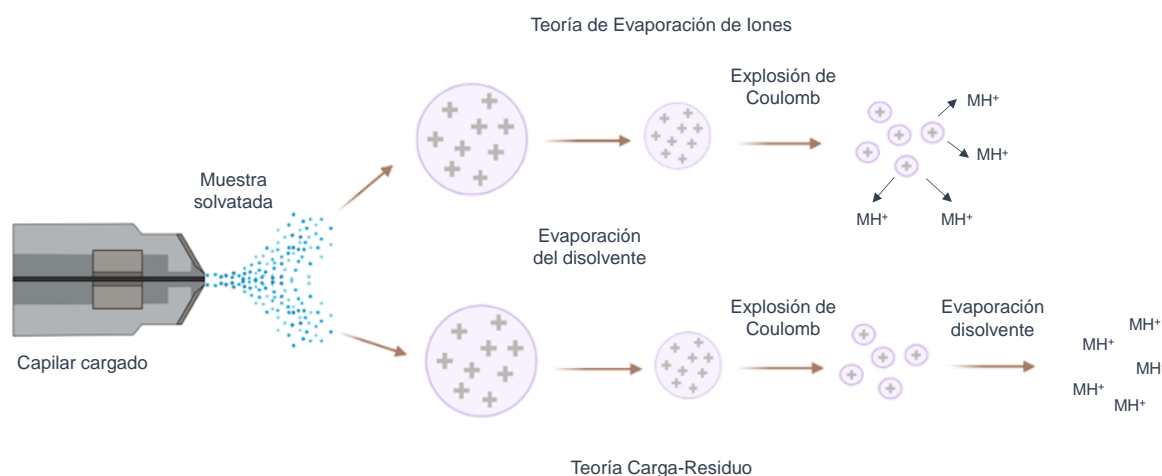
En lo que respecta a su aplicabilidad, aunque no hay un tipo de fuente capaz de ionizar cualquier tipo de compuestos, ESI es la más utilizada ya que abarca compuestos de polaridad media-alta y también de elevado molecular (>1000 Da). Por otro lado, uso de APCI está más orientado a compuestos de naturaleza iónica y peso molecular moderado, mientras que APPI complementa a ESI y APCI, ya que permite ionizar compuestos de muy baja polaridad que suelen ser difíciles de ionizar. A continuación, se describen de forma resumida las principales características de cada una de las fuentes de ionización mencionadas.

### **6.2.1. Ionización por electrospray (ESI)**

En este sistema, los iones se generan a presión atmosférica cuando se hace pasar la disolución de la muestra a través de un finísimo capilar de menos de 250  $\mu\text{m}$  de diámetro interno al tiempo que se le aplica un voltaje de unos 3-4 kV. La nebulización de la fase móvil que transporta la muestra se produce al combinar la aplicación de ese voltaje con la nebulización neumática. El elevado voltaje junto con el efecto de una corriente de nitrógeno que actúa como gas nebulizador provoca la generación de unas gotas muy finas de disolvente que contienen los analitos y además, al estar sometidas a dicho voltaje, provoca también que estas partículas queden cargadas en su superficie.

A medida que la corriente de nitrógeno evapora el disolvente, la repulsión electrostática va aumentando hasta que supera a la tensión superficial, momento en el que las gotas se

desintegran debido a la explosión de Coulomb generando microgotas altamente cargadas. Tal y como se describe en la Figura 28, a partir de las microgotas aparecen iones en fase gaseosa por la emisión o desorción de iones preformados en la superficie de la gota (evaporación) o por la desolvatación suave de esos iones (carga-residuo). Una vez generados, los iones se dirigen hasta el analizador fragmentándose por colisión, lo que hace que esta fuente de ionización sea también apta para moléculas de mayor tamaño [142].



**Figura 28.** Formación de iones mediante ESI.

### 6.2.2. Ionización química a presión atmosférica (APCI)

El proceso de ionización en APCI tiene lugar a presión atmosférica y se inicia por aplicación de un voltaje (1-5 kV) sobre la aguja de descarga en corona. La aplicación de ese voltaje provoca la formación de iones reactivos a través de una serie compleja de reacciones para, en última instancia, provocar una ionización eficiente del analito. La fase móvil se introduce a través de un capilar similar al utilizado en ESI, aunque en lugar de aplicar un voltaje para nebulizar la muestra, en este caso se usa además del gas nebulizador ( $N_2$ ) la acción del calor (100–500 °C).

Como en ESI, en la descarga se generan tanto iones positivos como negativos, una carga que se debe bien a la protonación (iones positivos) o bien a la desprotonación (iones negativos). APCI presenta la facilidad de acoplarse a otras técnicas de separación previas al igual que ESI, pero frente a esta última presenta la ventaja de ser menos susceptible a las interferencias de matriz generadas por sales [143, 144].

### 6.2.3. Ionización fotoquímica a presión atmosférica (APPI)

En APPI, el disolvente de la fase móvil que contiene los analitos se calienta a alta temperatura, de manera que interaccionan con los fotones emitidos por una fuente de luz para generar los iones moleculares. Además, este proceso tiene lugar de manera independiente al resto de moléculas del entorno, lo que repercute en una minimización del efecto matriz. Otra ventaja de APPI es su alta selectividad, dado que ni el  $N_2$  ni los disolventes se ionizan [145, 146].

## 6.3. ANALIZADORES DE MASAS

La selección del tipo de analizador es fundamental en el éxito de un análisis y va a depender de los compuestos estudiados, así como del objetivo del análisis. De forma general, los analizadores se pueden clasificar en dos grupos en función de si son analizadores de haz o de trampa. En los analizadores de haz, los iones abandonan la fuente de ionización y llegan al detector atravesando el campo de análisis, mientras que en los de trampa, como su nombre indica, los iones se quedan atrapados en el campo de análisis después de haberse formado en el propio analizador o habiendo sido inyectados a través de una fuente externa [142].

A su vez, MS ha ido evolucionando desde que en la década de 1960 se introdujeran los equipos de sector magnético de doble enfoque hasta la disponibilidad actual de equipos de MS de alta resolución (HRMS). Así, fueron incorporándose distintos analizadores como los basados en la transformada de Fourier, tiempo de vuelo (TOF) y Orbitrap y, finalmente, los instrumentos híbridos como cuadrupolo con TOF (Q-TOF), trampa de iones-TOF (IT-TOF) o Q-Orbitrap, entre otros. Estos analizadores proporcionan un tándem MS/MS o un espectro  $MS^n$  de alta resolución, además de medidas de masa monoisotópica exacta y una gran aplicabilidad para confirmar la presencia de los analitos, pero también para la identificación de compuestos desconocidos de gran utilidad en análisis no dirigido [147].

### 6.3.1. Cuadrupolo simple (Q)

Históricamente el analizador Q ha sido el más utilizado especialmente para GC-MS, aunque también para LC-MS. Esto se debe principalmente a su relativo bajo coste (en comparación con otros analizadores), pero también a su facilidad de uso y a que son físicamente más pequeños que otros analizadores como TOF. Este analizador está formado por cuatro barras metálicas de sección cilíndrica o hiperbólica dispuestas paralelamente dejando una circunferencia central, de manera que el haz de iones que le llega desde la fuente de ionización incida en la zona central.

Cada una de estas barras se conecta eléctricamente a su opuesta de manera que entre los pares de barras se pueda aplicar un voltaje de radiofrecuencia al que se le impone otro de corriente continua. De esta forma los iones viajan por el cuadrupolo, pero solo habrá ciertos valores de  $m/z$  capaces de llegar hasta el detector, mientras que el resto seguirán trayectorias inestables colisionando finalmente con las barras. Esto permite que, modificando el voltaje, se pueda seleccionar un determinado rango de  $m/z$  [142, 148].

### 6.3.2. Trampa de iones (IT)

El analizador IT está formado por dos electrodos hiperbólicos (end-cap) y un electrodo de anillo con una perforación que permite la entrada y salida de los iones. Una vez que los iones son retenidos en la cavidad de la trampa, se aplican diferentes voltajes generando un campo eléctrico en tres dimensiones y en función de cuál sea este voltaje aplicado, los iones se expulsarán de la trampa hacia el detector en función de su relación  $m/z$  [148].

### 6.3.3 Triple cuadrupolo (QqQ)

Este analizador es posiblemente uno de los más utilizados en los últimos años tanto para LC como para GC. Como su nombre indica, está formado por tres cuadrupolos: tanto el primero (Q1) como el tercero (Q3) actúan como filtros de masas, mientras que el segundo (Q2) lo hace como celda de colisión. Así, en Q1 y mediante la aplicación de dos voltajes, se produce la selección de los iones precursores; en Q2, al actuar como celda de colisión, tiene lugar la fragmentación de estos iones, y, por último, en Q3 se produce la selección de los iones producto. Todo el sistema opera en condiciones de alto vacío para evitar así colisiones indeseadas entre los fragmentos generados [148].

### 6.3.4 Tiempo de vuelo (TOF)

El concepto del análisis de masas por TOF lo propuso por vez primera Stephens en 1946 y dos años más tarde, en 1948 fue desarrollado por Cameron y Eggers y conocido entonces como *velocitron*. Conceptualmente, el funcionamiento de este analizador es de los más simples. Su funcionamiento se basa en una separación de los iones dependiente de la velocidad y su posterior detección tras su viaje a través del tubo de vuelo [149].

Todos los iones se forman a la vez y en el mismo lugar en la fuente de ionización y posteriormente se aceleran a través de un potencial fijo (1-20 kV) dentro del tubo de deriva.

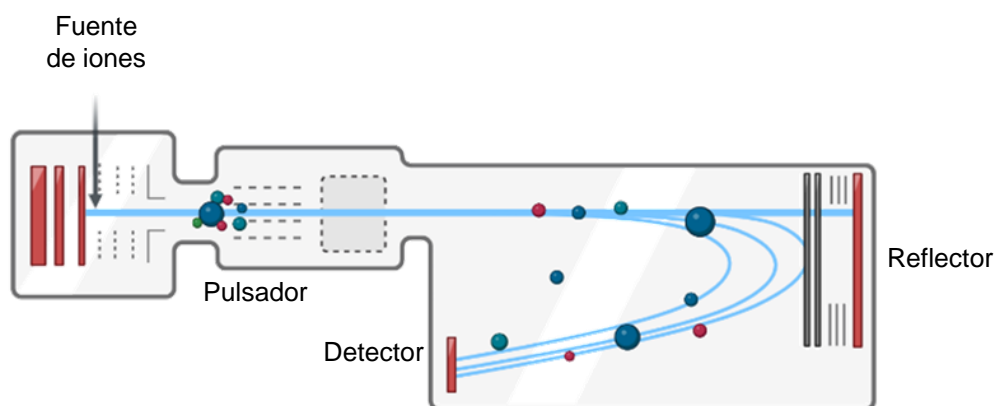


Dado que todos los iones que poseen la misma carga adquieren la misma energía cinética, los iones de menor  $m/z$  alcanzarán mayores velocidades que los de mayor  $m/z$ . Los iones viajan una distancia de entre 0,5 y 2 metros antes de impactar con el detector. De esta manera es posible determinar el valor de  $m/z$  de un ion midiendo el tiempo que tarda en llegar al detector [142]. Matemáticamente, el tiempo requerido para recorrer la distancia  $L$  se puede obtener de la ecuación 4:

$$t = L \cdot \sqrt{\frac{\mu \cdot m}{2EV \cdot z}} \quad (\text{Ecuación 4})$$

donde  $E$  es la cantidad eléctrica de una carga simple,  $\mu$  la masa de un solo átomo y  $V$  el potencial eléctrico.

Entre las ventajas de TOF se encuentran su elevada velocidad de análisis, su amplio rango de masas y su alta resolución. Sin embargo, TOF presenta ciertas limitaciones si se compara con otros analizadores, ya que opera a presiones más bajas y por tanto requiere bombas de vacío más potentes. Pero sin duda, el gran poder de resolución es uno de sus rasgos más característicos, ya que es posible distinguir iones en base a su dispersión temporal cuando se encuentran en el tubo de vuelo. Dicho de otra forma, si el tiempo, la posición y la velocidad de los iones con masas idénticas que entran en el tubo de vuelo son diferentes, el tiempo para llegar al detector también es diferente, permitiendo la determinación de dichos iones de forma separada [150]. La Figura 29 muestra un esquema del funcionamiento de un analizador TOF.



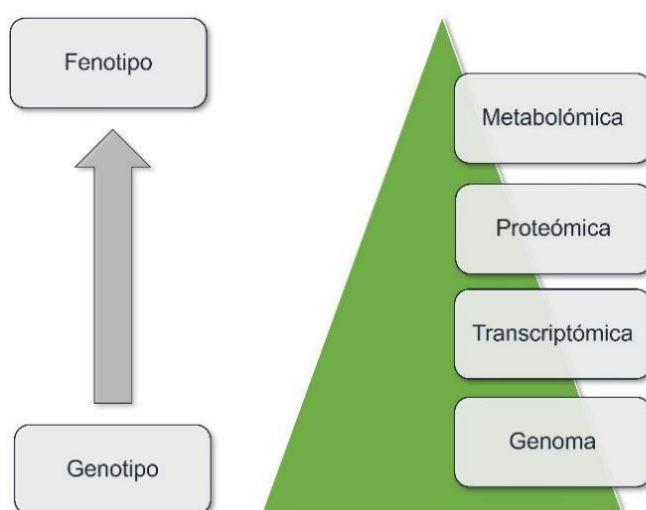
**Figura 29.** Esquema de un analizador de masas TOF.

En el analizador híbrido Q-TOF, el Q3 del QqQ se sustituye por un TOF, proporcionando la velocidad y sensibilidad del TOF junto con la capacidad de cuantificación del QqQ [150].

## 7. ANÁLISIS DEL METABOLOMA: METABOLÓMICA

La metabolómica es la ciencia encargada del estudio sistemático del perfil metabolómico (metaboloma) de un proceso biológico. El término metaboloma fue introducido por primera vez a finales de la década de 1990 por Oliver *et al.*, y hace referencia al conjunto formado por todos aquellos metabolitos presentes en una muestra biológica, ya sea biofluido, célula u organismo, mientras que los metabolitos son moléculas de bajo peso molecular (<1500 Da) procedentes de los procesos celulares y su presencia puede utilizarse como indicador de su actividad bioquímica [151].

La Figura 30 representa un esquema de las diferentes disciplinas *-ómicas* asociadas a la función celular y que permiten el estudio y comprensión de los sistemas biológicos. Como puede observarse, la metabolómica es la última disciplina en esta cascada, siendo la más cercana al fenotipo, y por tanto la más representativa del estado del organismo en un momento puntual [152].

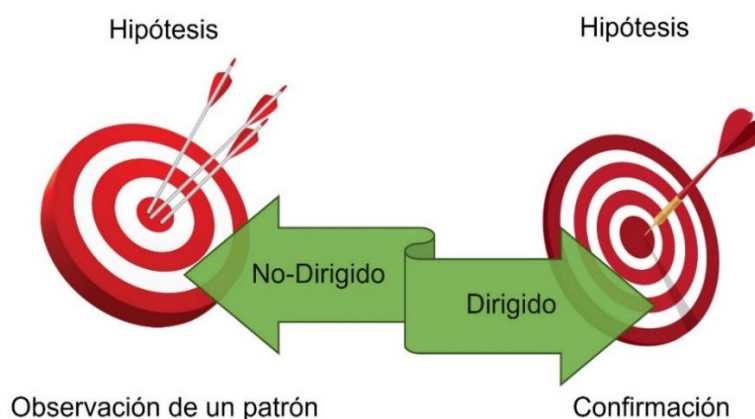


**Figura 30.** Representación esquemática del papel de las disciplinas *-ómicas* en la evaluación genotipo-fenotipo.

Para el estudio del metaboloma existen dos estrategias principales en función de la información disponible: aproximación dirigida y no dirigida (Figura 31). El análisis dirigido hace referencia al estudio de unos compuestos específicos o a un conjunto de metabolitos, donde se conoce el número y tipo de compuestos que se quiere estudiar. En este caso, la identificación de las sustancias se basa en el perfil de fragmentación y en el tiempo de retención de los compuestos en comparación con los estándares.

Por otro lado, el análisis no dirigido es un tipo de análisis integral en el que no se dispone de metabolitos específicos de interés, por lo que su objetivo principal es el de detectar el mayor número posible de estas sustancias en una variedad de muestras biológicas sin ningún sesgo de intencionalidad aparente. Para la identificación de compuestos se usa la masa exacta, el perfil isotópico, y se estudia el espectro obtenido mediante HRMS o MS. Los datos se comparan con la información disponible en bases de datos o se lleva a cabo una elucidación estructural [153]. Esta estrategia proporciona la capacidad de investigar el metabolismo a una escala global, en comparación con los estudios dirigidos tradicionales que suelen centrarse en áreas o rutas metabólicas específicas y en un número pequeño de metabolitos, permitiendo detectar miles de metabolitos en estudios generadores de hipótesis y asociar metabolitos previamente desconocidos con sus funciones biológicas [154].

Ambos enfoques se han usado en esta Tesis Doctoral, aplicando estrategias dirigidas para la monitorización de los analitos de interés de aquellos de los que se disponía de patrones comerciales, y una estrategia no dirigida para monitorizar e identificar posibles metabolitos derivados.



**Figura 31.** Diferencias del diseño experimental bajo enfoque dirigido y no dirigido.

La Figura 32 recoge las diferentes etapas involucradas en los estudios metabolómicos para generar resultados útiles y consistentes: diseño experimental, muestreo y almacenamiento, preparación y análisis de las muestras, identificación de características, pretratamiento y tratamiento de los datos y, por último, análisis univariante y multivariante [153, 155].



**Figura 32.** Etapas incluidas en un estudio metabolómico.

Una de las etapas críticas en metabolómica es la selección de la muestra debido a su influencia en los resultados generados. El metaboloma urinario se ha utilizado para investigar las consecuencias metabólicas de una enfermedad, debido a que constituye la principal ruta excretora de los metabolitos solubles en agua y xenobióticos. Así, la metabolómica de la orina debe implementarse para el descubrimiento de nuevos biomarcadores de enfermedades [156]. Por otro lado, el suero, es el principal portador de pequeñas moléculas en el organismo, y contiene una enorme cantidad de información. Por ello, se ha convertido en el fluido biológico más usado en metabolómica. Las muestras de suero presentan numerosas ventajas lo que ha propiciado que su estudio se extienda y se considere como una herramienta de gran potencial para el diagnóstico y la monitorización tanto del avance de una enfermedad como de los efectos provocados por los tratamientos aplicados. Este enfoque está considerado como mínimamente invasivo, eficiente y de bajo coste. El perfil de metabolitos del suero constituye un importante indicador del estado fisiológico o patológico y permite una mayor comprensión del mecanismo de aparición y progresión de una enfermedad a nivel metabólico, además de proporcionar información sobre la identificación de marcadores metabólicos tempranos en la aparición de una enfermedad [157].

Las matrices biológicas presentan una elevada complejidad y los metabolitos suelen encontrarse a concentraciones muy bajas, por lo que la preparación de la muestra es un paso crucial en análisis metabolómico [158]. El tratamiento de la muestra que debe utilizarse

dependerá de la estrategia dirigida o no dirigida seleccionada. En el enfoque dirigido se requieren tratamientos de muestra muy selectivos que proporcionen extractos concentrados y sin interferencias, mientras que en el enfoque no dirigido se seleccionarán tratamientos menos selectivos con el fin de obtener la mayor cantidad de metabolitos posibles.

En teoría, el metaboloma describe el conjunto completo de metabolitos en un sistema biológico. Sin embargo, en la práctica, la medida del metaboloma completo en un solo experimento es imposible. Por ello se opta por la utilización de plataformas analíticas que proporcionen información sobre las moléculas dentro de un amplio rango de polaridad, acidez o alcalinidad, cargas y pesos moleculares [154]. Dentro de estas plataformas, GC-MS, LC-MS y la resonancia magnética nuclear (RMN) son las técnicas más usadas para los análisis en metabolómica [159].

El tipo de cromatografía determinará las clases químicas de los metabolitos identificados, además la duración de la cromatografía también influirá en la cantidad de analitos identificados, ya que normalmente, los métodos cromatográficos más largos permiten obtener una mayor cantidad de compuestos identificados [153]. Respecto al tipo de MS, los equipos con alta resolución y velocidad de adquisición permiten monitorizar también un mayor número de metabolitos. En este contexto, se recomienda implementar equipos de alta resolución en experimentos de metabolómica no dirigida, ya que permiten identificar compuestos a niveles trazas en matrices complejas con un error de masa exacta menor de 5 ppm [160].

La complejidad de los datos generados requiere del uso de herramientas informáticas para su procesamiento, que pretenden aumentar la calidad de la señal y reducir los posibles sesgos presentes en los datos brutos. Para ello es necesario la reducción del ruido, la detección y deconvolución de picos, así como el alineamiento entre muestras para permitir posteriormente su comparación.

Para la identificación de los compuestos también se siguen diferentes estrategias dependiendo de la técnica analítica. La identificación en LC-MS se basa en la información generada a partir de sus espectros. Los experimentos realizados en equipos de alta resolución, así como la aplicación de MS<sup>2</sup> permiten incrementar la fiabilidad de la identificación. En esta etapa, el uso de bases de datos o librerías es fundamental. La librería gratuita METLIN es de las más utilizadas, e incluye moléculas como lípidos, esteroides, metabolitos bacterianos, péptidos de bajo peso molecular y fármacos, entre otras sustancias [153].

Finalmente se llevaría a cabo el análisis multivariante de los datos, para lo que es necesario llevar a cabo una normalización de la muestra para permitir un ajuste general en las diferencias entre muestras, transformación de la información y escalado de datos con el objetivo de facilitar

la comparación entre metabolitos individuales. El análisis quimiométrico incluye análisis multivariante tanto supervisado como no supervisado para proporcionar una interpretación descriptiva y predictiva de los datos metabolómicos. El análisis de los componentes principales (PCA) es un método no supervisado y supone la estrategia más utilizada para modelos de análisis de datos exploratorios e identificación de variación de abundancia entre muestras/grupos [153].

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] N. Brihi, Pharmacological activity of alkaloids: A review, *Asian J. Botany* 1 (2018) 1-6, <https://doi.org/10.63019/ajb.v1i2.467>.
- [2] J. Bruneton, *Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales*, ACRIBIA, 2001.
- [3] W. C. Evans, D. Evans, T. Evans, *Pharmacognosy (Sixteenth Edition)*, Capítulo 26: Alkaloids, Edition.W.B. Saunders, 2009, 353-415, <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-2933-2.00026-5>.
- [4] P. F. Rosales, G. S. Bordin, A. E. Gower, S. Moura, Indole alkaloids: 2012 until now, highlighting the new chemical structures and biological activities, *Fitoterapia* 143 (2020) 104558, <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104558>.
- [5] T. Aniszewski, *Alkaloids*, Capítulo 1: Definition, typology, and occurrence of alkaloids, 2015 1-97, <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-59433-4.00001-8>.
- [6] B. Sireesha, B. V. Reddy, S. K. Basha, K. Chandra, D. Anasuya, M. Bhavani, A review on pharmacological activities of alkaloids, *W. J. Curr. Med. Pharm. Res.* 1 (2019) 230-234, <https://doi.org/10.37022/wjcmpr.2019.01068>.
- [7] P. Dey, A. Kundu, A. Kumar, M. Gupta, B. M. Lee, T. Bhakta, S. Dash, H. S. Kim, Recent advances in natural products analysis, Capítulo 15: Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids), Elsevier, 2020, 505-567, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816455-6.00015-9>.
- [8] V. G. Uarrota, M. Maraschin, Â. F. M. Bairros, R. Pedreschi, Factors affecting the capsaicinoid profile of hot peppers and biological activity of their non-pungent analogs (Capsinoids) present in sweet peppers, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 61 (2021) 649-665, <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1743642>.

- [9] Ł. Adaszek, D. Gadomska, Ł. Mazurek, P. Łyp, J. Madany, S. Winiarczyk, Properties of capsaicin and its utility in veterinary and human medicine, *Res. Vet. Sci.* 123 (2019) 14-19, <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.12.002>.
- [10] E. K. Nelson, Constitution of capsaicin, the pungent principle of capsicum, *J. Am. Chem. Soc.* 7 (1919) 1115-1121.
- [11] F. Wang, Y. Xue, L. Fu, Y. Wang, M. He, L. Zhao, X. Liao, Extraction, purification, bioactivity and pharmacological effects of capsaicin: a review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 62 (2022) 5322-5348, <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1884840>.
- [12] Q. Xiang, W. Guo, X. Tang, S. Cui, F. Zhang, X. Liu, J. Zhao, H. Zhang, B. Mao, W. Chen, Capsaicin-the spicy ingredient of chili peppers: A review of the gastrointestinal effects and mechanisms, *Trends Food Sci. Technol.* 116 (2021) 755-765, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.08.034>.
- [13] J. R. Friedman, S. D. Richbart, J. C. Merritt, K. C. Brown, K. L. Denning, M. T. Tirona, M. A. Valentovic, S. L. Miles, P. Dasgupta, Capsaicinoids: Multiple effects on angiogenesis, invasion and metastasis in human cancers, *Biomed. Pharmacother.* 118 (2019) 109317, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109317>.
- [14] J. Ringuelet, S. Viña, *Productos naturales vegetales*, Editorial de la Universidad Nacional de La Plata, 2013.
- [15] F. Vázquez-Flota, M. L. Miranda-Ham, M. Monforte-González, G. Gutiérrez-Carbajal, C. Velázquez-García, Y. Nieto-Pelayo, La biosíntesis de capsaicinoides, el principio picante del chile, *Rev. Fitotec. Mex.* 30 (2007) 353-360, <https://doi.org/10.35196/rfm.2007.4.353>.
- [16] C. Aza-González, H. G. Núñez-Palenius, N. Ochoa-Alejo, Molecular biology of capsaicinoid biosynthesis in chili pepper (*Capsicum* spp.), *Plant Cell. Rep.* 30 (2011) 695-706, <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0968-8>.
- [17] J. F. Peppin, M. Pappagallo, Capsaicinoids in the treatment of neuropathic pain: A review, *Ther. Adv. Neurol. Disord.* 7 (2014) 22-32, <https://doi.org/10.1177/1756285613501576>.
- [18] M. Lu, C. Chen, Y. Lan, J. Xiao, R. Li, J. Huang, Q. Huang, Y. Cao, C-T. Ho, Capsaicin - The major bioactive ingredient of chili peppers: Bio-efficacy and delivery systems, *Food Funct.* 11 (2020) 2848-2860, <https://doi.org/10.1039/d0fo00351d>.
- [19] C. Bonezzi, A. Costantini, G. Cruccu, D. M. M. Fornasari, V. Guardamagna, V. Palmieri, E. Polati, P. Zini, A. H. Dickenson, Capsaicin 8% dermal patch in clinical practice: an expert

- opinion, *Expert Opin. Pharmacother.* 21 (2020) 1377-1387, <https://doi.org/10.1080/14656566.2020.1759550>.
- [20] O. M. Hall, A. Broussard, T. Range, M. A. C. Turpin, S. Ellis, V. M. Lim, E. M. Cornett, A. D. Kaye, Novel agents in neuropathic pain, the role of capsaicin: Pharmacology, efficacy, side effects, different preparations, *Curr. Pain Headache Rep.* 24 (2020) 53, <https://doi.org/10.1007/s11916-020-00886-4>.
- [21] E. Moita, A. Gil-Izquierdo, C. Sousa, F. Ferreres, L. R. Silva, P. Valentao, R. Domínguez-Perles, N. Baenas, P. B. Andrade, Integrated analysis of COX-2 and iNOS derived inflammatory mediators in LPS-Stimulated RAW macrophages pre-exposed to *Echium plantagineum* L. Bee Pollen Extract," *PLoS One* 8 (2013) e59131, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059131>.
- [22] B. Joe, B. R. Lokesh, Effect of curcumin and capsaicin on arachidonic acid metabolism and lysosomal enzyme secretion by rat peritoneal macrophages, *Lipids* 32 (1997) 1173-1180, <https://doi.org/10.1007/s11745-997-0151-8>.
- [23] A. Akella, S. B. Deshpande, Reflex hypertensive response induced by capsaicin involves endothelin-dependent mechanisms, *IJPP* 59 (2015) 23-29.
- [24] A. R. Josse, S. S. Sherriffs, A. M. Holwerda, R. Andrews, A. W. Staples, S. M. Phillips, Effects of capsinoid ingestion on energy expenditure and lipid oxidation at rest and during exercise, *Nutr. Metab.* 7 (2010) 65, <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-65>
- [25] P. V. Dludla, B. B. Nkambule, I. Cirilli, F. Marcheggiani, S. E. Mabhida, K. Ziqubu, Y. Ntamo, B. Jack, T. M. Nyambuya, S. Hanser, S. E. Mazibuko-Mbeje, Capsaicin, its clinical significance in patients with painful diabetic neuropathy, *Biomed. Pharmacother.* 153 (2022) 113439, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113439>.
- [26] M. Y. Kim, L. J. Trudel, G. N. Wogan, Apoptosis induced by capsaicin and resveratrol in colon carcinoma cells requires nitric oxide production and caspase activation, *Anticancer Res.* 29 (2009) 3733-3740.
- [27] Y. P. Hwang, Y. P. Hwang, H. J. Yun, J. H. Choi, E. H. Han, H. G. Kim, G. Y. Song, K. Kwon, T. C. Jeong, H. G. Jeong, Suppression of EGF-induced tumor cell migration and matrix metalloproteinase-9 expression by capsaicin via the inhibition of EGFR-mediated FAK/Akt, PKC/Raf/ERK, p38 MAPK, and AP-1 signaling, *Mol. Nutr. Food Res.* 55 (2011) 594-605, <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000292>.
- [28] J. R. Friedman, S. D. Richbart, J. C. Merritt, H. E. Perry, K. C. Brown, A. T. Akers, N. A. Nola, C. D. Stevenson, J. D. Hurley, S. L. Miles, M. T. Tirona, M. A. Valentovic, P. Dasgupta,



- Advances in Cancer Research, Capítulo 6: Capsaicinoids enhance chemosensitivity to chemotherapeutic drugs, Academic Press Inc., 2019, 263-298, <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2019.05.002>.
- [29] M. J. Ojeda-Montes, A. Ardid-Ruiz, S. Tomás-Hernández, A. Gimeno, A. Cereto-Massagué, R. Beltrán-Debón, M. Mulero, S. García-Vallvé, G. Pujadas, C. Valls, Ephedrine as a lead compound for the development of new DPP-IV inhibitors, *Future Med. Chem.* 9 (2017) 2129-2146, <https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0080>.
- [30] D. E. González-Juárez, A. Escobedo-Moratilla, J. Flores, S. Hidalgo-Figueroa, N. Martínez-Tagüeña, J. Morales-Jiménez, A. Muñoz-Ramírez, G. Pastor-Palacios, S. Pérez-Miranda, A. Ramírez-Hernández, J. Trujillo, E. Bautista, A review of the Ephedra genus: Distribution, ecology, ethnobotany, phytochemistry and pharmacological properties, *Molecules* 25 (2020) 3283, <https://doi.org/10.3390/molecules25143283>.
- [31] M. Mellado, M. Soto, A. Madrid, I. Montenegro, C. Jara-Gutiérrez, J. Villena, E. Werner, P. Godoy, I. F. Aguilar, In vitro antioxidant and antiproliferative effect of the extracts of *Ephedra chilensis* K Presl aerial parts, *BMC Complement. Altern. Med.* 19 (2019) 53, <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2462-3>.
- [32] R. Andraws, P. Chawla, D. L. Brown, Cardiovascular effects of Ephedra alkaloids: A comprehensive review, *Prog. Cardiovasc. Dis.* 47 (2005) 217-225, <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2004.07.006>.
- [33] A. S. Dousari, N. Satarzadeh, B. Amirheidari, H. Forootanfar, Medicinal and therapeutic properties of Ephedra, *Rev. Bras. Farmacogn.* 32 (2022) 883-899, <https://doi.org/10.1007/s43450-022-00304-3/Published>.
- [34] A. Kabir, A. Mocan, S. Piccolantonio, E. Sperandio, H. I. Ulusoy, M. Locatelli, Recent Advances in Natural Products Analysis, Capítulo 16: Analysis of amines, Elsevier, 2020, 569-591, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816455-6.00016-0>.
- [35] A. Önal, S. E. K. Tekkeli, C. Önal, A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods, *Food Chem.* 138 (2013) 509-515, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.056>.
- [36] N. Killiny, Y. Nehela, Citrus polyamines: Structure, biosynthesis, and physiological functions, *Plants* 9 (2020) 426, <https://doi.org/10.3390/plants9040426>.

- [37] M. Ganzera, C. Lanser, H. Stuppner, Simultaneous determination of *Ephedra sinica* and *Citrus aurantium var. amara* alkaloids by ion-pair chromatography, *Talanta* 66 (2005) 889-894, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.12.045>.
- [38] J. D. Fernstrom, M. H. Fernstrom, Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain, *J. Nutr.* 137 (2007) 1539S-1547S, <https://doi.org/10.1093/jn/137.6.1539S>.
- [39] A. B. Lange, Tyramine: From octopamine precursor to neuroactive chemical in insects, *Gen. Comp. Endocrinol.* 162 (2009) 18-26, <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.05.021>.
- [40] T. Farooqui, Review of octopamine in insect nervous systems, *Open Access Insect. Physiol.* 4 (2012) 1-17, <https://doi.org/10.2147/oaip.s20911>.
- [41] T. Roeder, Tyramine and octopamine: Ruling behavior and metabolism, *Annu. Rev. Entomol.* 50 (2005) 447-477, <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130404>.
- [42] A. Ataey, E. Jafarvand, D. Adham, E. Moradi-Asl, The relationship between obesity, overweight, and the human development index in world health organization eastern mediterranean region countries, *J. Prev. Med. Public Health* 53 (2020) 98-105, <https://doi.org/10.3961/jpmp.19.100>.
- [43] J. T. Dwyer, D. B. Allison, P. M. Coates, Dietary supplements in weight reduction, *J. Am. Diet Assoc.* 105 (2005) 80-86, <https://doi.org/10.1016/j.jada.2005.02.028>.
- [44] C. Ruiz-Moreno, J. Del Coso, V. Giráldez-Costas, J. González-García, J. Gutiérrez-Hellín, Effects of *p*-synephrine during exercise: A brief narrative review, *Nutrients* 13 (2021) 1-9, <https://doi.org/10.3390/nu13010233>.
- [45] L. S. Müller, A. P. L. Moreira, D. T. Muratt, C. Viana, L. M. Carvalho, An ultra-high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometric method for screening and simultaneous determination of anorexic, anxiolytic, antidepressant, diuretic, laxative and stimulant drugs in dietary supplements marketed for weight loss, *J. Chrom. Sci.* 57 (2019) 528-540, <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmz025>.
- [46] A. Fugh-Berman, A. Myers, *Citrus aurantium*, an ingredient of dietary supplements marketed for weight loss: current status of clinical and basic research, *Exp. Biol. Med.* 229 (2004) 698-704, <https://doi.org/10.1177/153537020422900802>.
- [47] The 2023 Monitoring Program, World anti-doping agency (WADA), 2023.

- [48] L. G. Rossato, V. M. Costa, R. P. Limberger, M. L. Bastos, F. Remião, Synephrine: From trace concentrations to massive consumption in weight-loss, *Food Chem. Toxicol.* 49 (2011) 8-16, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.11.007>.
- [49] L. G. Rossato, V. M. Costa, P. G. Pinho, F. Carvalho, M. L. Bastos, F. Remião, Structural isomerization of synephrine influences its uptake and ensuing glutathione depletion in rat-isolated cardiomyocytes, *Arch. Toxicol.* 85 (2011) 929-939, <https://doi.org/10.1007/s00204-010-0630-9>.
- [50] S. J. Stohs, H. G. Preuss, M. Shara, A review of the receptor-binding properties of *p*-synephrine as related to its pharmacological effects, *Ox. Med. Cell. Long.* 1 (2011) 482973, <https://doi.org/10.1155/2011/482973>.
- [51] S. J. Stohs, M. Shara, S. D. Ray, *p*-Synephrine, ephedrine, *p*-octopamine and *m*-synephrine: Comparative mechanistic, physiological and pharmacological properties, *Phytother. Res.* 34 (2020) 1838-1846, <https://doi.org/10.1002/ptr.6649>.
- [52] S. J. Stohs, H. G. Preuss, M. Shara, A review of the human clinical studies involving *Citrus aurantium* (bitter orange) extract and its primary protoalkaloid *p*-synephrine, *Int. J. Med. Sci.* 9 (2012) 527-538, <https://doi.org/10.7150/ijms.4446>.
- [53] J. G. Hellín, J. C. Garrigós, T. G. Pastor, *p*-Synephrine, exercise, weight loss and health, *Int. J. Sport. Sci.* 4 (2014) 128-137.
- [54] S. Wang, M. H. Pan, W. L. Hung, Y. C. Tung, C. T. Ho, From white to beige adipocytes: Therapeutic potential of dietary molecules against obesity and their molecular mechanisms, *Food Funct.* 10 (2019) 1263-1279, <https://doi.org/10.1039/c8fo02154f>.
- [55] X. Zheng, L. Guo, D. Wang, X. Deng, *p*-Synephrine: A Novel Agonist for Neuromedin U2 Receptor, *Biol. Pharm. Bull.* 37 (2014) 764-770, <https://doi.org/10.1248/bpb.b13-00788>.
- [56] M. M. Moein, A. El Beqqali, M. Abdel-Rehim, Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1043 (2017) 3-11, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.09.028>.
- [57] Z. Niu, W. Zhang, C. Yu, J. Zhang, Y. Wen, Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 102 (2018) 123-146, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.02.005>.
- [58] N. Majkić-Singh, What is a biomarker? From its discovery to clinical application, *J. Med. Biochem.* 30 (2011) 186-196, <https://doi.org/10.2478/v10011-011-0029-z>.

- [59] X. Fuentes-Arderiu, What is a biomarker? It's time for a renewed definition, *Clin. Chem. Lab. Med.* 51 (2013) 1689-1690, <https://doi.org/10.1515/cclm-2013-0240>.
- [60] A. Zhang, H. Sun, P. Wang, Y. Han, X. Wang, Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics, *J. Proteomics* 75 (2012) 1079-1088, <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.10.027>.
- [61] S. Hamidi, N. Alipour-Ghorbani, A. Hamidi, Solid phase microextraction techniques in determination of biomarkers, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 48 (2018) 239-251, <https://doi.org/10.1080/10408347.2017.1396885>.
- [62] S. Thomas, L. Hao, W. A. Ricke, L. Li, Biomarker discovery in mass spectrometry-based urinary proteomics, *Proteomics Clin. Appl.* 10 (2016) 358-370, <https://doi.org/10.1002/prca.201500102>.
- [63] N. Y. Ashri, M. Abdel-Rehim, Sample treatment based on extraction techniques in biological matrices, *Bioanalysis* 3 (2011) 2003-2018, <https://doi.org/10.4155/bio.11.201>.
- [64] M. Plebani, G. Banfi, S. Bernardini, F. Bondanini, L. Conti, R. Dorizzi, F. E. Ferrara, R. Mancini, T. Trenti, Serum or plasma? An old question looking for new answers, *Clin. Chem. Lab. Med.* 58 (2020) 178-187, <https://doi.org/10.1515/cclm-2019-0719>.
- [65] R. J. Anderegg, Derivatization in mass spectrometry: Strategies for controlling fragmentation, *Mass Spectrom. Rev.* 7 (1988) 395-424, <https://doi.org/10.1002/mas.1280070403>.
- [66] C. F. Poole, *Liquid Chromatography: Applications*, Capítulo 2: Derivatization in liquid chromatography, Elsevier Inc., 2013, 25-56, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415806-1.00002-4>.
- [67] J. Wang, Z. Liu, Y. Qu, Ultrasound-assisted dispersive solid-phase extraction combined with reversed-phase high-performance liquid chromatography-photodiode array detection for the determination of nine biogenic amines in canned seafood, *J. Chromatogr. A* 1636 (2021) 461768, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461768>.
- [68] F. Xu, Z. Li, Y. Liu, Z. Zhang, C. N. Ong, Enhancement of the capabilities of liquid chromatography-mass spectrometry with derivatization: General principles and applications, *Mass Spectrom. Rev.* 30 (2011) 1143-1172, <https://doi.org/10.1002/mas.20316>.

- [69] B. L. Qi, P. Liu, Q. Y. Wang, W. J. Cai, B. F. Yuan, Y. Q. Feng, Derivatization for liquid chromatography-mass spectrometry TrAC - Trends Anal. Chem. 59 (2014) 121-132, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.03.013>.
- [70] T. Santa, Derivatization in liquid chromatography for mass spectrometric detection, Drug Discov. Ther. 7 (2013) 9-17, <https://doi.org/10.5582/ddt.2013.v7.1.9>.
- [71] T. Y. Zhang, S. Li, Q. F. Zhu, Q. Wang, D. Hussain, Y. Q. Feng, Derivatization for liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry analysis of small-molecular weight compounds, TrAC - Trends Anal. Chem. 119 (2019) 115608, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.07.019>.
- [72] J. L. Ordóñez, A. M. Troncoso, M. D. C. García-Parrilla, R. M. Callejón, Recent trends in the determination of biogenic amines in fermented beverages - A review, Anal. Chim. Acta 939 (2016) 10-25, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.07.045>.
- [73] J. J. Learey, S. Crawford-Clark, B. J. Bowen, C. J. Barrow, J. L. Adcock, Detection of biogenic amines in pet food ingredients by RP-HPLC with automated dansyl chloride derivatization, J. Sep. Sci. 41 (2018) 4430-4436, <https://doi.org/10.1002/jssc.201800455>.
- [74] B. A. Marco, B. S. Rechelo, E. G. Tótolí, A. C. Kogawa, H. R. N. Salgado, Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review, Saudi Pharm. J. 27 (2019) 1-8, <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.07.011>.
- [75] I. T. Horváth, P. T. Anastas, Introduction: Green chemistry, Chem. Rev. 107 (2007) 2167-2168, <https://doi.org/10.1021/cr0783784>.
- [76] P. T. Anastas, N. Eghbali, Green Chemistry: Principles and practice, Chem. Soc. Rev. 39 (2010) 301-312, <https://doi.org/10.1039/b918763b>.
- [77] P. T. Anastas, Green Chemistry: Theory and practice, Oxford University Press, 1998.
- [78] A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namieśnik, The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices, TrAC - Trends Anal. Chem. 50 (2013) 78-84, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.010>.
- [79] L. H. Keith, L. U. Gron, J. L. Young, Green analytical methodologies, Chem. Rev. 107 (2007) 2695-2708, <https://doi.org/10.1021/cr068359e>.
- [80] P. M. Nowak, R. Wietecha-Posłuszny, J. Pawliszyn, White Analytical Chemistry: An approach to reconcile the principles of Green Analytical Chemistry and functionality, TrAC - Trends Anal. Chem. 138 (2021) 116223, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116223>.

- [81] A. B. Kanu, Recent developments in sample preparation techniques combined with high-performance liquid chromatography: A critical review, *J. Chromatogr. A* 1654 (2021) 462444, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.4624>.
- [82] J. S. S. Burato, D. A. Vargas Medina, A. L. de Toffoli, E. V. S. Maciel, F. Mauro Lanças, Recent advances and trends in miniaturized sample preparation techniques, *J. Sep. Sci.* 43 (2020) 202-225, <https://doi.org/10.1002/jssc.201900776>.
- [83] A. Gutiérrez-Serpa, R. González-Martín, M. Sajid, V. Pino, Greenness of magnetic nanomaterials in miniaturized extraction techniques: A review, *Talanta* 225 (2021) 122053, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.122053>.
- [84] L. Nováková, H. Vičková, A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation, *Anal. Chim. Acta* 656 (2009) 8-35, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.10.004>.
- [85] R. M. Smith, Before the injection - Modern methods of sample preparation for separation techniques, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 3-27, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00511-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00511-9).
- [86] C. I. C. Silvestre, J. L. M. Santos, J. L. F. C. Lima, E. A. G. Zagatto, Liquid-liquid extraction in flow analysis: A critical review, *Anal. Chim. Acta* 652 (2009) 54-65, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.05.042>.
- [87] K. Ridgway, S. P. D. Lalljie, R. M. Smith, Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods, *J. Chromatogr. A* 1153 (2007) 36-53, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.134>.
- [88] Y. Q. Tang, N. Weng, Salting-out assisted liquid-liquid extraction for bioanalysis, *Bioanalysis* 5 (2013) 1583-1598, <https://doi.org/10.4155/bio.13.117>.
- [89] J. Zhang, X. Xiong, Sample preparation in LC-MS bioanalysis, Capítulo 5: Salting-out assisted liquid-liquid extraction (SALLE) in LC-MS bioanalysis, John Wiley & Sons, INC., 2019, <https://doi.org/10.1002/9781119274315.ch5>.
- [90] P. Ścigalski, P. Kosobucki, Recent materials developed for dispersive solid phase extraction, *Molecules* 25 (2020) 4869, <https://doi.org/10.3390/molecules25214869>.
- [91] G. Islas, I. S. Ibarra, P. Hernandez, J. M. Miranda, A. Cepeda, Dispersive solid phase extraction for the analysis of veterinary drugs applied to food samples: A review, *Int. J. Anal. Chem.* 1 (2017) 8215271, <https://doi.org/10.1155/2017/8215271>.

- [92] J. A. Senzel, Miniaturization in analytical instrumentation, *Anal. Chem.* 42 (1970) 79A-81A, <https://doi.org/10.1021/ac60293a775>.
- [93] A. Agrawal, R. Keçili, F. Ghorbani-Bidkorbeh, C. M. Hussain, Green miniaturized technologies in analytical and bioanalytical chemistry, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 143 (2021) 116383, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116383>.
- [94] L. Q. Peng, J. Cao, Modern microextraction techniques for natural products, *Electrophoresis* 42 (2021) 219-232, <https://doi.org/10.1002/elps.202000248>.
- [95] V. Jalili, A. Barkhordari, A. Ghiasvand, Bioanalytical applications of microextraction techniques: A review of reviews, *Chromatographia* 83 (2020) 567-577, <https://doi.org/10.1007/s10337-020-03884-1>.
- [96] M. Rutkowska, J. Płotka-Wasyłka, M. Sajid, V. Andruch, Liquid-phase microextraction: A review of reviews, *Microchem. J.* 149 (2019) 103989, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.103989>.
- [97] S. Seidi, M. Rezazadeh, Y. Yamini, Pharmaceutical applications of liquid-phase microextraction, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 108 (2018) 296-305, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.09.014>.
- [98] Y. Yamini, M. Rezazadeh, S. Seidi, Liquid-phase microextraction – The different principles and configurations, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 112 (2019) 264-272, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.06.010>.
- [99] M. Rezaee, Y. Assadi, M. R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1-9, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.007>.
- [100] M. Rezaee, Y. Yamini, M. Faraji, Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2342-2357, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.088>.
- [101] A. Zgoła-Grześkowiak, T. Grześkowiak, Dispersive liquid-liquid microextraction, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 1382-1399, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.04.014>.
- [102] M. Saraji, M. K. Boroujeni, Recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction Microextraction Techniques, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 2027-2066, <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7467-z>.

- [103] E. Yiantzi, E. Psillakis, K. Tyrovola, N. Kalogerakis, Vortex-assisted liquid-liquid microextraction of octylphenol, nonylphenol and bisphenol-A, *Talanta* 80 (2010) 2057-2062, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.11.005>.
- [104] J. Regueiro, M. Llompарт, C. Garcia-Jares, J. C. Garcia-Monteagudo, R. Cela, Ultrasound-assisted emulsification-microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters, *J. Chromatogr. A* 1190 (2008) 27-38, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.02.091>.
- [105] M. Saraji, A. A. H. Bidgoli, Dispersive liquid-liquid microextraction using a surfactant as disperser agent, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 3107-3115, <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3894-2>.
- [106] J. Grau, C. Azorín, J. L. Benedé, A. Chisvert, A. Salvador, Use of green alternative solvents in dispersive liquid-liquid microextraction: A review, *J. Sep. Sci.* 45 (2022) 210-222, <https://doi.org/10.1002/jssc.202100609>.
- [107] M. I. Leong, S. D. Huang, Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop combined with gas chromatography with electron-capture or mass spectrometry detection, *J. Chromatogr. A* 1211 (2008) 8-12, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.09.111>.
- [108] U. Alshana, M. Hassan, M. Al-Nidawi, E. Yilmaz, M. Soylak, Switchable-hydrophilicity solvent liquid-liquid microextraction, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 131 (2020) 116025, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116025>.
- [109] Y. Liu, E. Zhao, W. Zhu, H. Gao, Z. Zhou, Determination of four heterocyclic insecticides by ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction in water samples, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 885-891, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.11.076>.
- [110] A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Potential of supramolecular solvents for the extraction of contaminants in liquid foods, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 530-539, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.06.029>.
- [111] M. A. Farajzadeh, M. R. Afshar Mogaddam, M. Aghanassab, Deep eutectic solvent-based dispersive liquid-liquid microextraction, *Anal. Methods* 8 (2016) 2576-2583, <https://doi.org/10.1039/c5ay03189c>.
- [112] M. Sajid, Dispersive liquid-liquid microextraction: Evolution in design, application areas, and green aspects, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 152 (2022) 116636, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116636>.



- [113] V. Jalili, A. Barkhordari, A. Ghasvand, A comprehensive look at solid-phase microextraction technique: A review of reviews, *Microchem. J.* 152 (2020) 104319, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104319>.
- [114] J. Płotka-Wasyłka, N. Szczepańska, M. Guardia, J. Namieśnik, Miniaturized solid-phase extraction techniques, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 73 (2015) 19-38, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.026>.
- [115] M. Anastassiades, S. J. Lehotay, Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and 'dispersive solid-phase extraction' for the determination of pesticide residues in produce, *J. AOAC Int.* 86 (2003) 412-431, <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>
- [116] A. Andrade-Eiroa, M. Canle, V. Leroy-Cancellieri, V. Cerdà, Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I), *TrAC - Trends Anal. Chem.* 80 (2016) 641-654, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.015>.
- [117] A. Andrade-Eiroa, M. Canle, V. Leroy-Cancellieri, V. Cerdà, Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part II), *TrAC - Trends Anal. Chem.* 80 (2016) 655-667, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.014>.
- [118] P. J. Robinson, P. Dunnill, M. D. Lilly, The properties of magnetic supports in relation to immobilized enzyme reactors, *Biotechnol. Bioeng.* 15 (1973) 603-606, <https://doi.org/10.1002/bit.260150318>.
- [119] M. Ghorbani, M. Aghamohammadhassan, M. Chamsaz, H. Akhlaghi, T. Pedramrad, Dispersive solid phase microextraction, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 118 (2019) 793-809, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.07.012>.
- [120] S. Büyüktiryaki, R. Keçili, C. M. Hussain, Functionalized nanomaterials in dispersive solid phase extraction: Advances and prospects, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 127 (2020) 115893, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115893>.
- [121] A. Chisvert, S. Cárdenas, R. Lucena, Dispersive micro-solid phase extraction, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 112 (2019) 226-233, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.005>.
- [122] A. H. Lu, E. L. Salabas, F. Schürth, Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application, *Angew. Chem., Int. Ed.* 46 (2007) 1222-1244, <https://doi.org/10.1002/anie.200602866>.

- [123] A. Ali, T. Shah, R. Ullah, P. Zhou, M. Guo, M. Ovais, Z. Tan, Y. Rui, Review on recent progress in magnetic nanoparticles: Synthesis, characterization, and diverse applications, *Front. Chem.* 9 (2021) 629054, <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.629054>.
- [124] T. I. Shabatina, O. I. Vernaya, V. P. Shabatin, M. Y. Melnikov, Magnetic nanoparticles for biomedical purposes: Modern trends and prospects, *Magnetochemistry* 6 (2020) 1-18, <https://doi.org/10.3390/magnetochemistry6030030>.
- [125] M. I. Anik, M. K. Hossain, I. Hossain, A. M. U. B. Mahfuz, M. T. Rahman, I. Ahmed, Recent progress of magnetic nanoparticles in biomedical applications: A review, *Nano Select* 2 (2021) 1146-1186, <https://doi.org/10.1002/nano.202000162>.
- [126] S. Liu, B. Yu, S. Wang, Y. Shen, H. Cong, Preparation, surface functionalization and application of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles, *Adv. Colloid Interface Sci.* 281 (2020) 102165, <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102165>.
- [127] R. Keçili, F. Ghorbani-Bidkorbeh, I. Dolak, G. Canpolat, M. Karabörk, C. M. Hussain, Functionalized magnetic nanoparticles as powerful sorbents and stationary phases for the extraction and chromatographic applications, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 143 (2021) 116380, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116380>.
- [128] R. C. Popescu, E. Andronescu, B. S. Vasile, Recent advances in magnetite nanoparticle functionalization for nanomedicine, *Nanomaterials* 9 (2019) 1791, <https://doi.org/10.3390/nano9121791>.
- [129] J. Li, X. Zhao, Y. Shi, Y. Cai, S. Mou, G. Jiang, Mixed hemimicelles solid-phase extraction based on cetyltrimethylammonium bromide-coated nano-magnets Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> for the determination of chlorophenols in environmental water samples coupled with liquid chromatography/spectrophotometry detection, *J. Chromatogr. A* 1180 (2008) 24-31, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.12.028>.
- [130] A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, Hemimicelles of alkyl carboxylates chemisorbed onto magnetic nanoparticles: Study and application to the extraction of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples, *Anal. Chem.* 81 (2009) 9012-9020, <https://doi.org/10.1021/ac9016264>.
- [131] Y. Cui, L. Ding, J. Ding, Recent advances of magnetic molecularly imprinted materials: From materials design to complex sample pretreatment, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 147 (2022) 116514, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116514>.

- [132] W. Yu, L. Sisi, Y. Haiyan, L. Jie, Progress in the functional modification of graphene/graphene oxide: A review, *RSC Adv.* 10 (2020) 15328-15345, <https://doi.org/10.1039/d0ra01068e>.
- [133] S. Iijima, Helical microtubules of graphitic carbon, *Nature* 354 (1991) 56-58, <https://doi.org/10.1038/354056a0>.
- [134] S. Rathinavel, K. Priyadharshini, D. Panda, A review on carbon nanotube: An overview of synthesis, properties, functionalization, characterization, and the application, *Mater. Sci. Eng. B Solid State Mater. Adv. Technol.* 268 (2021) 115095, <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2021.115095>.
- [135] C. Herrero-Latorre, J. Barciela-García, S. García-Martín, R. M. Peña-Crecente, J. Otárola-Jiménez, Magnetic solid-phase extraction using carbon nanotubes as sorbents: A review, *Anal. Chim. Acta* 892 (2015) 10-26, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.07.046>.
- [136] S. Ulrich, Solid-phase microextraction in biomedical analysis, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 167-194, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00934-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00934-1).
- [137] D. Titus, E. James Jebaseelan Samuel, S. M. Roopan, Green synthesis, characterization and applications of nanoparticles, *Capítulo 12: Nanoparticle characterization techniques*, Elsevier, 2018, 303-319, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102579-6.00012-5>.
- [138] M. R. Z. Kouhpanji, B. J. H. Stadler, A guideline for effectively synthesizing and characterizing magnetic nanoparticles for advancing nanobiotechnology: A review, *Sensors* 20 (2020) 2554, <https://doi.org/10.3390/s20092554>.
- [139] J. Lim, S. P. Yeap, H. X. Che, S. C. Low, Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering, *Nanoscale Res. Lett.* 8 (2013) 1-14, <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-381>.
- [140] C. Zambonin, A. Aresta, Recent applications of solid phase microextraction coupled to liquid chromatography, *Separations* 8 (2021) 34, <https://doi.org/10.3390/SEPARATIONS8030034>.
- [141] M. E. Torres-Padrón, C. Afonso-Olivares, Z. Sosa-Ferrera, J. J. Santana-Rodríguez, Microextraction techniques coupled to liquid chromatography with mass spectrometry for the determination of organic micropollutants in environmental water samples, *Molecules* 19 (2014) 10320-10349, <https://doi.org/10.3390/molecules190710320>.
- [142] G. L. Glish, R. W. Vachet, The basics of mass spectrometry in the twenty-first century, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2 (2003) 140-150, <https://doi.org/10.1038/nrd1011>.

- [143] H. Awad, M. M. Khamis, A. El-Aneed, Mass spectrometry, review of the basics: Ionization, *Appl. Spectrosc. Rev.* 50 (2015) 158-175, <https://doi.org/10.1080/05704928.2014.954046>.
- [144] A. El-Aneed, A. Cohen, J. Banoub, Mass spectrometry, review of the basics: Electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers, *Appl. Spectrosc. Rev.* 44 (2009) 210-230, <https://doi.org/10.1080/05704920902717872>.
- [145] J. A. Syage, Mechanism of  $[M+H]^+$  formation in photoionization mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15 (2004) 1521-1533, <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2004.07.006>.
- [146] A. Raffaelli, A. Saba, Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 22 (2003) 318-331, <https://doi.org/10.1002/mas.10060>.
- [147] F. J. Arrebola-Liébanas, R. Romero-González, A. Garrido Frenich, Applications in high resolution mass spectrometry: Food safety and pesticide residue analysis, Capítulo 1: HRMS: Fundamentals and basic concepts, Elsevier Inc., 2017, 1-14, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809464-8.00001-4>.
- [148] C. Li, S. Chu, S. Tan, X. Yin, Y. Jiang, X. Dai, X. Gong, X. Fang, D. Tian, Towards higher sensitivity of mass spectrometry: A perspective from the mass analyzers, *Front. Chem.* 9 (2021) 813359, <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.813359>.
- [149] J. F. García-Reyes, D. Moreno-González, R. Nortes-Méndez, B. Gilbert-López, and A. Molina Díaz, Applications in high resolution mass spectrometry: Food safety and pesticide residue analysis, Capítulo 2: HRMS: Hardware and software, Elsevier Inc., 2017, 15-57, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809464-8.00002-6>.
- [150] Z. Yang, Z. Ren, Y. Cheng, W. Sun, Z. Xi, W. Sun, Z. Xi, W. Jia, G. Li, Y. Wang, M. Guo, D. Li, Review and prospect on portable mass spectrometer for recent applications, *Vacuum* 199 (2022) 110889, <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2022.110889>.
- [151] A. Klassen, A. T. Faccio, G. A. B. Canuto, P. L. R. Cruz, H. C. Ribeiro, M. F. M. Tavares, A. Sussulini, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Chapter 1: Metabolomics: Definitions and significance in systems biology, Springer New York LLC, 2017, 3-14, [https://doi.org/10.1007/978-3-319-47656-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-47656-8_1).
- [152] K. Hollywood, D. R. Brison, R. Goodacre, *Metabolomics: Current technologies and future trends*, *Proteomics* 6 (2006) 4716-4723, <https://doi.org/10.1002/pmic.200600106>.
- [153] G. Carneiro, A. L. Radcenco, J. Evaristo, G. Monnerat, Novel strategies for clinical investigation and biomarker discovery: A guide to applied metabolomics, *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* 38 (2020) 20180045, <https://doi.org/10.1515/hmbci-2018-0045>.

- [154] W. J. Nash, W. B. Dunn, From mass to metabolite in human untargeted metabolomics: Recent advances in annotation of metabolites applying liquid chromatography-mass spectrometry data, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 120 (2019) 115324, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.11.022>.
- [155] E. Gorrochategui, J. Jaumot, S. Lacorte, R. Tauler, Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 82 (2016) 425-442, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.07.004>.
- [156] A. J. Chetwynd, W. B. Dunn, G. Rodriguez-Blanco, *Advances in experimental medicine and biology*, Capítulo 2: Collection and preparation of clinical samples for metabolomics, Springer, 2017, 19-44, [https://doi.org/10.1007/978-3-319-47656-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-47656-8_2).
- [157] A. Zhang, H. Sun, X. Wang, Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for disease: A systematic review, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 1239-1245, <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6117-1>.
- [158] B. Bojko, N. Reyes-Garcés, V. Bessonneau, K. Gorynski, F. Mousavi, E. A. S. Silva, J. Pawliszyn, Solid-phase microextraction in metabolomics, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 61 (2014) 168-180, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.07.005>.
- [159] M. Sindelar, G. J. Patti, Chemical discovery in the era of metabolomics, *J. Am. Chem. Soc.* 142 (2020) 9097-9105, <https://doi.org/10.1021/jacs.9b13198>.
- [160] A. Zhang, H. Sun, P. Wang, Y. Han, X. Wang, Modern analytical techniques in metabolomics analysis, *Analyst* 137 (2012) 293-300, <https://doi.org/10.1039/c1an15605e>.



# **CAPÍTULO I**

**ESTUDIO METABOLÓMICO DE CAPSAICINOIDES  
EN ORINA HUMANA MEDIANTE  
MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO-  
LÍQUIDO Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON  
ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA  
RESOLUCIÓN**

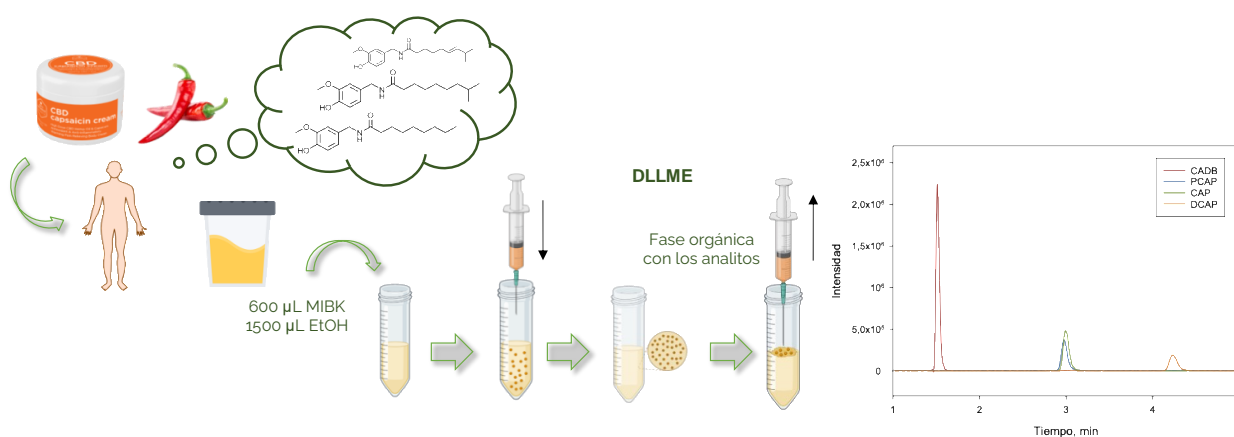




# ESTUDIO METABOLÓMICO DE CAPSAICINOIDES EN ORINA HUMANA MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN

## RESUMEN

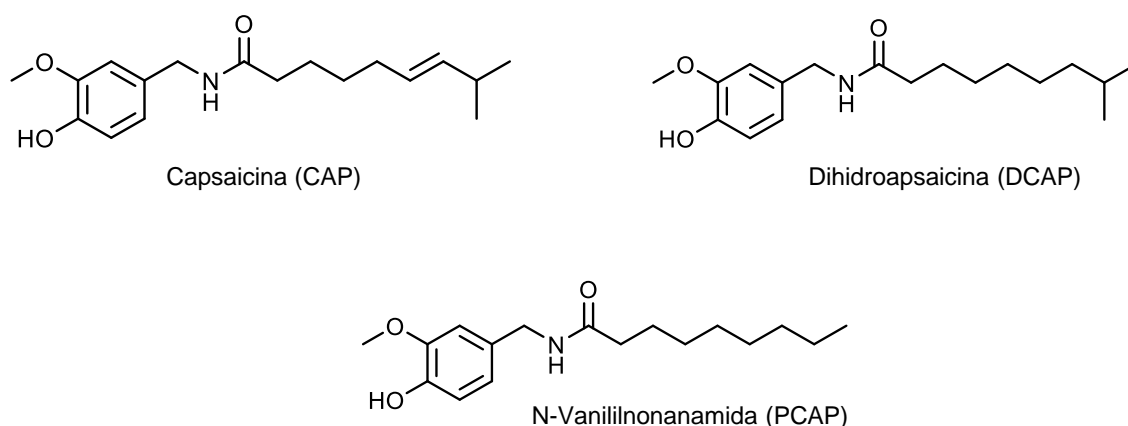
En este capítulo se propone un nuevo método analítico para la determinación de capsaicina (CAP), dihidrocapsaicina (DCAP) y N-vanililnonanamida (PCAP) en muestras de orina humana. La presencia de estos compuestos en orina puede ser indicativa de la administración por vía tópica de medicamentos basados en capsaicina, entre otras fuentes. Los analitos se preconcentran mediante microextracción dispersiva líquido-líquido añadiendo una mezcla compuesta por metil isobutil cetona (600  $\mu$ L, extractante) y etanol (1500  $\mu$ L, dispersante) a 7,5 mL de orina. El extracto orgánico enriquecido se evapora, se reconstituye en acetonitrilo y se analiza mediante cromatografía líquida con espectrometría de masas híbrida de cuadrupolo-tiempo de vuelo. La validación del método proporcionó límites de detección (LODs) de 8,0, 1,5 y 0,9  $\mu$ g/L para PCAP, CAP y DCAP, respectivamente. La aplicación del método al análisis de muestras de orina no reveló la presencia de ninguno de estos analitos en las muestras estudiadas. La detección mediante espectrometría de masas de alta resolución permitió también la búsqueda no dirigida de posibles metabolitos de los capsaicinoides de estudio.





## I.1. INTRODUCCIÓN

Los capsaicinoides son un grupo de compuestos de la familia de los alcaloides que se producen en diferentes plantas del género *Capsicum*, perteneciente a la familia Solanaceae y que se encuentran habitualmente en diferentes variedades de pimiento picante. La familia Solanaceae incluye un amplio número de compuestos estructuralmente relacionados. Entre ellos, CAP y DCAP son los capsaicinoides mayoritarios, con una abundancia de alrededor del 90% [1] (Figura I.1). Todos ellos presentan un anillo de 3-hidroxi-4-metoxi-bencilamida (vaniloide) en su estructura, pero difieren entre sí en la cadena alquílica hidrofóbica. Por ejemplo, CAP y DCAP se diferencian únicamente por la presencia de un doble enlace en su cadena lateral. Además, N-vanililnonanamida, también conocida como pseudocapsaicina (PCAP), pertenece al conocido como grupo de capsaicinoides minoritarios. PCAP comparte con CAP prácticamente la misma estructura, excepto por un doble enlace y un grupo metilo en la cadena de alquilo [2].



**Figura I.1.** Estructura química de los tres capsaicinoides estudiados.

Los capsaicinoides son los responsables de la acrimonia y de la sensación típica asociada a la ingesta de alimentos picantes, por lo que frecuentemente también se utilizan en la industria alimentaria como aditivos en preparaciones alimentarias para aportarles sabor, sensación picante y acritud. Adicionalmente, estos compuestos también presentan diversas actividades biológicas y farmacéuticas. La característica estructural responsable tanto del sabor picante como de la actividad biológica está asociada a la presencia de un enlace amida conectado a un anillo de vaniloide y a una cadena de acilo [3]. Farmacológicamente, los capsaicinoides se utilizan principalmente en el tratamiento del dolor de espalda, dolor neuropático periférico o la

osteoartritis entre otras dolencias debido a su acción analgésica. Se ha demostrado también que pueden actuar como agentes antiinflamatorios, antitumorales y antioxidantes [4-6]. Considerando estas propiedades terapéuticas, formulaciones comerciales de uso tópico en forma de cremas y lociones, cuyo contenido en CAP oscila entre 0,025-0,1% en peso, se utilizan ampliamente y de forma habitual en el tratamiento del dolor. La aplicación de concentraciones de CAP superiores al 8% en parches también está indicada en algunos casos en los que el dolor dura semanas [5, 7]. La administración de formulaciones basadas en CAP no está sujeta a ninguna prescripción especial de seguridad, además de que no se han descrito efectos adversos más allá de reacciones locales y transitorias como dolor suave, irritación o eritema. Sin embargo, por exposición a elevados niveles de capsaicinoides, proporcionados entre otras fuentes por sprays de pimienta, se han descrito otros efectos adversos como ceguera temporal, problemas cardiovasculares y respiratorios [8, 9].

En los últimos años, la determinación de capsaicinoides se ha llevado a cabo mediante diferentes técnicas, como cromatografía de gases (GC) [10, 11], cromatografía capilar electrocinética micelar (MECK) [12] y cromatografía líquida (LC), siendo esta última la más ampliamente utilizada. En cuanto a los métodos de detección, se han aplicado los basados en absorción ultravioleta (UV) [13, 14], diodos en serie (DAD) [15, 16] y fluorescencia (FLD) [17, 18], aunque la espectrometría de masas (MS) es de lejos el sistema de detección más comúnmente utilizado para la determinación de capsaicinoides mediante LC. Así, diferentes sistemas de MS como los basados en cuadrupolo simple (Q) [19], triple cuadrupolo (QqQ) [20-25] y MS de alta resolución (HRMS) [26-30], han sido acoplados a LC y aplicados principalmente al análisis de frutos del género *Capsicum* y otros alimentos relacionados [20-25, 27]. La combinación LC-HRMS ha demostrado su poder tanto para análisis cualitativo como cuantitativo, así como en estudios metabolómicos [31, 32]. La hibridación Q-Orbitrap se ha utilizado como analizador de HRMS en estudios sobre capsaicinoides [8, 27, 28], siendo para este propósito las aplicaciones de la combinación de Q con tiempo de vuelo (Q-TOF) significativamente menores [29].

Debido a la complejidad de las matrices biológicas y a sus niveles generalmente bajos de analitos, estas muestras requieren un tratamiento previo que incluye etapas de limpieza y preconcentración. Así, para la determinación de capsaicinoides en muestras de plasma y orina, se han aplicado tratamientos de muestra convencionales basados en extracción en fase sólida (SPE) [18, 19, 21, 27] y extracción líquido-líquido (LLE) [14, 20, 22-24]. Sin embargo, los tratamientos de muestra miniaturizados para matrices biológicas han ganado importancia debido a su potencial para la preconcentración y su carácter amigable con el medio ambiente, aumentando al mismo tiempo la velocidad de análisis [33-35]. A pesar de las demostradas

ventajas de estas técnicas, hasta donde se sabe, la bibliografía solo ofrece cuatro aplicaciones para la preconcentración de capsaicinoides, usando microextracción en fase sólida (SPME) para análisis de pimienta y salsas [11] y también de telas impregnadas de spray de defensa personal [10], extracción en fase sólida magnética para residuos de aceite [36], y microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) para pimienta [37]. Las técnicas de microextracción en fase líquida (LPME) son generalmente más rápidas y fáciles de aplicar que aquellas basadas en fase sólida. Entre las diferentes técnicas de LPME, destaca la DLLME ya que el equilibrio de partición de los analitos se alcanza de forma instantánea, se obtienen generalmente factores de preconcentración altos y no se precisa de un material especializado. La aplicación de la DLLME a muestras de orina es preferible a otros fluidos biológicos como sangre, suero o plasma en las que, debido a sus propiedades emulsionantes, se requieren normalmente de otros tratamientos previos. Además, la orina presenta otras ventajas relacionadas con su fácil accesibilidad en volúmenes grandes y, al igual que la sangre, se considera un fluido integrante ya que incorpora funciones y fenotipos de diferentes partes del cuerpo [33].

Así, en este capítulo, se desarrolla por primera vez un nuevo procedimiento analítico basado en DLLME con LC de ultra alta resolución (UHPLC) y Q-TOF-MS para la determinación de CAP, DCAP y PCAP en orina humana. La validación del método se aplicó al análisis de muestras tomadas de pacientes que habían sido tratados con medicamentos de uso tópico basados en CAP. Además, la aplicación de UHPLC-Q-TOF-MS bajo el modo de adquisición de datos no dirigido permitió investigar la posible presencia de metabolitos derivados de los capsaicinoides. De esta manera, la novedad de este estudio no solo concierne a la metodología analítica desarrollada, sino también al estudio metabolómico de capsaicinoides en orina humana.

## **I.2. PARTE EXPERIMENTAL**

### **I.2.1. REACTIVOS**

Los reactivos utilizados fueron de calidad analítica. CAP, DCAP y PCAP, así como el ácido ciclohexanocarboxílico 3,4-dimetoxibencilamida (CADB), utilizado como estándar interno (IS) fueron adquiridos en Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). Acetonitrilo (AcN) y metanol (MeOH), ambos de calidad cromatográfica, fueron proporcionados por Chem-Lab (Zedelgem, Belgium). Otros reactivos y disolventes, entre ellos, ácido fórmico, metil isobutil cetona (MIBK), etanol (EtOH), acetato de sodio, ácido acético y formiato amónico se obtuvieron de Merck KGaA. El agua utilizada se purificó previamente mediante un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

## I.2.2. PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES ESTÁNDAR

Las disoluciones patrón de cada uno de los analitos (CAP, DCAP y PCAP) de 500 mg/L se prepararon pesando 10 mg de cada uno de los compuestos y disolviéndolos en MeOH (20 mL) y se almacenaron a -20 °C en viales de vidrio. Las disoluciones de trabajo de cada analito a una concentración de 50 mg/L se prepararon diluyendo con agua y se almacenaron a 4 °C. La disolución del estándar interno, CADB, de 1000 mg/L se preparó en AcN y se almacenó también a -20 °C, mientras que su correspondiente disolución de trabajo de 100 mg/L se almacenó a 4 °C.

## I.2.3. INSTRUMENTACIÓN

Los análisis se llevaron a cabo haciendo uso de un sistema cromatográfico de ultra alta resolución acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución (UHPLC-HRMS) modelo Agilent 1290 Infinity II Series HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), equipado con una bomba binaria de alta velocidad y un módulo automático de multimuestreo, termostatzado a 5 °C, utilizado para la inyección de alícuotas de muestra de 20 µL. Estas muestras se colocaron en microinsertos de 250 µL de capacidad provistos de un pie polimérico y a su vez introducidos en viales de 2 mL. La separación de los analitos se llevó a cabo utilizando una columna de fase reversa Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 (100 mm x 2,1 mm, 1,8 µm) (Agilent, Waldbronn, Alemania) equilibrada a 25 °C. La elución de los analitos se realizó en modo isocrático haciendo uso de una fase móvil consistente en una mezcla 50:50 v/v de una disolución acuosa de ácido fórmico al 0,1% ajustada a pH 4,0 con formiato amónico 50 mM (disolvente A) y AcN conteniendo un 0,1% de ácido fórmico (disolvente B). La velocidad de flujo de la fase móvil fue de 0,4 mL/min. Bajo estas condiciones experimentales, los analitos eluyeron con tiempos de retención comprendidos entre 1,5 y 4,3 min (Tabla I.1).

La detección se llevó a cabo con un espectrómetro de masas Q-TOF Agilent 6550 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipado con un interfaz de electrospray Jet Stream Dual de Agilent (AJS-Dual ESI), operando en modo positivo. La presión del nebulizador de gas se ajustó a 40 psi, mientras que el flujo y la temperatura del gas de secado se fijaron a 16 L/min y 150 °C, respectivamente. Se aplicó para el gas envolvente un flujo de 12 L/min y una temperatura de 300 °C. Se establecieron voltajes de 4000, 400, 360 y 750 V para el capilar de nebulización, boquilla, fragmentador y octopolo 1 RF Vpp, respectivamente. El perfil de datos en el rango 50-1200  $m/z$  se adquirió para MS scans en un modo de rango dinámico extendido de 2 GHz con 3 espectros/s, 333,3 ms/espectro y 2675 transiciones/espectro. En cada ciclo, se aplicaron tres energías de colisión diferentes (0, 10 y 40 V). Se utilizó una masa de referencia

de 121,0509 para la corrección de masa durante los análisis. El análisis de los datos y el desarrollo del método se realizó con el software MassHunter Qualitative Analysis Navigator (Agilent Technologies, Revision B.08.00).

Las medidas de masa exacta de cada compuesto en los cromatogramas de iones totales (TICs) se obtuvieron usando un sistema de calibración automática que permitía también la corrección de masa. El equipo Q-TOF-MS llevó a cabo de forma automática la calibración interna de masa mediante una fuente de ionización dual que suministra el calibrante de forma automática, introduciendo un flujo desde fuera del cromatógrafo junto con la disolución de mezcla de referencia de calibración ES-TOF (Agilent) aplicada a un flujo muy bajo de alrededor de 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

Los análisis se realizaron haciendo uso de los cromatogramas de iones extraídos (EICs) proporcionados por las moléculas protonadas de cada analito, en una ventana de 0-5 ppm. La masa exacta de estas especies protonadas se utilizó con fines identificativos. Como señal analítica se empleó el área de los picos cromatográficos obtenidos de los EICs. Así, los valores de  $m/z$  teóricos y experimentales, como los iones cualificadores seleccionados para cada compuesto aparecen en la Tabla I.1. El error cometido en los valores de  $m/z$  experimental en relación con los valores teóricos se calculó en términos porcentuales como la diferencia entre las masas experimental y teórica dividido por el valor teórico y multiplicado por  $10^6$ .

Para el tratamiento de las muestras se utilizó un baño de agua termostático PRECISTERM (Grupo Selecta, España), una centrífuga EBA 20 (HettichZentrifugen, Tuttlingen, Alemania) y un sistema de evaporación/concentración automática XcelVap XCV-5400 (Biotage, Uppsala, Suecia). Los extractos de muestra se filtraron antes de proceder a su análisis cromatográfico usando filtros de membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (Análisis Vínicos S.L., España). Para el tratamiento de los datos, se utilizaron los programas informáticos Statgraphics Centurion XV.II, Minitab 19 y Sigmaplot 13.1 (Systat, Software INC., San Jose, CA).

**Tabla I.1.**

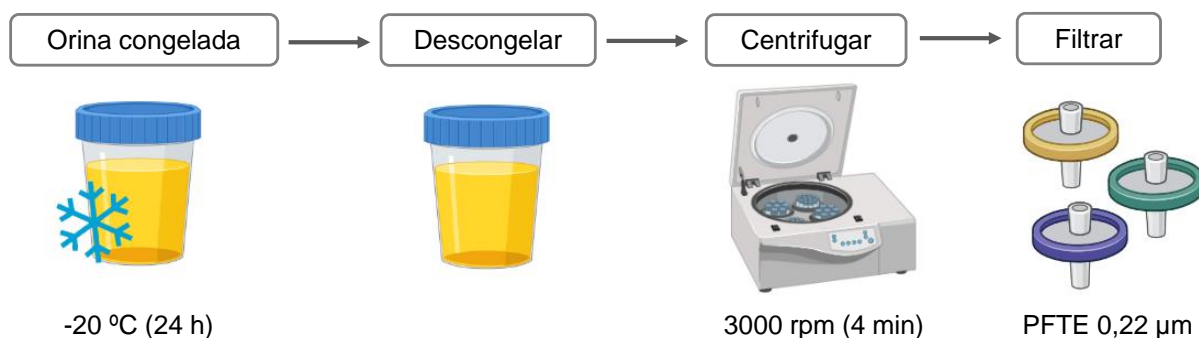
Parámetros UHPLC-Q-TOF-MS para los compuestos estudiados.

Parámetro	Analito			
	CADB	PCAP	CAP	DCAP
Fórmula molecular	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>3</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>3</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub>
t <sub>R</sub> (min)	1,52	2,94	3,02	4,29
m/z teórico	278,1752	294,2065	306,2065	308,2222
m/z experimental	278,1758	294,2069	306,2069	308,2226
Error (ppm)	2,16	1,36	1,31	1,30
Iones producto	151,0758	137,0606 170,1507	137,0600 182,1539	137,0598 184,1693

#### I.2.4. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras de orina se obtuvieron de 15 personas con edades comprendidas entre 5 y 59 años. Todos ellos presentaban dolor localizado y fueron tratados con lociones basadas en *Capsicum* en diferentes partes del cuerpo entre las que se incluye tobillo (2 muestras), muñeca (3 muestras), codo (1 muestra), rodilla (2 muestras) y brazo (1 muestra). Para las otras seis personas, la información relativa a qué parte del cuerpo fue tratada no estuvo disponible. Para la optimización y validación del método, se obtuvieron otras cinco muestras de orina de personas que no habían sido tratadas con cremas y lociones basadas en *Capsicum*. Todas las muestras se recogieron en recipientes de plástico estériles y se almacenaron a -20 °C durante un mínimo de 24 horas. Antes del análisis, las muestras se descongelaron, se centrifugaron a 3000 rpm durante 4 min y finalmente, el sobrenadante se filtró usando filtros de membrana PTFE de 0,22 µm de tamaño de poro (Figura I.2).

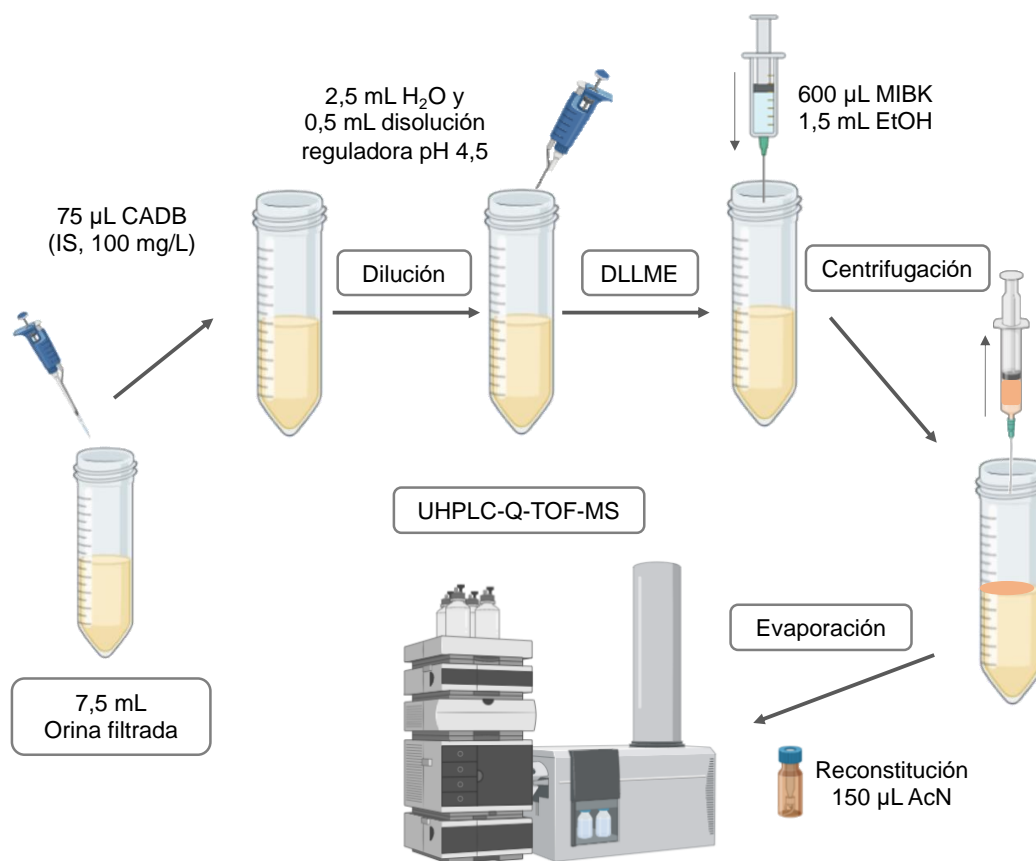




**Figura I.2.** Pretratamiento de las muestras de orina.

Para el procedimiento de DLLME (Figura I.3), en un tubo de centrifuga de 15 mL se colocaron 7,5 mL de orina, 75  $\mu\text{L}$  de CADB (100 mg/L) y 2,5 mL de agua. El pH se ajustó a 4,5 añadiendo 500  $\mu\text{L}$  de una disolución reguladora de acetato de sodio/ácido acético 0,1 M. A continuación, se inyectó vigorosamente en la disolución de la muestra una mezcla conteniendo 600  $\mu\text{L}$  de MIBK (disolvente extractante) y 1,5 mL de EtOH (agente disperante). Se observó una dispersión de gotas muy pequeñas de MIBK a través de la fase acuosa, en las que se extrajeron los analitos. Después de centrifugar la mezcla ternaria de disolventes durante 5 min a 3000 rpm, se recogió la fase orgánica de MIBK (aproximadamente 200  $\mu\text{L}$ ) de la parte superior del tubo, se transfirió a un vial de vidrio y se evaporó bajo una corriente suave de aire. Finalmente, el extracto seco se reconstituyó en 150  $\mu\text{L}$  de AcN, de los cuales, 20  $\mu\text{L}$  se inyectaron en el sistema cromatográfico.

Los procedimientos involucrando la participación de seres humanos se realizaron en conformidad con los estándares éticos. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética en la Investigación de la Universidad de Murcia (Informe favorable: 2908/2020).



**Figura I.3.** Procedimiento DLLME para la preconcentración de capsaicinoides en orina.

## I.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

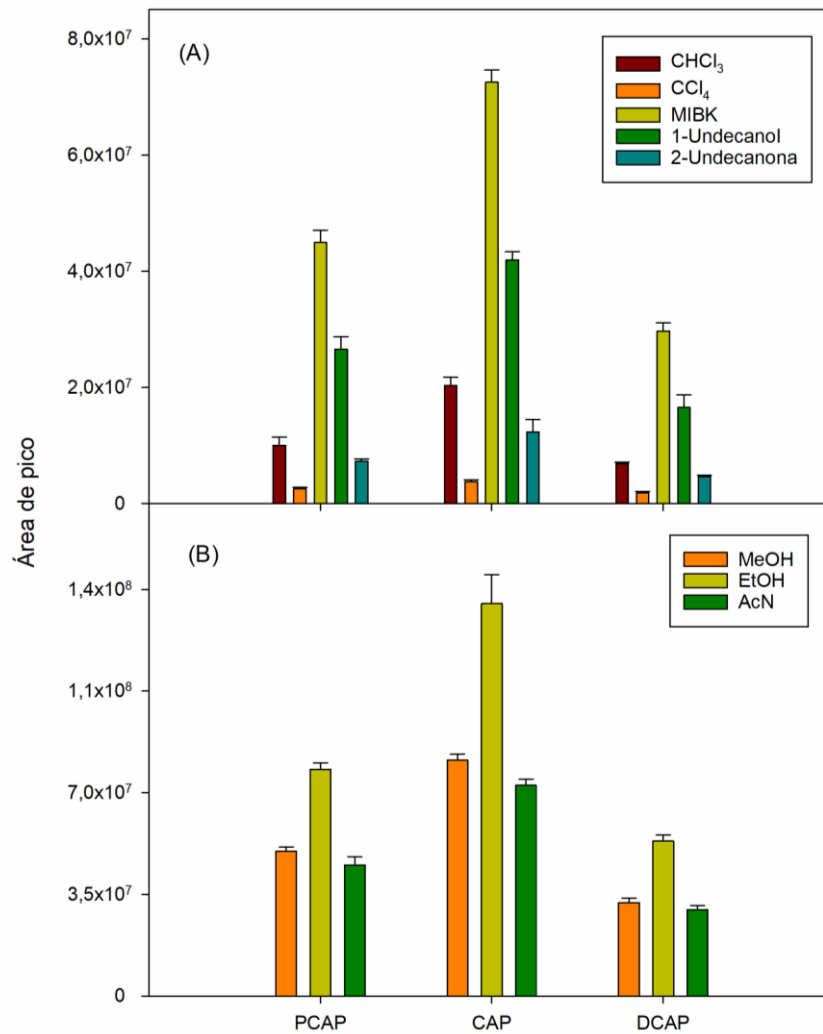
### I.3.1. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN UHPLC

Los experimentos preliminares se llevaron a cabo haciendo uso de una columna Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 (100 mm x 2,1 mm, 1,8 µm) y aplicando un modo de elución isocrático con una fase móvil compuesta por una mezcla de una disolución reguladora de formiato de amonio/ácido fórmico de pH 4 y 50 mM (disolvente A) y AcN conteniendo un 0,1% de ácido fórmico (disolvente B) en las proporciones 40:60, 50:50 y 60:40 v/v A:B, con un caudal de 0,4 mL/min. Debido a que no se consiguió la separación de CAP y PCAP bajo ninguna de las condiciones experimentales aplicadas, se estudió la capacidad de separación de una fase estacionaria proporcionando mecanismos de separación de C18 y pentafluorofenil (PFP), que presumiblemente aportaría una mayor eficiencia de separación, usando una columna ACE Excel 3 C18-PFP (150 mm x 4,6 mm, 3 µm). Se observó una mayor retención de los analitos, alargando el tiempo de análisis, y además CAP y PCAP permanecieron sin separarse bajo las diferentes fases móviles mencionadas anteriormente. En consecuencia, se seleccionó la columna Zorbax

considerando que el sistema de detección usado permite la identificación y cuantificación individual de CAP y PCAP aunque sus picos se solapen, y además, el análisis cromatográfico implica una menor duración. Finalmente, las condiciones adoptadas fueron una mezcla 50:50 v/v A:B con una velocidad de flujo de 0,4 mL/min. Bajo estas condiciones, se obtuvieron tiempos de retención de 2,94, 3,02 y 4,29 min para PCAP, CAP y DCAP, respectivamente (Tabla I.1). Se seleccionó el modo de ionización positiva en la fuente ESI, basándonos en trabajos previamente publicados [22, 25, 27, 30].

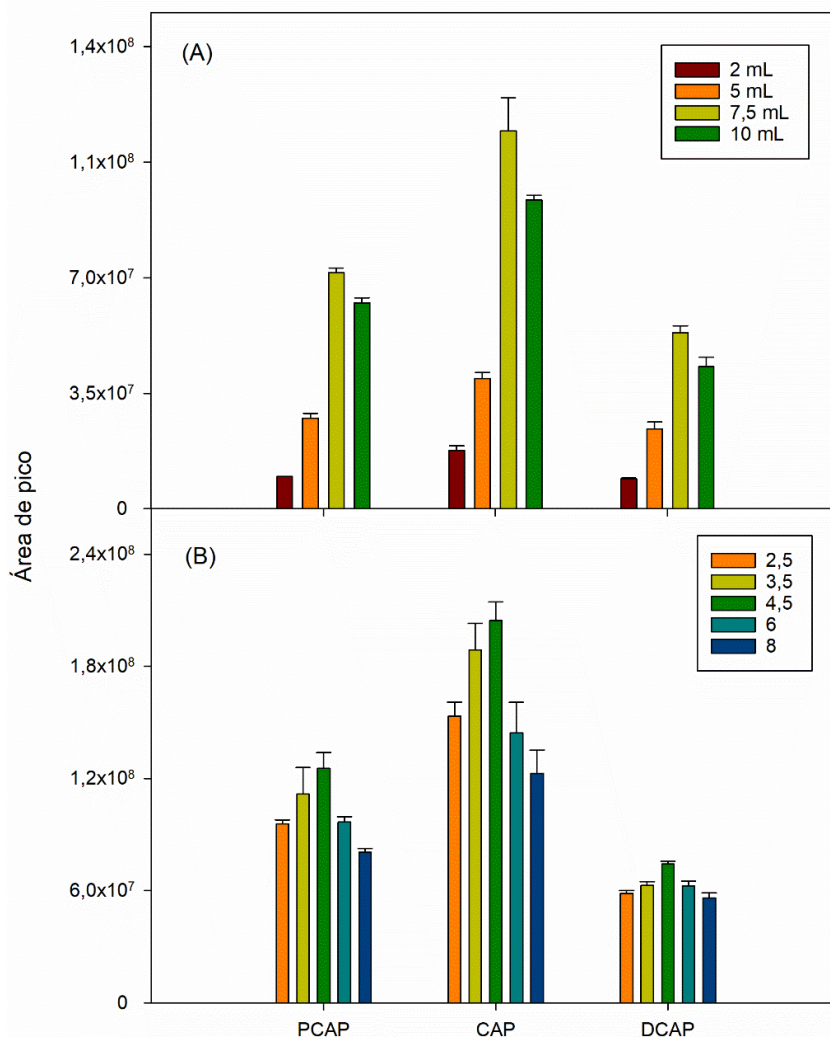
### **I.3.2. OPTIMIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DLLME**

La influencia de las diferentes variables que afectan al proceso de microextracción se estudió utilizando 7,5 mL de orina fortificada con los analitos a una concentración de 0,5 µg/mL y diluida hasta 10 mL con agua. Los disolventes más apropiados para ser utilizados como extractante y dispersante se seleccionaron mediante estudios univariantes. En cuanto al disolvente extractante, se requiere de este que posea una elevada capacidad de extracción, así como otras propiedades entre las que se encuentran una elevada solubilidad en la fase dispersante pero baja en la fase acuosa, baja volatilidad y un buen comportamiento cromatográfico. Así, se ensayaron disolventes orgánicos más densos (tetracloruro de carbono y cloroformo) y menos densos (1-undecanol, 2-undecanona y MIBK) que el agua. Para ello, se mezclaron 600 µL de cada uno de los disolventes anteriores con 1 mL de AcN, actuando como disolvente dispersante, y la mezcla se inyectó rápidamente en la disolución de la muestra. Como se observa en la Figura I.4A, los mejores resultados para los tres analitos se obtuvieron con MIBK, por lo que fue el agente extractante seleccionado, evitando así el uso de disolventes orgánicos halogenados. Como posibles disolventes dispersantes, se probaron AcN, MeOH y EtOH que cumplen el requisito de ser miscibles tanto con la fase extractante como con la acuosa. La Figura I.4B muestra que, para los tres capsaicinoides estudiados, la mayor sensibilidad se alcanza cuando se utilizó EtOH como dispersante, por lo que este fue seleccionado.



**Figura I.4.** Efecto de la naturaleza (A) del disolvente extractante y (B) del disolvente dispersante en la eficiencia de extracción del procedimiento DLLME para los analitos seleccionados.

Para la selección del volumen óptimo de muestra se realizaron cuatro ensayos usando 2, 5, 7,5 y 10 mL de orina. En todos los casos, el volumen final de fase acuosa se completó hasta 10 mL con agua. Al aumentar el volumen de orina de 2 a 7,5 mL, se obtuvo un incremento significativo en la señal analítica, mientras que cuando se usaron 10 mL de orina, la sensibilidad disminuyó para los tres analitos (Figura I.5A). La influencia del pH de la muestra se estudió en el rango 2,5-8 utilizando disoluciones reguladoras de acetato y fosfato 0,1 M. Como se observa en la Figura I.5B, a pH básico la eficiencia del proceso de extracción se ve negativamente afectada, mientras que la máxima sensibilidad se alcanzó a pH 4,5. Por ello todas las muestras se ajustaron a este valor de pH usando una disolución reguladora de acetato de sodio 0,1 M.



**Figura I.5.** Efecto del (A) volumen de muestra y (B) pH de la disolución dadora en la eficiencia del procedimiento DLLME para los analitos estudiados.

Para estudiar la influencia de los volúmenes de agente extractante y dispersante, así como la fuerza iónica de la fase acuosa en la eficiencia de la microextracción, se utilizó un método de diseño Taguchi, aplicando un diseño de matriz ortogonal (OAD) para los tres factores, los cuales se estudiaron en los siguientes intervalos: volumen de MIBK (0,6-1,5 mL), volumen de EtOH (0,75-1,5 mL) y concentración de sal (0-5% m/v) (Tabla I.2). El método OAD propuesto consistió en la realización de nueve ensayos diferentes. Cada ensayo se realizó por duplicado. Los resultados obtenidos muestran que la eficiencia de la extracción disminuyó a medida que se incrementa el volumen de agente extractante, probablemente debido al efecto de la dilución. Por tanto, se seleccionó el volumen de MIBK más bajo de los tres estudiados, es decir, 600  $\mu$ L. No se ensayaron volúmenes más bajos de 600  $\mu$ L debido a la dificultad que revestía la recuperación de la fase orgánica enriquecida.

El incremento en el volumen del disolvente dispersante dentro del rango 0,75-1,5 mL no produjo variación significativa en los resultados, aunque los valores más altos de área de pico se obtuvieron con 1,5 mL de EtOH, por lo que este volumen fue finalmente seleccionado. Con respecto a la fuerza iónica, los mejores resultados se obtuvieron en ausencia de sal. Por tanto, se descartó su adición a la fase acuosa.

**Tabla I.2.**

Parámetros estudiados en el método Taguchi.

Factor	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
Volumen MIBK ( $\mu\text{L}$ )	600	1000	1500
Volumen EtOH ( $\mu\text{L}$ )	750	1200	1500
Concentración de NaCl (% m/v)	0	2	5

### I.3.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Con la finalidad de validar el método propuesto, se obtuvieron los valores de los parámetros de intervalos de linealidad, límites de detección (LODs) y de cuantificación (LOQs), así como el efecto matriz y los factores de enriquecimiento (EFs). Como estándar interno (IS), se seleccionó CADB, una vez comprobada su ausencia en las muestras analizadas, debido a que presenta una estructura química similar a la de los capsaicinoides analizados, ya que incorpora también en su estructura el anillo de vanililo y el enlace amida [18]. Además, este compuesto también se transfirió a la fase de MIBK en la etapa de DLLME y mostró un comportamiento cromatográfico similar al de los analitos. Aplicando las condiciones seleccionadas, CADB eluyó a un tiempo de retención de 1,52 min.

La respuesta en la detección de los analitos se puede ver afectada por la coextracción de ciertas sustancias presentes en las muestras. Se estudió el posible efecto matriz comparando las pendientes de las rectas de calibrado obtenidas usando estándares acuosos y aquellas obtenidas aplicando el método de adiciones estándar a tres muestras de orina de diferentes individuos. En todos los casos, se representó la relación entre el área de pico analítico y el área del pico del IS frente a la concentración de analito, utilizando para ello, siete niveles de concentración dentro del rango 10-500  $\mu\text{g/L}$ . En todos los casos, los valores obtenidos para el coeficiente de correlación se situó por encima de 0,996. Los resultados mostraron que la matriz interfería suprimiendo la señal analítica de los tres analitos, obteniéndose diferencias significativas entre las pendientes de la calibración acuosa y las de adición estándar a las

muestras. Sin embargo, cuando se aplicó el test estadístico ANOVA de un factor para la comparación de las pendientes de la curva de calibración de las diferentes orinas utilizadas, no se encontraron diferencias significativas y los valores de “p” se hallaron en todos los casos dentro del rango 0,06-0,22. En consecuencia, la cuantificación de las muestras se llevó a cabo usando el método de calibración con matriz modelo (*matrix-matched calibration*).

Para establecer la sensibilidad del método, se calcularon los LODs y LOQs aplicando el criterio de la relación señal-ruido (S/N) de 3 y 10, respectivamente. Los valores obtenidos se encontraron en los intervalos de 0,9-8,0 y 3,3-27 µg/L para LODs y LOQs, respectivamente (Tabla I.3). La repetibilidad se evaluó utilizando la desviación estándar relativa (RSD) de las áreas de pico de los analitos para una serie de siete análisis consecutivos de una orina fortificada a 50 µg/L. Se obtuvieron valores de RSD comprendidos entre 8,7 y 9,0%. El uso del IS mejoró la repetibilidad, proporcionando valores de RSD en el rango 2,8-7,8% (Tabla I.3). El EF de cada analito se calculó como la relación entre las pendientes de las curvas de calibración para el método DLLME-UHPLC-Q-TOF-MS y las obtenidas en ausencia de preconcentración. Los resultados obtenidos fueron 64, 61 y 60 para PCAP, CAP y DCAP, respectivamente (Tabla I.3).

**Tabla I.3.**

Características analíticas del método DLLME con UHPLC-Q-TOF-MS optimizado.

Compuesto	EF	RSD <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>a,b</sup> (%)	LOD <sup>c</sup> (µg/L)	LOQ <sup>d</sup> (µg/L)
PCAP	64	9,0	4,0	8,0	27
CAP	61	8,9	2,8	1,5	5,0
DCAP	60	8,7	7,6	0,9	3,3

<sup>a</sup> n = 7. <sup>b</sup> Considerando el IS

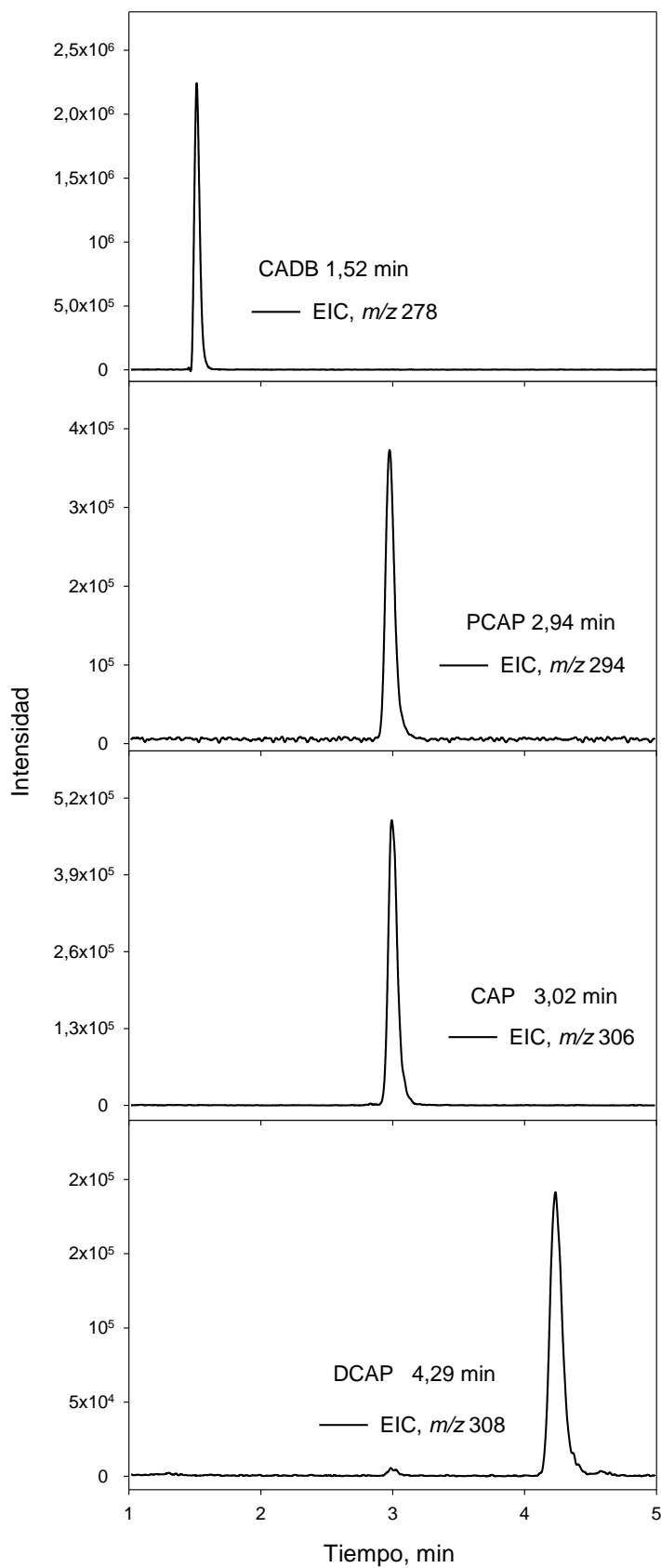
<sup>c</sup> Calculado para S/N = 3

<sup>d</sup> Calculado para S/N = 10

La Figura I.6 muestra los EICs obtenidos para una muestra de orina fortificada con los analitos a un nivel de concentración de 100 µg/L aplicando el método desarrollado basado en DLLME con UHPLC-Q-TOF-MS. El método optimizado se aplicó al análisis de quince muestras diferentes de orina de personas tratadas con lociones a base de CAP en diferentes partes del cuerpo. Los resultados obtenidos mostraron la ausencia de los tres analitos (CAP, PCAP y DCAP) en todas las muestras analizadas, al menos a concentraciones por encima de sus correspondientes LODs.

La Tabla I.4 muestra una comparación del método propuesto con otros previamente publicados en la bibliografía en los que también se aborda la determinación de capsaicinoides en muestras de orina. Es de destacar que hasta el momento no se ha propuesto ningún método para determinación de capsaicinoides en orina implicando tratamientos de muestra basados en técnicas miniaturizadas. El procedimiento DLLME desarrollado en este Capítulo requiere un tiempo de análisis significativamente más bajo, siguiendo además las directrices de la química analítica verde, a diferencia de las técnicas clásicas como la SPE para la que se necesita un volumen de disolvente orgánico considerablemente mayor.





**Figura I.6.** Cromatogramas de iones extraídos (EICs) para los capsaicinoides estudiados y el IS en una muestra de orina fortificada a 100  $\mu\text{g/L}$ .

**Tabla I.4.** Comparación del método DLLME con UHPLC-Q-TOF-MS propuesto con otros previamente publicados para la determinación de capsaicinoides en orina.

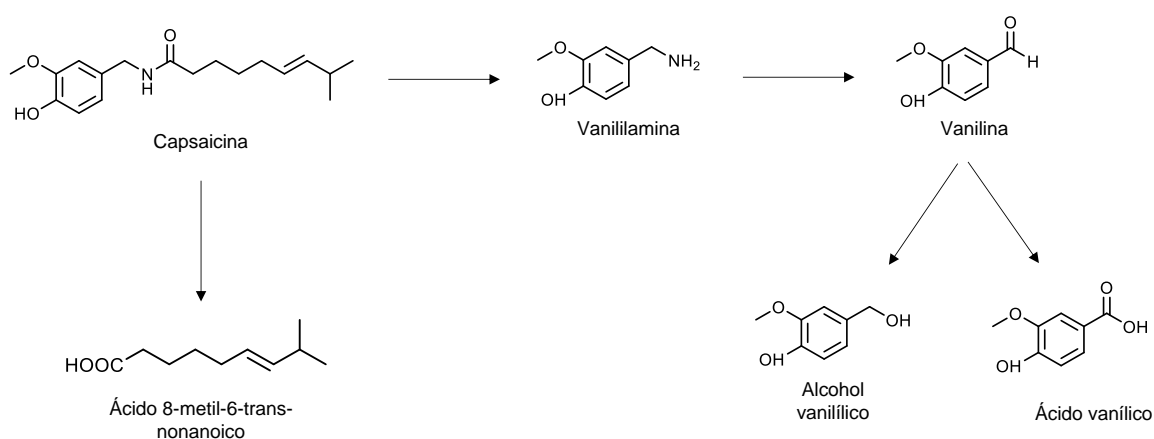
Analitos	Muestra	Tratamiento de la muestra		Análisis instrumental	LOD ( $\mu\text{g/L}$ )	RSD (%)	Ref.
		Procedimiento	Consumo de disolventes orgánicos				
CAP-G	Orina de rata (1 mL)	Hidrólisis enzimática y SPE	8,5 mL (AcN)	HPLC-Q-ESI+	0,1	6,3 (n=5)	[19]
CAP	Orina y suero de rata	LLE en tres etapas con EtAc	No se especifica	HPLC-UV	5	<1,02 (n=6)	[13]
CAP y CAP-G en análisis de multi drogas	Orina de caballo (6 mL)	SPE	3 mL hexano, 0,5 mL diisopropil eter, 3 mL $\text{CHCl}_3$ , 0,05 mL MeOH	UHPLC-QqQ-ESI+	0,075	0,06 (n=10)	[21]
CAP en análisis multi-drogas	Orina de caballo (3 mL)	Hidrólisis enzimática y SPE en línea	Alrededor de 6,5 mL MeOH	UHPLC-Q-Orbitrap HESI+	2,5	10,6 (n=6)	[27]
CAP, DCAP y PCAP	Orina humana (7,5 mL)	DLLME	1,5 mL EtOH, 0,6 mL MIBK, 0,15 mL AcN	UHPLC-Q-TOF-ESI+	1,5, 0,9, 8	2,8-4 (n=7)	Este trabajo

AcEt: acetato de etilo. G: glucuronido, HESI: ionización por electrospray con calor (*Heated Electrospray Ionization*)

### I.3.4. ANÁLISIS NO DIRIGIDO

Con la finalidad de identificar posibles metabolitos derivados de capsaicinoides y otros compuestos relacionados, se llevó a cabo un análisis no dirigido de los datos utilizando la masa exacta, patrón isotópico y los datos de fragmentación. Este estudio se llevó a cabo posteriormente a la adquisición de datos iniciales. Para ello, se creó una base de datos en la que se incluían 80 compuestos, todos ellos resultantes de diferentes procesos metabólicos descritos en la literatura para los capsaicinoides, así como otros compuestos relacionados (Tabla I.5).

Los principales metabolitos de CAP, DCAP y PCAP son alcohol vanilílico, vanilina, ácido vanílico, vanililamina y ácido 8-metil-6-*trans*-nonanoico [19, 38]. Estos metabolitos son comunes para los tres compuestos monitorizados en análisis dirigido debido al núcleo de vanililo de su estructura que es el mismo para todos ellos. La Figura I.7 muestra las estructuras químicas de estos metabolitos. Aunque en la Figura I.7 pudiera parecer que derivan solamente de CAP, en realidad se pueden obtener también a partir de DCAP y PCAP dado que en este caso lo que se modifica es el núcleo de vanililo y no la cadena alquílica que es donde residen las diferencias estructurales entre los tres analitos. A su vez, cada uno de estos compuestos es susceptible de conjugarse a otras biomoléculas en función de su biodisponibilidad en el organismo, pero esa es una opción que no se ha contemplado en este Capítulo.



**Figura I.7.** Estructura química de los metabolitos comunes a CAP, DCAP y PCAP.

Así pues, dado que las diferencias entre los CAP, DCAP y PCAP se encuentran en la cadena de alquilo, darán lugar a metabolitos específicos para cada compuesto a partir de la biotransformación dentro del organismo. La Tabla I.5 muestra los códigos utilizados para nombrar e identificar cada uno de los metabolitos posibles. Así, los nombres incluyen las letras “a”, “b” y “c” para referirse a CAP, DCAP y PCAP, respectivamente. Los números hacen referencia a la ruta metabólica que conduce a la formación de cada metabolito: deshidrogenación alifática con formación de anillo (M1),  $\omega$ -hidroxilación (M2),  $\omega$ -1-hidroxilación (M3), deshidrogenación alifática (M4), hidroxilación aromática (M5 y M7), O-demetilación (M6), N-deshidrogenación y oxigenación de anillo (M8), N-deshidrogenación (M9), O-demetilación y deshidrogenación alquíllica previo a macrociclación (M10), O-demetilación y deshidrogenación alquíllica (M11), O-demetilación y  $\omega$ -hidroxilación (M12), hidroxilación aromática y  $\omega$ -1-hidroxilación (M13 y M14), hidroxilación y deshidrogenación alquíllica (M15), hidroxilación aromática y deshidrogenación alquíllica previo a macrociclación (M16 y M17), hidroxilación aromática y  $\omega$ -deshidrogenación (M18 y M19) [8, 39, 40].

Además de estas vías metabólicas, existen otras posibilidades, como la conjugación a biomoléculas. La molécula de glutatión (GSH) puede conjugarse con un amplio número de moléculas, por lo que la formación de metabolitos GSH-capsaicinoides es otra posibilidad concebible de biotransformación metabólica. Para cada analito se han buscado tres conjugados GSH basados en los localizados previamente en la bibliografía [8]. Los códigos utilizados en la nomenclatura de estos compuestos siguen el mismo patrón que los mencionados con anterioridad: “a”, “b” y “c” para referirse al analito precursor. Los analitos pueden incorporar en su estructura una (GSH11 y GSH12) o dos moléculas de GSH (GSH13) en su anillo aromático. GSH11 y GSH12 difieren en la naturaleza de los sustituyentes del anillo aromático. GSH11 presenta dos grupos hidroxilo mientras que GSH12 tiene dos grupos hidroxilo y un grupo metoxi.

**Tabla I.5.**

Compuestos relacionados con los capsaicinoides monitorizados bajo análisis no dirigido.

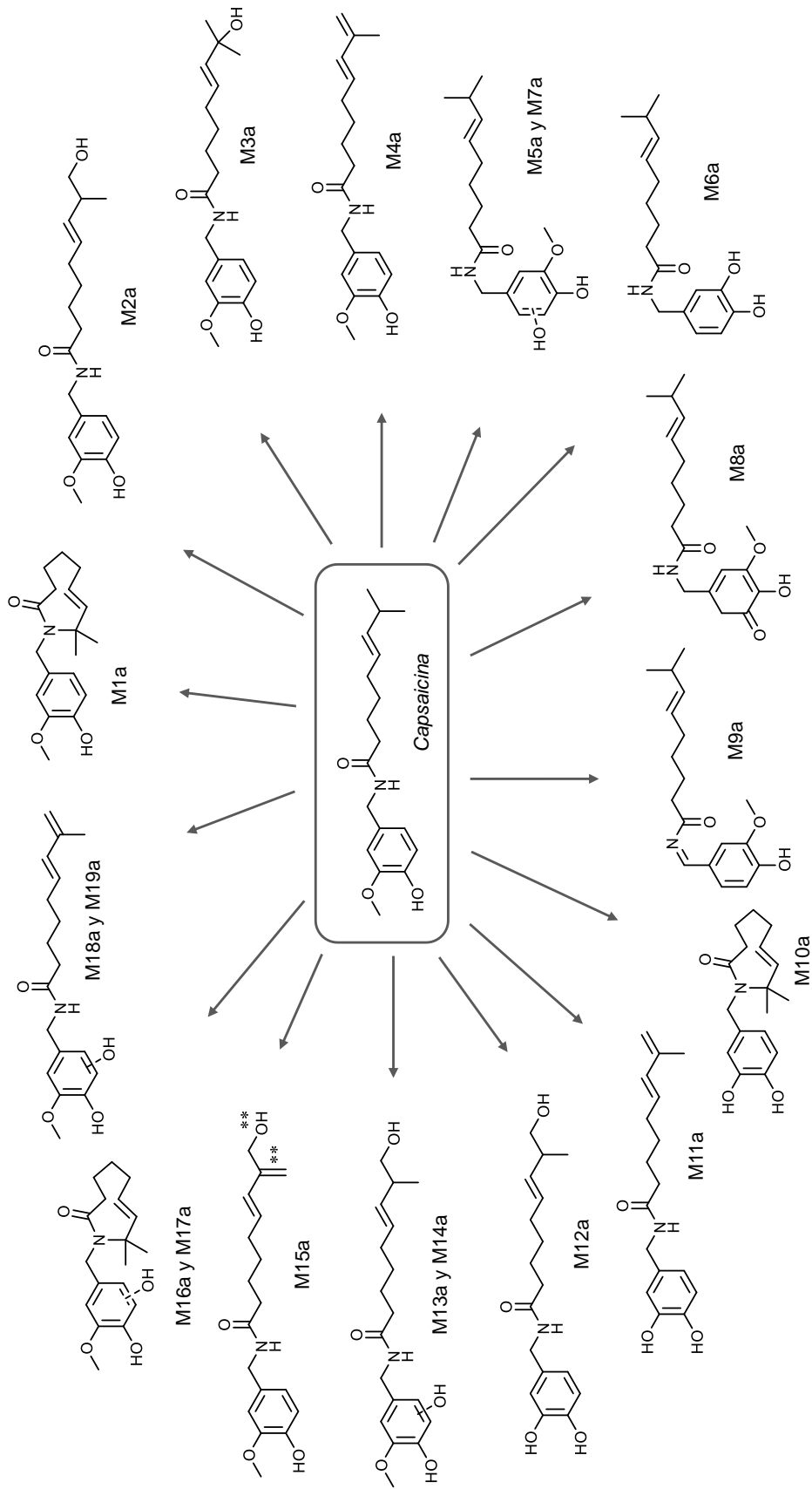
Compuesto	Fórmula molecular	Masa exacta [M+H] <sup>+</sup>
Nordihidrocapsaicina	C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>3</sub>	294,2065
Homocapsaicina	C <sub>19</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub>	319,2147
Homodihidrocapsaicina	C <sub>19</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>3</sub>	322,2383
Alcohol vanilílico	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	155,0709
Vanilina	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	153,0552
Ácido vanílico	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	169,0502
Vanililamina	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	154,0869
Ácido 8-metil-6- <i>trans</i> -nonanoico	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	170,1306
Dímero CAP	C <sub>36</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	609,3904
CAP-G	C <sub>24</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>9</sub>	481,3229
PCAP-G	C <sub>23</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>9</sub>	469,3229
DCAP-G	C <sub>24</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>9</sub>	483,3385
CAP-S	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NSO <sub>6</sub>	386,1637
PCAP-S	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NSO <sub>6</sub>	374,1637
DCAP-S	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> NSO <sub>6</sub>	388,1794
M1a, M4a, M9a	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>3</sub>	304,1913
M2a, M3a, M5a, M7a, M8b, M15b, M16b, M17b, M18b, M19b	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>4</sub>	322,2019
M6a, M10b, M11b, M1c, M4c, M9c	C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>3</sub>	292,1913
M8a, M15a, M16a, M17a, M18a, M19a	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>4</sub>	320,1862
M10a, M11a	C <sub>17</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub>	290,1756
M12a, M8c, M15c, M16c, M17c, M18c, M19c	C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>4</sub>	308,1862
M13a, M14a	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>5</sub>	338,1968
GSH11a	C <sub>27</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>10</sub> S	613,2544
GSH12a	C <sub>28</sub> H <sub>42</sub> N <sub>4</sub> O <sub>11</sub> S	643,2649
GSH13a	C <sub>38</sub> H <sub>57</sub> N <sub>7</sub> O <sub>16</sub> S <sub>2</sub>	932,3376
M1b, M4b, M9b	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>3</sub>	306,2069
M2b, M3b, M5b, M7b	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>4</sub>	324,2175
M6b	C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>3</sub>	294,2069
M12b, M2c, M3c, M5c, M7c	C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>4</sub>	310,2019
M13b, M14b	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>5</sub>	340,2124

**Tabla I.5. (Continuación)**

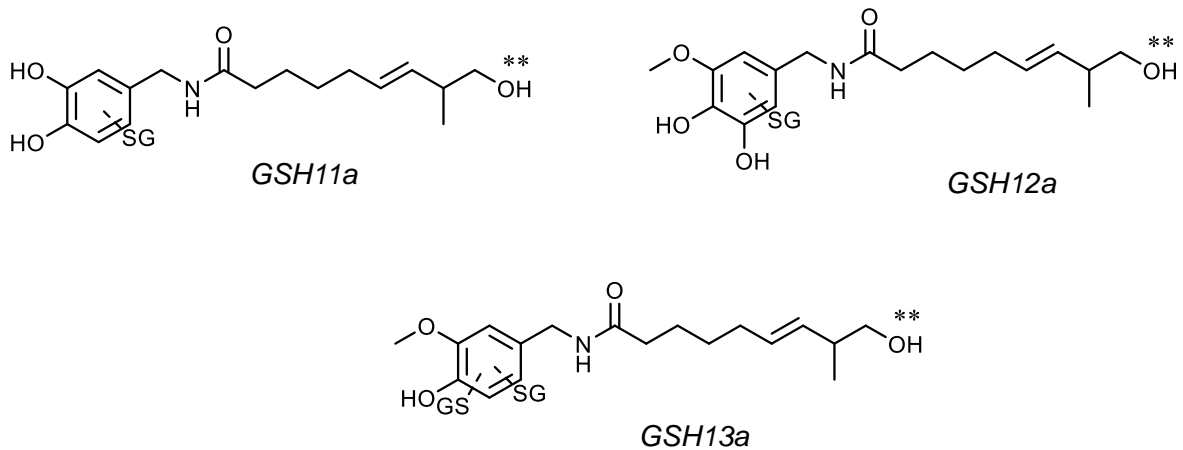
Compuestos relacionados con los capsaicinoides monitorizados bajo análisis no dirigido.

Compuesto	Fórmula molecular	Masa exacta [M+H] <sup>+</sup>
GSH11b	C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> N <sub>4</sub> O <sub>10</sub> S	615,2700
GSH12b	C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> N <sub>4</sub> O <sub>11</sub> S	645,2807
GSH13b	C <sub>38</sub> H <sub>59</sub> N <sub>7</sub> O <sub>16</sub> S <sub>2</sub>	934,3534
M6c	C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>3</sub>	280,1913
M10c, M11c	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub>	278,1756
M12c	C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>4</sub>	296,1862
M13c, M14c	C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>5</sub>	326,1968
GSH11c	C <sub>26</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>10</sub> S	601,2431
GSH12c	C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> N <sub>4</sub> O <sub>11</sub> S	631,2537
GSH13c	C <sub>37</sub> H <sub>57</sub> N <sub>7</sub> O <sub>16</sub> S <sub>2</sub>	920,3269

La Figura I.8 muestra un esquema con las estructuras químicas de los diferentes metabolitos descritos en bibliografía para los capsaicinoides. Concretamente, en la imagen se muestran los derivados de CAP aunque sus análogos para DCAP y PCAP mantendrían la misma sección aromática, diferenciándose únicamente en la cadena alquílica. Como muestra la Figura I.8, a algunas estructuras le corresponden dos nombres debido a que la estructura base es la misma para los dos metabolitos, con la excepción de que difieren en la posición del grupo hidroxilo como sustituyente del anillo aromático. La Figura I.9 muestra las estructuras de los tres posibles GSH-conjugados de CAP. Nótese que en esta Figura, solo se representan los tres derivados de CAP. En el caso de sus análogos derivados de DCAP y PCAP, el núcleo aromático de la molécula permanecería igual y solo se modificaría la cadena lateral en función si se trata de un metabolito derivado de DCAP o de PCAP. Además, el doble asterisco sobre el grupo hidroxilo indica que la posición exacta del sustituyente no está determinada.



**Figura I.8.** Esquema de los metabolitos derivados de CAP.

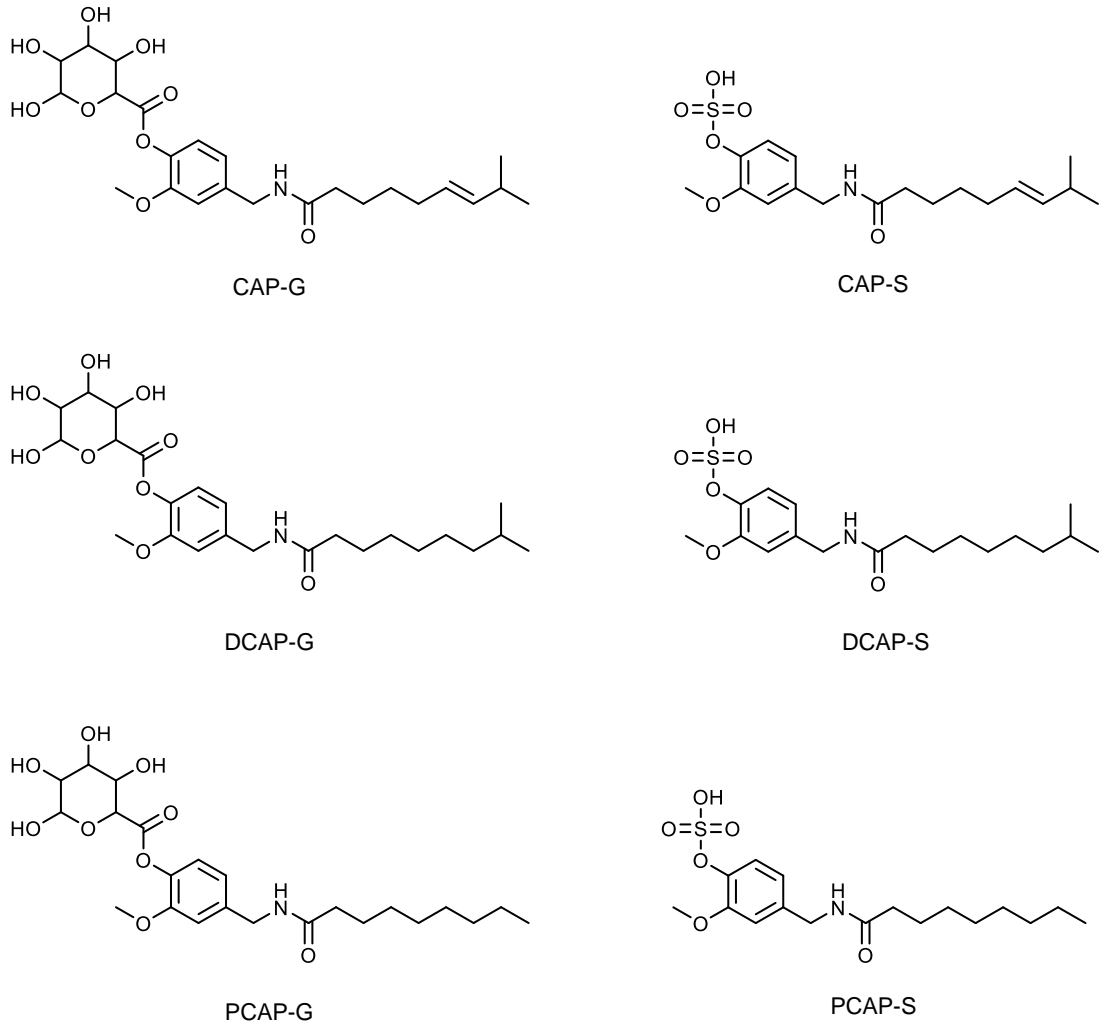


**Figura I.9.** Estructura química de los tres posibles metabolitos obtenidos por conjugación con la molécula de glutatión.

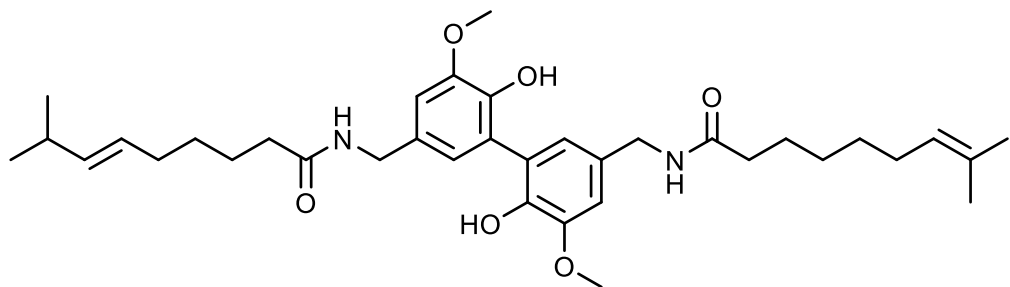
También se estudió la posibilidad de formación de los conjugados glucurónidos (G) y sulfonados (S) (Figura I.10). Los conjugados glucurónidos (CAP-G, DCAP-G y PCAP-G) se obtienen cuando se forma un enlace O-glicosídico entre el analito, en este caso los capsaicinoides, y una molécula de glucurónido [41]. Por otro lado, los conjugados sulfonados se forman cuando una molécula de sulfato se enlaza al grupo hidroxilo del anillo aromático de los capsaicinoides, eliminando una molécula de agua.

Además, se monitorizaron también otros tres compuestos, estructuralmente relacionados con los capsaicinoides, denominados nordihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina [42]. Finalmente, también se estudió la posibilidad de formación del dímero de capsacinina, incluyéndose también en la búsqueda (Figura I.11). Como resultado de los análisis no dirigidos, se puede concluir que no se detectó ninguno de los metabolitos bajo las condiciones experimentales estudiadas.





**Figura I.10.** Estructura química de los metabolitos glucurónidos y sulfonados de CAP, DCAP y PCAP, respectivamente.



**Figura I.11.** Estructura química del dímero de capsaicina.

## I.4. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un método basado en DLLME para la determinación de tres capsaicinoides empleando UHPLC-Q-TOF-MS. La elevada eficiencia de preconcentración proporcionada por la técnica DLLME, aplicada por primera vez a la determinación de CAP, DCAP y PCAP en orina, permitió proponer un procedimiento de tratamiento de muestra rápido y sensible, implicando un muy bajo consumo de disolventes orgánicos de además menor toxicidad que los que normalmente se utilizan, como los clorados. La ausencia de diferencias significativas entre las pendientes de calibración para las diferentes muestras de orina estudiadas permitió utilizar el método de calibración con matriz modelo con fines cuantificativos. La detección mediante HRMS utilizando la hibridación Q-TOF permitió la identificación inequívoca de los analitos, así como la investigación de los posibles metabolitos de los capsaicinoides en las muestras.

## I.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. S. Antonio, L. S. M. Wiedemann, V. F. Veiga Jr., The genus: Capsicum: A phytochemical review of bioactive secondary metabolites, *RSC Adv.* 8 (2018) 25767-25784, <https://doi.org/10.1039/c8ra02067a>.
- [2] A. S. Antonio, L. S. M. Wiedemann, V. F. Veiga Jr., Food Pungency: The evolution of methods for capsaicinoid analysis, *Food Anal. Methods* 12 (2019) 1327-1345, <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01470-2>.
- [3] J. Szolcsányi, Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology, *Neuropeptides* 38 (2004) 377-384, <https://doi.org/10.1016/j.npep.2004.07.005>.
- [4] Ł. Adaszek, D. Gadomska, Ł. Mazurek, P. Łyp, J. Madany, S. Winiarczyk, Properties of capsaicin and its utility in veterinary and human medicine, *Res. Vet. Sci.* 123 (2019) 14-19, <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.12.002>.
- [5] V. Fattori, M. S. N. Hohmann, A. C. Rossaneis, F. A. Pinho-Ribeiro, W. A. Verri, Capsaicin: Current understanding of its mechanisms and therapy of pain and other pre-clinical and clinical uses, *Molecules* 21 (2016) 844-877, <https://doi.org/10.3390/molecules21070844>.
- [6] M. Visalatchi, B. Madhan, G. Shanmugam, N-Vanillylnonanamide, a natural product from capsicum oleoresin, as potential inhibitor of collagen fibrillation, *Int. J. Biol. Macromol.* 156 (2020) 1146-1152, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.148>.

- [7] P. Anand, K. Bley, Topical capsaicin for pain management: Therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch, *Br. J. Anaesth.* 107 (2011) 490-502, <https://doi.org/10.1093/bja/aer260>.
- [8] L. Qin, Y. Wang, Y. Gong, J. Chen, B. Xu, L. Tang, L. Guo, J. Xie, Capsaicin metabolites and GSH-associated detoxification and biotransformation pathways in human liver microsomes revealed by LC-HRMS/MS with data-mining tools, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1133 (2019) 121843, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121843>.
- [9] M. Hayman, P. C. A. Kam, Capsaicin: A review of its pharmacology and clinical applications, *Curr. Anaesth. Crit. Care* 19 (2008) 338-343, <https://doi.org/10.1016/j.cacc.2008.07.003>.
- [10] O. Spicer, J. R. Almirall, Extraction of capsaicins in aerosol defense sprays from fabrics, *Talanta* 67 (2005) 377-382, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.05.031>.
- [11] A. Peña-Alvarez, E. Ramírez-Maya, L. A. Alvarado-Suárez, Analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin in peppers and pepper sauces by solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2483-2487, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.053>.
- [12] Y. Sun, B. Park, J. H. Ha, S. H. Kang, Voltage program-based MEKC with LIF detection for rapid quantification of native capsaicin and dihydrocapsaicin in foods, *Food Chem.* 323 (2020) 126831, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126831>.
- [13] D. Suresh, K. Srinivasan, Tissue distribution and elimination of capsaicin, piperine and curcumin following oral intake in rats, *Indian J. Med. Res.* 131 (2010) 682-691.
- [14] T. Hartley, B. Stevens, K. D. K. Ahuja, M. J. Ball, Development and experimental application of an HPLC procedure for the determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in serum samples from human subjects, *Indian J. Clin. Biochem.* 28 (2013) 329-335, <https://doi.org/10.1007/s12291-013-0297-0>.
- [15] M. Kuzma, K. Fodor, B. Boros, P. Perjési, Development and validation of an HPLC-DAD analysis for pharmacopoeial qualification of industrial Capsicum extracts, *J. Chromatogr. Sci.* 53 (2015) 16-23, <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmu004>.
- [16] A. González-Zamora, E. Sierra-Campos, J. G. Luna-Ortega, R. Pérez-Morales, J. C. R. Ortiz, J. L. García-Hernández, Characterization of different capsicum varieties by evaluation of their capsaicinoids content by high performance liquid chromatography,

- determination of pungency and effect of high temperature, *Molecules* 18 (2013) 13471-13486, <https://doi.org/10.3390/molecules181113471>.
- [17] M. Kuzma, K. Fodor, G. Maász, P. Avar, G. Mózsik, T. Past, E. Fischer, P. Perjési, A validated HPLC-FLD method for analysis of intestinal absorption and metabolism of capsaicin and dihydrocapsaicin in the rat, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 103 (2015) 59-66, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.10.007>.
- [18] M. Kuzma, K. Fodor, A. Almási, G. Mózsik, T. Past, P. Perjési, Toxicokinetic study of a gastroprotective dose of capsaicin by HPLC-FLD method, *Molecules* 24 (2019) 2848-2863, <https://doi.org/10.3390/molecules24152848>.
- [19] M. Noami, K. Igarashi, F. Kasuya, M. Ohta, M. Kanamori-Kataoka, Y. Seto, Study on the analysis of capsaicin glucuronide in rat urine by liquid chromatography-mass spectrometry after enzymatic hydrolysis, *J. Health Sci.* 52 (2006) 660-665, <https://doi.org/10.1248/jhs.52.660>.
- [20] C. A. Reilly, D. J. Crouch, G. S. Yost, A. A. Fatah, Determination of capsaicin, nonivamide, and dihydrocapsaicin in blood and tissue by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 26 (2002) 313-319, <https://doi.org/10.1093/jat/26.6.313>.
- [21] C. H. F. Wong, F. P. W. Tang, T. S. M. Wan, A broad-spectrum equine urine screening method for free and enzyme-hydrolysed conjugated drugs with ultra performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 697 (2011) 48-60, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.04.030>.
- [22] Y. You, C. E. Uboh, L. R. Soma, F. Guan, D. Taylor, X. Li, Y. Liu, J. Chem, Validated UHPLC-MS-MS method for rapid analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin in equine plasma for doping control, *J. Anal. Toxicol.* 37 (2013) 122-132, <https://doi.org/10.1093/jat/bks098>.
- [23] D. Wang, F. Meng, L. Yu, L. Sun, L. Sun, J. Guo, A sensitive LC-MS/MS method for quantifying capsaicin and dihydrocapsaicin in rabbit plasma and tissue: Application to a pharmacokinetic study, *Biomed. Chromatogr.* 29 (2015) 496-503, <https://doi.org/10.1002/bmc.3302>.
- [24] A. Zak, N. Siwinska, M. Slowikowska, H. Borowicz, P. Szpot, M. Zawadzki, A. Niedzwiedz, The detection of capsaicin and dihydrocapsaicin in horse serum following long-term local administration, *BMC Vet.* 14 (2018) 10-15, <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1518-9>.
- [25] R. Lorenzoni, F. Barreto, R. V. Contri, B. Verlindo de Araujo, A. R. Pohlman, T. D. Costa, Rapid and sensitive LC-MS/MS method for simultaneous quantification of capsaicin and

- dihydrocapsaicin in microdialysis samples following dermal application, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 173 (2019) 126-133, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.05.029>.
- [26] A. Garcés-Claver, M. S. Arnedo-Andrés, J. Abadía, R. Gil-Ortega, A. Álvarez-Fernández, Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in capsicum fruits by liquid chromatography-electrospray/time-of-flight mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 9303-9311, <https://doi.org/10.1021/jf0620261>.
- [27] W. H. Kwok, T. L. S. Choi, Y. Y. K. Tsoi, G. N. W. Leung, T. S. M. Wan, Screening of over 100 drugs in horse urine using automated on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-high resolution mass spectrometry for doping control, *J. Chromatogr. A* 1490 (2017) 89-101, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.02.020>.
- [28] S. Barbosa, J. Saurina, L. Puignou, O. Núñez, Targeted UHPLC–HRMS (Orbitrap) polyphenolic and capsaicinoid profiling for the chemometric characterization and classification of paprika with protected designation of origin (PDO) attributes, *Molecules* 25 (2020) 1623, <https://doi.org/10.3390/molecules25071623>.
- [29] O. Fayos, M. Savirón, J. Orduna, G. F. Barbero, C. Mallor, A. Garcés-Claver, Quantitation of capsiate and dihydrocapsiate and tentative identification of minor capsinoids in pepper fruits (*Capsicum* spp.) by HPLC-ESI-MS/MS(QTOF), *Food Chem.* 270 (2019) 246-272, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.112>.
- [30] A. Arrizabalaga-Larrañaga, G. Campmajó, J. Saurina, O. Núñez, F. J. Santos, E. Moyano, Determination of capsaicinoids and carotenoids for the characterization and geographical origin authentication of paprika by UHPLC–APCI–HRMS, *LWT-Food Sci. Technol.* 139 (2021) 110533, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110533>.
- [31] Z. Guo, S. Huang, J. Wang, Y. L. Feng, Recent advances in non-targeted screening analysis using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry to explore new biomarkers for human exposure, *Talanta* 219 (2020) 121339, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121339>.
- [32] C. Aydoğan, Recent advances and applications in LC-HRMS for food and plant natural products: a critical review, *Anal. Bioanal. Chem.* 412 (2020) 1973-1911, <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02328-6>.
- [33] F. Hansen, E. L. Øiestad, S. Pedersen-Bjergaard, Bioanalysis of pharmaceuticals using liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 189 (2020) 113446, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113446>.

- [34] M. Abdel-Rehim, S. Pedersen-Bjergaard, A. Abdel-Rehim, R. Lucena, M. M. Moein, S. Cárdenas, M. Miró, Microextraction approaches for bioanalytical applications: An overview, *J. Chromatogr. A* 1616 (2020) 460790, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460790>.
- [35] S. M. Daryanavard, H. Zolfaghari, A. Abdel-Rehim, M. Abdel-Rehim, Recent applications of microextraction sample preparation techniques in biological samples analysis, *Biomed. Chromatogr.* 35 (2021) e5105, <https://doi.org/10.1002/bmc.5105>.
- [36] Q. Lu, H. Guo, D. Li, Q. Zhao, Determination of capsaicinoids by magnetic solid phase extraction coupled with UPLC-MS/MS for screening of gutter oil, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1158 (2020) 122344, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122344>.
- [37] J. Caleb, U. Alshana, A. Hanoglu, I. I. Cali, Dispersive liquid-liquid microextraction for the isolation and HPLC-DAD determination of three major capsaicinoids in *Capsicum annum* L., *Turk J. Chem.* 45 (2021) 420-429, <https://doi.org/10.3906/kim-2009-55>.
- [38] T. Kawada, K. Iwai, In vivo and in vitro metabolism of dihydrocapsaicin, a pungent principle of hot pepper, in rats, *Agric. Biol. Chem.* 49 (1985) 441-448, <https://doi.org/10.1080/00021369.1985.10866743>.
- [39] C. A. Reilly, W. J. Ehlhardt, D. A. Jackson, P. Kulanthaivel, A. E. Mutlib, R. J. Espina, D. E. Moody, D. J. Crouch, G. S. Yost, Metabolism of capsaicin by cytochrome P450 produces novel dehydrogenated metabolites and decreases cytotoxicity to lung and liver cells, *Chem. Res. Toxicol.* 16 (2003) 336-349, <https://doi.org/10.1021/tx025599q>.
- [40] Y. J. Surh, H. Ahn, K. C. Kim, J. B. Park, S. S. Lee, Metabolism of capsaicinoids: Evidence for aliphatic hydroxylation and its pharmacological implications, *Life Sci.* 56 (1995) 305-311, [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(95\)00091-7](https://doi.org/10.1016/0024-3205(95)00091-7).
- [41] A. K. Sonker, M. Bhateria, K. Karsauliya, S. P. Singh, Investigating the glucuronidation and sulfation pathways contribution and disposition kinetics of Bisphenol S and its metabolites using LC-MS/MS-based nonenzymatic hydrolysis method, *Chemosphere* 273 (2021) 129624, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129624>.
- [42] G. H. Chiang, HPLC analysis of capsaicins and simultaneous determination of capsaicins and piperine by HPLC-ECD and UV, *J. Food Sci.* 51 (1986) 499-503, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1986.tb11165.x>

# **CAPÍTULO II**

**EXTRACCIÓN DISPERSIVA EN FASE SÓLIDA  
MAGNÉTICA PARA LA PRECONCENTRACIÓN DE  
CAPSAICINOIDES EN SUERO HUMANO  
MEDIANTE LC-HRMS**



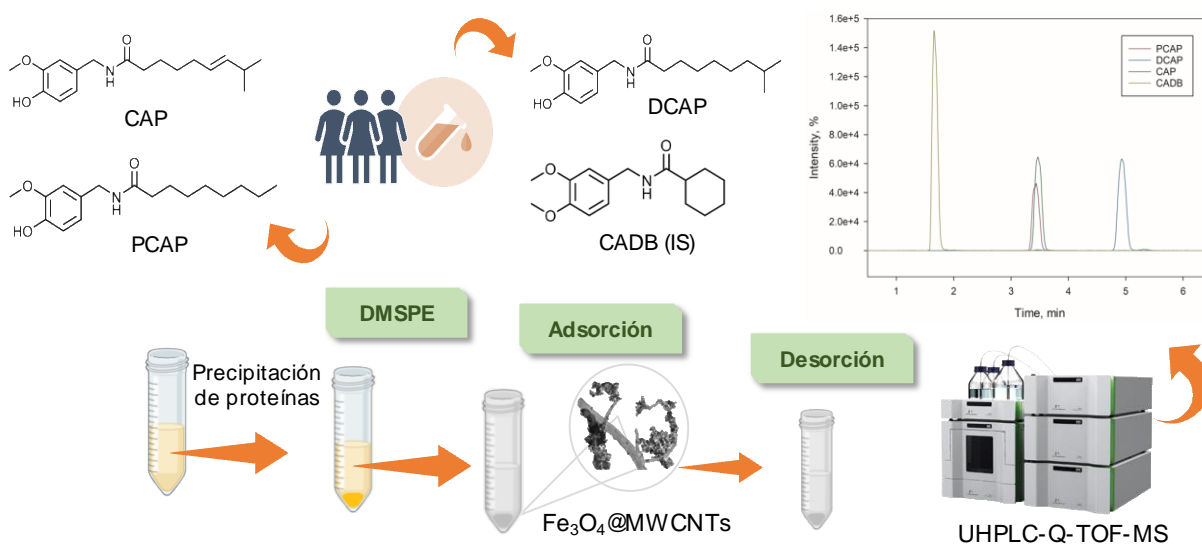




## EXTRACCIÓN DISPERSIVA EN FASE SÓLIDA MAGNÉTICA PARA LA PRECONCENTRACIÓN DE CAPSAICINOIDES EN SUERO HUMANO UTILIZANDO LC-HRMS

### RESUMEN

En este capítulo se describe el desarrollo de un nuevo método analítico basado en el uso de la microextracción dispersiva en fase sólida magnética (DMSPE) para la preconcentración de tres capsaicinoides en muestras de suero humano. Para ello, se ha estudiado la influencia de diversos factores experimentales que afectan tanto a la etapa de adsorción como a la de desorción en DMSPE. De entre los siete nanomateriales magnéticos estudiados, los mejores resultados se obtuvieron usando nanotubos de carbono de multipared. Los análisis de los extractos preconcentrados se llevaron a cabo mediante cromatografía líquida con espectrometría de masas de cuadrupolo y tiempo de vuelo operando en modo positivo. La validación del método mostró un rango de linealidad entre 0,3 y 300  $\mu\text{g/L}$ , con límites de detección de 0,1, 0,15 y 0,17  $\mu\text{g/L}$  para CAP, DCAP y PCAP, respectivamente. La repetibilidad del método, expresada como la desviación estándar relativa (RSD,  $n=7$ ), varió de 3,4 a 11%. Las muestras de suero también se estudiaron desde un enfoque no dirigido para la búsqueda de posibles metabolitos derivados de los capsaicinoides junto con otros compuestos relacionados.





## II.1. INTRODUCCIÓN

Los capsaicinoides forman un grupo de alcaloides producidos solo dentro del género *Capsicum* en la familia Solanaceae. Su estructura química consiste en un grupo vanililo unido a un grupo amida y a una cadena de alquilo, lo que proporciona a la molécula tres sitios diferentes con propiedades dipolares, hidrofílicas y lipofílicas, dotándoles de propiedades anfifílicas [1]. Capsaicina (CAP) y dihidrocapsaicina (DCAP) son los capsaicinoides más abundantes en pimientos picantes (80-90%), mientras que N-vanililnonanamida (DCAP) así como otros compuestos relacionados están presentes en cantidades sustancialmente más bajas [1].

Estos compuestos presentan ciertas actividades biológicas como antiinflamatoria, alivio del dolor, termorregulación corporal, anticancerígena, antioxidante y antimicrobiana [2]. Especialmente CAP, cuando se administra de forma oral o tópica, reduce la inflamación y el dolor derivado de la artritis reumatoide o fibromialgia [3]. Además, CAP muestra numerosos beneficios para el sistema cardiovascular, no solo para la prevención de la hipertensión sino también en la prevención del infarto de miocardio y de enfermedades coronarias [3]. Otra de las propiedades de los capsaicinoides que han acaparado la atención en los últimos años es su efecto adelgazante, lo que conduce a elevados niveles de capsaicinoides en suero que deben controlarse debido a posibles efectos adversos para los consumidores. En la bibliografía se ha descrito la habilidad de CAP y DCAP de inhibir la transcripción de algunos genes responsables de las proteínas que estimulan los procesos de termogénesis y adipogénesis, por lo que ambas sustancias juegan un papel fundamental en la regulación de la obesidad [3, 4]. Sin embargo, es conocido también el efecto tóxico de CAP que puede causar irritación en las mucosas de las membranas y en los tejidos, lo que ha conducido al establecimiento de una dosis letal al 50% (LD<sub>50</sub>) en humanos de 0,5-5 g/kg de peso corporal [4].

Por otro lado, aunque no existe una regulación universal, los productos basados en capsaicinoides, considerados como armas no letales, pueden usarse para defensa personal y por las fuerzas de seguridad en acciones antidisturbios. Por exposición a estos compuestos, se han reportado también complicaciones respiratorias o incluso hasta alguna muerte. Por esta razón, y considerando el fácil acceso de la población a estos productos para el tratamiento de diferentes problemas de salud, como el sobrepeso, el análisis de fluidos biológicos se ha convertido en un componente cada vez más utilizado en procedimientos judiciales [1]. Por todo ello, la disponibilidad de herramientas analíticas de elevada sensibilidad y precisión resulta de gran interés.

Para el análisis de capsaicinoides se han aplicado numerosas técnicas, incluyendo cromatografía de gases (GC) [5] y cromatografía líquida (LC), siendo esta última la más

ampliamente utilizada con diferencia. Los métodos LC suelen usar como sistemas de detección la espectrofotometría de absorción UV [6], fluorescencia (FLD) [7-9] o espectrometría de masas (MS) [10-18]. Entre los diferentes analizadores de MS disponibles en el mercado, los de triple cuadrupolo (QqQ) [10, 12-17] y MS de alta resolución (HRMS) basado en tiempo de vuelo (TOF) [18] son lo que se han aplicado más satisfactoriamente para análisis de capsaicinoides.

Los bajos niveles a los que los analitos suelen encontrarse en las muestras biológicas suponen uno de los principales problemas en los análisis, lo que significa que es necesario incluir etapas previas de limpieza y preconcentración. Tradicionalmente, para el aislamiento de capsaicinoides en sangre [10], orina [12, 18], suero [6, 15], plasma [13, 14] y tejidos [10, 14], se han aplicado técnicas como la extracción en fase sólida (SPE) [8, 12] y extracción líquido-líquido (LLE) [6, 10, 13-15]. En las últimas décadas, las metodologías miniaturizadas han irrumpido en un intento de superar los inconvenientes asociados a LLE y SPE. Estos inconvenientes incluyen largos tiempos de aplicación, procedimientos laboriosos y, en la mayoría de los casos, el consumo de elevadas cantidades de disolventes orgánicos. Así, las técnicas de preconcentración miniaturizadas, como la microextracción en fase líquida (LPME) y aquellas que involucran el aislamiento del analito en una fase sólida, han alcanzado un reconocimiento notable y en la actualidad se aplican ampliamente en diferentes áreas debido a la elevada eficiencia de extracción que proporcionan, a su rapidez y al menor consumo de disolventes orgánicos, lo que las convierten en técnicas que siguen las directrices de la química analítica verde [19].

En base a la bibliografía consultada, el tratamiento miniaturizado de muestras para la determinación de capsaicinoides en matrices biológicas no está demasiado explorado. En este sentido, la microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) se ha utilizado para la preconcentración de capsaicinoides en muestras de orina humana [18], mientras que la microextracción en fase sólida, se ha utilizado para la extracción de estos mismos analitos, pero en pimientos y salsas picantes [5]. La nanociencia analítica aplicada a la extracción dispersiva en fase sólida magnética (DMSPE) es una técnica cuyo uso apenas se ha visto implementado para estos compuestos, en particular solo para el análisis de muestras de aceite [9, 17]. Esta técnica hace uso de un material magnético para aislar los compuestos de interés mediante su dispersión a través de la disolución de la muestra, un enfoque que ofrece muchas ventajas sobre el uso del nanomaterial empaquetado en cartuchos de extracción [20]. Hasta la fecha, la metodología DMSPE no se ha aplicado previamente para la preconcentración de capsaicinoides en muestras de suero.

La novedad de este estudio radica en el desarrollo de un método analítico para la determinación de CAP, DCAP y PCAP en suero humano basado en la técnica DMSPE en

combinación con LC de ultra alta resolución acoplada a HRMS. Se presenta además la primera aplicación de nanotubos de carbono magnéticos de multipared (MWCNTs) para el aislamiento de capsaicinoides. Una vez validado el método, se utilizó en el análisis de diez muestras de suero de individuos tratados con cremas de uso tópico a base de capsaicina. Además, se ha llevado a cabo el desafío tecnológico de realizar un estudio metabolómico por medio de un enfoque no dirigido y el establecimiento de una estrategia simple para la identificación de derivados de capsaicinoides nuevos o poco conocidos. Seguidamente, esta estrategia se aplicó a la monitorización de estos derivados en las muestras de suero. El método propuesto abre la posibilidad a hacer un seguimiento de la exposición humana a CAP, DCAP y PCAP, compuestos que pueden acceder al cuerpo humano tanto intencional como involuntariamente, así como para el estudio en sí de estos compuestos derivados.

## II.2. PARTE EXPERIMENTAL

### II.2.1. REACTIVOS

Capsaicina (CAP,  $\geq 95,5\%$  de pureza), dihidrocapsaicina (DCAP,  $\geq 85\%$  de pureza), N-vanililnonanamida (PCAP,  $\geq 98\%$  de pureza) y ácido ciclohexanocarboxílico 3,4-dimetoxibencilamida (CADB, estándar interno (IS)) se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Cloruro de hierro (III) hexahidratado, sulfato de hierro (II) y amonio hexahidratado se obtuvieron de PanReac AppliChem (Barcelona, España). Amoniacó (disolución al 25% m/m) fue proporcionado por Scharlab S.L., (Barcelona, España). El ácido fórmico se obtuvo de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). Los disolventes acetonitrilo (AcN), metanol (MeOH) y etanol (EtOH) se adquirieron de J.T. Baker (Deventer, Países Bajos).

Las disoluciones madre de los capsaicinoides, así como del IS se prepararon de forma individual en MeOH a una concentración de 500 mg/L y se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en viales de vidrio. Las disoluciones intermedias y de trabajo se prepararon en agua y se mantuvieron a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Los nanotubos de carbono de multipared (MWCNTs), proporcionados por Shenzhen Nanotech Port Co., Ltd. (Guangdong Sheng, China), tienen un área superficial específica de 40-70  $\text{m}^2/\text{g}$ , un diámetro promedio en el rango de 40-60 nm y una longitud promedio mayor de 5  $\mu\text{m}$ . El agua de alta pureza se obtuvo utilizando un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Para la síntesis de otros materiales magnéticos diferentes del seleccionado, se utilizaron los siguientes reactivos (Sigma-Aldrich): ácido oléico (99%), nitrato de plata (9,5%), (3-aminopropil)-

trietoxisilano (98%, APTS), celulosa microcristalina (polvo, 20  $\mu\text{m}$ ), óxido de grafeno (GO, 2 mg/mL en suspensión acuosa) y pirrol (98%).

## II.2.2. INSTRUMENTACIÓN

Para los análisis cromatográficos se utilizó un sistema cromatográfico UHPLC Agilent 1290 Infinity II Series HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), equipado con una bomba binaria de alta velocidad y muestreador automático. El cromatógrafo está acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 6550 Q-TOF (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) por medio de una interfaz de electrospray Agilent Jet Stream Dual (AJS-Dual ESI). Para el ajuste de los parámetros experimentales del sistema UHPLC y del detector Q-TOF se utilizó el software MassHunter Workstation Data Acquisition (Revisión B.08.00). Las muestras termostatazadas a 5 °C se inyectaron (20  $\mu\text{L}$ ) en una columna UHPLC Omega Luna C18 (100 mm x 2,1 mm, 1,6  $\mu\text{m}$ ) con una velocidad de flujo de 0,4 mL/min. La columna se equilibró a una temperatura de 25 °C. Se aplicó un modo de elución isocrático usando una fase móvil con una proporción 50:50 de disolventes A y B, siendo A una disolución acuosa de ácido fórmico al 0,1% v/v y B AcN conteniendo también un 0,1% v/v de ácido fórmico. Bajo estas condiciones experimentales, los analitos eluyeron en 7 min.

El modo de ionización aplicado en ESI fue positivo de acuerdo con la bibliografía consultada [13-18]. La presión del gas nebulizador se ajustó a 40 psi, el flujo y la temperatura del gas de secado a 16 L/min y 150 °C, respectivamente; y el flujo del gas envolvente a 12 L/min y su temperatura a 300 °C. Los voltajes aplicados para el capilar de nebulización, fragmentador, boquilla y octopolo 1 RF Vpp fueron de 4000, 360, 500 y 750 V, respectivamente. Para las exploraciones MS se adquirieron datos centroidales en el rango 50-500  $m/z$  en modo de alta resolución de rango dinámico extendido de 2 GHz, con 2026 transiciones/espectro, 250 ms/espectro y 4 espectros/s. La corrección de masa durante el análisis se llevó a cabo usando la masa de referencia de 121,0509. Los cromatogramas de iones extraídos (EICs) se obtuvieron a partir de la molécula protonada de cada analito, con una ventana de 0-5 ppm, y se utilizaron tanto para la identificación como para la cuantificación, en este último caso, haciendo uso del valor de las áreas de pico cromatográfico como señal analítica. Los iones cualificadores adoptados para cada compuesto, así como los valores de  $m/z$  tanto experimentales como teóricos se muestran en la Tabla II.1. El error para los valores  $m/z$  experimentales en relación con los correspondientes teóricos se expresaron en términos de porcentajes, como la diferencia entre las masas experimental y teórica dividida por la teórica y multiplicada por  $10^6$ . Teniendo esto en cuenta, se obtuvieron unos valores de error de 2,5, 1,2 y 2,0 para CAP, DCAP y PCAP, respectivamente.

Para el tratamiento de la muestra se utilizó un agitador orbital (IKA-KS 130 Basic, Gottmadingen, Alemania) y una centrifuga refrigerada de laboratorio MPW-150 R (MPW Med. Instruments, Varsovia, Polonia). Los extractos de las muestras se filtraron antes de su análisis por UHPLC usando viales de Agilent con filtro incorporado de politetrafluoroetileno (PTFE) de tamaño de poro de 0,20  $\mu\text{m}$ . Se utilizaron imanes permanentes de neodimio (Supermagnete, Gottmadingen, Alemania) presentados en forma de bloque de Nd-Fe-B con unas dimensiones de 50 x 150 x 15 mm, 86 g de peso y 33 kg de fuerza.

**Tabla II.1.**

Parámetros UHPLC-Q-TOF-MS de los compuestos estudiados.

Analito	Fórmula molecular	$m/z$ teórico	$m/z$ experimental	Error (ppm)	iones producto ( $m/z$ )
CADB	$\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}_3$	278,1751	278,1764	2,8	151,0755
PCAP	$\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{NO}_3$	294,2064	294,2075	2,0	137,0602 170,1505
CAP	$\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{NO}_3$	306,2064	306,2077	2,5	137,0602 182,1545
DCAP	$\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{NO}_3$	308,2220	308,2224	1,2	137,0595 184,1699

### II.2.3. SÍNTESIS DE LOS MATERIALES MAGNÉTICOS ESTUDIADOS

El nanomaterial magnético utilizado,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MWCNTs}$ , se sintetizó siguiendo el método previamente propuesto por Arroyo-Manzanares *et al.* [21]. Se disolvieron 0,85 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en 250 mL de agua, y a continuación, se añadieron 0,5 g de MWCNTs previamente purificados. La suspensión obtenida se mantuvo durante 20 min en un baño de ultrasonidos termostatzado a 50 °C. La ferrita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) precipitó sobre las paredes de los MWCNTs mediante la adición gota a gota de 25 mL de una disolución de amoníaco 8 M, manteniendo agitación manual continua. Seguidamente, la mezcla se mantuvo a 50 °C durante 30 min para permitir el crecimiento del nanomaterial. Una vez enfriada la mezcla a temperatura ambiente, el nanomaterial magnético ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MWCNTs}$ ) se separó de la disolución por medio de un imán permanente y se lavó con agua purificada y EtOH. Finalmente, el material magnético se secó en estufa a 60 °C durante una noche, se trituró y se almacenó en un recipiente de vidrio a temperatura ambiente.

Además de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MWCNTs}$ , se han sintetizado otros materiales magnéticos cuya eficacia en la extracción de capsaicinoides ha sido evaluada. Partiendo de ferrita ya sintetizada, se procedió a su recubrimiento con diferentes materiales con el objetivo de funcionalizar su superficie para convertirla en un material más selectivo. A continuación, se describe de forma resumida la síntesis de cada uno de estos materiales magnéticos.

Las nanopartículas de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@$ ácido oleico se sintetizaron siguiendo el procedimiento propuesto por Benedé *et al.* [22] basado en coprecipitación química. Para ello se mezclaron 100 mL de una disolución acuosa 0,4 M de  $\text{FeCl}_3$  y 100 mL de una disolución acuosa 0,2 M de  $\text{CoCl}_2$ . A continuación, se añadieron gota a gota 100 mL de una disolución acuosa 3 M de NaOH mientras se mantenía agitación constante. Por último, se añadieron a la mezcla de reacción 2 mL de ácido oleico manteniéndola a 80 °C durante 1 h. El precipitado obtenido se enfrió a temperatura ambiente y se lavó varias veces con agua y EtOH para eliminar el exceso de ácido oleico de la disolución. Finalmente, el precipitado se dejó secar toda la noche a 100 °C.

Para la síntesis de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Ag, se siguió el método propuesto por López-García *et al.* [23]. Para ello, se suspendieron 0,28 g de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  en 20 mL de agua, seguidamente se añadieron 5,7 mL de una disolución de nitrato de plata (0,011 g/L) y se mantuvo la mezcla en agitación durante 5 min, para después incorporar 14 mL de una disolución de tetrahidrobórato de sodio (0,012 g/L). La mezcla resultante se agitó durante 10 min más y, por último, las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Ag se separaron con ayuda de un imán, se lavaron con agua y se suspendieron en 20 mL de agua.

La funcionalización de las nanopartículas de ferrita con APTS se llevó a cabo siguiendo la reacción de sililación descrita por Mukdasai *et al.* [24]. Para ello, se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 min una mezcla formada por 1,5 g de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , 3 g de APTS y 25 mL de ácido acético al 0,1% v/v. La suspensión formada se mantuvo en estufa a 80 °C durante toda la noche y el nanomaterial obtenido funcionalizado con APTS se separó con ayuda de un imán, se lavó con agua y MeOH y se secó a 90 °C en estufa.

Para las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ celulosa, se siguió el procedimiento descrito por Periyasamy *et al.* [25], en el que se disuelven 2 g de celulosa en 100 mL de una disolución compuesta por NaOH 2%:tiourea:urea:agua (8:6,5:8:77,5) manteniendo agitación constante durante 30 min y a 4 °C, para que se forme una disolución homogénea de celulosa. A continuación, se añaden lentamente 70 mL de una mezcla conteniendo 0,05 moles de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  y 0,01 moles de  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  y se agita durante 30 min más. Seguidamente, se añaden 0,1 moles de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y 0,1 moles de NaOH para mantener el pH a 10 y se deja agitar durante 1 h. Pasado este tiempo se añaden gradualmente 10 mL de una disolución conteniendo 3,7 mmoles de  $\text{FeCl}_3$  y 1,8 mmoles de  $\text{FeCl}_2$  y se deja que el nanomaterial envejezca durante 24 h a pH 10. Por último,



el material se filtra y se lava con agua hasta alcanzar la neutralidad y a continuación, se lava de nuevo con agua y EtOH y se deja secar a 80 °C durante 24 h.

El material de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PPy se sintetizó de acuerdo con el método propuesto por Asgharinezhad *et al.* [26]. Para ello, se añadieron 400 mL de agua (pH 9) a 1 g de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> y se agitó la mezcla durante 5 min. A continuación, se añadieron 0,5 mL de pirrol y se mantuvo la agitación durante 10 min más antes de proceder a la adición gota a gota y bajo agitación de 50 mL de una disolución acuosa de FeCl<sub>3</sub> 1,8% m/v. La reacción de polimerización se dejó progresar unas 15 h y finalmente se recogió el precipitado formado, siendo lavado con agua y MeOH hasta que el filtrado no presentara color y se secó en estufa a 70 °C durante una noche.

El nanomaterial de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/MWCNTs@PPy también se sintetizó siguiendo el procedimiento previamente descrito por Asgharinezhad *et al.* [26], aunque con algunas modificaciones. En primer lugar se procede a la síntesis de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@MWCNTs como ya se ha descrito previamente. A continuación, y para conseguir un material más selectivo, se llevó a cabo una reacción de polimerización oxidativa utilizando como monómero pirrol y FeCl<sub>3</sub> como agente oxidante. Para ello, se suspendieron 0,6 g de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@MWCNTs en 250 mL de agua (pH 9) y se agitó la mezcla durante 5 min para, en un segundo paso, añadir 0,4 mL de pirrol y continuar agitando 10 min más. Seguidamente, se añadieron 0,8 g de perclorato de sodio y se mantuvo la agitación durante 5 min. Por último, manteniendo la agitación se añadieron gota a gota 50 mL de agua conteniendo 0,56 g de FeCl<sub>3</sub> y se dejó proceder la reacción de polimerización durante la noche. El precipitado formado se separó con ayuda de imán externo, se lavó con agua y metanol y se secó en estufa a 70 °C durante la noche.

Por último, el nanomaterial Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@GO se sintetizó de acuerdo con el procedimiento propuesto por Asgharinezhad *et al.* [26]. En primer lugar se suspendieron 0,5 g de GO en 500 mL de agua y se aplicaron ultrasonidos durante 3 h para conseguir una buena dispersión. Después, se añadieron 0,85 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O y 0,422 g de FeCl<sub>3</sub> a 50 °C y en atmósfera de nitrógeno. A continuación, la mezcla se sonicó durante 10 min para, posteriormente, añadir gota a gota 20 mL de una disolución de NH<sub>4</sub>OH 8 M, de modo que precipitaron las nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> sobre las láminas de GO. Para permitir el crecimiento completo del nanomaterial, la reacción se mantuvo la mezcla durante 30 min a 50 °C. Por último, la dispersión se enfrió a temperatura ambiente y el material magnético se recogió y se lavó varias veces con agua y EtOH.

#### II.2.4. CARACTERIZACIÓN DE Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@MWCNTs

Para la caracterización de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@MWCNTs, se estudió el tamaño hidrodinámico del nanomaterial sintetizado mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) utilizando un equipo Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Reino Unido). El instrumento está equipado de un láser de He/Ne (4 mW) emitiendo a 633 nm, una celda de medida, un fotomultiplicador y un ordenador. La intensidad de dispersión en un ángulo de 173° en relación con la fuente (retrodispersión) se midió usando un detector de fotodiodos a temperatura ambiente. Un algoritmo de propósito general (integrado en el software del equipo Malvern Zetasizer) permitió el análisis de las funciones de autocorrelación de intensidad con el objetivo de determinar la distribución del coeficiente de difusión traslacional promedio de las partículas ( $D_t$ ). La ecuación de Stokes-Einstein relaciona el promedio de  $D_t$  y el promedio del diámetro hidrodinámico de las partículas ( $d_h$ ), de acuerdo con la Ecuación II.1:

$$d_h = \frac{2k_B T}{D_t 6\pi\eta_s} \quad (\text{Ecuación II.1})$$

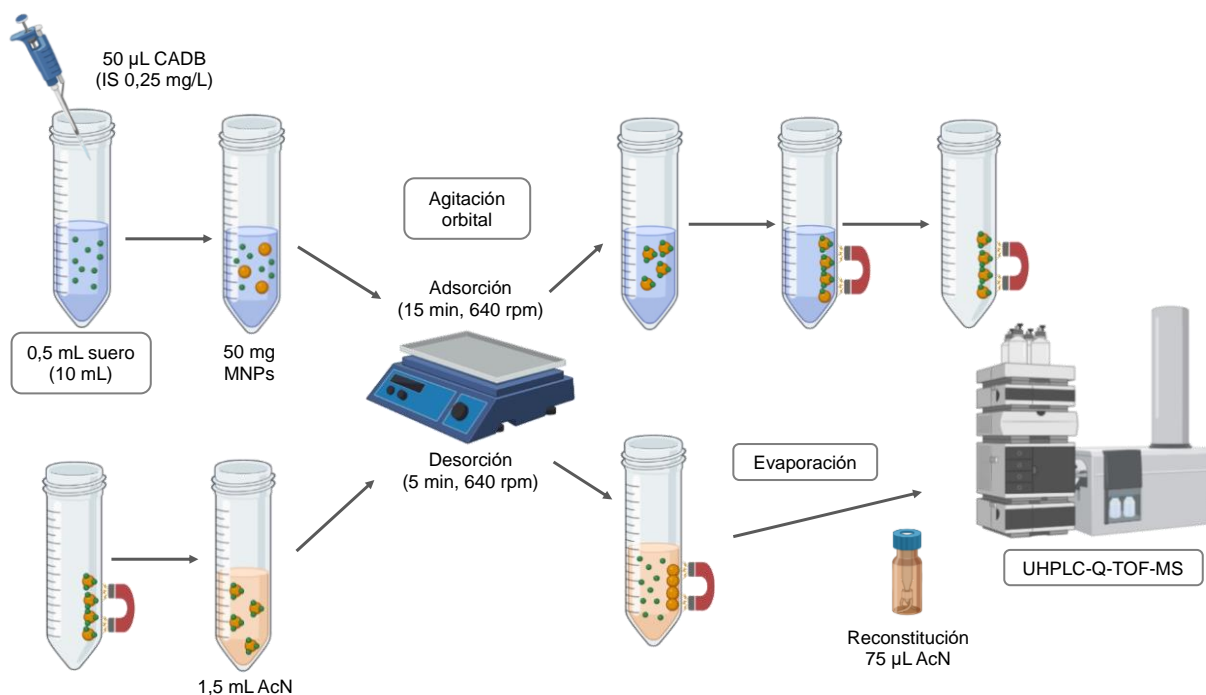
Siendo  $k_B$  la constante de Boltzmann,  $T$  la temperatura absoluta y  $\eta_s$  la viscosidad del disolvente. En este sentido, el radio de una esfera compacta se define por el valor de  $R_h$ , correspondiendo su coeficiente de difusión traslacional al promedio del coeficiente de difusión de las nanopartículas. El instrumento Nano ZS también puede medir potencial zeta, proporcionando información acerca de la cantidad de carga que presenta la superficie de las partículas. Aquellas partículas cuyo valor de potencial zeta esté fuera del rango -30 a +30 mV se consideran estables, debido a su elevada repulsión eléctrica, lo que las previene de una posible agregación.

La microcopia electrónica de transmisión (TEM) se aplicó a una disolución acuosa del nanomaterial dispersado utilizando un equipo Philips Tecnai-12 operando a un voltaje de aceleración de 120 kV y equipado con una cámara Megaview II para la toma de imágenes. Para ello, se preparó una suspensión en agua del nanomaterial y, después, se eliminó ese exceso de agua utilizando un papel absorbente antes de tomar las imágenes TEM. Mediante esta técnica se estudió la morfología y distribución de las nanopartículas de ferrita sobre los MWCNTs.

## II.2.5. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Las diez muestras de suero analizadas se obtuvieron de voluntarios de la Universidad de Murcia que habían sido tratados previamente con cremas a base de capsaicina y se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del análisis. Antes del análisis, las muestras se descongelaron y sobre 0,5 mL de cada una de ellas, se añadió 50  $\mu\text{L}$  de CADB (0,25 mg/L) y 1 mL de AcN, siendo a continuación las mezclas centrifugadas a 4000 rpm y  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 min con el objetivo de precipitar las proteínas presentes en el suero. El líquido sobrenadante se recogió y se llevó a 10 mL con agua.

En un tubo cónico de plástico se pesaron 50 mg de  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MWCNTs}$ , donde seguidamente se añadieron 10 mL de la disolución de la muestra (conteniendo los 0,5 mL de suero) y la mezcla se sometió a agitación orbital a 640 rpm durante 15 min. A continuación, el nanomaterial magnético enriquecido con los analitos se separó de la disolución sobrenadante con ayuda de un imán externo. En una segunda etapa, la de desorción, los capsaicinoides se desorbieron en 1,5 mL de AcN, aplicando agitación orbital a 640 rpm durante 5 min. Finalmente, el extracto orgánico se evaporó bajo una corriente de nitrógeno, se reconstituyó añadiendo 50  $\mu\text{L}$  de AcN y se filtró haciendo uso de viales con filtro de membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) incorporados. Para el análisis se inyectó un volumen de 20  $\mu\text{L}$  de la fase preconcentrada en el sistema cromatográfico (Figura II.1).



**Figura II.1.** Procedimiento experimental DMSPE.

Para los estudios de recuperación, se fortificaron dos muestras de suero a dos niveles de concentración diferentes (5 y 50  $\mu\text{g/L}$ ) por adición de un volumen de 0,01 y 0,1 mL, respectivamente, de la disolución intermedia de 0,25  $\mu\text{g/mL}$  se agitaron manualmente durante unos pocos segundos y se mantuvieron en reposo durante una hora antes de aplicar el procedimiento descrito anteriormente. Cada análisis se realizó por triplicado.

Este estudio ha recibido un informe positivo (ID: 2908/2020) de la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia.

## II.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### II.3.1. OPTIMIZACIÓN DE LA ETAPA DMSPE

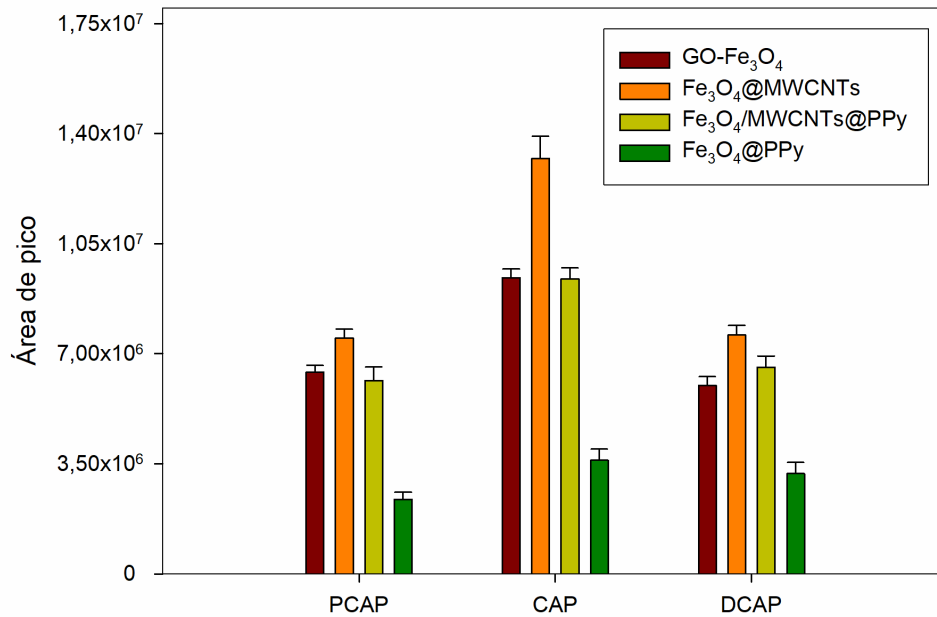
Con el objetivo de simplificar la matriz de la muestra antes de su preconcentración por DMSPE se ensayaron dos procedimientos diferentes, ambos incluyendo la precipitación de proteínas con AcN. En primer lugar, se añadió 1 mL de AcN a 500  $\mu\text{L}$  de suero (fortificado previamente con los analitos a una concentración de 0,1 mg/L) y se centrifugó la muestra durante 4 min a 3000 rpm. Después, el sobrenadante recuperado se llevó a 10 mL con agua y se preconcentró mediante DMSPE. En el segundo procedimiento, para prevenir posibles interferencias debidas a los lípidos contenidos en la muestra, se añadió 1 mL de hexano al sobrenadante y la mezcla homogeneizada se centrifugó otros 4 min a 3000 rpm. Tras la centrifugación, se recuperó la fase sedimentada y se llevó a 10 mL con agua para posteriormente someterse a DMSPE. Estos experimentos se realizaron por duplicado. Dado que no se encontraron diferencias significativas en términos de sensibilidad y perfiles cromatográficos, finalmente se adoptó el primero de los dos procedimientos descritos. El volumen de suero se fijó en el máximo disponible por muestra (0,5 mL).

Para obtener la máxima eficiencia de extracción para los capsaicinoides, se evaluó la influencia de diferentes variables que afectan tanto a la etapa de adsorción como de desorción en el procedimiento de DMSPE, haciendo uso del sobrenadante obtenido en el tratamiento de 500  $\mu\text{L}$  de suero (fortificado con los analitos a 0,1 mg/L) con 1 mL de AcN y diluido a 10 mL con agua.

Puesto que la naturaleza del material adsorbente magnético es determinante en la eficiencia de la preconcentración, se sintetizaron diferentes materiales magnéticos siguiendo los procedimientos descritos en la bibliografía: ácido oleico [22], plata [23], (3-aminopropil)-trióxido de silano (APTS) [24], celulosa [25], óxido de grafeno (GO) [26], polipirrol (PPy) [26],

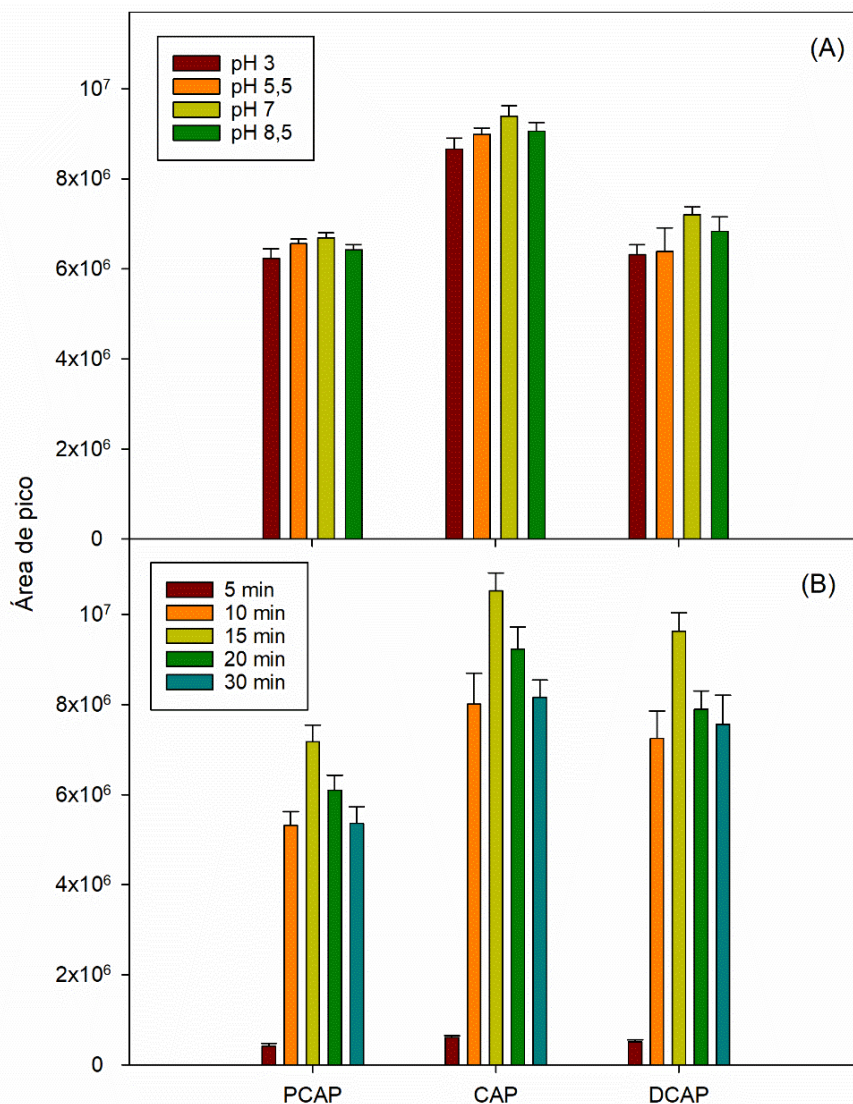
MWCNTs@PPy [26] y MWCNTs [21], todos ellos magnetizados con ferrita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). La posibilidad de interacciones entre las moléculas de los capsaicinoides y el ácido oleico debidas a que todos presentan en sus estructuras largas cadenas hidrocarbonadas fue el motivo por el que se estudió el material  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @ácido oleico como adsorbente. En ese sentido, se estudió la probabilidad de una posible interacción por coordinación entre los grupos amino de los analitos con las nanopartículas de plata [27] presentes en  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Ag, así como la buena afinidad proporcionada por APTS hacia estructuras químicas con grupos carbonilo, amino y anillos de benceno [24, 28]. La razón por la que se estudió el nanomaterial con celulosa fue su carácter biodegradable. Estudios previos de preconcentración de capsaicinoides mediante DMSPE usando GO [17] nos llevaron a comparar su eficiencia con la de los MWCNTs, cuya afinidad hacia muy diferentes tipos de compuestos orgánicos ya había sido probada, así como el adsorbente polimérico PPy y su combinación con MWCNTs (PPy/MWCNTs).

La Figura II.2 muestra la capacidad de extracción de los diferentes nanomateriales estudiados, usando 20 mg en cada caso. El resto de las condiciones experimentales fueron: 30 min de tiempo de adsorción con agitación orbital simultánea a 640 rpm, seguido de la desorción de los analitos desde el material magnético en 1,5 mL de AcN manteniendo la mezcla en agitación orbital a 640 rpm durante 15 min. Finalmente, 20  $\mu\text{L}$  del extracto orgánico se inyectó en el sistema UHPLC-Q-TOF-MS. No se observó preconcentración de los analitos cuando el nanomaterial magnético utilizado fue  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @celulosa,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Ag,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @APTS y  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ @ácido oleico. Como se observa en la Figura II.2,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @MWCNTs fue el material que proporcionó los mejores resultados, lo que se puede atribuir a las interacciones de tipo hidrofóbico entre los capsaicinoides y los MWCNTs, más específicamente a las interacciones de tipo  $\pi$ - $\pi$  entre los anillos de benceno de los analitos y la mayor parte de la superficie de los MWCNTs, así como a las interacciones con la cadena hidrocarbonada de los analitos. Así, el nanomaterial magnético que finalmente se seleccionó fue  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @MWCNTs.



**Figura II.2.** Efecto de la naturaleza del material magnético funcionalizado para la preconcentración de capsaicinoides mediante DMSPE (n=2).

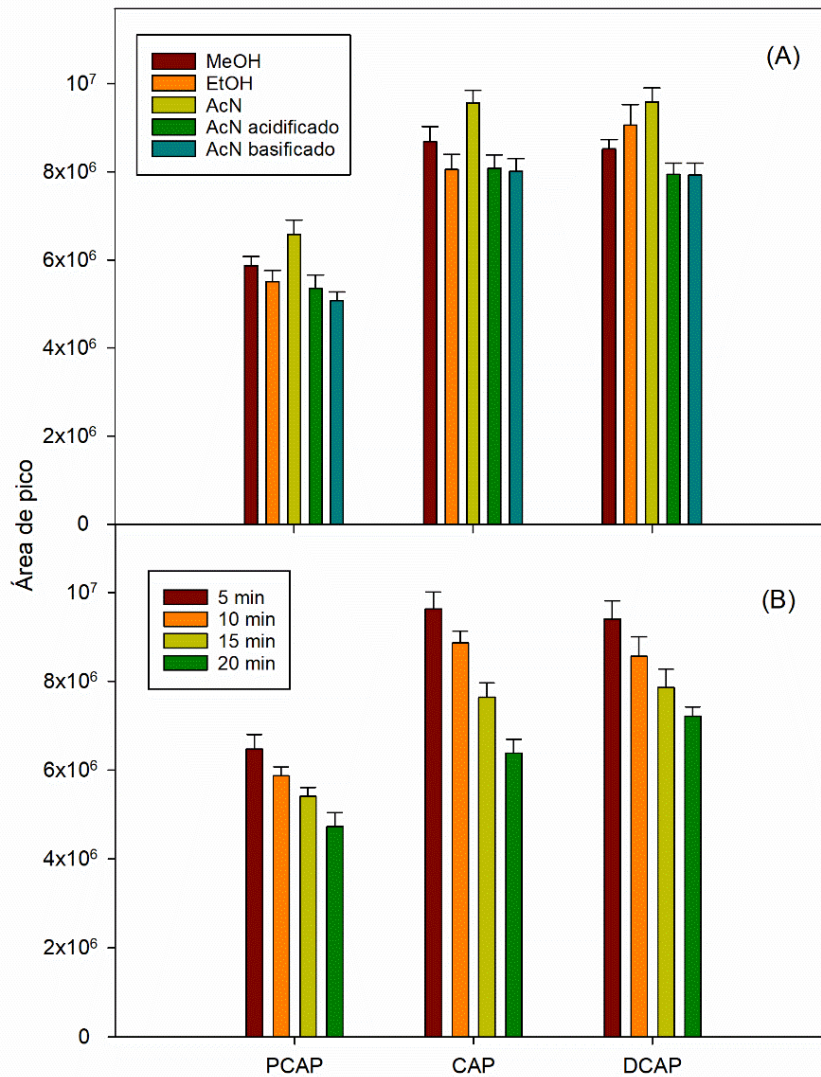
Al evaluar la influencia del pH de la fase acuosa en el rango 3-8,5 usando ácido fórmico y amoníaco, los resultados obtenidos fueron muy similares en todos los casos, aunque ligeramente mejores en cuanto a la señal analítica obtenida, para un pH de 7 (Figura II.3A), por lo que fue el valor seleccionado. El tiempo de la etapa de adsorción se estudió en un rango de tiempo comprendido entre 5 y 30 min. Como se observa en la Figura II.3B, la capacidad de adsorción se incrementó notablemente hasta 15 min, mientras que, sufrió un ligero descenso para tiempos mayores; en consecuencia, se fijó el tiempo de adsorción en 15 min.



**Figura II.3.** Efecto de (A) pH de la fase acuosa y (B) tiempo de adsorción en el procedimiento DMSPE (n=2).

Para la desorción de los capsaicinoides, el material magnético enriquecido con los analitos se mantuvo en contacto con 1,5 mL de diferentes disolventes (MeOH, EtOH y AcN) durante un tiempo de 5 min, mientras que la mezcla se sometía a agitación orbital a 640 rpm. La máxima sensibilidad fue proporcionada por AcN. También se estudió el efecto del pH del medio de desorción para valores de 4 y 9, usando ácido fórmico y amoníaco, respectivamente. Como se aprecia en la Figura II.4A, AcN sin ajuste previo del pH fue el disolvente que proporcionó los mejores resultados para los tres analitos estudiados, por lo que fue seleccionado. Se estudiaron tiempos de desorción de 5, 10, 15 y 20 min (Figura II.4B). Los mejores resultados se obtuvieron

con el tiempo más bajo de los estudiados, produciéndose una disminución de la señal analítica a partir de ese tiempo.

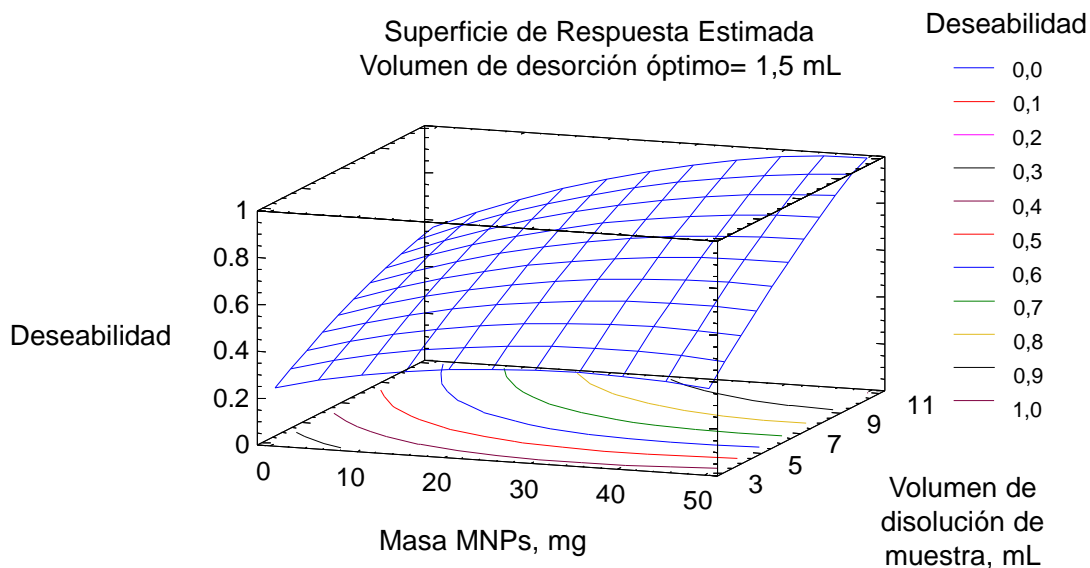


**Figura II.4.** Efecto de (A) naturaleza del disolvente de desorción y (B) tiempo de desorción en la eficacia del procedimiento DMSPE (n=2).

La influencia del volumen de disolución de muestra, la masa de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@MWCNTs y el volumen de disolvente de desorción se optimizó mediante un estudio multivariante basado en un diseño central compuesto (CCD, 2<sup>3</sup>+estrella), aplicando volúmenes de muestra en el rango 3-10 mL, masas de material magnético comprendidas entre 10 y 50 mg y volúmenes de disolvente de desorción de 1,5 a 5 mL. Los resultados obtenidos mostraron como condiciones óptimas 50 mg de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@MWCNTs mantenidos en contacto con 10 mL de disolución de muestra y sometidos a desorción en 1,5 mL de AcN. La superficie de respuesta obtenida para este estudio se muestra en la Figura II.5. En resumen, los resultados indican que un aumento



en la masa de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MWCNTs}$  y en el volumen de muestra tiene un efecto positivo en el análisis, mientras que un aumento del volumen de AcN en la etapa de desorción provoca el efecto contrario, lo que probablemente se debe a un efecto de dilución.



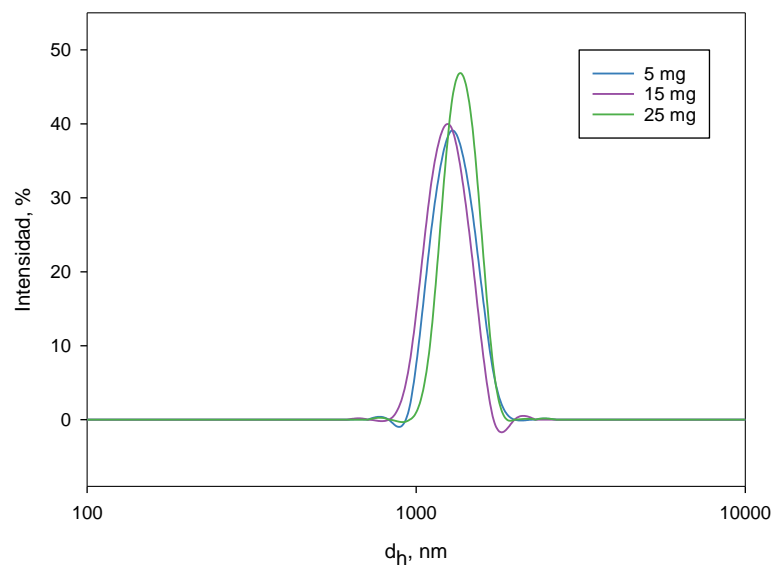
**Figura II.5.** Superficie de respuesta obtenida para la optimización del volumen de disolución de muestra, masa del nanomaterial magnético y volumen de disolvente de desorción en DMSPE.

Finalmente, con el objetivo de incrementar la sensibilidad del método, se estudió la posibilidad de evaporar la fase de AcN obtenida en la etapa de desorción y reconstituirla en un volumen de AcN más pequeño. Se seleccionó la reconstitución en un volumen de AcN de 50  $\mu\text{L}$ , ya que permitía una recuperación total y precisa del residuo seco. Volúmenes de AcN más bajos no permitieron una buena la recuperación del extracto, y el uso de volúmenes mayores de 50  $\mu\text{L}$  conducirían a la dilución del extracto, por lo que no se estudiaron.

### II.3.2. CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL MAGNÉTICO

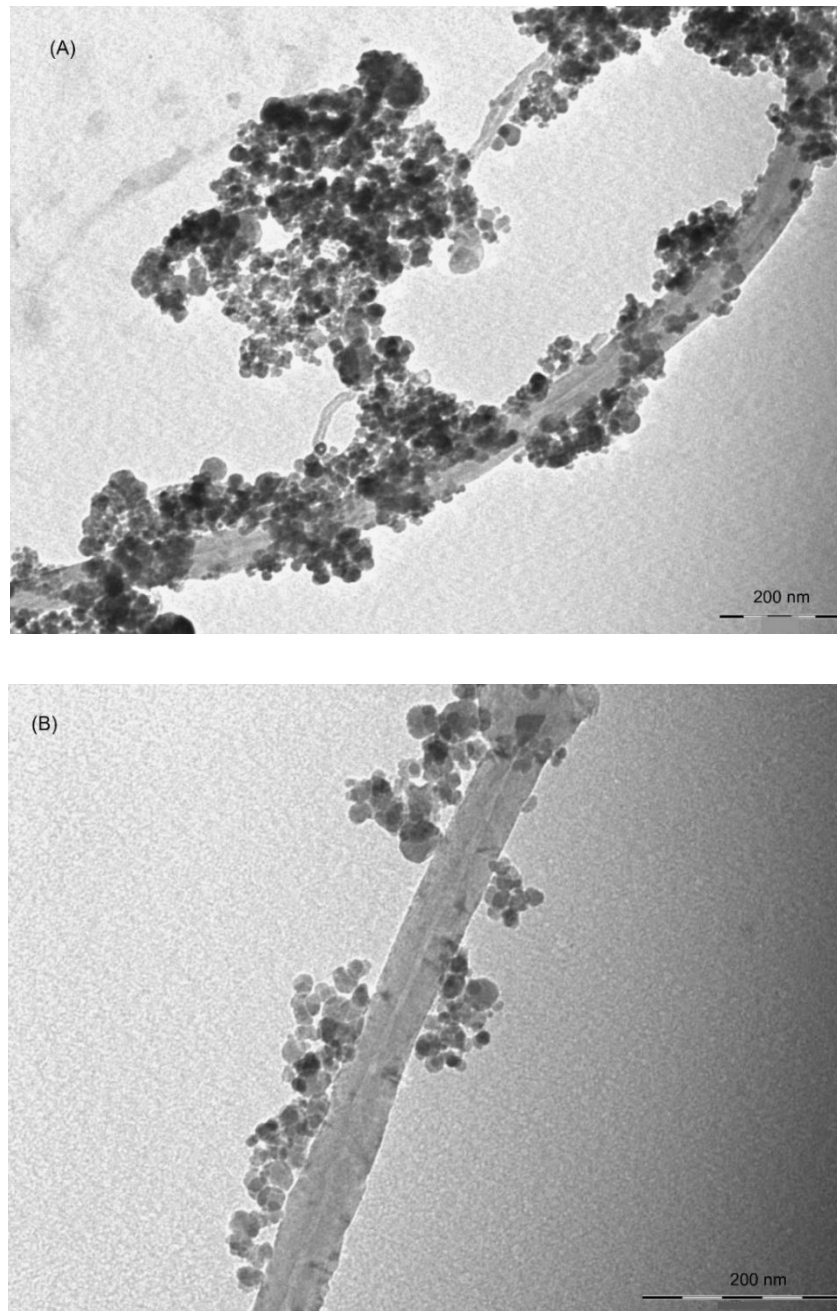
El nanomaterial seleccionado ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MWCNTs}$ ) para el procedimiento DMSPE propuesto había sido caracterizado previamente por Arroyo-Manzanares *et al.* [21], mediante las técnicas de espectroscopia de rayos X de energía dispersiva, difracción de rayos X, microscopia electrónica de barrido (SEM) y espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR). Además de estas técnicas, se han realizado otros estudios para obtener información adicional sobre el material magnético y mejorar así su caracterización. Para ello, se han aplicado las técnicas de DLS y TEM.

Las medidas por DLS se llevaron a cabo por adición de tres masas diferentes de 5, 15 y 25 mg de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MWCNTs}$  a 2 mL de agua y aplicando un solo ciclo de 16 medidas, sin necesidad de aplicar un tiempo de equilibrio dado que las muestras se encontraban inicialmente ya a temperatura ambiente. Bajo estas condiciones, los valores de diámetro hidrodinámico obtenidos ( $d_h$ ) fueron 1316, 1245 y 1372 nm para cada una de las tres cantidades de nanopartículas medidas, resultando un diámetro promedio de 1311 nm (Figura II.6). Los valores del potencial Z se obtuvieron bajo las mismas condiciones experimentales que las aplicadas para la medida del parámetro  $d_h$ . Los valores obtenidos fueron -4,52, 2,74 y 0,252 mV. Estos valores muestran que la carga superficial del nanomaterial está próxima a cero, lo que pone de manifiesto la ausencia de fuerzas de repulsión electrostática cuya función es la de prevenir la agregación. Es por ello por lo que las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MWCNTs}$  tienden a agregar y, por esta razón, se recomienda mantener una agitación continua durante la etapa de adsorción en el procedimiento de DMSPE.



**Figura II.6.** Distribución de tamaño obtenida de una suspensión de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MWCNTs}$  a diferentes concentraciones.

Las imágenes obtenidas por TEM que se observan en las Figuras II.7A y B se corresponden con una escala de 200 nm y en ellas se aprecian dos regiones diferentes del material disperso, lo que permite apreciar que las microesferas de ferrita de unos 35-95 nm de diámetro se encuentran inmobilizadas de forma aleatoria sobre la cara externa de las paredes de los MWCNTs, como ya se había observado mediante SEM [21]. Además, las imágenes proporcionadas por TEM muestran que los MWCNTs no tienen tendencia a la agregación mientras que este efecto si se observa en el caso de las microesferas de ferrita.



**Figura II.7.** Imágenes TEM de dos regiones diferentes de nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @MWCNTs con una escala de 200 nm.

### II.3.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO Y ANÁLISIS DE MUESTRAS DE SUERO

El método desarrollado se validó en términos de linealidad, límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs), exactitud y precisión. Las curvas de calibración para cada uno de los tres capsaicinoides se obtuvieron por el método del estándar interno (IS) usando CADB (25 µg/L), para el que previamente se había comprobado que no estaba contenido en las muestras bajo análisis y que además presenta un comportamiento cromatográfico y químico similar al de los analitos. Bajo estas condiciones seleccionadas, el tiempo de retención de CADB fue de 1,72 min. Los análisis de regresión lineal se realizaron representando la relación entre el área de pico de cada analito y el área de pico del IS frente a la concentración de analito para ocho niveles diferentes de concentración, y realizando cada análisis por duplicado. Los analitos mostraron un rango de linealidad de 0,3-300 µg/L, dependiendo del compuesto (Tabla II.2). Los valores del coeficiente de correlación obtenidos fueron en todos los casos superiores a 0,996.

**Tabla II.2.**

Características analíticas del método propuesto.

Compuesto	$t_R$ (min)	Linealidad (µg/L)	$R^2$	LOD <sup>a</sup> (µg/L)	RSD <sup>b</sup> (%)	
					5 µg/L	50 µg/L
PCAP	3,502	0,6-300	0,998	0,17	11	3,7
CAP	3,536	0,3-300	0,999	0,10	11	3,4
DCAP	5,009	0,5-300	0,996	0,15	9,5	5,8

<sup>a</sup> Calculado para una relación señal/ruido igual a 3

<sup>b</sup> n=7 (mismo día)

Dado que la presencia de ciertas sustancias co-extraídas de las muestras junto con los analitos puede afectar a la respuesta del sistema de detección, se estudió el posible efecto matriz por comparación de las pendientes obtenidas por calibración acuosa con las obtenidas aplicando el método de adiciones estándar a dos muestras de suero diferentes (Tabla II.3). Para este propósito, se utilizó una prueba estadística de tipo ANOVA. La ausencia de efecto matriz se vio confirmada ya que los valores “p” obtenidos fueron en todos los casos superiores a 0,05 con un nivel de confianza del 95%. Por tanto, la cuantificación de la muestra se llevó a cabo mediante calibración acuosa.

**Tabla II.3.**

Pendientes<sup>a</sup> (L/μg) de las gráficas de calibración mediante adiciones estándar a las muestras.

Compuesto	Acuoso	Suero 1	Suero 2
PCAP	0,0066±0,0001	0,0091±0,0001	0,0105±0,0006
CAP	0,0100±0,0002	0,0126±0,0001	0,0146±0,0009
DCAP	0,0091±0,0001	0,0122±0,0003	0,0129±0,0002

<sup>a</sup> Valor medio ± desviación estándar (n=8)

La sensibilidad del método se evaluó calculando los LODs y LOQs para una relación señal/ruido de 3 y 10, respectivamente. Los valores de LODs obtenidos se encontraron en el rango 0,1-0,17 μg/L, mientras que los correspondientes valores obtenidos para los LOQs se hallaron entre 0,33 y 0,57 μg/L (Tabla II.2). La repetibilidad del método se estudió como la desviación estándar relativa (RSD) para una serie de siete análisis consecutivos de una muestra de suero fortificada a 5 y 50 μg/L. Los valores de RSD oscilaron entre 9,5-11% y 3,4-5,8% para el nivel de concentración más bajo y elevado, respectivamente (Tabla II.2).

Debido a la indisponibilidad de materiales de referencia certificados, se realizaron estudios de recuperación para evaluar la exactitud del método. Para ello, se fortificaron dos muestras diferentes a 5 y 50 μg/L cuyos análisis proporcionaron unos valores de recuperación en los intervalos 97,0-99,4 y 94,6-96,9% para los niveles más bajo y alto, respectivamente.

La Tabla II.4 muestra una comparación del método desarrollado en este Capítulo con otros previamente publicados en la bibliografía y que también abordan la determinación de capsaicinoides en muestras de suero y plasma. Como se puede observar, solo un estudio previo aborda el análisis de suero humano [6], el resto se centran en suero animal. Además, el método presentado es el primero en el que se hace uso de HRMS, lo que permite una búsqueda metabolómica para las medidas de masa exacta de posibles compuestos relacionados con los capsaicinoides o bien los obtenidos como resultado de su metabolismo. Así, el método propuesto supone una mejora metodológica con respecto al uso de espectrometría de masas de baja resolución. En lo que a la sensibilidad del método se refiere, se obtuvieron LODs más bajos que los obtenidos mediante tratamientos de muestra tradicionales como SPE seguido de análisis por HPLC-FLD [8] y LLE con análisis por HPLC-UV [6], utilizando en este último caso un volumen de muestra cuatro veces superior al propuesto en el presente Capítulo. Si bien es cierto que MS en tándem (MS/MS) con analizador de triple cuadrupolo (QqQ) [13-15] proporciona LODs más bajos, HRMS permite la búsqueda de compuestos bajo análisis no

dirigido. Además, el tratamiento de muestra basado en LLE hace uso de disolventes tóxicos como los organoclorados [14, 15] o metil tert-butil éter [13] cuya elevada volatilidad hace que debiera manejarse bajo unas condiciones en las que la precisión del método no se viera comprometida. Al comparar la técnica DMSPE con SPE, se observa que la dispersión de la fase extractante en la disolución de la muestra permite la obtención de una mejor recuperación del analito.

Por otro lado, la principal ventaja del uso de nanopartículas mediante DMSPE sobre las fases extractantes empaquetadas utilizadas en SPE es su reutilizabilidad. Con respecto a la precisión del método, el tratamiento de muestra por DMSPE aquí propuesto proporciona valores de repetibilidad similares a los obtenidos por otras metodologías basadas en la extracción en fase líquida. Por lo que respecta a los dos procedimientos de DMSPE descritos previamente en la bibliografía para la determinación de capsaicinoides en aceites, destaca que la sensibilidad alcanzada con el método aquí desarrollado es similar a pesar de que se usa un sistema de detección de mayor sensibilidad, basado en MS/MS con QqQ [17] o al uso de materiales adsorbentes específicos como polímeros de impresión molecular [9].

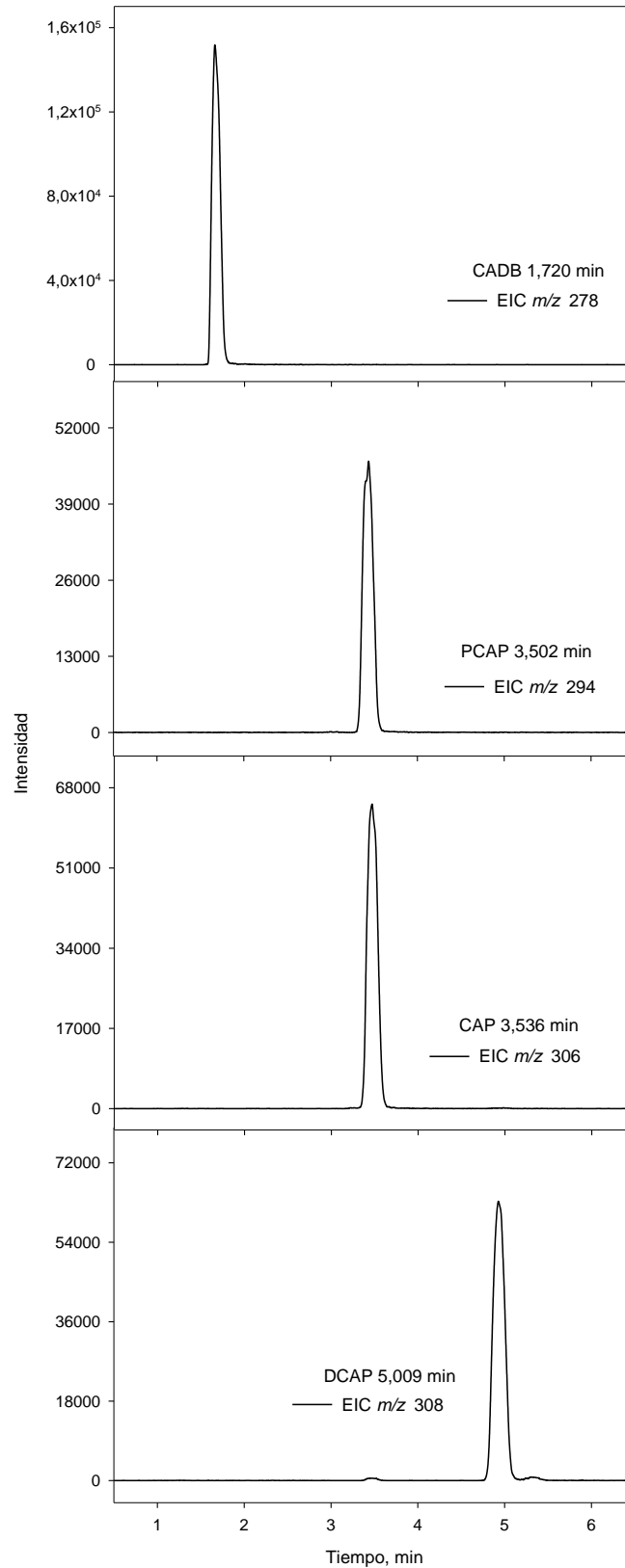
Bajo las condiciones finalmente seleccionadas, se analizaron diez muestras de suero humano procedentes de pacientes que habían sido tratados previamente con cremas y pomadas a base de capsaicina haciendo uso del método DMSPE con UHPLC-Q-TOF-MS propuesto. En ninguna de las muestras se detectaron los analitos objeto de estudio (CAP, DCAP y PCAP), al menos por encima de sus correspondientes LODs. La Figura II.8 muestra los cromatogramas EICs obtenido tras la aplicación del método desarrollado a una muestra de suero fortificado a 5 µg/L.

**Tabla II.4.**

Comparación del método propuesto con otros publicados para la determinación de capsaicoides en suero y plasma.

Analitos	Cantidad y naturaleza de la muestra	Tratamiento de la muestra y consumo total de disolvente orgánico	Medida instrumental	LOD ( $\mu\text{g/L}$ )	RSD <sup>b</sup> (%)	Ref.
CAP, DCAP	Suero y plasma humano (2 mL)	LLE con 2 mL de MIBK. 0,2 mL AcN para reconstituir el extracto seco	HPLC-UV (205 nm)	2,6, 3,8	9,1, 7,4	[6]
CAP, DCAP	Plasma de perro (0,5 mL)	Precipitación de proteínas (0,5 mL AcN) y SPE (3 mL MeOH). 50 $\mu\text{L}$ AcN para reconstituir el extracto seco	HPLC-FLD (230; 323 nm)	2	3,0, 0,4	[8]
CAP, DCAP	Plasma equino (1 mL)	LLE con 5 mL metil tert-butil éter. 60 $\mu\text{L}$ MeOH para reconstituir el extracto seco	UHPLC-QqQ-MS/MS with ESI+	0,0005	1,9-18,1	[13]
CAP, DCAP	Plasma de conejo (0,1 mL)	LLE con 1 mL N-hexano:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :isopropanol (100:50:5). 90 $\mu\text{L}$ AcN para reconstituir el extracto seco	HPLC-QqQ-MS/MS con ESI+	0,125 <sup>a</sup>	5,6-7,5	[14]
CAP, DCAP	Suero de caballo (0,2 mL)	LLE con 1(x5) mL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> . 25 $\mu\text{L}$ MeOH para reconstituir el extracto seco	UHPLC-QqQ-MS/MS con ESI+	0,0005, 0,001 <sup>a</sup>	No proporcionados	[15]
CAP, DCAP, PCAP	Suero humano (0,5 mL)	Precipitación de proteínas (1 mL AcN) y DMSPE (1,5 mL AcN). 50 $\mu\text{L}$ AcN para reconstituir el extracto seco	UHPLC-Q-TOF-MS con ESI+	0,10, 0,15, 0,17	3,4-11	Este trabajo

<sup>a</sup> Límite de cuantificación más bajo. <sup>b</sup> Estudios de repetibilidad



**Figura II.8.** Cromatogramas de iones extraídos (EICs) para los capsaicinoides y el IS obtenidos tras la aplicación del método DMSPE con UHPLC-HRMS para una muestra de suero fortificada a 5  $\mu\text{g/L}$ .

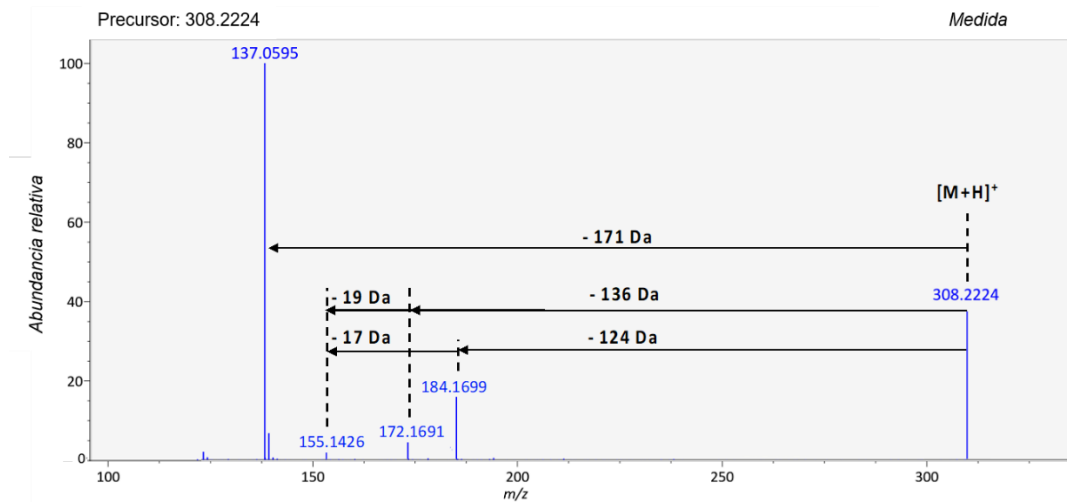


El análisis de muestras de suero de animales expuestos tópicamente a estos compuestos ha sido previamente considerado por otros autores. Así, Wang *et al.* [14], concluyeron que se produce una muy baja absorción en el sistema circulatorio de conejos ya que detectaron altos niveles en la piel, pero insignificantes en suero. Es destacable también el estudio de Kuzma *et al.* [8], que, aun considerando la situación ideal de una biodisponibilidad y recuperación del 100%, los capsaicinoides no se detectaron en suero de perro. De hecho, estos resultados se hallan en consonancia con otros estudios anteriores en los que se demuestra que la acumulación intestinal y el metabolismo hepático limitan los efectos farmacológicos sistémicos de los capsaicinoides. You *et al.* [13] y Zak *et al.* [15] analizaron plasma de caballo mediante HPLC-QqQ-MS, detectando contenidos de CAP a concentraciones muy bajas. Consecuentemente, nuestro procedimiento proporciona nuevos datos que confirman que tampoco aparecen niveles detectables de capsaicinoides en suero humano tras exposición tópica, aunque podrían incrementarse después de otros tipos de exposición.

#### II.3.4. ESTUDIO NO DIRIGIDO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS DERIVADOS DE CAPSAICINOIDES

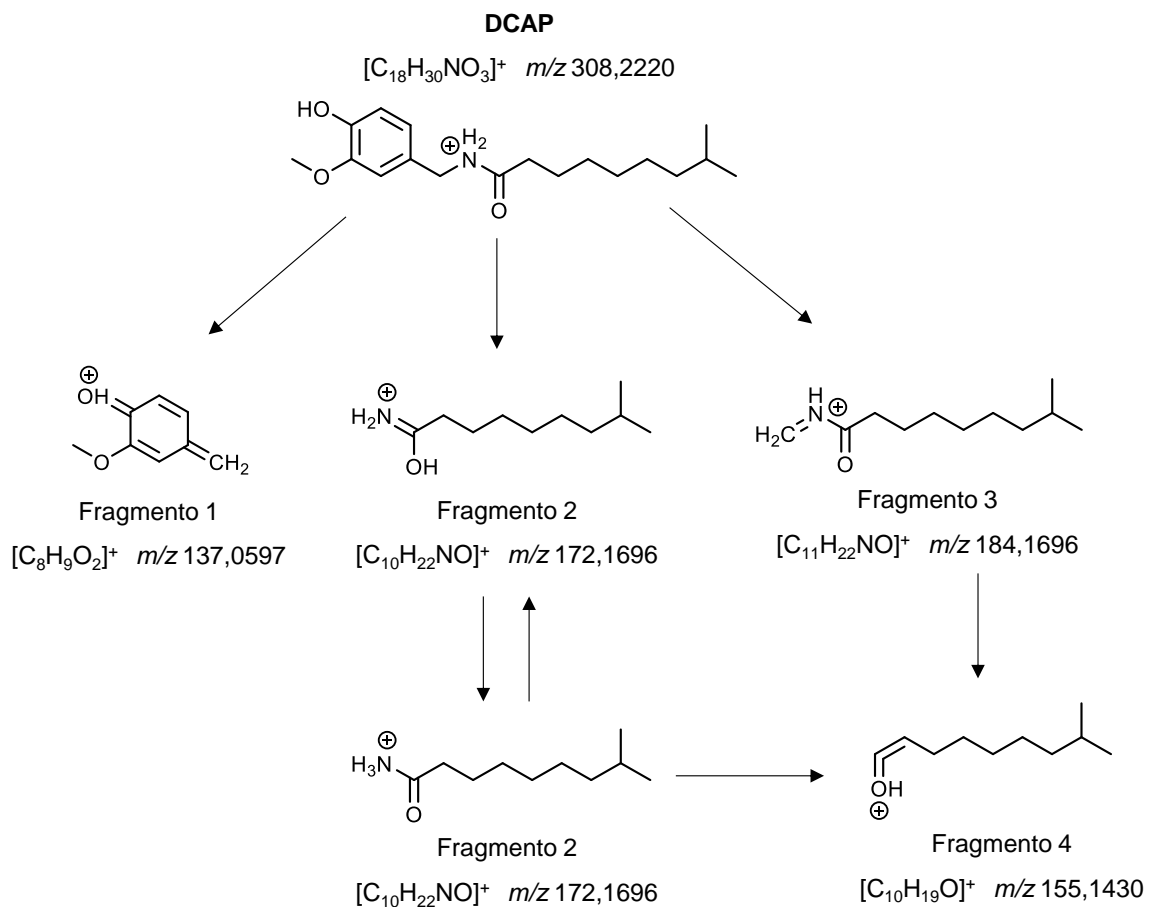
Antes de llevar a cabo el estudio no dirigido y con el objetivo de establecer una ruta para la identificación de compuestos derivados de capsaicinoides, se estudió la fragmentación de CAP, DCAP y PCAP.

La Figura II.9 muestra el espectro completo de HRMS/MS del precursor DCAP ( $m/z$  308), que se caracteriza por cuatro fragmentos principales. El ion padre con  $m/z$  308,2224 (error 1,2 ppm) sufre una escisión del enlace en la posición C7-N8 dando lugar al ion  $m/z$  137,0595, asignado como  $C_8H_9O_2^+$  (error -1,5 ppm) y que está involucrado en un reagrupamiento de los dobles enlaces de la estructura del anillo aromático, y al ion con  $m/z$  172,1691, que se corresponde con la cadena de acilo que resulta de la eliminación del anillo aromático ( $C_{10}H_{22}NO^+$ , error -2,8 ppm). Se observó también un ion de  $m/z$  155,1426 ( $C_{10}H_{17}O^+$ , error -2,8 ppm) correspondiente a la pérdida de amoniaco del ion  $m/z$  172,1691. Finalmente, también se observó el ion con  $m/z$  184,1699 al que se le asignó la fórmula  $C_{11}H_{22}NO^+$  (error 1,7 ppm). Este ion se corresponde con la pérdida del anillo aromático a partir del precursor DCAP y sufrió la pérdida posterior de  $-CH_2NH$  dando lugar nuevamente al ion  $m/z$  155,1426.



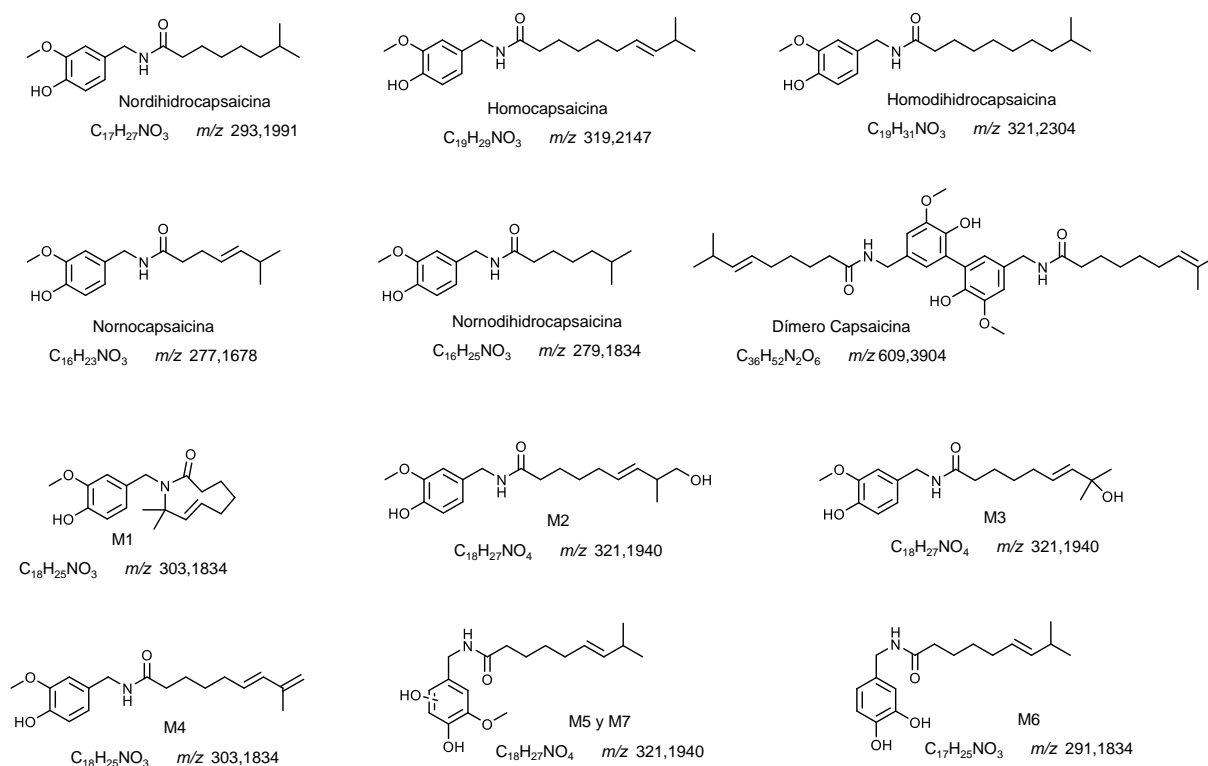
**Figura II.9.** Espectro HRMS/MS del estándar de DCAP.

La ruta de fragmentación de DCAP se muestra en la Figura II.10. CAP y DCAP presentaron el mismo patrón de fragmentación, lo que se halla en consonancia con lo descrito en bibliografía.



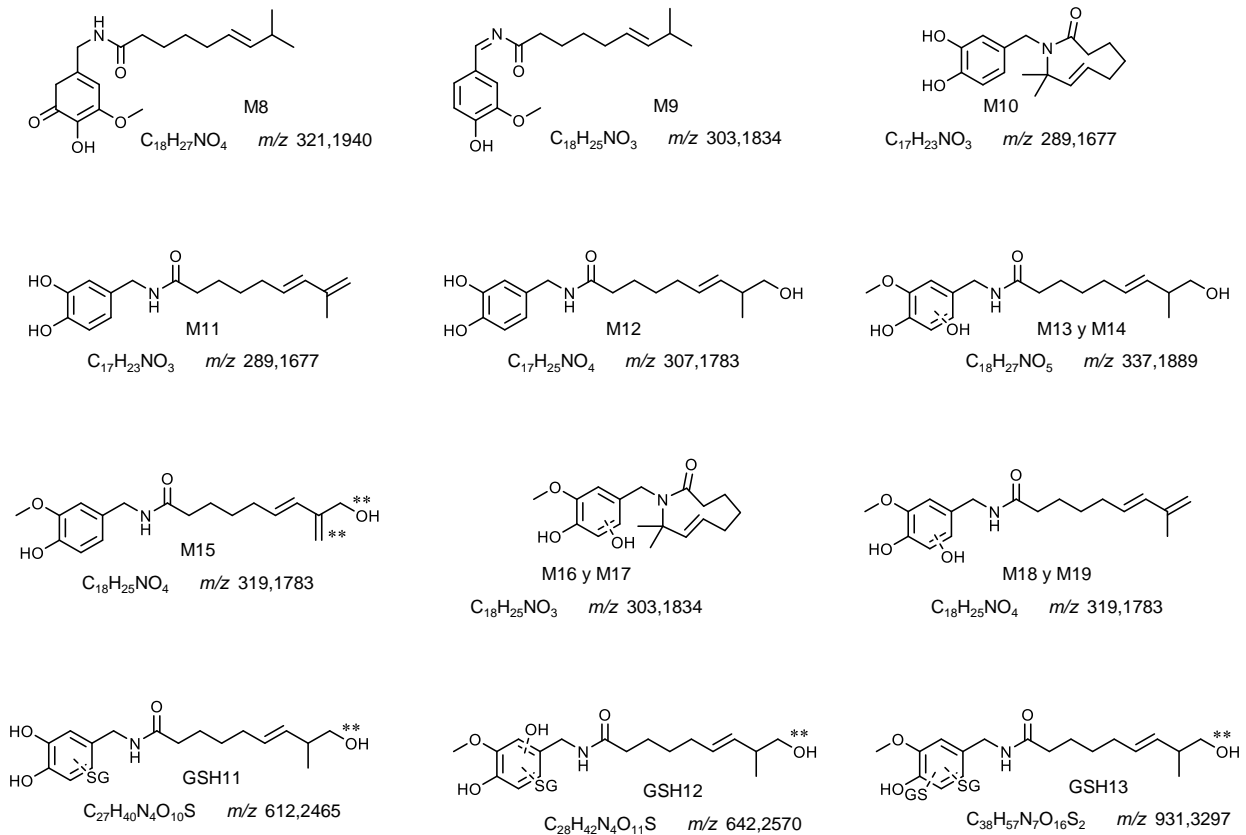
**Figura II.10.** Ruta de fragmentación de DCAP.

Hasta la fecha se han descrito 31 compuestos de la familia de la CAP o derivados de su metabolización. La Figura II.11 recoge un listado de las estructuras de todos estos derivados junto con su fórmula molecular y su masa exacta. Los compuestos M1-M19 derivan de la ruta metabólica de CAP. La mayor parte de ellos tienen la misma estructura basada en un anillo aromático y la cadena de acilo, por lo que se espera que sigan la misma ruta de fragmentación que CAP, DCAP y PCAP. Sin embargo, los compuestos M1, M10, M16 y M17 presentan en su estructura un remplazamiento de la cadena por una estructura cíclica unida al grupo -NH. La fragmentación de estos compuestos también se ha evaluado haciendo uso del espectro de HRMS/MS y de la información disponible en la bibliografía [29, 30].



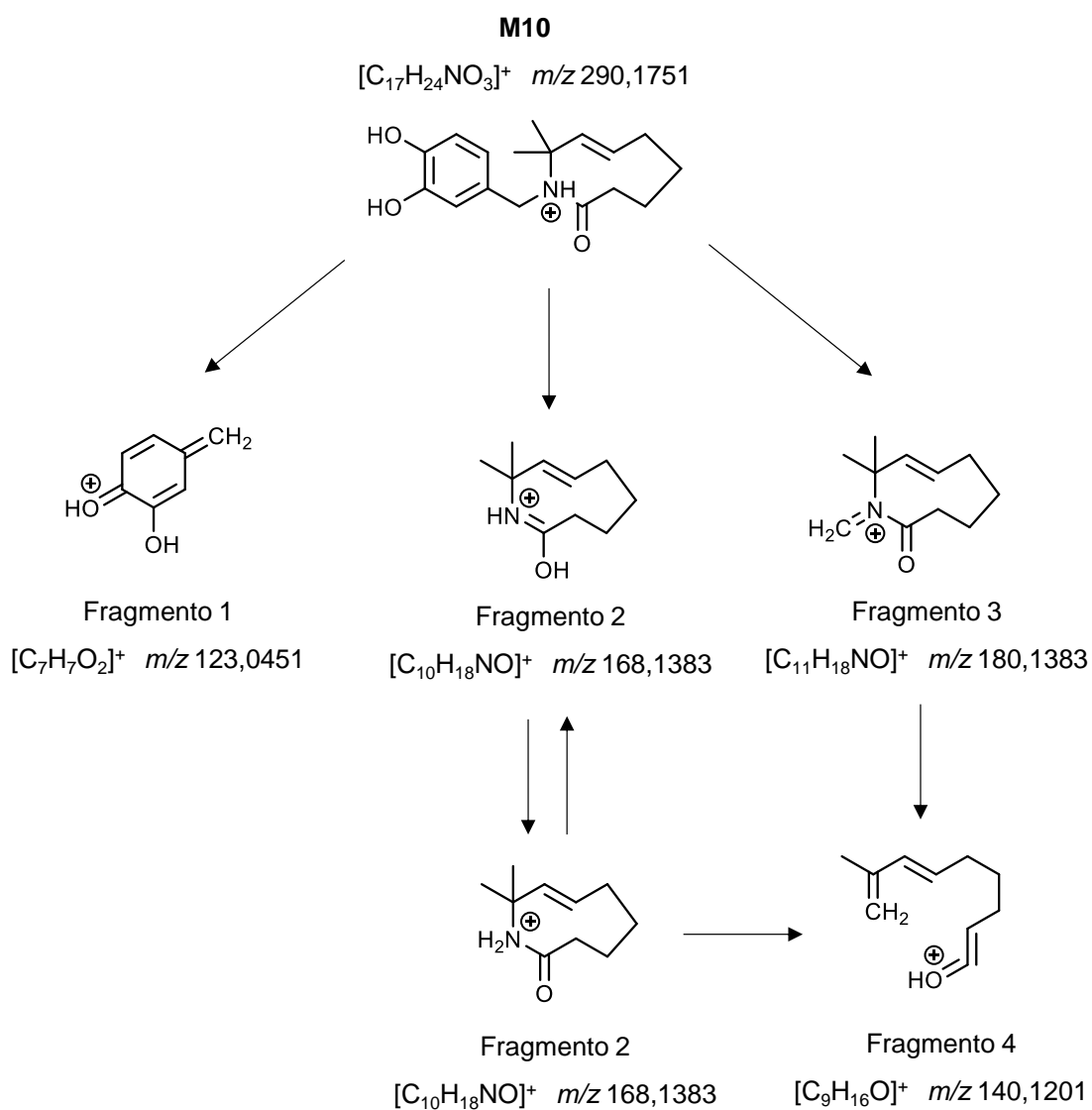
**Figura II.11.** Estructuras, fórmula molecular y masa exacta de los compuestos derivados de capsaicinoides.

## Continuación Figura II.11



**Figura II.11.** Estructuras, fórmula molecular y masa exacta de los compuestos derivados de capsaicinoides.

Como se puede ver, la fragmentación sigue una ruta similar a la de DCAP. La Figura II.12 muestra la ruta de fragmentación propuesta para el compuesto M10. Al igual que DCAP el ion padre de  $m/z$  290,1751 sufre la ruptura del enlace ubicado en la posición C7-N8 dando lugar al ion de  $m/z$  123,0440 ( $C_7H_7O_2^+$ ), correspondiente al anillo aromático, y al ion de  $m/z$  168,1383 ( $C_{10}H_{18}NO^+$ ), correspondiente al acilo cíclico, el cual subsecuentemente produce un ion de  $m/z$  151,1117 ( $C_{10}H_{15}O^+$ ) por la pérdida de  $NH_3$ . Finalmente, también se detectó el ion correspondiente a la pérdida del anillo aromático a partir del precursor M10 ( $m/z$  180,1383,  $C_{11}H_{18}NO^+$ ).



**Figura II.12.** Ruta de fragmentación del compuesto M10.

Por tanto, se puede concluir que hay cuatro iones principales que dominan el espectro de fragmentación de los compuestos derivados de capsaicinoides. En la Tabla II.5 aparecen las masas exactas y las fórmulas moleculares de los cuatro iones principales para todos los derivados descritos en la bibliografía [29, 30]. Basándonos en esta información, se propuso una estrategia para la identificación de compuestos derivados de capsaicinoides nuevos o poco estudiados (Figura II.13).

El fragmento 1 es el ion principal en el espectro de HRMS/MS y permite la identificación del anillo aromático presente en la estructura. El ion  $m/z$  137,0597 se corresponde con la estructura de CAP y, por tanto, está presente en todos los compuestos que comparten parte de su

estructura con la de CAP. El ion  $m/z$  153,0546 implica una hidroxilación en el anillo aromático mientras que el ion  $m/z$  123,0440 implica una O-desmetilación. Los compuestos M8 y M9 presentan los iones  $m/z$  168,0655 y 152,0760, respectivamente, lo que indica que el anillo aromático experimenta una fragmentación reteniendo el grupo -NH en su estructura. En el caso de M8, esto se debe a que este presenta un enlace C=O adicional en su anillo aromático, lo que impide el reagrupamiento de los dobles enlaces.

En el caso del compuesto M9, este presenta un doble enlace en el grupo -NH, lo que a su vez dificulta la ruptura de la unión C7-N8. La Tabla II.6 muestra la estructura del fragmento 1 de todos los compuestos descritos para la familia de CAP. La observación del segundo ion más abundante en HRMS/MS permite la identificación del resto de la estructura de los compuestos relacionados con capsaicinoides, como se puede ver en la Figura II.13. La presencia de un asterisco (\*) en una de las estructuras descritas en la Figura II.13 indica que la posición del doble enlace y del grupo hidroxilo no está determinada.

**Tabla II.5.** Iones predominantes en el espectro HRMS/MS de los compuestos derivados de capsaicinoides.

Compuesto	[M+H] <sup>+</sup>		Fragmento 1		Fragmento 2		Fragmento 3		Fragmento 4	
	Fórmula molecular	m/z	Fórmula molecular	m/z	Fórmula molecular	m/z	Fórmula molecular	m/z	Fórmula molecular	m/z
CAP	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> NO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	306,2064	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	137,0597	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> NO <sup>+</sup>	170,1539	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> NO <sup>+</sup>	182,1539	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> O <sup>+</sup>	153,1274
DCAP	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> NO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	308,2220	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	137,0597	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub> NO <sup>+</sup>	172,1696	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> NO <sup>+</sup>	184,1694	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> O <sup>+</sup>	155,1430
PCAP	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> NO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	294,2064	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	137,0597	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> NO <sup>+</sup>	158,1539	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> NO <sup>+</sup>	170,1539	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> O <sup>+</sup>	141,1274
NDCAP	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> NO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	294,2065	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	137,0597	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> NO <sup>+</sup>	158,1539	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> NO <sup>+</sup>	170,1539	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> O <sup>+</sup>	141,1274
HCAP	C <sub>19</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	320,2220	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	137,0597	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> NO <sup>+</sup>	184,1694	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> NO <sup>+</sup>	196,1696	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> O <sup>+</sup>	167,1429
HDCAP	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> NO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	322,2383	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	137,0597	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> NO <sup>+</sup>	186,1857	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> NO <sup>+</sup>	198,1859	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sup>+</sup>	169,1592
NDCAP	C <sub>16</sub> H <sub>26</sub> NO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	280,1907	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	137,0597	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> NO <sup>+</sup>	144,1388	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> NO <sup>+</sup>	156,1388	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sup>+</sup>	151,1117
NCAP	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	278,1751	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	137,0597	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> NO <sup>+</sup>	142,1226	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> NO <sup>+</sup>	154,1226	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> O <sup>+</sup>	149,0961
M1	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> NO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	304,1907	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	137,0597	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> NO <sup>+</sup>	168,1383	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> NO <sup>+</sup>	180,1383	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sup>+</sup>	151,1117
M2	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> NO <sub>4</sub> <sup>+</sup>	322,2013	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	137,0597	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	186,1489	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	198,1494	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	169,1223

**Tabla II.5. (Continuación)**  
Iones predominantes en el espectro HRMS/MS de los compuestos derivados de capsaicinoides.

Compuesto	[M+H] <sup>+</sup>		Fragmento 1		Fragmento 2		Fragmento 3		Fragmento 4	
	Fórmula molecular	m/z	Fórmula molecular	m/z	Fórmula molecular	m/z	Fórmula molecular	m/z	Fórmula molecular	m/z
M3	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> NO <sub>4</sub> <sup>+</sup>	322,2013	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	137,0597	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	186,1489	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	198,1494	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	169,1223
M4	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> NO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	304,1913	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	137,0597	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> NO <sup>+</sup>	168,1383	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> NO <sup>+</sup>	180,1383	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sup>+</sup>	151,1117
Isómeros M5 y M7	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> NO <sub>4</sub> <sup>+</sup>	322,2019	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub> <sup>+</sup>	153,0546	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> NO <sup>+</sup>	170,1539	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> NO <sup>+</sup>	182,1539	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> O <sup>+</sup>	153,1274
M6	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> NO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	292,1913	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	123,0440	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> NO <sup>+</sup>	170,1539	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> NO <sup>+</sup>	182,1539	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> O <sup>+</sup>	153,1274
M8	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> NO <sub>4</sub> <sup>+</sup>	322,2019	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	168,0655	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> NO <sup>+</sup>	170,1539	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> NO <sup>+</sup>	182,1539	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> O <sup>+</sup>	153,1274
M9	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> NO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	304,1907	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	152,0760	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> NO <sup>+</sup>	168,1383	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> NO <sup>+</sup>	180,1383	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sup>+</sup>	151,1117
M10	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	290,1751	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	123,0440	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> NO <sup>+</sup>	168,1383	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> NO <sup>+</sup>	180,1383	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sup>+</sup>	151,1117
M11	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	290,1751	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	123,0440	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> NO <sup>+</sup>	168,1383	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> NO <sup>+</sup>	180,1383	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sup>+</sup>	151,1117
M12	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> NO <sub>4</sub> <sup>+</sup>	308,1856	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	123,0440	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	186,1489	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	198,1494	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	169,1223



**Tabla II.5. (Continuación)**

iones predominantes en el espectro HRMS/MS de los compuestos derivados de capsaicinoides.

Compuesto	[M+H] <sup>+</sup>		Fragmento 1		Fragmento 2		Fragmento 3		Fragmento 4	
	Fórmula molecular	m/z	Fórmula molecular	m/z	Fórmula molecular	m/z	Fórmula molecular	m/z	Fórmula molecular	m/z
Isómeros M13 y M14	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> NO <sub>5</sub> <sup>+</sup>	338, 1962	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub> <sup>+</sup>	153, 0546	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	186, 1489	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	198, 1494	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	169, 1223
M15	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> NO <sub>4</sub> <sup>+</sup>	320, 1856	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	137, 0597	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	184, 1338	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	196, 1338	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	167, 1082
Isómeros M16 y M17, isómeros M18 y M19	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> NO <sub>4</sub> <sup>+</sup>	320, 1856	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub> <sup>+</sup>	153, 0546	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> NO <sup>+</sup>	168, 1383	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> NO <sup>+</sup>	180, 1383	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sup>+</sup>	151, 1117
NDCAP: Nordihidrocapsaicina, HCAP: Homocapsaicina, HDCAP: Homodihidrocapsaicina, NDCAP: Norrodihidrocapsaicina,										
NCAP: Nornocapsaicina										

**Identificación de la estructura del anillo aromático**

Posibles compuestos derivados de los capsaicinoides

↑

¿Cuál es el ion más abundante en el espectro de HRMS/MS?

↑

Obsérvese el fragmento 3, el segundo ion más abundante presente en el espectro de HRMS/MS

→

Fragmento 1 <i>m/z</i>	Estructura del anillo aromático	Fragmento 3 <i>m/z</i>	Cadena de acilo	Fragmento 3 <i>m/z</i>	Cadena de acilo
137,0597		154,1226		182,1539	
153,0546		156,1388		184,1694	
123,0440		170,1539		196,1696	
168,0655				196,1338	
152,0760		180,1383		198,1494	

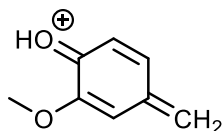
**Figura II.13.** Estrategia propuesta para la identificación de nuevos compuestos derivados de capsaicinoides. \* indica que la posición del doble enlace y el grupo hidroxilo no han sido determinadas.

La estrategia descrita anteriormente se aplicó a la detección de posibles derivados o productos del metabolismo de los capsaicinoides en las muestras de suero analizadas. Con este propósito, los datos adquiridos usando el método *all-ion* se procesaron siguiendo un enfoque no dirigido. Para el procesamiento de los datos, se utilizó el software libre MS-DIAL y se aplicó una metodología basada en metabolómica. Para los compuestos M1 y M2 se utilizaron unas masas de tolerancia de 0,01 y 0,025 Da, respectivamente.

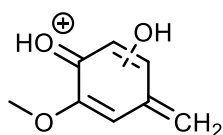
La deconvolución se llevó a cabo usando un valor de ventana de 0,5. Para la identificación de los picos se creó una base de datos con la información de los compuestos descritos en la Tabla II.5, permitiendo una tolerancia de masa exacta de 0,01 Da y un valor mínimo de corte de 85% para la identificación. Para incrementar el rango de monitorización, se consideraron las conjugaciones más importantes resultantes de la biotransformación en el organismo, por lo que se incluyeron en la base de datos los conjugados con glutatión (GSH), glucurónido (G) y sulfato (S), así como el dímero de CAP. Después de la identificación, el alineamiento de la muestra se llevó a cabo usando un tiempo de retención de 0,05 min y una tolerancia de MS1 de 0,015 Da.

**Tabla II.6.**

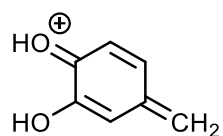
Fragmentos del ion 1 para los compuestos derivados de capsaicinoides conocidos.



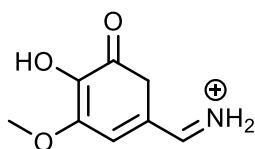
CAP, DCAP, PCAP, NDCAP, HCAP, HDCAP, NCAP, NDCAP, M1, M2, M3, M4, M15

 $C_8H_9O_2^+$   $m/z$  137,0597

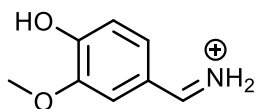
M5, M7, M13, M14, M16, M17, M18, M19

 $C_8H_9O_3^+$   $m/z$  153,0546

M6, M10, M11, M12

 $C_7H_7O_2^+$   $m/z$  123,0440

M8

 $C_8H_{10}NO_3^+$   $m/z$  168,06552

M9

 $C_8H_{10}NO_2^+$   $m/z$  152,0760

## II.4. CONCLUSIONES

El nanomaterial magnético a base de ferrita y MWCNTs seleccionado ha demostrado una excelente eficiencia para el aislamiento de CAP, DCAP y PCAP contenidos en muestras de suero humano mediante DMSPE, ofreciendo un alto grado de selectividad y sensibilidad. La combinación UHPLC-Q-TOF-MS permite la identificación de capsaicinoides con un error mínimo de acuerdo con los valores de masa exacta experimentales. Los datos obtenidos por HRMS/MS junto con la estrategia de identificación propuesta permiten la identificación de compuestos derivados de capsaicinoides nuevos o poco conocidos, siendo una herramienta de gran utilidad para estudios metabolómicos de esta familia de compuestos, lo que podría permitir una mejora del conocimiento sobre su toxicidad y el impacto de estos en la salud.

## II.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. S. Antonio, L. S. M. Wiedemann, V. F. Veiga Jr., Food Pungency: The evolution of methods for capsaicinoid analysis, *Food Anal. Methods* 12 (2019) 1327-1345, <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01470-2>.
- [2] Ł. Adaszek, D. Gadomska, Ł. Mazurek, P. Łyp, J. Madany, S. Winiarczyk, Properties of capsaicin and its utility in veterinary and human medicine, *Res. Vet. Sci.* 123 (2019) 14-19, <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.12.002>.
- [3] X. J. Luo, J. Peng, Y. J. Li, Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids, *Eur. J. Pharmacol.* 650 (2011) 1-7, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.074>.
- [4] M. K. Meghvansi, S. Siddiqui, M. H. Khan, V. K. Gupta, M. G. Vairale, H. K. Gogoi, L. Singh, Naga chilli: A potential source of capsaicinoids with broad-spectrum ethnopharmacological applications, *J. Ethnopharmacol.* 132 (2010) 1-14, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.08.034>.
- [5] A. Peña-Alvarez, E. Ramírez-Maya, L. A. Alvarado-Suárez, Analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin in peppers and pepper sauces by solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2483-2847, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.053>.
- [6] T. Hartley, B. Stevens, K. D. K. Ahuja, M. J. Ball, Development and experimental application of an HPLC procedure for the determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in serum samples from human subjects, *Indian J. Clin. Biochem.* 28 (2013) 329-335, <https://doi.org/10.1007/s12291-013-0297-0>.

- [7] M. Kuzma, K. Fodor, G. Maász, P. Avar, G. Mózsik, T. Past, E. Fischer, P. Perjési, A validated HPLC-FLD method for analysis of intestinal absorption and metabolism of capsaicin and dihydrocapsaicin in the rat, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 103 (2015) 59-66, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.10.007>.
- [8] M. Kuzma, K. Fodor, A. Almási, G. Mózsik, T. Past, P. Perjési, Toxicokinetic study of a gastroprotective dose of capsaicin by HPLC-FLD method, *Molecules* 24 (2019) 2848, <https://doi.org/10.3390/molecules24152848>.
- [9] Z. Liu, X. Wang, J. Chen, J. Gao, S. Yu, X. Wang, Three-template magnetic molecular imprinted polymer for the rapid separation and specific recognition of illegal cooking oil markers, *Microchem. J.* 157 (2020) 105052, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105052>.
- [10] C. A. Reilly, D. J. Crouch, G. S. Yost, A. A. Fatah, Determination of capsaicin, nonivamide, and dihydrocapsaicin in blood and tissue by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 26 (2002) 313-319, <https://doi.org/10.1093/jat/26.6.313>.
- [11] R. Q. Thompson, K. W. Phinney, M. J. Welch, E. V. White, Quantitative determination of capsaicinoids by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 1441-1451, <https://doi.org/10.1007/s00216-005-3102-y>.
- [12] C. H. F. Wong, F. P. W. Tang, T. S. M. Wan, A broad-spectrum equine urine screening method for free and enzyme-hydrolysed conjugated drugs with ultra performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 697 (2011) 48-60, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.04.030>.
- [13] Y. You, C. E. Uboh, L. R. Soma, F. Guan, D. Taylor, X. Li, Y. Liu, J. Chen, Validated UHPLC-MS-MS method for rapid analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin in equine plasma for doping control, *J. Anal. Toxicol.* 37 (2013) 122-132, <https://doi.org/10.1093/jat/bks098>.
- [14] D. Wang, F. Meng, L. Yu, L. Sun, L. Sun, J. Guo, A sensitive LC-MS/MS method for quantifying capsaicin and dihydrocapsaicin in rabbit plasma and tissue: Application to a pharmacokinetic study, *Biomed. Chromatogr.* 29 (2015) 496-503, <https://doi.org/10.1002/bmc.3302>.
- [15] A. Zak, N. Siwinska, M. Slowikowska, H. Borowicz, P. Szpot, M. Zawadzki, A. Niedzwiedz, The detection of capsaicin and dihydrocapsaicin in horse serum following long-term local administration, *BMC Vet. Res.* 14 (2018) 10-15, <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1518-9>.

- [16] R. Lorenzoni, F. Barreto, R. V. Contri, B. Verlindo de Araújo, A. R. Pohlman, T. D. Costa, S. S. Guterres, Rapid and sensitive LC-MS/MS method for simultaneous quantification of capsaicin and dihydrocapsaicin in microdialysis samples following dermal application, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 173 (2019) 126-133, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.05.029>.
- [17] Q. Lu, H. Guo, D. Li, Q. Zhao, Determination of capsaicinoids by magnetic solid phase extraction coupled with UPLC-MS/MS for screening of gutter oil, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1158 (2020) 122344, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122344>.
- [18] M. C Rodríguez-Palazón, N. Arroyo-Manzanares, P. Viñas, N. Campillo, Metabolomic study of capsaicinoid compounds in urine samples by dispersive liquid-liquid microextraction and ultra-high performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Microchem. J.* 178 (2022) 107373, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107373>.
- [19] H. Kataoka, Recent developments and applications of microextraction techniques in drug analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 339-364, <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3076-2>.
- [20] L. Xie, R. F. Jiang, F. Zhu, H. Liu, G. F. Ouyang, Application of functionalized magnetic nanoparticles in sample preparation, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 377-399, <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7302-6>.
- [21] N. Arroyo-Manzanares, R. Peñalver-Soler, N. Campillo, P. Viñas, Dispersive solid-phase extraction using magnetic carbon nanotube composite for the determination of emergent mycotoxins in urine samples, *Toxins* 12 (2020) 1-12, <https://doi.org/10.3390/toxins12010051>.
- [22] J. L. Benedé, A. Chisvert, D. L. Giokas, A. Salvador, Development of stir bar sorptive-dispersive microextraction mediated by magnetic nanoparticles and its analytical application to the determination of hydrophobic organic compounds in aqueous media, *J. Chromatogr. A* 1362 (2014) 25-33, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.08.024>.
- [23] I. López-García, S. Rengevicova, M. J. Muñoz-Sandoval, M. Hernández-Córdoba, Speciation of very low amounts of antimony in waters using magnetic core-modified silver nanoparticles and electrothermal atomic absorption spectrometry, *Talanta* 162 (2017) 309-315, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.044>.
- [24] S. Mukdasai, C. Thomas, S. Srijaranai, Enhancement of sensitivity for the spectrophotometric determination of carbaryl using dispersive liquid microextraction

- combined with dispersive  $\mu$ -solid phase extraction, *Anal. Methods* 5 (2013) 789-796, <https://doi.org/10.1039/c2ay25838b>.
- [25] S. Periyasamy, V. Gopalakannan, N. Viswanathan, Fabrication of magnetic particles imprinted cellulose based biocomposites for chromium(VI) removal, *Carbohydr. Polym.* 174 (2017) 352-359, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.029>.
- [26] A. A. Asgharinezhad, H. Ebrahimzadeh, Coextraction of acidic, basic and amphiprotic pollutants using multiwalled carbon nanotubes/magnetite nanoparticles@polypyrrole composite, *J. Chromatogr. A* 1412 (2015) 1-11, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.087>.
- [27] M. R. K. Alasl, M. R. Sohrabi, M. Davallo, Determination of trace amounts of aromatic amines after magnetic solid-phase extraction using silver-modified  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /graphene nanocomposite, *J. Sep. Sci.* 42 (2019) 1777-1785, <https://doi.org/10.1002/jssc.201800896>.
- [28] S. Mukdasai, C. Thomas, S. Srijaranai, Two-step microextraction combined with high performance liquid chromatographic analysis of pyrethroids in water and vegetable samples, *Talanta* 120 (2014) 289-296, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.12.005>.
- [29] C. A. Reilly, W. J. Ehlhardt, D. A. Jackson, P. Kulanthaivel, A. E. Mutlib, R. J. Espina, D. E. Moody, D. J. Crouch, G. S. Yost, Metabolism of capsaicin by cytochrome P450 produces novel dehydrogenated metabolites and decreases cytotoxicity to lung and liver cells, *Chem. Res. Toxicol.* 16 (2003) 336-349, <https://doi.org/10.1021/tx025599q>.
- [30] L. Qin, Y. Wang, Y. Gong, J. Chen, B. Xu, L. Tang, L. Guo, J. Xie, Capsaicin metabolites and GSH-associated detoxification and biotransformation pathways in human liver microsomes revealed by LC-HRMS/MS with data-mining tools, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1133 (2019) 121843, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121843>.



# **CAPÍTULO III**

**DETERMINACIÓN DE AMINAS BIOGÉNICAS EN  
ORINA HUMANA MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN  
DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO Y  
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON  
ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA  
RESOLUCIÓN**

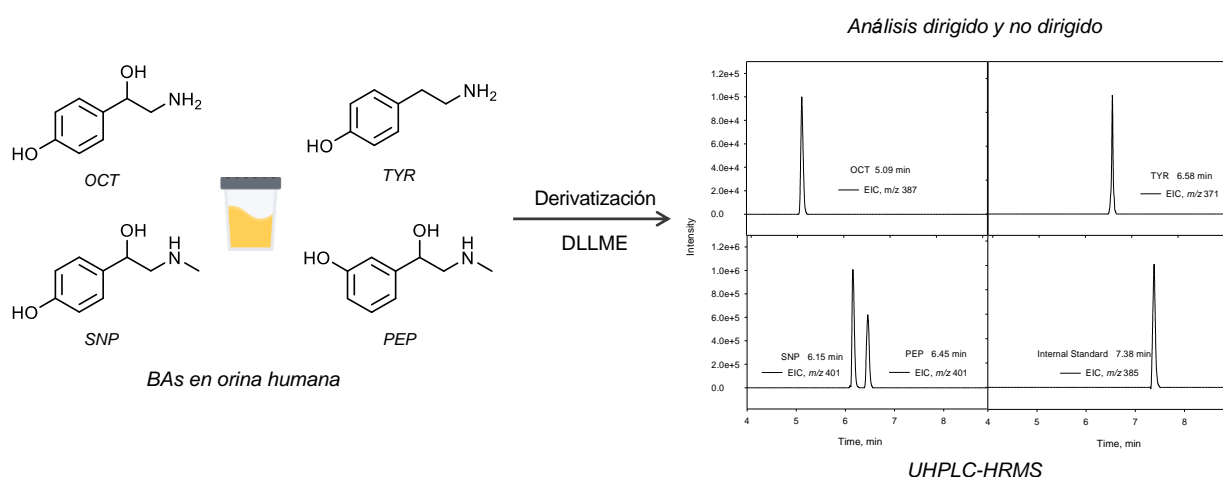




## DETERMINACIÓN DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ORINA HUMANA MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN

### RESUMEN

En este capítulo se presenta la combinación de microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) con cromatografía líquida de ultra alta resolución y espectrometría de masas con analizador híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (UHPLC-Q-TOF-MS) para la determinación simultánea de cuatro bioaminas (BAs) aromáticas (sinefrina (SNP), fenilefrina (PEP), tiramina (TYR) y octopamina (OCT) en orina humana. El tratamiento de la muestra incluye una etapa previa de derivatización con cloruro de dansilo para incrementar la eficiencia de extracción en el procedimiento de DLLME, en el que se añade una mezcla de cloroformo y etanol sobre 5 mL de muestra. Los límites de detección se hallaron en el rango 0,54-3,6 µg/L. La precisión y veracidad del método se estimó a dos niveles de concentración y se encontraron en los intervalos 3,4-10,2 y 93,6-114%, respectivamente. El análisis de 9 muestras de orina mostró niveles de TYR entre 52 y 304 µg/L. Además, se llevó a cabo un análisis no dirigido de las muestras para estudiar la presencia de otras BAs y metabolitos relacionados, no detectándose ninguna de estas especies.



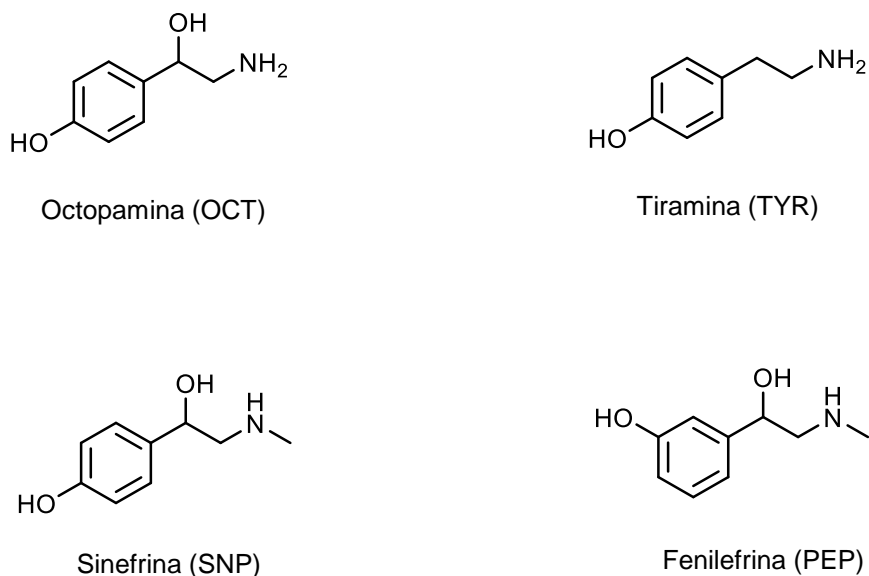


### III.1. INTRODUCCIÓN

Las aminas biogénicas (BAs) forman un grupo muy numeroso de compuestos orgánicos nitrogenados de bajo peso molecular producidos principalmente por descarboxilación microbiana de aminoácidos libres y por aminación y transaminación de aldehídos y cetonas [1]. Las BAs se pueden clasificar en base a su estructura química en alifáticas, aromáticas y heterocíclicas. Pueden estar presentes en una amplia variedad de productos alimentarios ricos en proteína animal, como carne o pescado, y también en bebidas fermentadas como vino y cerveza. Por otro lado, las frutas y verduras pueden contener BAs como componentes endógenos, pudiendo sus niveles verse incrementados debido a actividad microbiana no controlada [2].

Las BAs son metabolitos naturales de gran importancia para el funcionamiento normal del organismo humano. A bajas concentraciones, son esenciales para muchas funciones biológicas, actuando como neurotransmisores y hormonas, y también jugando un papel clave en la regulación de la temperatura corporal y en la digestión. Sin embargo, el consumo de altos niveles de BAs puede provocar diversos problemas de salud, incluyendo dolor de cabeza, alteración de la tensión arterial, problemas gastrointestinales y renales e incluso shock anafiláctico [1, 2]. De hecho, se han identificado algunas BAs como posibles biomarcadores para el diagnóstico de diversas patologías en humanos, como cáncer y desórdenes de tipo cardiovascular, autoinmune y neurodegenerativo [3]. Por ello, el nivel de BAs se ha convertido en un índice de calidad de algunos productos alimentarios y su concentración se halla regulada por diferentes agencias de salud como la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Authority*, EFSA), la Administración de Alimentos y Medicamentos (*Food and Drugs Administration*, FDA), la Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*, WHO), etc. [4].

En los últimos años, el culto al cuerpo y el mantenimiento de un alto nivel de actividad han conducido a la población al consumo de productos para controlar el peso, ganar músculo y obtener energía extra. Un gran número de estos productos contienen en sus formulaciones extractos de naranja amarga y de otras frutas del género *Citrus*, debido a que su contenido en diferentes BAs aromáticas como sinefrina (SNP), octopamina (OCT) y tiramina (TYR) es relativamente alto (Figura III.1). Estos compuestos presentan, además, efecto adrenérgico y similitudes estructurales con otros compuestos bioactivos como efedrina y adrenalina [5, 6].



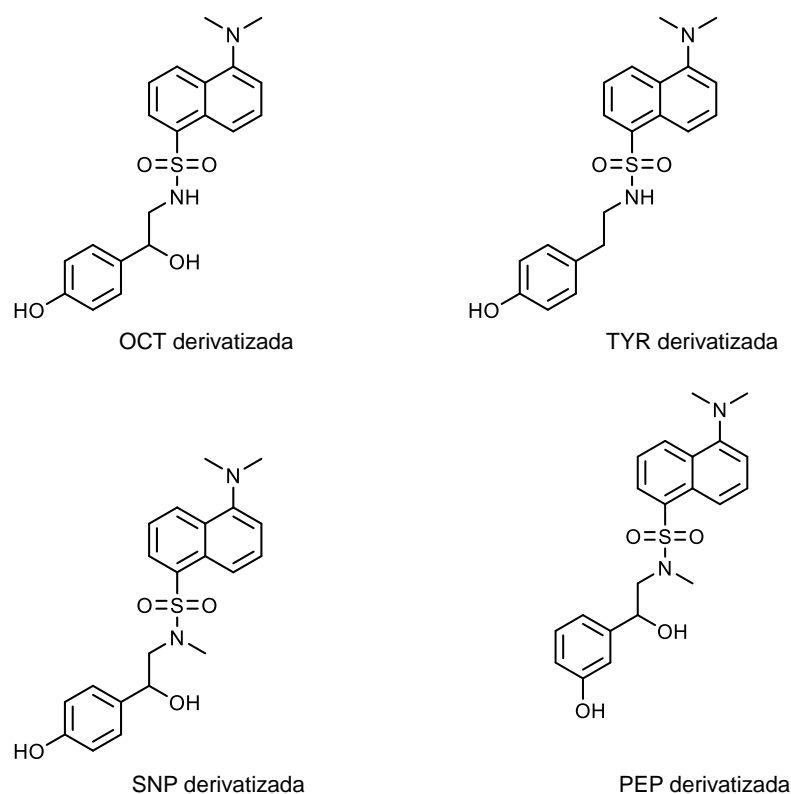
**Figura III.1.** Estructura química de las cuatro BAs estudiadas.

En las frutas del género *Citrus*, SNP es la más abundante seguida de OCT [7]. Tanto *para*-SNP, a menudo conocida como SNP, como *meta*-SNP, también conocida como fenilefrina (PEP), ha aumentado su interés en la comunidad científica desde que en 2004 la FDA prohibiera los suplementos nutricionales a base de efedrina [8]. Así, en 2009, la EFSA publicó una guía para la evaluación de la seguridad de preparaciones botánicas destinadas a ser utilizadas en la preparación de suplementos alimenticios [9]. Aunque las patentes nutraceuticas especifican sus composiciones, como la de Jones [10], que incluye SNP, OCT y al menos una de las BAs TYR, N-metiltiramina y hordenina, en muchos casos, no se especifican todos los componentes en la etiqueta comercial, o esta información no se ajusta al contenido real [8].

Con el objetivo de garantizar la salud humana, el control del consumo abusivo de BAs involucradas en suplementos alimenticios ha adquirido un gran interés. La orina es la matriz más ampliamente seleccionada en bioanálisis debido a su simplicidad a la hora de ser recogida, a que su composición es relativamente simple en comparación con otras muestras biológicas, y al hecho de que al igual que la sangre, la orina se considera un biofluido integrador, ya que incorpora en una sola muestra las funciones y los fenotipos de diferentes partes del organismo. En este Capítulo se desarrolla un enfoque dirigido para la determinación de SNP, OCT, TYR y PEP en orina humana. Las BAs aromáticas seleccionadas, que es probable que se encuentren en los suplementos nutricionales, tienen estructuras similares. Todas ellas presentan un anillo de benceno en el que una de sus posiciones está sustituida por un grupo hidroxilo y una cadena alquílica en posición *para*- (a excepción de PEP, que presenta esta cadena en la posición *meta*-) que contiene una amina primaria o secundaria.

Se han descrito diferentes métodos analíticos para la determinación de las BAs aromáticas aquí estudiadas [1, 2], incluyendo para el caso de análisis de fluidos biológicos, la electroforesis capilar (CE) [3, 11], resonancia magnética nuclear (RMN) [12], cromatografía de gases (GC) [13] y cromatografía líquida (LC) [14-21], siendo esta última técnica la más usada. Entre los diferentes detectores acoplados a los sistemas LC para bioanálisis, los basados en espectrometría de masas en tándem (MS/MS) [14-16, 19-21] y espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) [17, 18] han sido los que más se han empleado.

Se han propuesto diversos procedimientos de derivatización para la determinación de BAs con el fin de incrementar su volatilidad para su separación por GC [13], para mejorar la sensibilidad de detección (mejorando tanto las medidas de absorbancia y fluorescencia, como la ionización en MS), resolución cromatográfica o incluso para modificar las propiedades químicas de los analitos de interés para así eliminar interferencias de la matriz [1, 22]. El cloruro de dansilo (DNSCI) es posiblemente el reactivo derivatizante más utilizado para este propósito ya que reacciona con aminas primarias y secundarias, y proporciona en tiempos reducidos productos muy estables que exhiben tanto propiedades de absorción visible/UV como fluorescencia, así como condiciones favorables para la ionización en MS [22]. La Figura III.2 muestra las estructuras químicas de los derivados obtenidos por dansilación de las cuatro BAs estudiadas.



**Figura III.2.** Estructura química de las BAs derivatizadas con DNSCI.

Con frecuencia, estas BAs se hallan presentes en las matrices biológicas a bajas concentraciones, por lo que generalmente se requiere de un paso previo de tratamiento de la muestra para su limpieza y preconcentración de los analitos. Aunque se han propuesto algunos procedimientos sin preconcentración de la muestra, la extracción en fase sólida (SPE) es la técnica más utilizada para este fin [11, 14, 15, 18]. Sin embargo, las últimas tendencias en tratamiento de muestra están dirigidas hacia enfoques miniaturizados. Para la preconcentración de BAs en alimentos, la bibliografía recoge tanto la aplicación de procedimientos de microextracción en fase líquida, como los basados en fases sólidas. Entre las técnicas aplicadas destacan la microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) [23], DLLME asistida por ultrasonidos (UA-DLLME) [24], UA-DLLME utilizando líquidos iónicos [25], DLLME utilizando líquidos iónicos magnéticos [26] y la extracción dispersiva en fase sólida asistida por ultrasonidos (UA-DSPE) [27]. Sin embargo, hasta la fecha, las técnicas miniaturizadas no se han aplicado a la determinación de BAs en bioanálisis.

Desde su desarrollo, se han propuesto muchas mejoras para la técnica de DLLME. La aplicación de DLLME en su modo clásico consiste en la rápida inyección de una mezcla de dos disolventes (extractante y dispersante) sobre la fase acuosa provocando de esta forma la emulsificación del disolvente extractante en el seno de la fase dadora, alcanzándose rápidamente el equilibrio de partición del analito [28]. DLLME proporciona elevadas eficiencias de extracción para muestras muy variadas, incluyendo los fluidos biológicos [29]. La combinación derivatización-DLLME puede llevarse bajo seis formas diferentes dependiendo de las características tanto de los analitos como de la matriz de la muestra. El “modo derivatización y DLLME simultáneo” se aplica en un solo paso, siendo este generalmente seleccionado debido a su simplicidad y rapidez [30].

El objetivo de este estudio ha sido el desarrollo de un método analítico fiable y sensible basado en la cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) combinada con HRMS para la determinación de cuatro BAs (TYR, OCT, SNP y PEP) en orina humana que generalmente están contenidas en suplementos nutricionales y que a elevadas concentraciones pueden alterar el funcionamiento normal del organismo, actuando, por tanto, como biomarcadores de algunas enfermedades. Con este propósito, se aplicó la técnica DLLME para la preconcentración de los analitos sometidos previamente a una de etapa de derivatización. Además, bajo las mismas condiciones experimentales, se llevó a cabo un estudio no dirigido con el objetivo de investigar en las muestras estudiadas la presencia de posibles metabolitos de las BAs y compuestos relacionados.



## III.2. PARTE EXPERIMENTAL

### III.2.1. REACTIVOS

Hydrocloruro de fenilefrina (PEP,  $C_9H_{14}ClNO_2$ ), tiramina (TYR,  $C_8H_{11}NO$ ), ( $\pm$ )-sinefrina (SNP,  $C_9H_{13}NO$ ) y ( $\pm$ )-octopamina (OCT,  $C_8H_{12}ClNO_2$ ), así como cloruro de dansilo (DNSCI) y fenilpropanolamina (PPA), utilizados estos últimos como reactivo derivatizante y estándar interno (IS), respectivamente, se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los disolventes de calidad HPLC acetona, acetonitrilo y metanol fueron suministrados por Chem-Lab (Zedelgem, Bélgica). Ácido fórmico y cloroformo se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Amoníaco (25%), etanol y carbonato de sodio se adquirieron en Panreac (Barcelona, España) e hidrógeno carbonato de sodio de Merck (Darmstadt, Alemania). Para el análisis de creatinina, se adquirió creatinina anhidra, ácido pícrico y fosfato dibásico de potasio de Sigma y dodecil sulfato sódico de Fluka (Merck). El agua de alta pureza se obtuvo mediante un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

Se prepararon disoluciones madre individuales de cada una de las BAs (1000 mg/L) en metanol y se almacenaron a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  en viales de vidrio. Las disoluciones de trabajo que contenían una mezcla de los cuatro analitos a un nivel de concentración de 50 mg/L se prepararon por dilución con agua y se almacenaron a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . También se preparó una disolución madre del estándar interno PPA (1000 mg/L) en metanol, almacenándose a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , mientras que su correspondiente disolución de trabajo (5 mg/L) se preparó por dilución con agua. Por último, la disolución del reactivo derivatizante DNSCI se preparó a un nivel de concentración de 3000 mg/L en acetona.

### III.2.2. INSTRUMENTACIÓN

Los análisis se llevaron a cabo en un sistema UHPLC Agilent 1290 Infinity II Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipado con un módulo de muestreador automático y una bomba binaria de alta velocidad. La separación se llevó a cabo con una columna en fase reversa Zorbax de rápida resolución y alta definición (*Rapid Resolution High Definition*, RRHD) Eclipse Plus C18 (100 mm x 2,1 mm,  $1,8\text{ }\mu\text{m}$  de tamaño de partícula) de Agilent (Waldbronn, Alemania).

La detección se realizó con un espectrómetro de masas Agilent 6550 Q-TOF (Agilent Technologies) utilizando una interfaz electrospray Agilent Jet Stream Dual (AJS-Dual ESI) e

ionización por electrospray (ESI). Los parámetros de trabajo para los sistemas UHPLC y Q-TOF se ajustaron con el software MassHunter Workstation Data Acquisition (Agilent Technologies, Revision B.08.00). El análisis de datos se llevó a cabo mediante los softwares MassHunter Qualitative Analysis Navigator (Agilent Technologies, Revision B.08.00) y MS-DIAL (versión 4.80, RIKEN).

La etapa del tratamiento de la muestra requirió del uso de un baño de agua termostatzado PRECISTERM series (Grupo Selecta, España), una centrifugadora Eba 20 (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Alemania) y un sistema de evaporación/concentración automática XcelVap XCV-5400 (Biotage, Uppsala, Suecia). La determinación de creatinina se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro ATI Unicam UV2 UV-visible equipado con el software de tratamiento de datos VISION V3.00. Todas las medidas espectrofotométricas se realizaron a 25 °C en una cubeta de cuarzo de 1 cm de camino óptico.

### III.2.3. ANÁLISIS UHPLC-HRMS

Tanto los estándares como las muestras se termostataron a 5 °C en el muestreador, mientras que la columna se mantenía a 25 °C. La separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando una fase móvil compuesta por agua (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B) ambos conteniendo un 0,1% de ácido fórmico y aplicando el siguiente programa de elución en gradiente: 0-10 min: 10-90% B; 10-12 min: 90% B; 12-12,5 min: 90-10% B; 12,5-14 min: 10% B. La velocidad de flujo de la fase móvil se mantuvo constante a un valor de 0,4 mL/min. El volumen de inyección fue de 20 µL. Aplicando estas condiciones experimentales, los analitos derivatizados eluyeron con tiempos de retención comprendidos entre 5,09 y 6,58 min, mientras que el IS lo hizo a 7,38 min (Tabla III.1).

Los análisis de HRMS se realizaron utilizando una fuente ESI operando en modo positivo. La presión del gas nebulizador se ajustó a 40 psi, mientras que el flujo del gas de secado se ajustó a 16 L/min y a una temperatura de 150 °C y el gas envolvente a 12 L/min y 300 °C. Los voltajes del capilar de nebulización, boquilla, fragmentador y octopolo 1 RF Vpp fueron 4000, 400, 360 y 750 V, respectivamente. El perfil de datos en el rango 50-1000 *m/z* se adquirió para MS scans en modo de rango dinámico extendido de 2 GHz con 3 espectros/s, 333,3 ms/espectro y 2675 transiciones/espectro. Para cada ciclo se aplicaron tres valores de energía de colisión (0, 10 y 40 V).

**Tabla III.1.**

Parámetros UHPLC-Q-TOF-MS de los compuestos estudiados.

Analito	Fórmula molecular	$t_R$ (min)	$m/z$ teórico	$m/z$ experimental	Error (ppm)
OCT	$C_{20}H_{22}N_2O_4S$	5,09	387,1378	387,1375	-0,91
SNP	$C_{21}H_{24}N_2O_4S$	6,15	401,1535	401,1534	-0,26
PEP	$C_{21}H_{24}N_2O_4S$	6,45	401,1535	401,1536	0,24
TYR	$C_{20}H_{22}N_2O_3S$	6,58	371,1429	371,1428	-0,37
PPA	$C_{21}H_{24}N_2O_3S$	7,38	385,1586	385,1589	0,81

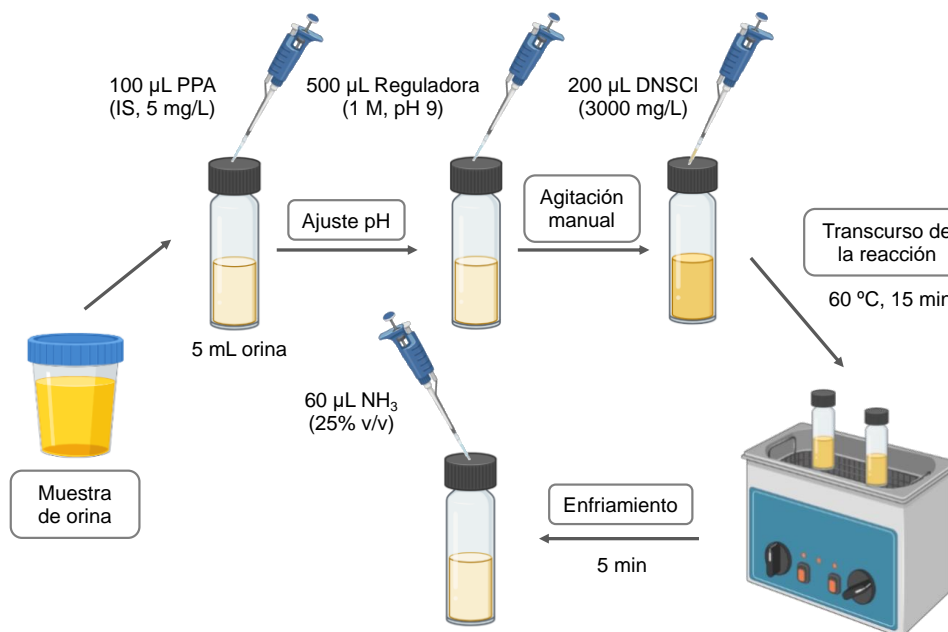
Los datos se transformaron a un formato Analysis Base Framework (ABF) y después se procesaron haciendo uso de MS-DIAL que consta de deconvolución y selección de marcadores, identificación de compuestos y alineamiento. El procesamiento dirigido se realizó con el objetivo de identificar y cuantificar los principales analitos utilizando el tiempo de retención, la masa exacta y la información de MS/MS. La Tabla III.1 incluye los valores de  $m/z$  experimentales y teóricos de para cada uno de los compuestos monitorizados. En términos de porcentaje, el error para los valores de  $m/z$  obtenidos con relación a los teóricos se calculó como la diferencia entre las masas experimental y teórica dividida por el valor teórico y multiplicado por  $10^6$ . El error en las masas se situó entre -0,91 y 0,24 ppm para las cuatro BAs.

### III.2.4. MUESTRAS

Se obtuvieron muestras de orina de tres individuos sanos que fueron mezcladas, fortificadas con los analitos a una concentración de 500 ng/mL y utilizadas para las etapas de optimización y validación del método. Dado que no se disponía de muestras de orina de individuos consumidores de suplementos nutricionales a base de BAs, el método desarrollado se aplicó al análisis de muestras de orina obtenidas de nueve voluntarios. Todos los voluntarios eran individuos sanos con edades comprendidas entre los 22 y 70 años. Cada individuo recogió sus muestras de orina en recipientes de plástico estériles y se congelaron a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  durante 24 horas antes del análisis. Para ello, las muestras de orina se descongelaron en un baño de agua a  $30\text{ }^\circ\text{C}$ , se centrifugaron a 3000 rpm durante 4 min y el sobrenadante resultante se recogió y filtró a través de un filtro de membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) de  $0,22\text{ }\mu\text{m}$  de tamaño de poro.

### III.2.5. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Para la etapa de derivatización, se aplicaron las condiciones descritas por Cao *et al.* [26] con ligeras modificaciones. La Figura III.3 recoge un esquema del procedimiento experimental seguido en esta etapa. De forma resumida, se colocaron en un tubo de vidrio 5 mL de orina descongelada, previamente centrifugada y filtrada, y se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de PPA (IS, 5 mg/L) y se ajustó el pH a 9 por adición de 500  $\mu\text{L}$  de una disolución reguladora 1 M de  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ . A continuación, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de DNSCI (3000 mg/L en acetona) y se agitó la mezcla vigorosamente de forma manual durante unos pocos segundos antes de colocarla durante 15 min en un baño de agua precalentado a 60  $^\circ\text{C}$  para permitir que se produzca la reacción. Seguidamente, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y finalmente se le adicionó 60  $\mu\text{L}$  de una disolución acuosa de amoníaco al 25% para parar la reacción de dansilación.



**Figura III.3.** Procedimiento experimental de la etapa de derivatización.

Para la etapa de DLLME, a la muestra de orina derivatizada se inyectó rápidamente una mezcla formada por 350  $\mu\text{L}$  de cloroformo (agente extractante) y 2 mL de etanol (agente dispersante), agitándose el tubo de forma manual vigorosamente durante unos segundos. Se observó la formación de una turbidez consistente en microgotas de cloroformo dispersadas en la fase acuosa en la que eran extraídas las BAs inicialmente contenidas en la fase acuosa (orina). Este sistema ternario de disolventes se centrifugó durante 4 min a 3000 rpm y la fase orgánica resultante se recogió del fondo del tubo y se transfirió a otro tubo de vidrio de menor capacidad en el que se evaporó bajo una corriente de aire comprimido. Finalmente, el extracto

seco se reconstituyó en 150  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo, de los cuáles 20  $\mu\text{L}$  fueron inyectados en el sistema cromatográfico.

La optimización y caracterización del método se llevó a cabo utilizando orina fortificada con los analitos a diferentes concentraciones. Las muestras se fortificaron, agitaron durante unos segundos y se dejaron reposar una hora antes de realizar la derivatización, la etapa de DLLME y el análisis instrumental. Cada análisis se llevó a cabo por triplicado.

### III.2.6. ANÁLISIS DE CREATININA Y MUESTRAS DE ORINA

Para la determinación de creatinina en las muestras de orina, se colocaron en una cubeta de cuarzo de 1 cm de camino óptico 2 mL de reactivo picrato formado por una mezcla de volúmenes iguales de una disolución de ácido pícrico 25 mM y una reguladora fosfato 300 mM (ajustada a pH 12,7 con hidróxido de sodio) ambos conteniendo dodecil sulfato sódico (SDS) 0,2 g/L. Las curvas de calibración se obtuvieron de la siguiente forma: se colocan en la cubeta 200  $\mu\text{L}$  de una disolución acuosa de creatinina estándar dentro del rango 50-2500 mg/L y se mezclan con la disolución del reactivo de picrato. En el espectrofotómetro se mide durante 2 min la absorbancia del complejo picrato-creatinina formado a una longitud de onda de 510 nm. En este ensayo, el parámetro utilizado como señal analítica es la velocidad de reacción. El contenido de creatinina en las muestras de orina se determinó aplicando las mismas condiciones experimentales utilizadas para las medidas en la etapa de calibración solo que en este caso, la disolución de creatinina estándar fue reemplazada por 2 mL de orina. Para verificar la precisión del método aplicado se utilizó un material de referencia certificado "Contaminantes orgánicos en orina de fumadores (congelada)" (Standard Reference Material, SRM 3672, MD, USA). El contenido certificado de creatinina en el SRM 3672 es de  $734 \pm 5$  mg/kg. La precisión del método se demostró ya que el contenido de creatinina obtenido en nuestros análisis fue de  $736 \pm 7$  mg/kg ( $n=3$ ).

### III.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### III.3.1. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

Para la optimización de la separación cromatográfica, inicialmente se estudió el poder de resolución para los analitos derivatizados con dos columnas diferentes: una Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 (100 mm x 2,1 mm, 1,8  $\mu\text{m}$ ) y una ACE Excel 3 C18-PFP (150 mm x 4.6 mm, 3  $\mu\text{m}$ ), esta última combinando de forma simultánea los mecanismos de separación proporcionados por C18 y pentafluorofenil (PFP). Con la columna ACE Excel 3, se intentó separar las BAs derivatizadas en modo isocrático usando diferentes proporciones de agua (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B), ambos conteniendo un 0,1% de ácido fórmico. Así, se varió la concentración de disolvente orgánico entre un 60 y un 90%, obteniéndose los mejores resultados cuando la proporción de disolventes A:B fue de 40:60, a una velocidad de flujo constante de 1 mL/min. Sin embargo, bajo estas condiciones OCT eluyó a 13,11 min, mientras que SNP y PEP al ser isómeros de posición co-eluyeron a 20,82 min y TYR a 24,10 min, lo que suponían unos tiempos de retención bastante largos.

Por otro lado, se evaluó la eficiencia de separación de la columna Zorbax con una reducción en la velocidad de flujo de 1 a 0,4 mL/min, lo que también benefició a la eficiencia de ionización en MS. Bajo condiciones de separación isocráticas, las BAs no se separaban bien o no se obtenían picos cromatográficos con formas apropiadas. Consiguientemente, se ensayaron diferentes métodos de elución en gradiente, proporcionando los mejores resultados el que comenzaba con un gradiente lineal de 10 a 90% del disolvente B (10 min), manteniendo esta proporción durante 2 min. Finalmente, la fase móvil se programó para alcanzar la composición inicial en 0,5 min, para mantenerse a ese porcentaje durante 1,5 min antes de proceder a la siguiente inyección. Bajo estas condiciones, los analitos derivatizados eluyeron con tiempos de retención de 5,09; 6,15; 6,45 y 6,58 min para OCT, SNP, PEP y TYR, respectivamente.

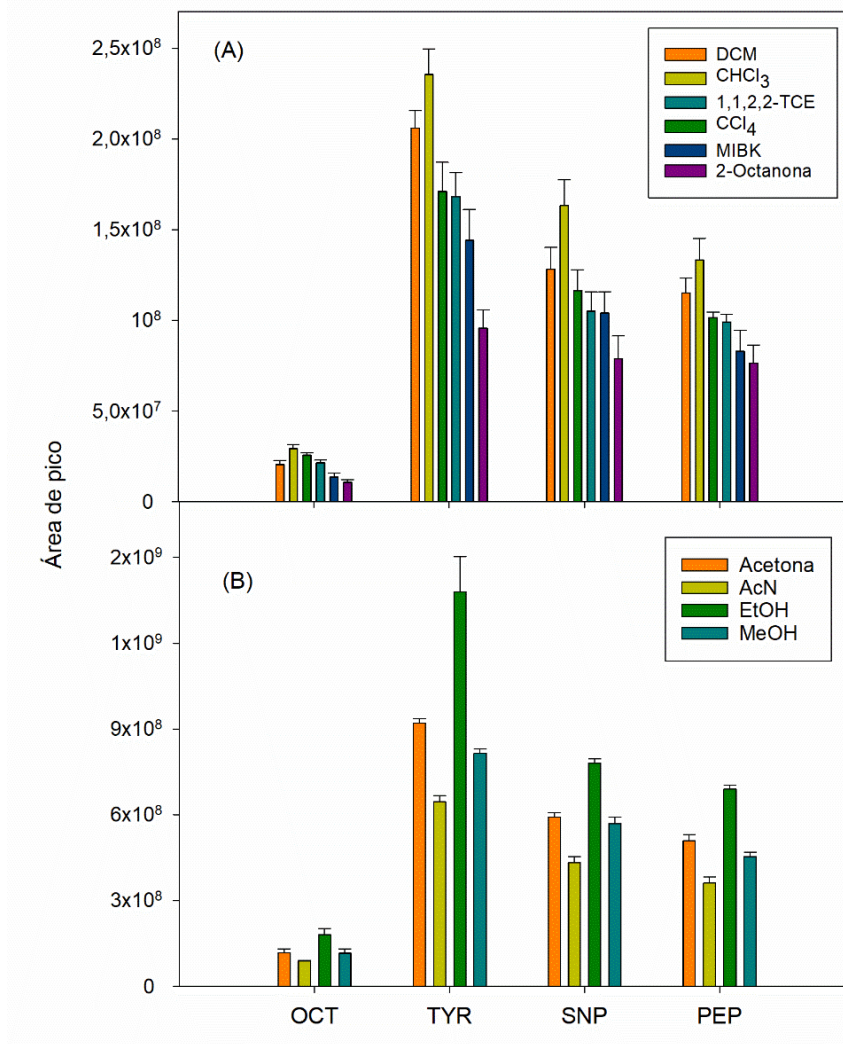
#### III.3.2. OPTIMIZACIÓN DEL TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Para incrementar la sensibilidad del método analítico se incluyó en el tratamiento de la muestra una etapa de preconcentración de los analitos. De entre las diferentes metodologías miniaturizadas disponibles en la actualidad, se optó por la aplicación de DLLME teniendo en cuenta las múltiples ventajas que esta técnica ha demostrado para diferentes tipos de analitos y matrices. Con el propósito de aumentar la afinidad de los analitos hacia la fase extractante, se decidió convertirlos a una forma química de menor polaridad utilizando DNSCI como reactivo derivatizante. Con este fin, se optimizó el procedimiento de derivatización basado en las

condiciones propuestas por Cao *et al.* [26], utilizando 5 mL de una orina fortificada con las BAs a 500 ng/mL. Se verificó que la máxima sensibilidad se obtenía con la adición de 0,2 mL de DNSCI (3000 mg/L) y trabajando a pH 9.

El procedimiento de DLLME se optimizó utilizando 5 mL de una muestra de orina previamente derivatizada fortificada con las BAs a 500 ng/mL, realizándose cada experimento por triplicado. Para la selección del disolvente extractante se debe tener en cuenta que este tenga elevada afinidad por los analitos, así como su miscibilidad con el agente dispersante, pero que a la vez sea inmisible con la fase acuosa. En este experimento, se probó un conjunto de disolventes orgánicos tanto halogenados como no halogenados (0,5 mL) utilizando en todos los casos 1,5 mL etanol como disolvente dispersante. Se encontró que los disolventes más densos que el agua como diclorometano (DCM), cloroformo, tetracloruro de carbono y 1,1,2,2-tetracloroetano (1,1,2,2-TCE) proporcionaron mejores resultados que los disolventes orgánicos menos densos que el agua probados, metil isobutil cetona (MIBK) y 2-octanona, contando además con la ventaja de que al ser más densos que el agua y depositarse en el fondo del tubo cónico, la recolección de la fase orgánica enriquecida con los analitos es más sencilla que cuando se utilizan disolventes de menor densidad que el agua. De todos los disolventes probados, cloroformo fue el que proporcionó los mejores resultados para todos los compuestos (Figura III.4A), por lo que fue el seleccionado.

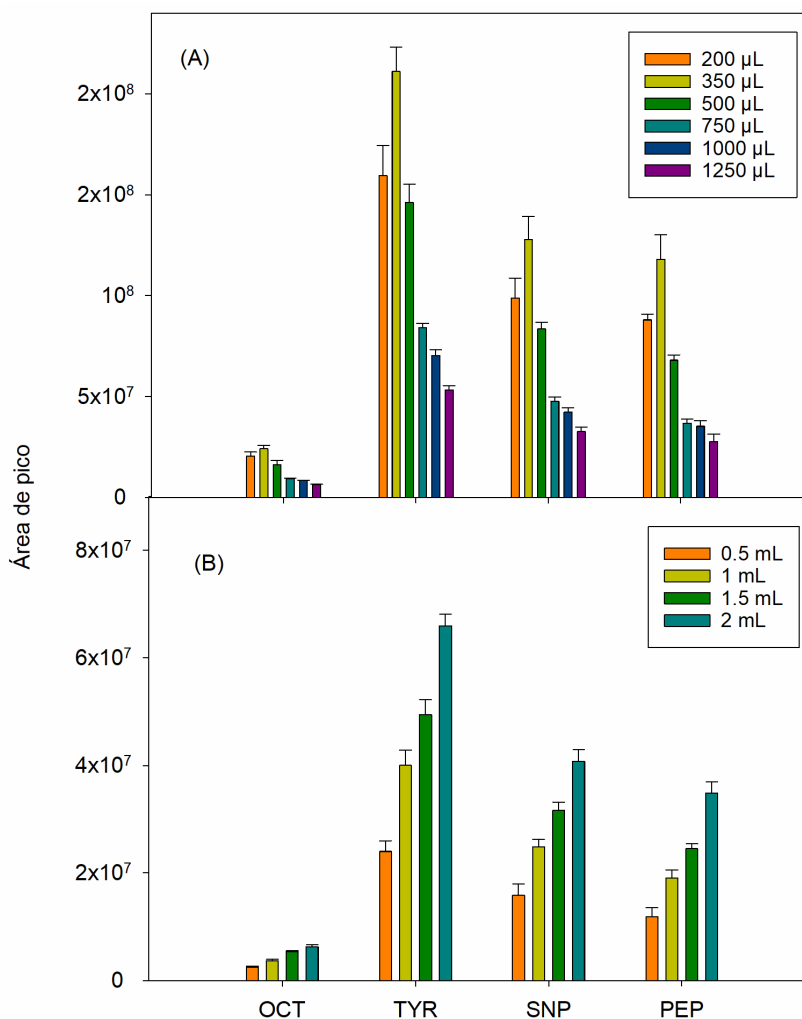
Como disolventes dispersantes, se investigó la efectividad de acetona, metanol, etanol y acetonitrilo, utilizando en todos los casos 1 mL y considerando su miscibilidad tanto con la fase orgánica extractante como con la fase acuosa. En todos los casos, se utilizó 0,5 mL de cloroformo y 5 mL de orina fortificada con las BAs a 500 ng/mL. Como se muestra en la Figura III.4B, para todos los analitos la mayor señal analítica se obtuvo con etanol, seguido de acetona, metanol y acetonitrilo. El cloroformo comercial normalmente viene estabilizado con etanol para prevenir la oxidación y la generación de sustancias indeseadas (ácido clorhídrico y fosgeno), y precisamente esta combinación de disolventes fue la más adecuada para el procedimiento DLLME. Los resultados obtenidos junto con el hecho de que el etanol presenta baja toxicidad condujeron a que finalmente este fuera el disolvente dispersante seleccionado.



**Figura III.4.** Efecto de (A) naturaleza del disolvente extractante y (B) naturaleza del disolvente dispersante (n=3).

Se estudió el efecto del volumen de agente extractante en el rango de 200 a 1250  $\mu\text{L}$ . Como se muestra en la Figura III.5A, la eficiencia de extracción aumentó hasta 350  $\mu\text{L}$ , disminuyendo para volúmenes mayores, probablemente debido a un efecto de dilución. Por tanto, para los siguientes experimentos se seleccionó un volumen de 350  $\mu\text{L}$  de cloroformo. El volumen de etanol se estudió entre 0,5 y 2 mL. Como se observa en la Figura III.5B, las señales analíticas aumentaron al hacerlo también el volumen de dispersante en todo el intervalo estudiado, probablemente debido a una mayor dispersión de la fase extractante. Considerando que 2 mL ya es una cantidad relativamente alta de disolvente para una técnica miniaturizada, no se realizaron pruebas con un volumen de etanol mayor de 2 mL, siendo este el volumen seleccionado.

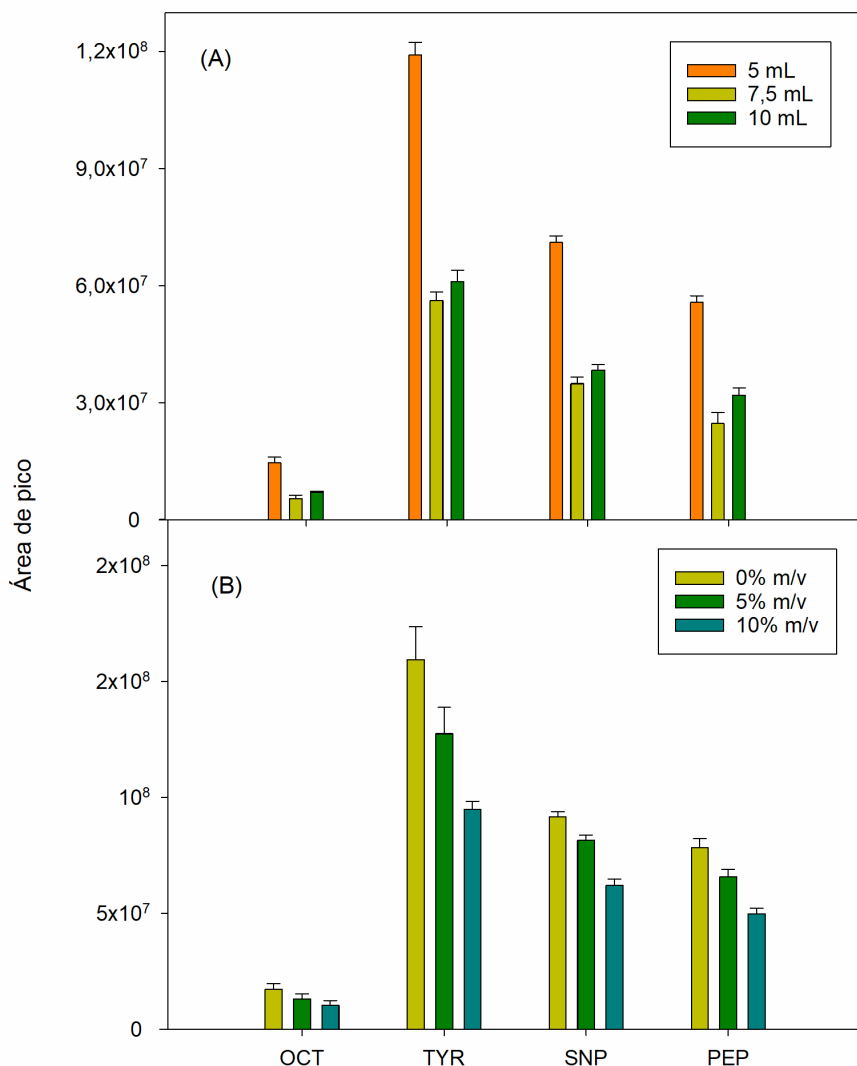




**Figura III.5.** Efecto de (A) volumen de extractante y (B) volumen de dispersante (n=3).

También se optimizó la influencia del volumen de muestra en la eficiencia de la microextracción utilizando 5, 7,5 y 10 mL de muestra de orina junto con 350 µL de cloroformo y 2 mL de etanol como disolventes extractante y dispersante, respectivamente. La Figura III.6A muestra que la mayor sensibilidad se obtuvo para un volumen de muestra de 5 mL, mientras que se observó una disminución de la señal para volúmenes mayores, probablemente como consecuencia del efecto matriz. Por tanto, se seleccionó un volumen de muestra de 5 mL.

No se estudió el efecto del pH en la fase acuosa porque este ya venía determinado previamente por las condiciones requeridas para llevar a cabo la reacción de derivatización de los analitos. Sí que se evaluó la influencia de la concentración de cloruro sódico en la fase acuosa (0, 5 y 10% m/v). Como se observa en la Figura III.6B, los mejores resultados se obtuvieron en ausencia de sal, por lo que su adición fue descartada.



**Figura III.6.** Efecto de (A) volumen de muestra y (B) concentración de NaCl en la fase acuosa (n=3).

Finalmente, teniendo en cuenta la incompatibilidad del disolvente extractante seleccionado y la fase móvil utilizada para la separación cromatográfica, la fase orgánica enriquecida con los analitos se evaporó y posteriormente se reconstituyó en AcN. Para ello, se probaron volúmenes de 150 y 200  $\mu$ L de AcN y como era de esperar, los mejores resultados se obtuvieron con un volumen de 150  $\mu$ L, por lo que fue el volumen seleccionado para reconstituir el extracto seco en todos los casos. No se ensayaron volúmenes más pequeños debido a la dificultad de reconstituir de forma eficiente el extracto seco.

### III.3.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Para la validación del método propuesto se obtuvieron los parámetros de rango de linealidad, precisión, límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs), recuperación y veracidad. Se adoptó el uso de un estándar interno (IS) con el objetivo de aumentar la precisión del método y contrarrestar los posibles efectos de la matriz. Se seleccionó fenilpropanolamina (PPA) como IS teniendo en cuenta que su estructura química es similar a la de las BAs objeto de estudio y su ausencia en las muestras, la cual fue comprobada antes de los análisis. La estructura de PPA tiene en común con los analitos la presencia de un anillo de benceno unido a una cadena alquílica que a su vez contiene un grupo amino. La presencia de esta amina primaria permite que se pueda tratar bajo las mismas condiciones de derivatización y preconcentración que las BAs. Bajo dichas condiciones experimentales la forma dansilada de PPA eluyó a un tiempo de retención de 7,38 min.

Para evaluar el posible efecto matriz en las muestras, se prepararon curvas de calibración en presencia de IS a una concentración de 100 µg/L, tanto en disolución acuosa como para dos muestras de orina, representando la relación entre el área obtenida para cada uno de los analitos y la del IS frente a la concentración de analito para cada uno de los siete niveles de concentración ensayados. La comparación mediante un test-t entre las pendientes obtenidas en presencia y en ausencia de matriz mostró valores de pendientes estadísticamente diferentes para cada uno de los analitos ( $p < 0,05$ ), (Tabla III.2). Sin embargo, se pudo aplicar la calibración mediante matriz modelo para la cuantificación de las muestras, ya que no se encontraron diferencias significativas entre las pendientes obtenidas por el método de adiciones estándar para ambas muestras de orina ( $p > 0,05$ ).

**Tabla III.2.**

Pendientes<sup>a</sup> (L/µg) de las rectas de calibración mediante adiciones estándar.

Analito	Estándares Acuosos	Orina 1	Orina 2
OCT	0,00053 ± 0,00002	0,01569 ± 0,00045	0,01555 ± 0,00081
SNP	0,00221 ± 0,00010	0,05914 ± 0,00148	0,05830 ± 0,00096
PEP	0,00187 ± 0,00007	0,04943 ± 0,00900	0,04802 ± 0,00075
TYR	0,00516 ± 0,00025	0,04090 ± 0,00137	0,04013 ± 0,00186

<sup>a</sup> Valor medio ± desviación estándar (n=8).

El rango de linealidad se situó entre 2,5 y 500 µg/L para SNP, PEP y TYR, mientras que para OCT se encontró entre 10 y 500 µg/L (Tabla III.3). Se evaluó la repetibilidad del método analizando por quintuplicado una muestra de orina fortificada a dos niveles de concentración (50 y 200 µg/L) con una mezcla de las BAs, obteniéndose valores de desviación estándar relativa (RSD) dentro de los rangos 12,4-16,1 y 4,2-12,2 % para los niveles de concentración más alto y bajo, respectivamente. Sin embargo, cuando la repetibilidad se calculó utilizando PPA como IS, se apreció una mejora notable en los valores de RSD obtenidos, encontrándose entonces dentro de los rangos 5,1-8,1% para 50 µg/L y 3,4-10,2% para 200 µg/L (Tabla III.3).

**Tabla III.3.**

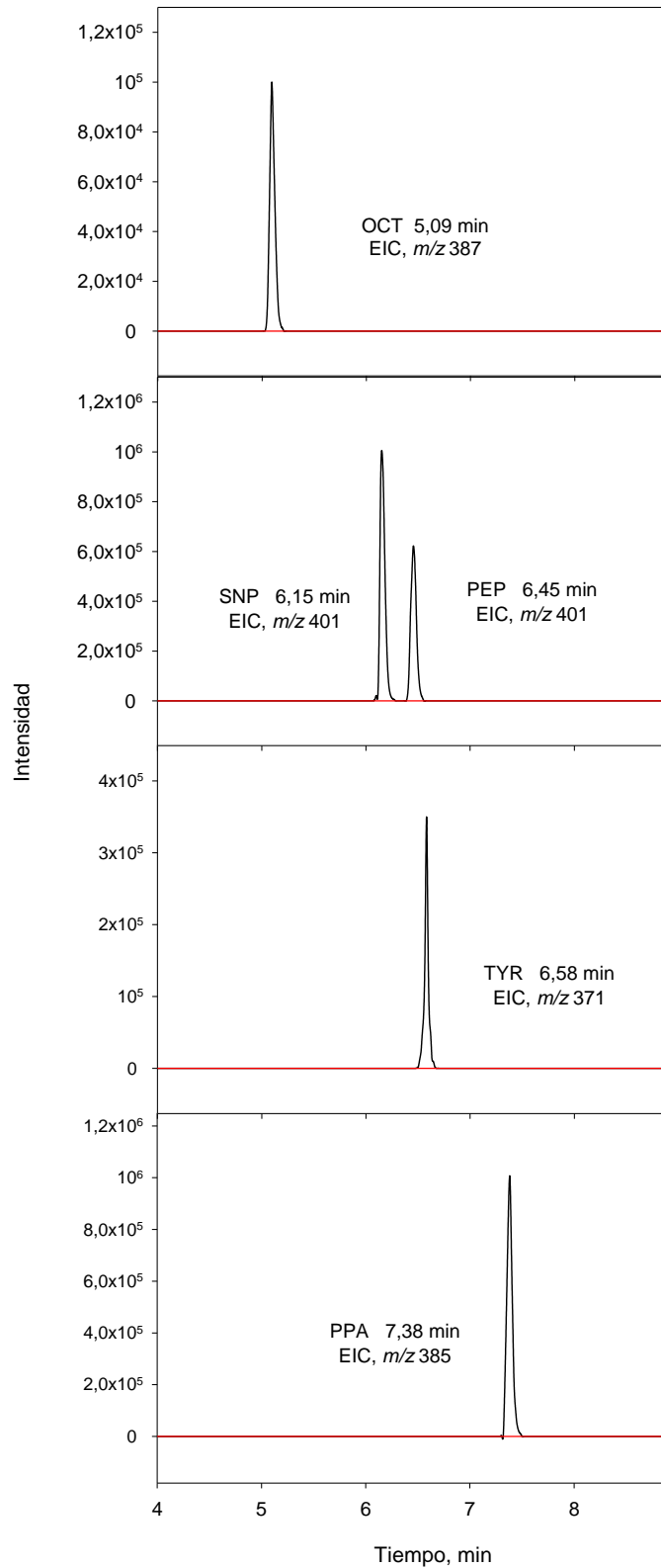
Características analíticas del método propuesto.

Analito	Linealidad (µg/L)	R <sup>2</sup>	LOQ <sup>a</sup> (µg/L)	RSD <sup>b</sup> (%)		Recuperación <sup>c</sup> (%)	
				50 µg/L	200 µg/L	25 µg/L	100 µg/L
OCT	10-500	0,999	12,0	8,1	10,2	114	102
SNP	2,5-500	0,999	1,8	8,3	3,4	110	96.8
PEP	2,5-500	0,995	1,8	5,1	5,1	109	97.4
TYR	2,5-500	0,995	2,0	5,5	9,4	93,6	103

<sup>a</sup> Calculado para una relación señal-ruido de 10. <sup>b</sup> n=5. <sup>c</sup> Valor medio (n=3).

Los LOQs para las cuatro BAs analizadas se calcularon considerando una relación señal/ruido de 10 y, como se recoge en la Tabla III.3, se hallaron entre 1,8 y 12 µg/L. Por otro lado, los LODs, obtenidos para una relación señal/ruido de 3, se encontraron entre 0,54 y 3,6 µg/L. Los factores de enriquecimiento (EF) se calcularon como la relación entre las pendientes de calibración aplicando el método UHPLC-Q-TOF-MS con DLLME y en ausencia de la etapa de preconcentración. Los valores de EF obtenidos se encontraron en el rango 17,9-24,2.

La Figura III.7 muestra los cromatogramas de iones extraídos (EICs) obtenidos para una muestra de orina fortificada con las BAs a una concentración de 80 µg/L utilizando el método propuesto, así como los obtenidas para una muestra blanco. Para estudiar la veracidad del método, se llevaron a cabo estudios de recuperación ya que no se disponía de materiales de referencia certificados. Los análisis en triplicado de una muestra de orina fortificada a dos niveles de concentración diferentes, 50 y 100 µg/L, proporcionaron valores de recuperación dentro de los rangos 93,6-114 y 96,8-103% para la concentración más baja y alta, respectivamente.



**Figura III.7.** Cromatogramas de iones extraídos (EICs) obtenidos para una muestra de orina sin fortificar (línea roja) y para una muestra de orina fortificada con las diferentes BAs a 80  $\mu\text{g/L}$  (IS, 100  $\mu\text{g/L}$ ) (línea negra).

En la Tabla III.4 se recoge una comparación del método propuesto basado en DLLME con UHPLC-Q-TOF-MS con otros previamente publicados en la bibliografía relacionados con la determinación de las BAs estudiadas en este trabajo en muestras de orina. Cabe destacar que el método propuesto supone la primera aplicación de una técnica de microextracción en fase líquida para la preconcentración de SNP, PEP, OCT y TYR en muestras de orina. Para aquellos tratamientos que hacen uso de SPE [14, 15, 17, 18], es destacable el elevado consumo de disolventes orgánicos (entre 3 y 8,25 mL) y el tiempo requerido, resultando también en una sensibilidad más baja en comparación con la alcanzada con el método propuesto. Además, el uso de volúmenes pequeños de disolventes orgánicos va en consonancia con las pautas descritas en las guías de la química verde.

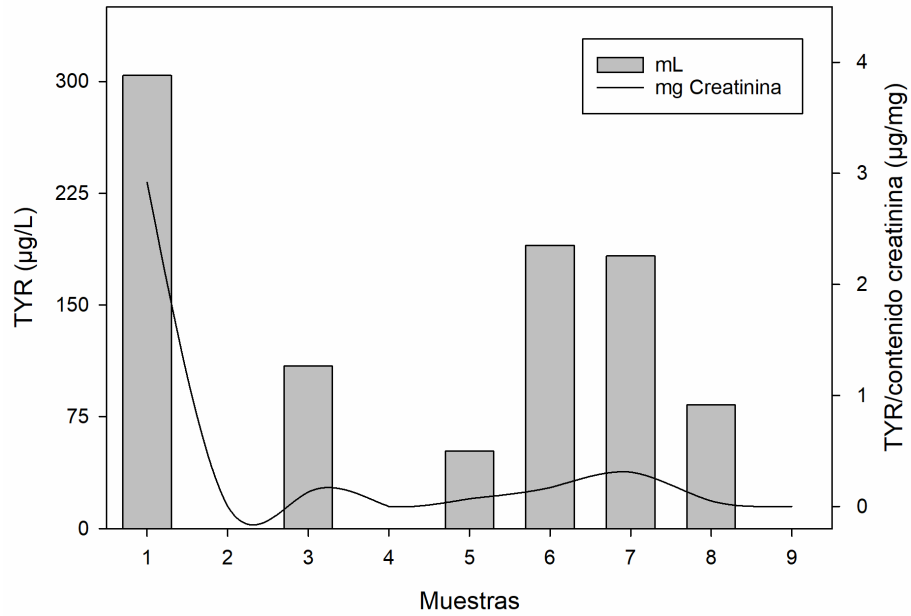
Además, la derivatización previa de las BAs proporciona una mejora en la sensibilidad, no solo por ser transformados en compuestos de menor polaridad y consecuentemente mayor afinidad hacia la fase orgánica extractante, sino que también se consigue una mayor eficacia en el proceso de ionización en MS. Adicionalmente, solo se tiene constancia de dos estudios previos [17, 18] que hagan uso de HRMS, permitiendo a su vez la búsqueda metabólica para la medida de masa exacta de posibles metabolitos y compuestos relacionados con los analitos. Es importante tener en cuenta que el método propuesto permite alcanzar incluso una mejor sensibilidad que los que utilizan MS/MS con analizador QTrap [14-16, 19, 20], con la ventaja añadida de que posibilita la búsqueda bajo un enfoque no dirigido, evitando un tratamiento de muestra añadido como la hidrólisis enzimática [19, 21].

### III.3.4. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE ORINA

Con el objetivo de demostrar la aplicabilidad de la metodología propuesta, se analizaron muestras de orina de nueve voluntarios sanos. Las BAs SNP, OCT y PEP no se detectaron en ninguna muestra, mientras que sí que fue posible cuantificar TYR en un 67% de las muestras. La ausencia de PEP en las muestras era de esperar ya que su disponibilidad en la naturaleza es un tema que suscita controversia en la actualidad, considerándose de origen sintético [8]. Las concentraciones de TYR encontradas en las muestras oscilaron entre 52 y 304 µg/L, como se observa en la Figura III.8.

Se calculó también el contenido de creatinina en cada una de las muestras. Considerando la diferencia en los volúmenes de orina excretados por cada individuo, el contenido de creatinina se usa como factor de corrección, sabiendo que, a diferencia de la orina, la creatinina se produce y elimina a una velocidad relativamente constante. Así, la cantidad de cualquier sustancia

eliminada a través de la orina se puede comparar con la cantidad de creatinina en dicha orina. Los análisis de creatinina en las nueve muestras proporcionaron contenidos desde 72 a 1550 mg/L. Los valores de la relación TYR/creatinina oscilaron entre 0,05 y 2,92  $\mu\text{g/L}$  (Figura III.8).



**Figura III.8.** Contenido de TYR en las muestras de orina expresado por unidad de volumen (eje-y izquierdo) y por masa de creatinina (eje-y derecho).

**Tabla III.4.**  
Comparación del método propuesto con otros publicados previamente para la determinación de BAs en orina por LC.

Análitos	Volumen y tratamiento de muestra	Detector en LC	LOD (µg/L)	Repetibilidad, RSD (%)	Ref.
OCT, SNP, PEP	2 mL, SPE	QTrap-MS/MS, ESI	5-10	3,6-14,7	[14]
SNP, OCT, TYR	2 mL, SPE	QTrap-MS/MS, ESI	50-460	No proporcionado	[15]
OCT, TYR	50 mL, Precipitación de proteínas	QTrap-MS/MS, APCI	1,7, 0,8	6,2, 5,0 (n=5)	[16]
TYR	0,1 mL, Precipitación de proteínas	QTrap-MS/MS, ESI	5	8,2 (n =6)	[20]
SNP, PEP	0,1 mL, Hidrólisis enzimática y extracción en disolvente	QTrap-MS/MS, ESI	13, 26,1	0,4-10,6	[19]
SNP	0,1 mL, Hidrólisis enzimática	QTrap-MS/MS, ESI	No proporcionado	No proporcionado	[21]
SNP, OCT	No se especifica, SPE	QOrbitrap-HRMS, ESI	30	No proporcionado	[17]
OCT, TYR	2 mL, SPE	Q-TOF-HRMS, ESI	1,7, 5,2	12 (n=7)	[18]
OCT, SNP, TYR, PEP	5 mL, Dansilación y DLLME	Q-TOF-HRMS, ESI	0,54-3,6	5,1-8,3 (n=5)	Este trabajo



### III.3.5. ANÁLISIS NO DIRIGIDO

La posible identificación de metabolitos procedentes de las BAs, así como de otros compuestos relacionados en las muestras de orina analizadas, se abordó mediante el tratamiento de los datos a través de una estrategia de análisis no dirigido. Para este propósito, los datos adquiridos haciendo uso del método *all-ion* se procesaron utilizando el software MS-DIAL, mediante la búsqueda de coincidencias en la masa exacta, patrones de fragmentación y perfil isotópico con una metodología basada en análisis metabolómico. Para MS1 y MS2, se utilizaron tolerancias para las masas de 0,01 y 0,025 Da, respectivamente, estableciendo una altura mínima de pico de 1000 para su detección. La deconvolución se llevó a cabo utilizando un valor de ventana de 0,5.

Basándonos en lo publicado en la bibliografía, se creó una base de datos de MS en la que se incluyeron 29 compuestos entre metabolitos de las BAs de interés, así como compuestos relacionados buscados también desde este enfoque no dirigido (Tabla III.5). Los compuestos incluidos en la Tabla III.5 pueden clasificarse en dos categorías diferentes dependiendo de si son un tipo de metabolito procedente de alguna de las cuatro BAs (OCT, TYR, SNP y PEP) o bien si se trata de un compuesto relacionado, es decir, aquellos que comparten similitudes en su estructura química en comparación con la de los analitos principales de este estudio.

Estructuralmente, OCT, TYR, SNP y PEP son bastante similares a epinefrina (adrenalina), norepinefrina (noradrenalina) y efedrina, por lo que se incluyeron en el estudio no dirigido a pesar de que efedrina es un derivado de fenilpropanilamina y no contiene una posición *para*-sustituida con un grupo hidroxilo [31]. Hordenina y N-metiltiramina se incluyeron en la búsqueda debido que a sintéticamente se obtienen a partir de TYR formando parte de la misma ruta biosintética y a que están incluidas en algunos suplementos nutricionales. Otros dos compuestos que también se estudiaron en todas las muestras fueron isopropiloctopamina (iso-propil-OCT) e isoprenalina, a pesar de que su ausencia en *Citrus aurantium* ya había sido citada por Mercader *et al.*, y la probabilidad de ser detectadas era mínima, (Figura III.9) [32].

**Tabla III.5.**

Metabolitos y compuestos relacionados con BAs monitorizados en el enfoque no dirigido.

Compuesto	Ion protonado			Ion dansilado			Ion didansilado		
	Fórmula molecular	Masa exacta	Fórmula molecular	Masa exacta	Fórmula molecular	Masa exacta	Fórmula molecular	Masa exacta	Masa exacta
Epinefrina	$[C_9H_{14}NO_3]^+$	184,0974	$[C_{21}H_{25}N_2O_5S]^+$	417,1485	----	----	----	----	----
Norepinefrina	$[C_8H_{12}NO_3]^+$	170,0818	$[C_{20}H_{23}N_2O_5S]^+$	403,1328	$[C_{32}H_{34}N_3O_7S_2]^+$	636,1839			
N-metilpiramina	$[C_9H_{14}NO]^+$	152,1076	$[C_{21}H_{25}N_2O_3S]^+$	385,1587	----	----			
Efedrina	$[C_{10}H_{16}NO]^+$	166,1233	$[C_{22}H_{27}N_2O_3S]^+$	399,1743	----	----			
Hordequina	$[C_{10}H_{16}NO]^+$	166,1233	----	----	----	----			
Iso-propil-OCT	$[C_{11}H_{18}NO_2]^+$	196,1338	$[C_{23}H_{29}N_2O_4S]^+$	429,1849	----	----			
Isoprenalina	$[C_{11}H_{18}NO_3]^+$	212,1288	$[C_{23}H_{29}N_2O_5S]^+$	445,1798	----	----			
MTYR1	$[C_8H_9O_2]^+$	137,0603	----	----	----	----			
MTYR2	$[C_8H_9O_3]^+$	153,0552	----	----	----	----			
MOCT	$[C_8H_{11}O_3]^+$	155,0709	----	----	----	----			
MSNP	$[C_8H_9O_4]^+$	169,0502	----	----	----	----			

**Tabla III.5. (Continuación)**

Metabolitos y compuestos relacionados con BAs monitorizados en el enfoque no dirigido.

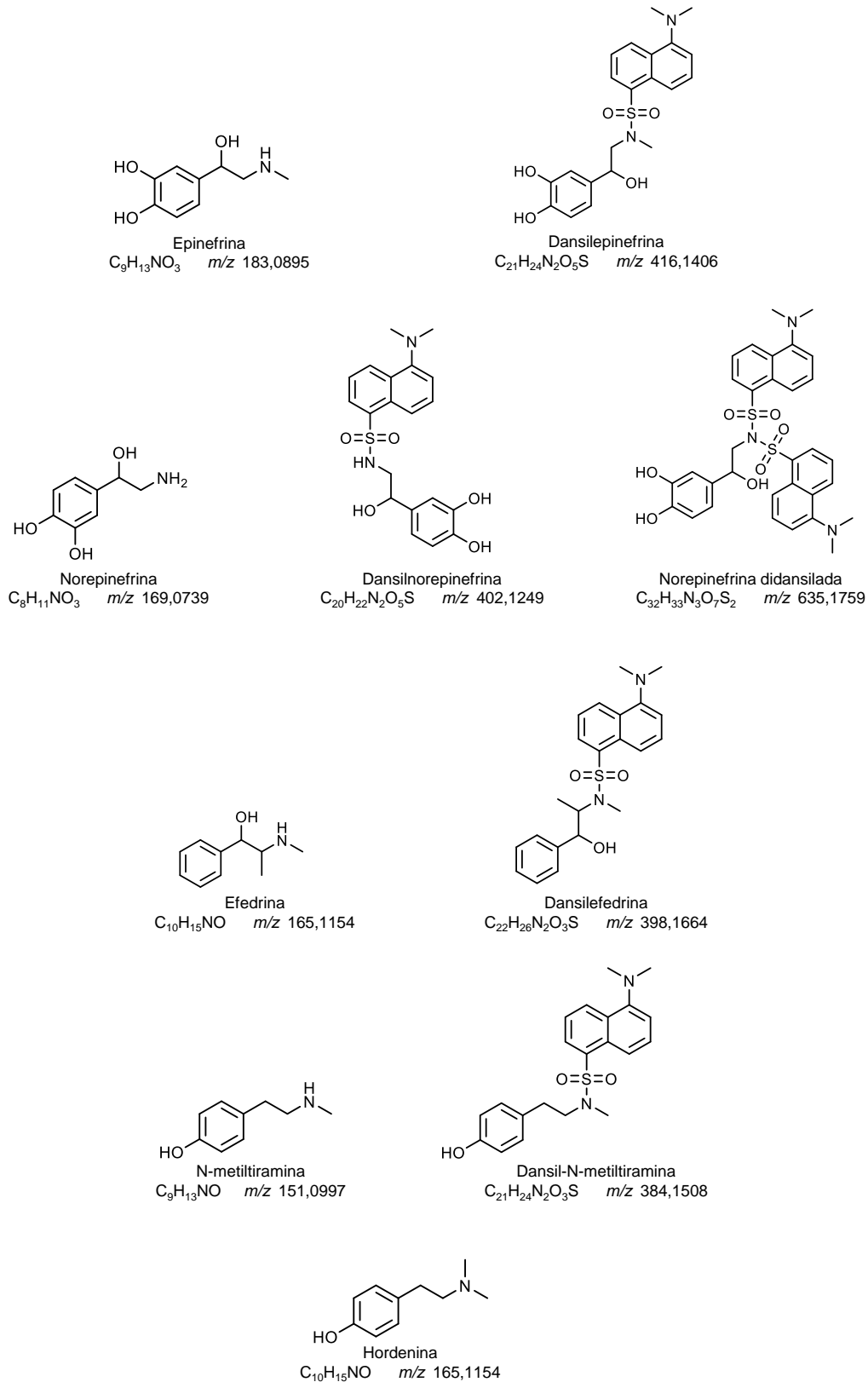
Compuesto	Ion protonado		Ion dancilado		Ion didansilado	
	Fórmula molecular	Masa exacta	Fórmula molecular	Masa exacta	Fórmula molecular	Masa exacta
TYR-S	[C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>4</sub> S] <sup>+</sup>	218,0488	[C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	451,0998	[C <sub>32</sub> H <sub>34</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> S <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	684,1509
OCT-S	[C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>5</sub> S] <sup>+</sup>	234,0437	[C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	467,0948	[C <sub>32</sub> H <sub>34</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> S <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	700,1483
SNP-S	[C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>5</sub> S] <sup>+</sup>	248,0593	[C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	481,1104	----	----
PEP-S	[C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>5</sub> S] <sup>+</sup>	248,0593	[C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	481,1104	----	----
MTYR1-S	[C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub> S] <sup>+</sup>	216,0099	----	----	----	----
MTYR2-S	[C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub> S] <sup>+</sup>	233,0121	----	----	----	----
MOCT-S	[C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> S] <sup>+</sup>	235,0277	----	----	----	----
MSNP-S	[C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub> S] <sup>+</sup>	249,0070	----	----	----	----
MPEP-S	[C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub> S] <sup>+</sup>	249,0070	----	----	----	----
TYR-G	[C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>7</sub> ] <sup>+</sup>	314,1241	[C <sub>26</sub> H <sub>31</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S] <sup>+</sup>	547,1751	[C <sub>38</sub> H <sub>42</sub> N <sub>3</sub> O <sub>11</sub> S <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	780,2292
OCT-G	[C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>8</sub> ] <sup>+</sup>	330,1190	[C <sub>26</sub> H <sub>31</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> S] <sup>+</sup>	563,1700	[C <sub>38</sub> H <sub>42</sub> N <sub>3</sub> O <sub>12</sub> S <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	796,2241

**Tabla III.5. (Continuación)**

Metabolitos y compuestos relacionados con BAs monitorizados en el enfoque no dirigido.

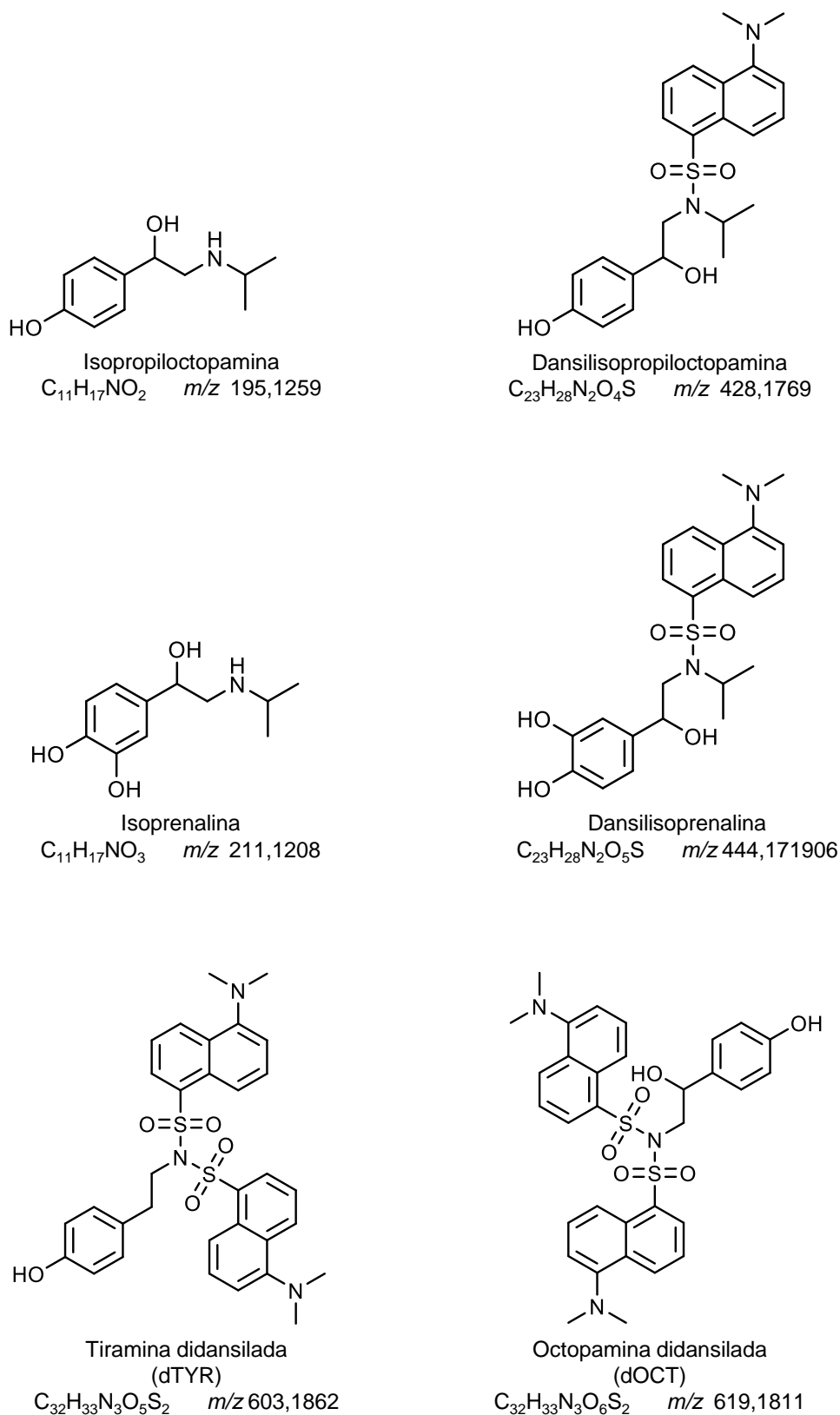
Compuesto	Ion protonado		Ion dancilado		Ion didancilado	
	Fórmula molecular	Masa exacta	Fórmula molecular	Masa exacta	Fórmula molecular	Masa exacta
SNP-G	$[C_{15}H_{22}NO_8]^+$	344,1346	$[C_{27}H_{33}N_2O_{10}S]^+$	577,1857	$[C_{27}H_{33}N_2O_{10}S]^+$	577,1857
PEP-G	$[C_{15}H_{22}NO_8]^+$	344,1346	----	----	----	----
MTYR1-G	$[C_{14}H_{17}O_8]^+$	312,0851	----	----	----	----
MTYR2-G	$[C_{14}H_{17}O_9]^+$	329,0873	----	----	----	----
MOCT-G	$[C_{14}H_{19}O_9]^+$	331,1030	----	----	----	----
MSNP-G	$[C_{14}H_{17}O_{10}]^+$	345,0822	----	----	----	----
MPEP-G	$[C_{14}H_{17}O_{10}]^+$	345,0822	----	----	----	----

Iso-propil-OCT, isopropiltoptamina; MTYR1, *p*-hidroxifenilacetaldéhid; MTYR2, ácido *p*-hidroxifenilacético acid; MOCT, *o*-hidroxifenilglicol; MSNP, ácido *p*-hidroximandélico acid.



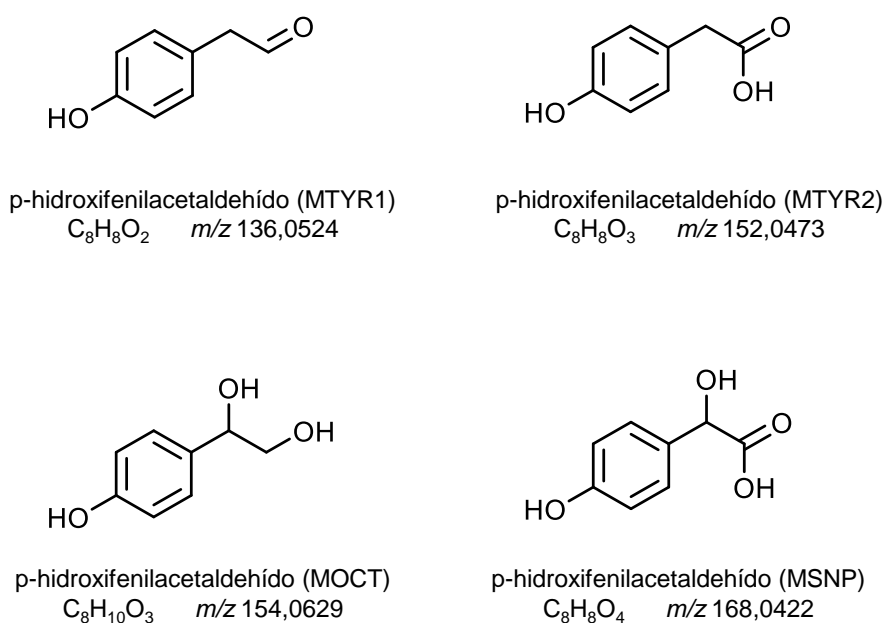
**Figura III.9.** Estructuras químicas derivatizadas y sin derivatizar de los compuestos relacionados con las BAs buscadas en el análisis no dirigido.

Continuación Figura III.9



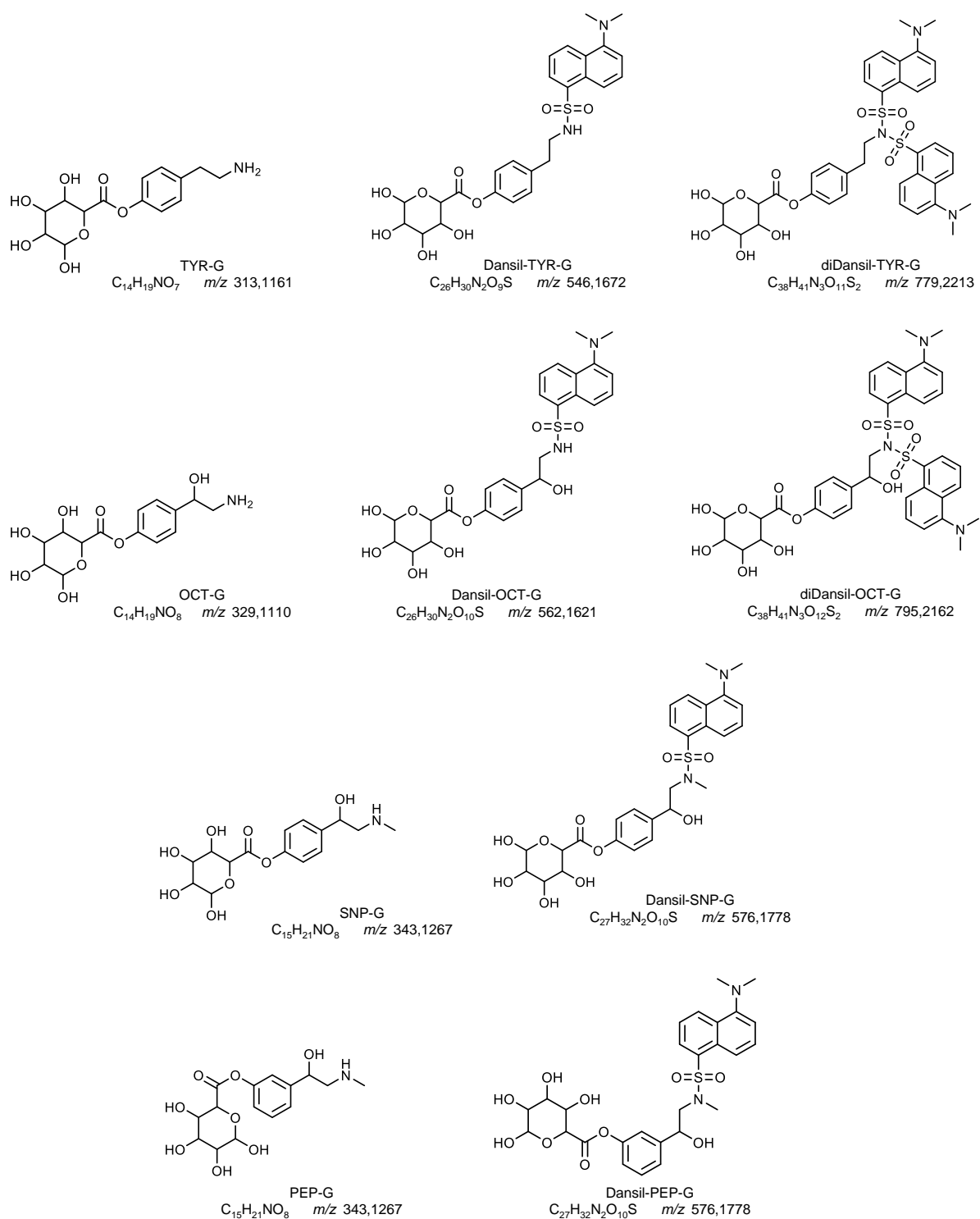
**Figura III.9.** Estructuras químicas derivatizadas y sin derivatizar de los compuestos relacionados con las BAs buscadas en el análisis no dirigido.

De los cuatro analitos estudiados, tres de ellos (TYR, OCT y SNP) derivan de la misma ruta sintética que empieza con el aminoácido L-fenilalanina al que le sigue L-tirosina. A partir de ahí, L-TYR, L-OCT y L-SNP se obtienen sintéticamente, por este orden, a partir de L-tirosina. Como cita Thevis *et al.* [15], OCT se metaboliza a ácido *p*-hidroximandélico (MSNP). Por otro lado, Medana *et al.*, indicaron la ausencia de desmetilación en el metabolismo de SNP y que los principales metabolitos de SNP encontrados en plasma y orina, MSNP y *p*-hidroxifenilglicol (MOCT), derivan ambos de la desaminación oxidativa y de los conjugados sulfonados (SNP-S) y glucurónidos (SNP-G) de fase II [17]. Además, TYR metaboliza a *p*-hidroxifenilacetaldehído (MTYR1), el cuál puede, a su vez, generar ácido *p*-hidroxifenilacético (MTYR2) en un siguiente paso (Figura III.10) [15].



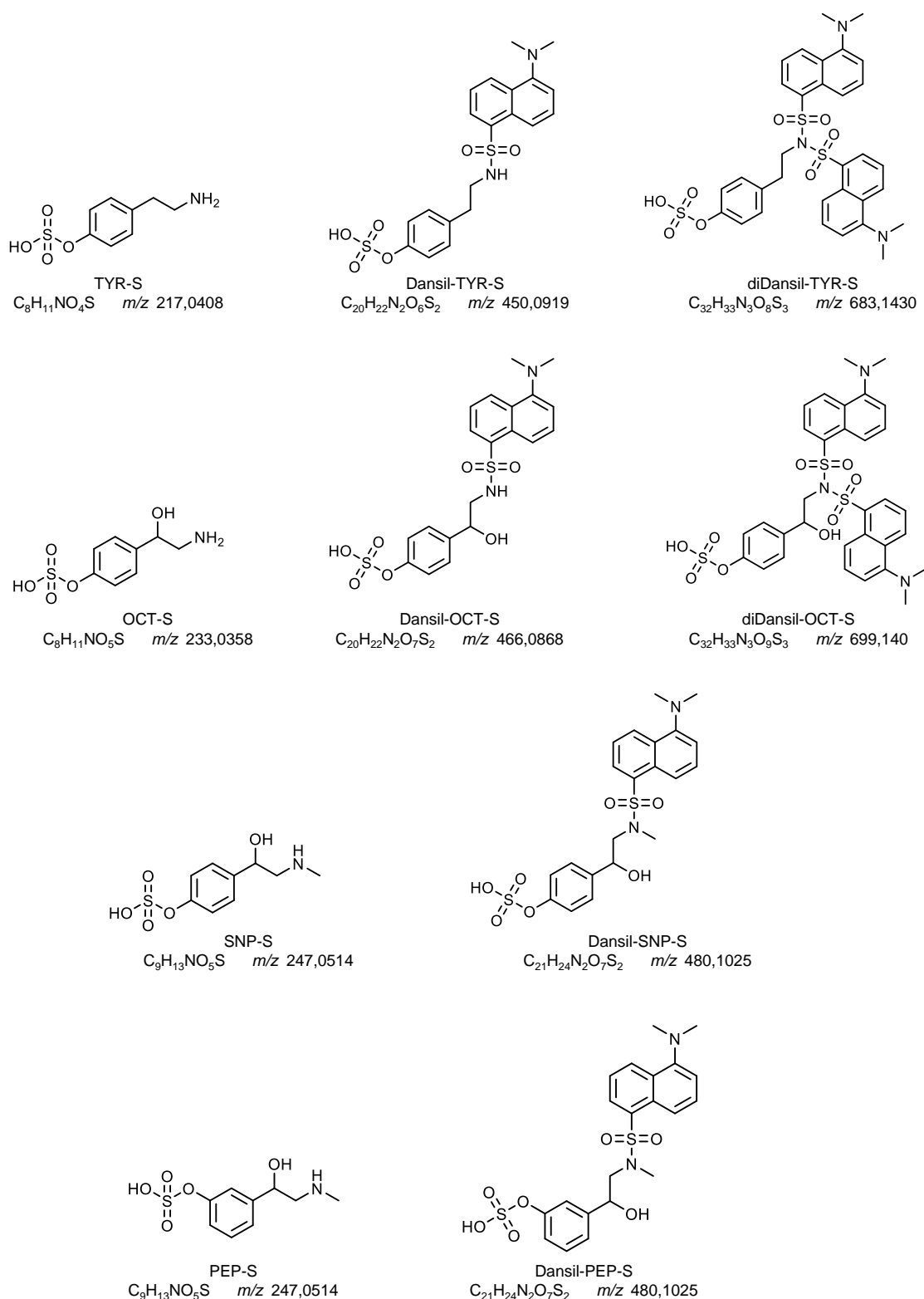
**Figura III.10.** Estructura química de los metabolitos generales procedentes de las rutas metabólicas de las BAs buscadas en el análisis no dirigido.

También se evaluó la posibilidad de formación de conjugados glucurónidos (G) (Figura III.11) y sulfonados (S) (Figura III.12) (OCT-G, TYR-G, SNP-G, PEP-G y OCT-S, TYR-S, SNP-S, PEP-S). Por esta razón, se incluyeron en nuestra base de datos otros posibles compuestos que no se encontraban descritos previamente en la bibliografía: OCT-G, TYR-G, SNP-G, PEP-G, OCT-S, TYR-S, SNP-S y PEP-S. Los conjugados glucurónidos aparecen cuando se forma un enlace O-glicosídico entre el grupo hidroxilo de las BAs y una molécula de glucurónido, mientras que la sulfonación ocurre cuando una molécula de sulfato se une al grupo hidroxilo de las BAs [33].



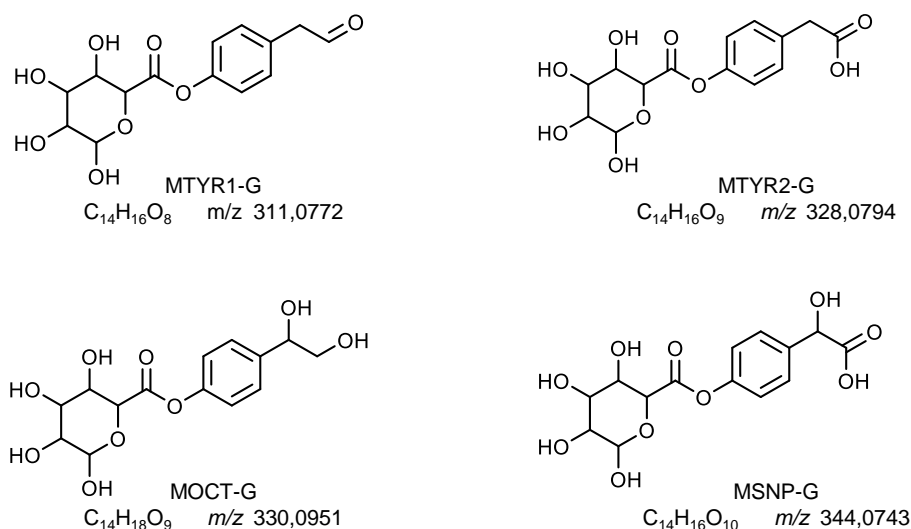
**Figura III.11.** Estructuras químicas de los conjugados glucurónidos de las BAs en su forma derivatizada y sin derivatizar buscados bajo análisis no dirigido.



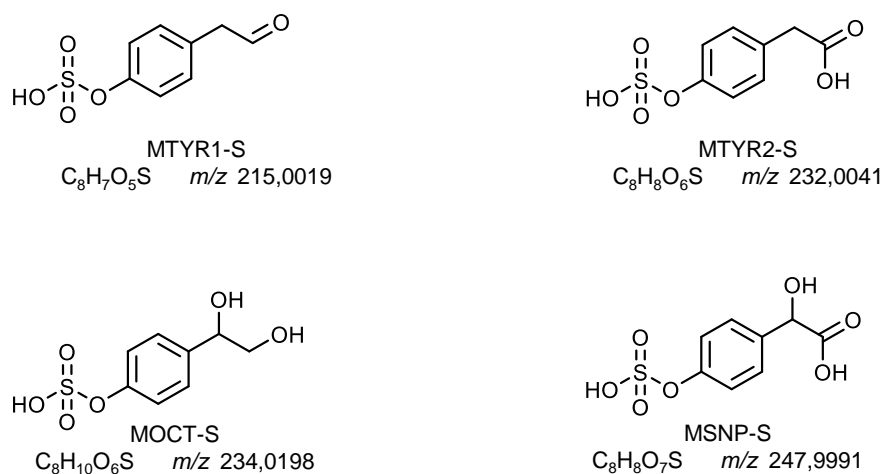


**Figura III.12.** Estructuras químicas de las BAs sulfonadas en su forma derivatizada y sin derivatizar buscadas bajo análisis no dirigido.

Se ha evaluado también la posibilidad de una posible conjugación tipo glucurónido (Figura III.13) y sulfato (Figura III.14) de los cuatro metabolitos principales de las BAs previamente mencionados (MTYR1, MTYR2, MOCT y MSNP), resultando en ocho nuevos metabolitos: MTYR1-G, MTYR2-G, MOCT-G, MSNP-G, MTYR1-S, MTYR2-S, MOCT-S y MSNP-S. Esta es una opción viable debido a la presencia de un grupo hidroxilo en el anillo de benceno de cada metabolito principal, el cuál es susceptible de sufrir esas reacciones. Sin embargo, ninguno de estos compuestos estudiados en el enfoque no dirigido se detectó en las nueve muestras de orina analizadas.



**Figura III.13.** Estructuras químicas de los metabolitos glucurónidos buscados bajo análisis no dirigido.



**Figura III.14.** Estructuras químicas de los metabolitos sulfonados buscados bajo análisis no dirigido.

### III.4. CONCLUSIONES

En este trabajo se propone un método analítico de elevada sensibilidad para la cuantificación de cuatro BAs (OCT, TYR, SNP y PEP), directamente relacionadas con el consumo de diversos suplementos nutricionales, en orina humana. Una reacción de derivatización sencilla y rápida junto con la preconcentración de los analitos derivatizados mediante DLLME permite alcanzar bajos límites de detección. Además, el análisis mediante UHPLC-Q-TOF-MS permite una identificación inequívoca de los compuestos basándose en los tiempos de retención y en el valor de la masa exacta. Por último, la detección por HRMS permite el análisis de las muestras bajo un enfoque no dirigido con objeto de investigar la presencia de posibles metabolitos procedentes de las BAs, así como de compuestos relacionados.

### III.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Y. Zhang, Y. Zhang, Y. Zhou, G. Li, W. Yang, X. Feng, A review of pretreatment and analytical methods of biogenic amines in food and biological samples since 2010, *J. Chromatogr. A* 1605 (2019) 360361, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.07.015>.
- [2] M. Papageorgiou, D. Lambropoulou, C. Morrison, E. Kłodzińska, J. Namieśnik, J. Płotka-Wasyłka, Literature update of analytical methods for biogenic amines determination in food and beverages, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 98 (2018) 128-142, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.11.001>.
- [3] K. Maráková, J. Piešťanský, Z. Zelinková, P. Mikuš, Simultaneous determination of twelve biogenic amines in human urine as potential biomarkers of inflammatory bowel diseases by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 186 (2020) 113294, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113294>.
- [4] C. Ruiz-Capillas, A. M. Herrero, Impact of biogenic amines on food quality and safety, *Foods* 8 (2019) 62, <https://doi.org/10.3390/foods8020062>.
- [5] R. S. Pawar, S. Sagi, D. Leontyev, Analysis of bitter orange dietary supplements for natural and synthetic phenethylamines by LC-MS/MS, *Drug Test. Anal.* 12 (2020) 1241-1251, <https://doi.org/10.1002/dta.2871>.
- [6] A. H. W. Koh, R. Chess-Williams, A. E. Lohning, HPLC-UV-QDa analysis of Citrus aurantium-labelled pre-workout supplements suggest only a minority contain the plant extract, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 193 (2021) 113746, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113746>.

- [7] Y. Zhang, B. Jiao, Simultaneous determination of six protoalkaloids in Chinese local varieties of loose-skin mandarins and sweet oranges by strong cation exchange-high performance liquid chromatography, *Food Anal. Methods* 12 (2019) 677-686, <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1401-0>.
- [8] L. G. Rossato, V. M. Costa, R. P. Limberger, M. L. Bastos, F. Remião, Synephrine: From trace concentrations to massive consumption in weight-loss, *Food Chem. Toxicol.* 49 (2011) 8-16, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.11.007>.
- [9] European Food Safety Authority. Advice on the EFSA guidance document for the safety assessment of botanicals and botanical preparations intended for use as food supplements, based on real case studies, *EFSA* 7 (2009) 280, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.280>.
- [10] D. Jones, Nutraceutical composition useful for inducing or maintaining weight loss, enhancing physical performance, and increasing muscle mass comprises at least one of synephrine, hordenine, octopamine, tyramine and N-methyltyramine, Patent ZHISHIN INC (ZHIS-Non-Starndard), Primary Accession Number: 2004-042526. Disponible online: <https://www.webofscience.com/wos/allldb/full-record/DIIDW:2004042526>.
- [11] W. Tang, S. Ge, F. Gao, G. Wang, Q. Wang, P. He, Y. Fang, On-line sample preconcentration technique based on a dynamic pH junction in CE-amperometric detection for the analysis of biogenic amines in urine, *Electrophoresis* 34 (2013) 2041-2048, <https://doi.org/10.1002/elps.201300116>.
- [12] T. Chatzimitakos, V. Exarchou, S. A. Ordoudi, Y. Fiamegos, C. Stalikas, Ion-pair assisted extraction followed by <sup>1</sup>H NMR determination of biogenic amines in food and biological matrices, *Food Chem.* 202 (2016) 445-450, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.013>.
- [13] B. Fodor, E. Üveges, I. Molnár-Perl, Direct sample preparation and simultaneous perfluoroacylation - Trimethylsilylation of biogenic monoamines along with their acidic metabolites for a single step analysis by GC-MS, *Anal. Chim. Acta* 1127 (2020) 9-19, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.06.032>.
- [14] A. Thomas, G. Sigmund, S. Guddat, W. Schänzer, M. Thevis, Determination of selected stimulants in urine for sports drug analysis by solid phase extraction via cation exchange and means of liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Eur. J. Mass Spectrom.* 14 (2008) 135-143, <https://doi.org/10.1255/ejms.925>.

- [15] M. Thevis, A. Koch, G. Sigmund, A. Thomas, W. Schänzer, Analysis of octopamine in human doping control samples, *Biomed. Chromatogr.* 26 (2012) 610-615, <https://doi.org/10.1002/bmc.1705>.
- [16] F. Gosetti, E. Mazzucco, M. C. Gennaro, E. Marengo, Simultaneous determination of sixteen underivatized biogenic amines in human urine by HPLC-MS/MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 907-916, <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6269-z>.
- [17] C. Medana, P. Calza, V. Giancotti, F. Dal Bello, M. Aragno, C. Baiocchi, Study of the photocatalytic transformation of synephrine: A biogenic amine relevant in anti-doping analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 1105-1113, <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6593-3>.
- [18] J. C. Domínguez-Romero, J. F. García-Reyes, F. J. Lara-Ortega, A. Molina-Díaz, Screening and confirmation capabilities of liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry for the determination of 200 multiclass sport drugs in urine, *Talanta* 134 (2015) 74-88, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.10.050>.
- [19] M. Bader, T. Lang, R. Lang, T. Hofmann, Synephrine as a specific marker for orange consumption, *J. Agric. Food Chem.* 65 (2017) 4853-4858, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01941>.
- [20] X. M. Han, Y. J. Qin, Y. Zhu, X. L. Zhang, N. X. Wang, Y. Rang, Development of an underivatized LC-MS/MS method for quantitation of 14 neurotransmitters in rat hippocampus, plasma and urine: Application to CUMS induced depression rats, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 174 (2019) 683-695, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.06.043>.
- [21] T. Saenger, F. Hübner, V. Lindemann, K. Ganswind, H. U. Humpf, Urinary biomarkers for orange juice consumption, *Mol. Nutr. Food Res.* 65 (2021) 200781, <https://doi.org/10.1002/mnfr.202000781>.
- [22] A. Lkhagva, C. C. Shen, Y. S. Leung, H. C. Tai, Comparative study of five different amine-derivatization methods for metabolite analyses by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1610 (2020) 460536, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460536>.
- [23] J. Płotka-Wasyłka, V. Simeonov, J. Namieśnik, An in-situ derivatization dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas-chromatography mass spectrometry for determining biogenic amines in home-made fermented alcoholic drinks, *J. Chromatogr. A* 1453 (2016) 10-18, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.05.052>.

- [24] K. J. Huang, C. Y. Wei, W. L. Liu, W. Z. Xie, J. F. Zhang, W. Wang, Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection for sensitive determination of biogenic amines in rice wine samples, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6636-6641, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.07.070>.
- [25] K. J. Huang, C. X. Jin, S. L. Song, C. Y. Wei, Y. M. Liu, J. Li, Development of an ionic liquid-based ultrasonic-assisted liquid-liquid microextraction method for sensitive determination of biogenic amines: Application to the analysis of octopamine, tyramine and phenethylamine in beer samples, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 879 (2011) 579-584, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.01.018>.
- [26] D. Cao, X. Xu, S. Xue, X. Feng, L. Zhang, An in-situ derivatization combined with magnetic ionic liquid-based fast dispersive liquid-liquid microextraction for determination of biogenic amines in food samples, *Talanta* 199 (2019) 212-219, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.02.065>.
- [27] J. Wang, Z. Liu, Y. Qu, Ultrasound-assisted dispersive solid-phase extraction combined with reversed-phase high-performance liquid chromatography-photodiode array detection for the determination of nine biogenic amines in canned seafood, *J. Chromatogr. A* 1636 (2021) 461768, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461768>.
- [28] M. Sajid, Dispersive liquid-liquid microextraction: Evolution in design, application areas, and green aspects, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 152 (2022) 116636, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116636>.
- [29] C. D'Ovidio, M. Bonelli, E. Rosato, A. Tartaglia, H. I. Ulusoy, V. Samanidou, K. G. Furton, A. Kabir, I. Ali, F. Savini, M. Locatelli, U. Grazia, Novel applications of microextraction techniques focused on biological and forensic analyses, *Separations* 9 (2022) 18, <https://doi.org/10.3390/separations9010018>.
- [30] M. Sajid, Dispersive liquid-liquid microextraction coupled with derivatization: A review of different modes, applications, and green aspects, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 106 (2018) 169-182, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.07.009>.
- [31] S. J. Stohs, H. G. Preuss, M. Shara, A review of the receptor-binding properties of p-synephrine as related to its pharmacological effects, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 1 (2011) 482973, <https://doi.org/10.1155/2011/482973>.
- [32] J. Mercader, E. Wanecq, J. Chen, C. Carpené, Isopropyl-norsynephrine is a stronger lipolytic agent in human adipocytes than synephrine and other amines present in Citrus

- aurantium, *J. Physiol. Biochem.* 67 (2011) 443-452, <https://doi.org/10.1007/s13105-011-0078-2>.
- [33] A. K. Sonker, M. Bhateria, K. Karsauliya, S. P. Singh, Investigating the glucuronidation and sulfation pathways contribution and disposition kinetics of Bisphenol S and its metabolites using LC-MS/MS-based nonenzymatic hydrolysis method, *Chemosphere* 273 (2021) 129624, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129624>.





# CONCLUSIONES





Los resultados obtenidos en Tesis Doctoral permiten establecer como conclusión general que el uso de las diferentes técnicas de microextracción, tanto en fase líquida como en fase sólida magnética, acopladas a la separación por LC y detección mediante HRMS supone una muy buena herramienta para el análisis de una gran variedad de compuestos orgánicos de naturaleza y propiedades fisicoquímicas muy variadas presentes en matrices biológicas humanas de fácil accesibilidad. Las conclusiones específicas derivadas de la investigación realizada en esta Tesis se detallan a continuación:

1. Las técnicas de microextracción han permitido alcanzar el objetivo de desarrollar métodos analíticos sensibles y selectivos, aportando numerosas ventajas respecto de los tratamientos de muestra convencionales. Los límites de detección han sido rebajados considerablemente, permitiendo simplificar de manera simultánea la matriz de la muestra y aislar los analitos de interferentes que podrían complicar su detección y cuantificación.

2. El uso de DLLME supone una forma rápida, sencilla y de bajo coste para la extracción de capsaicinoides y aminos biogénicas de muestras de orina, implicando un consumo mínimo de disolventes orgánicos. En el análisis de aminos biogénicas se ha utilizado la modalidad clásica de DLLME en la que el disolvente de extracción es más denso que el agua, mientras que en la determinación de capsaicinoides, se ha hecho uso de un agente extractante menos denso que el agua, lo que pone de manifiesto la influencia de la naturaleza de los analitos a la hora de implementar una técnica u otra.

3. Considerando la incompatibilidad de los disolventes extractantes utilizados en DLLME con la técnica de separación cromatográfica seleccionada, la evaporación de la fase orgánica enriquecida con los analitos y su posterior reconstitución en un volumen mínimo de disolvente ha solventado este problema a la vez que ha permitido incrementar aún más los factores de preconcentración previamente alcanzados.

4. Se ha demostrado el potencial de la técnica DMSPE para la extracción y preconcentración de capsaicinoides. En este sentido, la selección del material magnético adecuado es fundamental para garantizar el éxito de la extracción. Además, la posibilidad de funcionalizar la superficie de las nanopartículas magnéticas ha sido clave para conseguir un material magnético selectivo hacia los analitos. De entre los distintos recubrimientos ensayados los nanotubos de carbono han proporcionado los mejores resultados.

5. La caracterización de los nanomateriales magnéticos empleados en DMSPE resulta de gran interés para controlar las propiedades de la fase extractante y garantizar la repetitividad de los procedimientos de extracción. El uso de técnicas espectroscópicas y de microscopía ha

permitido una buena caracterización del material seleccionado en esta Tesis para la preconcentración de capsaicinoides.

6. La aplicación de las técnicas miniaturizadas seleccionadas en esta Tesis Doctoral requirió una mínima preparación previa de las muestras de suero y orina, incluyendo tratamientos tan simples como centrifugación, filtración o precipitación de proteínas.

7. La correcta selección de las fases estacionaria y móvil ha permitido la separación de compuestos con estructuras estrechamente relacionadas. Así, ha sido posible la separación de SNP y PEP cuya diferencia estructural se debe a la localización del grupo hidroxilo del anillo aromático, localizándose en la posición para- en el caso de SNP, y en posición meta- en el caso de PEP. Es de destacar que todas las separaciones se han llevado a cabo en fase reversa, tratándose de una de las técnicas de LC más ampliamente usadas. En relación a las fases móviles empleadas, en todos los casos se trata de mezclas de acetonitrilo y una fase acuosa en presencia de ácido fórmico para favorecer la ionización de los analitos en el sistema de detección. Siempre que ha sido posible, se ha optado por el modo de elución isocrático, aunque la aplicación de gradientes de elución ha permitido acortar la etapa de separación cromatográfica.

8. Los métodos propuestos han sido debidamente validados habiéndose obtenido excelentes parámetros relativos a intervalos de linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión y veracidad. El efecto matriz ha sido estudiado mediante la comparación estadística de las pendientes de calibración externa, con disoluciones patrón, y las obtenidas mediante adiciones estándar a las muestras, en todos los casos haciendo uso de un patrón interno. Cabe resaltar que el tedioso método de adiciones estándar a las muestras ha podido ser eludido en todos los casos, pudiendo aplicarse calibración externa o usando una matriz modelo.

9. El sistema de detección basado en HRMS se presenta como la herramienta ideal para la detección de compuestos previamente sometidos a separaciones cromatográficas, ya que permite la identificación y cuantificación de los analitos a niveles traza. Además, esta herramienta ha permitido también ampliar el campo de análisis, ya que ofrece realizar análisis bajo enfoques no dirigidos hacia la búsqueda de metabolitos o compuestos relacionados con los analitos objeto de estudio.

La tabla siguiente resume las características más importantes de los métodos de análisis desarrollados en esta Tesis Doctoral.

Analitos	Muestra	Tratamiento de la muestra	Preconcentración	Columna cromatográfica	Fase móvil	Detección (MS)	
						Interfase	Analizador
Capsaicinoides: CAP, DCAP y PCAP	Orina humana	Centrifugación y filtración	DLLME: 7,5 mL muestra + 600 µL MIBK + 1,5 mL EtOH. Reconstrucción: 150 µL AcN	Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 (100 mm x 2,1 mm, 1,8 µm)	50:50 v/v AcN: reguladora HCOOH/NH <sub>4</sub> COOH Isocrático Flujo: 0,4 mL/min	ESI+	Q-TOF
Capsaicinoides: CAP, DCAP y PCAP	Suero humano	Precipitación de proteínas con AcN	DMSPE: Adsorción: 10 mL muestra + 50 mg Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @MWCNTs. Desorción: 1,5 mL AcN. Reconstrucción: 50 µL AcN	Omega Luna C18 (100 mm x 2,1 mm, 1,6 µm)	50:50 v/v AcN:HCOOH 0,1% Isocrático Flujo: 0,4 mL/min	ESI+	Q-TOF
Aminas biogénicas: OCT, TYR, SNP y PEP	Orina humana	Centrifugación, filtración y derivatización con DNSCl	DLLME: 5 mL muestra + 350 µL CHCl <sub>3</sub> + 2 mL EtOH. Reconstrucción: 150 µL AcN	Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 (100 mm x 2,1 mm, 1,8 µm)	AcN:HCOOH 0,1% Gradiente Flujo: 0,4 mL/min	ESI+	Q-TOF



# ANEXOS



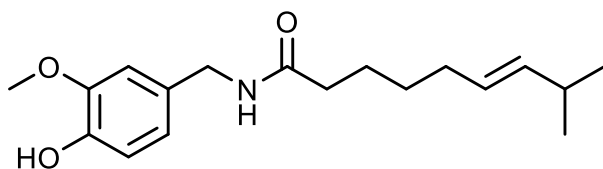




## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS COMPUESTOS BAJO ESTUDIO

A continuación, se describen algunas de las propiedades fisicoquímicas más características de los protoalcaloides (capsaicinoides y aminas biogénicas) que han sido objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral: capsaicina (CAP), dihidrocapsaicina (DCAP), N-vanillilnonanamida (PCAP), octopamina (OCT), tiramina (TYR), sinefrina (SNP) y fenilefrina (PEP). Los datos presentados se han obtenido de las bases de datos Chempider y Pubchem [1, 2].

### Capsaicina (CAP)


**Nombre sistemático:**

8-metil-N-vanillil-6-nonenamida

**Fórmula molecular:** C<sub>18</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>3</sub>
**Masa monoisotópica:** 305,1990 Da

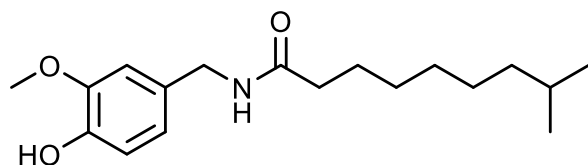
**Log P:** 3,75

**pKa:** 9,93 y -1,4

**Solubilidad:** 28,93 mg/L (agua, 25 °C)

**Punto de fusión:** 65 °C

### Dihidrocapsaicina (DCAP)


**Nombre sistemático:**

N-[(4-hidroxi-3-metoxifenil)metil]-8-metilnonanamida

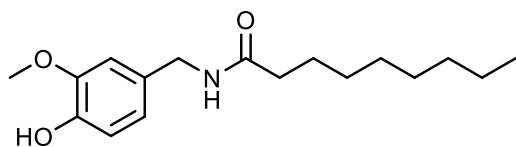
**Fórmula molecular:** C<sub>18</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>3</sub>
**Masa monoisotópica:** 307,2147 Da

**Log P:** 3,556

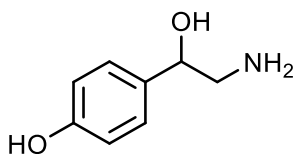
**pKa:** --

**Solubilidad:** 2,811 mg/L (agua, 25 °C)

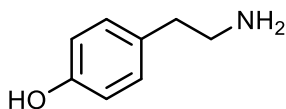
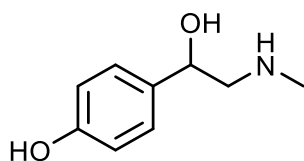
**Punto de fusión:** 65,5 – 65,8 °C

**N-vanililnonanamida (PCAP)****Nombre sistemático:**

N-[(4-hidroxi-3-metoxifenil)metil]nonanamida

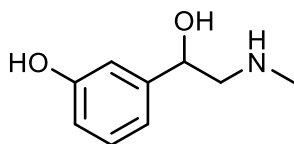
**Fórmula molecular:** C<sub>17</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>3</sub>**Masa monoisotópica:** 293,1990 Da**Log P:** 3,202**pKa:** 9,77**Solubilidad:** muy poco soluble en agua**Punto de fusión:** 124-128 °C**Octopamina (OCT)****Nombre sistemático:**

4-(2-amino-1-hidroxietil)fenol

**Fórmula molecular:** C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>**Masa monoisotópica:** 153,0789 Da**Log P:** --**pKa:** 8,98**Solubilidad:** > 28,4 mg/L (agua, 25 °C)**Punto de fusión:** 170 °C**Tiramina (TYR)****Nombre sistemático:** 4-(2-aminoetil)fenol**Fórmula molecular:** C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>NO**Masa monoisotópica:** 137,0840 Da**Log P:** 0,68**pKa:** 9,6**Solubilidad:** 0,0104 mg/mL (agua, 15 °C)**Punto de fusión:** 164-165 °C**Sinefrina (SNP)****Nombre sistemático:**

(R)-4-(1-hidroxi-2-(metilamino)etil)fenol

**Fórmula molecular:** C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>**Masa monoisotópica:** 167,0946 Da**Log P:** -0,45**pKa:** 9,79**Solubilidad:** 0,0004265 mg/L (agua, 25 °C)**Punto de fusión:** 162-164 °C

**Fenilefrina (PEP)****Nombre sistemático:**

3-[(1R)-1-hidroxi-2-(metilamino)etil]fenol

**Fórmula molecular:** C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>**Masa monoisotópica:** 167,0946 Da**Log P:** -0,31**pKa:** 8,97**Solubilidad:** 10<sup>6</sup> mg/L (agua, 25 °C)**Punto de fusión:** 140-145 °C**BIBLIOGRAFÍA**

- [1] ChemSpider. <https://chemspider.com>. Último acceso: 2 de junio, 2023.
- [2] PubChem. <https://pubchem.com>. Último acceso: 2 de junio, 2023.



## PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

La presente Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones, que se han presentado en Congresos Nacionales e Internacionales:

**Metabolomic study of capsaicinoid compounds in urine samples by dispersive liquid-liquid microextraction and ultra-high performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry.**

María Consolación Rodríguez-Palazón, Natalia Arroyo-Manzanares, Pilar Viñas, Natalia Campillo.

*Microchemical Journal* 178 (2022) 107373

DOI: 10.1016/j.microc.2022.107373

Presentado como comunicación oral en “I Symposium on Chemical Physical Sciences For Young Researchers”, Murcia (2020).



**Dispersive magnetic solid-phase extraction for capsaicinoid compounds in human serum using LC-HRMS: targeted and non-targeted approaches.**

María Consolación Rodríguez-Palazón, Natalia Arroyo-Manzanares, Pilar Viñas, Ignacio López-García, Manuel Hernández-Córdoba, Natalia Campillo.

*Analytical and Bioanalytical Chemistry* 415 (2023) 2133-2145

DOI: 10.1007/s00216-023-04544-7

Presentado como póster en “2nd European Sample Preparation e-Conference”, celebrado en formato virtual (2022).



**Monitoring of biogenic amines in human urine using dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography with high-resolution mass spectrometry.**

María Consolación Rodríguez-Palazón, Natalia Arroyo-Manzanares, Natalia Campillo, Pilar Viñas.

*Separations* 10 (2023) 232

DOI: 10.3390/separations10040232

Presentado como comunicación oral en “VI Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia”, Murcia (2021).



# **ABREVIATURAS**







**ABREVIATURAS**

AcN, acetonitrilo

APCI, ionización química a presión atmosférica

API, ionización a presión atmosférica

APPI, fotoionización a presión atmosférica

APTS, (3-aminopropil)-trietoxisilano

AQC, 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo de carbamato

BA, amina biogénica

BNZCl, cloruro de benzoílo

CADB, ácido ciclohexanocarboxílico 3,4-dimetoxibencilamida

CAP, capsaicina

CCD, diseño central compuesto

CD, ciclodextrina

CE, electroforesis capilar

CNBF, 4-cloro-3,5-dinitrobencenotrifluoruro

CNTs, nanotubos de carbono

CPE, extracción en punto de nube

CTAB, bromuro de hexadeciltrimetilamonio

DAD, detector de diodos en serie

DBSCl, cloruro de dabsilo

DCAP, dihidrocapsaicina

DCM, diclorometano

DDP, cisplatino

DEEMM, etoximetilenmalonato de dietilo

DESs, disolventes eutécticos profundos

DLLME, microextracción dispersiva líquido-líquido

DLS, dispersión dinámica de luz

DMSPE, microextracción dispersiva en fase sólida magnética

DNSCI, cloruro de dansilo

DOPA, 3,4-dihidroxifenilalanina

DSDME, microextracción en gota directamente suspendida

DSPE, extracción en fase sólida dispersiva

EF, factor de enriquecimiento

EFSA, Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

EIC, cromatograma de iones extraídos

ER, recuperación de la extracción

ESI, ionización por electrospray

EtOH, etanol

FDA, Administración de Alimentos y Medicamentos

FLD, detector de fluorescencia

FTIR, espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier

G, grafeno

GC, cromatografía de gases

GFAAS, espectroscopía de absorción atómica en horno de grafito

GSH, glutatión

GO, óxido de grafeno

HCAP, homocapsaicina

HDCAP, homodihidrocapsaicina

HF-LPME, microextracción en fase líquida con fibra hueca

HOR, hordenina

HPLC, cromatografía líquida de alta resolución

HRMS, espectrometría de masas de alta resolución

ILs, líquidos iónicos

IS, estándar interno

IT, trampa de iones

IT-TOF, trampa de iones con tiempo de vuelo

LC, cromatografía líquida

LD<sub>50</sub>, dosis letal al 50%

LDSs, disolventes de baja densidad

LLE, extracción líquido-líquido

LOD, límite de detección

LOQ, límite de cuantificación

LPME, microextracción en fase líquida

MECK, cromatografía capilar electrocinética micelar

MeOH, metanol

MIBK, metil isobutil cetona

MIPs, polímeros de impresión molecular

MNPs, nanopartículas magnéticas

MS, espectrometría de masas

MS/MS, espectrometría de masas en tándem

MWCNTs, nanotubos de carbono de pared múltiple

*m/z*, relación carga-masa

NCAP, nornocapsaicina

NDCAP, nordihidrocapsaicina

NMT, N-metiltiramina

OAD, diseño de matriz ortogonal

- OCT, octopamina
- ODS, octadecilsililo
- OMS, Organización Mundial de la Salud
- OPA, *o*-ftalaldehído
- PAs, poliaminas
- PANI, polianilina
- PCAP, N-vanililnonanamida (pseudocapsaicina)
- PEP, fenilefrina
- PFP, pentafluorofenil
- PNP, dolor neuropático periférico
- PPA, fenilpropanolamina
- PPy, polipirrol
- PTFE, politetrafluoroetileno
- Q, cuadrupolo simple
- QAV, Química Analítica Verde
- QqQ, triple cuadrupolo
- Q-TOF, cuadrupolo con tiempo de vuelo
- RMN, resonancia magnética nuclear
- ROS, especies de oxígeno reactivas
- RP-LC, cromatografía líquida en fase reversa
- RSD, desviación estándar relativa
- RXD, difracción de rayos X
- SA-DLLME, microextracción dispersiva líquido-líquido asistida por surfactantes
- SALLE, extracción líquido-líquido asistida con sal
- SBSE, extracción por adsorción sobre barras agitadoras
- SDME, microextracción en gota simple

SDS, dodecil sulfato sódico

SEM, microscopía electrónica de barrido

SFODME, microextracción en gota orgánica flotante solidificada

SFOD-DLLME, DLLME con solidificación de la gota orgánica flotante

SHSs, disolventes de hidrofiliidad intercambiable

SHU, unidades de picante de Scoville

S/N, señal ruido

SNP, sinefrina

SPE, extracción en fase sólida

SPME, microextracción en fase sólida

SRM, material de referencia certificado

SUPRAs, disolventes supramoleculares

SWCNTs, nanotubos con estructura de pared única

TEM, microscopia electrónica de transmisión

TIC, cromatograma de iones totales

TLC, cromatografía en capa fina

TOF, tiempo de vuelo

TRPV1, receptor de potencial transitorio vaniloide de subtipo 1

TYR, tiramina

UHPLC, cromatografía líquida de ultra-alta resolución

UA-DLLME, microextracción dispersiva líquido-líquido asistida por ultrasonidos

UV, ultravioleta

VA-DLLME, microextracción dispersiva líquido-líquido asistida por agitación vórtex

WADA, Agencia Mundial Antidopaje

$\mu$ DSPE, extracción en fase sólida microdispersiva



# **ÍNDICE DE FIGURAS**







**INTRODUCCIÓN**

<b>Figura 1.</b> Esquema de clasificación de los alcaloides en base a los tres criterios establecidos .....	22
<b>Figura 2.</b> Estructura general de los capsaicinoides.....	24
<b>Figura 3.</b> Estructura química y fórmula molecular de los principales capsaicinoides .....	25
<b>Figura 4.</b> Comparación estructural entre capsaicinoides (izquierda) y capsinoides (derecha).....	25
<b>Figura 5.</b> Ruta biosintética para la obtención de capsaicinoides. ....	27
<b>Figura 6.</b> Estructura química de las dos formas enantioméricas de efedrina y sus principales derivados.....	35
<b>Figura 7.</b> Estructura química y fórmula molecular de las principales BAs alifáticas .....	36
<b>Figura 8.</b> Estructura química y fórmula molecular de las principales BAs aromáticas. ....	37
<b>Figura 9.</b> Estructura química y fórmula molecular de las BAs heterocíclicas.....	37
<b>Figura 10.</b> Esquema de la ruta biosintética para la obtención de las BAs estudiadas a partir de los aminoácidos fenilalanina y tirosina. ....	40
<b>Figura 11.</b> Comparación de las rutas biosintéticas derivadas del aminoácido tirosina e implicadas en la obtención de feniletilaminas y catecolaminas. ....	41
<b>Figura 12.</b> Estructura química de compuestos con estructura una similar a SNP.....	43
<b>Figura 13.</b> Estructura química de los tres isómeros de posición de SNP .....	44
<b>Figura 14.</b> Enantiómeros R y S de <i>p</i> -SNP .....	45
<b>Figura 15.</b> Esquema del proceso de estimulación adrenérgica en los adipocitos.....	46
<b>Figura 16.</b> Estructuras químicas de los principales reactivos empleados en la derivatización de aminas .....	53
<b>Figura 17.</b> Esquema de reacción de DNSCI con la estructura general de las aminas estudiadas en esta Tesis .....	54
<b>Figura 18.</b> Ventajas ofrecidas por los sistemas miniaturizados de análisis.....	61
<b>Figura 19.</b> Principales ventajas de las técnicas de microextracción .....	62
<b>Figura 20.</b> Procedimiento experimental DLLME .....	64

<b>Figura 21.</b> Procedimiento experimental de aplicación de DMSPE .....	71
<b>Figura 22.</b> Nanoestructuras de fullereno, CNTs y G .....	75
<b>Figura 23.</b> Estructura de (A) SWCNTs y (B) MWCNTs .....	76
<b>Figura 24.</b> Tipos de funcionalización de las MNPs con CNTs: (A) endoédrica y (B) exoédrica .....	77
<b>Figura 25.</b> Principales técnicas utilizadas en la caracterización de MNPs. ....	80
<b>Figura 26.</b> Esquema de funcionamiento de un sistema DLS .....	81
<b>Figura 27.</b> Esquema general del funcionamiento de un espectrómetro de masas .....	82
<b>Figura 28.</b> Formación de iones mediante ESI.....	84
<b>Figura 29.</b> Esquema de un analizador de masas TOF .....	87
<b>Figura 30.</b> Representación esquemática del papel de las disciplinas -ómicas en la evaluación genotipo-fenotipo .....	88
<b>Figura 31.</b> Diferencias del diseño experimental bajo enfoque dirigido y no dirigido .....	89
<b>Figura 32.</b> Etapas incluidas en un estudio metabolómico.....	90

## CAPÍTULO I

<b>Figura I.1.</b> Estructura química de los tres capsaicinoides estudiados.....	113
<b>Figura I.2.</b> Pretratamiento de las muestras de orina.....	119
<b>Figura I.3.</b> Procedimiento DLLME para la preconcentración de capsaicinoides en orina.....	120
<b>Figura I.4.</b> Efecto de la naturaleza (A) del disolvente extractante y (B) del disolvente dispersante en la eficiencia de extracción del procedimiento DLLME para los analitos seleccionados.....	122
<b>Figura I.5.</b> Efecto del (A) volumen de muestra y (B) pH de la disolución dadora en la eficiencia del procedimiento DLLME para los analitos estudiados.....	123
<b>Figura I.6.</b> Cromatogramas de iones extraídos (EICs) para los capsaicinoides estudiados y el IS en una muestra de orina fortificada a 100 µg/L .....	127
<b>Figura I.7.</b> Estructura química de los metabolitos comunes a CAP, DCAP y PCAP .....	129

<b>Figura I.8.</b> Esquema de los metabolitos derivados de CAP.....	133
<b>Figura I.9.</b> Estructura química de los tres posibles metabolitos obtenidos por conjugación con la molécula de glutatión .....	134
<b>Figura I.10.</b> Estructura química de los metabolitos glucurónidos y sulfonados de CAP, DCAP y PCAP, respectivamente.....	135
<b>Figura I.11.</b> Estructura química del dímero de capsaicina .....	135

## CAPÍTULO II

<b>Figura II.1.</b> Procedimiento experimental DMSPE .....	153
<b>Figura II.2.</b> Efecto de la naturaleza del material magnético funcionalizado para la preconcentración de capsaicinoides mediante DMSPE (n=2).....	156
<b>Figura II.3.</b> Efecto de (A) pH de la fase acuosa y (B) tiempo de adsorción en el procedimiento DMSPE (n=2).....	157
<b>Figura II.4.</b> Efecto de (A) naturaleza del disolvente de desorción y (B) tiempo de desorción en la eficacia del procedimiento DMSPE (n=2) .....	158
<b>Figura II.5.</b> Superficie de respuesta obtenida para la optimización del volumen de disolución de muestra, masa del nanomaterial magnético y volumen de disolvente de desorción en DMSPE. ....	159
<b>Figura II.6.</b> Distribución de tamaño obtenida de una suspensión de nanopartículas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @MWCNTs a diferentes concentraciones. ....	160
<b>Figura II.7.</b> Imágenes TEM de dos regiones diferentes de nanopartículas Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @MWCNTs con una escala de 200 nm.....	161
<b>Figura II.8.</b> Cromatogramas de iones extraídos (EICs) para los capsaicinoides y el IS obtenidos tras la aplicación del método DMSPE con UHPLC-HRMS para una muestra de suero fortificada a 5 µg/L.....	166
<b>Figura II.9.</b> Espectro HRMS/MS del estándar de DCAP. ....	168
<b>Figura II.10.</b> Ruta de fragmentación de DCAP.....	168
<b>Figura II.11.</b> Estructuras, fórmula molecular y masa exacta de los compuestos derivados de capsaicinoides.....	169
<b>Figura II.12.</b> Ruta de fragmentación del compuesto M10. ....	171

<b>Figura II.13.</b> Estrategia propuesta para la identificación de nuevos compuestos derivados de capsaicinoides .....	176
---	-----

### CAPÍTULO III

<b>Figura III.1.</b> Estructura química de las cuatro BAs estudiadas.....	188
<b>Figura III.2.</b> Estructura química de las BAs derivatizadas con DNSCI .....	189
<b>Figura III.3.</b> Procedimiento experimental de la etapa de derivatización. ....	194
<b>Figura III.4.</b> Efecto de (A) naturaleza del disolvente extractante y (B) naturaleza del disolvente dispersante (n=3).....	198
<b>Figura III.5.</b> Efecto de (A) volumen de extractante y (B) volumen de dispersante (n=3).....	199
<b>Figura III.6.</b> Efecto de (A) volumen de muestra y (B) concentración de NaCl en la fase acuosa (n=3).....	200
<b>Figura III.7.</b> Cromatogramas de iones extraídos (EICs) obtenidos para una muestra de orina sin fortificar (línea roja) y para una muestra de orina fortificada con las diferentes BAs a 80 µg/L (IS, 100 µg/L) (línea negra) .....	203
<b>Figura III.8.</b> Contenido de TYR en las muestras de orina expresado por unidad de volumen (eje-y izquierdo) y por masa de creatinina (eje-y derecho) .....	205
<b>Figura III.9.</b> Estructuras químicas derivatizadas y sin derivatizar de los compuestos relacionados con las BAs buscadas en el análisis no dirigido. ....	211
<b>Figura III.10.</b> Estructura química de los metabolitos generales procedentes de las rutas metabólicas de las BAs buscadas en el análisis no dirigido. ....	213
<b>Figura III.11.</b> Estructuras químicas de los conjugados glucurónidos de las BAs en su forma derivatizada y sin derivatizar buscados bajo análisis no dirigido. ....	214
<b>Figura III.12.</b> Estructuras químicas de las BAs sulfonadas en su forma derivatizada y sin derivatizar buscadas bajo análisis no dirigido .....	215
<b>Figura III.13.</b> Estructuras químicas de los metabolitos glucurónidos buscados bajo análisis no dirigido .....	216
<b>Figura III.14.</b> Estructuras químicas de los metabolitos sulfonados buscados bajo análisis no dirigido .....	216

# ÍNDICE DE TABLAS





**INTRODUCCIÓN**

<b>Tabla 1.</b> Enunciados de los 12 principios de la Química Verde .....	56
<b>Tabla 2.</b> Enunciados de los 12 principios de la QAV. ....	57

**CAPÍTULO I**

<b>Tabla I.1.</b> Parámetros UHPLC-Q-TOF-MS para los compuestos estudiados .....	118
<b>Tabla I.2.</b> Parámetros estudiados en el método Taguchi .....	124
<b>Tabla I.3.</b> Características analíticas del método DLLME con UHPLC-Q-TOF-MS optimizado .....	125
<b>Tabla I.4.</b> Comparación del método DLLME con UHPLC-Q-TOF-MS propuesto con otros previamente publicados para la determinación de capsaicinoides en orina .....	128
<b>Tabla I.5.</b> Compuestos relacionados con los capsaicinoides monitorizados bajo análisis no dirigido .....	131

**CAPÍTULO II**

<b>Tabla II.1.</b> Parámetros UHPLC-Q-TOF-MS de los compuestos estudiados .....	149
<b>Tabla II.2.</b> Características analíticas del método propuesto.....	162
<b>Tabla II.3.</b> Pendientes (L/ $\mu$ g) de las gráficas de calibración mediante adiciones estándar a las muestras. ....	163
<b>Tabla II.4.</b> Comparación del método propuesto con otros publicados para la determinación de capsaicinoides en suero y plasma. ....	165
<b>Tabla II.5.</b> Iones predominantes en el espectro HRMS/MS de los compuestos derivados de capsaicinoides.....	173
<b>Tabla II.6.</b> Fragmentos del ion 1 para los compuestos derivados de capsaicinoides conocidos. ....	178

**CAPÍTULO III**

<b>Tabla III.1.</b> Parámetros UHPLC-Q-TOF-MS de los compuestos estudiados. ....	193
<b>Tabla III.2.</b> Pendientes (L/ $\mu$ g) de las rectas de calibración mediante adiciones estándar.....	201
<b>Tabla III.3.</b> Características analíticas del método propuesto. ....	202
<b>Tabla III.4.</b> Comparación del método propuesto con otros publicados previamente para la determinación de BAs en orina por LC.....	206
<b>Tabla III.5.</b> Metabolitos y compuestos relacionados con BAs monitorizados en el enfoque no dirigido .....	208