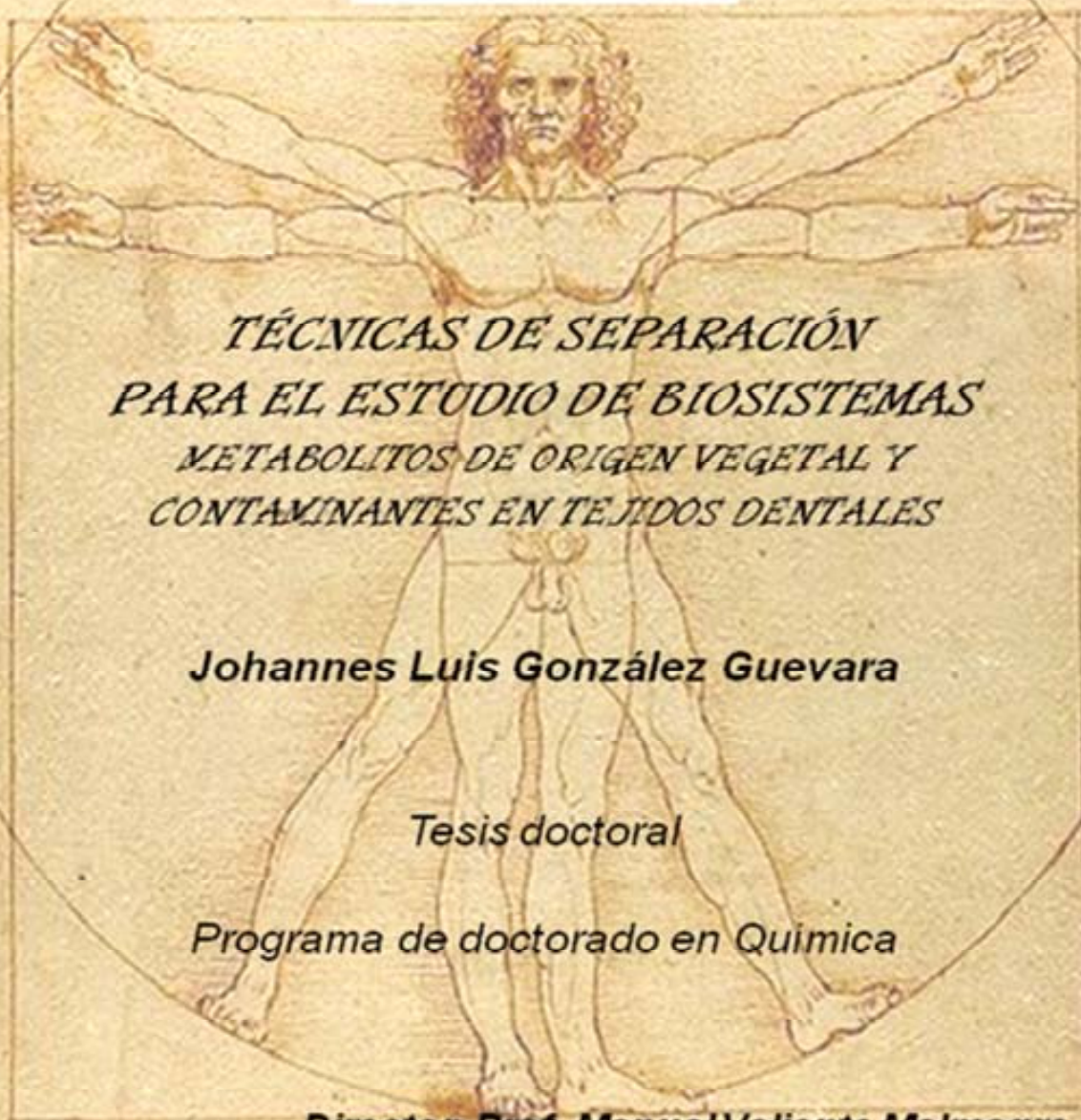


UAB

**Universitat Autònoma
de Barcelona**



*TÉCNICAS DE SEPARACIÓN
PARA EL ESTUDIO DE BIOSISTEMAS
METABOLITOS DE ORIGEN VEGETAL Y
CONTAMINANTES EN TEJIDOS DENTALES*

Johannes Luis González Guevara

Tesis doctoral

Programa de doctorado en Química

Director: Prof. Manuel Valiente Malmagro

Departamento de Química

Facultad de Ciencias

2009

Memoria presentada para aspirar al Grado de Doctor por

Johannes Luis González Guevara

Visto bueno

Dr. Manuel Valiente Malmagro

Bellaterra, 30 de Octubre de 2009

a mi padre

“La speranza, interprete in fra l’artificiosa natura e la umana specie”

Leonardo Da Vinci
(Vinci, 1452 – Amboise, 1519)

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	VII
AGRADECIMIENTOS	XIII
CONTRIBUCIONES	XV

RESUMEN DE LA TESIS	1
ABSTRACT	9
ACRÓNIMOS	15

I. INTRODUCCIÓN

I.1. LA INTERACCION DE LA ACTIVIDAD HUMANA Y LOS BIOSISTEMAS

I.1.1. El mundo vegetal como fuente natural de principios activos.....	21
I.1.1.1. <u>Implicaciones en el campo terapéutico</u>	21
I.1.1.2. <u>Implicaciones en el campo nutricional</u>	25
I.1.2. Los compuestos orgánicos volátiles y los medios contaminados.....	27
I.1.2.1. <u>Implicaciones medioambientales</u>	29
I.1.2.2. <u>Implicaciones en la salud</u>	30

I.2. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS BASADAS EN TÉCNICAS DE SEPARACIÓN APLICADAS AL ESTUDIO DE METABOLITOS DE PLANTAS Y COMPUESTOS TÓXICOS EN MEDIOS CONTAMINADOS

I.2.1. Metodologías generales.....	31
I.2.1.1. <u>Caracterización de metabolitos secundarios bioactivos en plantas</u>	31
I.2.1.2. <u>Caracterización de metabolitos como indicadores de la exposición a sustancias tóxicas</u>	34
I.2.2. Técnicas de separación cromatográficas.....	35
I.2.2.1. <u>Determinación de flavonoides y terpenoides en muestras vegetales</u>	35
I.2.2.2. <u>Determinación de BTEX y metabolitos en matrices diversas</u>	40
I.2.3. Técnicas de separación no cromatográficas.....	42
I.2.3.1. <u>Microextracción en fase sólida: su aplicación medioambiental y bioanalítica</u>	42
I.2.3.2. <u>Microextracción en fase líquida: su aplicación medioambiental y bioanalítica</u>	44

I.3. BIBLIOGRAFÍA	48
--------------------------------	-----------

OBJETIVOS DE LA TESIS	55
II. CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS BIOACTIVOS DE ESPECIES DE ERYTHROXYLUM	
II.1. RESUMEN	61
II.2. INTRODUCCIÓN	62
II.3. OBJETIVOS	68
II.4. PARTE EXPERIMENTAL	69
II.4.1. Recolección y preparación del material vegetal.....	69
II.4.2. Análisis fitoquímico de especies de <i>Erythroxylum</i>	69
II.4.2.1. Tamizado fitoquímico.....	69
II.4.2.2. Estudio de flavonoides mayoritarios.....	70
II.4.2.2.1. Aislamiento de flavonoides mayoritarios.....	70
II.4.2.2.2. Análisis cuantitativo de flavonoides.....	70
II.4.2.3. Análisis de la fracción menos polar del extracto EtOH de <i>E. minutifolium</i>	72
II.4.2.4. Fraccionamiento del extracto EtOH de <i>E. minutifolium</i>	74
II.4.2.5. Determinación de fenoles totales.....	76
II.4.2.6. Procesamiento cromatográfico.....	77
II.4.2.6.1. Cromatografía en capa fina (TLC).....	77
II.4.2.6.2. Cromatografía líquida a vacío (DFC).....	78
II.4.2.6.3. Cromatografía de exclusión molecular (MEC).....	79
II.4.2.7. Análisis espectroscópico.....	80
II.4.3. Evaluación de parámetros de interés biológico.....	80
II.4.3.1. Ensayos antioxidantes.....	80
II.4.3.1.1. Ensayo del poder reductor.....	80
II.4.3.1.2. Ensayo de superóxido por el sistema HX/XO.....	82
II.4.3.2. Ensayo de actividad antiviral (HSV-1).....	84
II.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	87
II.5.1. Tamizado fitoquímico de especies de <i>Erythroxylum</i>	87
II.5.2. Actividad antioxidante y antiviral de especies de <i>Erythroxylum</i>	89
II.5.3. Caracterización química general del extracto de EtOH de <i>E. minutifolium</i>	92
II.5.3.1. Estudio de la fracción polar. Flavonoides mayoritarios.....	92
II.5.3.1.1. ombuin (7,4'-di-O-metilquercetin) 3-O-β-rutinósido (2).....	94
II.5.3.1.2. ombuin (7,4'-di-O-metilquercetin) 3-O-β-rutinósido 5-O-β-glucósido (1).....	98
II.5.3.1.3. quercetin 3-O-β-rutinósido (rutina) (3).....	101

II.5.3.2. Estudio de la fracción menos polar. Triterpenos pentacíclicos.....	101
II.5.4. Estudio quimiotaxonómico de flavonoides en especies de <i>Erythroxylum</i>	108
II.5.5. Fraccionamiento guiado por bioensayos del extracto EtOH de <i>E. minutifolium</i>	113
II.5.5.1. Caracterización química de las fracciones.....	113
II.5.5.1.1. palmitato de β -amirina (4).....	114
II.5.5.1.2. catequina (5).....	114
II.5.5.1.3. β -sitosterol (6).....	115
II.5.5.2. Caracterización biológica de las fracciones.....	116
II.5.5.2.1. Capacidad de transferencia de electrones y de átomos de H.....	116
II.5.5.2.2. Capacidad inhibitoria de formación de radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$).....	118
II.5.5.2.3. Actividad antiviral (HSV-1).....	120
II.6. CONCLUSIONES	124
II.7. BIBLIOGRAFÍA	125

III. ESTUDIO Y APLICACION DE LA MICROEXTRACCION EN FASE LIQUIDA A LA DETERMINACION DE POLIFENOLES ANTINUTRICIONALES DE LA DIETA MEDITERRÁNEA. CASO DE LA QUERCETINA EN ALIMENTOS VEGETALES

III.1. RESUMEN	133
III.2. INTRODUCCIÓN	134
III.3. OBJETIVOS	136
III.4. PARTE EXPERIMENTAL	137
III.4.1. Reactivos y preparación de muestras.....	137
III.4.2. Procedimiento de microextracción en fase líquida (LPME).....	137
III.4.3. Calibrado del método de LPME-HPLC.....	138
III.4.4. Condiciones de separación cromatográfica mediante HPLC.....	140
III.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	141
III.5.1. Procedimiento de LPME para el análisis de la quercetina.....	141
III.5.1.1. Descripción del contexto de la LPME aplicado a la quercetina.....	141
III.5.1.2. Estudio del tipo de fase orgánica (SLM).....	144
III.5.1.3. Estudio del pH de la fase de carga bajo régimen de gradiente de pH.....	147
III.5.1.4. Estudio del pH de la fase aceptora bajo régimen de gradiente aniónico.....	149
III.5.1.5. Comportamiento de la quercetina bajo LPME.....	152
III.5.2. Aplicabilidad del método de LPME en alimentos de la dieta mediterránea.....	154
III.6. CONCLUSIONES	158
III.7. BIBLIOGRAFÍA	159

IV. DETERMINACIÓN DE BTEX Y METABOLITOS EN DIENTES HUMANOS COMO BIOMARCADORES. UTILIZACIÓN DE LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

IV.1. RESUMEN	165
IV.2. INTRODUCCIÓN	166
IV.3. OBJETIVOS	170
IV.4. PARTE EXPERIMENTAL	171
IV.4.1. Reactivos y preparación de muestras.....	171
IV.4.2. Procedimientos de dopaje y extracción a partir de las muestras dentales.....	172
IV.4.3. Método de SPME-HPLC para el análisis de BTEX y metabolitos.....	173
IV.4.3.1. <u>Procedimiento de SPME</u>	173
IV.4.3.2. <u>Condiciones de separación mediante HPLC</u>	174
IV.4.3.3. <u>Estudio de los tiempos de extracción y desorción para SPME-HPLC</u>	175
IV.4.3.4. <u>Parámetros de validación del método SPME-HPLC</u>	175
IV.4.4. Método de SPME-GC-MS para el análisis de BTEX.....	176
IV.4.4.1. <u>Procedimiento de SPME</u>	176
IV.4.4.2. <u>Condiciones de separación mediante GC-MS</u>	177
IV.4.4.3. <u>Estudio de los tiempos de extracción y desorción para SPME-GC-MS</u>	177
IV.4.4.4. <u>Parámetros de validación del método SPME-GC-MS</u>	178
IV.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	179
IV.5.1. Separación cromatográfica de BTEX y metabolitos mediante HPLC.....	179
IV.5.2. Estudios de dopaje de dientes y extracción de los BTEX y metabolitos.....	179
IV.5.3. Procedimientos de SPME para los BTEX, fenoles y ácidos carboxílicos.....	182
IV.5.3.1. <u>Selección de las condiciones de SPME</u>	182
IV.5.3.2. <u>Tiempos de extracción (adsorción) y desorción en SPME</u>	183
IV.5.4. Resultados en la validación de los métodos SPME-HPLC y SPME-GC-MS.....	186
IV.5.5. Resultados en la aplicación de los métodos de SPME en dientes humanos.....	193
IV.6. CONCLUSIONES	195
IV.7. BIBLIOGRAFÍA	196

V. MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA MEDIANTE MEMBRANAS LIQUIDAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS COMO METABOLITOS DE BTEX EN DIENTES HUMANOS

V.1. RESUMEN	201
V.2. INTRODUCCIÓN	202

V.3. OBJETIVOS	204
V.4. PARTE EXPERIMENTAL	205
V.4.1. Reactivos y preparación de muestras.....	205
V.4.2. Procedimiento de microextracción en fase líquida (LPME).....	205
V.4.3. Parámetros de validación del método de LPME-HPLC.....	206
V.4.4. Condiciones de separación cromatográfica mediante HPLC.....	206
V.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	207
V.5.1. Procedimiento de LPME para el análisis de los ácidos carboxílicos.....	207
V.5.1.1. <u>Selección de las condiciones de LPME</u>	207
V.5.1.2. <u>Tipo de disolvente orgánico para la membrana líquida soportada (SLM)</u>	207
V.5.1.3. <u>Gradiente de pH en transporte no facilitado</u>	210
V.5.1.4. <u>Gradiente de pH en transporte facilitado</u>	211
V.5.1.5. <u>Gradiente aniónico en transporte facilitado</u>	214
V.5.1.6. <u>Tiempo de transporte</u>	216
V.5.1.7. <u>Velocidad de agitación</u>	218
V.5.1.8. <u>Salinidad</u>	218
V.5.1.9. <u>Disolución aceptora</u>	220
V.5.2. Resultados en la validación del método LPME-HPLC.....	221
V.5.3. Resultados en la aplicación del método de LPME en dientes humanos.....	222
V.6. CONCLUSIONES	227
V.7. BIBLIOGRAFÍA	228
CONCLUSIONES DE LA TESIS	231
ANEXOS	235

Anexo 1

González JL, González KL, Vélez H, González JA, Payo A, Molina J, Prieto S, **2006**. Flavonoid glycosides from Cuban *Erythroxylum* species. *Biochemical Systematics and Ecology* 34, 539-542.

Anexo 2

González JL, García M, Echemendía OA, Sánchez R, Prieto S, Valiente M. Anti-herpes simplex virus type 1 activity and chemical characterization of fractions obtained from *Erythroxylum minutifolium* extract. To be submitted

Anexo 3

González JL, Valiente M. Practical considerations in the hollow fiber liquid phase microextraction of quercetin for plant food applications. To be submitted

Anexo 4

González JL, Valiente M. Simultaneous determination of BTEX and their metabolites in teeth as environmental biomarkers using solid-phase microextraction followed by HPLC and GC/MS. To be submitted

Anexo 5

González JL, Valiente M. Hollow fibre supported liquid membrane extraction for BTEX metabolites analysis in human teeth as biomarkers. To be submitted

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

I. INTRODUCCIÓN

TABLAS

Tabla 1.1. Algunas fuentes de emisión de VOC en espacios interiores y exteriores	28
--	----

FIGURAS

Figura 1.1. Formación de los radicales libres y acción de los polifenoles (ArOH).....	22
Figura 1.2. Microfotografía del virus del herpes simple (Género <i>Simplexvirus</i> , especies tipo I y tipo II).....	23
Figura 1.3. Ciclo reproductivo general del virus.....	25
Figura 1.4. Algunos ejemplos de estructuras de metabolitos secundarios con propiedades antinutricionales.....	27
Figura 1.5. Vínculo causa-efecto en la formación de ozono troposférico.....	29
Figura 1.6. Estructuras básicas de flavonoides.....	36
Figura 1.7. Ejemplo de cromatogramas obtenidos por TLC y HPLC de cuatro especies de <i>Passiflora</i>	36
Figura 1.8. Cromatograma GC-MS de un extracto de especie de <i>Arnica</i>	37
Figura 1.9. Electroferograma de un extracto de <i>Passiflora incarnata</i> L.....	37
Figura 1.10. Estructuras básicas de algunos triterpenos pentacíclicos.....	38
Figura 1.11. Cromatograma HPLC de una especie de <i>Boswellia</i>	39
Figura 1.12. Cromatograma GC-MS de aceites de plantas varias en la identificación de triterpenoides.....	39
Figura 1.13. Cromatograma GC-MS de BTEX en muestras de suelos.....	40
Figura 1.14. Estructura de metabolitos de los BTEX.....	41
Figura 1.15. Cromatogramas HPLC-UV solapados de una mezcla de ácidos carboxílicos (línea clara) y una muestra de orina (línea oscura).....	42
Figura 1.16. Componentes del dispositivo de SPME.....	44
Figura 1.17. Características del sistema de SLM en fibra hueca "hollow fiber" para la LPME.....	45
Figura 1.18. Sistema de transportes en SLM durante la LPME.....	47

II. CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS BIOACTIVOS DE ESPECIES DE *ERYTHROXYLUM*

TABLAS

Tabla 2.1. Resultados de ensayos antivirales en especies del género <i>Erythroxylum</i>	64
Tabla 2.2. Resultados en el tamizado fitoquímico de las hojas de seis especies de <i>Erythroxylum</i>	88
Tabla 2.3. Fenoles totales, poder reductor y actividad anti-HSV tipo 1 de extractos EtOH de seis especies	

de <i>Erythroxyllum</i>	91
Tabla 2.4. Máximos UV de los flavonoides aislados de <i>E. minutifolium</i>	94
Tabla 2.5. Identificación de compuestos en la fracción menos polar del extracto EtOH bioactivo de <i>E. minutifolium</i> mediante HPLC-GC-MS.....	105
Tabla 2.6. Tiempos de retención, máximos UV y linealidad del método para los flavonoides en hojas y ramas de cuatro especies de <i>Erythroxyllum</i>	109
Tabla 2.7. Contenido de flavonoles en hojas y ramas de cuatro especies de <i>Erythroxyllum</i>	111
Tabla 2.8. Presencia de los tres rutinósidos de flavonoles en especies de <i>Erythroxyllum</i>	112
Tabla 2.9. Fenoles totales, poder reductor y actividad inhibitoria del radical superóxido del extracto EtOH, fracciones y compuestos puros de <i>E. minutifolium</i>	117
Tabla 2.10. Actividad anti-VHS1 del extracto EtOH, fracciones y compuestos de <i>E. minutifolium</i>	121
 FIGURAS	
Figura 2.1. Algunos triterpenos de tipo oleanano característicos del género <i>Erythroxyllum</i>	65
Figura 2.2. Algunas estructuras de flavonoides tipo flavonol característicos del género <i>Erythroxyllum</i>	66
Figura 2.3. Ruta general de aislamiento de metabolitos secundarios mayoritarios.....	71
Figura 2.4. Equipo Konik HPLC-GC-MS.....	73
Figura 2.5. Esquema de fraccionamiento.....	75
Figura 2.6. Sistemas de cromatografía líquida a vacío (DFC).....	78
Figura 2.7. Sistema empleado para la cromatografía de exclusión molecular (MEC).....	79
Figura 2.8A. Poder reductor y contenido de fenoles totales de extractos EtOH de especies de <i>Erythroxyllum</i>	91
Figura 2.8B. Actividad antiviral de especies de <i>Erythroxyllum</i>	91
Figura 2.9. <i>Erythroxyllum minutifolium</i>	92
Figura 2.10. Espectros UV con el uso de reactivos de desplazamiento químico, NaOAc y NaOAc/H ₃ BO ₃ , de tres flavonoides aislados de <i>E. minutifolium</i>	94
Figura 2.11. Espectro NMR ¹ H del compuesto 2 (7,4'-di-O-metilquercetin (ombuin) 3-O-β-rutinósido).....	96
Figura 2.12. Espectro NMR ¹³ C del compuesto 2 (7,4'-di-O-metilquercetin (ombuin) 3-O-β-rutinósido).....	97
Figura 2.13. Espectro NMR ¹ H del compuesto 1 (7,4'-di-O-metilquercetin (ombuin) 3-O-β-rutinósido 5-O-β-glucósido).....	99
Figura 2.14. Espectro NMR ¹³ C del compuesto 1 (7,4'-di-O-metilquercetin (ombuin) 3-O-β-rutinósido 5-O-β-glucósido).....	100
Figura 2.15. Estructura de los tres glicósidos de flavonoides.....	101
Figura 2.16. Cromatogramas HPLC-GC-MS del extracto EtOH bioactivo de <i>E. minutifolium</i>	103
Figura 2.17. Ampliación del cromatograma GC-MS de la fracción apolar del extracto EtOH de <i>E. minutifolium</i>	104
Figura 2.18. Espectros de masas del triterpeno 27 (lup 20-en-3-ona) y referencia.....	106
Figura 2.19. Fragmentación característica de los triterpenos de tipo 20-lupenos 3-sustituídos.....	106
Figura 2.20. Espectros de masa de los triterpenos 29 , 30a y 30b (12-oleaneno y 12-oleanenos 3-sustituídos) y referencias correspondientes.....	107

Figura 2.21. Fragmentación característica de los triterpenos de tipo 12-oleanenos 3-sustituídos.....	108
Figura 2.22. Cromatogramas obtenidos durante la determinación de flavonoides en hojas y ramas de cuatro especies de <i>Erythroxylum</i>	110
Figura 2.23. Estructura del palmitato de β -amirina (4), catequina (5) y β -sitosterol (6).....	115
Figura 2.24. Poder reductor y contenido de fenoles totales del extracto EtOH, fracciones y compuestos aislados de <i>E. minutifolium</i>	118
Figura 2.25. Actividad de inhibición de radical superóxido para el extracto de EtOH, fracciones y compuestos aislados de <i>E. minutifolium</i>	120
Figura 2.26. Actividad anti-VHS1 del extracto EtOH y fracciones de <i>E. minutifolium</i>	121
Figura 2.27. Triterpenos pentacíclicos identificados por GC-MS en la fracción C del extracto EtOH de <i>E. minutifolium</i> y algunos triterpenos anti-HSV-1 de tipo lupano y oleanano.....	123

III. ESTUDIO Y APLICACION DE LA MICROEXTRACCION EN FASE LIQUIDA A LA DETERMINACION DE POLIFENOLES ANTINUTRICIONALES DE LA DIETA MEDITERRÁNEA. CASO DE LA QUERCETINA EN ALIMENTOS VEGETALES

TABLAS

Tabla 3.1. Componentes de la SLM en régimen de gradiente de pH para la LPME de la quercetina.....	145
Tabla 3.2. Componentes de la SLM en régimen de gradiente iónico para la LPME de la quercetina.....	145
Tabla 3.3. Componentes del sistema de membranas en régimen de gradiente de pH para la LPME de la quercetina con fase de carga a pH2 y 5.....	148
Tabla 3.4. Componentes del sistema de membranas en régimen de gradiente aniónico para la LPME de la quercetina con fase aceptora a pH6 y 8.....	150
Tabla 3.5. Componentes del sistema de membranas en régimen de gradiente de pH y aniónico para la LPME de la quercetina.....	152
Tabla 3.6. Calibrado del método de LPME con el uso de membranas huecas (hollow fiber) en el análisis de quercetina en alimentos de la dieta mediterránea.....	155
Tabla 3.7. Aplicabilidad del método de LPME con el uso de membranas tipo "hollow fiber" en el análisis de quercetina en alimentos de la dieta mediterránea.....	156

FIGURAS

Figura 3.1. Estructura de los flavonoles más abundantes en alimentos provenientes de plantas.....	134
Figura 3.2. Sistema de LPME.....	139
Figura 3.3. Sistema de CLAR Thermo-Fisher.....	140
Figura 3.4. Estructura de la quercetina.....	141
Figura 3.5. LPME de la quercetina en regimen de gradiente de pH.....	142
Figura 3.6. LPME de la quercetina en regimen de gradiente aniónico.....	142
Figura 3.7. Cromatograma de la HPLC obtenido para la quercetina (11,7 min) y espectro UV	

en el rango 180-300 nm (detección a 260 nm).....	144
Figura 3.8. LPME de la quercetina con el uso de diferentes fases orgánicas.....	147
Figura 3.9. LPME de la quercetina con el uso de dos fases orgánicas y distintos valores de pH en la fase de carga.....	149
Figura 3.10. LPME de la quercetina con el uso distintos valores de pH en la fase aceptora de NaCl 2M.....	151
Figura 3.11. Contenido porcentual de la quercetina en cada después de la LPME.....	153
Figura 3.12. Curva de calibrado del método de LPME-HPLC para la quercetina.....	155
Figura 3.13. Cromatogramas del extracto acuoso de <i>Vicia faba</i> , <i>Brassica oleracea</i> y <i>Camellia sinensis</i> antes (línea continua) y después (línea discontinua) del proceso de LPME.....	157

IV. DETERMINACIÓN DE BTEX Y METABOLITOS EN DIENTES HUMANOS COMO BIOMARCADORES. UTILIZACIÓN DE LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

TABLAS

Tabla 4.1. Algunas propiedades químicas y métodos de análisis de BTEX y metabolitos.....	168
Table 4.2. Datos cromatográficos (áreas de pico) obtenidos después de la SPME de BTEX con el uso de una fibra de 85 µm CAR/PDMS y desorción en dos disolventes distintos.....	185
Table 4.3. Rango lineal, límites de detección (LOD) y precisión (RSD) del método de SPME-HPLC para BTEX y metabolitos.....	188
Table 4.4. Rango lineal, límites de detección (LOD) y precisión del método SPME-GC-MS para BTEX.....	192
Table 4.5. Determinación de BTEX y metabolites por SPME-GC-MS y SPME-HPLC en dientes humanos.....	194

FIGURAS

Figura 4.1. Estructuras de los BTEX y algunos de sus metabolitos.....	166
Figura 4.2. Estudio de dopaje de dientes de bovino (A) y estudio de la extracción de los BTEX y metabolitos a partir de los dientes dopados (B).....	172
Figura 4.3. Procedimiento de SPME-HPLC para el análisis consecutivo de BTEX y metabolitos.....	174
Figura 4.4. Sistema de SPME-GC-MS.....	176
Figura 4.5. Equipo TRACE GC ULTRA Thermo para el análisis de BTEX por SPME-GC-MS.....	177
Figure 4.6. Cromatograma HPLC de BTEX, fenoles y ácidos carboxílicos a 260 nm.....	180
Figure 4.7. Cinética de adsorción de BTEX y metabolites en dientes de bovino.....	181
Figure 4.8. Cinética de extracción de BTEX y metabolites con NaOH 1M en ultrasonidos a partir de dientes dopados.....	181
Figure 4.9. Perfil cromatográfico de BTEX y metabolitos después de 4 h de extracción con NaOH 1M en baño ultrasónico a partir del diente dopado.....	182
Figure 4.10. Influencia del tiempo de extracción en la SPME de BTEX y metabolitos a partir de disoluciones dopadas.....	184
Figure 4.11. Influencia del tiempo de desorción en la SPME de BTEX y metabolitos a partir	

de disoluciones dopadas.....	185
Figura 4.12. Curvas de calibrado de los métodos: "headspace"-SPME-HPLC para el análisis de BTEX y fenoles (A y B) y SPME-HPLC para fenoles y ácidos carboxílicos (C).....	189
Figura 4.13. Determinación de las K_D para BTEX y fenoles mediante el método de "headspace"-SPME-HPLC	190
Figura 4.14. Determinación de las K_D para fenoles y ácidos carboxílicos en el método de SPME-HPLC.....	191
Figura 4.15. Cromatograma del análisis de BTEX por "headspace"-SPME-GC-MS y las curvas de calibrado del método.....	192

V. MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA MEDIANTE MEMBRANAS LIQUIDAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS CARBOXÍlicos COMO METABOLITOS DE BTEX EN DIENTES HUMANOS

TABLAS

Tabla 5.1. Estudio de formación de la SLM con dihexiléter para la LPME durante 5 h.....	210
Table 5.2. Porcentaje remanente en la SLM respecto al total extraído en 3 h de LPME.....	216
Table 5.3. Resultados en la validación del método de LPME-HPLC para los ácidos carboxílicos.....	224
Tabla 5.4. Determinación de ácidos carboxílicos como metabolitos de BTEX por LPME-HPLC en dientes humanos como biomarcadores.....	225
Tabla 5.5. Determinación de ácidos carboxílicos como metabolitos de BTEX por LPME-HPLC en otros fluidos biológicos como posibles biomarcadores.....	228

FIGURAS

Figura 5.1. Estructuras de algunos metabolitos de los BTEX.....	202
Figura 5.2. Efecto del tipo de membrana líquida soportada (SLM) en el factor de enriquecimiento (EF) para el ácido mandélico (MA), ácido hipúrico (HA) y 4-metil hipúrico (MHA).....	209
Figura 5.3. Efecto de la concentración del tensoactivo SPAN 85 en el factor de enriquecimiento para el MA, HA y MHA.....	211
Figura 5.4. Estructuras de los extractantes trioctilamina (TOA), óxido de trioctilfosfina (TOPO) y tributilfosfato (TBP).....	212
Figura 5.5. Efecto de los extractantes: tributilfosfato (TBP), óxido de trioctilfosfina (TOPO) y trioctilamina (TOA) en <i>n</i> -decanol sobre el EF para el MA, HA y MHA.....	213
Figura 5.6. Efecto del tipo de transporte en el EF para el MA, HA y MHA.....	215
Figura 5.7. Efecto del tiempo de transporte en el EF para el MA, HA y MHA mediante tres tipos de transporte.....	217
Figura 5.8. Efecto de la velocidad de agitación en el EF para MA, HA y MHA.....	219
Figura 5.9. Efecto de la salinidad en el EF para el MA, HA y MHA.....	219
Figura 5.10. Efecto del tipo de buffer como fase aceptora en el EF para la LPME del MA, HA y MHA.....	220

Figura 5.11. Curvas de calibrado obtenidas para el análisis de los ácidos carboxílicos MA, HA y MHA mediante el método de LPME-HPLC.....	221
Figura 5.12. Solapamiento de cromatogramas de las fasesceptoras obtenidas con el uso de diferentes transportes después de LPME de los dientes humanos 11 y 13.....	224
Figura 5.13. Solapamiento de cromatogramas de las fases de carga inicial (línea discontinua) y aceptora después de la LPME (línea continúa) para la muestra de diente humano #12.....	225
Figura 5.14. Cromatograma de las fasesceptoras obtenidas después de la LPME de una muestra de uña (línea discontinua), cabello (línea clara continúa) y orina (línea oscura continúa).....	226

AGRADECIMIENTOS

Este ha sido un largo camino, y en ocasiones demasiado intenso para un solo corazón. Cada período en la vida, cada proceso y evento, cada actividad diaria nos involucra física y emocionalmente de un modo único e irrepetible.

Esto que hoy me ocupa completamente es el final de algo que comenzó con una idea, una posibilidad, y puedo asegurarme que ha llegado a su culminación, o como prefiero nombrar, a un final que se abre, pues nada se detiene y todo nos aporta, aunque muchas veces no sea aprovechado.

Para comenzar a agradecer no deben faltar las personas que estuvieron en un principio. Mi primera directora de tesis, testigo de la génesis y la primera energía, la Dra. Sylvia Prieto. Y en aquellos comienzos también, mis colegas de la hoy mi lejana isla cubana: Juan Carlos, Marta Elena, Osmín, Ketia, José Antonio, Hermán, René, Gabino, y tantos otros. También a mis entrañables amigos: Mayté, Llalir, Sandra, Teo, Rubén, Lázaro y muchos más desperdigados por el mundo.

No puede faltar un agradecimiento al Dr. José María Gibert por la oportunidad de realizar este trabajo de tesis en este maravilloso país de países que me acogió durante estos años: Europa.

También agradecer a todos los integrantes del pintoresco mundo del GTS y alrededores: Aleix, Francesc, Angels, Anna, Tania, Lluís, Marta, Agustín, Marc, Jordi, Montse Resina, Montse López, Cristina, Bea, Pili, Amanda, Patricia, Elena, Angélica, Enrique, Diego, Fran, Nadia, Rajaa, Gustavo, Maria Dolors y tantos otros que van y vienen.

A mi director de tesis y capo del GTS, Dr. Manuel Valiente, por todo el conocimiento transmitido, por su personal filosofía científica, por acogerme en el grupo, por su confianza, por la oportunidad, por su entrega en los momentos más convulsos.

Además, a mis amigos de la ONU y otros: Guna, Javier, Iván, Gustavo, Kitty, Elsa, Héctor, Edwin y también a Mariá, Manuel, Tony, Eloy, Pierre...

A Annalisa, por todo su amor, por estar a mi lado en los momentos más placenteros y los más difíciles, por invitarme siempre a la practicidad, a ver más allá de las circunstancias. Gracias, tesoro.

A Paola y Renato, por todo su cariño, su apoyo constante en estos años de quehacer, Siempre agradecido.

A mi madre y hermano, por aceptar siempre mis decisiones, por creer en todos mis proyectos, intentando hacer de la distancia una no lejanía.

A mi padre, especialmente, por todo aquello que me dejó, conciente e inconcientemente, por su silenciosa presencia, su profesionalidad, su paz. Donde quiera que estés, hoy aquí conmigo, de alguna manera, más real que nunca.

A todos, gracias,

Johannes Luis

CONTRIBUCIONES

El presente estudio representa la colaboración de las siguientes instituciones cubanas y españolas:

Ministerio de Salud Pública de Cuba (Proyecto No. 0008001), por el soporte del trabajo experimental realizado en las diversas instituciones cubanas: Centro de Química Farmacéutica (Departamento de Química, Laboratorio de Productos Naturales) e Instituto Finlay (Departamento de Virología).

Ministerio de Ciencia y Educación de España (Proyectos: CTQ2005-09430-C05-01 y CTM2006-13091-C2-02), por el soporte al trabajo experimental realizado en las diversas instituciones españolas.

Generalitat de Catalunya, por el soporte a los estudios de doctorado en el período 2006-2009 a través de una beca FI (*Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu*).

Programa Alβan 2004 (programa de la UE de Becas de Alto Nivel para América Latina, becario E04D041574CU), por el soporte de los estudios de doctorado en el período 2005-2006.

Universitat Autònoma de Barcelona, Departament de Química, Unitat de Química Analítica, Centro Grupo de Técnicas de Separación en Química (GTS), donde se ha realizado la mayor parte del presente estudio.

Universitat de Barcelona, Facultat de Biología, Departament de Fisiología, donde se realizaron los ensayos antioxidantes, con agradecimiento especial a la Dra. María Teresa Mitjavila.

Instituto Finlay, Ciudad de la Habana, Cuba, por la ejecución de los ensayos antivirales de todas las muestras vegetales, con especial agradecimiento a Miladys García y Olga A. Echemendía.

Servei de Anàlisis Químic, Universitat Autònoma de Barcelona, con especial agradecimiento a Alba Eustaquio por la realización de los análisis de espectrometría de masas.

Servei de RMN, Universitat Autònoma de Barcelona, con especial agradecimiento a Miquel Cabanas por la realización de los análisis de resonancia magnética nuclear.

Institut de Analítica Industrial IKAI-KONIK, Barcelona, con especial agradecimiento a Raquel Sánchez, Nieves Carrión y José A. Muñoz por la ejecución de los análisis de HPLC-GC-MS.

Dra. Cristina Gracia Ruiz y Aux. Cristina Sáez Selva del CAP Salut de Drassanes, Institut Català de Salut (Barcelona) por el suministro de las muestras dentales, gentilmente donadas por sus pacientes.

RÉSUMEN DE LA TESIS

La interacción entre la actividad humana y los diferentes biosistemas no siempre se ha llevado a cabo en un modo sostenible, por un lado debido a un uso indiscriminado de los recursos naturales y por otro producto de una postura egocéntrica en detrimento de los ecosistemas, generando una contaminación ambiental de manera sistemática. En este sentido, en el presente trabajo de tesis se han desarrollado un conjunto de metodologías analíticas basadas en técnicas separativas para el estudio de diferentes tipos de biosistemas donde la acción del hombre ha jugado un papel central, y que servirán en un futuro para profundizar en el conocimiento de esta interacción. Estas metodologías analíticas se implementaron para el estudio de dos biosistemas fundamentales: el reino vegetal como fuente natural de principios activos tanto en el campo terapéutico como nutricional, y por otro lado, en las implicaciones de la contaminación en la salud humana.

En un primer estudio se seleccionaron especies de plantas del género *Erythroxylum*, avaladas por la práctica etnomédica, para el establecimiento de metodologías que permitieron la identificación y aislamiento de sus principales agentes antioxidantes y antivirales. En un segundo término se estudió el comportamiento de la quercetina bajo un método de microextracción en fase líquida y su determinación en alimentos vegetales para una posible caracterización como agente antinutricional. En tercer y cuarto lugar se desarrollaron metodologías de microextracción en fase sólida y líquida para el estudio de compuestos orgánicos volátiles de importante toxicidad y sus metabolitos en dientes humanos con vistas a establecer una herramienta analítica futura que permita correlacionar la exposición a estas sustancias y la salud bucal. A continuación se describen los diferentes estudios realizados.

CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS BIOACTIVOS DE ESPECIES DE *ERYTHROXYLUM*

Especies del género *Erythroxylum* que crecen en Cuba han sido usadas en la práctica etnomédica para la cura o alivio de diversas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo y los procesos virales. En este género se han evaluado extractos con actividad antioxidante y antiviral, así como se han identificado familias de metabolitos secundarios predominantes tales como alcaloides, terpenoides y flavonoides. En el presente estudio se desarrollaron metodologías de fraccionamiento guiado por bioensayos para la caracterización química y biológica de las especies seleccionadas. Durante la identificación de las familias de metabolitos secundarios presentes en las partes aéreas de seis especies se identificaron predominantemente los polifenoles, en particular flavonoides. Se determinó la actividad antioxidante a través del contenido de fenoles totales y del poder reductor de extractos de EtOH de estas especies, así como su actividad antiviral frente a cepas del virus del herpes simple tipo 1 de referencia (HSV-1r) y aislado (HSV-1a). Se realizó el estudio quimiotaxonómico de los flavonoides mayoritarios en cuatro de estas especies mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), lo que permitió una determinación del patrón de flavonoides característico para estas especies (flavonoides de tipo rutinósido de ombuina y

quercetina). Se seleccionó la especie *E. minutifolium* por su abundancia, endemismo y mayor actividad biológica de su extracto en EtOH (fenoles: 46%, poder reductor: 27,8%, CE50(HSV-1r)=18,14 µg/mL, CE50(HSV-1a)=36,88 µg/mL). Se caracterizó la fracción menos polar del extracto bioactivo de *E. minutifolium*, y se identificaron por HPLC-GC-MS ácidos grasos, fitol, ácido benzoico, tocoferol, sitosterol y triterpenos pentacíclicos de tipo lupano y oleanano. Se llevó a cabo posteriormente el fraccionamiento del extracto bioactivo para aislar los metabolitos secundarios mayoritarios y la evaluación de la actividad antioxidante (fenoles totales, poder reductor y capacidad inhibitoria del radical superóxido) y antiviral (HSV-1r y HSV-1a) de las fracciones obtenidas. Mediante el uso de la cromatografía líquida a vacío (DFC) y la cromatografía por exclusión molecular (MEC), se aislaron tres glicósidos de flavonol: ombuina-3-O-rutinósido-5-O-glucósido (1), ombuina-3-O-rutinósido (2) y rutina (3), un triterpenoide tipo oleanano: palmitato de β -amirina (4), un flavano: catequina (5) y un fitosterol: β -sitosterol (6), mayoritarios en el extracto. El fraccionamiento y los bioensayos permitieron identificar los polifenoles (fracción de taninos, fracción de glicósidos de flavonoide, rutina y catequina) como responsables de la actividad antioxidante del extracto y a su vez permitió la obtención de la fracción responsable de la actividad antiherpética del extracto total, cuyos responsables de esta actividad podrían ser los triterpenos pentacíclicos identificados.

ESTUDIO Y APLICACION DE LA MICROEXTRACCION EN FASE LIQUIDA A LA DETERMINACION DE POLIFENOLES ANTINUTRICIONALES DE LA DIETA MEDITERRÁNEA. CASO DE LA QUERCETINA EN ALIMENTOS VEGETALES

La quercetina es una hidroxiflavona predominante en muchas plantas y constituye parte del conjunto de flavonoides que le confieren propiedades antinutricionales a algunos alimentos de origen vegetal. En el presente trabajo se realizó un estudio del comportamiento de la quercetina bajo un sistema de microextracción en fase líquida (LPME) soportada en membrana de tipo "hollow fiber" para su futura aplicación en la caracterización de esta sustancia como factor antinutricional en alimentos de la dieta mediterránea. Se estudiaron una serie de factores básicos que influyen en la LPME de la quercetina seguido de HPLC como sistema de detección y se utilizó el factor de enriquecimiento (EF) como parámetro a seguir. Se emplearon diferentes tipos de membranas líquidas soportadas (SLM) como posibles fases orgánicas en el sistema de membranas con el uso de diversos componentes: *n*-dodecano (DOD) como diluyente, dihexiléter (DHE) y *n*-decanol (DEC) como modificadores, y trioctilamina (TOA), tributilfosfato (TBP) y cloruro de trioctilamonio (Aliquat 336) como transportadores o extractantes. Se utilizaron combinaciones de los distintos componentes de la SLM y según las condiciones experimentales se establecieron dos tipos de gradientes: de pH y aniónico. Además, se estimó la influencia del pH de las fases de carga y aceptoras, y también se determinó el paso limitante en cada sistema de gradiente a través del análisis del contenido de quercetina remanente en cada fase después del proceso extractivo. Los resultados obtenidos indicaron una diversidad de

situaciones relacionadas con la naturaleza de los componentes de la SLM y de las condiciones de las fases de carga y aceptoras. Estos resultados fueron interpretados en términos de estabilidad del complejo analito-transportador y de la interacción entre analito-modificador en la fase orgánica, mostrando efectos negativos y positivos en el transporte. Los sistemas que emplearon DHE+TBP y DOD+DEC+Aliquat como SLM bajo gradiente de pH y gradiente aniónico, respectivamente, resultaron ser los más adecuados para la extracción de la quercetina. Sin embargo, los EF mostraron resultados que no superaron el valor de 2, debido por una parte a la estabilización de la molécula en la SLM o en la fase de carga. Se realizó un calibrado del método, obteniéndose una linealidad de 0,998, un límite de detección (LOD) de 7,3 µg/L y una repetitividad de 1,3%. Se aplicó el método de LPME a tres alimentos utilizados en la dieta mediterránea tales como legumbre (*Vicia faba*), brócoli (*Brassica oleracea*) y té verde (*Camellia sinensis*). Los resultados mostraron una alta capacidad de pre-concentración y de "clean up" del método aplicado a muestras reales y permitió determinar un contenido de quercetina entre 1,6 y 10,8 mg/g, además de la identificación de otros flavonoides como la catequina y la rutina.

DETERMINACIÓN DE BTEX Y METABOLITOS EN DIENTES HUMANOS COMO BIOMARCADORES. UTILIZACIÓN DE LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Existen diversos grupos de compuestos orgánicos volátiles contaminantes del medio ambiente y perjudiciales para el hombre que provienen de la actividad humana. Dentro de ellos se destacan los BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y *p*-xileno) que son absorbidos por el organismo para ser liberados en su forma oxidada como fenoles y ácidos carboxílicos. De las enfermedades que puede ocasionar una exposición prolongada a estos compuestos sobresalen diversos tipos de cáncer. En el presente estudio se establecieron diversas metodologías analíticas basadas en la microextracción en fase sólida (SPME) para la caracterización de BTEX y algunos de sus metabolitos como el fenol (P), *p*-cresol (*p*C), ácido mandélico (MA), ácido hipúrico (HA) y ácido 4-metilhipúrico (MHA) en muestras de dientes humanos con vistas a establecer un método que permita correlacionar en un futuro el nivel de exposición a estas sustancias tóxicas y la salud bucal. Los métodos de SPME consistieron en una simple extracción de los BTEX y metabolitos con una solución básica extractante a partir del diente, seguido de SPME con fibras de polidimetilsiloxano (PDMS) y poliacrilato (PA), y posterior análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se realizó previamente un estudio de optimización de los parámetros cinéticos que rigen el dopaje de los dientes, la extracción con la disolución extractante y la SPME con disoluciones dopadas. Los tiempos de dopaje y extracción con NaOH 1M fueron optimizados a 4h. Los tiempos de adsorción y desorción de la fibra para todos los compuestos estuvieron en el rango de 10-75 min. La validación de los métodos de SPME para cada grupo de compuestos: BTEX, fenoles y ácidos carboxílicos, determinados de forma consecutiva a partir de la misma muestra, mostraron una

adecuada linealidad entre 0,984-0,999 en el rango de concentración empleado con una precisión menor del 15%. Los límites de detección (LOD) estuvieron en el orden de 0,6-0,9 pg para los BTEX por SPME-GC-MS y 2-333 ng para todos los compuestos por SPME-HPLC. Los valores de K_D fueron superiores a los reportados en la literatura para estos métodos aplicados a esta familia de compuestos. En el análisis de dientes humanos se identificaron BTEX y fenoles en prácticamente todas las muestras, mostrando un contenido entre 7-1967 ng/g de BTEX y 36-99 µg/g de fenoles. Los ácidos carboxílicos no pudieron ser identificados en estas muestras dentales bajo tratamiento de SPME.

MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA MEDIANTE MEMBRANAS LIQUIDAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS COMO METABOLITOS DE BTEX EN DIENTES HUMANOS

Los ácidos carboxílicos, productos de la oxidación de los BTEX después de su absorción por el organismo, constituyen biomarcadores de la exposición a estas sustancias tóxicas. Generalmente se determinan mediante el análisis de fluidos biológicos tales como la sangre y la orina, pero no se han empleado hasta la actualidad otros tipos de muestras biológicas. En el presente estudio se estableció una metodología analítica basada en la microextracción en fase líquida (LPME) soportada en membrana hueca ("hollow fiber") para la caracterización de los ácidos carboxílicos ácido mandélico (MA), ácido hipúrico (HA) y ácido 4-metilhipúrico (MHA) como metabolitos de los BTEX en muestras de dientes humanos con el objetivo de establecer un método que permita correlacionar en un futuro el nivel de exposición a estas sustancias tóxicas y la salud bucal. Se desarrolló un método de LPME seguido de HPLC con el uso de membranas tipo "hollow fiber" de polipropileno para el análisis de los ácidos carboxílicos en dientes humanos. Para ello, se realizó un estudio en disoluciones dopadas de los diferentes transportes a través de la membrana líquida soportada (SLM): transporte no facilitado con dodecano, dihexiléter y decanol, y transporte facilitado con el uso de los transportadores trioctilamina (TOA), óxido de trioctilfosfina (TOPO), tributilfosfato (TBP) y cloruro de trioctilamonio (Aliquat 336). En unos casos se empleó como fuerza de transporte un gradiente de pH y en otros un gradiente de aniones. Se utilizó el factor de enriquecimiento (EF) como parámetro a seguir. Los resultados obtenidos indicaron una variedad de situaciones relacionadas con la naturaleza del transportador y fueron interpretados en términos de estabilidad del complejo analito-transportador formado en la fase orgánica, mostrando efectos negativos y positivos en el transporte. El sistema más simple de decanol como SLM sin ningún tipo de transporte facilitado fue seleccionado en este caso, y se optimizaron otros parámetros que afectan los EF, obteniéndose los mejores valores para un tiempo de extracción de 20h, 500 rpm de velocidad de agitado, NaOH 1M como fase aceptora y un contenido en sal añadida de 500 mM en las fases de carga. La determinación de algunos parámetros

de validación del método de LPME optimizado permitió obtener una linealidad del 0,991-0,999 en el rango de concentración empleado, unos límites de detección (LOD) de 0,2-1,6 ng, una repetibilidad del 7,0-10,1 % y una reproducibilidad del 5,3-8,1 %. La aplicación del método de LPME en dientes humanos permitió identificar MA y HA en cantidades entre 2-11 $\mu\text{g/g}$ y 0,2-70 $\mu\text{g/g}$, respectivamente.

ABSTRACT

The interaction between the human activity and different ecosystems has not always been carried out in a sustainable way: on the one hand, due to an indiscriminate use of the natural resources and on the other hand as a product of a self-centred position in the detriment of the ecosystems, generating an environmental contamination in a systematic way. In this sense, in the present work we have developed a set of analytical methodologies based on separation techniques for the study of different types of bio-systems where the action of the man has played a central role; these methodologies will serve also in the future to study these bio-systems more in depth. These analytical methodologies were implemented for the study of two main bio-systems: the vegetal kingdom like natural source of active principles as much in the therapeutic field as the nutritional one, and contaminated ecosystems and their implications in the human health. In a first study species of *Erythroxylum* genus were selected, used in ethnomedical practice, for the establishment of methodologies in the search of antiviral and antioxidant agents. In the second part, an analytical method was established for the characterization of quercetin: this method could allow future studies of this compound as an antinutritional agent of vegetal origin. In the third and fourth parts we have developed a series of methodologies for the study of volatile organic compounds of important toxicity and its metabolites to establish a future analytical tool to correlate the exposure to these substances and the oral health.

CHARACTERIZATION OF BIOACTIVE EXTRACTS FROM *ERYTHROXYLUM* SPECIES

The 250 species of shrubs or small to medium-sized trees of the genus *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) are widespread in tropical regions from South America, Africa, Southeast Asia and Australia. The genus *Erythroxylum* is present in the flora of Cuba with 22 species, 16 of which are endemic. It has been used in ethno-medical practices with anti-inflammatory, anti-bacterial, tonic and stimulant properties, for liver, renal and vesicular afflictions, as a powerful diuretic, and in the treatment of venereal diseases, muscular afflictions (rheumatism and atrosis), and respiratory affections (bronchitis, pneumonia, catarrh, tuberculosis, asthma). In *Erythroxylum*, the prominent flavonoid compounds are flavonols, and the majority of them occur as 3-O-monoglycosides with glucose, galactose, arabinose, xylose, and rhamnose, and as 3-O-diglycosides with various combinations of those sugars. Kaempferol, quercetin, and ombuin are the main aglycones of *Erythroxylum* flavonols. In previous studies, the antioxidant and antiherpetic activities of some *Erythroxylum* species have been evaluated. *Erythroxylum* species are used in Cuba as herbal medicines related to viral processes and oxidative stress. In the present study, leaves from six Cuban *Erythroxylum* species were submitted to phytochemical screening. Alkaloids, triterpenoids/steroids, lactones/coumarins, reducing sugars, phenols/tannins and flavonoids were identified as principal secondary metabolites. The antiviral and antioxidant activities of these *Erythroxylum* extracts were simultaneously investigated for the first time to identify the bioactive agents. Activity-guided

fractionation of the most bioactive extract (*E. minutifolium*) led to the chemical characterization of the two main antiherpetic and superoxide radical inhibitory fractions. Three characteristic flavonol glycosides of the genus were isolated as constituents of the most antioxidant fraction with a superoxide radical IC_{50} of 264.14 $\mu\text{g/mL}$. Fatty acids, phytol, alpha-tocopherol and pentacyclic triterpenes of lupane and oleanane were identified in the most antiviral fraction by HPLC-GC-MS. Beta-amyrin palmitate, beta-sitosterol and catechin were also isolated from this antiviral fraction. The synergism of these compounds in the fraction showed a significant inhibitory concentration (IC_{50}) against two different HSV-1 strains (2.6 and 6.1 $\mu\text{g/mL}$). Pentacyclic triterpenes were found to have the major responsibility in the inhibitory activity against HSV-1.

LIQUID PHASE MICROEXTRACTION APPLIED ON THE DETERMINATION OF QUERCETIN IN VEGETABLE FOODS

Quercetin is a plant secondary metabolite and one of the most important flavonoid very widely present in plant kingdom. In addition, when included in animal or human diet, their antioxidant activity slowed the oxidation of others molecules but, in the other hand, this compound belongs to a group of polyphenols with antinutritional properties. Fruits, beans and vegetables, which are known to be concentrated in flavonoids, constitute an important part of Mediterranean diet. A recent unpublished study, demonstrated the difficulties in the analysis of quercetin in plant foods during the pre-treatment method. The present study concerns the development of a methodology based on the transport through hollow fibre supported liquid membranes as a liquid phase microextraction (LPME) to characterize quercetin in aqueous solutions to evaluate the behaviour of this compound through these membrane system for its future application in plant foods. Ten different liquid membranes were evaluated by using both pH gradient and anionic gradient transports with the use of different solvents as diluents and modifiers (dodecane, dihexyl ether and decanol) and ionic and non ionic metabolites as carriers for the facilitated transport. An appropriate pH in donor and acceptor solutions was studied for these two types of transports, and the quantity of quercetin remaining in the phases of the supported liquid membrane (SLM) system was determined to approach the mechanisms of interaction between quercetin and the components of the membrane system. In all cases the obtained enrichment factors (EF) were very low. The results indicated a variety of situations related to the carrier nature and the structural properties of quercetin, providing both positive and negative effects. Calibration of the method at the best conditions included linearity (0.998), limits of detection (7.3 $\mu\text{g/L}$) and repeatability (1.3%) experiments. Applicability was evaluated for species of bean (*Vicia faba*), and two species of vegetables: broccoli (*Brassica oleracea*) and green tea (*Camellia sinensis*) with a good clean up effect for all extracts after LPME. Selective determination of quercetin was made by HPLC technique and its concentration in these plant foods was found in the range of 1.6-10.8 mg/g.

DETERMINATION OF BTEX AND METABOLITES IN HUMAN TEETH AS BIOMARKERS. USE OF SOLID PHASE MICROEXTRACTION

BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene, and *o*-, *m*-, and *p*-xylenes) are widely used not only for industrial raw materials but also as solvents, primary components of motor vehicle gasoline, and starting products in a variety of chemical syntheses. These volatile organic compounds are highly toxic, and factory workers, in particular, are occupationally exposed to these solvents. These applications have rendered BTEX ubiquitous in the environment. Human exposition to these compounds can have serious health consequences like neurological diseases or cancer. In recent years, BTEX and corresponding metabolites have been widely studied, owing to the health risks associated with exposure to these organic compounds. The present study concerns with one-step simple extraction of BTEX and its metabolites (phenols and aromatic acids) from spiked tooth using NaOH solution followed by SPME-HPLC (or GC-MS) determination to establish a capable and future tool for categorizing cumulative exposure to BTEX and its relation with dental health. Optimization of both the spiking procedure and extraction step of these analytes from tooth was carried out. Two fibers coated either with carboxen-polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) or polyacrylate (PA) were used to establish a methodology for determining the level of environmental exposure of dental tissues. The optimization of SPME variables, such as the absorption and desorption times, was also determined for all analytes at 30 C using spiked solutions. For BTEX analysis, a HS-SPME-GC/MS method was established. Finally, the features of the SPME-HPLC and HS-SPME-GC/MS methods were determined. Linearity for SPME-HPLC method was established using spiked solutions with both BTEX and metabolites of 2.5, 5.0, 10.0, 25.0 µg/mL, and working at the optimum absorption and desorption times. The obtained results indicate a good linearity (r^2 above 0.994) for all analytes. Triplicate analyses including three SPME extractions for each spiked sample were performed with a precision lower than 15%. Limit of detection (LOD) were 2–333 ng for SPME-HPLC and 0.6-0.9 pg for SPME-GC-MS methods in spiking solutions. The K_D values were determined for the first time to SPME-HPLC method and all K_D values were higher than those reported for SPME. Micrograms per tooth gram of BTEX and phenols were quantified in ten human teeth and aromatic acids were not identified.

LIQUID PHASE MICROEXTRACTION THROUGH LIQUID MEMBRANES FOR CARBOXYLIC ACIDS DETERMINATION AS BTEX METABOLITES IN HUMAN TEETH

The use of human teeth as biomarkers has been previously applied to characterize environmental exposure mainly to metal contamination. Difficulties arise when the contaminants are volatile or its concentration level is very low. The present study concerns with the development of a methodology based on the transport through hollow fibre supported liquid membranes as liquid phase microextraction (LPME) to characterize three different metabolites of BTEX contaminants: mandelic

acid (MA), hippuric acid (HA) and 4-methylhippuric acid (MHA) to establish a capable and future tool for categorizing cumulative exposure to BTEX and its relation with dental health. The related driving force for the liquid membrane has been studied by using both non facilitated and facilitated transport. An appropriate pH gradient was applied when a non facilitated transport was implemented through the supported liquid membrane (SLM) system. In this case enrichment factors (EF) of several hundred were accomplished. Different ionic and non ionic water insoluble compounds were used as metabolite carriers for the facilitated transport at SLM. The results obtained indicated a variety of situations related to the carrier nature and providing both positive and negative effects. Such behaviour has been interpreted in terms of the stability of the corresponding metabolite-carrier complexes at the organic phase or SLM. Different solvents were used for the liquid membrane, including, dodecane, dihexyl ether and *n*-decanol, being *n*-decanol most suitable. Other parameters affecting the extraction process, such as extraction time, stirring speed, acceptor buffer and salt content were studied in spiking solution to obtain the best enrichment factors for all analytes. Validation of the optimized method included linearity (> 0.991), limits of detection (0.2-1.6 ng), repeatability (7-10.1%) and reproducibility (5.3-8.1%) experiments and application of the method to the analysis of these compounds in human teeth were carried out. Selective determination of the metabolites was made by HPLC technique and the quantitative results were obtained in the range of 2-11 $\mu\text{g/g}$ and 0.2-70 $\mu\text{g/g}$ for MA and HA, respectively.

ACRÓNIMOS

AcOEt (*ethylacetate*): acetato de etilo
BAW (*butanol-acetic acid-water*): butanol-ácido acético-agua
BTEX (*benzene, toluene, ethylbenzene, xylene*): benceno, tolueno, etilbenceno, xileno
BuOH (*butanol*): butanol
CAR/PDMS (*carboxen/polydimethylsiloxane*): carboxen/polidimetilsiloxano
CC50 (*50% citotoxic concentration*): concentración citotóxica media
CPE (*citopathogenic effect*): efecto citopatogénico
CZE (*capilar zone electrophoresis*): electroforesis capilar
DFC (*dry flash chromatography*): cromatografía líquida a vacío
DMSO (*dimethylsulfoxide*): dimetilsulfóxido
EC50 (*50% effective concentration*): concentración efectiva media
EE (*extraction efficiency*): eficiencia de extracción
EF (*enrichment factor*): factor de enriquecimiento
EtOH (*ethanol*): etanol
GC (*gas chromatography*): cromatografía de gases
HA (*hippuric acid*): ácido hipúrico
HOAC (*acetic acid*): ácido acético
HPLC (*high performance liquid chromatography*): cromatografía líquida de alta resolución
HSV (*herpes simplex virus*): virus del herpes simple
HX (*hipoxanthine*): hipoxantina
I (*percent of inhibition*): porcentaje de inhibición
IC50 (*50% inhibitory concentration*): concentración inhibitoria media
LLE (*liquid-liquid extraction*): extracción líquido-líquido
LOD (*limit of detection*): límite de detección
LPME (*liquid phase microextraction*): microextracción en fase líquida
MA (*mandelic acid*): ácido mandélico
MeOH (*methanol*): metanol
Me₂CO (*acetone*): acetona
MEC (*molecular exclusion chromatography*): cromatografía por exclusión molecular
MHA (*methyl-hippuric acid*): ácido metil-hipúrico
MS (*mass spectrometry*): espectrometría de masas
NBT (*nitrobluetetrazolium salt*): sal de *nitrobluetetrazolium*
NMR (*nuclear magnetic resonance*): resonancia magnética nuclear
P (*phenol*): fenol
PA (*polyacrilate*): poliacrilato
pC (*para-cresol*): *para*-cresol
PDMS (*polydimethylsiloxane*): polidimetilsiloxano

Qr (*quercetin*): quercetina

ROS (*reactive oxygen species*): especies reactivas de oxígeno

RSD (*relative standard deviation*): desviación estándar relativa

SD (*standard deviation*): desviación estándar

SI (*selective index*): índice selectivo

SLM (*supported liquid membrane*): membrana líquida soportada

SOD (*superoxide dismutase*): superóxido dismutasa

SPE (*solid phase extraction*): extracción en fase sólida

SPME (*solid phase microextraction*): microextracción en fase sólida

TBP (*tributylphosphate*): tributilfosfato

TOA (*trioctylamine*): trioctilamina

TOPO (*trioctylphosphine oxide*): óxido de trioctilfosfina

TLC (*thin layer chromatography*): cromatografía en capa fina

UV (*ultraviolet*): ultravioleta

VOC (*volatile organic compounds*): compuestos orgánicos volátiles

XO (*xanthine oxidase*): xantina oxidasa

Nota: Los acrónimos empleados en la presente tesis fueron usados de manera consciente en su variante original en idioma inglés por comodidad técnica debido a que la mayoría de estos términos (compuestos, sistemas y técnicas analíticas) son usados ampliamente en la literatura científica en idioma inglés y es el modo con que se conocen en el ámbito científico.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

I.1. LA INTERACCIÓN DE LA ACTIVIDAD HUMANA Y LOS BIOSISTEMAS

I.1.1. El mundo vegetal como fuente natural de principios activos

Durante miles de años, las plantas han jugado un papel importante tanto en la alimentación del hombre como en el tratamiento y prevención de enfermedades humanas. Desde la revolución agrícola, hace 12000 años, el hombre antiguo comenzó a interesarse por el reino vegetal como fuente de alimento y posteriormente en su uso como medicamento [D'Adamo y Whitney, 2009]. Las plantas, utilizadas en la alimentación, se destacan por su aporte nutricional en fitonutrientes, metabolitos secundarios de importante valor nutricional y que presentan un impacto notable en la salud del ser humano [Cervera y col., 2004]. Esta doble propiedad nutricional y medicinal de las plantas ha llevado al hombre a desarrollar campos de estudios tan destacados como la Dietoterapia y la Fitoterapia, respectivamente. En este sentido, los fitomedicamentos se han utilizado a partir de diversas materias primas que incluyen las plantas terrestres, microorganismos terrestres, organismos marinos, y vertebrados e invertebrados terrestres [Newman y col., 2000]. La importancia de estos productos naturales en la medicina moderna puede determinarse usando tres criterios: (1) el índice de introducción de nuevas entidades químicas de amplia diversidad estructural, (2) el número de enfermedades tratadas o prevenidas por estas sustancias, y (3) su frecuencia de uso en el tratamiento de la enfermedad [Newman y col., 2003; Koehn y Carter, 2005; Paterson y Anderson, 2005; Balunas y Kinghorn, 2005; Jones y col., 2006]. Puesto que los metabolitos secundarios de fuentes naturales vienen elaborados dentro de sistemas vivos, se ha demostrado una mayor acción biológica de éstos metabolitos frente a las moléculas totalmente sintéticas [Koehn y Carter, 2005], propiedades éstas que los hacen mejores candidatos al desarrollo posterior del medicamento [Balunas y Kinghorn, 2005]. El escrutinio de indicaciones médicas ha demostrado que los productos naturales y las drogas derivadas han sido utilizados para tratar el 87% de todas las enfermedades humanas categorizadas (en este caso 48 de 55 enfermedades), lo que incluye agentes antibacterianos, anticáncer, anticoagulantes, antiparasitarios, inmunosupresores, entre otros [Newman y col., 2003].

I.1.1.1. Implicaciones en el campo terapéutico

Muchas de las enfermedades modernas están estrechamente vinculadas a un incremento de los procesos oxidativos en el organismo, producto del estilo de vida actual. Las especies reactivas de oxígeno ROS (radical superóxido O_2^{\bullet} , peróxido de hidrógeno H_2O_2 y radical hidroxilo OH^{\bullet}), así como otros radicales libres, son especies altamente reactivas que se forman durante el metabolismo normal

y son precursores del daño en los tejidos (lípidos, grasas y proteínas), lo cual constituye una de las causas principales de la aparición de enfermedades degenerativas.

El reino vegetal es una importante fuente de metabolitos secundarios con propiedades antioxidantes. La función de estos antioxidantes es interceptar y reaccionar con los radicales libres más rápidamente y de esta manera evitar la oxidación de los tejidos y su posterior deterioro [Halliwell y Gutteridge, 1989]. Los antioxidantes fenólicos, por ejemplo, conforman un importante grupo de metabolitos secundarios presentes en las plantas que inhiben la oxidación a través de su interacción con estas especies reactivas. Existen dos mecanismos fundamentales en los cuales los antioxidantes pueden tener una acción preventiva: la transferencia de un átomo de H y la transferencia de un electrón (**figura 1.1**).

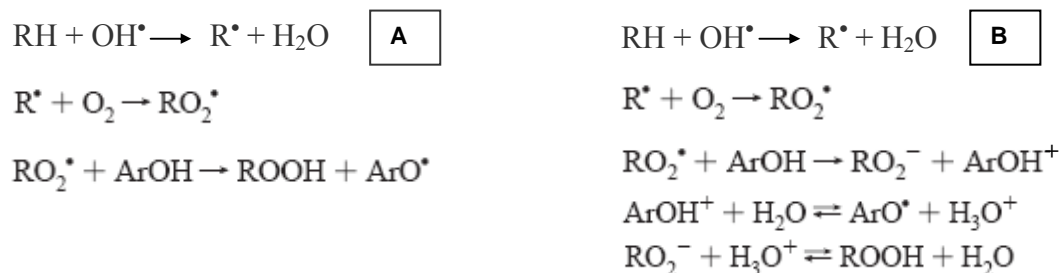


Figura 1.1. Formación de los radicales libres y acción de los polifenoles (ArOH).

A: mecanismo de transferencia de un protón de H. **B:** mecanismo de transferencia de electrones.

Durante la primera reacción (iniciación), una vez que el radical libre (por ejemplo, una ROS como el OH[•]) ha conseguido robar el electrón que necesita para aparear su electrón libre, la molécula estable que se lo cede (por ejemplo, un lípido, simbolizado como RH) se convierte a su vez en un radical libre (R[•]) altamente reactivo, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye las células [Wright y col., 2001]. Esta especie R[•] puede reaccionar posteriormente con oxígeno molecular formándose en este caso un ácido graso peroxil radical también muy inestable. A través de la acción de los antioxidantes fenólicos (ArOH) se produce la neutralización de los radicales libres y la formación de una especie radicalaria de estructura fenólica mucho más estable y menos reactiva (ArO[•]), ya sea por un mecanismo de transferencia de un átomo de H (**figura 1.1A**) o de electrones (**figura 1.1B**). En estudios realizados con antioxidantes fenólicos se llegó a la conclusión de que en la mayoría de los casos predomina el mecanismo de transferencia de un átomo de H para este tipo de estructuras [Wright y col., 2001]. Otros estudios han permitido conocer la relación estructura-actividad antioxidante de este tipo de moléculas [De Bruyne y col., 1999]. La información sobre efectos antioxidantes de extractos de plantas ha estado relacionada con polifenoles del tipo flavonoide,

xantona, ácidos fenólicos y taninos [Rice-Evans y col., 1996; De Bruyne y col., 1999; Sanz y col., 2004; Moein y col., 2008; Capettini y col., 2009], donde sitios activos hidroxilados específicos de estas moléculas presentan un rol fundamental en la etapa de terminación o neutralización de las reacciones de propagación de los radicales libres.

Por otro lado y dentro del campo terapéutico, la importancia en la búsqueda de nuevos medicamentos antivirales ha ido incrementándose en las últimas décadas, siendo las plantas una fuente prometedora [Newman y col., 2002, 2003]. Ante todo, se puede considerar que un virus es un agente genético que posee un ácido nucléico que puede ser ADN o ARN, rodeado de una capa de proteína. Los virus contienen toda la información necesaria para su ciclo reproductor; pero necesitan para conseguirlo a otras células vivas de las que utilizan orgánulos y moléculas. Los virus pueden actuar de dos formas distintas: se reproducen en el interior de la célula infectada o utilizan todo el material y la maquinaria de la célula hospedante, a través de la unión al material genético de la célula en la que se alojan, lo cual produce cambios genéticos en ella. Por eso, se pueden considerar los virus como agentes infecciosos productores de enfermedades o como agentes genéticos que alteran el material de la célula huésped [Reusser, 1996]. El virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) (**figura 1.2**), por ejemplo, es un importante patógeno para el hombre, especialmente en el caso de adultos altamente susceptibles. Luego del establecimiento de la latencia, este virus puede reactivarse y causar infecciones recurrentes. Las infecciones por HSV-1 son muy comunes y mayormente afectan a los adultos. Los síntomas fundamentales que este virus ocasiona incluyen el síndrome de la gripe, con fiebre, dolor de cabeza, mialgia, malestar general, seguido de lesiones y ulceraciones locales.

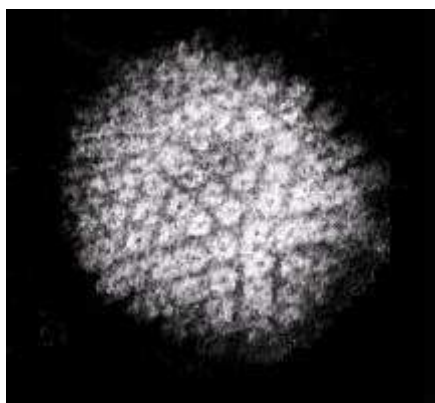


Figura 1.2. Microfotografía del virus del herpes simple (Género *Simplexvirus*, especies tipo I y tipo II)

En la actualidad se dispone de drogas antivirales efectivas, tales como el acyclovir, ganciclovir, valaciclovir, penciclovir, famciclovir y el vidarabine. Sin embargo, se hace necesario la búsqueda de nuevos fitomedicamentos antiherpéticos ya que el acyclovir, como medicamento más comúnmente empleado para infecciones del virus de herpes simple (HSV) seguido por el penciclovir/famciclovir, a conllevado serios problemas de resistencia del virus a estos medicamentos, fundamentalmente debidos a la capacidad de mutar que posee este tipo de virus [Reusser, 1996]. Por otro lado, los medicamentos de elección para las terapias antivirales, generalmente son bastante costosos, por lo que algunos pacientes con ataques frecuentes no pueden asumir el gasto para un tratamiento largo. Por lo tanto, existe una gran necesidad de encontrar nuevos agentes antivirales que posean diferentes mecanismos de acción y sean más accesibles económicamente.

Existen muchos ejemplos positivos de estudios de tamizado antiviral de especies de plantas utilizadas por la medicina tradicional para el tratamiento de infecciones ocasionadas por virus, que han derivado en extractos, fracciones y compuestos puros con un potencial antiviral importante. En estos estudios se han analizado extractos polares de una gran cantidad de especies de Sudamérica y Asia [Locher y col., 1995; Kott y col., 1999; Rajbhandari y col., 2001; Chiang y col., 2002; Vijayan y col., 2004]. A partir de los resultados de la bioactividad de estos extractos y fracciones, muchos grupos de investigación han trabajado con vistas a identificar los principios activos responsables de esta actividad. Dentro de los grupos de metabolitos secundarios aislados con mejor actividad anti-HSV se encuentran los de tipo polifenol (taninos y flavonoides), terpenos (mono-, di- y triterpenos), y glicósidos [Khan y col., 2005]. De estos compuestos se han realizado estudios de relación estructura-actividad [Amoros y col., 1992; De Bruyne y col., 1999; Farag y col., 2004; Nohara, 2004] y de mecanismos de acción frente a estos virus [Armaka y col., 1999; Simoes y col., 1999; Kurokawa y col., 1999; Shahat y col., 2002], que han permitido entender la acción individual de estas moléculas, así como en sinergia con otras.

Todo virus depende del material biológico de una célula. Durante el ciclo de vida del virus (**figura 1.3**): adsorción (unión virus-célula), penetración (dentro de la célula huésped), desnudamiento (liberación del ácido nucléico del virus), multiplicación (biosíntesis de nuevos virus), ensamblaje (formación de nuevos virus) y liberación (salida de la célula huésped), la acción de los compuestos antivirales puede recaer en una o varias de estas etapas. Los compuestos antivirales actúan a menudo como “análogos de nucleósidos” (falsos nucleósidos, los bloques de construcción de los ácidos nucleicos) que los virus incorporan a sus genomas durante la propagación (multiplicación+ensamblaje). El ciclo de vida del virus entonces se detiene debido a que las nuevas cadenas de ADN sintetizadas son defectuosas. Esto se debe a que los análogos carecen de los grupos hidroxilos que junto a los átomos de fósforo forman los enlaces de la molécula de ADN. A esto se le denomina interrupción de la cadena de ADN [Magden y col., 2005]. Ejemplos de análogos sintéticos de nucleósidos son el aciclovir para tratar el virus del herpes y la lamivudina para las infecciones de VIH y hepatitis B, los cuales detienen la replicación del virus actuando en la etapa de multiplicación (**figura 1.3**).

De esta manera, y teniendo en cuenta el potencial terapéutico de las plantas, el estudio del reino vegetal permite seguir abriendo nuevos caminos en la búsqueda de agentes bioactivos naturales, cuyo proceso debe transitar desde un conocimiento etnomédico de la planta, pasando por el dominio de métodos analíticos para su caracterización química, hasta la comprensión del mecanismo estructura-actividad de la especie química.

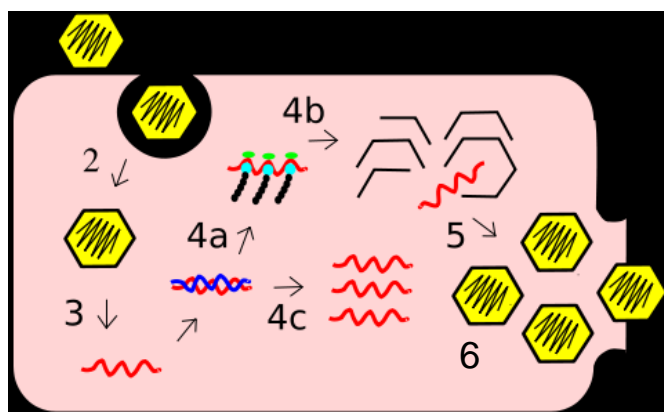


Figura 1.3. Ciclo reproductivo general del virus. Adsorción (1), penetración (2), desnudamiento (3), multiplicación (4), ensamblaje (5) y liberación (6).

I.1.1.2. Implicaciones en el campo nutricional

La alimentación no sólo remite a la satisfacción de una necesidad fisiológica idéntica en todos los seres humanos, sino también a la diversidad de culturas y a todo lo que contribuye a modelar la identidad de cada pueblo, dependiendo así de las técnicas de producción agrícola, de las estructuras sociales, de las representaciones dietéticas y religiosas y consiguientes preceptos, de la visión del mundo y de un conjunto de tradiciones lentamente elaboradas a lo largo de los siglos [Flandrin, 2004]. Las relaciones entre estos aspectos de la cultura y las maneras de alimentarse han existido siempre, desde la conquista del fuego hasta la actualidad, y poco a poco el hombre ha venido entendiendo que la alimentación es una forma de utilización del alimento y que la nutrición es el proceso mediante el cual los alimentos ingeridos se transforman y asimilan conformando los materiales necesarios y esenciales para el mantenimiento de la vida [Cervera y col., 2004].

Dentro de los diversos tipos de alimentos, los que provienen de las plantas presentan muchas ventajas nutricionales ya que le aportan al ser humano macronutrientes como los glúcidos, las proteínas y la fibra vegetal, pero se destacan por su aporte en micronutrientes tales como vitaminas,

minerales y fitocompuestos [Cervera y col., 2004]. Sin embargo, algunos alimentos derivados de plantas poseen ciertas propiedades antinutricionales que afectan a parte de la población mundial de manera sistemática. Algunos de estos grupos de compuestos naturales incluyen saponinas, flavonoides, alcaloides, taninos, oxalatos, fitatos, proteasas, lectinas, lignanos, dentro de los más significativos [Osagie, 1998; Singh y col., 2003]. El énfasis siempre se ha depositado en los efectos tóxicos y antinutritivos que estos compuestos le aportan al alimento en estado natural, aunque muchos de estos efectos pueden eliminarse o disminuirse mediante la aplicación sobre el alimento de varios procesos tales como la impregnación, germinación, ebullición, autoclave, fermentación, manipulación genética, entre otros. Esta característica antinutricional se entiende como una reducción en la utilización del nutriente y de la toma del alimento, pudiendo provocar dispepsias o malestares digestivos [Osagie, 1998]. Estos factores antinutritivos desempeñan un gran papel en la limitación de un uso más amplio de muchas plantas. Los niveles tóxicos de estas plantas varían con la especie, el cultivo y el tratamiento post-cosecha.

Algunos de estos metabolitos secundarios que constituyen factores antinutricionales también poseen un alto valor biológico con una amplia aplicación como agentes farmacológicos activos [Oakenfull y Sidhu, 1989], como es el caso de las saponinas y los flavonoides. Dentro de los polifenoles, los flavonoides constituyen una clase ampliamente distribuida en la plantas. Actualmente se utilizan suplementos nutricionales enriquecidos en flavonoides [Mennen y col., 2005] y se han detectado para las proantocianidinas (taninos condensados) y la quercetina (**figura 1.4**) suministradas en altas dosis, ciertos efectos tóxicos en el organismo [Jones y Hughes, 1982; Dunnick y Hailey, 1992], pudiéndose comportar como pro-oxidantes [Sakihama y col., 2002].

Es conocido el efecto antinutricional de ciertos polifenoles del té, donde la quercetina se encuentra en una importante concentración, relacionado con la inhibición de la absorción del hierro [Temme y van Hoydonck, 2002]. Por otro lado, los taninos condensados también poseen efectos antinutricionales debido a su fuerte interacción con las proteínas y la inhibición de ciertas enzimas [Santos-Buelga y Scalbert, 2000]. Por ejemplo, el consumo de la especie *Vicia faba* de alubia, rica en taninos, puede reducir la utilización de proteínas en niños [Hussein y Abbas, 1985], lo cual pudo conocerse mediante el análisis del balance de nitrógeno en sangre antes y después de la ingesta. También se indica que, en el consumo habitual de alimentos ricos en polifenoles se debe tener en cuenta a la matriz del alimento que puede influir en los efectos antinutricionales de estos compuestos.

Un seguimiento del contenido de este tipo de compuestos en alimentos derivados de plantas, así como el conocimiento de su ingesta diaria en la dieta humana moderna son puntos cruciales a tener en cuenta en aras de una calidad alimenticia que garantice una correcta nutrición del alimento.

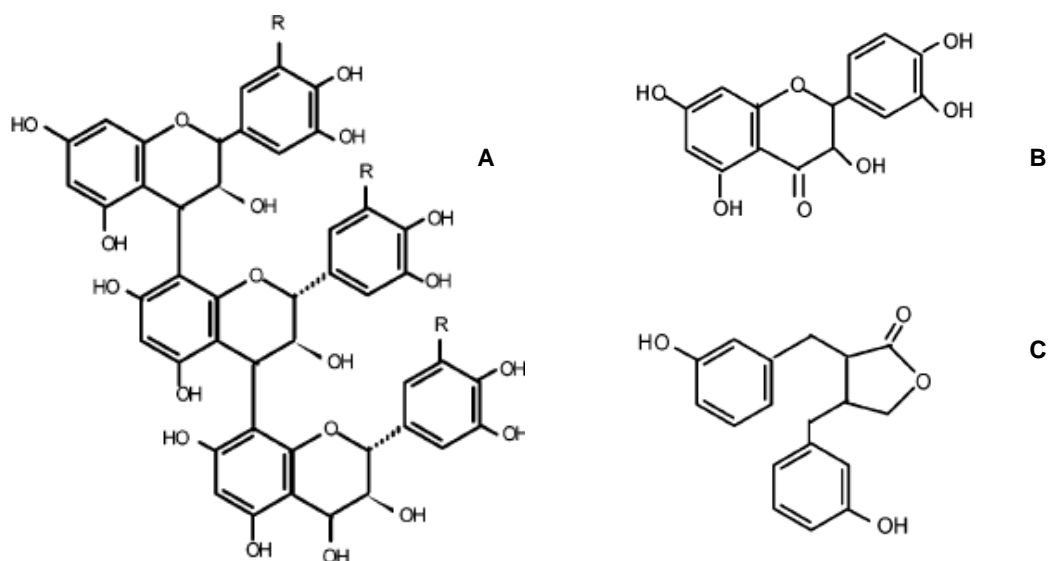


Figura 1.4. Algunos ejemplos de estructuras de metabolitos secundarios con propiedades antinutricionales. **A:** proantocianidina (taninos condensados). **B:** quercetina (flavonoides). **C:** enterolactona (lignanos).

I.1.2. Los compuestos orgánicos volátiles y los medios contaminados

Los compuestos orgánicos volátiles (VOC) son todos aquellos hidrocarburos muy volátiles que se presentan en estado gaseoso a la temperatura ambiente normal y que presentan un rango de temperaturas de ebullición entre 50°C y 260°C. Suelen presentar una cadena con un número de carbonos inferior a doce y contienen otros elementos como oxígeno, flúor, cloro, bromo, azufre o nitrógeno [Piccot y col., 1992; Jones 1999]. Su número supera el millar, pero los más abundantes en el aire son metano, tolueno, n-butano, iso-pentano, etano, benceno, n-pentano, propano y etileno. Tienen un origen tanto natural (VOC biogénicos) como antropogénico (debido a la actividad humana), siendo la fuente natural más común la emisión del metano, un gas de efecto invernadero, generado por la descomposición de la materia orgánica, por la quema de biomasa o por animales rumiantes como las vacas. Otros VOC de origen natural son los aceites esenciales constituidos por terpenos. Por otro lado, las fuentes artificiales tienen su origen principalmente en actividades industriales, la evaporación de disolventes orgánicos, los automóviles e incluso el humo del tabaco [Molhave, 1991; Carter, 1994; Edwards y col., 2001], así como de diversos tipos de materiales usados por el hombre en espacios interiores [Jones, 1999] según se muestra en la **Tabla 1.1**.

Debido a su volatilidad dan lugar tanto a contaminación atmosférica como a importantes riesgos para la salud. Estos compuestos participan activamente en numerosas reacciones, en la troposfera y en la estratosfera, contribuyendo a la formación del smog fotoquímico y al efecto invernadero, siendo precursores del ozono troposférico [Carter, 1994; Bare y col., 2003]. Sus propiedades tóxicas van a depender de cada compuesto y de las condiciones de la exposición. Son además moléculas

orgánicas liposolubles, presentando afinidad por las grasas por lo que se acumulan fácilmente en los tejidos grasos del cuerpo humano. La vía de entrada más peligrosa al organismo es la inhalación y son metabolizados en el mejor de los casos en compuestos hidrosolubles para ser eliminados con posterioridad [Molhave, 1991; Jones, 1999]. Por estas razones, la emisión de aquellos VOC muy tóxicos (carcinogénicos y mutagénicos), como es el caso particular de los denominados BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) [Hinwood y col., 2007], debe estar estrictamente controlada.

Tabla 1.1. Algunas fuentes de emisión de VOC en espacios interiores y exteriores.

Fuente	Espacios interiores
Productos comerciales	Hidrocarburos alifáticos (decano), hidrocarburos aromáticos (tolueno, xilenos), hidrocarburos halogenados (cloruro de metileno), alcoholes, cetonas (acetona, metiletilcetona), aldehidos (formaldehído), ésteres (alquiletoxilato), éteres (glicoléter), terpenos (limoneno, alfa-pineno).
Pinturas y suplementos	Hidrocarburos alifáticos (hexano, heptano), hidrocarburos aromáticos (tolueno), hidrocarburos halogenados (cloruro de metileno, dicloruro de propileno), alcoholes, cetonas (metiletilcetona), ésteres (acetato de etilo), éteres (metil-, etil- y butil-éter).
Adhesivos	Hidrocarburos alifáticos (hexano, heptano), hidrocarburos aromáticos y halogenados, alcoholes, aminas, cetonas (acetona, metiletilcetona), ésteres (acetato de vinilo), éteres.
Muebles y ropa	hidrocarburos aromáticos (estireno), hidrocarburos halogenados (cloruro de vinilo), aldehídos (formaldehído), ésteres, éteres.
Materiales de construcción	Hidrocarburos alifáticos (decano, dodecano), hidrocarburos aromáticos (tolueno, estireno, etilbenceno), hidrocarburos halogenados (cloruro de vinilo), aldehídos (formaldehído), cetonas (acetona, butanona), ésteres (uretano, acetato de etilo), éteres.
Materiales de combustión	Hidrocarburos alifáticos (propano, butano, iso-butano), aldehídos, (acetaldehído, acroleína)
Agua potable	Hidrocarburos halogenados (tricloroetano, cloroformo).
Espacios exteriores	
Actividad humana diversa	Hidrocarburos alifáticos (alcanos C1-C14; mono-, di-, tri-metil alcanos C4-C8; ciclo alcanos C5, C6; alquenos C2-C9; isoalquenos C4-C9), acetilenos (acetileno, metilacetileno), hidrocarburos aromáticos (benceno, tolueno, etilbenceno, xilenos, tetralina, naftalenos, estireno), alcoholes (C1-C4), éteres (C2, C5, C6), aldehídos (formaldehído, acetaldehído, glioxal), cetonas (C4), hidrocarburos aromáticos oxigenados (benzaldehído, fenol, alquilfenoles), otros (nitrito de metilo).

I.1.2.1. Implicaciones medioambientales

Muchos VOC son peligrosos contaminantes del aire y cuando se mezclan con óxidos de nitrógeno reaccionan para formar ozono al nivel del suelo, formando la bruma industrial, conocida como "smog" [Carter, 1994; Bare y col., 2003; Ao y col., 2003]. El ozono (O_3) es un gas oxidante reactivo producido de forma natural en trazas en la atmósfera y su concentración en la troposfera (6-20 km) conlleva impactos perjudiciales en la salud humana y al ecosistema. Los índices de formación del ozono en la troposfera son gobernados por reacciones químicas complejas, que son influenciadas por concentraciones en el ambiente de óxidos de nitrógeno (NOx) y de VOC, temperatura, luz del sol, y de flujos convectivos (**Figura 1.5**).

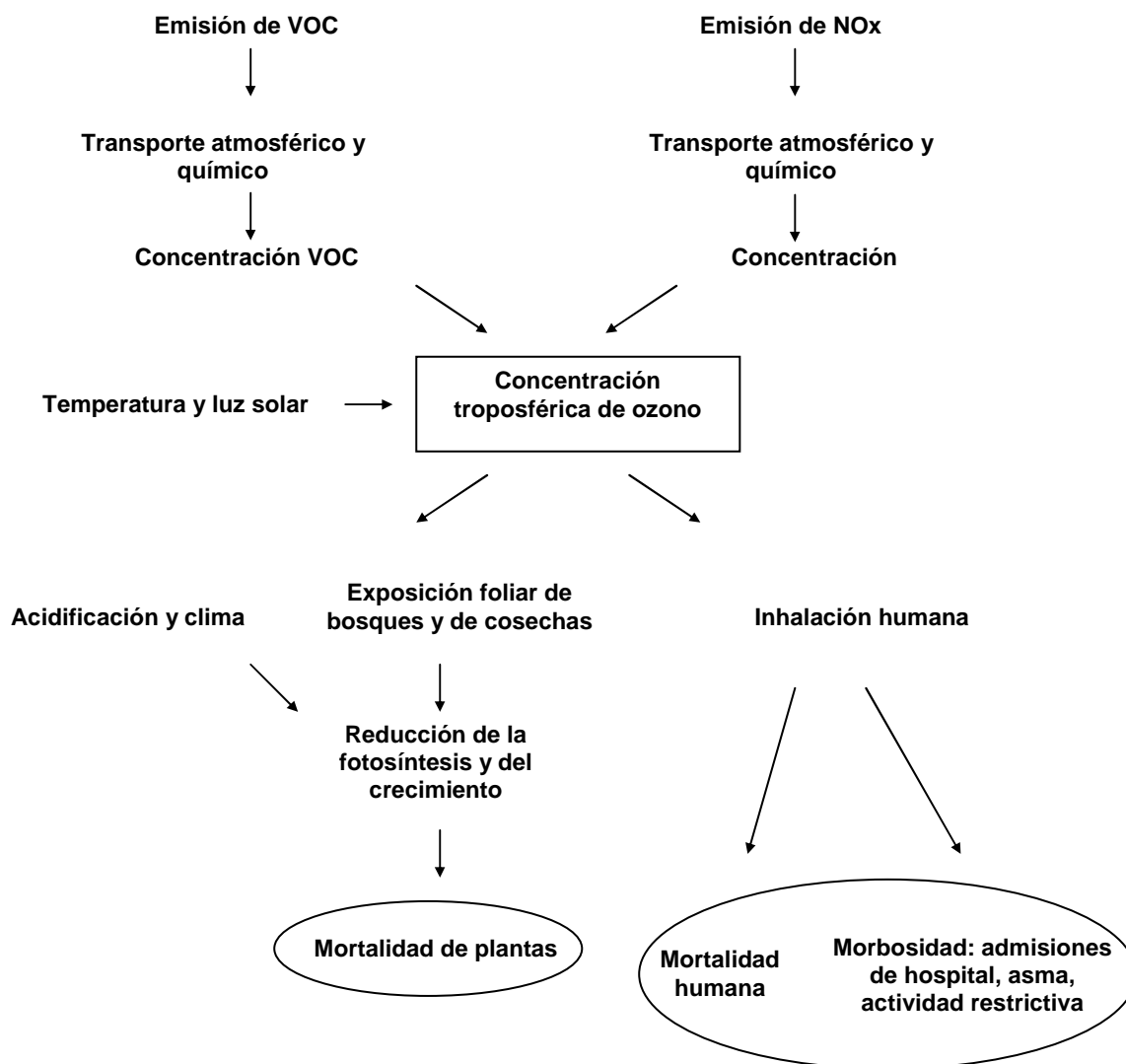
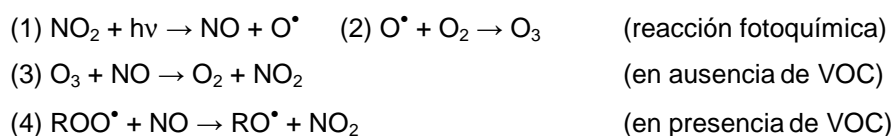


Figura 1.5. Vínculo causa-efecto en la formación de ozono troposférico.

La presencia de especies de NO_x provoca un aumento en la formación de O₃, contenido que disminuye con la presencia de especies tipo NO (ver reacciones 1-3). En este sentido, el balance NO_x/NO es importante en la producción del O₃ en la troposfera. La formación de ozono debida a reacciones fotoquímicas de las especies NO_x, no genera altas concentraciones en la capa troposférica. Sin embargo, la presencia de los VOC, los cuales se concentran en la troposfera debido al transporte atmosférico y químico, promueve la formación de radicales libres (ROO[•]) que hacen consumir los niveles de NO o convertir el NO en NO_x (reacción 4),, provocando, como consecuencia altas concentraciones de ozono en la troposfera al aumentar la relación NO_x/NO [Carter, 1994]. Estas reacciones generales se detallan a continuación:



La presencia de los VOC en esta capa atmosférica perjudica notablemente a las plantas y la salud humana. En primer lugar, provoca una disminución de la fotosíntesis de las plantas y problemas en el crecimiento vegetal debido a la acidificación del medio ambiente por formación de HNO₃ (NO₂ + OH[•] → HNO₃). Por otro lado, en el hombre tiene una repercusión no deseada fundamentalmente por efectos de inhalación de este aire proveniente de la troposfera, generando problemas respiratorios y otros tipos de complicaciones en la salud al ser el ozono un compuesto oxidante y tóxico (**Figura 1.4**) [Carter, 1994].

El primer paso en el desarrollo de metodologías para la reducción de los fenómenos contaminantes consiste en la selección y estudio de las categorías de impacto, las cuales son generalmente de dos tipos: (1) las categorías que incluyen el agotamiento abiótico del recurso, la utilización del suelo y el agua, y (2) las categorías relacionadas con la contaminación, que incluyen la formación de ozono, calentamiento del planeta, toxicología humana, ecotoxicología, formación del “smog”, acidificación, eutroficación, entre otros [Bare y col., 2003].

I.1.2.2. Implicaciones en la salud

Los efectos de los VOC para la salud pueden variar mucho según el compuesto y comprenden desde un alto grado de toxicidad hasta ausencia de efectos conocidos. Esos efectos dependerán de la naturaleza de cada compuesto y del grado y del período de exposición al mismo. Las personas con mayor riesgo de exposición a largo plazo a estos VOC son los trabajadores en sitios industriales que tienen una exposición ocupacional prolongada a estas sustancias tóxicas, los fumadores de cigarrillos, y las personas expuestas por períodos prolongados a las emisiones del tránsito pesado de vehículos automotores. También dentro del hogar podemos encontrar numerosas fuentes de VOC, como en el

caso de los productos de limpieza, productos de higiene personal, cosméticos, pinturas, plásticos, entre otros [Molhave, 1991, Yu y Crump, 1998; Hinwood y col., 2007].

Muchos de estos compuestos afectan al organismo humano después de su absorción, promoviendo reacciones metabólicas adversas. El cuerpo en su intento de evacuarlos promueve reacciones de oxidación para generar compuestos hidrosolubles y de fácil eliminación a través de la orina, el sudor o las heces. Un ejemplo de este proceso se puede observar en los BTEX que son oxidados a fenoles y ácidos aromáticos para su posterior evacuación [Bieniek, 1994], pero que durante su paso por el organismo provocan un nivel de toxicidad importante [Hinwood y col., 2007].

En general, una exposición a los VOC a largo plazo puede causar lesiones del hígado, los riñones y el sistema nervioso central, con irritabilidad, falta de memoria, dificultad de concentración, entre otras alteraciones. La exposición a corto plazo puede causar reacciones alérgicas con irritación de los ojos y las vías respiratorias, dolor de cabeza, mareo, trastornos visuales, fatiga, pérdida de coordinación, reacciones alérgicas de la piel, náusea y trastornos de la memoria. Además, tienen un papel fundamental como precursores de procesos cancerígenos, al estimular reacciones indeseadas en el organismo que alteran el normal funcionamiento del metabolismo humano [Bare y col., 2003; Lee y col., 2006; Hinwood y col., 2007].

I.2. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS BASADAS EN TÉCNICAS DE SEPARACIÓN APLICADAS AL ESTUDIO DE METABOLITOS DE PLANTAS Y COMPUESTOS TÓXICOS EN MEDIOS CONTAMINADOS

I.2.1. Metodologías generales

I.2.1.1. Caracterización de metabolitos secundarios bioactivos en plantas

Desde un punto de vista fitoquímico existe una gran cantidad de información relativa a los métodos de extracción, separación, aislamiento, identificación, análisis cualitativo y cuantitativo, que aportan un conocimiento al estudio de las plantas desde el punto de vista de la fisiología, la patología, la ecología, la genética, la taxonomía y la medicina natural [Linskens y Jackson, 1985; Harborne, 1973-1998; Dey y Harborne, 1989-1997].

Uno de los enfoques más completos de la investigación fitoquímica actual está basado, previo establecimiento del blanco farmacológico o terapéutico a investigar, en una selección del material vegetal (familia o género de planta) a través del concurso de la información etnomédica, la quimiotaxonomía y los antecedentes de la investigación científica del género en cuestión [Butler, 2004; Balunas y Kinghorn, 2005]. Seleccionado el género de planta a estudiar, se lleva a cabo,

posteriormente, una metodología de fraccionamiento guiada por bioensayos, la cual permite diferenciar los distintos extractos y priorizar las investigaciones. Primero se determina si los extractos de las especies seleccionadas son activos (cribado biológico). Aquellos extractos más activos se seleccionan para su posterior investigación y se comienza el fraccionamiento que continúa guiado por bioensayos. Cada fracción obtenida se evalúa frente al blanco farmacológico y de la fracción más activa se tratan de aislar los metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica fijada al inicio de la investigación. En ocasiones, según los objetivos de la investigación, no necesariamente la fracción más activa es caracterizada químicamente. Esto puede estar motivado por el sinergismo positivo o negativo muy común en estas muestras vegetales de composición tan compleja, donde en una fracción menos activa pueden estar presentes los principales agentes responsables, cuya actividad queda enmascarada por la presencia de otros metabolitos antagónicos. De esta manera, la habilidad del investigador ante los resultados químicos y farmacológicos, en correspondencia con los antecedentes de la literatura, permitirá establecer una ruta de fraccionamiento adecuada, que guíe la investigación hacia los agentes responsables de la actividad del extracto de partida. Estos aspectos hacen del fraccionamiento guiado por bioensayos a partir de una muestra vegetal en la búsqueda de sus agentes bioactivos, todo un proceso complejo, donde no existe una ruta ideal para llevar a buen término la investigación, y va a depender de muchos factores, los cuales se han de valorar en cada etapa del estudio.

El bioensayo debe poseer como características ser simple, rápido, fiable, barato, y reproducible, además, debe modelar, lo mejor posible, el organismo viviente. En la mayoría de los casos ningún bioensayo reúne todos los criterios anteriores. El bioensayo *in-vivo* (con animales) puede proporcionar datos más válidos que el ensayo *in-vitro* (con células), sin embargo, el primero suele ser complicado, lento y caro. Por otro lado, los ensayos celulares son generalmente rápidos, simples y baratos, pero no modelan bien los organismos más desarrollados. Debido a los costes y el tiempo, los ensayos *in-vitro* son, al inicio, los normalmente empleados y el ensayo *in-vivo* sólo se reserva para profundizar en la actividad biológica de los compuestos puros para su futuro uso clínico potencial, durante la etapa de ensayos clínicos. Los bioensayos padecen limitaciones conocidas. Así, las pruebas de citotoxicidad son inespecíficas y pueden producir falsos positivos, lo cual puede llevar la investigación hacia compuestos muy tóxicos. Los resultados hallados para los compuestos más activos pueden ocultar la presencia de compuestos menos citotóxicos de interés. Por otro lado, los bioensayos basados en mecanismos de acción poseen una especificidad alta, lo cual puede provocar que compuestos que actúen por diferentes mecanismos no se aislen durante el fraccionamiento guiado.

En relación a la acción antioxidante de extractos vegetales sobre el organismo, el ensayo se dirige hacia la evaluación de las especies reactivas de oxígeno, así como otros radicales libres, que son especies altamente reactivas y se forman cotidianamente en el organismo humano. Debido a la compleja composición química de los extractos vegetales, la actividad antioxidante no puede ser evaluada por un solo método. De esta manera, los ensayos antioxidantes comúnmente aceptados

incluyen métodos enzimáticos y no enzimáticos; y los primeros se utilizan para medir la capacidad inhibitoria de la actividad de enzimas generadoras de radicales libres y/o la capacidad secuestradora de radicales libres, ambos a través de métodos colorimétricos [Cos y col., 1998; Choi y col., 2002].

Por otro lado, la determinación de fenoles totales, que indica la capacidad de transferencia de átomos de H, y del poder reductor, que indica la capacidad de transferencia de electrones, constituyen dos ensayos colorimétricos no enzimáticos que aportan un conocimiento del potencial antioxidante de las muestras vegetales en estudio, así como una guía de fraccionamiento del extracto bioactivo en la búsqueda de los agentes antioxidantes responsables de la actividad. En la técnica de fenoles totales se utiliza el reactivo Folin-Ciocalteu (mezcla de ácidos fosfomolibdico-fosfotúngstico), el cual reacciona con los grupos OH fenólicos y provoca variaciones en la absorbancia de estos compuestos [Singleton y Rossi, 1965]; la medición de la absorbancia resultante permite conocer el contenido de fenoles en la muestra vegetal. En la técnica de poder reductor se utiliza el sistema Fe(II)/Fe(III) que en presencia de compuestos fenólicos y debido a la capacidad dadora de electrones de estas moléculas, el Fe (III) se reduce, lo cual provoca un cambio en la absorbancia de la muestra que puede medirse espectrofotométricamente como capacidad reductora [Yen y Chen, 1995]. Por otro lado, muchos métodos enzimáticos se han desarrollado para medir la capacidad secuestradora de radicales libres de muestras vegetales con alto contenido de polifenoles [Yen y Chen, 1995]. Estos métodos se basan en la inhibición de la acumulación de productos oxidados, debido a la disminución de los niveles de concentración del radical libre por la presencia de antioxidantes secuestradores de estos radicales [Cos y col., 1998; Choi y col., 2002]. Uno de los métodos enzimáticos más utilizados para medir la capacidad secuestradora del radical O_2^{\cdot} , lo constituye el sistema xantina oxidasa/sal de *nitrobluetetrazolium* (XO/NBT) en presencia de la metaloproteína superóxido dismutasa (SOD) [Beauchamp y Fridovich, 1971]. El método se basa en la generación enzimática de O_2^{\cdot} por el sistema hipoxantina/XO, y una posterior oxidación de la sal NBT por el radical O_2^{\cdot} para dar un producto oxidado, el cual puede ser medido espectrofotométricamente. La enzima SOD es una importante enzima antioxidante, capaz de convertir el radical O_2^{\cdot} en H_2O_2 y O_2 molecular, y se utiliza como competencia respecto a la actividad antioxidante de la muestra problema [Ukeda y col., 1997, 1999].

Otra de las actividades biológicas ampliamente evaluada en extractos de plantas es la antiherpética debido a que las plantas constituyen una fuente natural de medicamentos antivirales. Existen algunas metodologías de tamizado antiviral de muestras vegetales que permiten determinar la actividad virucida (capacidad de la muestra de eliminar el virus) o actividad inhibitoria (capacidad de la muestra de inhibir el crecimiento del virus), a través de la propagación del virus en líneas celulares adecuadas [Vlietinck y col., 1991]. También se indica el ensayo de inhibición en placa, reducción en placa, inhibición del efecto citopático inducido por el virus y reducción del rendimiento del virus, como algunos de estos ensayos antivirales *in-vitro* empleados comúnmente para evaluar muestras vegetales.

Desde el punto de vista de la identificación de los metabolitos secundarios se emplean técnicas espectroscópicas tales como la espectrofotometría ultravioleta (UV), la espectrometría de masas (MS)

y la resonancia magnética nuclear (NMR). Para la elucidación estructural de los flavonoides, la técnica que se ha revelado más poderosa es la de NMR, aunque la MS [Cuyckens y Claeys, 2004] y la espectrofotometría UV con el uso de reactivos de desplazamiento químico, tales como KOH, AlCl_3 , AlCl_3/TFA , H_3PO_4 y $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOAc}$ [Mabry y col., 1970; Ducrey y col., 1995], aportan abundante información, muchas veces concluyente, acerca del patrón de sustitución (grupos específicos en el esqueleto base del flavonoide que determinan cada compuesto). Por otro lado, en el caso de los triterpenos, los cuales presentan una gran variedad estructural, la MS constituye una poderosa herramienta para la caracterización y reconocimiento del tipo de familia a través del esqueleto base de la estructura en cuestión [Budzikiewicz y col., 1963]. Por otro lado, la NMR de carbono 13 (^{13}C NMR) representa una técnica espectroscópica complementaria para localizar la posición de los grupos funcionales en la estructura del triterpeno, generalmente insaturaciones y grupos OH, O, CHO, C=O y COOH [Agrawal y Jain, 1992].

I.2.1.2. Caracterización de metabolitos como indicadores de la exposición a sustancias tóxicas

Muchos productos químicos, a los cuales las plantas y animales se exponen, experimentan un impacto en su metabolismo antes del almacenaje o excreción de dichas sustancias en el organismo. En algunos casos, una medida de los niveles de metabolitos en tejidos o de los productos de excreción puede ser utilizada como un indicador de la exposición a tales productos químicos. Esta medida de metabolitos como un medio de supervisar la exposición puede ser especialmente valiosa cuando existen dificultades prácticas en la determinación de la exposición a un producto químico específico. Tal situación puede presentarse cuando un producto químico se metaboliza muy rápidamente o cuando es difícil determinar la exposición, especialmente en períodos a largo plazo cuando la dosificación es debida a la inhalación del producto químico durante la cual las concentraciones en el aire fluctúan extensamente. La determinación de la exposición a largo plazo a los agentes contaminantes del aire, tales como el humo del cigarro o la exposición en la industria a los compuestos orgánicos volátiles, ejemplifica un área donde la medida de los metabolitos puede proporcionar una indicación exacta de la exposición. Sin embargo, para que la medida del metabolito sea útil como indicador de la exposición a los productos químicos, varios criterios deben ser cumplidos: (1) el metabolito debe ser específico para el producto químico referido. Por el contrario, la determinación del metabolito puede resultar de poco valor si el producto químico se metaboliza totalmente a metabolitos no específicos, tales como agua, dióxido de carbono, acetatos, cloruros, o urea. (2) debe conocerse el metabolismo del producto químico en el organismo de interés. Los estudios en el metabolismo de drogas y de otros xenobióticos han demostrado que para muchos compuestos existen grandes diferencias en su metabolización inter- e intra-especies. Puede también haber diferencias en el metabolismo dentro del mismo individuo, dependiendo de la edad y del estado hormonal y alimenticio. Todos estos factores complican el uso de las determinaciones del metabolito

en la evaluación de la exposición a los productos químicos. (3) como en todo tipo de supervisión, se deben utilizar métodos fiables de muestreo y análisis y la calidad analítica debe ser garantizada para asegurar la obtención de resultados válidos [Aitio y Jarvisalo, 1984; Slorach, 1991].

Una amplia gama de tejidos, fluidos corporales, y productos de excreción son potencialmente útiles para la determinación de metabolitos *in vivo*: por ejemplo, (a) sangre, saliva, y leche; (b) tejido adiposo, cerumen, dientes, pelo, y uñas; y (c) orina, heces, y aire expirado. Una gama mucho más amplia de tejidos se puede utilizar en estudios de la exposición del curso de vida de productos químicos que se acumulan en el cuerpo, si los tejidos se pueden recoger de cadáveres durante la autopsia. Metales presentes en los tejidos o los fluidos corporales, tales como el plomo en sangre, hueso o dientes, el cadmio en corteza del riñón, y el mercurio en pelo, pueden estar presentes como metabolitos. Sin embargo, se sabe relativamente poco sobre la forma química real en la cual estos metales están presentes en los tejidos en cuestión y, para los propósitos de la supervisión de la exposición, ellos se determinan generalmente como metal, y no como metabolito [Aitio y Jarvisalo, 1984; Slorach, 1991].

Particularmente y por interés de la presente tesis, se desea mencionar que los tejidos dentales, por ejemplo, son una de las muestras biológicas menos utilizadas como biomarcadores para el estudio del impacto medioambiental en el organismo. Los dientes han sido estudiados hasta la actualidad principalmente para la determinación de niveles de contaminación de sustancias tóxicas que se acumulan como en el caso de los metales pesados, tales como plomo, cadmio, cinc y manganeso, los cuales son secuestrados por el mineral del diente durante su formación [Gerlach y col., 2000; Nowak y Chmielnicka, 2000; Tvinnereim y col., 2000; Ericson y col., 2001; Kang y col., 2004; Arora y col., 2006; Costa de Almeida y col., 2007]. Otras sustancias tóxicas como las dioxinas han sido estudiadas en dientes de mamíferos para conocer los niveles de contaminación [Murtomaa y col., 2007], así como la exposición a fluoruros a través de la determinación de flúor en dientes humanos [Kierdorf y Kierdorf, 1999] y sustancias orgánicas como la nicotina y cotinina en el monitoreo de la acumulación por exposición al humo del cigarro en niños como fumadores pasivos [Pascual y col., 2003; Marchei y col., 2008].

I.2.2. Técnicas de separación cromatográficas

I.2.2.1. Determinación de flavonoides y terpenoides en muestras vegetales

En el presente capítulo se se realiza una exposición breve de las diferentes técnicas separativas más ampliamente usadas para el análisis de flavonoides y terpenoides como dos de los grupos de metabolitos secundarios con mayor interés farmacológico.

Los flavonoides constituyen una importante familia de metabolitos secundarios ampliamente distribuida en la flora mundial. Para el estudio de estos compuestos y debido a la diversidad

estructural que pueden presentar (**figura 1.6**) [Harborne, 1998], comúnmente se emplean técnicas separativas como la cromatografía en capa fina (TLC), la cromatografía de gases (GC), la electroforesis capilar (CZE) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con el uso de detectores como el espectrómetro de masas (HPLC-MS y GC-MS) y el espectrofotómetro ultravioleta (HPLC-UV y ZCE-UV), así como la técnica combinada de HPLC-GC-MS.

Así, la TLC es una técnica ampliamente utilizada para separar e identificar una gran variedad de flavonoides en extractos de plantas y/o fracciones con el uso de reveladores químicos [Wagner y Bladt, 1996] y de la espectrofotometría UV (**figura 1.7A**), la cual ha sido comparada con la técnica combinada de HPLC-UV (**figura 1.7B**) [Pereira y col., 2004].

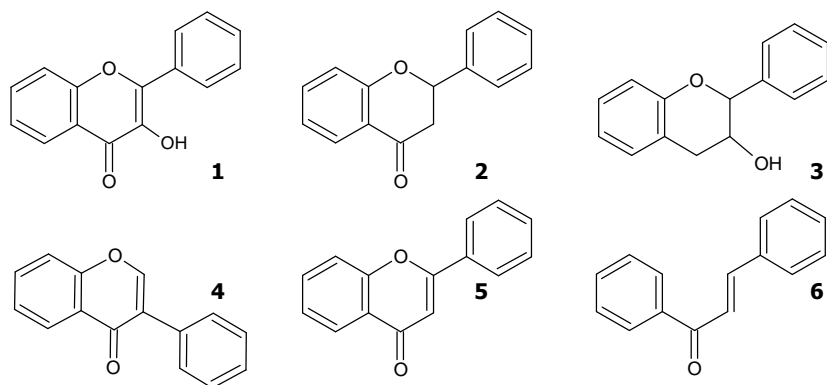


Figura 1.6. Estructuras básicas de flavonoides. **1:** flavonol, **2:** flavanona, **3:** flavano, **4:** isoflavona, **5:** flavona, **6:** chalcona.

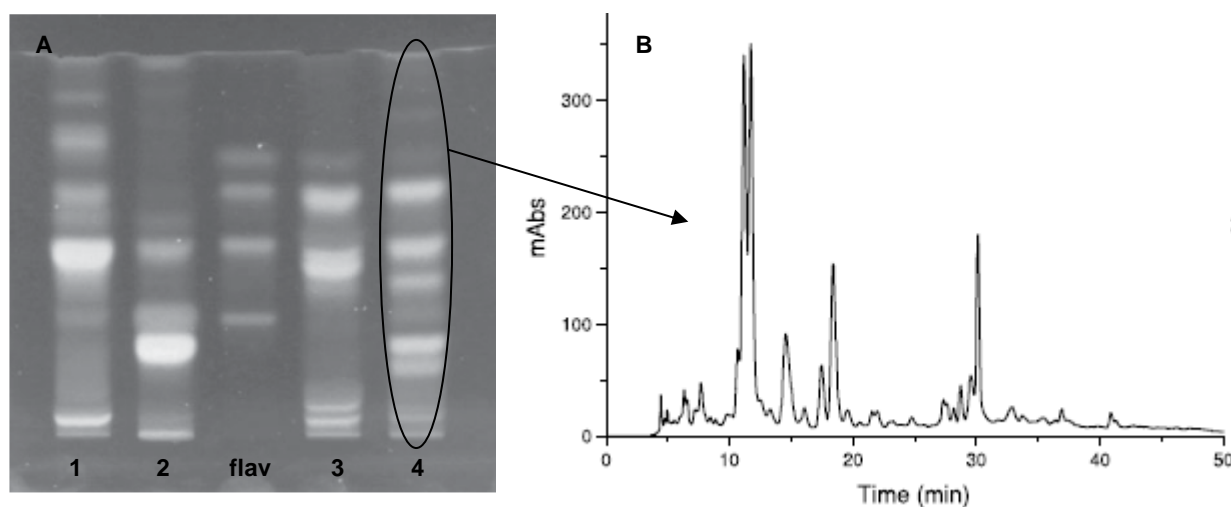


Figura 1.7. Ejemplo de cromatogramas obtenidos por TLC de cuatro especies de *Passiflora* y una mezcla de patrones de flavonoides (**A**) y de una de las especies por HPLC (**B**) en la identificación de cuatro flavonoides.

La GC-MS es una técnica que se ha empleado solo para el análisis de flavonoides libres o aglicones (**figura 1.8**), ya que debido a la elevada polaridad y el alto peso molecular que poseen los flavonoides complejos como los glicósidos, se requiere de una previa preparación de muestras (hidrólisis o derivatización) antes del análisis cromatográfico [Schmidt y Merfort, 1993].

Otra técnica que resulta interesante ser mencionada, aunque no se encuentre dentro de las cromatográficas, es la ZCE-UV, la cual ha sido usada para el análisis de flavonoides libres como la quercetina [Dadáková y col., 2001], y de flavonoides C-glicósidos (**figura 1.9**) [Voirin y col., 2000].

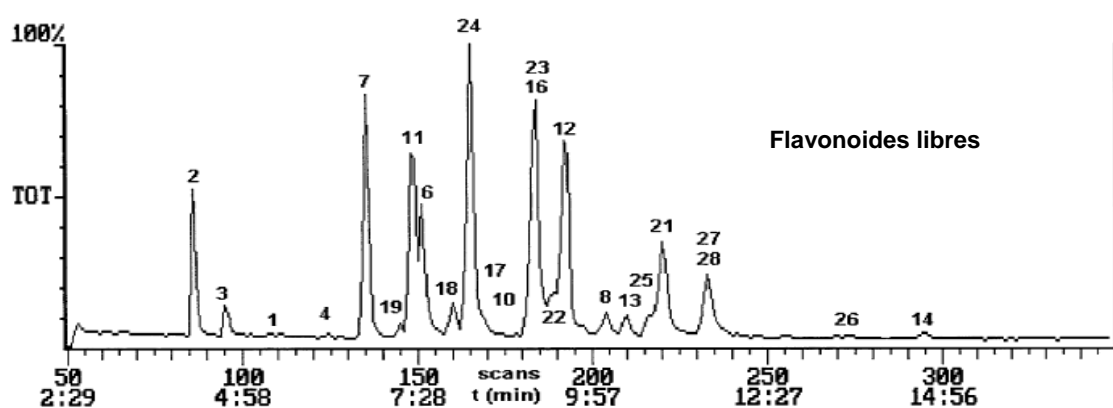


Figura 1.8. Cromatograma GC-MS de un extracto de especie de *Arnica* y la identificación de 26 flavonoides.

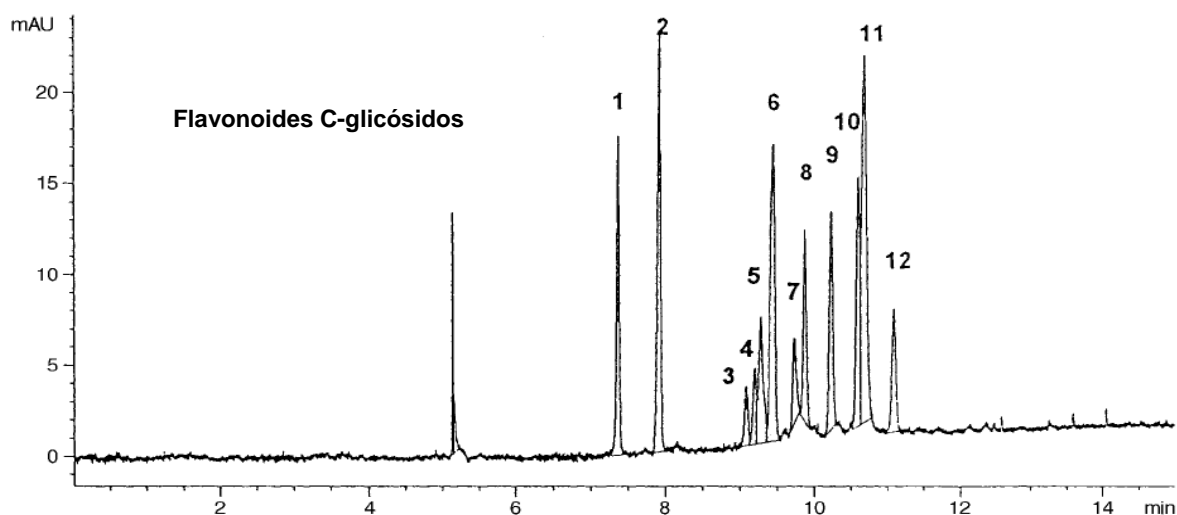


Figura 1.9. Electroferograma de un extracto de *Passiflora incarnata* L. y la identificación de doce C-glicósidos de flavonoides.

Las técnicas más empleadas para el estudio de flavonoides en muestras vegetales son la HPLC-UV y el HPLC-MS. La técnica del HPLC se utilizó por vez primera para el análisis de estos compuestos en 1976 [Hasegawa y col., 1996] y su aplicación se ha recopilado en varias ocasiones [Daigle y Conkerton, 1983, 1988; Merken y Beecher 2000]. Las condiciones cromatográficas más recientes para el análisis de flavonoides consisten en el uso de columnas en fase reversa de una longitud de 100 a 300 mm, y usualmente de 4,6 mm de diámetro interno. Los sistemas de elución son comúnmente binarios, con disolventes que contienen aditivos ácidos (HOAc, HClO₄, H₃PO₄ o HCOOH) como fase móvil A y otro disolvente orgánico como el MeOH o el MeCN como fase móvil B. La velocidad de flujo que se emplea usualmente es de 1,0 o 1,5 mL/min [Merken y Beecher, 2000].

Por otro lado, en el caso de los terpenoides, específicamente los triterpenos pentacíclicos, son compuestos lipofílicos que pueden aumentar su polaridad por la presencia en su estructura de grupos funcionales del tipo OH, COOH o dobles enlaces (**Figura 1.10**).

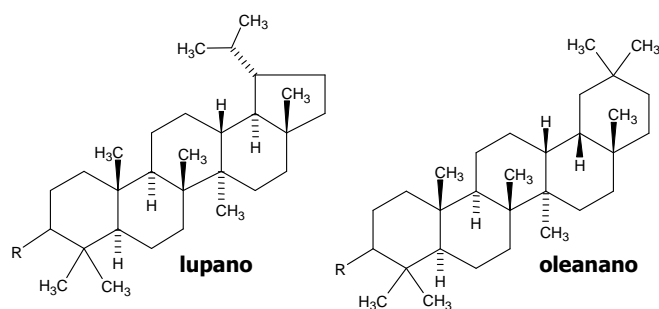


Figura 1.10. Estructuras básicas de algunos triterpenos pentacíclicos.

Estos metabolitos se extraen a partir del material vegetal con el uso de disolventes polares y de mediana polaridad como el MeOH y el CH₃Cl, y su separación y aislamiento a partir del extracto crudo se realiza comúnmente a través de cromatografía preparativa en placa o columna con silica gel [Chávez y col., 1996; Barreiros y col., 2002 y 2005] y una posterior purificación por HPLC en fase reversa [Chang y col., 2001, Mathe y col., 2004]. En el estudio de estos metabolitos en el material vegetal se emplea la HPLC (**Figura 1.11**) y la GC acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS). Debido a la similitud estructural, isomerías de posición y conformacionales, la técnica más resolutiva y eficaz es la GC-MS (**Figura 1.12**) [Nytoft y col., 2002].

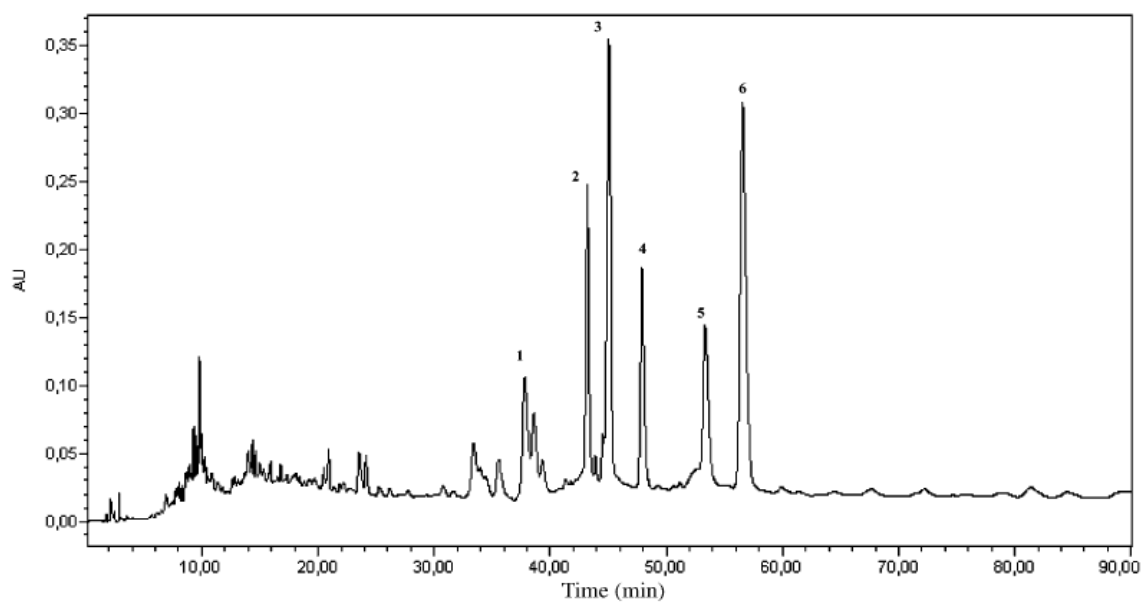


Figura 1.11. Cromatograma HPLC de una especie de *Boswellia* y la identificación de seis triterpenoides

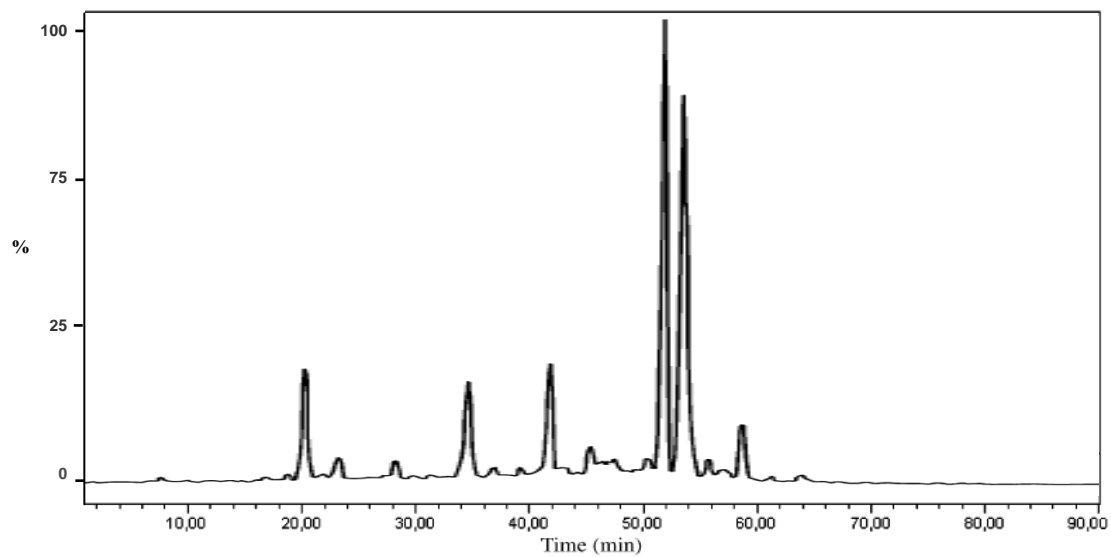


Figura 1.12. Cromatograma GC-MS de aceites de plantas variadas en la identificación de triterpenoides.

I.2.2.2. Determinación de BTEX y metabolitos en matrices diversas

En el presente capítulo se realiza una breve presentación de las diferentes técnicas separativas más ampliamente usadas para el análisis de BTEX como compuestos orgánicos volátiles (VOC) y de sus metabolitos, dentro del estudio del impacto medioambiental en el organismo humano debido a la exposición a estas sustancias.

Dentro de los VOC, los BTEX constituyen uno de los grupos con mayor importancia debido a su toxicidad para el hombre [Hinwood y col., 2007]. Los BTEX, por sus características de compuestos altamente volátiles han sido estudiados ampliamente a través de la técnica de GC-MS en muestras de suelo [Ezquerro y col., 2004], aguas [Lee y col., 2007; Guimaraes y col., 2008], y aire [Tumbiolo y col., 2004; Hinwood y col., 2007] en estudios de impacto medioambiental. En la **Figura 1.13** se observa un ejemplo donde la técnica es capaz de separar los isómeros del xileno [Ezquerro y col., 2004].

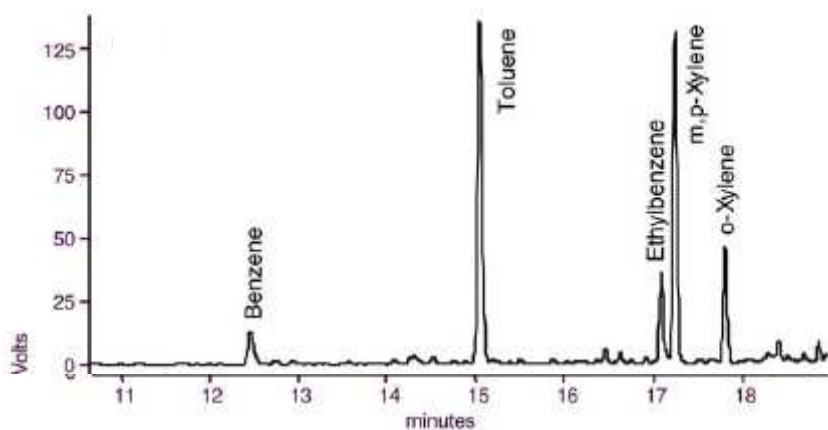


Figura 1.13. Cromatograma GC-MS de BTEX en muestras de suelos.

Uno de los estudios de mayor interés está relacionado con el nivel de exposición humana mediante el análisis de los metabolitos de los BTEX en fluidos biológicos. Estos compuestos posteriormente a su absorción, son oxidados en el organismo a fenoles y ácidos carboxílicos para luego ser eliminados vía orina y sudor [Bieniek, 1994]. Como se observa en la **Figura 1.14**, los metabolitos del benceno (B) son el fenol (P) y los ácidos fenilmercaptúrico y mucónico [Boogaard y Sittert, 1996], los del tolueno (T) son el *p*-cresol (pC) y el ácido hipúrico (HA), los del etilbenceno (E) son el ácido mandélico (MA) y el fenilglioxílico (PGA), y los del xileno (X) son los ácidos metilhipúricos (MHA), que en este caso se muestra el par de compuestos sustituidos en posición *para* [Sperlinková y col., 2004].

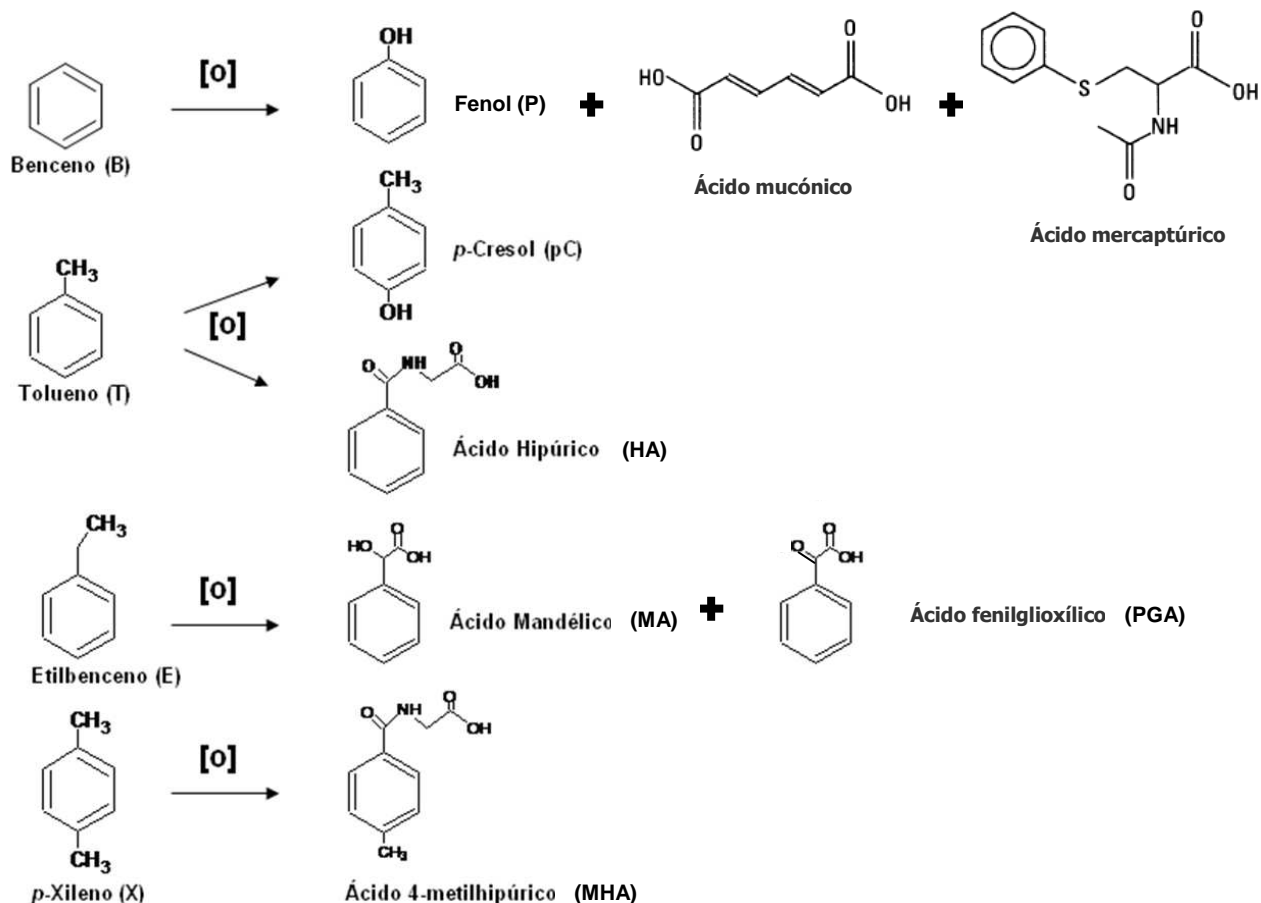


Figura 1.14. Estructura de metabolitos de los BTEX.

Aunque se han realizado estudios para la determinación directa de BTEX por GC-MS en muestras de sangre, aliento y orina [Khan, 2006], la aplicación más común consiste en la determinación de sus metabolitos en fluidos biológicos mediante la HPLC-UV y la HPLC-MS para el caso de los metabolitos de los BTEX tales como los ácidos fenilmercaptúrico, mucónico, mandélico, fenilgloxílico e hipúricos [Moon y col.m, 1997; Laffon y col., 2001; Sperlinková y col., 2004; Khan, 2006], con el objetivo de conocer su impacto en la salud humana en personas sistemáticamente expuestas a estas sustancias. En la **Figura 1.15** se muestra un ejemplo del análisis de varios metabolitos de BTEX en muestra de orina por HPLC-UV con el uso de un patrón interno.

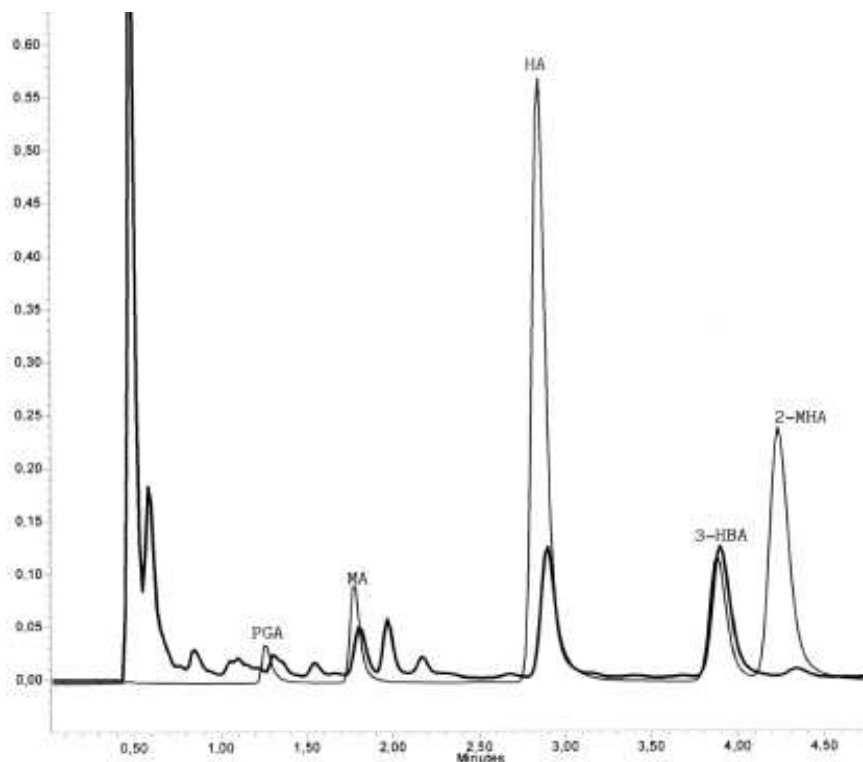


Figura 1.15. Cromatogramas HPLC-UV solapados de una mezcla de ácidos carboxílicos (línea clara) y una muestra de orina (línea oscura) e identificación de los ácidos fenilgloxílico (PGA), mandélico (MA), hipúrico (HA), hidroxibenzoico (3-HBA) y metilhipúrico (2-MHA).

I.2.3. Técnicas de separación no cromatográficas

I.2.3.1. Microextracción en fase sólida: su aplicación medioambiental y bioanalítica

La microextracción en fase sólida (SPME) en su variante también de “*headspace*” para el caso de los compuestos volátiles es una técnica que no usa disolventes orgánicos, fácilmente automatizable, es altamente selectiva y rápida [Arthur and Pawliszyn, 1990; Pawliszyn, 1997, 1999; Penton, 1999], que simplifica el análisis de sustancias volátiles y no volátiles en matrices medioambientales como aguas, suelos, alimentos, fragancias y fluidos biológicos [Schüpfer y Huynh, 2008]. En el presente capítulo se hará un breve énfasis en el uso de la SPME para el estudio de VOC, específicamente los BTEX y sus metabolitos, en muestras de importancia medioambiental y bioanalítica.

En la **Figura 1.16** se muestran en detalles los componentes del dispositivo de SPME. Esta técnica de preconcentración emplea diferentes tipos de fibras y su principio de funcionamiento se establece a través de un equilibrio de adsorción-desorción de los analitos desde la muestra hacia el interior de la fibra (adsorción) y posteriormente de la fibra a una disolución donde se desorben para su preconcentración (desorción), o directamente en el inyector del cromatógrafo de gases en el caso de la SPME-GC. Las fibras de polidimetilsiloxanos y poliacrilatos, son las más empleadas para abarcar de forma general un amplio rango de compuestos de acuerdo al peso molecular y la polaridad, desde los volátiles no polares como los BTEX [Ezquerro, 2004], pasando por los semivolátiles como los fenoles [Baclocchi, 2001] y los ácidos carboxílicos de elevada polaridad, siendo estos últimos los de menor aplicación [Fan y Deng, 2002].

Debido a que el mecanismo de extracción para esta técnica se realiza mediante un proceso en equilibrio, es imprescindible la optimización de los parámetros cinéticos tiempo de extracción y desorción, previamente a la aplicación, que permitan los mayores porcentajes de extracción y sobretodo una buena reproducibilidad. Estos parámetros pueden verse afectados por factores como la temperatura, la velocidad de agitado, las características de la muestra en cuanto a su contenido en sal y buffers, entre otros.

En los estudios de optimización de SPME para el análisis de BTEX, fenoles y ácidos carboxílicos aromáticos, los mejores resultados se obtienen en muestras líquidas [Ezquerro y col., 2004] a pH2 y adición de NaCl [van Doorn y col., 1998; Baclocchi y col., 2001]. El efecto de la temperatura en SPME de estos compuestos demuestra que la eficiencia de extracción mayor es alcanzada en el rango 20-30 °C [Huang y col., 1997; Ezquerro y otros, 2004; Lee y otros, 2007]. En general, el análisis de BTEX [Ezquerro y col., 2004; Lee y col., 2007], fenoles [Buchholz y Pawliszyn, 1994; Barták y col., 1997; van Doorn y col., 1998; Baclocchi y col., 2001] y ácidos carboxílicos aromáticos [Fan y Deng, 2002] a través de SPME, como paso de preconcentración, seguido de las técnicas GC, HPLC y ZCE, permite obtener resultados satisfactorios con alta eficiencia de separación, simplicidad, volúmenes de inyección pequeños y tiempos cortos de análisis. Sin embargo, la SPME es una técnica que preferentemente encuentra aplicación para sustancias volátiles y semivolátiles. No obstante, es capaz de analizar matrices complejas tanto medioambientales como los fluidos biológicos, lográndose unos buenos efectos de “clean up” de las muestras, así como elevadas preconcentraciones, que permite con una adecuada selectividad determinar concentraciones en el orden de los ppt.

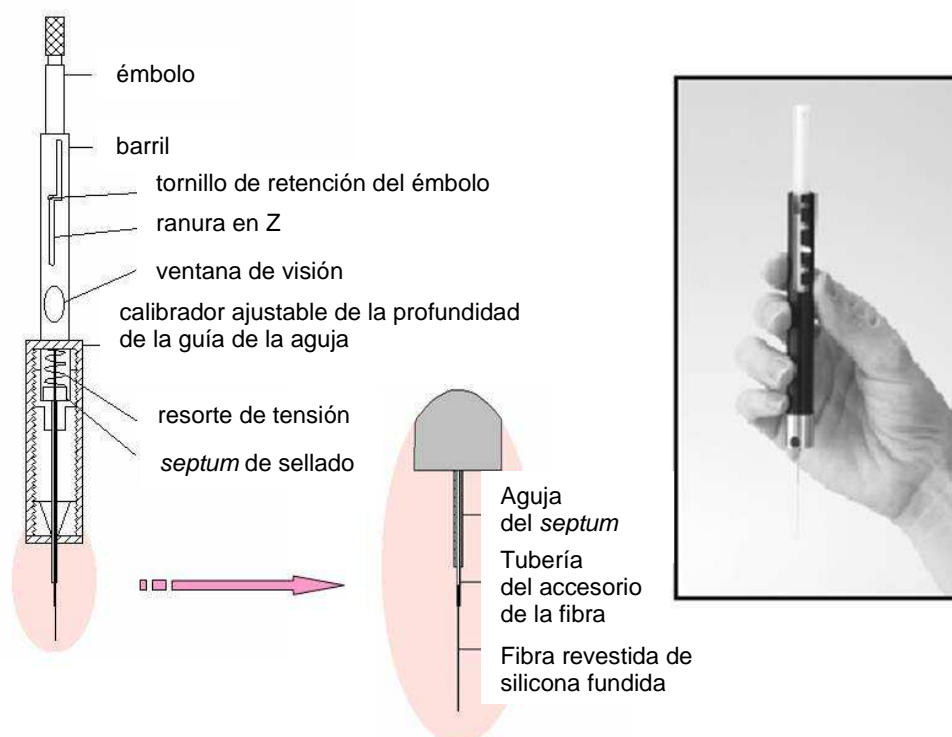


Figura 1.16. Componentes del dispositivo de SPME.

I.2.3.2. Microextracción en fase líquida: su aplicación medioambiental y bioanalítica

La aplicación de membranas líquidas soportadas (SLM) en la preparación de muestras en química analítica fue sugerida por Audunsson [1986]. La técnica de microextracción en fase líquida (LPME) presentada por [Jonsson y Mathiasson, 1992] utiliza una fibra hueca porosa (“hollow fiber”) impregnada con una fase orgánica para crear la membrana líquida soportada (SLM) que en combinación con la HPLC, la GC y la ZCE constituye uno de los más recientes métodos preparativos de muestras complejas con aplicaciones medioambientales y bioanalíticas, así como en la industria farmacéutica y alimenticia [Jonsson y Mathiasson, 1992, 1999a, 1999b, 2000, 2001; Zhu y col., 2001; Rasmussen y Pedersen-Bjergaard, 2004; Pedersen-Bjergaard y Rasmussen, 2005; Lee y col., 2008], debido al alto poder de enriquecimiento que posee, su alta eficiencia en la limpieza de la muestra y bajo consumo de disolvente orgánico. Se utilizan en este caso con preferencia, fibras huecas porosas de polímeros hidrófobos como el polipropileno, cuyos poros son llenados con un disolvente orgánico adecuado para una buena impregnación y formación de la SLM. El método radica en la extracción de los analitos a partir de disoluciones acuosas hacia la SLM, y posteriormente, el analito es re-extraído desde esta a una fase aceptora que se encuentra en el interior de la fibra hueca. Estas SLM consisten en disolventes orgánicos hidrófobos tales como hidrocarburos, éteres y alcoholes de

cadena larga, capaces de sostenerse en los poros de la fibra y ser estables desde unos días hasta meses [Jonsson y Mathiasson, 2001]. Se han utilizado una serie de aditivos para la SLM con el objetivo de aumentar la eficacia y la selectividad de la extracción, posiblemente con cierta disminución en estabilidad de la SLM. La LPME es químicamente similar a una extracción líquido-líquido (LLE) de una muestra acuosa con un disolvente orgánico, seguido de una extracción de esta fase orgánica a una fase acuosa diferente [Jonsson y Mathiasson, 2001]. En la **Figura 1.17** se ilustra una de las variantes de microextracción con el uso de fibras huecas y se detallan los componentes del sistema de membranas **(A)** y un ejemplo de dispositivo empleado en "batch" **(B)**.

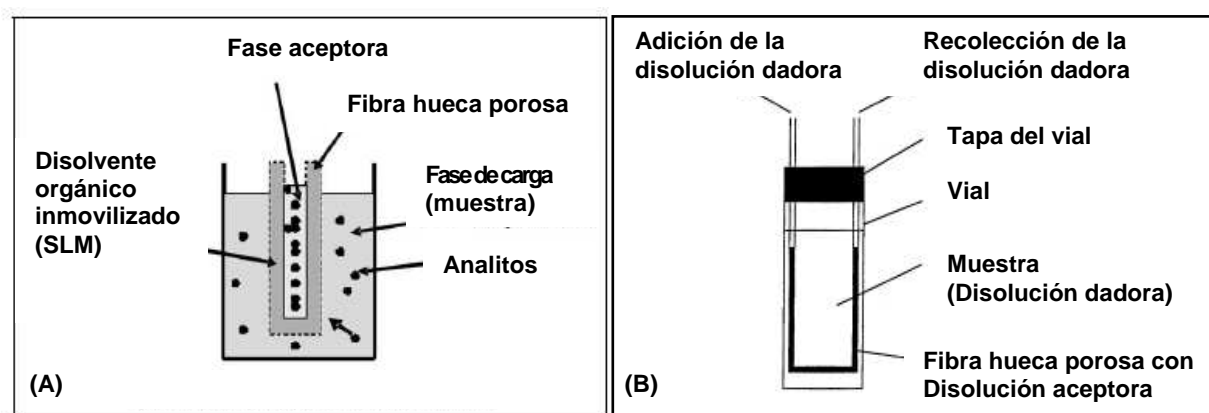


Figura 1.17. Características del sistema de SLM en fibra hueca "hollow fiber" para la LPME.

Estos sistemas de membrana en tres fases, donde una SLM está rodeada por otras dos fases, proporcionan posibilidades de extracción en dos pasos con un alto grado de selectividad ya que en cada paso pueden ocurrir distintos procesos químicos extractivos [Jonsson y Mathiasson, 2001]. Sobre todo, es posible atrapar el analito en la fase aceptora, mediante la formación de especies cargadas que impidan la extracción en sentido inverso hacia la membrana líquida, lo cual provee al sistema de eficientes fuerzas de transporte para la transferencia de masa y conseguir así altos factores de enriquecimiento [Chimuka y col., 1998]. El parámetro fundamental que caracteriza la extracción con SLM es la eficiencia de extracción EE (fracción de moléculas de analito que son recuperadas en la fase aceptora) o lo que es equivalente el factor de enriquecimiento EF (concentración de analitos en la fase aceptora respecto a la fase de carga inicial) los cuales están en función de varios factores como la magnitud del coeficiente de partición K_D del analito entre las fases acuosas y la SLM [Jonsson y Mathiasson, 2000]. Para compuestos con valores de K_D intermedios, la transferencia de masas estaría limitada por el transporte en la fase de carga y para compuestos hidrofóbicos, con altos valores de K_D , la limitación estaría en la recuperación de los analitos en la fase aceptora, ya que la primera extracción hacia la SLM y la permanencia del analito en esta fase estaría favorecida. Por otro lado, para compuestos hidrofílicos como los ácidos carboxílicos y compuestos

fenólicos, con bajos valores de K_D , el analito es insuficientemente extraído hacia la fase orgánica (SLM) y toda la transferencia de masas está limitada por el transporte debido a la difusión a través de la SLM [Jonsson y Mathiasson, 2000]. Por esta razón, la selección de una adecuada SLM es el requisito fundamental para el estudio de ácidos carboxílicos con LPME. Un estudio demostró [Chimuka y col., 2000] que la mayor eficiencia de extracción se obtiene cuando la hidrofobicidad, expresada como coeficiente de partición octanol-agua, es del orden de 10^3 .

En la **Figura 1.18A** se ilustra detalladamente el proceso que ocurre mediante un transporte por gradiente de pH de compuestos con características ácidas, donde el pH de la fase de carga debe ser al menos 3 unidades menor que el pKa del analito que garantice la forma no disociada de las especies [Jonsson y Mathiasson, 2000], mientras que la fase aceptora debe ser una disolución básica [Wodzki y Nowaczyk, 2002], garantizándose con esta diferencia de pH una difusión de los analitos hacia la fase aceptora. Este tipo de transporte, anteriormente descrito, se puede denominar como no facilitado y existen una serie de transportadores utilizados ampliamente en LLE, que añadidos a la fase orgánica facilitan la transferencia de masas para el caso de compuestos carboxílicos altamente hidrofílicos [Wardell y King, 1978]. Estos transportadores incluyen sustancias como los extractantes que forman complejos con los analitos extraídos en la fase orgánica, a través de mecanismos que pueden incluir solvatación por puentes de hidrógeno (**Figura 1.18B**) o formación de pares iónicos (**Figura 1.18C**), lo que aumenta la velocidad del transporte a través de la fase orgánica.

Algunas alternativas de la LPME con fibras huecas soportadas han sido empleadas ampliamente para la recuperación y concentración de ácidos carboxílicos y compuestos fenólicos a partir de diferentes matrices vegetales y medioambientales con el uso de diferentes SLM y adición de transportadores típicos como alquilaminas, alquifosfatos y alquifosfinas, los cuales permiten la formación de complejos solvatados que favorecen la extracción, o también, el caso de aminas cuaternarias (por ejemplo, cloruros de alquilamonio) que forman pares iónicos y favorecen el transporte de especies cargadas [Schlosser y col., 2005].

La LPME presenta muchas ventajas en comparación con la tradicional LLE. En primer lugar, el uso de disolventes orgánicos es muy reducido y normalmente sólo unos pocos microlitros se utilizan para la preparación de la SLM en los poros de la fibra polimérica. En segundo lugar, resulta sencillo para extraer grandes volúmenes de muestra (hasta 1 L) con muy pequeños volúmenes de disolución aceptora (5-25 μL), que permite enriquecer sustancialmente los analitos en una manera conveniente sin la participación de los procedimientos de evaporación del disolvente [Bardstu y col., 2007]. En tercer lugar, porque se realiza una extracción y una re-extracción simultánea de los analitos con diferentes condiciones de pH lo cual proporciona una alta selectividad y permite una excelente limpieza de muestras complejas (efecto "clean up") en muestras medioambientales y fluidos biológicos [Pedersen-Bjergaard y Ramussen, 1999; Zhu y col., 2001]. Además, dado que se transfieren los analitos en una solución acuosa aceptora, esta puede ser directamente inyectada en HPLC o ZCE.

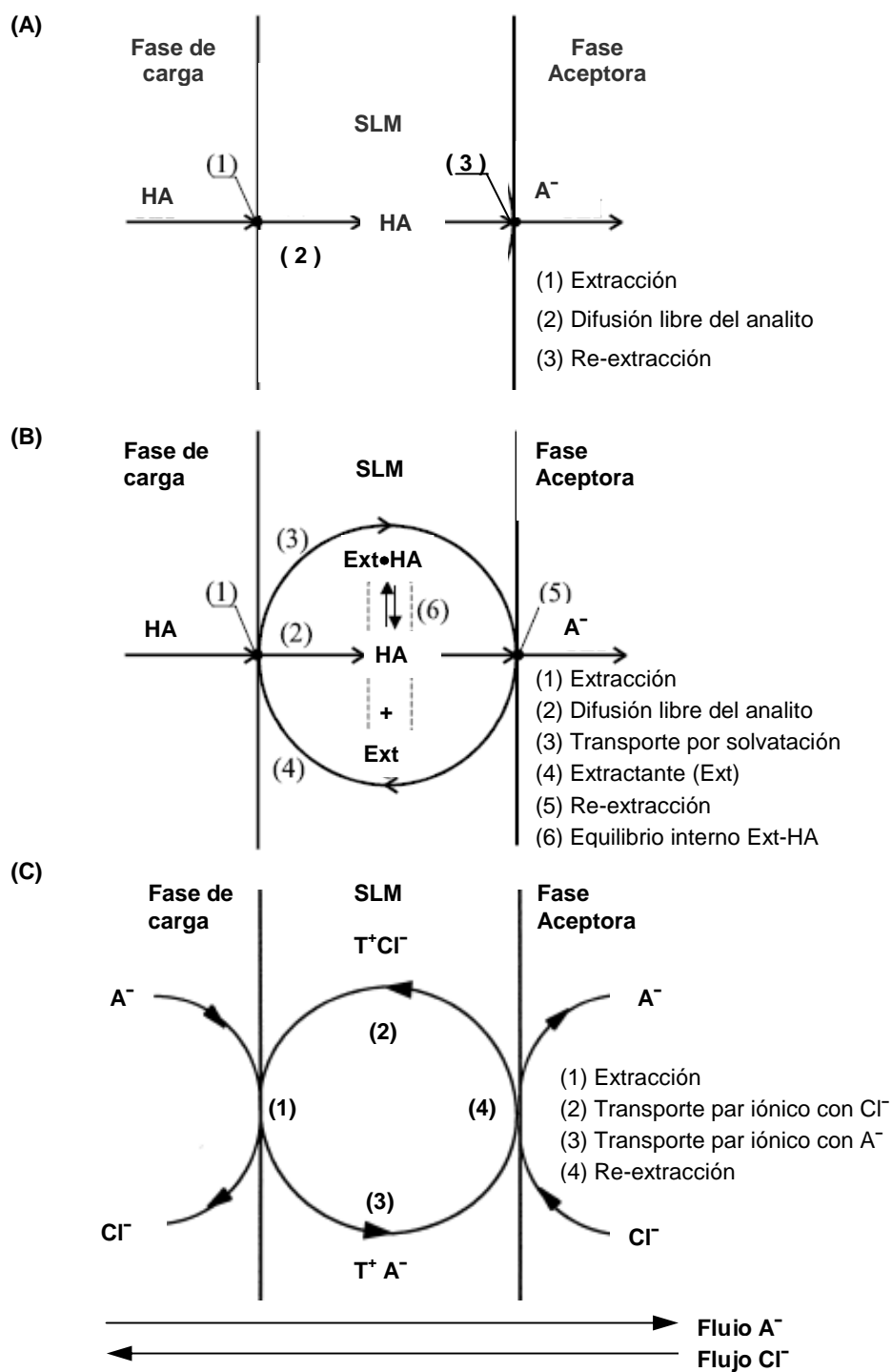


Figura 1.18. Sistema de transportes en SLM durante la LPME. (A): Gradiente de pH en transporte no facilitado, (B): Gradiente de pH en transporte facilitado con extractantes (Ext), (C): Gradiente aniónico con transporte facilitado con transportador catiónico (T⁺).

I.3. BIBLIOGRAFÍA

- Aitio A, Jarvisalo J, **1984**. Biological monitoring of occupational exposure to toxic chemicals. *Pure & Applied Chemistry* 56(4), 549–566.
- Agrawal PK, Jain DC, **1992**. ¹³C NMR spectroscopy of oleanane triterpenoids. *Progress in NMR Spectroscopy* 24: 1-90.
- Amoros M, Simoes CMO, Girre L, Sauvager F, Cormier M, **1992**. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *Journal of Natural Products* 55(12), 1732-1740.
- Aoa CH, Lee SC, Makb CL, Chana LY, **2003**. Photodegradation of volatile organic compounds (VOCs) and NO for indoor air purification using TiO₂: promotion versus inhibition effect of NO. *Applied Catalysis B: Environmental* 42(2), 119-129.
- Armaka M, Papanikolaou E, Sivropoulou A, Arsenakis M, **1999**. Antiviral properties of isoborneol, a potent inhibitor of herpes simplex virus type 1. *Antiviral Research* 43(2): 79–92.
- Arora M, Kennedy BJ, Elhoul S, Pearson NJ, Walker DM, Bayl P, Chan SWY, **2006**. Spatial distribution of lead in human primary teeth as a biomarker of pre- and neonatal lead exposure. *Science of the Total Environment* 371(1-3), 55-62.
- Arthur CL, Pawliszyn J, **1990**. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry* 62(19), 2145-8.
- Audunsson A, **1986**. Aqueous/aqueous extraction by means of a liquid membrane for sample cleanup and preconcentration of amines in a flow system. *Analytical Chemistry* 58, 2714–2723.
- Baclocchi R, Attina M, Lombardi G, Boni MR, **2001**. Fast determination of phenols in contaminated soils. *Journal of Chromatography A* 911(1), 135-141.
- Balunas MJ, Kinghorn AD, **2005**. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences* 78, 431-441.
- Bardstü KF, Ho TS, Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S, Jonsson JA, **2007**. Supported liquid membranes in hollow fiber liquidphase microextraction (LPME) – Practical considerations in the three-phase mode. *Journal of Separation Science* 30, 1364–1370.
- Bare JC, Norris GA, Pennington DW, McKone T, **2003**. The Tool for the Reduction and Assessment of Chemical and Other Environmental. *Journal of Industrial Ecology* 6(3-4), 49-78.
- Barreiros ML, David JM, de Queiroz LP, David JP, **2005**. Flavonoids and triterpenes from leaves of *Erythroxylum mummularia*. *Biochemical Systematics and Ecology* 33, 537-540.
- Barták P, Cap L, **1997**. Determination of phenols by solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A* 767(1+2), 171-175.
- Beauchamp Ch, Fridovich I, **1971**. Superoxide dismutase. Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44(1), 276-87.
- Boogaard PJ, van Sittert NJ, **1996**. Suitability of S-Phenyl Mercapturic Acid and trans-trans-Muconic Acid as Biomarkers for Exposure to Low Concentrations of Benzene. *Environmental Health Perspectives* 104(6), 1151-1157.
- Buchholz KD, Pawliszyn J, **1994**. Optimization of solid-phase microextraction conditions for determination of phenols. *Analytical Chemistry* 66(1), 160-7.
- Budzikiewicz H, Wilson JM, Djerassi Carl, **1963**. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic triterpenes. *J Am Chem Soc* 85(22), 3688-99.

- Butler MS, **2004**. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *Journal of Natural Product* 67(12), 2141–2153.
- Capettini LSA, Campos LVA, dos Santos MH, Nagem TJ, Lemos VS, Cortes SF, **2009**. Vasodilator and antioxidant effect of xanthenes isolated from Brazilian medicinal plants. *Planta Medica* 75, 145-148.
- Carter W, **1994**. Development of ozone reactivity scales for volatile organic compounds. *Journal of the Air and Waste Management Association* 44, 881–899.
- Cervera P, Clapés J, Rigolfas R, **2004**. Alimentación y dietoterapia. McGraw-Hill, Madrid.
- Chang YS, Ku YR, Lin JH, Lu KL, Ho LK, **2001**. Analysis of three lupane type triterpenoids in *Helicteres angustifolia* by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 26(5-6), 849-855.
- Chávez JP, Dos Santos ID, Cruz FG, David JM, **1996**. Flavonoids and triterpene ester derivatives from *Erythroxylum leal costae*. *Phytochemistry* 41(3), 941-943.
- Chimuka L, Megersa N,; Norberg J, Mathiasson L, Jönsson JA, **1998**. Incomplete Trapping in Supported Liquid Membrane Extraction with a Stagnant Acceptor for Weak Bases. *Analytical Chemistry* 70, 3906-3911.
- Chimuka L, Mathiasson L, Jonsson JA, **2000**. Role of octanol–water partition coefficients in extraction of ionisable organic compounds in a supported liquid membrane with a stagnant acceptor. *Analytical Chimica Acta* 416, 77-86.
- Choi ChW, Kim SC, Hwang SS, Choi BK, Ahn HJ, Lee MY, Park SH, Kim SK, **2002**. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science (Shannon, Ireland)* 163(6), 1161-1168.
- Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van Poel B, Pieters L, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D, **1998**. Structure-Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers. *Journal of Natural Products* 61(1), 71-76.
- Costa de Almeida GR, Saraiva MCP, Barbosa FJr, Barbosa FJ, Cury JA, Rosario de S ML, Buzalaf MAR, Gerlach RF, **2007**. Lead contents in the surface enamel of deciduous teeth sampled in vivo from children in uncontaminated and in lead-contaminated areas. *Environmental Research* 104(3), 337-345.
- Cuyckens F, Claeys M, **2004**. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry* 39: 1-15.
- Dadáková E, Procházková E, Krížek M, **2001**. Application of micellar electrokinetic capillary chromatography for quantitative analysis of quercetin in plant materials. *Electrophoresis* 22: 1573-1578.
- Daigle DJ, Conkerton EJ, **1983**. Analysis of flavonoids by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography* 6: 105-118.
- Daigle DJ, Conkerton EJ, **1988**. Analysis of flavonoids by HPLC: an update. *J. Liquid Chromatogr.* 11: 309-325.
- De Bruyne, T, Pieters L, Deelstra H, Vlietinck A, **1999**. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology* 27(4), 445-459.
- De-Eknamkul W, Potduang B, **2003**. Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. *Phytochemistry* 62, 389-398.
- Dey PM, Harborne JB, **1989-1997**. Methods in Plant Biochemistry, in 10 volumes, Academic Press, London.
- Dunnick JK, Hailey JR, **1992**. Toxicity and carcinogenicity studies of quercetin, a natural component of foods. *Fundamental and Applied Toxicology* 19, 423–31.
- Ducrey B, Wolfender JL, Marston A, Hostettmann K, **1995**. Analysis of flavonol glycosides of thirteen *Epilobium* species (Onagraceae) by LC-UV and thermospray LC-MS. *Phytochem.* 38(1): 129-37.

- Edwards R, Jurvelina J, Saarelad K, Jantunena M, **2001**. VOC concentrations measured in personal samples and residential indoor, outdoor and workplace microenvironments in EXPOLIS-Helsinki, Finland. *Atmospheric Environment* 35(27), 4531-4543.
- Ericson JE, Rinderknecht A, Gonzalez EJ, Crinella F,M, Kleinman MT, **2001**. Measurements of Manganese with Respect to Calcium in Histological Enamel Cross Sections: Toward a New Manganese Biomarker. *Environmental Research* 86(1), 46-50.
- Ezquerro O, Ortiz G, Pons B, Tena MT, **2004**. Determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in soils by multiple headspace solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A* 1035(1), 17-22.
- Fan X, Deng Y, **2002**. Separation and identification of aromatic acids in soil and the Everglades sediment samples using solid-phase microextraction followed by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 979(1-2), 417-424.
- Farag RS, Shalaby AS, El-Baroty GA, Ibrahim NA, Ali MA, Hassan EM, **2004**. Chemical and biological evaluation of the essential oils of different *Melaleuca* species. *Phytother. Res.* 18(1): 30–5.
- Gerlach RF, de Souza AP, Cury JA, Line SRP, **2000**. Effect of lead, cadmium and zinc on the activity of enamel matrix proteinases in vitro. *European Journal of Oral Science* 108, 327-334.
- Guimaraes AD, O Carvalho JJ, Gonçalves, Alpendurada MF, **2008**. Simultaneous analysis of 23 priority volatile compounds in water by solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry and estimation of the method's uncertainty. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry* 88(3), 151–164.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, **1989**. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2nd ed., Clarendon Press.: Oxford.
- Harborne JB, **1973-1998**. *Phytochemical Methods: A guide to modern techniques of plant analysis*. Chapman and Hall, London.
- Hasegawa S, Berhow MA, Fong CH, **1996**. *Modern Methods of Plants Analysis*. vol 18, (ed) Springer: New York.
- Huang SD, Cheng ChP, Sung YH, **1997**. Determination of benzene derivatives in water by solid-phase microextraction. *Analytica Chimica Acta* 343(1-2), 101-108.
- Hussein L, Abbas H, **1985**. Nitrogen balance studies among boys fed combinations of faba beans and wheat differing in polyphenolic contents. *Nutrition Reports International* 31, 67-81.
- Jones E, Hughes RE, **1982**. Quercetin, flavonoids and the life-span of mice. *Experimental Gerontology* 17, 213–7.
- Jones AP, **1999**. Indoor air quality and health. *Atmospheric Environment* 33(28), 4535-4564.
- Jones WP, Chin Y-W, Kinghorn AD, **2006**. The role of pharmacognosy in modern medicine and pharmacy. *Current Drug Targets* 7, 247-264.
- Jönsson JA, Mathiasson L, **1992**. Supported liquid membrane techniques for sample preparation and enrichment in environmental and biological analysis. *Trends in Analytical Chemistry* 11, 106–114.
- Jönsson JA, Mathiasson L, **1999**. Liquid membrane extraction in analytical sample preparation: I. Principles *Trends in Analytical Chemistry* 18, 318–325.
- Jonsson JA, Mathiasson L, **1999**. Liquid membrane extraction in analytical sample preparation II. Applications. *Trends in Analytical Chemistry* 18, 325-334.
- Jönsson JA, Mathiasson L, **2000**. Membrane-based techniques for sample enrichment *Journal of Chromatography A* 902, 205–225.
- Jönsson JA, Mathiasson L, **2001**. Membrane extraction in analytical chemistry. *Journal of Separation Science* 24, 495–507.

- Kang D, Amarasiriwardena D, Goodman AH, **2004**. Application of laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS) to investigate trace metal spatial distributions in human tooth enamel and dentine growth layers and pulp. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378(6), 1608-1615.
- Khan MTH, Ather A, Thompson KD, Gambari R, **2005**. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. *Antiviral Research* 67: 107-119.
- Khan HA, **2006**. A Concise Review of Chromatographic Methods for the Analysis of Benzene and its Metabolites. *Croatica Chemica Acta* 79(2), 169-175.
- Kierdorf U, Kierdorf H, **1999**. Dental fluorosis in wild deer: its use as a biomarker of increased fluoride exposure. *Environmental Monitoring and Assessment* 57(3), 265-275.
- Koehn FE, Carter GT, **2005**. The evolving role of natural products in drug discovery. *Natural Review in Drug Discovery* 4, 206–220.
- Kott V, Barbini L, Cruañes M, De D, Muñoz J, Vivot E, Cruañes J, Martino V, Ferraro G, Cavallaro L, Campos R, **1999**. Antiviral activity in Argentine medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 64: 79–84.
- Kurokawa M, Basnet P, Ohsugi M, Hozumi T, Kadota S, Namba T, Kawana T, Shiraki K, **1999**. Anti-herpes simplex virus activity of moronic acid purified from *Rhus javanica* *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Pharmacological Experimental Therapy* 289(1), 72–78.
- Lee Ch-W, Dai Y-T, Chien Ch-H, Hsu DJ, **2006**. Characteristics and health impacts of volatile organic compounds in photocopy centers. *Environmental Research* 100(2), 139-149.
- Lee M-R, Chang Ch-M, Dou J, **2007**. Determination of benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes in water at sub-ng/L levels by solid-phase microextraction coupled to cryo-trap gas chromatography-mass spectrometry. *Chemosphere* 69(9), 1381-1387.
- Lee J, Lee HK, Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S, **2008**. Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: A review. *Analytica Chimica Acta* 624, 253-268.
- Linskens HF, Jackson JF, **1985**. *Modern Methods of Plant Analysis, New Series*. Springer, Berlin.
- Locher CP, Burch MT, Mower HF, Berestecky J, Davis H, Van Poel B, Lasure A, Vanden Berghe DA, Vlietinck AJ, **1995**. Antimicrobial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. *Journal Ethnopharmacology* 49(1): 23–32.
- Magden J, Kääriäinen I, Ahola T, **2005**. Inhibitors of virus replication: recent developments and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66(6), 612-621.
- Marchei E, Joya X, Garcia-Algar O, Vall O, Pacifici R, Pichini S, **2008**. Ultrasensitive detection of nicotine and cotinine in teeth by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22(16), 2609-2612.
- Mathe C, Culioli G, Archier P, Vieillescazes C, **2004**. High-performance liquid chromatographic analysis of triterpenoids in commercial *frankincense*. *Chromatographia* 60(9/10), 493-499.
- Merken HM, Beecher GR, **2000**. Measurement of Foods Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(3): 577-599.
- Moein MR, Khan SI, Ali Z, Ayatollahi SAM, Kobarfard F, Nasim S, Choudhary MI, Khan IA, **2008**. Flavonoids from *Iris songarica* and their antioxidant and estrogenic activity. *Planta Medica* 74, 1492-1495.
- Mølhave L, **1991**. Volatile Organic Compounds, Indoor Air Quality and Health. *International Journal of Indoor Environment and Health* 1(4), 357–376.

- Murtomaa M.; Tervaniemi O-M, Parviainen J, Ruokojärvi P, Tuukkanen, J, Viluksela M, **2007**. Dioxin exposure in contaminated sawmill area: the use of molar teeth and bone of bank vole (*Clethrionomys glareolus*) and field vole (*Microtus agrestis*) as biomarkers. *Chemosphere* 68(5), 951-957.
- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM, **2000**. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Reports* 17, 215-234.
- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM, **2003**. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Product* 66, 1022-1037.
- Nohara T, **2004**. Search for functions of natural oligoglycosides—Solanaceae and Leguminosae origin glycosides *Yakugaku. Zasshi* 124(4): 183-205.
- Nowak B, Chmielnicka J, **2000**. Relationship of Lead and Cadmium to Essential Elements in Hair, Teeth, and Nails of Environmentally Exposed People. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46(3), 265-274.
- Nytoft HP, Bojesen-Koefoed JA, Christiansen FG, Fowler MG, **2002**. Oleanane or lupane? Reappraisal of the presence of oleanane in *Cretaceous-Tertiary* oils and sediments. *Organic Geochemistry* 33(11), 1225-1240.
- Oakenfull DG, Sidhu GS, **1989**. Saponins. In: *Toxicants of plant origin. 2, Glycosides*, edited by P. R. Cheeke, CRC Press. Inc. Florida. 4: 97.
- Osagie AU, **1998**. Antinutritional factors. In: *Natural Quality of Plant Foods*, 221-244.
- Pascual JA, Diaz D, Segura J, Garcia-Algar O, Vall O, Zuccaro P, Pacifici R, Pichini S, **2003A** simple and reliable method for the determination of nicotine and cotinine in teeth by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry RCM* 17(24), 2853-5.
- Paterson I, Anderson EA, **2005**. The renaissance of natural products as drug candidates. *Science* 310, 451-453.
- Pawliszyn, J. *Solid Phase Microextraction, Theory and Practice*, Wiley-VCH, New York, **1997**.
- Pawliszyn, J. (Ed.), *Applications of Solid Phase Microextraction*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1999**.
- Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE, **1999**. Liquid-Liquid-Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry* 71, 2650-2656.
- Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE, **2005**. Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques. *Journal of Chromatography B* 817, 3-12.
- Penton Z., in: S.A. Scheppers-Wercinski (Ed.), *Solid Phase Microextraction, A Practical Guide*, Marcel Dekker, New York, **1999**, p. 27.
- Pereira CAM, Yariwake JH, Lanças FM, Wauters J-N, Tits M, Angenot L, **2004**. A HPTLC Densitometric Determination of Flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and Comparison with HPLC Method. *Phytochemical Analysis* 15, 241-248.
- Piccot SD, Watson JJ, Jones JW, **1992**. A Global Inventory of Volatile Organic Compound Emissions From Anthropogenic Sources, *Journal of Geophysical Research* 97(D9), 9897-9912.
- Rajbhandari M, Wegner U, Julich M, Schopke T, Mentel R, **2001**. Screening of Nepalese medicinal plants for antiviral activity. *Journal of Ethnopharmacology* 74: 251-255.
- Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S, **2004**. Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction. *Trends Analytical Chemistry* 23, 1-10.
- Reusser P, **1996**. Herpesvirus resistance to antiviral drugs: a review of the mechanisms, clinical importance and therapeutic options. *Journal of Hospital Infection* 33, 235-248.
- Rice-Evans C, Miller NJ, Paganga G, **1996**. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20, 933-956.

- Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H, **2002**. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 177, 67–80.
- Santos-Buelga C, Scalbert A, **2000**. Proanthocyanidins and tannin-like compounds: nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of Science and Food Agriculture* 80, 1094–1117.
- Sanz MJ, Ferrandiz ML, Cejudo M, Terencio MC, Gil B, Bustos G, Ubeda A, Gunasegaran R, Alcaraz MJ, **1994**. Influence of a series of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress. *Xenobiotica* 24, 689-699.
- Schlosser S, Kertesz R, Martak J, **2005**. Recovery and separation of organic acids by membrane-based solvent extraction and pertraction. An overview with a case study on recovery of MPCA. *Separation and Purification Technology* 41, 237–266.
- Schmidt TJ, Merfort I, **1993**. Resolution of complex mixture of flavonoid aglycones by analysis of gas chromatographic-mass spectrometric data. *Journal of Chromatography* 634, 350-355.
- Schüpfer PY, Huynh CK, **2008**. Solid Phase Microextraction as a Short-Term Sampling Technique for BTEX Occupational Exposure. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene* 5(8), 490–500.
- Shahat AA, Cos P, De Bruyne T, Apers S, Hammouda FM, Ismail SI, Azzam S, Claeys M, Goovaerts E, Pieters L, Vanden Berghe D, Vlietinck AJ, **2002**. Antiviral and antioxidant activity of flavonoids and proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*. *Planta Medica* 68(6), 539–541.
- Simoës CM, Amoros M, Girre L, **1999**. Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. *Phytotherapy Research* 13(4), 323–328.
- Singh B, Bhat TJ, Singh B, **2003**. Potential Therapeutic Applications of Some Antinutritional Plant Secondary Metabolites. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51, 5579-5597.
- Singleton VL, Rossi JA Jr, **1965**. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16(3), 144-58.
- Slorach SA, **1991**. Measurement of Metabolites as Indicators of Exposure to Chemicals. In: *Methods for Assessing Exposure of Human and Non-Human Biota*, 323-330, John Wiley & Sons.
- Sperlinková I, Dabrowska L, Stransky V, Kučera J, Tichý M, **2004**. Human urine certified reference material CZ 6009: creatinine, styrene metabolites (mandelic acid and phenylglyoxylic acid). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378, 1208–1212.
- Temme EHM, van Hoydonck PG, **2002**. Tea consumption and iron status. *European Journal of Clinical Nutrition* 56, 379–86.
- Tumbiolo S, Gal J-F, Maria P-Ch, Zerbinati O, **2004**. Determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in air by solid phase micro-extraction/gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 380, 824–830.
- Tvinnereim HM, Eide R, Riise T, **2000**. Heavy metals in human primary teeth: some factors influencing the metal concentrations. *Science of the Total Environment* 255(1-3), 21-27.
- Ukeda H, Maeda S, Ishii T, Sawamura M, **1997**. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'-{1-[(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium}-bis(4-methoxy-6-nitro)benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthine oxidase. *Analytical Biochemistry* 251(2), 206-209.
- Ukeda H, Kawana D, Maeda S, Sawamura M, **1999**. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on the reduction of highly water-soluble tetrazolium salts by xanthine-xanthine oxidase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 63(3), 485-488.

- van Doorn H, Grabanski CB, Miller DJ, Hawthorne SB, **1998**. Solid-phase microextraction with pH adjustment for the determination of aromatic acids and bases in water. *Journal of chromatography A* 829(1-2), 223-33.
- Vijayan P, Raghu C, Ashok G, Dhanaraj SA, Suresh B, **2004**. Antiviral activity of medicinal plants of Nilgiris. *Indian Journal Medicine Research*: 120(1), 24–29.
- Vlietinck AJ, Vanden Berghe DA, **1991**. Can ethnopharmacology contribute to the development of antiviral drugs? *Journal of Ethnopharmacology* 32(1-3), 141-53.
- Voirin B, Sportouch M, Raymond O, Jay M, Bayet C, Dangles O, El Hajji H, **2000**. Separation of Flavone C-Glycosides and Qualitative Analysis of *Passiflora incarnata* L. by Capillary Zone Electrophoresis. *Phytochemical Analysis* 11, 90–98.
- Wagner H, Bladt Sabine, **1996**. *Plant drug analysis a thin layer chromatography atlas*. (ed) Springer: New York.
- Wardell JM, King CJ, **1978**. Solvent equilibriums for extraction of carboxylic acids from water. *Journal of Chemical and Engineering Data* 23 (2), 144–148.
- Wodzki R, Nowaczyk J, **2001**. Propionic and acetic acid pertraction through a multimembrane hybrid system containing TOPO or TBP. *Separation and Purification Technology* 26, 207–220.
- Wright, JS, Johnson ER, DiLabio GA, **2001**. Predicting the Activity of Phenolic Antioxidants: Theoretical Method, Analysis of Substituent Effects, and Application to Major Families of Antioxidants. *Journal of the American Chemical Society* 123(6), 1173-1183.
- Yen G-Ch, Chen H-Y, **1995**. Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43(1), 27-32.
- Yu CI, Crump D, **1998**. A review of the emission of VOCs from polymeric materials used in buildings. *Building and Environment* 33(6), 357-74.
- Zhu L, Zhu L, Lee HK, **2001**. Liquid–liquid–liquid microextraction of nitrophenols with a hollow fiber membrane prior to capillary liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 924, 407–414.

OBJETIVOS DE LA TESIS

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos anteriormente, los objetivos de los estudios que se presentan pueden resumirse como sigue:

Establecimiento de metodologías analíticas basadas en técnicas cromatográficas y espectroscópicas para la caracterización específica de los agentes bioactivos (fracciones y/o metabolitos secundarios) en especies de *Erythroxylum* responsables de la actividad biológica demostrada por la práctica etnomédica de estas plantas en Cuba.

Estudio del comportamiento de la quercetina bajo un nuevo procedimiento con el uso de membranas líquidas que puedan conducir a una futura caracterización como agente antinutricional en alimentos de la dieta mediterránea.

Implantación de métodos analíticos de microextracción y separación para el estudio de BTEX y sus metabolitos en dientes humanos que puedan contribuir a una posible correlación entre la exposición ambiental a estas sustancias tóxicas y la salud bucal.

CAPÍTULO II

CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS BIOACTIVOS

DE ESPECIES DE ERYTHROXYLUM

II.1. RESUMEN

En el presente estudio se realizó la identificación de las familias de metabolitos secundarios presentes en las partes aéreas de seis especies de *Erythroxylum* que crecen en Cuba, donde predominaron los polifenoles, tales como los flavonoides. Se determinó la actividad antioxidante a través del contenido de fenoles totales y del poder reductor de extractos de EtOH de estas especies, así como su actividad antiviral frente a un virus de herpes simple tipo 1 de referencia (HSV-1r) y uno aislado (HSV-1a). Se seleccionó la especie *E. minutifolium* por su abundancia, endemismo y mayor actividad biológica de su extracto de EtOH (fenoles totales: 46%, poder reductor: 27,8%, EC50 (HSV-1r)=18,14 µg/mL, EC50 (HSV-1a)=36,88 µg/mL). Se realizó el estudio quimiotaxonómico de los flavonoides mayoritarios en cuatro de estas especies mediante HPLC, lo que permitió una determinación del patrón de flavonoides característico para estas especies (flavonoides de tipo rutinósido de ombuina y quercetina). Se caracterizó la fracción menos polar del extracto bioactivo de *E. minutifolium*, y se identificaron por HPLC-GC-MS ácidos grasos, fitol, ácido benzoico, tocoferol, sitosterol y triterpenos del tipo lanostano, lupano y oleanano. Se llevó a cabo posteriormente el fraccionamiento del extracto bioactivo para aislar los metabolitos secundarios mayoritarios y la evaluación de la actividad antioxidante (fenoles totales, poder reductor y capacidad inhibitoria del radical superóxido) y antiviral (HSV-1r y HSV-1a) de las fracciones obtenidas. Mediante el uso de la cromatografía líquida a vacío y la cromatografía por exclusión molecular, se aislaron tres glicósidos de flavonol: ombuina-3-O-rutinósido-5-O-glucósido (**1**), ombuina-3-O-rutinósido (**2**) y rutina (**3**), un triterpenoide tipo oleanano: palmitato de β-amirina (**4**), un flavano: catequina (**5**) y un fitosterol: β-sitosterol (**6**), mayoritarios en el extracto. El fraccionamiento y los bioensayos permitieron identificar los polifenoles (fracción de taninos, fracción de glicósidos de flavonoides, rutina y catequina) como responsables de la actividad antioxidante del extracto y a su vez permitió la obtención de la fracción responsable de la actividad antiherpética. De esta manera se demostró que la bioactividad del extracto no depende de sus compuestos mayoritarios sino del sinergismo de la mezcla de sus componentes químicos.

II.2. INTRODUCCIÓN

El género *Erythroxylum* se describió por Patrick Browne en 1756 y constituye el más grande e importante género de la familia Erythroxylaceae. El nombre *Erythroxylum* se deriva de la combinación de dos palabras griegas: *erythros* (rojo) y *xylon* (madera), las cuales se refieren a la madera rojiza de algunas especies. Erythroxylaceae, como familia, se describió por vez primera en 1822 [Humboldt y col., 1822] y se ha señalado históricamente como “the Coca family” [Schulz, 1907], debido a que a dicha familia pertenecen las especies *E. coca* Lam. y *E. novogranatense* (Morris) Plowman, ambas con elevada cantidad del alcaloide cocaína. Esta familia pertenece a la clase Magnoliopsida, subclase Rosidae, en el orden Linales. Este orden lo integran 5 familias y unas 550 especies [Cronquist, 1981]; Linaceae y Erythroxylaceae son las dos familias más grandes, en tanto Humiriaceae, Ixonanthaceae y Hugoriaceae son pequeñas. Este género posee la mayor representatividad y diversidad en el Neotrópico, principalmente en Brasil y Venezuela. Las 250 especies conocidas de Erythroxylaceae son árboles de pequeño tamaño y se encuentran distribuidos en regiones tropicales de América del Sur, África, sudeste de Asia y Australia. En las Antillas están descritas 33 especies, de las cuales 23 son endémicas. Cuba posee un total de 22 especies con un 68 % de endemismo, La Española 8 especies, Puerto Rico 5, Jamaica 5, Antillas menores 6 y Bahamas 4 [Oviedo, 2001]. Las especies cubanas del género *Erythroxylum* crecen en suelos cársicos (tipo serpentina) y suelo aluvial, en zonas costeras, precosteras altas y mogotes, preferentemente en ambientes secos y de temperatura elevada. En Cuba existen 7 especies de distribución amplia y entre ellas se destaca el *Erythroxylum minutifolium* Griseb. var. *minutifolium*, especie endémica abundantemente distribuida. Esta especie es del tipo nanofanerófita (tamaño de 0,5-2 m), sus ramas son flexuosas, y sus hojas son leptófilas del tipo coriácea por su diminuto tamaño y consistencia [Oviedo, 2001].

Para el género *Erythroxylum* existen 111 registros de uso etnomédico de alrededor de 15 especies en 12 países, fundamentalmente de Sudamérica (Perú, Ecuador, Colombia y Brasil). Las diferentes especies de *Erythroxylum* se han utilizado para el tratamiento de unos 40 trastornos clínicos [Board of Trustees University of Illinois NAPRALERT (SM) (1975-2003) Database]. Las principales propiedades etnomédicas atribuidas a este género son: estimulante, para la inducción de euforia, contra la fatiga, el alivio de la sensación del hambre, problemas estomacales, cefaleas y dolor de garganta. También las especies de este género se han utilizado contra la fiebre, los desórdenes hepáticos y renales, como anestésico local, afrodisíaco, antihemorrágico, anti-inflamatorio, cicatrizante, entre otras. Los órganos vegetales más utilizados en la medicina tradicional son las partes aéreas (hojas y ramas) y las especies más empleadas son el *E. coca*, *E. coca* var. *coca*, *E. coca*, var. *ipadu*, *E. novogratense* y *E. novogratense* var. *truxillensis*. En general, los métodos de extracción más utilizados son los tradicionales de infusión y de cocción en agua [Board of Trustees University of Illinois NAPRALERT (SM) (1975-2003) Database]. En Cuba se han empleado extractos de estas plantas como antiinflamatorio, para la dermatosis y en el tratamiento de enfermedades

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Introducción

relacionadas con estados virales como la bronquitis y otras afecciones respiratorias [Roig, 1974; Bisse, 1988].

Según estudios anteriores [González y col., 2005] los extractos o fracciones de solo 15 especies del género se han estudiado frente a 30 distintos modelos de ensayos de bioactividad. Las acciones biológicas evaluadas con mayor frecuencia fueron el efecto citotóxico (26,6 %), la actividad antibacteriana (20 %) y la actividad antiviral (13,3 %). Las partes aéreas, de las especies *E. argentinum*, *E. monogynum*, *E. monii* y *E. coca* han sido las más estudiadas en este sentido y los tipos de extractos más comúnmente utilizados para realizar estos ensayos fueron los provenientes de MeOH, H₂O, EtOH y éter de petróleo.

La evaluación de la actividad antimicrobiana es uno de los ensayos biológicos más realizados para estas 15 especies del género. Dentro de los ensayos antimicrobianos se llevaron a cabo 76 ensayos antibacterianos, de los cuales el 23,7% resultaron positivos, se realizaron 12 ensayos frente a hongos, de los que el 58,3% resultaron ser positivos. Frente a virus se describen 5 ensayos y el 60% positivos; para las levaduras, de 5 ensayos realizados, el 20 % dieron positivos y de 4 ensayos antiparasitarios realizados con extractos de estas especies, todos dieron negativos [Board of Trustees University of Illinois NAPRALERT (SM) (1975-2003) Database]. De forma general, a partir de la información de la literatura científica, la actividad antimicrobiana para extractos de especies del género no es muy importante. Sin embargo, como el número de especies y de ensayos realizados en estos estudios es pequeño, no resulta concluyente un criterio definitivo acerca del potencial antimicrobiano del género. Por otra parte, como para 10 extractos de diferentes especies, el 20% resultó ser citotóxico, también a partir de esta información, es probable que los extractos de estas plantas no representen un peligro para la destrucción de las células.

Hasta la actualidad existen escasos estudios de la actividad antioxidante realizada a especies del género *Erythroxylum*. Extractos de *E. macrocarpum* y *E. sideroxyloides* demostraron tener una actividad potente como secuestradores de radicales, así como una fuerte inhibición de la peroxidación lipídica [Neergheen y col., 2007; Soobrattee y ol., 2008]. Dentro de las especies que crecen en Cuba, el *E. minutifolium* y el *E. confusum* mostraron también una significativa inhibición de la peroxidación lipídica [Rodeiro y col., 2008]. En estos estudios, las propiedades antioxidantes de los extractos han estado relacionadas con la presencia de grandes cantidades de polifenoles y triterpenos. La acción antioxidante de extractos de plantas ha estado relacionada con la presencia de grupos de metabolitos del tipo polifenol tales como flavonoides, xantonas, ácidos fenólicos y taninos [Sanz y col., 1994; Rice-Evan y col., 1996; De Bruyne y col., 1999b; Moein y col., 2008; Capettini y col., 2009]. Los polifenoles presentan una estructura ideal para interceptar y reaccionar con radicales libres mediante mecanismos de transferencia de protones o de electrones [Wright y col., 2001]. Además, estas moléculas pueden reaccionar como inhibidores de enzimas tales como la xantina oxidasa (XO), la cual es considerada una fuente importante de radicales superóxido (O₂[•]) [Cos y col., 1998]. Este y otros radicales de tipo especie reactiva de oxígeno inducen daño a biomoléculas (lípidos, proteínas,

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Introducción

carbohidratos y ácidos nucleicos), lo cual está relacionado con algunas enfermedades degenerativas [Halliwell, 1994].

Por otro lado, el estudio de la actividad antiviral de extractos de especies del género se ha concentrado fundamentalmente frente al virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1). De un total de 6 ensayos antivirales, 4 de ellos se realizaron frente a este virus [Hattori y col., 1995; Lohezic y col., 1999; Fortin y col., 2002], un ensayo frente al virus vaccinia [Bhakuni y col., 1988] y uno de inhibición de la proteasa del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) [Matsuse y col., 1999]. En la **Tabla 2.1** se resume el potencial antiviral encontrado, según la literatura científica, para algunas especies del género *Erythroxylum*. Según se muestra en la **Tabla 2.1**, los extractos polares de las partes aéreas de cuatro especies estudiadas presentan un potencial anti-HSV-1 significativo, con valores de concentración efectiva media EC₅₀ ≥ 100 µg/mL y para las especies del género que crecen en Cuba existe escasa información de actividad biológica. Las infecciones herpéticas son comunes en los humanos y son responsables del herpes labial y genital, la queratitis y la encefalitis. Los extractos de plantas y un gran número de metabolitos secundarios como los polifenoles, terpenos y glicósidos han demostrado ser fitomedicamentos alternativos eficaces [Khan y col., 2005; Cos y col., 2008].

Tabla 2.1. Resultados de ensayos antivirales en especies del género *Erythroxylum*.

Especie	Parte de la planta	Tipo de extracto	Resultado de actividad antiviral
<i>E. kunthianum</i>	hojas y ramas	EtOH-H ₂ O(1:1)	Vaccinia 50 µg/mL (inactivo)
<i>E. citrifolium</i>	ramas	H ₂ O	VIH proteasa IC ₅₀ 43 µg/mL (activo)
		MeOH	HSV-1 dosis: 100 mg/kg (activo)
<i>E. lucidum</i>	hojas	MeOH	HSV-1 100 µg/mL (activo)
<i>E. laurifolium</i>	hojas y ramas	Me ₂ CO-H ₂ O (7:3)	HSV-1 100 µg/mL (dudoso)
	hojas y ramas	MeOH	HSV-1 125 µg/mL (activo)

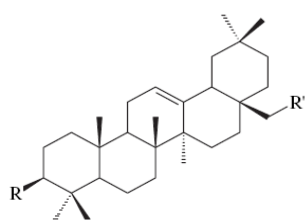
Se ha estudiado aproximadamente, la composición química de 56 especies del género [Board of Trustees University of Illinois NAPRALERT (SM) (1975-2003) Database], así como su quimiotaxonomía [Hegnauer, 1981]. Recientemente, un análisis de Bases de Datos realizado [González y col., 2005] demostró que los principales metabolitos secundarios presentes en estas especies son alcaloides del tipo tropano (54,7 %), para el cual la cocaína constituye el compuesto representativo de esta familia de metabolitos [Griffin y Lin, 2000]; los terpenoides (23,3 %) del tipo diterpeno y triterpeno, los flavonoides (19,8 %), entre los cuales se destacan los de tipo flavonol y otros grupos químicos (2,2 %) de tipo polifenol, como taninos condensados [Kolodziej y col., 1991; Hansen y col. 1996; Lohezic y col., 1999], pterocarpanos [Dos Santos y col. 2003] y acetofenonas [Kanchanapoom y col., 2005]. Los estudios fitoquímicos de este género se han efectuado en diversas regiones del mundo, donde se destacan países como Perú, Brasil, Mauritania, Bolivia y Zambia. Las

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Introducción

especies más estudiadas han sido el *E. coca*, *E. coca* var. *coca*, *E. zambesiacum*, *E. hypericifolium* y *E. monogynum*, y en menor grado las especies *E. australe*, *E. novogratense* var. *truxillense*, *E. pictum*, *E. argentinum*, *E. rotundifolium* y *E. rufum*. En la mayoría de estas especies el aislamiento de metabolitos secundarios se realizó a partir de hojas y corteza [González y col., 2005]. Algunas investigaciones realizadas en Cuba han contemplado el análisis fitoquímico de 12 especies nativas del género *Erythroxylum* [Dominicis y Fernández, 1991, 1995; Fernández y col., 1995; Payo y col., 1996, 2000; Cazaña y col., 2004], aunque, en su mayoría, han sido estudios de tamizado fitoquímico. En estos estudios se detectó la presencia de alcaloides, taninos, aminas, saponinas, fenoles simples y terpenoides en las especies investigadas.

Dentro de la familia de los terpenoides, los diterpenos y triterpenos son los más abundantes en el género [González y col., 2005]. Los triterpenos pentacíclicos (C₃₀) constituyen los triterpenos más representativos y se han aislado de 4 especies de *Erythroxylum* [Board of Trustees University of Illinois NAPRALERT (SM) (1975-2003) Database]. Los triterpenos característicos del género presentan como estructuras básicas el oleanano y el lupano. Estos triterpenos tienen como característica estructural el hecho de encontrarse en forma de ésteres de ácidos grasos, generalmente palmítico y esteárico (**Figura 2.1**) [Chávez y col., 1996; Barreiros y col., 2005; González y col., 2008], aunque pueden presentarse también en su forma libre [Iñigo y Pomilio, 1984; Barreiros y col., 2002]. La cadena del éster del ácido graso se encuentra generalmente enlazada a la posición 3 del triterpeno. Ambos compuestos presentan estructuras pentacíclicas; el lupano constituido por 4 anillos de 6 miembros y uno de 5 miembros, mientras que el oleanano está formado por 5 anillos de 6 miembros. Estos metabolitos se biosintetizan por la planta a través de la ruta del acetil coenzima A y su base esqueletal establecida a partir de la ciclación del escualeno, el cual se identificó en la especie *E. argentinum* [Iñigo y Pomilio, 1984].



- 1: R = OH; R' = H
- 2: R = OCO(CH₂)_nCH₃; R' = H (n14 y n16)
- 3: R = OCO(CH₂)_nCH₃; R' = OH (n14 y n16)
- 4: R = OCO(CH₂)₁₄CH₃; R' = COOH

Figura 2.1. Algunos triterpenos de tipo oleanano característicos del género *Erythroxylum*. Amirina (1), palmitato y estearato de amirina (2), palmitato y estearato de eritrodiool (3), palmitato del ácido oleanólico (4).

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Introducción

En cuanto a los polifenoles en el género, más del 50 % de los flavonoides aislados son de tipo flavonol [González y col., 2005], y en menor medida se han identificado flavononas [Bohm y col., 1981, 1988; Johnson y col., 1997], flavanos [Kolodziej y col., 1991; Hansen y col. 1996; Chávez y col., 1996], isoflavonas [Johnson and Schmidt, 1999], flavonas [Chávez y col., 1996] y chalconas [Dos Santos y col., 2003]. Existe mucha información de flavonoides identificados en las partes aéreas de especies de *Erythroxylum* [Paris y Delaveau, 1963; Bohm y col., 1981, 1982, 1988; Iñigo y Pomilio, 1984, 1985; Bonefeld y col., 1986; Iñigo y col., 1988] y algunos de estos compuestos son marcadores quimiotaxonómicos para especies del género [Bohm y col., 1988; Johnson y col., 1997, 1998, 2002, 2003; Johnson y Schmidt, 1999, 2004]. Los flavonoles constituyen el grupo más representativo en el género [Hegnauer, 1981], y en la gran mayoría de los casos aparecen en forma de 3-O-monoglicósidos de glucosa, galactosa, arabinosa, xilosa y ramnosa, y como 3-O-diglicósidos con varias combinaciones de estos azúcares. El kaempferol (4',5,7 hidroxiflavonol) y la quercetina (3',4',5,7 hidroxiflavonol) son los aglicones mayoritarios de los flavonoles de *Erythroxylum* [Bohm y col., 1988]. Sin embargo, otros tipos de flavonoides como los 3',4' y 7-O-monoglicósidos de taxifolina, fisetina, luteolina, eriodictiol y dihidrokaempferol se han caracterizado en hojas de coca [Jonhson y col., 1997, 1998], por lo que no se ha de descartar la presencia de estos compuestos en los extractos de *Erythroxylum*. En la **Figura 2.2** se ilustran algunas estructuras anteriormente mencionadas.

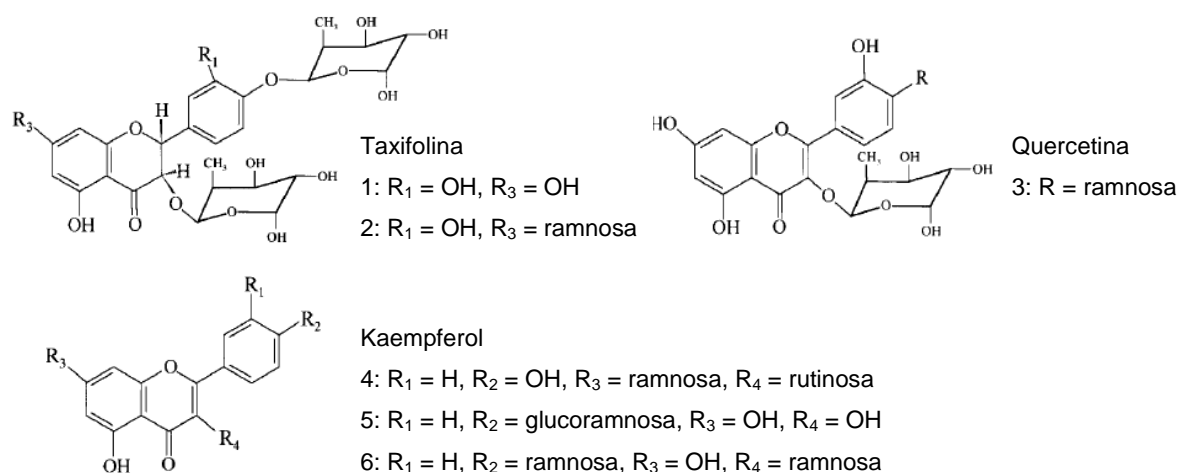


Figura 2.2. Algunas estructuras de flavonoides tipo flavonol característicos del género *Erythroxylum*. Taxifolina 3',5,7-trihidroxi-4',3-diramnósido (1), taxifolina 3',5-dihidroxi-4',3,7-triramnósido (2), quercetina-3-ramnósido (3), kaempferol 4',5-dihidroxi-3-rutinósido-7-ramnósido (4), kaempferol 3,5,7-trihidroxi-4'-glucoramnósido (5), kaempferol-5,7-dihidroxi-4',3-diramnósido (6).

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Introducción

Como ya se conoce, muchas de las enfermedades degenerativas, infecciosas y crónicas del hombre actual vienen originadas por procesos oxidativos que se suceden en el organismo debido a un incremento de los niveles de radicales libres derivado del estilo de vida moderno. Por otro lado, y en relación con las enfermedades virales, la infección por HSV-1 en particular ha sido tratada con éxito mediante el acyclovir [Whitley y col., 1991], pero se ha encontrado una resistencia de cepas del virus después del tratamiento con medicamentos sintéticos de este tipo [Kimberlin y col., 1998]. Este panorama indica que la búsqueda de productos naturales antioxidantes así como nuevos agentes antiherpéticos es necesaria con urgencia. En este sentido, las especies del género *Erythroxylum* podrían constituir una fuente importante de fitomedicamentos debido a la valiosa composición química que poseen en metabolitos secundarios potencialmente antioxidantes y antivirales. Por estas razones, en el presente estudio se describe la caracterización de la actividad antiherpética y antioxidante de especies de *Erythroxylum* que crecen en Cuba, así como una caracterización química del extracto de la especie más activa dirigida por bioensayos en la búsqueda de agentes bioactivos que puedan ser empleados con fines terapéuticos. De esta manera se establece además una metodología analítica que permita realizar este tipo de estudios en otras especies dentro y fuera del género *Erythroxylum*.

II.3. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los antecedentes descritos, el objetivo del presente estudio es la caracterización de extractos vegetales de especies cubanas del género *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) con el uso de metodologías analíticas separativas para la obtención de los extractos y los compuestos con actividad antioxidante y antiviral. Este objetivo se desarrollará a través de las siguientes etapas:

1. Selección de la especie de *Erythroxylum* que resulte de interés a partir de métodos de tamizado fitoquímicos y farmacológicos *in vitro*.
2. Caracterización química del extracto de mayor actividad biológica.
3. Obtención de los metabolitos secundarios mayoritarios para el estudio quimiotaxonómico.
4. Instrumentación del método de fraccionamiento a partir del extracto más activo para la evaluación antioxidante y antiviral de sus diferentes fracciones.
5. Obtención de los metabolitos secundarios presentes en el extracto activo mediante el empleo de técnicas separativas clásicas y modernas.
6. Caracterización estructural de los diferentes metabolitos aislados con la utilización de técnicas espectroscópicas.
7. Evaluación de la actividad antioxidante y antiviral de los metabolitos secundarios aislados.

Hipótesis

Los métodos separativos actuales constituyen herramientas analíticas útiles para el estudio de caracterización fitoquímica y farmacológica de extractos de especies de *Erythroxylum* que crecen en Cuba como fuentes de agentes antioxidantes y antivirales naturales.

II.4. PARTE EXPERIMENTAL

La exposición de este capítulo corresponde al desarrollo metodológico del estudio realizado, el cual está ordenado en las siguientes etapas: recolección y preparación del material vegetal, metodologías y técnicas utilizadas en el estudio fitoquímico de las especies y metodologías empleadas en la evaluación de la actividad biológica de las especies.

II.4.1. Recolección y preparación del material vegetal

Las partes aéreas de las especies de *Erythroxylum* fueron recolectadas en la provincia de Pinar del Río (Cuba) entre los años 2001 y 2003. Para cada estudio se especifica la fecha de recolección. Las muestras vegetales se depositaron en el herbolario del Instituto Pedagógico de Pinar del Río con los siguientes códigos:

E. havanense Jacq. (9207), *E. alaternifolium* var. *alaternifolium* (9201), *E. suave* Lunan. (9209), *E. areolatum* Linn. (9279), *E. minutifolium* Griseb. var. *minutifolium* (9200) y *E. confusum* Britt. (9191). Todas las especies se identificaron por la Dra. Ramona Oviedo del Instituto de Ecología y Sistemática (Cuba). Las partes aéreas se secaron a la sombra, se molieron y almacenaron en lugar seco a temperatura ambiente.

II.4.2. Análisis fitoquímico de especies de *Erythroxylum*

En el presente capítulo se procede a describir las metodologías y técnicas empleadas en el análisis fitoquímico de las muestras vegetales, las cuales se ordenan de la siguiente manera: tamizado fitoquímico de las especies, estudio de sus flavonoides mayoritarios y caracterización química del extracto de *E. minutifolium*.

II.4.2.1. Tamizado fitoquímico

El cribado fitoquímico se realizó a partir de una modificación del método reportado por Chhabra y col. [1984]. Para ello se emplearon las muestras vegetales recolectadas en Abril del 2001. El procedimiento consistió en la preparación de tres extractos en la proporción material vegetal: disolvente de 1:10 (g/mL). El primer extracto se preparó por suspensión del material vegetal en n-hexano (p.a., Merck, Alemania) y reflujo de la mezcla durante 30 min. Después de enfriar a temperatura ambiente y decantar, se separó el extracto (extracto en n-hexano) del material vegetal insoluble. A este último se le adicionó un volumen de EtOH (clase A, 95%, Centro de Química

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Parte Experimental

Farmacéutica, CQF, Cuba) y se procedió como en el caso anterior, para obtener el extracto etanólico. Por último, a partir del residuo del material vegetal extraído con n-hexano y EtOH se obtuvo el extracto acuoso (agua bidestilada, CQF, Cuba).

Luego de la preparación de estos extractos, se realizaron los diferentes ensayos mediante reacciones de identificación, a través de la aparición de color o precipitado característicos, para determinar la presencia de los grupos de metabolitos secundarios: flavonoides, polifenoles, alcaloides, azúcares reductores, lactonas/cumarinas, triterpenos/esteroides, glicósidos cardiotónicos, quinonas, lípidos/aceites esenciales, carotenoides, saponinas, aminas, mucílagos [Farnsworth, 1966; Chhabra y col., 1984] en cada muestra investigada.

II.4.2.2. Estudio de flavonoides mayoritarios

II.4.2.2.1. *Aislamiento de flavonoides mayoritarios*

Las hojas secas y molidas (480 g) de *E. minutifolium* (Julio 2002) se sometieron a extracciones sucesivas por Soxhlet a partir del mismo material vegetal sólido de partida con el uso de disolventes de diversa polaridad. Primero con n-hexano, luego el residuo con CHCl_3 y el residuo resultante con EtOH (calidad p.s., CQF, Cuba). Se obtuvieron rendimientos de 5,47; 3,98 y 65,66 g, respectivamente (**Figura 2.3**) para un solo experimento. Se tomaron 12 g del extracto etanólico y se sometieron a una extracción con la mezcla BuOH:H₂O (1:1). De esta extracción, la fracción orgánica (5 g) se separó en una columna de Sephadex LH-20 por cromatografía por exclusión molecular (MEC) con el empleo de EtOH como eluyente. Se recolectó un total de 20 fracciones, las que se analizaron por TLC, con el uso de BuOH-HOAc-H₂O (BAW, 60:25:15) como fase móvil. A partir de las fracciones 6, 8 y 12 se obtuvieron, por recristalización en EtOH, 22,1 mg de **1**, 164,3 mg de **2** y 151,3 mg de **3**. A continuación, se muestra el esquema de esta separación de flavonoides.

II.4.2.2.2. *Análisis cuantitativo de flavonoides*

Reactivos y preparación de muestras

La quercetina se utilizó de la firma Merck (Darmstadt, Alemania) y el resto de los flavonoides fueron aislados de las hojas *E. minutifolium*. El análisis de la pureza y la identificación estructural se realizó previamente por espectrofotometría ultravioleta (UV) y resonancia magnética nuclear (NMR). Todos los disolventes y ácidos empleados se utilizaron de Merck (Darmstadt, Alemania): MeOH (puro y grado HPLC), DMSO y H₃PO₄ (85%). A partir de 1g de material vegetal seco (Mayo 2003, excepto *E. minutifolium*: Abril 2001 y Julio 2002) se extrajo con MeOH-H₂O (8:2) por 24 h dos veces a

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Parte Experimental

temperatura ambiente. La mezcla se filtró a través de un embudo Büchner. El proceso de extracción se repitió dos veces más con MeOH-H₂O (1:1). Los cuatro filtrados se combinaron y concentraron en rotroevaporador a 40 °C. El volumen de extracto se ajustó a 30 mL y se filtró previo análisis por HPLC.

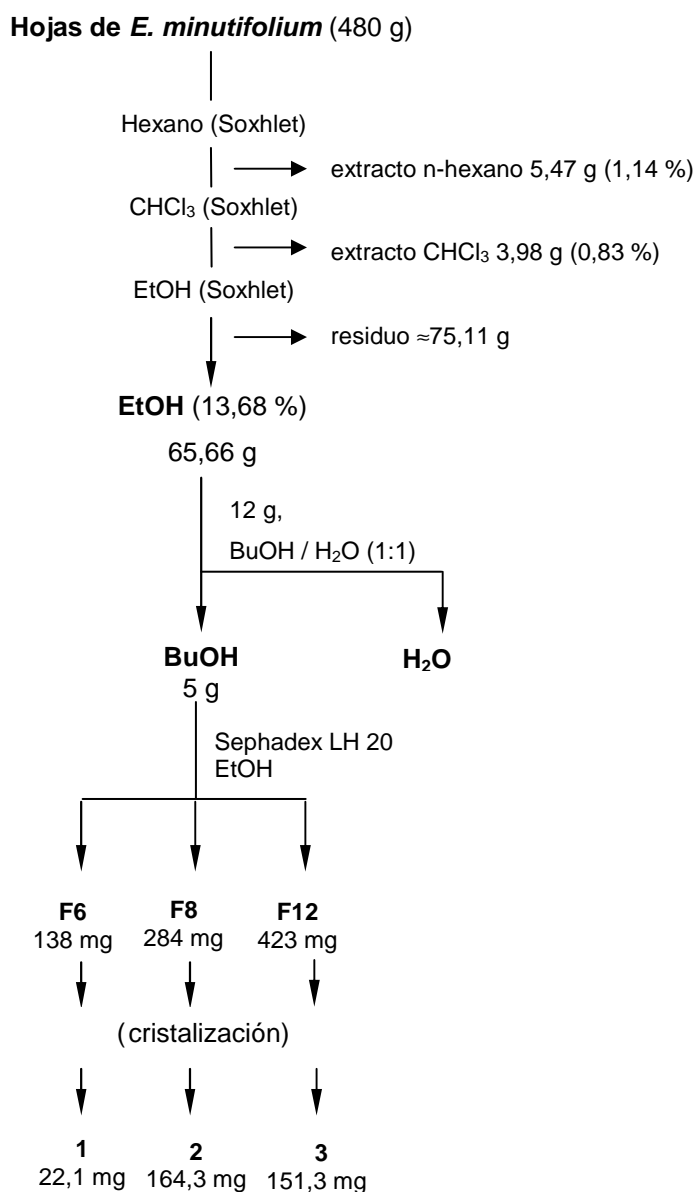


Figura 2.3. Ruta general de aislamiento de metabolitos secundarios mayoritarios. Uso de la cromatografía por exclusión molecular (MEC).

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Parte Experimental

Condiciones cromatográficas

El sistema HPLC consistió en un cromatógrafo Merck-Hitachi (Darmstadt, Germany), equipado con una bomba cuaternaria de baja presión modelo L-7100, un *loop* de 20 μ L y un detector UV de longitud de onda variable modelo L-7400 (Merck-Hitachi, Darmstadt, Germany) que se fijó a 354 nm. La separación cromatográfica se desarrolló en una columna Hypersil ODS C₁₈ (10 μ m, 250 x 4,0 mm, Knauer) a temperatura ambiente. Para la fase móvil, 30 % MeOH en H₂O con 1 % de H₃PO₄ (Panreac, España) se empleó como eluyente A, y MeOH como eluyente B. Se estableció el siguiente gradiente: 25% B durante 5 min; 5-10 min, hasta 80% B; 10-15 min, y retorno a 25 % B hasta un tiempo final de 20 min. El flujo se estableció constante a 1 mL/min.

Identificación y pureza de los picos

La mezcla de patrones (flavonoides aislados) se preparó en DMSO a la concentración aproximada de 0,5 mg/mL y se almacenó protegido de la luz a -20°C. Las disoluciones se prepararon cada día mediante la dilución de 0,5 mL de la mezcla de patrones con 2 mL de MeOH. Cada compuesto se identificó por comparación de los tiempos de retención y espectros UV obtenidos a partir de cada pico en el cromatograma de la muestra respecto a la mezcla de patrones.

Análisis cuantitativo

Para la construcción de curvas de calibrado, la mezcla de patrones se diluyó hasta los rangos de concentración apropiados. Las curvas de calibrado se obtuvieron mediante el análisis por triplicado de patrones a tres niveles de concentración (0,5; 0,25 y 0,1 mg/mL). La determinación cuantitativa se llevó a cabo por el método de la curva de calibrado con una mezcla de patrones de concentración conocida (0,125 mg/mL), la cual se analizó por duplicado antes y después del análisis de las muestras reales. Las muestras se analizaron por triplicado y el área de los picos se utilizó para calcular el contenido de cada flavonoide en las muestras vegetales.

II.4.2.3. Análisis de la fracción menos polar del extracto EtOH de *E. minutifolium*

Reactivos y material vegetal

Las hojas de la especie *E. minutifolium*, fueron recolectadas en la provincia de Pinar del Río (Cuba) en Julio de 2002. Se utilizaron los disolventes y gases: MeCN (Merck, Alemania), H₂O y He, todos con calidad para cromatografía analítica.

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Parte Experimental

Condiciones cromatográficas

HPLC: En la separación por HPLC se empleó un equipo Konik 550C (BCN, España) con una columna Polygosil C18 250x2,6 mm y diámetro interno de 5 μm , un volumen de inyección de 20 μL , detección UV a 210 nm (0-5 min) y 354 nm (5-20 min), un flujo constante de 2 mL/min, una temperatura de la columna de 30°C, y como fase móvil A: H₂O, B: MeCN con un gradiente de: 100% B (0-5 min), 20% B (10-13 min), 100% B (15-20 min).

Interfase: Se empleó una interfase K2 (Konik) para el acoplamiento HPLC-GC con 1 cm de adsorbente Tenax (TA 80-100 mesh), una transferencia HPLC-GC de 1 min (0,5-1,5 min del cromatograma de HPLC) a un flujo de He a 1000 mL/min, un volumen de transferencia de 2 mL, una temperatura de adsorción de 80°C (1min), una temperatura de desorción de 250°C (5 min) y un tiempo de eliminación del disolvente en la interfase de Tenax de 5 min.

GC-MS: Para la separación por GC, se empleó un equipo Konik MS Q12 QUADRUPOLE (BCN, Spain), provisto de una columna J&W DB-WAX 30 m, 0,25 mm, 0,25 μm , como gas portador He a 1,2 mL/min, la inyección se realizó en modo Splitless a 250°C, un gradiente de temperatura de 40°C durante 2 min; 30°C/min hasta 120°C; 2,8°C/min hasta 250°C y 250°C hasta un tiempo final de 70 min. Respecto a la detección por MS: un modo de ionización de impacto electrónico EI(+), una energía del electrón de 70 eV, la temperatura de la fuente a 120 °C, una temperatura de transferencia de 250 °C y un rango de masas de m/z 40-460 a una velocidad de 600 ms/ion; 100 ms/ion (SIM).

En la siguiente **Figura 2.4** se ilustra el equipo HPLC-GC-MS, empleado en el análisis de la fracción apolar del extracto EtOH de *E minutifolium*.



Figura 2.4. Equipo Konik HPLC-GC-MS utilizado en el estudio de la fracción apolar a partir del extracto total de EtOH de la especie *E. minutifolium*.

II.4.2.4. Fraccionamiento del extracto EtOH de *E. minutifolium*

Se pesaron 300 g de hojas secas y trituradas de la especie *E. minutifolium* (Julio 2002). Al material vegetal se le realizó una extracción en Soxhlet con EtOH (95 %, CQF, Cuba) durante 24 h. Los líquidos orgánicos de extracción se concentraron por destilación y se les añadió 5 veces el volumen de Me₂CO (p.s., CQF, Cuba) con la obtención de una fracción **A** y la aparición de un precipitado (fracción **B**). Se separó el sólido de la mezcla de Me₂CO-EtOH y se concentró nuevamente para repetir el paso de precipitación hasta la no aparición de sólido. Para **B** se realizó un análisis de taninos condensados (proantocianidinas) por TLC con la fase móvil tolueno-Me₂CO-HOAc (3:7,5:1) y vainillina al 1% en HCl (70 %) como revelador. La mezcla resultante de Me₂CO-EtOH (fracción **A**) se concentró, se le añadieron 5 volúmenes de CHCl₃ (p.s., CQF, Cuba) y se dejó reposar por 24 h (fracción **C**). Pasado este tiempo se separó el precipitado obtenido (fracción **D**) por filtración al vacío. Las aguas madres (fracción **C**) se concentraron y se repitió el paso de precipitación con CHCl₃ hasta la no aparición de sólido. Se realizó una MEC en Sephadex LH20 y EtOH como fase móvil, a partir de **D**. Se obtuvieron 3 fracciones fundamentales, las cuales se concentraron y se dejaron en reposo. Se obtuvieron por recristalización los compuestos **1** (18,8 mg), **2** (139,6 mg) y **3** (128,6 mg). A partir de **C** se realizó una cromatografía líquida a vacío (DFC) con el uso de gradientes de hexano-AcOEt con incrementos del 5 % y 10 % hasta la relación 1:1. Se continuó con un gradiente de CHCl₃-MeOH con incremento del 10 % hasta la relación 7:3, y finalmente se realizó un lavado con MeOH. Se unieron las fracciones por similitud cromatográfica. Las 27 fracciones obtenidas se concentraron y se dejaron en reposo. De la fracción 1 y 2 cristalizaron 54,6 mg del compuesto **4**. Otras tres fracciones se sometieron a un estudio ulterior con el empleo de las técnicas DFC y MEC. La fracción 21 se sometió a una DFC con gradientes de CHCl₃/MeOH (9:1 y 8:2), AcOEt y AcOEt/MeOH (1:1). La segunda fracción obtenida se eluyó por MEC con CHCl₃/MeOH (7:3) y MeOH para obtener en la quinta fracción 27 mg del compuesto **5**. A partir de las fracciones 11 y 12, se obtuvieron 112,3 mg del compuesto **6**, con el uso de gradientes de hexano-AcOEt (95:5) a (8:2) con incrementos del 5 %, AcOEt y AcOEt-MeOH (8:2).

El esquema general del procedimiento realizado en un solo experimento y descrito anteriormente se muestra en la **Figura 2.5**.

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Parte Experimental

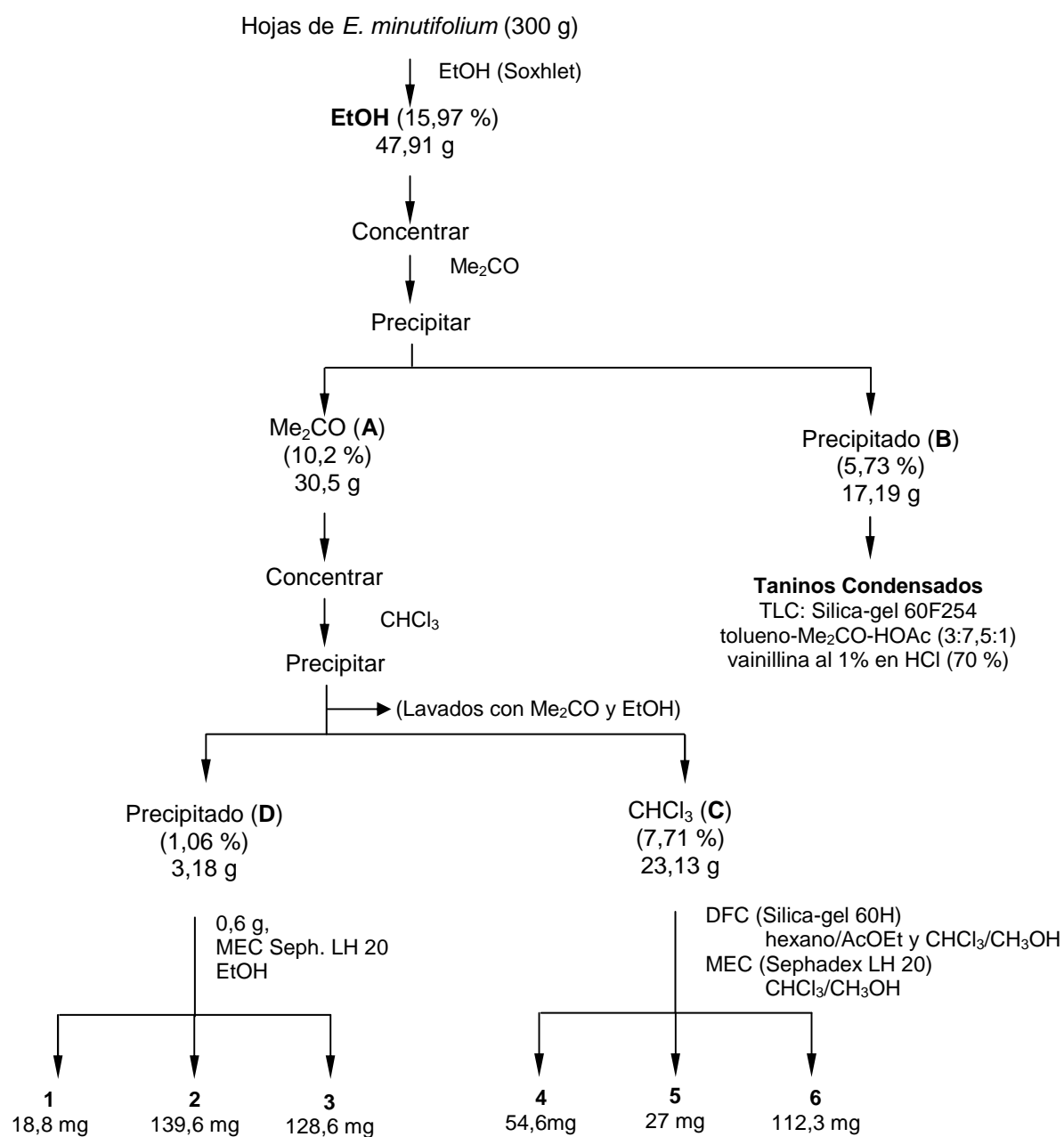


Figura 2.5. Esquema de fraccionamiento (Los porcentajes están relacionados con el material vegetal seco).

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Parte Experimental

II.4.2.5. Determinación de fenoles totales

La metodología, descrita por Singleton y Rossi [1965], se aplicó con una modificación técnica que consistió en el uso de una disolución saturada de Na_2CO_3 y una lectura de la absorbancia a 765 nm (en el procedimiento original: 7,5 % Na_2CO_3 y 760 nm). Estas modificaciones fueron estandarizadas previamente y adecuadas al presente estudio.

Reactivos y disoluciones

Disolución de ácido gálico (5 g/L)

Se pesaron 0,5 g de ácido gálico (Sigma-Aldrich, EUA) en un matraz aforado de 100 mL (Balanza analítica Explorer®Pro, OHAUS, Suiza), se disolvieron en 10 mL de EtOH (Merck, Alemania) y se enrasó con H_2O destilada.

Disolución saturada de carbonato de sodio

Se pesaron 40 g de Na_2CO_3 (Sigma-Aldrich, EUA) en un vaso de precipitado, se adicionaron 160 mL de H_2O destilada y se llevó a ebullición. Después de enfriarse la disolución, se añadieron unos cristales de Na_2CO_3 , se filtró, se trasvasó a un matraz aforado de 200 mL y se enrasó con H_2O destilada.

Preparación de muestras

Cien gramos de las hojas de cada especie vegetal: *E. areolatum* (Enero/2002), *E. alaternifolium* (Abril/2001), *E. confusum* (Mayo/2003), *E. havanense* (Abril/2001), *E. minutifolium* (Julio/2002) y *E. suave* (Abril/2001), se extrajeron con EtOH (95 %, CQF, Cuba) en un equipo Soxhlet durante 12 h. Los extractos etanólicos se concentraron y se pesaron. Las fracciones y compuestos aislados a partir del extracto EtOH de *E. minutifolium* se obtuvieron a través del fraccionamiento descrito en la **Figura 2.5**. Se pesaron 30 mg de cada muestra en un matraz aforado de 100 mL y se disolvieron en una mínima cantidad de MeOH o EtOH (5-10 mL) y se enrasó con H_2O destilada para obtener una concentración final de 300 $\mu\text{g/mL}$.

Preparación de la curva de calibrado

Se tomaron alícuotas a partir de la disolución patrón de ácido gálico (5 g/L) para preparar una serie de disoluciones en las concentraciones de 0, 50, 100, 150, 250 y 500 $\mu\text{g/mL}$.

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Parte Experimental

Procedimiento

En un vial con 1,58 mL de H₂O destilada, se añadieron 20 µL de cada muestra y patrón. Se adicionaron 100 µL del reactivo Folin-Ciocalteu (Merck, Alemania) y se incubaron durante 8 min. A continuación, se adicionaron 300 µL de disolución de Na₂CO₃ y se incubaron a 40 °C por 30 min. Se leyeron las absorbancias en un espectrofotómetro UV 1603 (Shimadzu, Japón) a 765 nm.

II.4.2.6. Procesamiento cromatográfico

A continuación se describen los procedimientos cromatográficos, tanto para objetivos analíticos (TLC) como preparativos (DFC y MEC), empleados en el fraccionamiento, aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios a partir de los extractos vegetales.

II.4.2.6.1. *Cromatografía en capa fina (TLC)*

Esta técnica se utilizó para el análisis cualitativo de las fracciones obtenidas a partir de las columnas cromatográficas preparativas como seguimiento de los pasos de fraccionamiento en columna.

Se emplearon placas de silica gel 60G F₂₅₄ (10 x 20 cm) de Merck (Alemania), con 0,1 mm de espesor. Se utilizaron como sistemas de disolventes (calidad p.a., Merck, Alemania) mezclas de hexano:AcOEt, CHCl₃:MeOH, tolueno:Me₂CO:HOAc y BuOH:HOAc:H₂O (BAW), cuyas proporciones se especifican en cada caso. Como reveladores se usaron la luz UV (254 y 366 nm), para taninos condensados se utilizó vainillina (Merck, Alemania) al 1% en HCl al 70 % (JTBaeker, Holanda) y como revelador universal, Ce(SO₄)₂ (Merck, Alemania) en H₂SO₄ concentrado (JTBaker, Holanda). Esta última disolución se preparó a partir de 12 g de Ce(SO₄)₂ y 350 g de hielo colocados en un vaso de precipitado de 500 mL, al cual se le adicionaron lentamente 40 g de H₂SO₄ concentrado. La mezcla se agitó con agitador de vidrio y se colocó en baño de H₂O (70 °C) hasta obtener una disolución amarilla-naranja. Las placas después de sumergidas en la disolución de Ce(SO₄)₂ se calentaron en plancha eléctrica a 80 °C hasta la aparición de manchas coloreadas que permitieron la identificación de determinados grupos de metabolitos secundarios de interés y sirvieron de guía en el fraccionamiento.

II.4.2.6.2. Cromatografía líquida a vacío (DFC)

La presente técnica preparativa se empleó para el fraccionamiento y aislamiento de metabolitos secundarios a partir de extractos y/o fracciones apolares y de mediana polaridad, con el uso de sílica gel como fase estacionaria y una bomba de vacío para llevar a cabo la elución de la muestra con la mezcla de disolventes usados como fase móvil. En este caso se emplearon dos dimensiones distintas de columna para volúmenes diversos de muestra: la columna de mayor dimensión para fracciones de partida y la columna de menor dimensión para fracciones obtenidas con la primera columna.

Se utilizó una columna de vidrio de 30 cm de altura y 6 cm de diámetro (columna I) a la cual se le adicionaron 100 g de sílica gel 60H (6-35 μm) de la SDS (Francia). Se empleó un émbolo y una bomba de vacío Telstar G6 (España) para el empaquetamiento hasta la altura de 8 cm. La muestra a fraccionar se disolvió en una mínima cantidad de Me_2CO y se secó en rotavapor junto con 3 g de sílica gel en un balón de 250 mL. La mezcla de sílica gel y muestra se colocó en la parte superior de la columna. Se emplearon gradientes de hexano-AcOEt, CHCl_3 -MeOH y MeOH para el lavado final. Los gradientes se especifican en cada caso.

Por otro lado, se utilizó una columna de vidrio de 30 cm de altura y 3 cm de diámetro (columna II) a la cual se le adicionaron 15 g de sílica gel 60H (6-35 μm) de la SDS (Francia). Se empleó un émbolo y una bomba de vacío Telstar G6 (España) para el empaquetamiento hasta la altura de 5 cm. La muestra a fraccionar se disolvió en una mínima cantidad de Me_2CO y se secó en rotavapor junto con 0,5 g de sílica gel en un balón de 100 mL. La mezcla de sílica gel y muestra se colocó en la parte superior de la columna. Se emplearon gradientes de hexano-AcOEt, CHCl_3 -MeOH y MeOH para el lavado final. Los gradientes se especifican en cada caso. En la siguiente **Figura 2.6** se muestran ambas columnas utilizadas para la DFC.



Figura 2.6. Sistemas de cromatografía líquida a vacío (DFC).

II.4.2.6.3. Cromatografía de exclusión molecular (MEC)

Esta variante de cromatografía preparativa se empleó para el fraccionamiento de extractos y/o fracciones polares en la separación y aislamiento de los metabolitos secundarios por tamaño molecular. Se emplearon dos columnas de diversa dimensión para distintos volúmenes de muestra: una primera columna de mayor dimensión para muestras de partida y una segunda columna menor para fracciones obtenidas en la primera columna.

Se empleó una columna de vidrio de 100 cm de altura por 3 cm de diámetro la cual se empaquetó con 100 g de Sephadex LH-20 de la Amersham Bioscience (Suecia) previamente condicionada (hinchada) con EtOH. La muestra se disolvió en una mínima cantidad de MeOH y se le adicionó posteriormente EtOH hasta un volumen de 20 mL. Se empleó EtOH como fase móvil y un flujo de 0,8 mL/min.

Se empleó además, una columna de vidrio de 100 cm de altura por 3 cm de diámetro empaquetada con 50 g de Sephadex LH-20 de la Amersham Bioscience (Suecia) previamente hinchada con EtOH. La muestra se disolvió en una mínima cantidad de MeOH. Se empleó CHCl_3 -MeOH (1:4) y MeOH como fases móviles. Este procedimiento se empleó para el aislamiento del flavano (5). En la siguiente **Figura 2.7** se ilustra el equipo usado para la MEC.



Figura 2.7. Sistema empleado para la cromatografía de exclusión molecular (MEC).

II.4.2.7. Análisis espectroscópico

Los espectros UV se obtuvieron en MeOH y con adición de los reactivos de desplazamiento químico acetato de sodio (NaOAc) y acetato de sodio-ácido bórico (NaOAc/H₃BO₃) [Harborne, 1973-1998] en un espectrofotómetro HACH DR/4000U (EEUU), en este caso con el propósito de identificar el esqueleto base de la estructura de los flavonoides aislados.

Los espectros NMR ¹H se obtuvieron a 250,13 y 599,19 MHz y los de NMR ¹³C a 62,90 y 150,858 MHz en CHCl₃, MeOH y DMSO, en equipos Bruker ARX-250 y DRX-600 (Alemania), respectivamente. Los experimentos bidimensionales HHCOSY, HSQC y HMBC se obtuvieron a 400,13 MHz en un equipo Bruker ARX-400 (Alemania). Se utilizó esta técnica para la elucidación estructural de los metabolitos secundarios aislados.

Los espectros de masas se obtuvieron por la técnica ESI+ con CHCl₃:MeOH (1:2) en un equipo Esquire3000 para la elucidación estructural de algunos de los compuestos apolares aislados.

II.4.3. Evaluación de parámetros de interés biológico

Se procede a continuación a la descripción de la metodología utilizada para llevar a cabo los ensayos antioxidantes y antiviral de los extractos, fracciones y compuestos aislados.

II.4.3.1. Ensayos antioxidantes

Dentro de los ensayos de la actividad antioxidante realizados a los extractos, fracciones y compuestos aislados se encuentran el de poder reductor como evaluador de la capacidad reductora de la muestra (método no enzimático) [Oyaizu, 1986; Yen y Chen, 1995] y el de superóxido como medidor de la capacidad secuestradora del radical O₂[•] (método enzimático) [Beauchamp y Fridovich, 1971; Ukeda y col., 1997, 1999].

II.4.3.1.1. *Ensayo del poder reductor*

La metodología, descrita por Oyaizu [1986], y Yen y Chen [1995], se aplicó modificada según se detalla a continuación. Esta modificación consistió esencialmente en la toma de menor cantidad de muestra (1,2 mL) para la lectura final de la absorbancia, la cual se realizó a 690 nm en lugar de 700 nm como se describe originalmente. Estas variaciones fueron estandarizadas previamente para su adecuación al estudio presente.

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Parte Experimental

Reactivos y disoluciones

Disolución de hexacianoferrato de potasio ($K_3Fe(CN)_6$, 1%)

Se pesaron 150 mg del reactivo (Sigma-Aldrich, EUA) en balanza analítica (Explorer®Pro, OHAUS, Suiza) y se disolvieron en 15 mL de H₂O destilada (siempre se preparó el mismo día de su utilización).

Disolución tampón fosfato (pH=6,6; 0,2 M)

Se pesaron 2,75 g de NaH₂PO₄*H₂O (Sigma-Aldrich, EUA) y 2,842 g de Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich, EUA) y se disolvieron en 100 mL de H₂O destilada.

Disolución de ácido tricloroacético (10%)

Se pesaron 10 g del reactivo (Sigma-Aldrich, EUA) y se disolvieron en 100 mL de H₂O destilada.

Disolución de cloruro de hierro III ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0,167%)

Se pesaron 16,7 g del reactivo (Sigma-Aldrich, EUA) y se disolvieron en 10 mL de H₂O destilada (se preparó el mismo día de su utilización).

Disolución de quercetina (1 mg/mL)

Se pesaron 10 mg del reactivo (Merck, Alemania) y se disolvieron en 10 mL de Me₂CO, MeOH o DMSO (Merck, Alemania).

Preparación de muestras

Cien gramos de las hojas de *E. areolatum* (Enero/2002), *E. alaternifolium* (Abril/2001), *E. confusum* (Mayo/2003), *E. havanense* (Abril/2001), *E. minutifolium* (Julio/2002) y *E. suave* (Abril/2001), se extrajeron con EtOH en un equipo Soxhlet durante 12 h. Los extractos etanólicos se concentraron y se pesaron. Las fracciones y compuestos aislados a partir del extracto EtOH de *E. minutifolium* se obtuvieron a través del fraccionamiento descrito en la **Figura 2.5**. Se pesaron 25 mg de cada muestra en un matraz aforado de 100 mL. Se disolvieron en una mínima cantidad (5-10 mL) de Me₂CO, MeOH o DMSO (Merck, Alemania), según las características de solubilidad de cada

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Parte Experimental

muestra. Se enrasó con H₂O destilada, se tomó una alícuota de 0,4 mL y se trasvasó a un vial eppendorf. Se enrasó nuevamente hasta un volumen de 1 mL (concentración final 100 µg/mL).

Preparación de la curva de calibrado

Se tomaron alícuotas a partir de la disolución patrón de quercetina (1 mg/mL) para preparar una serie de disoluciones en las concentraciones de 0, 25, 50 y 100 µg/mL.

Procedimiento

Se midieron 160 µL de cada disolución (patrón y muestra) y se trasvasaron a un vial eppendorf. Se adicionaron 400 µL de tampón fosfato, 400 µL de K₃Fe(CN)₆ (1%) y se incubaron a 50 °C por 20 min. Se añadieron 400 µL de ácido tricloroacético (10%) y se centrifugó por 10 min a 3000 g (6200 rpm). Se midieron 1,2 mL del sobrenadante, se trasvasó a un vial eppendorf y se adicionaron 120 µL de FeCl₃ 6H₂O (0,167%). Se cargó la placa de ELISA con 200 µL de cada disolución. Se esperaron 50 min para el desarrollo del color y se leyó a 690 nm en un equipo Labsystems iEMS Reader MF ELISA. Los resultados se expresaron en µg/mL y porcentaje de unidades equivalentes de quercetina.

II.4.3.1.2. Ensayo de superóxido por el sistema HX/XO

La metodología está descrita por Beauchamp y Fridovich [1971], y Ukeda y col. [1997, 1999], y a continuación se detalla una modificación de la técnica para las muestras vegetales en cuestión, que esencialmente consistió en el uso adicional de la enzima HX, y de una lectura de la absorbancia a 37°C durante 10 min (en el procedimiento original: 25°C y 20 min). Esta variación fue estandarizada previamente y adecuada al presente estudio.

Reactivos y disoluciones

Disolución de carbonato de sodio (Na₂CO₃, 50 mM; pH 9,4)

Se pesaron 1,05 g de Na₂CO₃ (Sigma-Aldrich, EUA) en balanza analítica (Explorer®Pro, OHAUS, Suiza) y se disolvieron en 250 mL de H₂O destilada.

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Parte Experimental

Disoluciones de hipoxantina, HX, (500 μM), xantina-oxidasa, XO, (600 mU/mL), sal de nitrobluetetrazolium, NBT, (250 μM) y superóxido dismutasa, SOD, (265 U/mL)

Se pesaron 6,8 mg de HX (Sigma-Aldrich, EUA) y se disolvieron en 100 mL de Na_2CO_3 (50 mM), preparado con anterioridad. Se pesaron 25 mg de XO (0,12 U/mg, Sigma-Aldrich, EU) y disolvieron en 5 mL de H_2O . Se pesaron 10 mg de NBT (Sigma-Aldrich, EUA) y se disolvieron en 50 mL de H_2O destilada. Se disolvieron 3000 U del reactivo SOD (Sigma-Aldrich, EUA) en 11,32 mL de H_2O destilada.

Preparación de muestras

Cien gramos de las hojas de *E. areolatum* (Enero/2002), *E. alaternifolium* (Abril/2001), *E. confusum* (Mayo/2003), *E. havanense* (Abril/2001), *E. minutifolium* (Julio/2002) y *E. suave* (Abril/2001), se extrajeron con EtOH en un equipo Soxhlet durante 12 h. Los extractos etanólicos se concentraron y se pesaron. Las fracciones y compuestos aislados a partir del extracto en EtOH de *E. minutifolium* se obtuvieron a través del fraccionamiento descrito en la **Figura 2.4**. Se prepararon concentraciones del extracto y fracciones en el rango de 150-650 μmL , y para los compuestos en el rango de 10-1000 μmL .

Procedimiento

En placas de 96 pozos se adicionaron las siguientes cantidades por triplicado:

	Blanco (μL)	Blanco+SOD (μL)	Muestra (μL)	Muestra+SOD (μL)
Na_2CO_3	140	120	120	100
HX	20	20	20	20
XO	20	20	20	20
NBT	20	20	20	20
Muestra	-	-	20	20
SOD	-	20	-	20

Se midió la densidad óptica a 540 nm y a 37 $^{\circ}\text{C}$ de temperatura, al minuto 0 y minuto 10, en un lector de placas Labsystems iEMS Reader MF ELISA. Se calculó el porcentaje de inhibición del radical O_2^{\cdot} , aplicando la siguiente expresión:

$$\% \text{Inhibición } (\text{O}_2^{\cdot}) = 100 - [(\Delta\text{T} - \Delta\text{T}_{\text{SOD}})_{\text{muestra}} / (\Delta\text{T} - \Delta\text{T}_{\text{SOD}})_{\text{blanco}}] \times 100,$$

donde $\Delta\text{T} = t(10 \text{ min}) - t(0 \text{ min})$ y $\Delta\text{T}_{\text{SOD}} = t(10 \text{ min})_{\text{SOD}} - t(0 \text{ min})_{\text{SOD}}$

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Parte Experimental

De esta manera se determinaron los porcentajes de inhibición a las distintas concentraciones y se construyó la gráfica de porcentaje de inhibición frente a la concentración para determinar la concentración inhibitoria media (IC50) en µg/mL y el porcentaje de inhibición (I).

II.4.3.2. Ensayo de actividad antiviral (HSV-1)

Preparación de las muestras vegetales

Cien gramos de las hojas de *E. areolatum* (Enero/2002), *E. alaternifolium* (Abril/2001), *E. confusum* (Mayo/2003), *E. havanense* (Abril/2001), *E. minutifolium* (Julio/2002) y *E. suave* (Abril/2001), se extrajeron con EtOH en un equipo Soxhlet durante 12 h. Los extractos etanólicos se concentraron y se pesaron. Las fracciones y compuestos aislados a partir del extracto EtOH de *E. minutifolium* se obtuvieron a través del fraccionamiento descrito en la **Figura 2.5**.

Cultivo celular

Se utilizó la técnica descrita por Pino y col. [2004]. Se empleó la línea celular Vero (riñón de mono verde africano), procedente de la *American Type Culture Collection* (ATCC, número CCL-22) entre los pases 140 y 145. Las células se hicieron crecer en medio MEM suplementado con L-glutamina al 0,1% (Sigma-Aldrich, EUA), suero bovino fetal inactivado (SBF, Hyclone, EUA) al 5% y 100 UI/mL de sulfato de neomicina (Sigma-Aldrich, EUA) a una temperatura de incubación de 37 °C.

Virus

Los virus semillas se prepararon a partir de la cepa 8WC de referencia procedente del Instituto Carlos III de Madrid (España) en el pase 2 y la cepa proveniente de un aislamiento donada por los Laboratorios de la Defensa de Ciudad de la Habana (Cuba) que resultó resistente al Aciclovir en el pase 6. Estos virus se inocularon en frascos de 75 cm² con monocapa confluyente de células Vero, con una multiplicidad de infección de 0,1 e incubados durante 1 h para permitir la adsorción. Al cabo de este tiempo se añadió medio de cultivo MEM con SBF al 2%, y se cosecharon cuando el 75% de la monocapa mostró efecto citopatogénico (CPE). Alícuotas de virus se conservaron a -70 °C.

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Parte Experimental

Titulación de los virus

Se prepararon suspensiones de células Vero en medio MEM y SBF al 5%. Las células se dispensaron a una concentración de 2×10^5 células/mL en placas de cultivo de 96 pozos (Costar) a razón de 100 μ L por pozo. Las placas se inocularon después de incubarlas a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5% durante 1 hora. Para la titulación se prepararon diluciones decimales de los virus y se inocularon 50 μ L por pozo (8 réplicas por dilución). Las placas fueron incubadas en las condiciones antes descritas durante tres días hasta la aparición del CPE. El cálculo de la dosis de infección media del cultivo celular se realizó según el método Reed y Muench [Payment y Trudel, 1993].

Método de dilución del punto final (método Reed y Muench)

Se calculó la infección media del cultivo celular a través del porcentaje de los valores acumulativos de los datos de lectura del CPE en las réplicas de cada dilución. A través del logaritmo negativo de la dilución, cuyo valor es mayor del 50 % más el valor de distancia proporcional, se determinó el resultado del logaritmo negativo de la infección media del cultivo celular [Payment y Trudel, 1993].

Método colorimétrico del MTT

Se añadieron en cada pozo, 20 μ L de MTT, *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide* (Sigma, EUA), a una concentración de 5 mg/mL y pH=7,2, y se incubaron las placas durante 3 h a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5%. Al cabo de este tiempo se eliminó el medio de los pozos y se añadieron 100 μ L de dimetilsulfóxido DMSO (BDH, Alemania), se agitó la placa en un agitador KS500 a 300 rpm durante 15 min y se leyó a 540 nm en lector de ELISA (Organon Teknika Reader 530) [Mosmann, 1983].

Determinación de la concentración citotóxica media (CC50)

Se estudiaron los efectos citotóxicos de los diferentes extractos, fracciones y compuestos en la línea celular Vero. En placas de cultivo se añadieron 100 μ L por pozos de diferentes concentraciones de los extractos disueltos en medio de cultivo (4 réplicas por concentración) en monocapas confluentes de células Vero. Se incubaron por tres días y posteriormente se realizó el método colorimétrico del MTT (descrito anteriormente). El porcentaje de células viables se calculó a partir del valor de absorbancia de los cultivos tratados con cada concentración de los extractos con respecto al

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Parte Experimental

control celular que se consideró el 100% de viabilidad y se determinó la concentración citotóxica media (CC50) por análisis de regresión lineal para un coeficiente de correlación mayor de 0,9. Este experimento se realizó por triplicado.

Determinación de la concentración efectiva media (EC50) antiviral en células Vero

Este ensayo se realizó en placas de 96 pozos sembradas a razón de 2×10^5 células por pozos, y una vez formada la monocapa (24 h posteriores), se añadieron 50 μL por pozos de las diferentes concentraciones de los extractos, fracciones y compuestos en estudio (3,9; 7,8; 15,6; 31,2; 62,5; 125; 250 $\mu\text{g/mL}$) en medio de cultivo (4 réplicas por concentración). Transcurrida 1 h de incubación (37°C), se infectaron todos los pozos con 50 μL de 100 DICC₅₀ de cada virus (referencia y aislado) y las placas fueron incubadas a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5% hasta la aparición del CPE en los pozos del control de virus sin tratamiento. Posteriormente, se aplicó el método colorimétrico del MTT [Mosmann, 1983] para determinar la viabilidad celular. El experimento se realizó tres veces. El cálculo de la EC50 antiviral se realizó según Takeuchi y col. [1991]. Este valor es indicador de la concentración inhibitoria del 50% del crecimiento o propagación del virus. De esta manera se representó el porcentaje de sobrevivencia respecto a las diferentes concentraciones de las muestras y se realizó un análisis de regresión lineal con un coeficiente de correlación mayor de 0,9. El índice selectivo (SI) se calculó para cada una de las muestras frente a las cepas virales empleadas, mediante la relación del valor de la CC50 y el valor de la EC50 obtenido en cada caso específico, y se siguió el criterio de Wyde y col. [1993], que selecciona aquellos resultados que alcancen un SI>10.

Análisis Estadístico

Se determinaron las ecuaciones de regresión lineal de los valores de porcentaje de sobrevivencia a las diferentes concentraciones de los extractos, fracciones y compuestos. Las ecuaciones obtenidas permitieron el cálculo de los valores de CC50 y EC50 antiviral de cada uno de las muestras evaluadas. Finalmente, a los valores obtenidos en las tres réplicas se les calculó la media, la desviación estándar (SD) y se comprobó la linealidad mediante el análisis de varianza (ANOVA). Con estos datos se procedió a la determinación de diferencias estadísticamente significativas.

II.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II.5.1. Tamizado fitoquímico de especies de *Erythroxylum*

Para comenzar el estudio preliminar fitoquímico de algunas especies de *Erythroxylum* que crecen en Cuba, se recolectaron 6 especies en la zona occidental del país (Pinar del Río). Según la información recopilada del género [González y col., 2005], se seleccionaron las hojas de estas especies para la identificación de los grupos químicos presentes en este órgano de la planta y la preparación de extractos para el tamizado fitoquímico.

Los resultados obtenidos en el presente estudio sobre el tamizado fitoquímico se muestran en la **Tabla 2.2**. Los principales metabolitos secundarios identificados en los extractos polares fueron del tipo triterpeno/esteroide, polifenol, lactona/cumarina (solo extractos etanólicos) y azúcares reductores. Este resultado se encuentra en correspondencia con los metabolitos secundarios característicos del género [González y col., 2005], que son del tipo terpenoide y glicósido de polifenol, sin embargo un grupo químico tan representativo de este género como los alcaloides [Griffin y Lin, 2000] no se pudo identificar (**Tabla 2.2**). Se podría inferir a partir de este resultado, que existe una baja concentración de alcaloides para estas especies crecidas en el occidente de Cuba.

Los alcaloides, quinonas, saponinas y glicósidos cardiotónicos se identificaron escasamente, mientras que los lípidos/aceites esenciales y carotenoides no se detectaron en ninguna muestra vegetal. Por otro lado, las aminas se identificaron solamente en la especie *E. havanense*.

Los resultados obtenidos en la identificación de flavonoides merecen un análisis particular. Estos compuestos se identificaron con abundancia en las hojas de *E. areolatum*, *E. confusum* y *E. minutifolium*. En el caso de *E. areolatum*, sus flavonoides son altamente polares ya que se identificaron sólo en su extracto acuoso. Para las especies *E. havanense* y *E. alaternifolium* no se detectó prácticamente la presencia de flavonoides, sin embargo sí se identificaron polifenoles en una cantidad significativa para todas las especies (**Tabla 2.2**). El ensayo de FeCl_3 , que se emplea para la identificación de polifenoles, es inespecífico, ya que se basa en la capacidad de complejación que presenta el Fe con las estructuras fenólicas, sin embargo la identificación de flavonoides se realiza con el reactivo Shinoda y es un ensayo específico donde se involucra el anillo C, anillo en el que se encuentra al grupo carbonilo del flavonoide [Farnsworth, 1966]. Por lo tanto, de este resultado se infiere que los principales polifenoles presentes en estas dos últimas especies no son del tipo flavonoide.

Estos resultados de identificación de familias de metabolitos, como se realizan con extractos que constituyen una matriz muy compleja, sólo sirven de guía cualitativa preliminar ya que son ensayos que están sometidos a muchos resultados falsos positivos y negativos [Farnsworth, 1966]. Por estas razones se hace necesario el uso de técnicas cromatográficas para fraccionar los extractos y realizar una adecuada identificación de los componentes químicos con una menor interferencia.

Tabla 2.2. Resultados en el tamizado fitoquímico de las hojas de seis especies de *Erythroxylum* que crecen en Cuba (Abril 2001)

Familia de metabolitos	Tipo de extracto																	
	Hexano						EtOH						H ₂ O					
	Especies																	
	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI
Flavonoides	NO	NO	NO	NO	NO	NO	-	++	+++	++	-	-	+++	+++	+++	++	-	+
Polifenoles	NO	NO	NO	NO	NO	NO	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Alcaloides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Azúcares reductores	NO	NO	NO	NO	NO	NO	++	+++	+++	++	++	+++	++	++	+++	+++	+	++
Lactonas/cumarinas	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+	+++	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Triterpenos/esteroides	+++	++	+++	+	+	++	+++	+	++	+++	+++	+	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Glicósidos cardiotónicos	NO	NO	NO	NO	NO	NO	+	++	-	-	-	-	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Quinonas	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Lípidos/aceites esenciales	-	-	-	-	-	-	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Carotenoides	-	-	-	-	-	-	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Saponinas	NO	NO	NO	NO	NO	NO	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	++
Aminas	NO	NO	NO	NO	NO	NO	-	-	-	-	+++	-	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Mucílago	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	+	-	-	-	-	-

Ensayo de identificación positivo (+), negativo (-), no se realiza ensayo (NO)

I= *E. suave*; II= *E. confusum*; III= *E. areolatum*; IV= *E. minutifolium*; V= *E. havanense*; VI= *E. alaternifolium*

II.5.2. Actividad antioxidante y antiviral de especies de *Erythroxylum*

En la evaluación de la actividad antioxidante de extractos etanólicos de las hojas de seis especies de *Erythroxylum* se emplearon dos ensayos químicos *in-vitro*, la determinación de fenoles totales y del poder reductor. Ambos ensayos permiten un acercamiento al potencial antioxidante de las muestras vegetales. En el primer caso se empleó el ácido gálico como referencia (fenol simple sustituido por tres grupos OH), el cual se utiliza comúnmente para realizar un estimado del porcentaje de fenoles totales. En el caso del poder reductor, se empleó como referencia la quercetina por ser un metabolito secundario con una reconocida actividad antioxidante [Re y col., 1999].

Los resultados de la evaluación de la actividad antioxidante se muestran en la **Tabla 2.3**. Para la determinación de los fenoles totales y el poder reductor se emplearon concentraciones de extractos de alrededor de 300 y 100 µg/mL, respectivamente. Las curvas de calibrado (absorbancia *versus* concentración) correspondientes al ácido gálico (para determinar fenoles totales) y la quercetina (para determinar el poder reductor) mostraron un coeficiente de correlación >0,99. Estos dos compuestos se consideran el 100% de fenoles totales y de poder reductor, respectivamente. A partir de ambas curvas de calibrado se realizaron los presentes ensayos antioxidantes mediante la interpolación de la absorbancia mostrada por los extractos y obteniéndose así un valor de concentración que referido al ácido gálico o a la quercetina se establece como porcentaje equivalente o unidad equivalente (**Tabla 2.3**). El porcentaje de fenoles totales para todos los extractos se obtuvo por encima de un 22%, semejante al poder reductor, el cual se obtuvo por encima del 21%, con excepción del extracto de *E. havanense*, el cual mostró un bajo poder reductor (0,72 %). Estos valores porcentuales se obtuvieron en un rango pequeño para cinco de las seis especies, así, fenoles totales: 31-46 % y poder reductor: 21-30 %.

En la **Figura 2.8A** se muestra una comparación de los resultados de fenoles totales y el poder reductor obtenidos para las seis especies. Si se analiza la gráfica de barras se puede observar que entre las especies existe una casi total correspondencia de valores de fenoles totales y poder reductor obtenidos para cada una. Esto puede indicar que los compuestos fenólicos podrían ser los principales metabolitos secundarios responsables del poder reductor de los extractos. Las especies *E. alaternifolium* y *E. minutifolium* mostraron valores ligeramente superiores al resto (fenoles totales=43,8 y 46 %; poder reductor: 30,1 y 27,8 %, respectivamente), lo cual indicó que ambos extractos resultaron los de mejor potencial antioxidante en cuanto a la capacidad donante de átomos de H (medido a través del porcentaje de fenoles totales) y donante de electrones (a través del poder reductor).

Por otro lado, la actividad antiviral se llevó a cabo a través de un ensayo biológico *in-vitro* con el uso de células Vero infectadas con el HSV-1, y el uso de un virus de referencia (HSV-1r) y un virus aislado (HSV-1a) de pacientes infectados. Este último es un virus que posee resistencia a medicamentos antivirales, lo cual constituye un indicador superior de actividad antiherpética para aquellas muestras que inhiban su crecimiento o propagación. Para este ensayo se emplearon

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Resultados y Discusión

concentraciones de extracto de 3,9; 7,8; 15,6; 31,2; 62,5; 125 y 250 µg/mL, y se determinó la concentración citotóxica media (CC50), la concentración efectiva media (EC50) y finalmente el índice selectivo ($SI=CC50/EC50$) como indicador del potencial antiviral de la muestra.

En la evaluación de la actividad antiherpética todos los extractos mostraron una baja citotoxicidad (>1000 µg/mL) y una EC50 frente al virus de referencia ≤ 100 µg/mL, excepto para el *E. havanense* (**Tabla 2.3**), cuyo extracto no inhibió el crecimiento del virus en el rango de concentración utilizado. Estos valores de EC50, incluida la inactividad del *E. havanense*, se corresponden con los resultados obtenidos en estudios anteriores en especies del género [Hattori y col., 1995; Lohezic y col., 1999; Fortin y col., 2002]. Frente al virus aislado, solo resultaron activas las especies *E. areolatum*, *E. alaternifolium* y *E. minutifolium*, y sus extractos mostraron los mejores valores de EC50, en rangos de 10-50 µg/mL para el virus de referencia y de 30-100 µg/mL para el virus aislado (**Tabla 2.3**). Los resultados hallados durante el tamizado fitoquímico (**Tabla 2.2**) para estas tres especies donde se identificaron compuestos que han demostrado poseer actividad antiherpética tales como polifenoles, terpenoides y glicósidos [Khan y col., 2005; Cos y col., 2008], permite entender los valores de EC50 obtenidos frente al HSV-1. La EC50 obtenida para el virus aislado siempre resultó mayor que la del virus de referencia debido a que el primero, al haber estado expuesto a medicamentos antivirales, se hace más resistente por la capacidad de mutación que tienen los virus. El resultado obtenido para estas tres especies mostró que constituyen los tres extractos más activos frente al HSV-1.

En la **Figura 2.8B** se comparan los resultados de la actividad antiherpética para las seis especies, donde el extracto del *E. areolatum* mostró la mayor actividad inhibitoria frente al virus de referencia (14,64 µg/mL), mientras que el extracto del *E. minutifolium* mostró la mayor actividad inhibitoria frente al virus aislado (36,88 µg/mL). Sin embargo, esta última especie mostró también una significativa actividad frente al virus de referencia (18,14 µg/mL). El indicador de actividad inhibitoria frente a la cepa del virus aislada de pacientes enfermos es el más importante, lo cual indica que el extracto de EtOH del *E. minutifolium* constituye la muestra vegetal de mayor actividad antiherpética dentro de las seis especies. Si se considera además, que el acyclovir, medicamento antiviral por excelencia, posee una $EC50 < 2$ µg/mL [Chiang y col., 2002], se puede plantear que ambos extractos constituyen una fuente de agentes anti-HSV-1, en especial el *E. minutifolium*.

Aunque no existe información en la literatura sobre actividad antiherpética de estas especies, se puede extraer de los resultados del tamizado fitoquímico (**Tabla 2.2**) que ambas especies mostraron una mayor actividad anti-VHS-1 posiblemente debido a la abundante presencia de polifenoles, flavonoides, terpenoides y glicósidos, a menudo responsables de la actividad antiherpética de extractos vegetales [Khan y col., 2005], y que en particular fueron las dos únicas especies (III y IV) que dieron positivas en la identificación de quinonas, que constituyen también un grupo importante dentro de los polifenoles antivirales [Andersen y col., 1991].

Tabla 2.3. Fenoles totales, poder reductor y actividad anti-HSV tipo 1 de extractos EtOH de seis especies de *Erythroxylum*

Extractos	Fenoles Totales ^a	Poder Reductor ^b	Actividad anti-HSV-1 (µg/ml) ^c			
	± SD (%)	± SD (%)	EC50 ± SD (VHS-1r)	SI (VHS-1r)	EC50 ± SD (VHS-1a)	SI (VHS-1a)
<i>E. areolatum</i>	38,1 ± 2,1	23,0 ± 0,6	14,64 ± 7,2	> 68,31	98,43 ± 6,3	> 10,16
<i>E. alaternifolium</i>	43,8 ± 4,1	30,3 ± 0,3	48,31 ± 2,8	> 20,7	82,49 ± 7,6	>12,12
<i>E. confusum</i>	41,8 ± 4,9	22,4 ± 0,4	100,52 ± 11,7	> 9,95	inactivo	NE
<i>E. havanense</i>	24,8 ± 4,3	0,72 ± 0,07	inactivo	NE	inactivo	NE
<i>E. minutifolium</i>	46,0 ± 5,3	27,8 ± 0,7	18,14 ± 4,3	> 55,13	36,88 ± 5,5	> 27,11
<i>E. suave</i>	41,8 ± 3,7	25,3 ± 1,6	84,68 ± 8,7	> 11,81	inactivo	NE

HSV-1: virus herpes simple tipo 1, EC50: concentración media inhibitoria, SI: índice selectivo (SI=CC50/EC50), SD: desviación estándar, VHS-1r: cepa del virus de referencia, VHS-1a: cepa del virus aislado, NE: no evaluado.

^a cada valor representado ± SD como porcentaje equivalente a ácido gálico (n=3). Concentración de extractos: 260-300 µg/ml. Calibrado del ácido gálico: $r^2=0,997$.

^b cada valor representado ± SD como unidad equivalente de quercetina (n=4). Concentración de los extractos: 100 µg/ml. calibrado de la quercetina: $r^2=0,991$.

^c cada valor de EC50 representado ± SD (n=4). Concentración media citotóxica para los extractos: CC50>1000 µg/ml frente a la línea celular Vero.

Figura 2.8A. Poder reductor y contenido de fenoles totales de extractos EtOH de especies de *Erythroxylum*

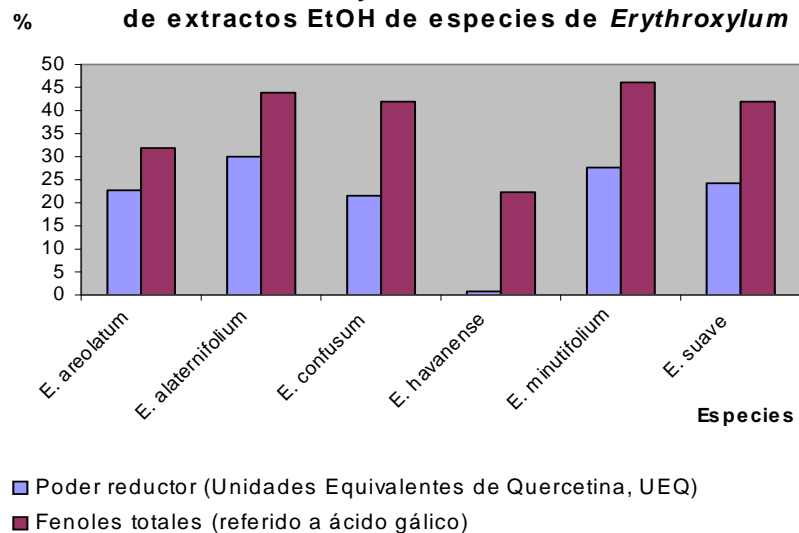
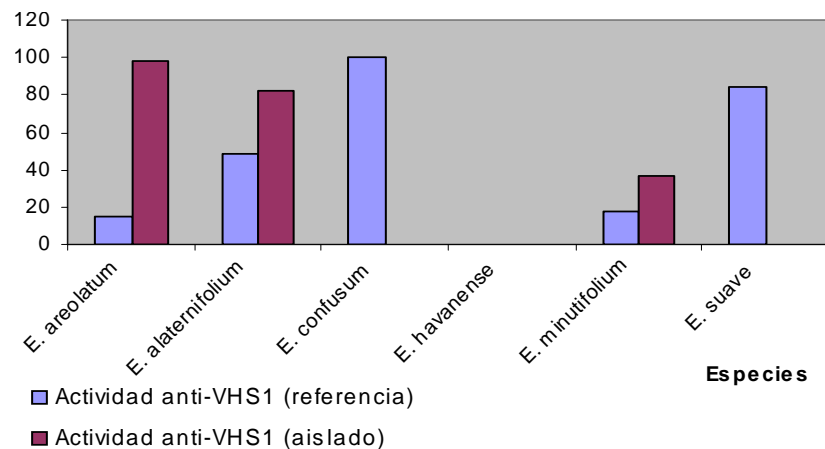


Figura 2.8B. Actividad antiviral de especies de *Erythroxylum* EC50 (HSV-1)



II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Resultados y Discusión

La convergencia entre los resultados de la evaluación antioxidante y antiviral indicaron que la especie *E. minutifolium* constituye la muestra a seleccionar para iniciar la caracterización y fraccionamiento de su extracto en la búsqueda de los agentes bioactivos responsables de la actividad encontrada. Esto sumado a la característica de esta planta de ser una especie endémica y a la vez abundante en el archipiélago cubano [Oviedo, 2001], hacen del extracto de EtOH del *E. minutifolium* el mejor candidato para iniciar el estudio. De esta manera se establecieron tres criterios para la selección de esta especie: abundancia en el país, endemismo y mayor actividad biológica.

II.5.3. Caracterización química general del extracto de EtOH de *E. minutifolium*

II.5.3.1. Estudio de la fracción polar. Flavonoides mayoritarios

Se inició un fraccionamiento para el aislamiento de los metabolitos secundarios mayoritarios a partir de la especie seleccionada *E. minutifolium* (**Figura 2.9**) con el objetivo de realizar un posterior análisis quimi taxonómico de algunas especies crecidas en la isla.



Figura 2.9. *Erythroxylum minutifolium*.

Según se muestra en el esquema de la **Figura 2.3**, se realizaron tres extracciones en Soxhlet a partir de las hojas de *E. minutifolium* (Julio 2002) con hexano, CHCl_3 y EtOH, con vistas a separar los grupos químicos según su polaridad. El resultado encontrado coincidió con los resultados del tamizado fitoquímico realizado con anterioridad. El hexano y el CHCl_3 extrajeron menos del 2 % de compuestos respecto al material vegetal de partida, sin embargo el EtOH extrajo más del 13 %, lo que indicó el predominio de metabolitos secundarios polares. Un análisis por TLC de los tres extractos indicó la presencia de una gran mancha amarilla para el extracto etanólico alrededor de R_f 0,5, revelada con AlCl_3 , característica de flavonoides.

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Resultados y Discusión

Se realizó un procedimiento general basado en una extracción BuOH:H₂O (1:1) y una MEC con Sephadex LH-20. De la columna se obtuvieron tres fracciones de flavonoides fundamentales, las cuales ofrecieron manchas típicas de estos compuestos por TLC. A partir de estas fracciones cristalizaron en EtOH tres compuestos puros: **1** (R_f 0,27; 22,1 mg), **2** (R_f 0,62; 164,39 mg) y **3** (R_f 0,59; 151,3 mg), los cuales fueron analizados por UV, con el uso de reactivos de desplazamiento químico, NMR ¹H y ¹³C.

Los espectros UV (**Figura 2.10**) mostraron que los tres compuestos aislados son flavonoides al observarse dos máximos de absorción fundamentales para este tipo de compuestos: banda primaria BI: 300-380 nm, relacionada con la absorción provocada por el sistema de dobles enlaces "cinamoil" que se establece entre el anillo B y C del flavonoide (**Figura 2.10**), y una banda secundaria BII: 240-280 nm, relacionada con el sistema de dobles enlaces "benzoil" que se establece entre los anillos A y C del flavonoide (**Figura 2.10**) [Mabry et al. 1970]. Para los tres compuestos se encontró que eran flavonoides de tipo flavonol 3, 3',4'-sustituídos, al presentar la banda BI: 328-360 nm y BII: 250-275 nm [Mabry y col., 1970]. Por otro lado, al comparar los espectros UV de **1** y **2** respecto a **3**, se observan diferencias hipsocrómicas en ambas bandas de absorción. Esto es típico de una mayor glicosilación o metilación del esqueleto base del flavonoide.

En la **Figura 2.10** y **Tabla 2.4** se muestran los resultados del análisis de espectros UV de los flavonoides con el uso de NaOAc y NaOAc/H₃BO₃ como reactivos de desplazamiento químico. Estos reactivos se emplean para determinar el patrón de hidroxilación y estimar la posición de glicósidos en el aglicón del flavonoide. El NaOAc se emplea para detectar la presencia de un OH libre en posición 7 del flavonoide y provoca un desplazamiento batocrómico de la banda BII en 5-20 nm. Por otro lado, el NaOAc/H₃BO₃ se emplea para detectar grupos OH en posición *orto* (grupo catecol) en 3',4', al formarse un complejo con este sistema OH *orto*. Este complejo provoca que la banda BI presente un desplazamiento batocrómico entre 12-30 nm.

Según la **Tabla 2.4**, se observa que por adición del NaOAc se obtiene un desplazamiento batocrómico significativo de la banda BII (Δ = 15 nm) del flavonoide **3**, lo que indica la presencia de OH libre en posición 7, y la adición del otro reactivo solo provocó un desplazamiento batocrómico de la banda BI (Δ = 22 nm) del compuesto **3**, lo que indica la presencia de un grupo ortodihidroxilo en 3',4'. Los cambios no observados para **1** y **2** con el uso de ambos reactivos indican que estos flavonoles presentan la posición 7, 3',4' sustituidas (ejemplo: grupos hidroxilo, glicósido o metoxilo).

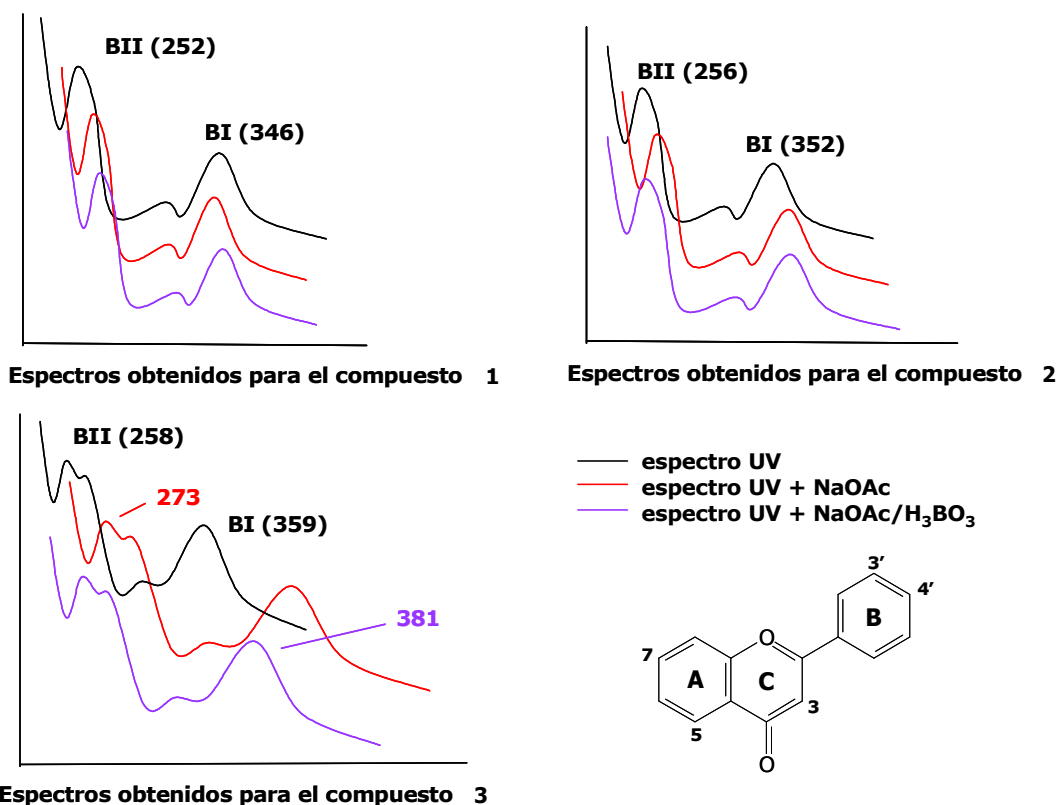


Figura 2.10. Espectros UV con el uso de reactivos de desplazamiento químico, NaOAc y NaOAc/H₃BO₃, de tres flavonoides aislados de *E. minutifolium*.

Tabla 2.4. Máximos UV de los flavonoides aislados de *E. minutifolium* y los desplazamientos obtenidos por adición de reactivos de desplazamiento químico

Compuesto	máximos UV en MeOH		máximos UV (NaOAc)		máximos UV (NaOAc/H ₃ BO ₃)	
	BII /nm	BI /nm	BII /nm	BI /nm	BII /nm	BI /nm
1	252, 262 (h)	346, 302 (h)	260	342	262	346
2	256, 268 (h)	352, 298 (h)	264	356	256	356
3	258, 268 (h)	359, 297 (h)	273	392	262	381

1: ombuin-3-rutinósido-5-glucósido; 2: ombuin-3-rutinósido; 3: rutina; BI y BII: bandas 1ria y 2ria; h: hombro

II.5.3.1.1. ombuin (7,4'-di-O-metilquercetin) 3-O-β-rutinósido (2)

El resultado del análisis estructural por UV indicó la presencia de tres flavonoles 7,3',4' sustituidos por grupos -OH, -OMe y/o -O-glicósidos. El espectro NMR ¹H de **2** (Figura 2.11) confirmó la presencia de la sustitución en el anillo B del aglicón en posiciones 3',4' con un doblete (*d*) a 7,55 ppm (*J_m*= 2,3 Hz), un doblete a 7,05 ppm (*J_o*= 8,7 Hz) y un doblete de doblete (*dd*) a 7,72 ppm (*J_m*= 2,3 Hz;

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Resultados y Discusión

$J_o=8,7$ Hz), asignados a los protones H-2', H-5' y H-6' del anillo B, respectivamente. La 5,7-disustitución del anillo A, se demostró por la presencia de dobletes a 6,36 y 6,67 ppm, cada uno con un acoplamiento *meta* ($J= 2,2$ Hz), asignado a H-6 y H-8, respectivamente. Un singlete (s) a 12,52 ppm indicó la presencia de un OH libre en posición 5. Dos singletes a 3,87 y 3,88 ppm confirmaron la presencia de dos metoxilos enlazados a anillo aromático. Los datos espectrales UV y NMR ^1H permitieron confirmar la presencia de un grupo metoxilo en 7. El otro grupo metoxilo pudiera estar enlazado a una de las posiciones 3' o 4' del anillo B, que generalmente posee las sustituciones en 4'. Luego del resultado por UV, se sospechó de la presencia de glicósidos, lo cual se confirmó a través de señales típicas de azúcares en el espectro NMR ^1H (3-3,5 ppm). El número de señales en esta zona indicó presencia de al menos dos azúcares. Dos dobletes a 0,99 ppm ($J= 6,1$ Hz) y 4,41 ppm ($J= 1$ Hz) se asignaron a los protones H-6''' y H-1''' de ramnosa, respectivamente. Un doblete adicional a 5,39 ppm se asignó al H-1'' de la glucosa. Estas señales protónicas confirmaron un enlace directo al flavonoide y un acoplamiento axial-axial de $J_{aa}= 7,3$ Hz entre H-1'' y H-2'', indicador de una β -configuración entre ambos azúcares. El espectro NMR ^{13}C de **2** (Figura 2.12) mostró una 3-di-O-glicosilación, con numerosas señales en el rango de 25-80 ppm. La presencia de 3-O-rutinósido se demostró por comparación de datos de NMR ^{13}C [Agrawal, 1989]. Señales a 55,6 y 55,8 ppm confirmaron la presencia de dos grupos metoxilos en 7 y 4'. Este hecho se basó en el ligero desplazamiento a campos más bajos del C-7 (+1,1 ppm) y C-4' (+1,78 ppm), unido con la aparición a campos más altos del C-5' (-4,87 ppm), respecto a datos espectrales de flavonoides similares [Agrawal, 1989]. Por lo tanto, **2** se identificó como el 7,4'-di-O-metilquercetin (ombuin) 3-O- β -rutinósido. Algunas señales de NMR publicadas para este flavonoide derivatizado con trimetilsilano (TMS), obtenido de otras especies del género, coincidieron con las asignadas [Iñigo y Pomilio, 1985]. A continuación se muestra por vez primera la asignación completa de señales de NMR de este flavonoide sin derivatizar.

7,4'-di-O-metilquercetin (ombuin) 3-O- β -rutinósido (2). Sólido amorfo amarillo intenso. $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{O}_{16}$. UV λ (nm): 256, 268 (h) y 352, 298 (h). Ningún desplazamiento se observó con la adición de NaOAc y NaOAc/ H_3BO_3 (Tabla 2.4). NMR ^1H (599,19 MHz, DMSO): δ 0,99 (3H, *d*, $J = 6,3$ Hz, H-6'''); 3,00-3,50 (señales solapadas, protones del azúcar); 3,72 (1H, H-6''); 3,87 (3H, *s*, OMe); 3,88 (3H, *s*, OMe); 4,41 (1H, $J_{ee} = 1$ Hz, H-1'''); 5,39 (1H, *d*, $J_{aa} = 7,3$ Hz, H-1''); 6,36 (1H, *d*, $J_m = 2,2$ Hz, H-6); 6,67 (1H, *d*, $J_m = 2,2$ Hz, H-8); 7,05 (1H, *d*, $J_o = 8,7$ Hz, H-5'); 7,55 (1H, *d*, $J_m = 2,3$ Hz, H-2'); 7,72 (1H, *dd*, $J_m = 2,3$ Hz, $J_o = 8,7$ Hz, H-6'). NMR ^{13}C (150,858 MHz, DMSO): δ 17,49 (C-6'''); 55,51 (OMe); 55,87 (OMe); 66,74 (C-6''); 68,04 (C-5'''); 69,77 (C-4''); 70,21 (C-2'''); 70,49 (C-3'''); 71,72 (C-4'''); 73,93 (C-2''); 75,74 (C-5''); 76,32 (C-3''); 92,10 (C-8); 100,59 (C-1'''); 101,07 (C-1''); 97,74 (C-6); 104,88 (C-10); 111,28 (C-5'); 115,70 (C-2'); 121,34 (C-6'); 122,74 (C-1'); 135,71 (C-3); 145,74 (C-3'); 150,01 (C-4'); 156,51 (C-9); 156,26 (C-2); 160,76 (C-5); 165,00 (C-7); 177,39 (C-4). [δ : desplazamiento químico; *d*, *dd*, *m*: multiplicidad doblete, doblete de doblete y multiplete, respectivamente. J_m , J_o , J_g , J_{aa} , J_{ee} : acoplamiento H-H meta, orto, geminal, axial-axial y ecuatorial-ecuatorial, respectivamente].

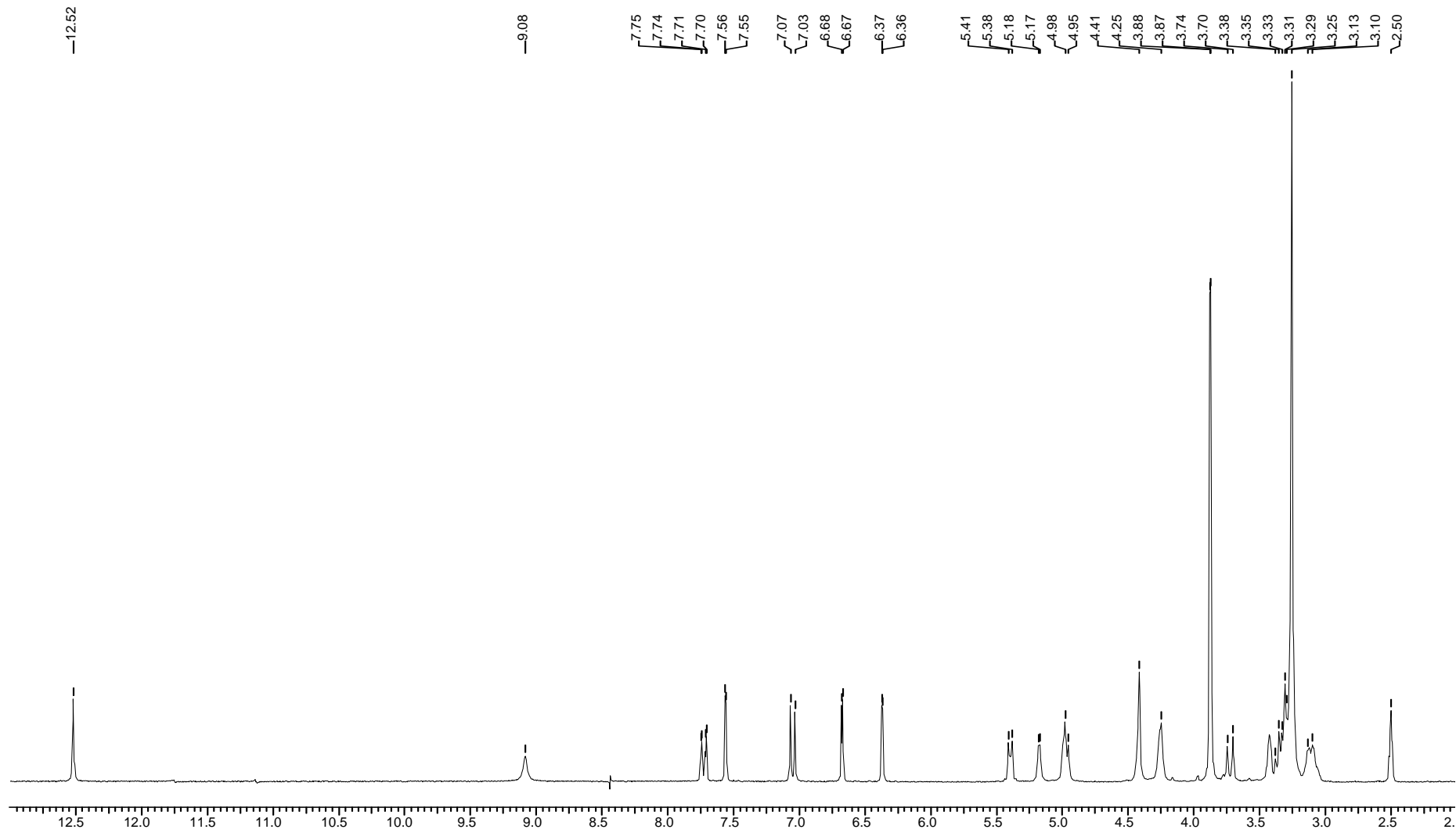


Figura 2.11. Espectro NMR ^1H del compuesto 2 (7,4'-di-O-metilquercetin (ombuin) 3-O- β -rutinósido).

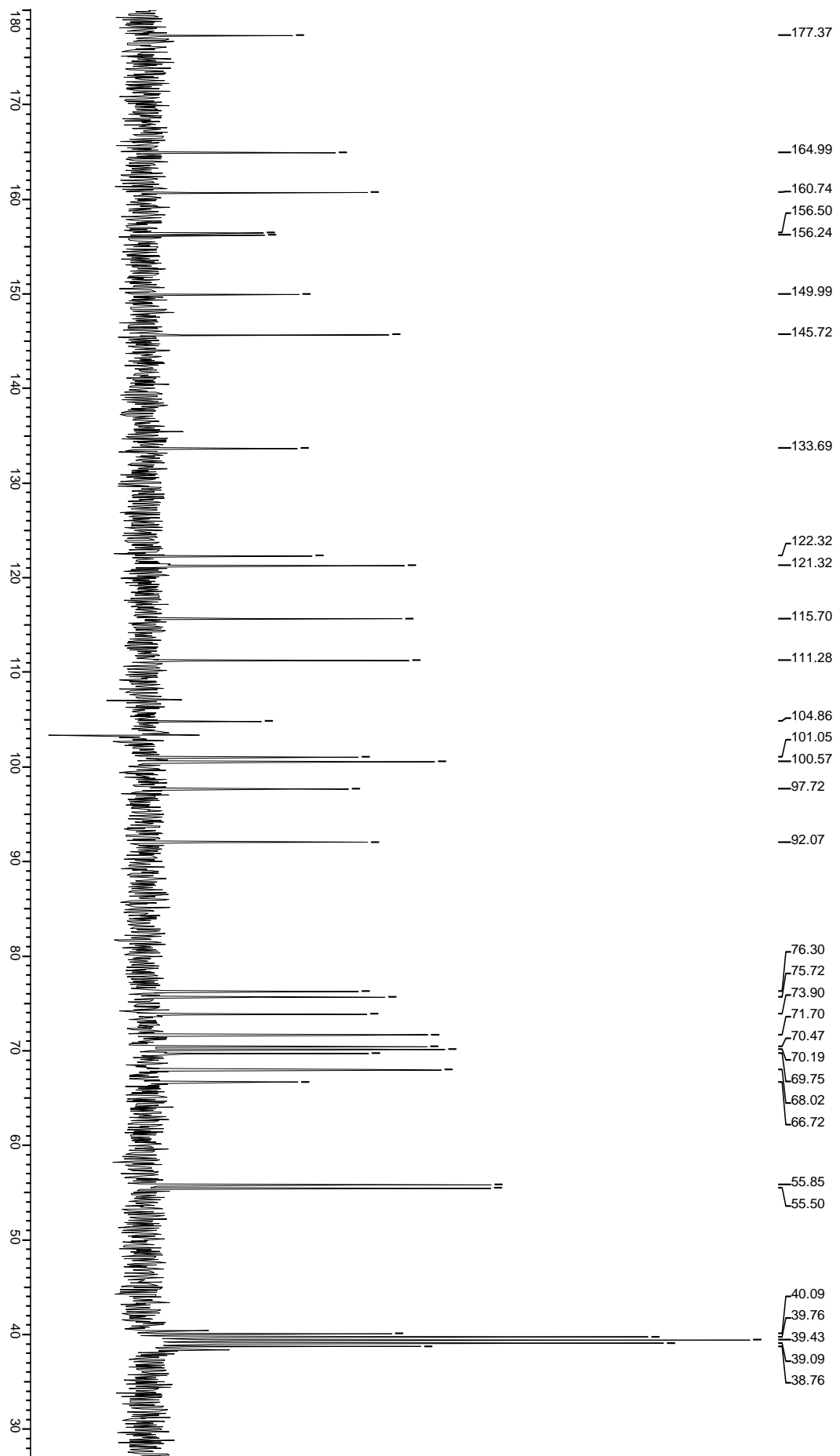


Figura 2.12. Espectro NMR ^{13}C del compuesto 2 (7,4-di-O-metilquercetin (ombuin) 3-O- β -rutinosido).

II.5.3.1.2. ombuin (7,4'-di-O-metilquercetin) 3-O-β-rutinósido 5-O-β-glucósido (1)

El espectro NMR ¹H de **1** (Figura 2.13) resultó similar respecto al de **2**, por lo que se estaba en presencia de dos glicósidos de flavonoide muy parecidos. Las señales protónicas del anillo B mostraron las mismas señales, con dos dobletes (H-2' y H-5') y un doblete de doblete (H-6') en el rango 7-8 ppm. Las señales correspondientes al anillo A (H-6 y H-8) aparecieron a campos más bajos 6,87 y 6,91 ppm, respectivamente. Esto es debido a la presencia de un sustituyente adicional en este anillo. La ausencia de una señal alrededor de 12 ppm puede ser causada por la sustitución del grupo OH en posición 5, a diferencia del OH libre de **2**. Dos metoxilos aromáticos aparecieron a igual corrimiento químico que los del flavonoide **2** (3,88 y 3,87 ppm). Los protones del azúcar aparecieron como señales solapadas entre 3-5,5 ppm, mucho más complejas que las observadas para **2**, lo cual indicó la presencia adicional de un azúcar. La comparación entre los espectros NMR ¹³C de ambos flavonoides en el rango 65-80 ppm confirmó que **1** tenía una glicosilación adicional en posición 5 (Figura 2.14). Esto se demostró por el desplazamiento de -2,61 ppm de la señal C-5 (158,15 ppm) y -4,45 ppm del grupo carbonilo C-4 (172,94 ppm), respecto a las correspondientes a **2**. Esto se encuentra típicamente asociado con una glicosilación del grupo OH en C-5 [Agrawal, 1989]. La presencia de un 5-O-glucósido se confirmó a través de la asignación de C-6^v de la glucosa a 60,8 ppm con la técnica DEPT (señal negativa de CH₂ en el espectro). El resto de los carbonos de la glucosa y rutinosa (glucosa-ramnosa) se asignaron por comparación con patrones. El compuesto **1** se identificó como el 7,4'-di-O-metilquercetin (ombuin) 3-O-β-rutinósido 5-O-β-glucósido (Figura 2.15). En contraste con las observaciones anteriores, Iñigo y col. [1985] no notaron el corrimiento de la señal del C-4 a campos más altos para la ombuina 3-rutinósido 5-glucósido, producto de la hidrólisis y derivatización de esta molécula. Esta es la primera vez que se informa la asignación completa de este flavonoide sin derivatizar.

7,4'-di-O-metilquercetin (ombuin) 3-O-β-rutinósido-5-O-β-glucósido (1). Sólido cristalino amarillo pálido. C₃₅H₄₄O₂₁. UV λ (nm): 252, 262 (h) y 346, 302 (h). Ningún desplazamiento se observó con la adición de NaOAc y NaOAc/H₃BO₃ (Tabla 2.4). NMR ¹H (599,19 MHz, DMSO): δ 3,00-3,50 (señales solapadas, protones del azúcar); 3,72 (1H, *d*, H-6^v); 3,87 (3H, *s*, OMeⁱ); 3,90 (3H, *s*, OMe); 4,42 (1H, *J_{ee}* = 1 Hz, H-1ⁱⁱⁱ); 4,83 (1H, *d*, *J_{aa}* = 7,3 Hz, H-1^{iv}); 5,25 (1H, *d*, *J_{aa}* = 7,3 Hz, H-1^v); 6,87 (1H, *d*, *J_m* = 2,2 Hz, H-6); 6,91 (1H, *d*, *J_m* = 2,2 Hz, H-8); 7,03 (1H, *d*, *J_o* = 8,8 Hz, H-5ⁱ); 7,55 (1H, *d*, *J_m* = 2,1 Hz, H-2ⁱ); 7,75 (1H, *dd*, *J_m* = 2,1 Hz, *J_o* = 8,8 Hz, H-6ⁱ). NMR ¹³C (150,858 MHz, DMSO): δ 17,50 (C-6ⁱⁱⁱ); 55,51 (OMe); 55,88 (OMe); 60,80 (C-6^{iv}); 66,68 (C-6^v); 68,02 (C-5ⁱⁱⁱ); 69,71 (C-4^{iv}); 69,83 (C-4^v); 70,18 (C-2ⁱⁱⁱ); 70,47 (C-3ⁱⁱⁱ); 71,74 (C-4ⁱⁱⁱ); 73,39 (C-2^{iv}); 73,94 (C-2^v); 75,59 (C-3^{iv}); 75,68 (C-5^{iv}); 76,38 (C-3^v); 77,47 (C-5^v); 95,59 (C-8); 100,55 (C-1ⁱⁱⁱ); 101,29 (C-1^{iv}); 102,32 (C-1^v); 103,61 (C-6); 108,82 (C-10); 111,25 (C-5ⁱ); 115,63 (C-2ⁱ); 121,22 (C-6ⁱ); 122,35 (C-1ⁱ); 135,85 (C-3); 145,68 (C-3ⁱ); 149,75 (C-4ⁱ); 154,41 (C-9); 157,41 (C-2); 158,15 (C-5); 163,52 (C-7); 172,94 (C-4).

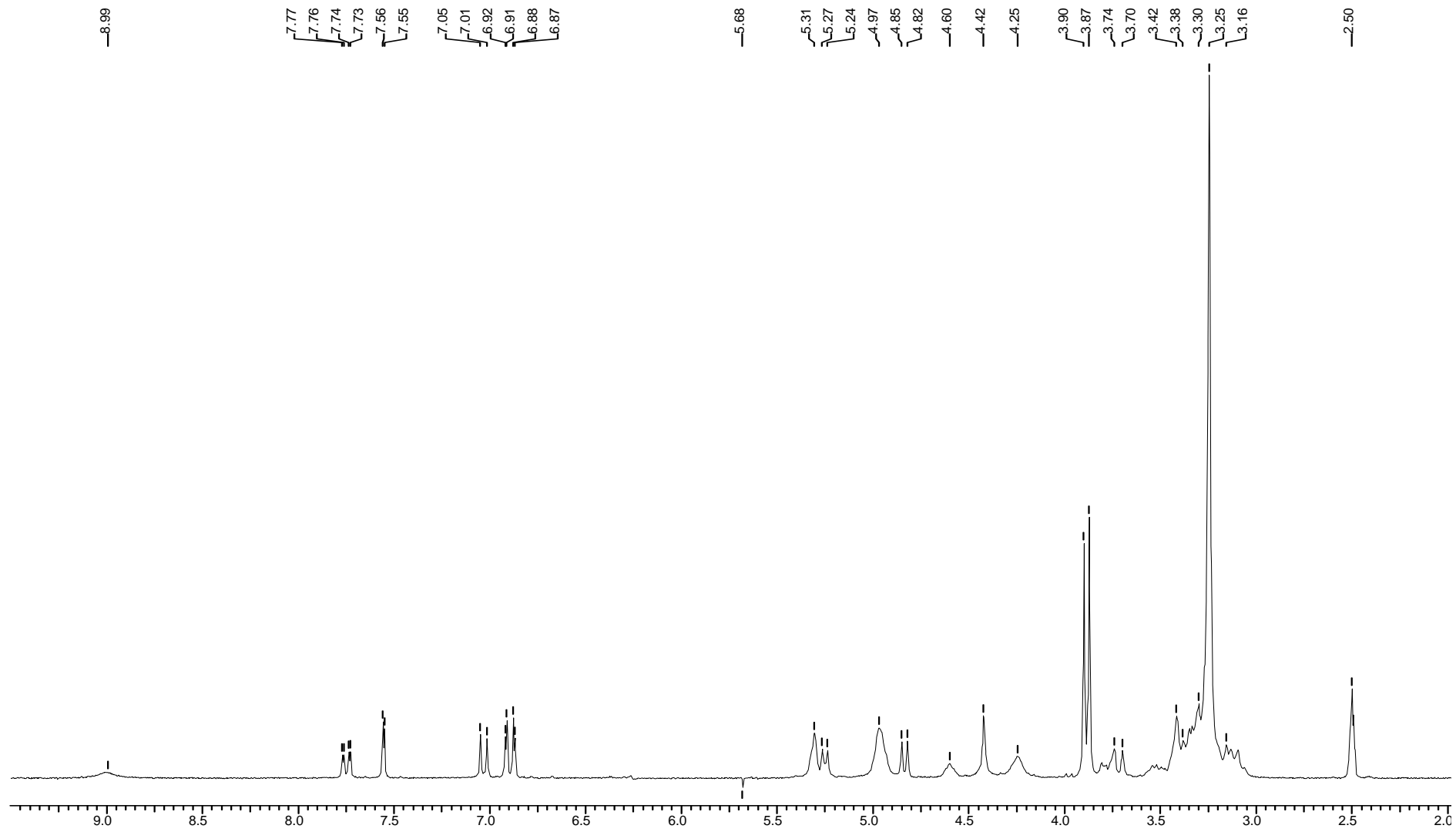


Figura 2.13. Espectro NMR ^1H del compuesto 1 (7,4'-di-O-metilquercetin (ombuin) 3-O- β -rutinósido 5-O- β -glucósido).

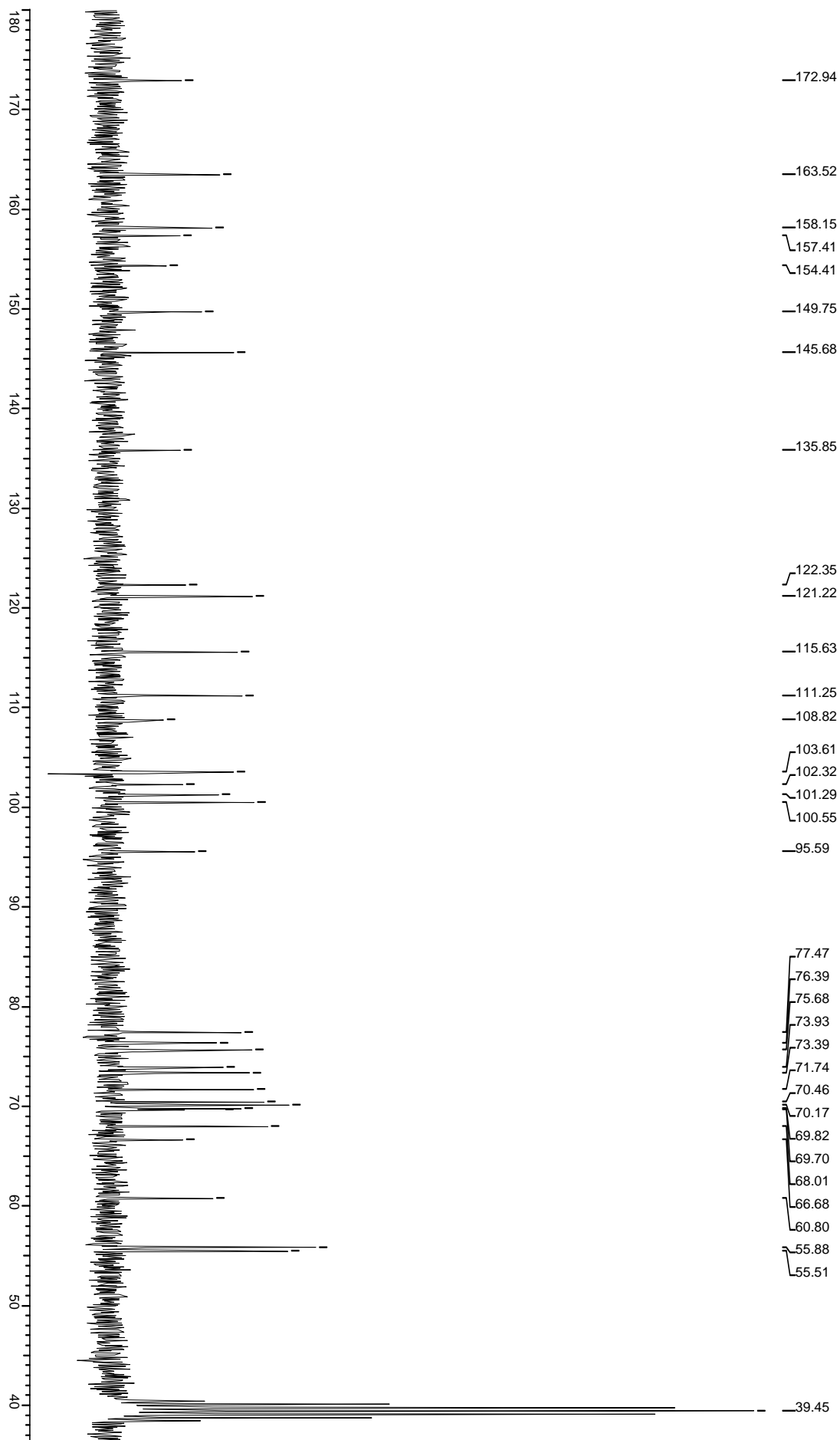


Figura 2.14. Espectro NMR ^{13}C del compuesto **1** (7,4'-di-O-metilquercetin (ombuin) 3-O- β -rutinosido 5-O- β -glucosido).

II.5.3.1.3. quercetin 3-O-β-rutinósido (rutina) (3)

El flavonoide **3** se identificó como la rutina (**Figura 2.15**) por comparación de los datos extraídos de sus espectros UV, NMR ^1H y ^{13}C [Agrawal, 1989] con el uso de un patrón (Merck, Darmstadt, Alemania).

quercetin 3-O-β-rutinósido (rutina) (3): Sólido amorfo amarillo intenso. $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$. UV λ (nm): 258, 268 (h) y 359, 297 (h). Se observaron desplazamientos batocrómicos en ambas bandas de absorción con la adición de NaOAc y NaOAc/ H_3BO_3 (**Tabla 2.4**). NMR ^1H (599,19 MHz, DMSO): δ 1,005 (3H, *d*, H-6''); 3,00-3,50 (señales solapadas, protones del azúcar); 3,72 (1H, H-6''); 4,405 (1H, H-1'''); 5,345 (1H, *d*, H-1''); 6,195 (1H, *d*, H-6); 6,38 (1H, *d*, H-8); 6,85 (1H, *d*, H-5'); 7,535 (1H, *d*, H-2'); 7,565 (1H, *dd*, H-6'). NMR ^{13}C (150,858 MHz, DMSO): δ 17,47 (C-6''); 66,81 (C-6''); 68,01 (C-5''); 69,88 (C-4''); 70,19 (C-2''); 70,44 (C-3''); 71,74 (C-4''); 73,92 (C-2''); 75,77 (C-5''); 76,34 (C-3''); 93,37 (C-8); 100,53 (C-1'''); 101,07 (C-1''); 98,48 (C-6); 103,81 (C-10); 116,12 (C-5'); 115,05 (C-2'); 121,39 (C-6'); 121,04 (C-1'); 133,18 (C-3); 144,55 (C-3'); 148,20 (C-4'); 156,39 (C-9); 156,24 (C-2); 161,04 (C-5); 163,87 (C-7); 177,19 (C-4).

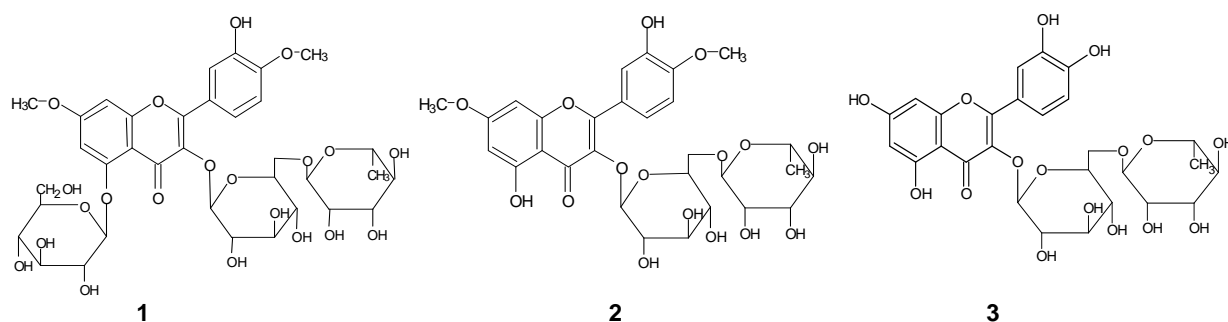


Figura 2.15. Estructura de los tres glicósidos de flavonoide

II.5.3.2. Estudio de la fracción menos polar. Triterpenos pentacíclicos

El extracto EtOH obtenido de las hojas de *E. minutifolium* (Julio/2002) se seleccionó para un posterior estudio por su mejor actividad biológica, abundancia y endemismo. Luego de conocer los componentes mayoritarios de la fracción polar del extracto, compuesta fundamentalmente por los flavonoides **1**, **2** y **3**, se utilizó una técnica combinada de HPLC-GC-MS para la caracterización química de la fracción menos polar de dicho extracto etanólico. En la **Figura 2.16** se muestran los resultados.

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Resultados y Discusión

Sin previo tratamiento de la muestra se inyectó una porción del extracto directamente en el equipo de HPLC y se optimizaron las condiciones de separación de tal manera que los componentes menos polares de la muestra emigraran con rapidez a través de la columna, mientras que los componentes más polares quedaran retenidos. Esta optimización se realizó con un juego de patrones de tres flavonoides (**1**, **2**, **3**) aislados con anterioridad a partir de un fraccionamiento del extracto. La mezcla de MeCN/H₂O constituyó una variante de fase móvil adecuada para este tipo de separación, donde un 100% de MeCN permitió una rápida migración de la fracción apolar del extracto (pico A, **Figura 2.16**) y un gradiente posterior, la migración de la fracción polar del extracto (pico B, **Figura 2.16**), la cual contiene los flavonoles **1**, **2** y **3**. Este es un aspecto de suma importancia para la técnica de HPLC-GC-MS, ya que se necesitan cromatogramas cortos que permitan una rápida transferencia hacia el cromatógrafo de gases, lo cual se traduce como un menor volumen de disolvente a hacer pasar a través de la interfase durante la preconcentración de la fracción, previa introducción al equipo.

La fracción de interés se reunió en el pico A, el cual presentó un ancho de pico de 1 min, que a un flujo de 2 mL/min permitió una transferencia a la interfase K2 con Tenax de solo 2 mL. Luego de recogida esta fracción en la interfase a 80°C, se elimina el disolvente durante 5 min con un alto flujo de He y se calienta a 250 °C para su desorción y paso a la columna del cromatógrafo de gases. En la misma **Figura 2.17**, se muestra el cromatograma obtenido por GC-MS de la fracción A, con la identificación de 30 compuestos a través de la comparación de sus espectros de masas con referencias de la librería de espectros. Una ampliación de dicho cromatograma se puede observar en la **Figura 2.17** y los compuestos identificados se listan en la **Tabla 2.5**. De esta manera se pudieron identificar ácidos grasos saturados C6 y C12-C24, ácidos grasos insaturados del C18, sus derivados metílicos y etílicos, así como fitol, ácido benzoico, tocoferol, sitosterol y triterpenos del tipo lanostano, lupano y oleanano.

Los resultados de identificación obtenidos por la técnica de GC-MS no son definitivos si no se realiza un exhaustivo análisis de los espectros de masas obtenidos para cada compuesto, ya sea a través del análisis de fragmentación característica o el uso de patrones. Estos resultados combinados con la información de la literatura, permiten una mayor seguridad en cuanto a la presencia de dichas estructuras en la muestra analizada.

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Resultados y Discusión

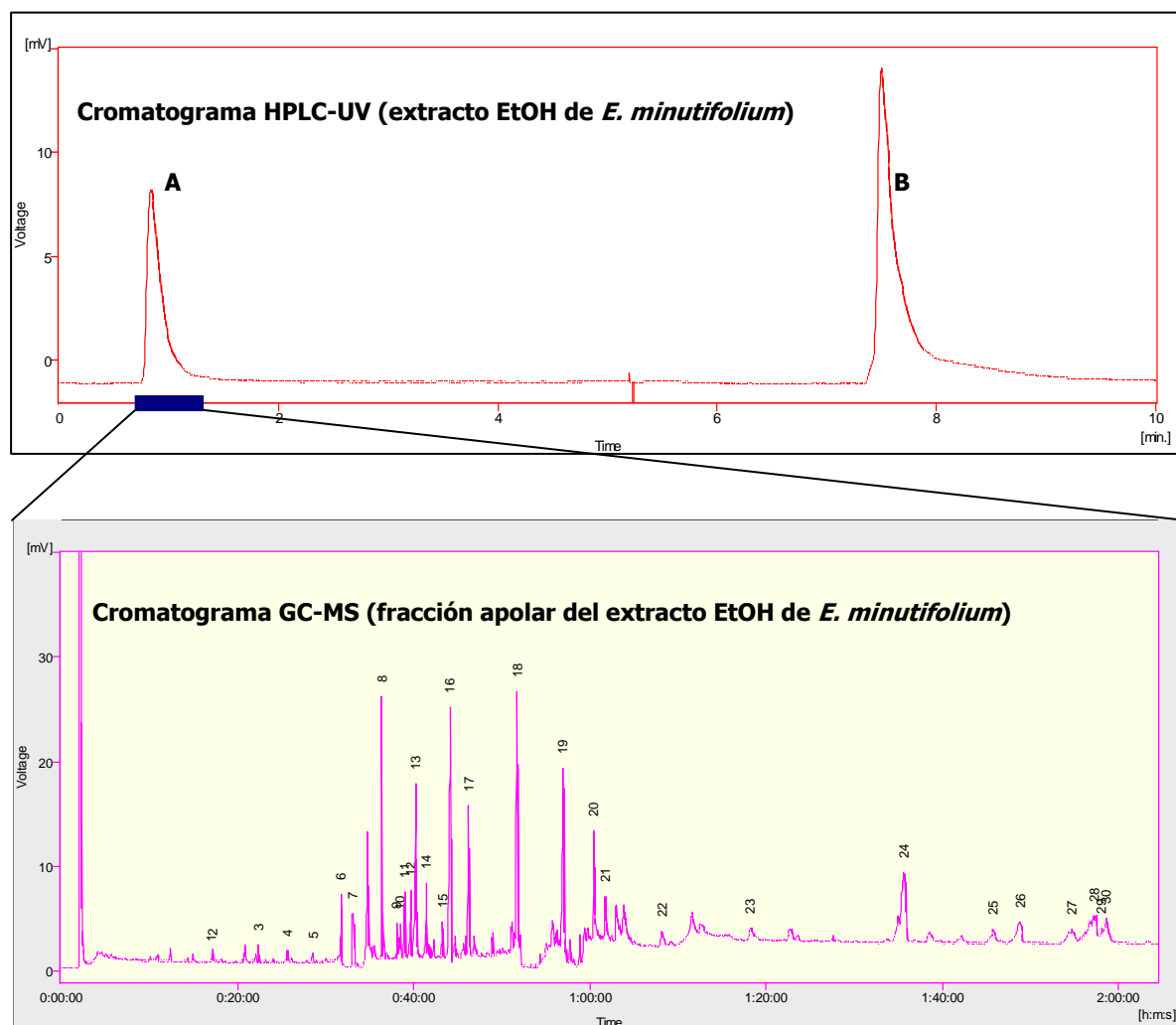


Figura 2.16. Cromatogramas HPLC-GC-MS del extracto EtOH bioactivo de *E. minutifolium*.

A: fracción apolar (254 nm), B: fracción polar (354 nm), 1-30: compuestos identificados.

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Resultados y Discusión

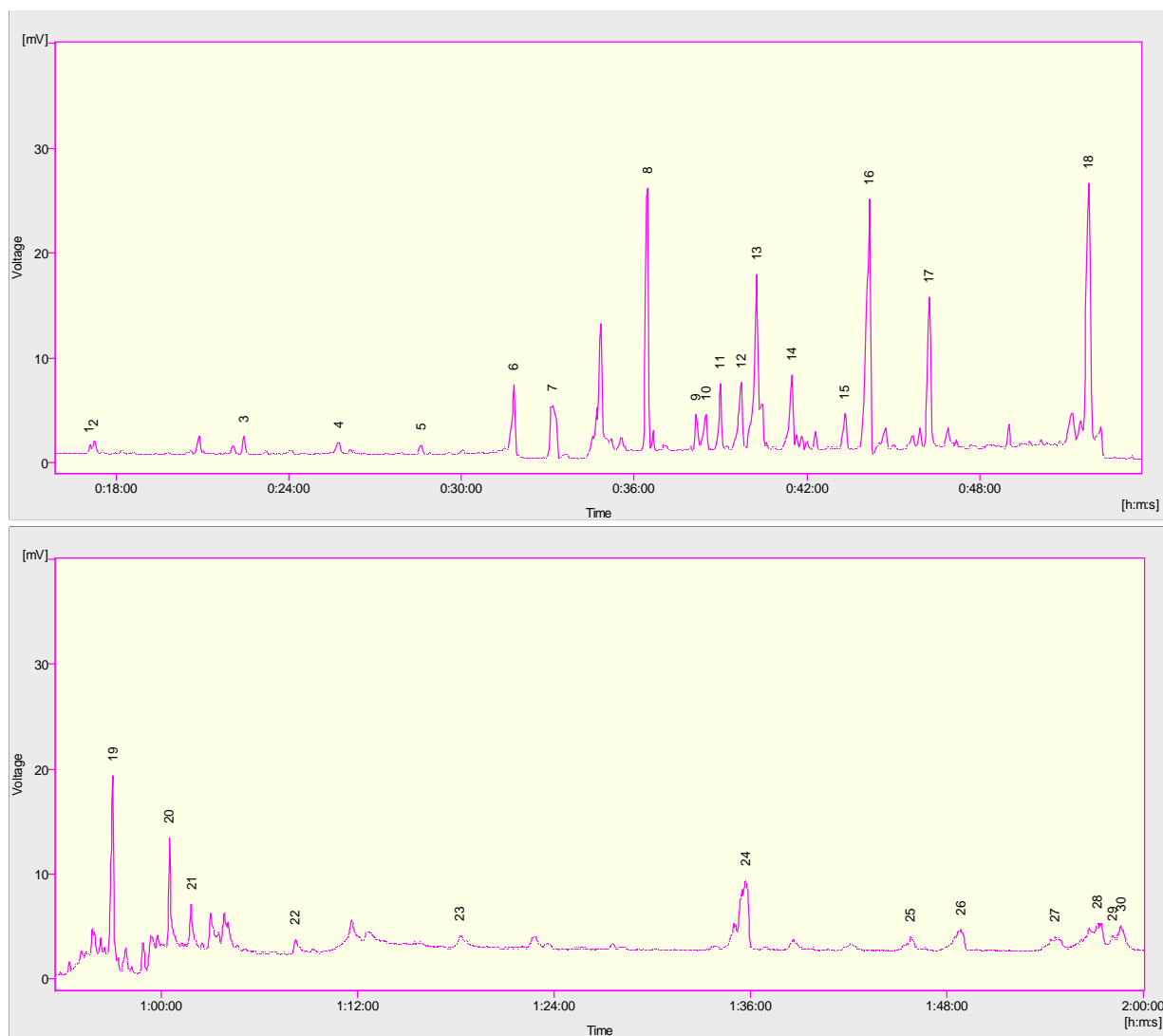


Figura 2.17. Ampliación del cromatograma GC-MS de la fracción apolar del extracto EtOH de *E. minutifolium*.

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Resultados y Discusión

Tabla 2.5. Identificación de compuestos en la fracción menos polar del extracto EtOH bioactivo de *E. minutifolium* mediante HPLC-GC-MS.

Pico	t _R [h:m:s]	Nombre del compuesto	Tipo de compuesto
1	0:17:07	dodecanoato de etilo	etiléster ác C12:0
2	0:17:16	ácido hexanoico	ác graso C6:0
3	0:22:23	ácido 2-hexenoico	ác graso C6:1 (2=3)
4	0:25:41	tetradecanoato de etilo	etiléster ác C14:0
5	0:28:30	6,10,14-trimetil 2-pentadecanona	derivado del fitol
6	0:31:41	hexadecanoato de metilo	metiléster ác C16:0
7	0:33:07	hexadecanoato de etilo	etiléster ác C16:0
8	0:36:20	desconocido	
9	0:38:07	ácido benzoico	derivado del benceno
10	0:38:25	octadecanoato de metilo	metiléster ác C18:0
11	0:38:56	9-octadecenoato de metilo	metiléster ác C18:1 (9=10)
12	0:39:35	octadecanoato de etilo	etiléster ác C18:0
13	0:40:19	9-octadecenoato de etilo	etiléster ác C18:1 (9=10)
14	0:41:30	9,12-octadecadienoato de etilo	etiléster ác C18:2 (9=10) (12=13)
15	0:43:15	9,12,15-octadecatrienoato de etilo	etiléster ác C18:3 (9=10) (12=13) (15=16)
16	0:43:57	3,7,11,15-tetrametil 2-hexadecenol (fitol)	alcohol graso
17	0:46:11	ácido tetradecanoico	ácido graso C14:0
18	0:51:47	ácido hexadecanoico	ácido graso C16:0
19	0:56:53	ácido octadecanoico	ácido graso C18:0
20	1:00:00	ácido 9,12,15-octadecatrienoico	ác graso C18:3 (9=10) (12=13) (15=16)
21	1:01:48	ácido eicosanoico	ácido graso C20:0
22	1:08:06	ácido docosanoico	ácido graso C22:0
23	1:18:07	ácido tetracosanoico	ácido graso C24:0
24	1:35:23	alfa tocoferol	vitamina E
25	1:45:55	24-metil 5-colesten-3-ol	esteroide
26	1:48:52	3-acetil 9,19-ciclolanost-24-eno	triterpeno lanostano
27	1:54:43	lup 20-en-3-ona	triterpeno lupano
28	1:57:10	sitosterol	esteroide
29	1:58:10	olean-12-eno	triterpeno oleanano
30	1:58:45	olean-12-en-3-ona 3-OH-olean-12-eno (amirina)	triterpenos oleanano

Por su interés fitoquímico, en este capítulo se realiza un análisis de los espectros de masas de los triterpenos de tipo lupano y oleanano identificados. En la **Figura 2.18** se muestran los espectros de masas del compuesto 27 y su referencia, identificado como la lupen-3-ona (**Tabla 2.5**). Los triterpenos pentacíclicos de tipo lupano presentan en su estructura cuatro anillos de seis miembros y uno de cinco miembros, este último tiene comúnmente enlazado un grupo isopropil o isopropenil. En

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Resultados y Discusión

el espectro de masas de este triterpeno se observan tres de los iones fragmento más importantes: m/z 218, 205 y 189, cuya fragmentación proviene directamente de la estructura inicial y su representación se muestra en la **Figura 2.19** [Budzikiewicz y cols., 1963]. Los tres fragmentos constituyen tres vías distintas de apertura del anillo C de la estructura del triterpeno. Para el caso de los fragmentos m/z 218 y 189, la apertura del anillo C genera fragmentos cargados de los anillos D-E, mientras que el fragmento m/z 205 contiene los anillos A-B del lupano. El espectro de masas obtenido para el compuesto 27 presenta una baja intensidad de sus iones fragmentos fundamentales debido a la interferencia producida por el solapamiento de otros compuestos que migran conjuntamente con él (**Figura 2.16**), no obstante cuando se compara con el de referencia se observa semejanza en cuanto a la relación de intensidades entre los iones fragmento de cada espectro.

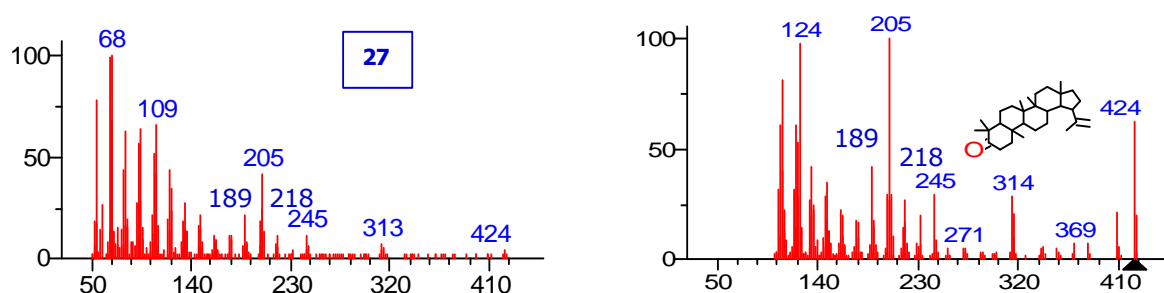


Figura 2.18. Espectros de masas del triterpeno 27 (lup 20-en-3-ona) y referencia.

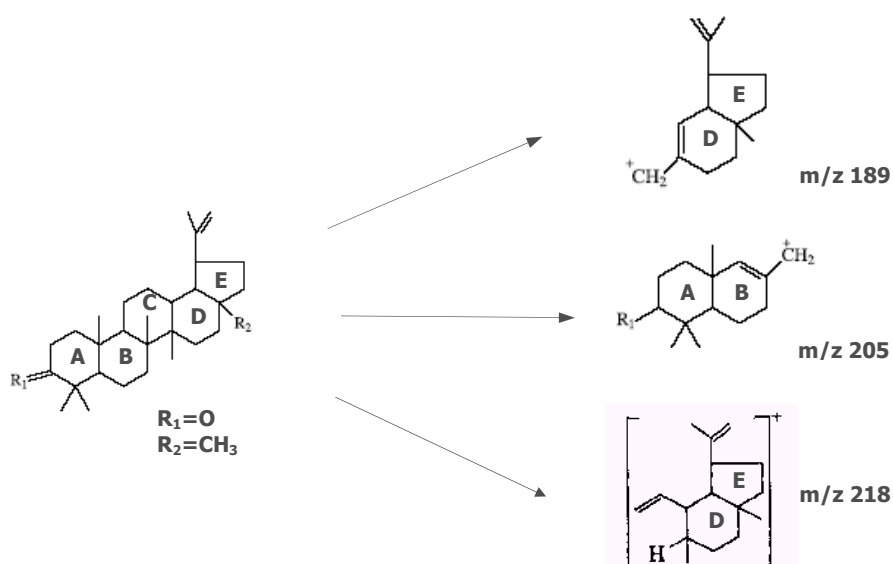


Figura 2.19. Fragmentación característica de los triterpenos de tipo 20-lupenos 3-sustituídos.

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Resultados y Discusión

Los picos identificados como 29 y 30 contienen una mezcla de oleananos 12-insaturados. Este resultado se obtuvo a través de la comparación de sus espectros con espectros de referencia (**Figura 2.20**). Para este tipo de triterpeno pentacíclico insaturado, formado por cinco anillos de seis miembros, la fragmentación característica sigue la vía de la reacción retro-Diels-Alder, la cual se inicia a partir del doble enlace en posición 12-13 del anillo C (**Figura 2.21**). De esta manera se obtienen los iones fragmento m/z 218, 203, 189 y 133, como los más significativos. La fragmentación retro-Diels-Alder provoca la ruptura del anillo C y la formación del ión fragmento más abundante en el espectro con una m/z 218. A partir de esta especie iónica se obtiene el fragmento m/z 203 por la pérdida del CH_3 de la posición 17. Otra fragmentación que puede ocurrir a partir de la especie de m/z 218 es la pérdida de $\text{C}-\text{CH}_3$ en la misma posición y ganancia de 2H , lo que produce el fragmento de m/z 189, el cual a través de una fragmentación posterior y producto de la apertura del anillo E se obtiene el fragmento de m/z 133 [Budzikiewicz y cols., 1963].

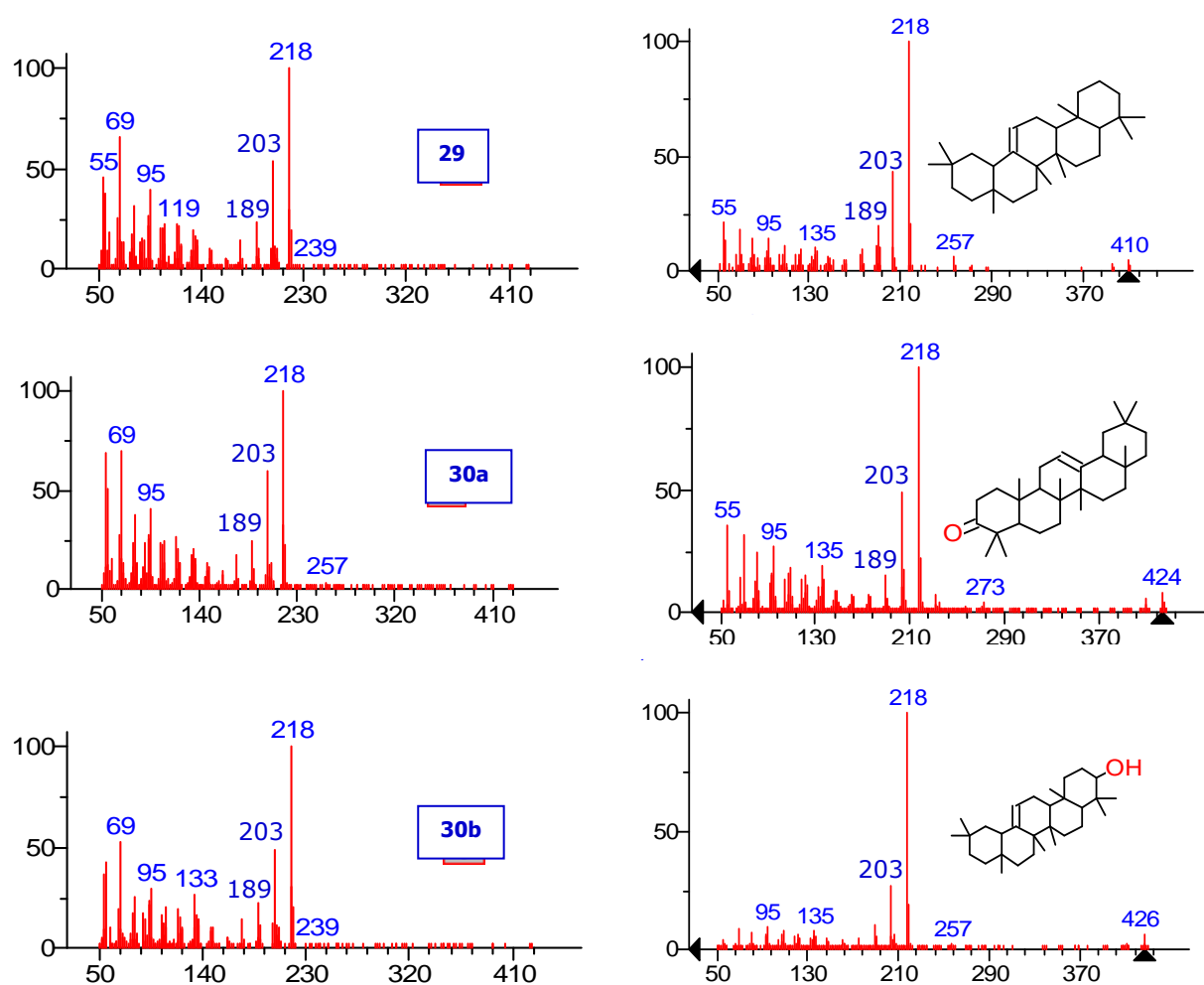


Figura 2.20. Espectros de masa de los triterpenos 29, 30a y 30b (12-oleaneno y 12-oleanenos 3-sustituidos) y referencias correspondientes.

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxyllum*

Resultados y Discusión

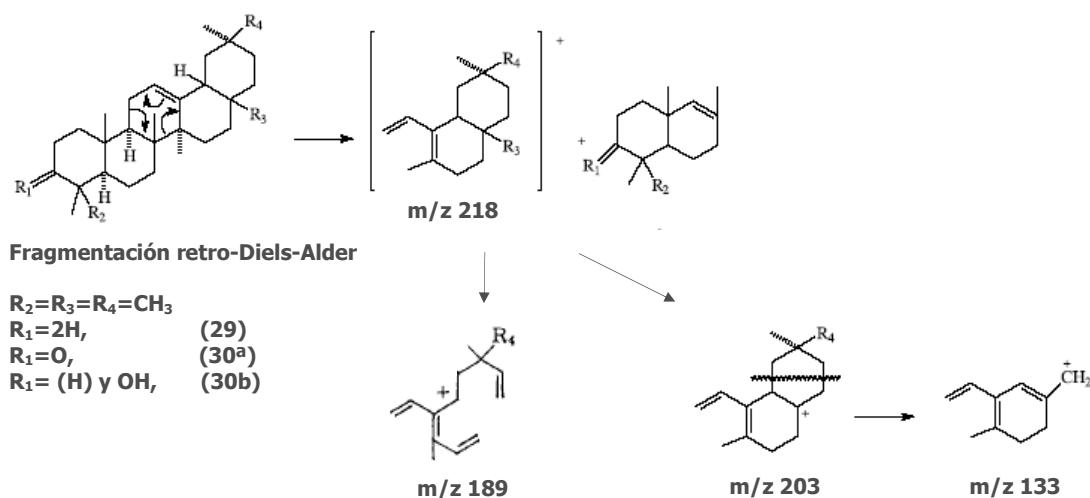


Figura 2.21. Fragmentación característica de los triterpenos de tipo 12-oleanenos 3-sustituidos.

II.5.4. Estudio quimiotaxonómico de flavonoides en especies de *Erythroxyllum*

Se han realizado extensos estudios de la presencia de flavonoides en especies de *Erythroxyllum* con el propósito de aplicar estos datos químicos para llegar a una mejor comprensión de relaciones quimiotaxonómicas dentro del género en su totalidad [Bohm y col., 1988; Jonhson y col., 1997-2004]. No obstante, ningún estudio ha estado encaminado hacia la determinación cuantitativa de estos compuestos en el material vegetal.

Para lograr un aproximación al conocimiento del patrón de flavonoides característico de las especies de *Erythroxyllum* que crecen en Cuba, se llevó a cabo la identificación y el análisis cuantitativo de los tres rutinósidos de flavonoide (**1-3**) obtenidos anteriormente de la especie *E. minutifolium*, así como de la quercetina, en las hojas y ramas de cuatro especies del género. Como el objetivo presente consiste en conocer si estos flavonoides constituyen los principales metabolitos de especies de Cuba, se recolectó material vegetal fresco en Mayo 2003, excepto para la especie *E. minutifolium* (Abril 2001 y Julio 2002), debido al interés de correlacionar estos resultados con resultados de actividad biológica para esta especie, fundamentalmente las hojas recolectadas en Julio 2002, material vegetal seleccionado para el estudio de fraccionamiento del extracto bioactivo.

El extracto de flavonoides se obtuvo a través de cuatro extracciones por maceración con MeOH:H₂O a partir del material vegetal seco. Después de la última extracción, el contenido de flavonoides se obtuvo por debajo del límite de detección de la técnica. Una metodología desarrollada durante esta investigación que incluye el uso de la HPLC y detección UV a 354 nm, se empleó para separar y cuantificar los flavonoides por el método del estándar externo (curva de calibrado) y el uso de los flavonoides **1**, **2** y **3**, purificados por recristalización en EtOH, y quercetina como patrones.

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Resultados y Discusión

La identificación de los picos en el cromatograma se basó en los tiempos de retención y los espectros UV obtenidos por comparación con los patrones. Los resultados se muestran en la **Figura 2.22** y **Tabla 2.6** (datos subrayados corresponden a la recolecta de *E. minutifolium*, Julio 2002).

El método permitió una determinación específica de cada flavonoide con una buena resolución de picos en la mayoría de los casos (**Figura 2.22**), tanto para la disolución de patrones como para las muestras problemas. Se obtuvo una buena linealidad ($r > 0,98$) en el intervalo de concentración empleado (**Tabla 2.6**) y según los cromatogramas de la **Figura 2.22**, se identificaron glicósidos en todas las muestras, con excepción de las ramas de *E. confusum* y *E. areolatum*, donde no se identificó la rutina. La quercetina (Qr) no se identificó por esta técnica en ninguna de las muestras vegetales. Este resultado negativo está en correspondencia con estudios de variación de flavonoides en *Erythroxylum* [Bohm y col., 1988], en los cuales la Qr siempre aparece como mono y diglicósido. Hasta el momento no existe información en la literatura científica de la presencia de Qr en el género.

Tabla 2.6. Tiempos de retención, máximos UV y linealidad del método para los flavonoides en hojas y ramas de cuatro especies de *Erythroxylum* (n=3)

	t_R (min)	absorbancia UV (nm)	$y=ax+b$, modelo lineal	
			r	c (mg/mL)
1	3,92	252; 262h; 302h; 346	0,9971	0,51; 0,25; 0,13
3	4,70	258,5; 268h; 298h; 352	0,9899	0,72; 0,36; 0,18
Qr	9,72	255; 269h; 301h; 370	0,9903	0,50; 0,25; 0,12
2	10,84	256; 268h; 298h; 352	0,9948	0,46; 0,23; 0,11

1: ombuin-3-rutinósido-5-glucósido, **2:** ombuin-3-rutinósido, **3:** rutina, **Qr:** quercetina, h: hombro, r : coeficiente de correlación, c : concentración

Al realizar una comparación de los perfiles cromatográficos, se puede plantear que en la mayoría de las muestras vegetales estos tres rutinósidos constituyen los principales flavonoides de la fracción polifenólica. Sin embargo, las hojas de la especie *E. confusum* presenta una marcada diferencia composicional, con la detección de otros flavonoides no identificados, alrededor de 6, 12 y 13 minutos (**Figura 2.22**).

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Resultados y Discusión

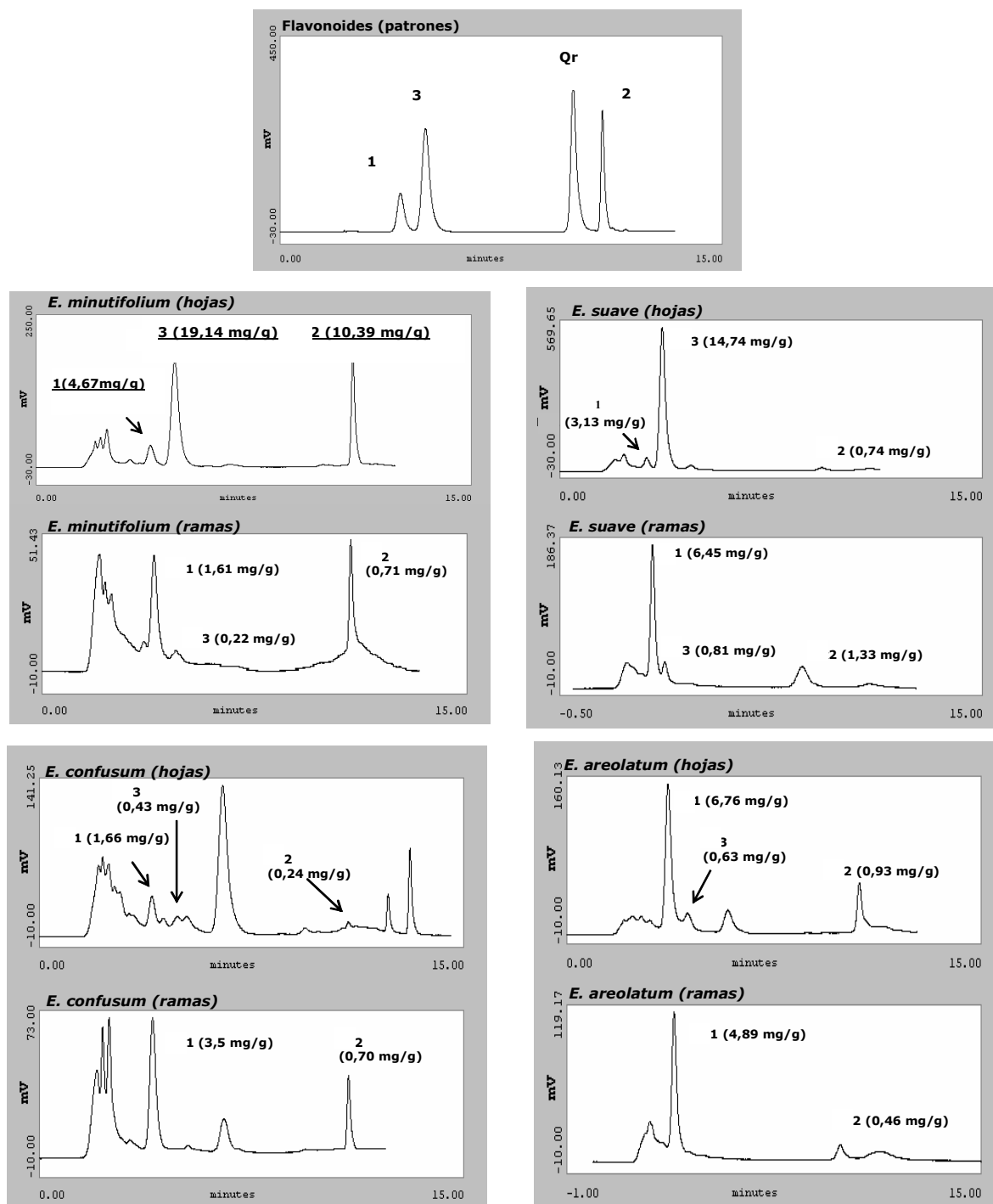


Figura 2.22. Cromatogramas obtenidos durante la determinación de flavonoides en hojas y ramas de cuatro especies de *Erythroxylum*. Columna: Hypersil ODS C18 250x4,0 mm (10 μ m), V_{iny} : 20 μ l, λ : 354 nm, flujo: 1 ml/min, fase móvil: A-1% H_3PO_4 /MeOH (7:3), B-100% MeOH, Gradiente: 25% B (5 min), 25-80% B (5-10 min)

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxyllum*

Resultados y Discusión

No existe en la literatura ningún precedente de análisis cuantitativo de flavonoides en especies del género. Los resultados obtenidos en el presente estudio se ilustran en la **Tabla 2.7**, los cuales mostraron variaciones significativas de rutinósidos entre las diferentes muestras. El flavonoide **3** se determinó en un rango de concentraciones de 19,1 mg/g (hojas de *E. minutifolium*, Julio 2002) a 0,2 mg/g (ramas de *E. minutifolium*). La concentración de **3** en hojas siempre resultó superior que en ramas, lo cual indicó una mayor acumulación del flavonoide en las hojas de estas especies. En las ramas de *E. confusum* y *E. areolatum* no se identificó el glicósido. La rutina (**3**) se encuentra ampliamente distribuida en el reino vegetal, y en el género *Erythroxyllum* se ha identificado en 9 especies (**Tabla 2.8**).

Los flavonoides **1** y **2** se identificaron en las hojas y ramas de las cuatro especies (**Tabla 2.7**). El flavonoide **2** se determinó en un rango de concentraciones de 10,4 mg/g para las hojas de *E. minutifolium* (Julio 2002) a 0,24 mg/g para las hojas de *E. confusum*. Este glicósido constituye un flavonol específico de *Erythroxyllum* (**Tabla 2.8**), y sólo se ha identificado fuera del género en dos especies: *Phytolacca dioica* [Soliman y Sobieh, 1999] y *Flyriella parryi* [Mabry y col., 1981]. Para **1**, el rango de concentración se determinó entre 6,76 mg/g (hojas de *E. areolatum*) y 1,61 mg/g (ramas de *E. minutifolium*). Este raro e inusual flavonol se ha atribuido solamente al género *Erythroxyllum* y no se ha encontrado en ninguna otra fuente natural hasta la actualidad. En adición a estudios realizados por Iñigo y col. [1985, 1988] con las especies *E. argentinum* y *E. cuneifolium* (**Tabla 2.8**), en el presente estudio se informa la detección de este flavonoide en hojas y ramas de cuatro especies cubanas.

Tabla 2.7. Contenido de flavonoles en hojas y ramas de cuatro especies de *Erythroxyllum*

Muestra	1		3		Qr	2	
	[] ± SD	RSD (%)	[] ± SD	RSD (%)		[] ± SD	RSD (%)
<u>E. min. (h)</u>	<u>4,67 ± 0,05</u>	<u>1,15</u>	<u>19,14 ± 0,09</u>	<u>0,46</u>	–	<u>10,39 ± 0,13</u>	<u>1,23</u>
<u>EtOH (h)</u>	<u>33,36 ± 0,05</u>	<u>1,15</u>	<u>136,71 ± 0,09</u>	<u>0,46</u>	–	<u>74,21 ± 0,13</u>	<u>1,23</u>
E. min. (h)	2,12 ± 0,04	1,92	5,12 ± 0,02	0,44	–	3,30 ± 0,05	1,55
E. min. (r)	1,61 ± 0,03	1,57	0,22 ± 0,01	4,58	–	0,71 ± 0,03	3,95
E. conf. (h)	1,66 ± 0,03	1,78	0,43 ± 0,01	1,96	–	0,24 ± 0,01	0,98
E. conf. (r)	3,5 ± 0,1	2,75	–	–	–	0,70 ± 0,03	3,86
E. areo. (h)	6,76 ± 0,08	1,25	0,63 ± 0,02	2,83	–	0,93 ± 0,01	1,24
E. areo. (r)	4,89 ± 0,04	0,87	–	–	–	0,46 ± 0,02	3,53
E. sua. (h)	3,13 ± 0,12	3,72	14,74 ± 0,23	1,54	–	0,74 ± 0,01	1,55
E. sua. (r)	6,45 ± 0,18	2,82	0,81 ± 0,01	0,45	–	1,33 ± 0,02	1,42

1: ombuin-3-rutinósido-5-glucósido, 2: ombuin-3-rutinósido, 3: rutina, Qr: quercetina, E. min.: *E. minutifolium*, E. conf.: *E. confusum*, E. areo.: *E. areolatum*, E. sua.: *E. suave*, h: hojas, r: ramas, SD: desviación estándar (n=3), RSD: coeficiente de variación, []: mg/g de material seco por triplicado para cada muestra. Los datos subrayados pertenecen a las hojas y al extracto EtOH bioactivo de las hojas de *E. minutifolium* (Julio 2002).

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Resultados y Discusión

Tabla 2.8. Presencia de los tres rutinósidos de flavonoles en especies de *Erythroxylum*

Especie	1	2	3	Referencia
<i>E. argentinum</i>	+	+	+	Iñigo y Pomilio, 1985
<i>E. barbatum</i>		+		Bohm y col., 1988
<i>E. campestre</i>		+		Bohm y col., 1988
<i>E. coca</i>			+	Paris y Delaveau, 1963
<i>E. coca var. novogranatense</i>		+	+	Paris y Delaveau, 1963; Bonefeld y col., 1986
<i>E. coca var. spruceanum</i>			+	Paris y Delaveau, 1963
<i>E. cuneifolium</i>	+	+		Iñigo y col., 1988
<i>E. daphnites</i>		+		Bohm y col., 1988
<i>E. engleri</i>		+	+	Bohm y col., 1988
<i>E. lofgrenii</i>		+	+	Bohm y col., 1988
<i>E. novogranatense</i>		+		Bohm y col., 1988
<i>E. pruinatum</i>		+		Bohm y col., 1988
<i>E. rufum</i>			+	Bohm y col., 1988
<i>E. squamatum</i>		+		Bohm y col., 1988
<i>E. subracemosum</i>		+	+	Bohm y col., 1988
<i>E. subrotundum</i>		+		Bohm y col., 1988
<i>E. vacciniifolium</i>		+	+	Bohm y col., 1988
<i>E. tenue</i>		+		Bohm y col., 1988

1: ombuin-3-rutinósido-5-glucósido, 2: ombuin-3-rutinósido, 3: rutina

Las hojas de *E. minutifolium* recolectadas en Julio 2002, presentaron la mayor concentración de **2** y **3** respecto al resto de las muestras vegetales (**Tabla 2.7**). Si se tiene en cuenta el contenido de los tres flavonoides en el extracto (**Tabla 2.7**) y el rendimiento del extracto de 47,91 g (**Figura 2.5**), se puede obtener que el 24,4 % del contenido total de dicho extracto bioactivo está compuesto por la mezcla de estos tres glicósidos de flavonoides. Si se tiene en cuenta además el contenido de fenoles totales para el extracto (47 %, **Tabla 2.5**), se puede inferir que estos tres flavonoides constituyen los principales componentes de la fracción polifenólica en el extracto, lo cual podría explicar la actividad antioxidante y antiviral encontrada para *E. minutifolium* (**Tabla 2.5**).

Los resultados mostrados en la **Tabla 2.7** confirman que los glicósidos de ombuina son marcadores quimiosistemáticos característicos del género *Erythroxylum*. El rutinósido **2** se ha identificado en 15 especies del género, mientras que **1** sólo en dos especies (**Tabla 2.8**). El último estudio donde se menciona este raro flavonol data de 1988 y hasta ese momento se utilizaron soportes cromatográficos de silicagel y Sephadex LH-20. La similitud de propiedades cromatográficas de estos glicósidos pudo haber causado la falta de indentificación de **1** en el género durante los

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Resultados y Discusión

estudios realizados en la década de los años 80, período en el que se estudiaron los flavonoides de *Erythroxylum* con profundidad. Los resultados encontrados para estas especies que crecen en el occidente de Cuba, indican la importancia de reinvestigar especies de *Erythroxylum* para la identificación de **1**, a través del método de HPLC descrito anteriormente.

El presente estudio constituye la primera información de análisis cuantitativo de flavonoides en especies de *Erythroxylum* y la primera descripción quimiotaxonómica de este tipo de compuestos en especies que crecen en Cuba.

II.5.5. Fraccionamiento guiado por bioensayos del extracto EtOH de *E. minutifolium*

Los resultados obtenidos durante el tamizado fitoquímico y biológico de seis especies de *Erythroxylum* demostraron un potencial antioxidante y antiviral de los extractos polares de las hojas de estas especies, además de una concentración elevada de polifenoles en este órgano de la planta. El aislamiento y elucidación estructural de tres glicósidos de flavonoide a partir de las hojas de la especie *E. minutifolium*, permitió conocer la existencia de una elevada concentración de estos glicósidos en varias especies que crecen en Cuba durante un análisis cuantitativo realizado por HPLC. La convergencia entre estos resultados indicó que la especie *E. minutifolium* constituye la muestra a seleccionar para iniciar la búsqueda de los agentes bioactivos a través del estudio del fraccionamiento del extracto y la evaluación biológica de las fracciones y compuestos aislados. El resultado de la mejor actividad biológica sumado a la característica de esta planta de ser una especie endémica y a la vez abundante en el archipiélago cubano [Oviedo, 2001], hacen del extracto en EtOH del *E. minutifolium* el mejor candidato para iniciar el estudio.

El extracto activo de EtOH se preparó a través de extracción en Soxhlet a partir de 300 g de hojas secas. La metodología de fraccionamiento (**Figura 2.5**) se diseñó al tener en cuenta los resultados fitoquímicos anteriores y de actividad antioxidante y antiherpética del extracto y sus fracciones, cuyos resultados se analizan en detalle más adelante. En un primer paso se obtuvo por precipitación con Me₂CO un sólido (**B**) y un sobrenadante (**A**), del cual se obtuvo luego de una segunda precipitación, esta vez con CHCl₃, un sólido amarillo (**D**), y una fracción clorofórmica (**C**) (**Figura 2.5**).

II.5.5.1. Caracterización química de las fracciones

En la fracción **B** se identificaron predominantemente por TLC taninos condensados, mientras que a partir de la fracción **D** se aislaron por MEC los tres flavonoides mayoritarios de la planta: la ombuina-3-O-rutinósido-5-O-glucósido (**1**), la ombuina-3-O-rutinósido (**2**) y la rutina (**3**), los cuales habían sido aislados con anterioridad. Un análisis por HPLC de esta fracción **D** permitió comprobar

que estos tres flavonoides eran básicamente los únicos componentes de esta fracción. En relación a la fracción **C**, se aislaron mediante DFC y MEC el palmitato de β -amirina (**4**), la catequina (**5**) y el β sitosterol (**6**). Un análisis por GC-MS de la fracción **C** permitió comprobar que contenía los mismos componentes de la fracción apolar del extracto total, cuya composición se estudió previamente por HPLC-GC-MS. El fraccionamiento de esta fracción **C** se detalla a continuación.

II.5.5.1.1. palmitato de β -amirina (**4**)

De la segunda y tercera fracción obtenida por DFC de **C** precipitaron 54,7 mg de un triterpeno identificado como el palmitato de β -amirina (**4**, **Figura 2.23**). La identificación se realizó por TLC, con el uso de hexano-AcOEt (9:1) como fase móvil y Ce(SO₄)₂ como revelador, mediante comparación de su valor de R_f (0,92) respecto a un patrón. Se realizó la elucidación estructural por comparación de los espectros de NMR ¹H, NMR ¹³C, DEPT, HHCOSY y HSQC, así como de MS, respecto a los datos publicados en la literatura [Agrawal y Jain, 1992; Chávez y col., 1996; Barreiros y col., 2002; González y col., 2008]. Este triterpeno de tipo oleanano, esterificado en posición 3 por un ácido graso (**Figura 2.23**), es característico del género y se ha identificado con anterioridad en cinco especies de *Erythroxylum*: *E. argentinum* [Iñigo y Pomilio, 1984], *E. leal costae* [Chávez y col., 1996], *E. passerinum* [Barreiros y col., 2002], *E. mummularia* [Barreiros y col., 2005] y *E. confusum* [González y col., 2008]. Presenta como esqueleto base la amirina, de la cual se han aislado, en forma no esterificada, sus dos confórmeros α y β , de las especies *E. argentinum* y *E. passerinum*, y se encuentra ampliamente distribuida en el reino vegetal. Sólo en este género aparece con ácidos grasos de 16 y 18 átomos de carbono enlazados a la estructura [Barreiros y col., 2005].

palmitato de β -amirina (4): Sólido amorfo amarillo pálido. C₄₆H₈₀O₂. NMR ¹H (250,13 MHz, CH₃Cl): 0,8-2 (señales solapadas, protones del oleanano); 2,29 (2H, t, CH₂); 4,5 (1H, t, H-3); 5,18 (1H, t, H-12). NMR ¹³C (62,90 MHz, CH₃Cl): δ 38,23 (C-1); 22,68 (C-2); 80 (C-3); 37,74 (C-4); 55,23 (C-5); 18,25 (C-6); 32,57 (C-7); 39,00 (C-8); 47,21 (C-9); 36,82 (C-10); 23,52 (C-11); 121,62 (C-12); 145,18 (C-13); 41,69 (C-14); 26,91 (C-15); 26,12 (C-16); 32,47 (C-17); 47,53 (C-18); 46,77 (C-19); 31,07 (C-20); 34,85 (C-21); 37,13 (C-22); 28,39 (C-23); 16,76 (C-24); 15,54 (C-25); 16,79 (C-26); 25,95 (C-27); 28,04 (C-28); 33,32 (C-29); 23,68 (C-30); 173,65 (COO); 14,12 (CH₃); 23,59 (CH₂); 25,17 (CH₂); 29,17 (CH₂); 29,26 (CH₂); 29,36 (CH₂); 29,46 (CH₂); 29,58 (CH₂); 29,69 (CH₂)_n; 31,92 (CH₂); 34,72 (CH₂). MS (electrospray ESI+, 10 ppm en CHCl₃/MeOH, 1:2) M+Na⁺=687,6.

II.5.5.1.2. catequina (**5**)

De la fracción 21 obtenida de **C** se aisló por DFC y MEC un flavonoide identificado como catequina (**5**, **Figura 2.23**). La identificación se realizó por TLC, con el uso de CHCl₃-MeOH (8:2)

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Resultados y Discusión

como fase móvil, mediante comparación de su valor de R_f (0,36) respecto a un patrón. La caracterización completa se realizó por comparación de sus espectros de NMR ^1H , NMR ^{13}C , DEPT, HHCOSY, HSQC y HMBC, respecto a datos de la literatura [Agrawal, 1989]. Este flavano se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y sólo se había aislado con anterioridad en una especie del género: *E. novogranatense* [Bonefeld y col., 1986].

3,3',4',5,7 tetrahidroxiflavano (catequina) (5): Sólido amorfo naranja. $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{O}_5$. NMR ^1H (250,13 MHz, MeOH): δ 2,5/2,8 (2H, *dd*, $J_g=15$ Hz, $J_v=7,8$ Hz, CH_2); 4 (1H, *d*, $J=8$ Hz, CH); 4,5 (1H, *m*, CH); 5,9 (1H, *d*, $J_m=2,8$ Hz, H-8); 5,95 (1H *d*, $J_m=2,8$ Hz, H-6); 6,75 (1H, *dd*, $J_o=8,3$ Hz, $J_m=2,8$ Hz, H-6'); 6,8 (1H, *d*, $J_o=8,3$ Hz, H-5'); 6,9 (1H, *d*, $J_m=2,8$ Hz, H-2'). NMR ^{13}C (62,90 MHz, MeOH): δ 28,4 (C-4); 68,7 (C-3); 82,7 (C-2); 95,5 (C-8); 96,3 (C-6); 100,8 (C-10); 115,2 (C-2'); 116,1 (C-5'); 120,02 (C-6'); 132,1 (C-1'); 146,08 (C-3'); 146,11 (C-4'); 156,8 (C-9); 157,4 (C-5); 157,6 (C-7).

II.5.5.1.3. β -sitosterol (6)

A partir de las fracciones 11 y 12 obtenidas de **C** se obtuvieron por DFC 112,3 mg de un fitosterol identificado como el β -sitosterol (**6**, **Figura 2.23**). La caracterización completa se realizó por comparación de sus espectros de NMR ^1H , NMR ^{13}C , DEPT, HHCOSY, HSQC, HMBC y NOE respecto a datos publicados en la literatura [De-Eknamkul y Potduang, 2003]. Este compuesto se había identificado durante el análisis por HPLC-GC-MS del extracto EtOH de *E. minutifolium*.

β -sitosterol (6): Sólido cristalino en forma de agujas. $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$. NMR ^1H (250,13 MHz, CH_3Cl): 0,6-2,4 (señales solapadas, protones del fitosterol); 3,50 (1H, *m*, H-3); 5,34 (1H, *m*, H-5). NMR ^{13}C (62,90 MHz, CH_3Cl): δ 37,15 (C-1); 31,47 (C-2); 71,72 (C-3); 42,11 (C-4); 140,62 (C-5); 121,60 (C-6); 31,81 (C-7); 31,81 (C-8); 50,03 (C-9); 36,40 (C-10); 20,98 (C-11); 39,68 (C-12); 42,23 (C-13); 56,66 (C-14); 24,20 (C-15); 28,15 (C-16); 55,96 (C-17); 11,76 (C-18); 19,29 (C-19); 36,04 (C-20); 18,68 (C-21); 33,85 (C-22); 25,98 (C-23); 45,73 (C-24); 29,06 (C-25); 19,76 (C-26); 18,94 (C-27); 22,97 (C-28); 11,88 (C-29).

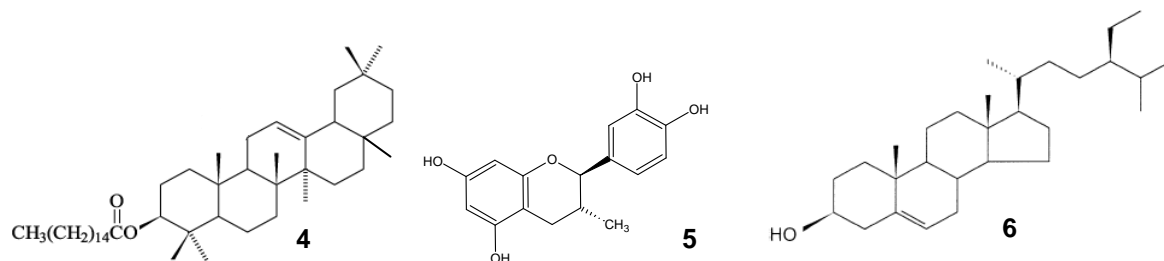


Figura 2.23. Estructura del palmitato de β -amirina (4), catequina (5) y β -sitosterol (6).

II.5.5.2. Caracterización biológica de las fracciones

II.5.5.2.1. *Capacidad de transferencia de electrones y de átomos de H*

En la **Tabla 2.9** se muestran los resultados obtenidos en la determinación de fenoles totales y poder reductor del extracto, las fracciones y los compuestos aislados. Para el caso de los compuestos aislados sólo se determinó el poder reductor. El porcentaje de fenoles totales y poder reductor resultó muy similar para el extracto y las fracciones en rangos de 40-53 y 21-33 %, respectivamente. No se observó una clara diferencia en cuanto al potencial antioxidante entre las fracciones (**Figura 2.23**). No obstante los mejores resultados se encontraron para las dos primeras fracciones obtenidas del extracto (**A** y **B**). El resultado obtenido por ambas técnicas demostró en general la presencia de un alto contenido de compuestos antioxidantes.

De los seis compuestos aislados de las fracciones **D** y **C**, la rutina (**3**) y la catequina (**5**) mostraron la mayor actividad antioxidante con valores de poder reductor de 37,5 y 79,9 %, respectivamente (**Tabla 2.9** y **Figura 2.24**). Los metabolitos **4** y **6** tuvieron un poder reductor muy bajo (4,3 y 5,9 %, respectivamente), mientras que para **1** y **2** el resultado fue nulo (**Tabla 2.9**). Si se analiza el valor del poder reductor de las fracciones y los compuestos aislados (**Figura 2.24**) se puede considerar que la rutina (**3**) en **D** y la catequina (**5**) en **C** (**Figura 2.5**) constituyen los principales responsables del poder reductor en estas fracciones.

Una diferencia estructural importante entre los flavonoides **3** y **5** respecto a los demás metabolitos, es que los dos poseen un mayor número de grupos fenólicos y un grupo catecol en el anillo B (OH en posición *orto*) del flavonoide (**Figuras 2.15** y **2.23**). Estas dos características estructurales les confieren propiedades reductoras (donante de electrones) y quelantes (captadora de radicales libres), así como una capacidad de transferencia de H (reactividad de los grupos OH libres). Estos grupos fenólicos activos juegan un papel importante en los mecanismos de transferencia de H o electrón al radical libre, lo que se traduce en un mejor poder reductor y su propiedad antioxidante. En el caso de los flavonoides **1** y **2**, el resultado nulo del poder reductor está en correspondencia con un menor número de OH fenólicos libres, debido a la sustitución de estas posiciones por grupos metilo y glicosilo, lo que bloquea las zonas reactivas de ambas moléculas (**Figura 2.15**).

Si se realiza una comparación estructural de los flavonoides **1**, **2** y **3**, se puede constatar que tienen como base estructural la quercetina (**Figura 2.15**). Desde el compuesto **3** al **1** existe un aumento del número de grupos glicosilo y metoxilo en el aglicón quercetina. Esto indica que esta planta biosintetiza la quercetina y posteriormente le incorpora estos grupos funcionales útiles para su metabolismo vegetal. El valor del poder reductor obtenido para **3** respecto a la quercetina (utilizada como indicadora del 100 % de poder reductor), puede indicar que la sustitución de un disacárido por el OH de la posición 3 provoca una disminución del poder reductor de la quercetina (37,5 %; **Tabla 2.9**), lo cual indica la importancia del grupo OH libre en dicha posición para una respuesta antioxidante. A su vez, la respuesta nula del poder reductor obtenida para las dos ombuinas (**1** y **2**),

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Resultados y Discusión

puede indicar que el bloqueo del grupo catecol en el anillo B y los OH en disposición meta del anillo A en ambas moléculas, es determinante para anular el poder reductor de la quercetina.

Tabla 2.9. Fenoles totales, poder reductor y actividad inhibitoria del radical superóxido del extracto EtOH, fracciones y compuestos puros de *E. minutifolium*

Muestra	Fenoles Totales ^a	Poder Reductor ^b	Xantina oxidasa (O ₂ ^{·-})	
	± SD (%)	± SD (%)	I (%)	IC50 (%)
EtOH	46,0 ± 5,3	27,8 ± 0,7	27,1	368,7
A	51,0 ± 1,4	33,4 ± 1,5	21,8	378,4
B	53,0 ± 3,8	29,0 ± 0,1	inactivo	inactivo
C	40,4 ± 2,3	25,3 ± 0,8	12,4	335,9
D	47,0 ± 3,4	21,7 ± 0,3	38,3	248,4
1	NR	inactivo	inactivo	inactivo
2	NR	inactivo	10,6	489,7
3	NR	37,5 ± 0,5	55	124,1
4	NR	4,3 ± 0,2	inactivo	inactivo
5	NR	79,9 ± 0,9	100	31,8
6	NR	5,9 ± 0,6	25,9	398,9

I: porcentaje de inhibición a 200 µg/mL, IC50: concentración para obtener el 50 % de inhibición máxima, SD: desviación estándar, NR: no realizado. **A, B, C, D:** fracciones del extracto de EtOH, **1:** ombuin-3-rutinósido-5-glucósido, **2:** ombuin-3-rutinósido, **3:** rutina, **4:** palmitato de β-amirina, **5:** catequina, **6:** β -sitosterol. ^a cada valor representado como porcentaje equivalente a ácido gálico (n=3). Rango de concentración: 260-300 µg/ml. Coeficiente de correlación para el ácido gálico: $r^2=0,997$. ^b cada valor representado como porcentaje equivalente a quercetina (n=4). Concentración: 100 µg/ml. Coeficiente de correlación para la quercetina: $r^2=0,991$.

Si se analiza el valor del contenido de los flavonoides mayoritarios **1, 2 y 3** en el extracto (24,4 %) y se compara con el resultado del poder reductor del extracto (27,8 %, **Tabla 2.9**) se podría plantear que estos metabolitos tienen un peso importante en la capacidad donante de electrones del extracto total. No obstante, al separarse una fracción enriquecida en estos tres flavonoides (**D**), cuyo poder reductor indicó un valor muy pequeño, del 21,7 % (**Tabla 2.9**), no es posible adjudicar la máxima responsabilidad de la capacidad donante de electrones del extracto total a uno de estos tres metabolitos. Esto se puede observar también en el valor de fenoles totales del extracto (46 %) y de la fracción **D**, cuyo valor del 47 % indica que la capacidad donante de H no es exclusiva de estos tres compuestos.

De esta manera, aunque las fracciones obtenidas del extracto posean valores semejantes de fenoles totales y poder reductor, el fraccionamiento establecido permitió la identificación de los

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Resultados y Discusión

principales metabolitos (polifenoles) responsables de la actividad antioxidante encontrada para el extracto.

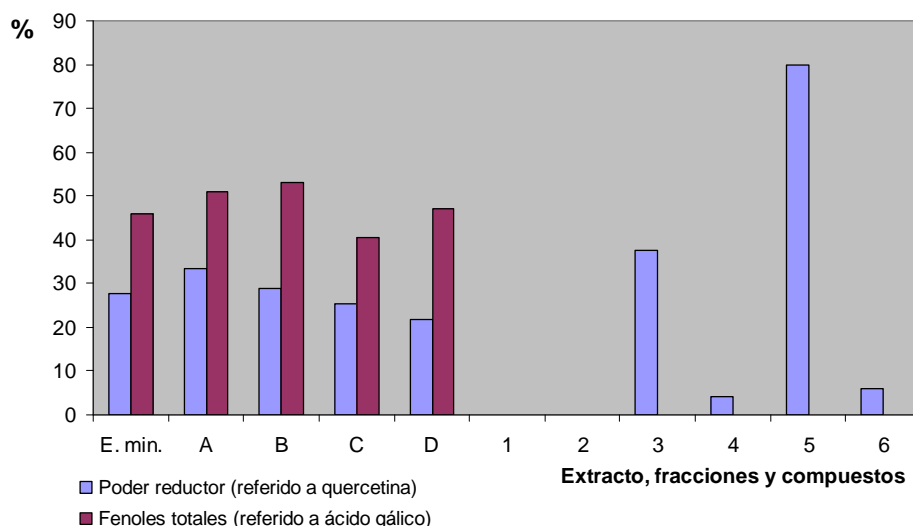


Figura 2.24. Poder reductor y contenido de fenoles totales del extracto EtOH, fracciones y compuestos aislados de *E. minutifolium*.

II.5.5.2.2. Capacidad inhibitoria de radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$)

Es conocido que extractos de especies del género tales como el *E. macrocarpum* y el *E. sideroxyloides* han demostrado ser potentes secuestradores de radicales, así como potentes inhibidores de la peroxidación lipídica, respectivamente [Neergheen y col., 2007; Soobrattee y col., 2008]. Recientemente extractos de especies cubanas de *E. minutifolium* y *E. confusum* han mostrado además una significativa inhibición de la peroxidación lipídica [Rodeiro y col., 2008]. Para este género no se han realizado estudios antioxidantes frente al radical superóxido.

En la **Tabla 2.9** del epígrafe anterior, se muestran los resultados obtenidos durante el análisis de la actividad inhibitoria frente al radical superóxido generado enzimáticamente por el sistema HX-XO. La xantina oxidasa es una enzima que cataliza la oxidación de HX a ácido úrico y durante esta reacción se genera un equivalente de radical superóxido [Cos y col., 1998]. La reacción siguiente es la oxidación de la sal NBT por el radical generado. El ensayo consiste en inhibir esta última reacción provocada por la presencia del radical superóxido, lo cual es equivalente a una actividad antioxidante de las muestras vegetales frente a dicho radical. Con este ensayo enzimático se logra una mayor especificidad y se profundiza en el potencial antioxidante del extracto de EtOH, las fracciones y compuestos aislados, de *E. minutifolium*.

Según se observa en la **Tabla 2.9** y la gráfica superior de la Figura 17, para una concentración de 200 µg/mL, el valor del porcentaje de inhibición disminuye a medida que avanza el fraccionamiento hasta la fracción enriquecida en los flavonoides mayoritarios (**D**), donde se obtiene la mayor actividad inhibitoria. Sin embargo, cuando se aumenta la concentración de las muestras se logra un aumento de la actividad inhibitoria durante dicho fraccionamiento (**Figura 2.25**, superior). En todo el rango de concentración, la fracción **D** mostró la mayor inhibición, y se observó además una inhibición dosis-dependiente para el extracto y para todas las fracciones.

Otra manera de observar este comportamiento es a través del cálculo de la concentración inhibitoria media (IC₅₀). En la **Tabla 2.9** se puede observar el mismo comportamiento analizado anteriormente para el extracto y las fracciones. En un primer paso, del fraccionamiento se obtiene una fracción inactiva (**B**) y otra de una actividad ligeramente inferior a la del extracto (**A**, 378 µg/mL). Luego en el segundo paso se obtienen dos fracciones con mayor actividad que el extracto de partida, donde **D** alcanza un valor de inhibición de 248,4 µg/mL.

En el caso de los compuestos aislados es importante señalar que con la excepción de los compuestos **1** y **4**, que no tuvieron actividad inhibitoria frente al radical superóxido, los demás mostraron un comportamiento dosis-dependiente al igual que las muestras vegetales (**Figura 2.25**, inferior). Para los flavonoides **3** y **5**, y al igual que los resultados antioxidantes de fenoles totales y poder reductor, ambos metabolitos constituyeron los de mayor actividad inhibitoria con valores de IC₅₀ de 124,1 y 31,8 µg/mL, respectivamente. Es conocido que los flavonoides, y en particular la catequina (**5**) y la rutina (**3**), son potentes inhibidores de la xantina oxidasa [Selloum y col., 2001]. De esta manera se puede plantear, nuevamente, que ambos flavonoides pueden tener un rol importante en la actividad inhibitoria encontrada para las fracciones **D** y **C**. Sin embargo, a pesar de que la catequina (**5**) posee mayor actividad inhibitoria que la rutina (**Tabla 2.9**, **Figura 2.25**), las fracciones de donde ambos provienen no muestran la misma relación. Esto es debido a que la fracción **C** es mucho más compleja en composición que **D**, la cual contiene mayoritariamente los flavonoides **1**, **2** y **3**. Esto provoca una disminución de la actividad de la catequina por la presencia de otros compuestos, lo cual es equivalente a decir que existe un sinergismo negativo para **C**. Para la fracción **D**, también se observa un sinergismo negativo al comparar los valores de la fracción y de sus componentes puros, pero en este caso como **2** y **3** poseen actividad, no es tan marcada la diferencia como para **C**, la cual contiene gran cantidad de compuestos cuya actividad se desconoce.

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Resultados y Discusión

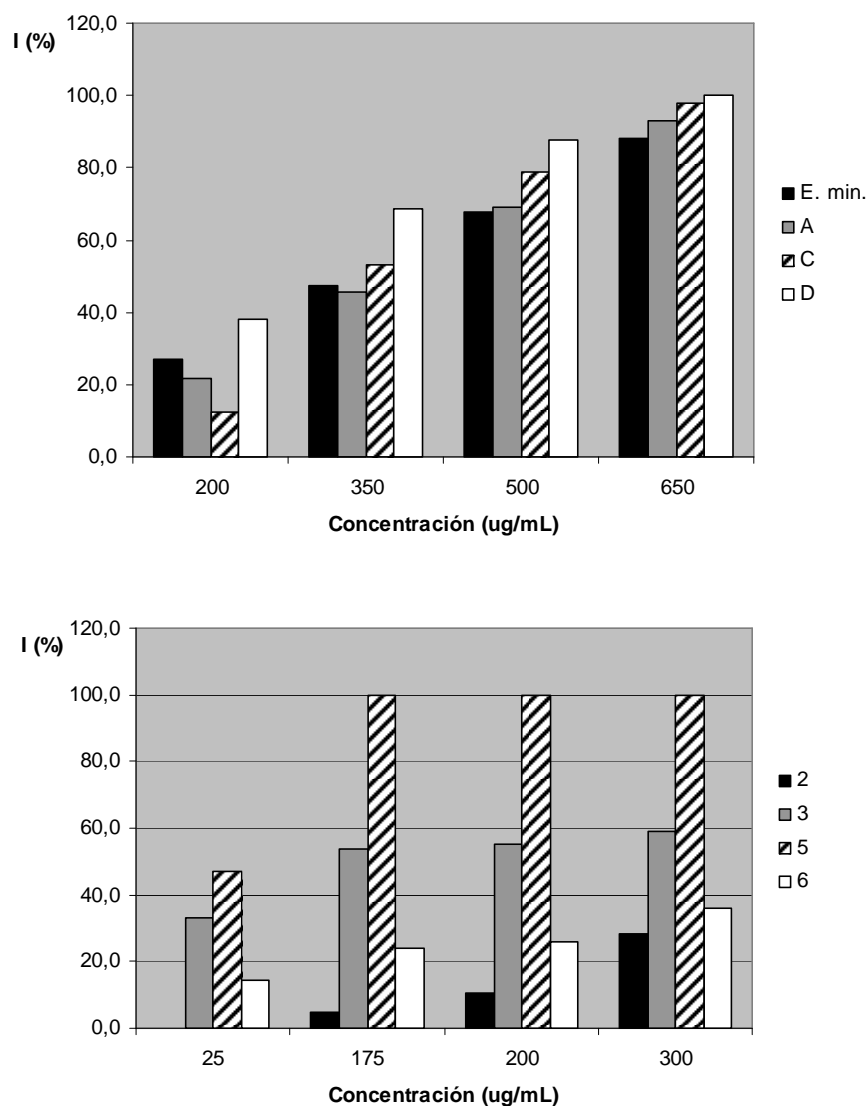


Figura 2.25. Actividad de inhibición de radical superóxido para el extracto de EtOH, fracciones y compuestos aislados de *E.*

II.5.5.2.3. Actividad antiviral (HSV-1) de *E. minutifolium*

En el presente estudio, los resultados en la actividad antiherpética mostraron una marcada diferencia entre las distintas fracciones obtenidas del extracto de *E. minutifolium* (Tabla 2.10, Figura 2.26). Esto indicó que la ruta de fraccionamiento establecida es adecuada para separar del extracto total el grupo de metabolitos con actividad antiviral. Los valores de EC₅₀ observados, frente al virus aislado fueron superiores a los obtenidos frente al virus de referencia debido a que estas cepas de virus se aislaron de pacientes que fueron tratados con Acyclovir y mostraron resistencia al

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Resultados y Discusión

tratamiento. De esta manera, el resultado antiviral frente a las cepas del virus aislado es un indicador de mayor importancia y se puede entender que ofrezcan más resistencia a la acción antiherpética de las muestras vegetales en estudio.

Tabla 2.10. Actividad anti-VHS1 del extracto EtOH, fracciones y compuestos de *E. minutifolium*

Muestra	Virus de referencia (HSV-1r)		Virus aislado (HSV-1a)	
	EC50 ± SD	SI	EC50 ± SD	SI
EtOH	18,14 ± 4,3	> 55,13	36,88 ± 5,5	> 27,11
A	67,22 ± 3,6	> 14,88	84,89 ± 8,7	> 11,78
B	9,12 ± 1,9	> 109,65	23,44 ± 2,3	> 42,66
C	2,56 ± 0,7	> 390,62	6,09 ± 0,5	> 164,20
D	inactivo	–	inactivo	–

HSV-1: virus herpes simple tipo 1, EC50: concentración media inhibitoria, SI: índice selectivo, SD: desviación estándar, HSV-1r: cepa del virus de referencia, HSV-1a: cepa del virus aislado. **A, B, C, D**: fracciones provenientes del extracto de EtOH.

^a cada valor de EC50 representado en µg/ml (n=4). Concentración media citotóxica para todos los extractos: CC50>1000 µg/ml frente a la línea celular Vero. SI=CC50/EC50.

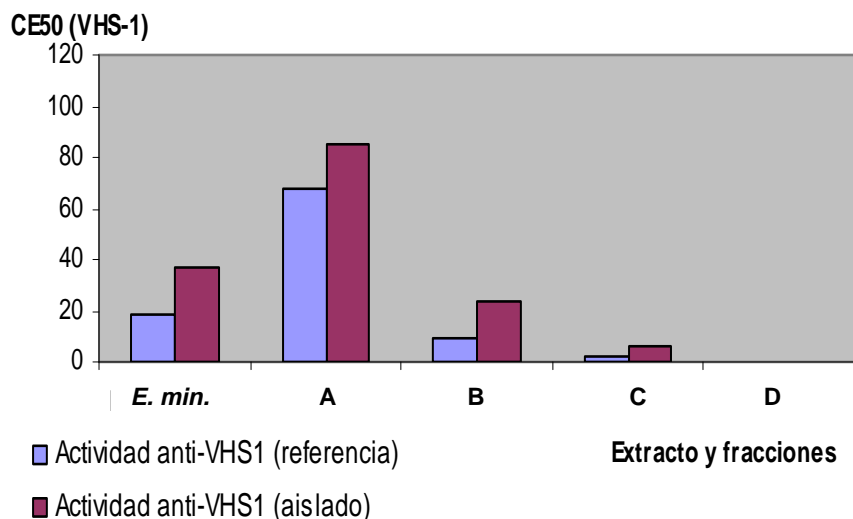


Figura 2.26. Actividad anti-VHS1 del extracto EtOH y fracciones de *E. minutifolium*.

Si se realiza un análisis de la ruta de fraccionamiento (**Figura 2.5**) se puede observar que en un primer paso se obtiene una fracción **A** menos activa que el extracto EtOH de la planta ($EC_{50}=67,22 \mu\text{g/mL}$) y una fracción **B** con una significativa actividad antiviral ($EC_{50}=9,12 \mu\text{g/mL}$). Sin embargo, en un posterior fraccionamiento de **A** se obtuvo la fracción más activa **C** ($EC_{50}=2,56 \mu\text{g/mL}$) y una fracción **D** inactiva (**Tabla 10**). Siendo la fracción $A=C+D$, se puede considerar que el fraccionamiento permitió separar la mezcla de compuestos con actividad antiviral en la fracción **C**, dejando los componentes inactivos en la fracción **D**. Esto indicó, además, que existe un sinergismo negativo de los componentes de **D** sobre **A** y que la fracción **D** podría ser la causante de este efecto que se interpreta más adelante. En general, las fracciones mostraron una importante actividad anti-HSV-1 ($SI>10$), excepto la fracción **D**, la cual no inhibió el crecimiento de ninguna de las dos cepas de virus en el rango de concentración empleado para la técnica (**Tabla 2.10, Figura 2.26**). De todas las muestras, las fracciones **C** y **B** mostraron el mejor resultado antiviral, provocando una disminución en 6-7 veces la EC_{50} inhibitoria del extracto inicial (**Tabla 2.10, Figura 2.26**). Esto indicó que en dichas fracciones se concentraron los metabolitos secundarios que en sinergia ofrecen una mayor acción inhibitoria del crecimiento del virus como se detallará más adelante.

En cuanto a la fracción **B**, la identificación de taninos condensados por TLC [Escribano y col., 1992] como sus principales componentes químicos, permitió conocer que este tipo de metabolitos son los responsables de la actividad antiherpética encontrada para esta fracción, cuyo resultado ofreció el segundo mejor valor de EC_{50} después de la fracción **C**, frente a las dos cepas del virus (9,12 y 23,44 $\mu\text{g/mL}$, **Tabla 2.10**). En estudios realizados con taninos condensados se ha demostrado el potencial anti-HSV de este tipo de estructuras [De Bruyne y col., 1999a y 1999b].

En relación a la fracción más activa, **C**, se pudieron aislar tres compuestos mayoritarios (**4, 5 y 6, Figura 2.23**), de los cuales sólo se conoce la actividad de la catequina (**5**) frente al HSV-1, flavano que es capaz de inhibir la infección en la célula pero no la replicación del virus [Kaul y col., 1985]. Según estudios posteriores sobre la actividad anti-HSV-1 de flavonoides [Xu y col., 1993; Mahmood y col., 1993], la catequina presentó una débil actividad con valores de EC_{50} de 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$. Por otro lado, triterpenoides de tipo lupano y oleanano semejantes a la β -amirina (**4**) aislada, pero con grupos hidroxilo, carbonilo y carboxilo adicionales en la estructura, han demostrado poseer una potente actividad anti-HSV-1 [Ryu et al., 1993; Kurokawa et al., 1999; Chiang et al., 2002; Khan y col., 2005]. Según se muestra en la **Figura 2.27**, los triterpenos identificados en la fracción **C** se clasificaron como 3-hidroxi y 3-oxo triterpenos pentacíclicos de lupano y oleanano (**27, 29, 30a, 30b**) y presentan similitud estructural con los triterpenos anti-HSV-1 mencionados anteriormente (**T1-T4**). Por esta razón, los triterpenos identificados en **C** poseen un rol importante en la significativa actividad antiherpética hallada, cuyo valor de EC_{50} (2,6 $\mu\text{g/mL}$) resultó ser del mismo orden que la actividad del Acyclovir (1,9 $\mu\text{g/mL}$), uno de los mejores medicamentos antiherpéticos [Chiang y col., 2002]. Sin embargo, debe tenerse en cuenta un posible efecto sinérgico de los diferentes componentes de esta fracción.

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Resultados y Discusión

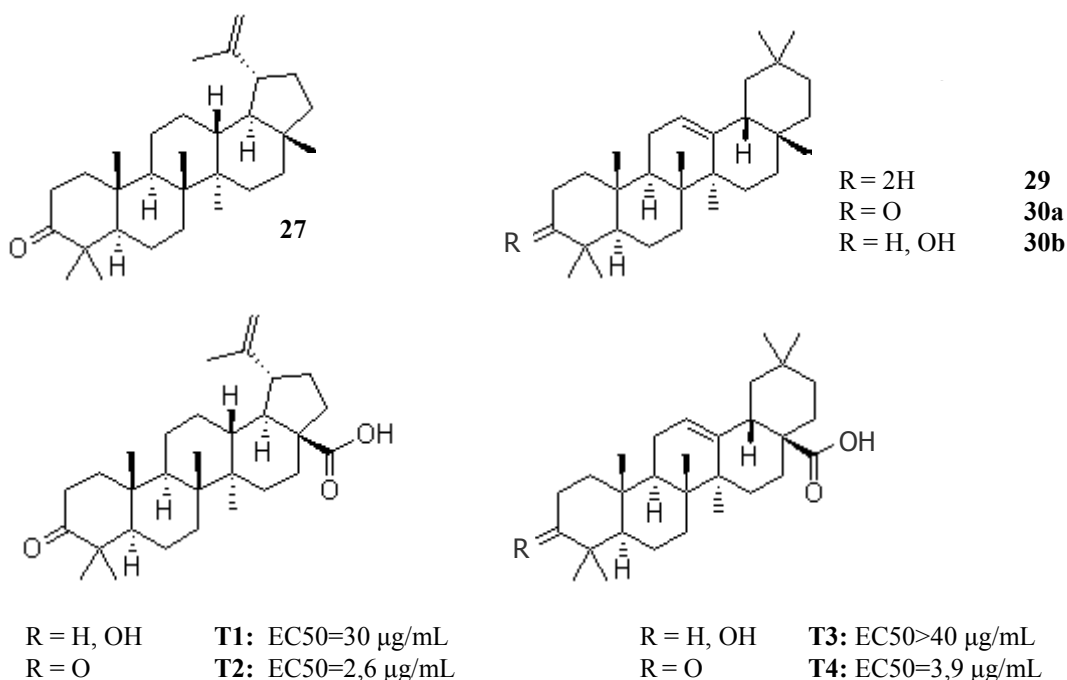


Figura 2.27. Triterpenos pentacíclicos (**27**, **29**, **30a**, **30b**) identificados por GC-MS en la fracción **C** del extracto EtOH de *E. minutifolium* y algunos triterpenos anti-HSV-1 de tipo lupano y oleanano (**T1-T4**). **27**: lupen-3-ona. **29**: olean-12-eno. **30a**: olean-12-en-3-ono. **30b**: olean-12-en-3-ol. **T1**: ácido betulínico, [Ryu y col., 1993](#). **T2**: ácido betulónico, [Kurokawa y col., 1999](#). **T3**: ácido oleanólico, [Chiang y col., 2002](#). **T4**: ácido oleanónico (ácido morónico), [Kurokawa y col., 1999](#).

Por otro lado, la identificación de tres glicósidos de flavonoide mayoritarios en la fracción inactiva **D** (**Figura 2.5**), permitió atribuir a estos metabolitos la responsabilidad de la disminución de la actividad antiherpética de la fracción **A** (**Tabla 2.10**, **Figura 2.26**). Estudios anteriores han demostrado que la actividad de los flavonoides frente al HSV-1 decrece con el incremento del número de grupos OH en la estructura [[Amoros y col., 1992](#)], y a su vez, que la presencia de grupos *ortho*-trihidroxisilos en el anillo B del flavonoide potencia la actividad anti-HSV [[De Bruyne y col., 1999a](#)]. Además, parece indicar que los flavonoides con grupos hidroxilos libres en posiciones C-3, C-5, C-7, C-3', C-4' muestran la mayor actividad antiviral [[Wleklík y col., 1988](#); [Liu y col., 2008](#)]. El resultado encontrado para la fracción **D** está en correspondencia con lo descrito anteriormente, ya que dicha fracción está compuesta fundamentalmente por los glicósidos de flavonoide **1-3**, los cuales poseen estructuras altamente hidroxiladas y sustituidas (**Figura 2.15**), y de los cuales sólo se conoce que la actividad anti-HSV-1 de la rutina (**3**) es débil a una EC₅₀ de 50 y 32 μg/mL [[Wleklík y col., 1988](#); [Lee y col., 1999](#)]. Por lo tanto, la presencia de estos tres glicósidos de flavonoides, debido al alto grado de sustitución de sus sitios activos (grupos OH) en la molécula, no ofrece un aporte positivo en la acción antiherpética del extracto etanólico de *E. minutifolium*.

II.6. CONCLUSIONES

De los resultados descritos en el presente capítulo podemos extraer las siguientes conclusiones más relevantes:

1. La evaluación fitoquímica, la actividad antioxidante (fenoles totales y poder reductor) y la actividad antiviral (HSV-1) de extractos de EtOH de seis especies de *Erythroxylum* que crecen en Cuba, permitió una selección de la especie *E. minutifolium* como la más adecuada para su estudio en la búsqueda de los agentes bioactivos.
2. En la fracción polar del extracto bioactivo de *E. minutifolium* se identificaron como componentes principales tres glicósidos de flavonoide, mientras que en la fracción menos polar se identificaron ácidos grasos saturados e insaturados y sus ésteres, fitol, ácido benzoico, tocoferol, sitosterol y triterpenos del tipo lanostano, lupano y oleanano.
3. El estudio quimiotaxonómico de flavonoides presentes en las partes aéreas de cuatro especies de *Erythroxylum* mediante HPLC permitió una observación del patrón de flavonoides característicos en estas especies.
4. El fraccionamiento del extracto de EtOH activo de las hojas de *E. minutifolium*, permitió diferenciar tres glicósidos de flavonoide, un triterpeno, un flavano y un fitosterol, mayoritarios en el extracto.
5. El fraccionamiento del extracto EtOH y los ensayos antioxidantes (fenoles totales, poder reductor e inhibición del radical superóxido) permitieron la identificación de los polifenoles responsables de la actividad antioxidante del extracto (taninos, rutina y catequina).
6. El fraccionamiento del extracto EtOH y el ensayo antiviral (HSV-1) permitieron la identificación de triterpenos de tipo lupano y oleanano como posibles responsables de la actividad antiviral hallada para la fracción más activa (apolar) en un valor del orden de medicamentos antivirales convencionales (acyclovir).
7. La bioactividad encontrada para el extracto EtOH de *E. minutifolium* no depende de sus compuestos mayoritarios sino del sinergismo de la mezcla de sus componentes químicos.

II.7. BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal PK, **1989**. Carbon-13 NMR of flavonoids. Elsevier, The Netherlands.
- Agrawal PK, Jain DC, **1992**. ¹³C NMR spectroscopy of oleanane triterpenoids. *Progress in NMR Spectroscopy* 24: 1-90.
- Amoros M, Simoes CMO, Girre L, Sauvager F, Cormier M, **1992**. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *Journal of Natural Products* 55(12), 1732-1740.
- Andersen DO, Weber ND, Wood SG, Hughes BG, Murray BK, North JA, **1991**. In vitro virucidal activity of selected anthraquinones and anthraquinone derivatives. *Antiviral Research* 16, 185–196.
- Barreiros ML, David JM, Pereira PAP, Guedes MLS, David JP, **2002**. Fatty acid esters of triterpenes from *Erythroxylum passerinum*. *Journal of Brazilian Chemistry Society* 13(5), 669-673.
- Barreiros ML, David JM, de Queiroz LP, David JP, **2005**. Flavonoids and triterpenes from leaves of *Erythroxylum mummularia*. *Biochemical Systematics and Ecology* 33, 537-540.
- Beauchamp Ch, Fridovich I, **1971**. Superoxide dismutase. Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44(1), 276-87.
- Bhakuni DS, Goel AK, Jain S, Mehrotra BN, Patnaik GK, Prakash V, **1988**. Screening of Indian plants for biological activity. Part XIII. *Indian Journal Experimental Biology* 26(11): 883-904.
- Bisse J, **1988**. *Arboles de Cuba*. Científico Técnica, La Habana, Cuba, 146-149.
- Board of Trustees University of Illinois NAPRALERT (SM) (**1975-2003**) Database: Programme for Collaborative Research in the Pharmaceutical Sciences, Chicago, EE.UU.
- Bohm, BA, Phillips DW, Ganders FR, **1981**. Flavonoids of *Erythroxylum rufum* and *Erythroxylum ulei*. *Journal of Natural Products* 44(6), 676-9.
- Bohm, BA, Ganders FR, Plowman T, **1982**. Biosystematics and evolution of cultivated coca (Erythroxylaceae). *Systematic Botany* 7(2), 121-133.
- Bohm BA, Loo T, Nicholls KW, Plowman T, **1988**. Flavonoid variation in *Erythroxylum*. *Phytochem.* 27(3), 833-7.
- Bonefeld M, Friedrich H, Kolodziej H, **1986**. (+)-catechin 3-rhamnoside from *Erythroxylum novogranatense*. *Phytochemistry* 25(5), 1205-1207.
- Budzikiewicz H, Wilson JM, Djerassi Carl, **1963**. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic triterpenes. *J Am Chem Soc* 85(22), 3688-99.
- Capettini LSA, Campos LVA, dos Santos MH, Nagem TJ, Lemos VS, Cortes SF, **2009**. Vasodilator and antioxidant effect of xanthenes isolated from Brazilian medicinal plants. *Planta Medica* 75, 145-148.
- Cazaña Y, González JA, Prieto S, Molina J, González JL, Urquiola A. **2004**. Evaluación fitoquímica de tres especies de *Erythroxylum*. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 23(2): 193-197.
- Chávez JP, Dos Santos ID, Cruz FG, David JM, **1996**. Flavonoids and triterpene ester derivatives from *Erythroxylum leal costae*. *Phytochemistry* 41(3), 941-943.
- Chiang LC, Chiang W, Chang MY, Ng LT, Lin CC, **2002**. Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds *in vitro*. *Antiviral Research* 55(1): 53–62.
- Chhabra SC, Uiso FC, Mshiu EN, **1984**. Phytochemical screening of Tanzanian medicinal plants I. *Journal of Ethnopharmacology* 11(2): 157-179.

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Bibliografía

- Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van Poel B, Pieters L, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D, **1998**. Structure-Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers. *Journal of Natural Products* 61(1), 71-76.
- Cos P, Maes L, Vlietinck A, Pieters L, **2008**. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection - an update (1998-2007). *Planta Medica* 74, 1323-1337.
- Cronquist A, **1981**. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, NY.
- De Bruyne T, Pieters L, Witvrouw M, De Clercq E, Vanden Berghe D, Vlietinck AJ, **1999a**. Biological evaluation of proanthocyanidin dimers and related polyphenols. *J Nat Prod* 62(7): 954-958.
- De Bruyne, T, Pieters L, Deelstra H, Vlietinck A, **1999b**. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology* 27(4), 445-459.
- De-Eknamkul W, Potduang B, **2003**. Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. *Phytochemistry* 62, 389-398.
- Dominicis ME, Fernández H, **1991**. Phytochemical study of *Erythroxylum havanense* Jacq. (Erythroxylaceae). *Revista Cubana de Farmacia* 25(2), 137-139.
- Dominicis ME y Fernández H, **1995**. Tamizaje de alcaloides y saponinas de plantas que crecen en Cuba II. Península de Guanacahabibes. *Revista Cubana de Farmacia*, 29: 52-57.
- Dos Santos CC, Lima MAS, Silveira ER, **2003**. Micromolecular secondary metabolites of *Erythroxylum barbatum*. *Biochemical Systematics and Ecology* 31, 661-664.
- Escribano T, Gutiérrez Y, Rivas JC, Santos C, **1992**. Characterization of procyanidins of *Vitis vinifera* variety Tinta del país grape seeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 40, 1794-1799.
- Farnsworth NR, **1966**. Biological and phytochemical screening of plants. *J. Pharmaceutical Sc.* 55(3): 225-276.
- Fernández H, Sandoval D y Herrera PP, **1995**. Tamizaje de alcaloides y saponinas de plantas que crecen en Cuba III. Sierra del Rosario. *Revista Cubana de Farmacia*, 29: 58-64.
- Fortin H, Vigor C, Lohezic-Le Devehat F, Robin V, Le Bosse B, Boustie J, Amoros M, **2002**. *In vitro* antiviral activity of thirty-six plants from La Reunion Island. *Fitoterapia* 73(4): 346-350.
- González JA, García N, Gordo O, Vélez H, **2008**. Una Entidad Química Aislada de *Erythroxylum confusum* Britton: Palmitato de β -Amirina. *Latin American Journal of Pharmacy* 27(1), 85-8.
- González KL, González JA, González JL, Prieto S, **2005**. Género *Erythroxylum*: análisis de la información científica. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 24(2): 284-290.
- Griffin WJ, Lin GD, **2000**. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. *Phytochemistry* 53, 623-637.
- Halliwell B, **1994**. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344, 721-724.
- Hansen K, Adersen A, Smitt UW, Nyman U, Christensen SB, Schwartner C, Wagner H, **1996**. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory flavonoids from *Erythroxylum laurifolium*. *Phytomedicine* 2(4), 313-317.
- Harborne JB, **1973-1998**. *Phytochemical Methods: A guide to modern techniques of plant analysis*. Chapman and Hall, London.
- Hattori M, Nakabayashi T, Lim YA, Miyashiro H, Kurokawa M, Shiraki K, Gupta MP, Correa M, Pilapitiya U, **1995**. Inhibitory effects of various ayurvedic and Panamanian medicinal plants on the infection of Herpes Simplex Virus-1 *in vitro* and *in vivo*. *Phytotherapy Research* 9(4): 270-276.
- Hegnauer R, **1981**. Chemotaxonomy of Erythroxylaceae (including some ethnobotanical notes on Old World species). *Journal of Ethnopharmacology* 3(2-3), 279-92.

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Bibliografía

- Humboldt A von, Bonpland A and Kunth, **1822**. Nova Genera et species Plantarum, 5, París.
- Iñigo RPA, Pomilio AB. **1984**. Terpenoids and trans-4-hydroxy-N-methyl-L-proline from *Erythroxylum argentinum*. Anales de la Asociación Química Argentina 72(3), 255-9.
- Iñigo RPA., Pomilio AB, **1985**. Flavonoids from *Erythroxylum argentinum*. Phytochem 24, 347-349.
- Iñigo RPA, De Iglesias DIA, Catalan CAN, **1988**. Kaempferol 3- α -D-glucopyranoside-7- α -L-rhamnopyranoside from *Erythroxylum cuneifolium*. Phytochemistry 27, 1230-1231.
- Johnson EL, Schmidt WF, Norman HA, **1997**. Leaf flavonoids as chemotaxonomic markers for two *Erythroxylum* taxa. Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences 52, 577-585.
- Johnson EL, Schmidt WF, Norman HA, **1998**. Flavonoids as markers for *Erythroxylum* taxa: *E. coca* var. *ipadu* and *E. novogranatense* var. *truxillense*. Biochem Syst Ecol 26, 743-759.
- Johnson EL, Schmidt WF, **1999**. Flavonoids as chemotaxonomic markers for *Erythroxylum ulei*. Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences 54, 881-888.
- Johnson EL, Schmidt WF, Cooper D, **2002**. Flavonoids as chemotaxonomic markers for cultivated Amazonian coca. Plant Physiology and Biochemistry 40, 89-95.
- Johnson EL, Schmidt WF, Emche SD, Mossoba MM, Musser SM, **2003**. Kaempferol (rhamnosyl) glucoside, a new flavonol from *Erythroxylum coca* var. *ipadu*. Biochemical Systematics and Ecology 31, 59-67.
- Johnson EL, Schmidt WF, **2004**. Flavonoids as chemotaxonomic markers for *Erythroxylum australe*. Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences 59, 769-776.
- Kanchanapoom T, Noiarsa P, Tiengtham P, Otsuka H, Ruchirawat S, **2005**. Acetophenone diglycosides from *Erythroxylum cambodianum*. Chem. Pharm. Bull. 53(5), 579—581
- Kaul TN, Middleton EJr, Ogra PL, **1985**. Antiviral effect of flavonoids on human virases. Journal of Medical Virology 15(1), 71-79.
- Khan MTH, Ather A, Thompson KD, Gambari R, **2005**. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. Antiviral Research 67: 107-119.
- Kimberlin DW, Whitley RJ, **1998**. Human herpesvirus-6: neurologic implications of a newly-described viral pathogen. Journal of Neurovirology 4, 474-85.
- Kolodziej H, Bonefeld M, Burger JFW, Brandt EV, Ferreira D, **1991**. Structure and conformational analysis of a procyanidin 3-O-rhamnoside from *Erythroxylum novogranatense*. Phytochemistry 30(4), 1255-1258.
- Kurokawa M, Basnet P, Ohsugi M, Hozumi T, Kadota S, Namba T, Kawana T, Shiraki K, **1999**. Anti-herpes simplex virus activity of moronic acid purified from *Rhus javanica* in vitro and in vivo. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 289, 72–78.
- Lee JH, Kim YS, Lee CK, Lee HK, Han SS, **1999**. Antiviral activity of some flavonoids on Herpes Simplex Viruses. Korean Journal of Pharmacognosy 30(1), 34-39.
- Liu A-L, Liu B, Qin H-L, Lee SM, Wang Y-T, Du G-H, **2008**. Anti-influenza virus activities of flavonoids from the medicinal plant *Elsholtzia rugulosa*. Planta Medica 74, 847-851.
- Lohezic F, Amoros M, Boustie J, Girre L, **1999**. *In-vitro* antiherpetic activity of *Erythroxylum laurifolium* (Erythroxylaceae). Pharmacy and Pharmacology Communication 5(3), 249-253.
- Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB, **1970**. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag: NY.
- Mabry TJ, Timmermann BN, Heil N, Powell MA, **1981**. Systematic implications of the flavonoids and chromosomes of *Flyriella* (compositae-eupatorieae). Plant Systematic Evolution 137, 275-280.
- Mahmood N, Pizza C, Aquino R, De Tommasi N, Piacente S, Colman S, Burke A, Hay AJ, **1993**. Inhibition of HIV infection by flavanoids. Antiviral Research 22(2/3),189-199.

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Bibliografía

- Matsuse IT, Lim YA, Hattori M, Correa M, Gupta MP, **1999**. A search for anti-viral properties in Panamanian medicinal plants. The effects on HIV and its essential enzymes. *Journal of Ethnopharmacology* 64(1): 15-22.
- Moein MR, Khan SI, Ali Z, Ayatollahi SAM, Kobarfard F, Nasim S, Choudhary MI, Khan IA, **2008**. Flavonoids from *Iris songarica* and their antioxidant and estrogenic activity. *Planta Medica* 74, 1492-1495.
- Mosmann T, **1983**. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65(1-2), 55-63.
- Neergheen VS, Bahorun T, Jen L-S, Aruoma OI, **2007**. Bioefficacy of Mauritian endemic medicinal plants: assessment of their phenolic contents and antioxidant potential. *Pharmaceutical Biology* 45, 9-17.
- Oviedo R, **2001**. Contribución al conocimiento de *Erythroxylaceae* Kunth en Cuba y Las Antillas. Thesis, Institute of Ecology and Systematic, La Habana, Cuba.
- Oyaizu M, **1986**. Products of the browning reaction. Antioxidative activities of products of the browning reaction of glucosamine. *Eiyogaku Zasshi*, 44(6), 307-15.
- Paris RR, Delaveau P, **1963**. The flavonoids of the leaves of *Erythroxylon coca*. Isolation of rutoside and isoquercitroside. *Compt. Rend.* 256, 301-3.
- Payment P, Trudel M, **1993**. *Isolation and identification of viruses*. In: *Methods and Techniques in Virology* (P. Payment & M. Trudel, Eds.). Marcel Dekker, New York, 19-40.
- Payo AL, Domínguez RS, Suárez MO, Batista M, Castro HT, Rastrelli L, Aquino R, **2000**. Tropane alkaloids from leaves and stem bark of *Erythroxylum alaternifolium* and *Erythroxylum rotundifolium*. *Phytochemistry* 54(8), 927-932.
- Payo AL, Oquendo M, Oviedo R, **1996**. Tamizaje fitoquímico preliminar de plantas que crecen en Sierra de Nipe, Holguín. *Revista Cubana de Farmacia* 30: 120-131.
- Pino S, González JL, García M, Carballo MT, Echemendía OA, Garrido G, González JA, Molina J, Prieto S, **2004**. Preliminary Phytochemical Screening and *in vitro* Antiherpetic activity of *Erythrina fusca* Lour. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 23(4): 453-458.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C, **1999**. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* 26(9/10), 1231-1237.
- Rice-Evans C, Miller NJ, Paganga G, **1996**. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20, 933-956.
- Rodeiro I, Donato MT, Martínez I, Hernández I, Garrido G, González-Lavaut JA, Menéndez R, Laguna A, Castell JV, Gómez-Lechon MJ, **2008**. Potential hepatoprotective effects of new Cuban natural products in rat hepatocytes culture. *Toxicology in vitro* 22, 1242-1249.
- Roig JT, **1974**. *Plantas medicinales, aromáticas y venenosas de Cuba*. Ciencia y Técnica, Instituto del Libro, La Habana, Cuba, 103-105, 555.
- Ryu SY, Lee CK, Ahn JW, Lee SH, Zee OP, **1993**. Antiviral activity of triterpenoid derivatives. *Archives of Pharmacal Research* 16, 339-42.
- Sanz MJ, Ferrandiz ML, Cejudo M, Terencio MC, Gil B, Bustos G, Ubeda A, Gunasegaran R, Alcaraz MJ, **1994**. Influence of a series of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress. *Xenobiotica* 24, 689-699.
- Schulz OE, **1907**. *Erythroxylaceae*. In: Urban, I. ed., *Symbolae Antillanae*, 5, Leipzig.
- Selloum L, Reichl S, Mueller M, Sebihi L, Arnhold J, **2001**. Effects of Flavonols on the Generation of Superoxide Anion Radicals by Xanthine Oxidase and Stimulated Neutrophils. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 395(1), 49-56.

II. Caracterización de extractos bioactivos de especies de *Erythroxylum*

Bibliografía

- Singleton VL, Rossi JA Jr, **1965**. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16(3), 144-58.
- Soliman HSM, Sobieh O, **1999**. Two spermicidal saponins and two flavonoids from berries of *Phytolacca dioica* L. *Journal of Pharmaceutical Science* 23, 84-96.
- Soobrattee MA, Bahorun T, Neergheen VS, Googoolye K, Aruoma OI, **2008**. Assessment of the content of phenolics and antioxidant actions of the Rubiaceae, Ebenaceae, Celastraceae, Erythroxylaceae and Sterculaceae families of Mauritian endemic plants. *Toxicology in vitro* 22, 45-56.
- Takeuchi H, Baba M, Shigeta S, **1991**. An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. *Virology Methods* 33, 66-71.
- Ukeda H, Maeda S, Ishii T, Sawamura M, **1997**. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'-{1-[(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium}-bis(4-methoxy-6-nitro)benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthine oxidase. *Analytical Biochemistry* 251(2), 206-209.
- Ukeda H, Kawana D, Maeda S, Sawamura M, **1999**. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on the reduction of highly water-soluble tetrazolium salts by xanthine-xanthine oxidase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 63(3), 485-488.
- Whitley R, Arvin A, Prober C, Burchett S, Corey L, Powell D, Plotkin S, Starr S, Alford C, Connor J, **1991**. A controlled trial comparing vidarabine with acyclovir in neonatal herpes simplex virus infection. *Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. New England Journal of Medicine* 324, 444-449.
- Wleklik M, Luczak M, Panasiak W, Kobus M, Lammer-Zarawska E, **1988**. Structural basis for antiviral activity of flavonoids-naturally occurring compounds. *Acta Virology* 32(6), 522-525.
- Wright, JS, Johnson ER, DiLabio GA, **2001**. Predicting the Activity of Phenolic Antioxidants: Theoretical Method, Analysis of Substituent Effects, and Application to Major Families of Antioxidants. *Journal of the American Chemical Society* 123(6), 1173-1183.
- Wyde R, Ambrose MW, Meyerson LR, Gilbert BE, **1993**. The antiviral activity of SP-303, a natural polyphenolicpolymer against respiratory syncytial and parainfluenza type 3 viruses in cotton rats. *Antiviral Research* 20, 145-154.
- Xu HX, Kadota S, Kurokawa M, Shiraki K, Matsumoto T, Namba T, **1993**. Isolation and structure of Woodorien, a new glucoside having antiviral activity, from *Woodwardia orientalis*. *Chemistry Pharmaceutical Bulletin* 41(10),1803-1806.
- Yen G-Ch, Chen H-Y, **1995**. Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43(1), 27-32.

CAPÍTULO III

*ESTUDIO Y APLICACION DE LA MICROEXTRACCION EN FASE
LIQUIDA A LA DETERMINACION DE POLIFENOLES
ANTINUTRICIONALES DE LA DIETA MEDITERRÁNEA.
CASO DE LA QUERCETINA EN ALIMENTOS VEGETALES*

III.1. RESUMEN

En el presente trabajo se realizó un estudio del comportamiento de la quercetina bajo un sistema de microextracción en fase líquida (LPME) soportada en membrana de tipo “hollow fiber” para su posible aplicación en la determinación de esta sustancia como factor antinutricional en alimentos de la dieta mediterránea, legumbres en nuestro caso.

Se estudiaron una serie de factores básicos que influyen en el transporte de la quercetina a través de la membrana líquida, SLM, en el proceso LPME seguido de la HPLC como sistema de detección y se utilizó el factor de enriquecimiento (EF) como parámetro indicador del proceso en estudio. Se emplearon diferentes composiciones de posibles fases orgánicas como membranas líquidas soportadas (SLM) con el uso de diversos componentes: *n*-dodecano (DOD) como diluyente, dihexiléter (DHE) y *n*-decanol (DEC) como modificadores, y trioctilamina (TOA), tributilfosfato (TBP) y cloruro de trioctilamonio (Aliquat 336) como transportadores o extractantes. Se utilizaron combinaciones de los distintos componentes de la SLM y según las condiciones experimentales, como fuerza impulsora del transporte, se establecieron dos tipos de gradientes entre las fases acuosas: de pH ó aniónico. Además, se estudió la influencia del pH de las fases de carga y receptoras, determinándose el paso limitante en cada sistema de gradiente a través del análisis del contenido de quercetina remanente en cada fase después del proceso extractivo. Los resultados obtenidos indicaron una diversidad de situaciones relacionadas con la naturaleza de los componentes de la SLM y de las condiciones de las fases de carga y receptoras. Estos resultados fueron interpretados en términos de estabilidad del complejo analito-transportador y de la interacción analito-modificador en la fase orgánica, mostrándose efectos negativos y positivos de estos factores en el transporte de quercetina. Los sistemas que emplearon DHE+TBP y DOD+DEC+Aliquat como SLM bajo gradiente de pH y gradiente aniónico, respectivamente, resultaron ser los más adecuados para la extracción de la quercetina. Sin embargo, los EF mostraron valores muy bajos que no superaron el valor de 2, debido por una parte a la estabilización de la molécula en la SLM (formación del complejo extractante-quercetina). Se realizó un calibrado del método de determinación correspondiente, obteniéndose una linealidad del 0,998, un límite de detección de 7,3 µg/L y una repetitividad de 1,3%. Se aplicó el método de LPME a tres alimentos utilizados en la dieta mediterránea tales como una legumbre (*Vicia faba*), el brócoli (*Brassica oleracea*) y el té verde (*Camellia sinensis*). Los resultados mostraron una alta capacidad de pre-concentración y de “clean up” del método aplicado a muestras reales y permitió determinar un contenido de quercetina entre 1,6 y 10,8 mg/g, además de la identificación de otros flavonoides como la catequina y la rutina.

III. Estudio y aplicación de la microextracción en fase líquida a la determinación de polifenoles antinutricionales de la dieta mediterránea. Caso de la quercetina en alimentos vegetales

Introducción

III.2. INTRODUCCIÓN

Los flavonoides constituyen metabolitos secundarios distribuidos en prácticamente todas las plantas superiores [Harborne, 1998]. Conjuntamente con los lignanos, los estilbenos y los ácidos fenólicos, los flavonoides conforman un grupo de polifenoles altamente diverso [Scalbert y Williamson, 2000] y debido a su elevada distribución en el mundo vegetal, se encuentran en casi todos los alimentos derivados de plantas [Scalbert y Williamson, 2000]. Esta familia de compuestos se destaca por sus propiedades terapéuticas tales como efecto antioxidante, antimutagénico, anticarcinogénico, antiinflamatorio y antimicrobiano, que le confiere al ser humano beneficios en la prevención de enfermedades [Ferguson, 2001]. No obstante, conjuntamente con estos beneficios, el interés reciente de los polifenoles está relacionado con sus efectos antinutricionales [Soetan, 2008], tales como la disminución de la absorción y digestibilidad de los alimentos a través de su habilidad para enlazarse con las proteínas y los minerales. La astringencia, por ejemplo, de algunas frutas y bebidas naturales es atribuida a la precipitación de las proteínas salivares por los polifenoles. Dentro de los flavonoides con efectos antinutricionales se destacan los taninos, aunque los de tipo flavonol también presentan un rol importante como factor antinutricional al promover un metabolismo microbiano extensivo en el ecosistema gastrointestinal [Spencer y Rice-Evans, 2003; Singh y col., 2003].

De los flavonoles más extensamente distribuidos en alimentos provenientes de plantas, como frutas, vegetales, legumbres y bebidas, se encuentran la quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavona), el kaempferol (3,5,7,4'-tetrahidroxiflavona), la miricetina (3,5,7,3',4',5'-hexahidroxiflavona) y la isoramnetina (3,5,7,4'-tetrahidroxi-3'-methoxiflavona) [Hollman y Arts, 2000]. Estos flavonoles (**Figura 3.1**) se encuentran en una alta concentración en alimentos de la dieta mediterránea tales como cebolla, brócoli, alubia, manzana y té [Hollman y Arts, 2000], donde la quercetina es predominante en este grupo de flavonoides.

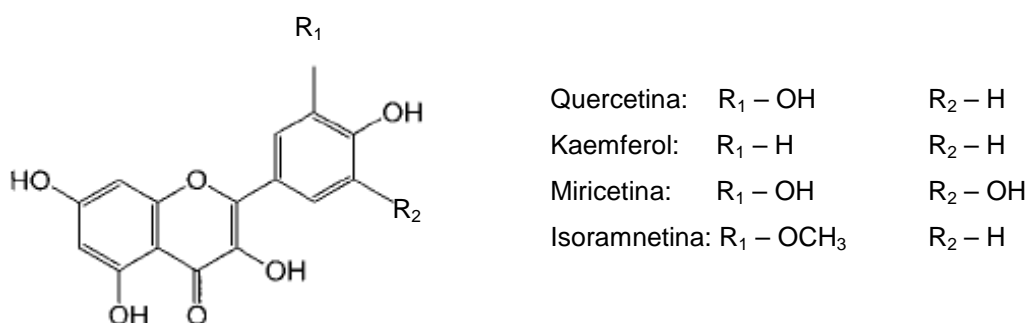


Figura 3.1. Estructura de los flavonoles más abundantes en alimentos provenientes de plantas.

III. Estudio y aplicación de la microextracción en fase líquida a la determinación de polifenoles antinutricionales de la dieta mediterránea. Caso de la quercetina en alimentos vegetales

Introducción

En algunos países la quercetina se utiliza como suplemento nutricional [Weldin y col., 2003], debido a las conocidas propiedades terapéuticas de dicho flavonoide, tales como antioxidante [Rice-Evans y col., 1996], anticancerígeno [Hertog y col., 1992; Hertog y col., 1993a] y antiinflamatorio [Ferrándiz y Alcaraz, 1991]. No obstante, la quercetina forma parte del consumo diario de los flavonoides principales, constituyendo uno de los más abundantes de la dieta [Hertog y col., 1992], que en su totalidad suman unos 20-30 mg al día [Hertog y col., 1993b], por lo que resulta de interés establecer un método sencillo y rápido que permita su determinación en alimentos necesaria para la posibilidad de establecer correlaciones entre su contenido y los efectos antinutricionales encontrados. En los estudios de flavonoles se han empleado diversas técnicas analíticas donde predominan la cromatografía en capa fina (TLC) con detección UV [Mabry, 1970] y en las últimas décadas la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de matriz de diodos [Robards y Antolovich, 1997] y espectrometría de masas (MS) [Justesen y col., 1998]. Para aplicar la técnica de HPLC, que constituye la más ampliamente utilizada en la determinación de flavonoles como la quercetina en plantas, a menudo es necesario una limpieza previa de la muestra a estudiar o un método de "clean up", aunque en ocasiones la determinación puede realizarse de manera directa [Merken y Beecher, 2000]. Algunos de los métodos de pretratamiento de la muestra vegetal incluyen la extracción líquido-líquido (LLE), extracción en fase sólida (SPE), cromatografía en contracorriente, cromatografía por exclusión molecular (MEC) y métodos que combinan pasos de diluciones, centrifugaciones y filtraciones que complican y alargan el procedimiento [Merken y Beecher, 2000]. Debido al gran número de metabolitos secundarios que son extraídos conjuntamente con la quercetina y que pueden afectar su identificación, se hace imprescindible un tratamiento inicial a la muestra que permita eliminar estos efectos de matriz. En este sentido, la microextracción en fase líquida (LPME) puede permitir un tratamiento selectivo de la muestra y presenta muchas ventajas en comparación con la tradicional extracción sólido-líquido o líquido-líquido [Jönsson y Mathiasson, 1992]. En primer lugar, por el uso reducido de disolventes orgánicos (sólo unos pocos microlitros). En segundo lugar, resulta sencillo para extraer grandes volúmenes de muestra (hasta 1 L) con volúmenes muy pequeños de disolución aceptora (5-25 μ L), lo que permite enriquecer sustancialmente los analitos en solución de una manera conveniente y sin el empleo de los procedimientos de evaporación del disolvente [Bardstü y col., 2007]. En tercer lugar, porque se realiza una extracción y una re-extracción simultánea de los analitos bajo diferentes condiciones de pH, lo cual proporciona una alta selectividad y excelente limpieza de muestras complejas como los extractos de plantas en este caso. Además, dado que se transfieren los analitos en una solución acuosa aceptora, esta puede ser directamente inyectada en HPLC.

Teniendo en cuenta estos antecedentes y para llevar a cabo el propósito del presente estudio, el efecto de diferentes factores en la LPME de este flavonoide, tales como el pH de las fases de carga y aceptoras, así como el tipo de membrana líquida soportada (SLM), fue evaluado en muestras modelos con el objetivo de conocer el comportamiento de la quercetina bajo sistema extractivo. Se determinó, además, su aplicabilidad en diferentes alimentos característicos de la dieta mediterránea.

III. Estudio y aplicación de la microextracción en fase líquida a la determinación de polifenoles antinutricionales de la dieta mediterránea. Caso de la quercetina en alimentos vegetales

Objetivos

III.3. OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como objetivo fundamental el estudio del comportamiento de la quercetina en un sistema de membrana líquida soportada en capilar de fibra hueca ("hollow fiber") que produce la microextracción en fase líquida (LPME), y, de esta forma, establecer una metodología analítica para la determinación del contenido de quercetina en alimentos de la dieta mediterránea, facilitando su posible caracterización como componente antinutricional. Para ello se desarrollaron las siguientes etapas:

1. Descripción del sistema de LPME aplicado a la quercetina.
2. Estudio del tipo de fase orgánica.
3. Estudio del pH de la fase de carga bajo régimen de gradiente de pH.
4. Estudio del pH de la fase aceptora bajo régimen de gradiente aniónico.
5. Comportamiento de la quercetina bajo LPME.
6. Aplicabilidad del método de LPME en alimentos de la dieta mediterránea.

Hipótesis

El sistema de LPME mediante membrana líquida soportada en capilar de fibra hueca es una herramienta eficaz para la determinación de la quercetina en muestras de alimentos vegetales de la dieta mediterránea.

III.4. PARTE EXPERIMENTAL

La exposición de este capítulo corresponde al desarrollo metodológico del estudio realizado, el cual está ordenado en las siguientes etapas: descripción de los procedimientos generales de preparación de muestras, procedimiento de LPME, calibrado del método de LPME-HPLC, así como las condiciones cromatográficas de análisis de la quercetina.

III.4.1. Reactivos y preparación de muestras

La quercetina (Sigma-Aldrich, Madrid, España) fue utilizada para preparar la disolución madre en metanol (MeOH) de calidad para HPLC y a partir de ella se prepararon las disoluciones de trabajo. Los siguientes reactivos y disolventes orgánicos usados fueron de Sigma-Aldrich (Madrid, España): cloruro de metiltrioctilamonio (Aliquat 336), >98% dodecano (DOD), >97% dihexiléter (DHE), 97% *n*-decano (DEC), 99% tributilfosfato (TBP), y 98% trioctilamina (TOA). Las sales y ácidos utilizados fueron de Panreac (Madrid, España): 99,5% fosfato de sodio $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 98% hidróxido de sodio NaOH, 99,5% cloruro de sodio NaCl, 37% ácido clorhídrico HCl, y 85% ácido fosfórico H_3PO_4 . El agua desionizada fue purificada a través de un sistema de purificación Millipore (Milford, Estados Unidos).

Para la LPME, la disolución patrón de la quercetina (1000 mg/L) fue preparada disolviendo 10 mg del patrón en 10 mL de MeOH y almacenada a 4 °C. Veinte mililitros (20 mL) de cada disolución de carga fue preparada tomando alícuotas de la disolución patrón y diluyéndolas en agua o una disolución de NaOH 0,1M hasta obtener concentraciones de 1000 µg/L para el estudio de LPME, y luego se ajustó al pH de trabajo por adición de gotas de HCl. La disolución aceptora (NaOH 1M a pH12,6 o NaCl 2M a pH6 y 10) fueron preparadas disolviendo cantidades adecuadas de cada reactivo en 1 L de agua.

Los alimentos de la dieta mediterránea empleados en la aplicación del método fueron de tres tipos: alubias como legumbre (*Vicia faba*) proveniente de Túnez, la brócoli como crucífera (*Brassica oleracea*) proveniente de España y el té verde como bebida (*Camellia sinensis*) de Marruecos.

III.4.2. Procedimiento de microextracción en fase líquida (LPME)

Se estableció una modificación del procedimiento de extracción en discontinuo, descrito con anterioridad [Liu y col., 2005; Berhanu y col., 2006], para aplicarlo al pretratamiento de la quercetina mediante LPME. Se utilizó un capilar de fibra hueca de polipropileno Accurel PP tipo Q3-2 (200 µm de espesor, 600 µm de diámetro interno y 0,2 µm de tamaño de poro) y se cortaron manualmente 15 cm para cada experimento, aportando aproximadamente unos 40 µL de volumen interno. Para la formación de la SLM (paso de impregnación de los poros de la fibra) el espacio interno de la fibra fue

III. Estudio y aplicación de la microextracción en fase líquida a la determinación de polifenoles antinutricionales de la dieta mediterránea. Caso de la quercetina en alimentos vegetales

Parte Experimental

llenado con el disolvente orgánico usado como SLM, utilizando una jeringa (**Figura 3.2A**). La fibra se colocó en una tapa de vial con dos orificios para sostenerla (**Figura 3.2B**) y se sumergió en un vial de 20 mL que contenía el disolvente orgánico (**Figura 3.2C**) y 5 min en baño ultrasónico fue establecido como tiempo de impregnación. Posteriormente, el espacio interior (lumen) del capilar de fibra hueca fue lavado con 200 μL de agua para eliminar el exceso de disolvente orgánico en la parte interna de la fibra y otros 300 μL de disolución aceptora se hicieron pasar lentamente a través del lumen de la fibra para garantizar la eliminación de burbujas y un completo llenado con la fase aceptora (**Figura 3.2D**). Los extremos de la fibra se sellaron y se sumergió en agua durante 1 min y agitación para eliminar el exceso de disolvente orgánico en las paredes externas. De esta manera, la fibra se dejó lista para transferirla a un vial de 20 mL con la disolución de carga para la LPME (**Figura 3.2E** y **3.2F**). Después de cada extracción, los 40 μL de disolución aceptora, que contiene la quercetina extraída, se recolectó en un vial de 250 μL . La recolección se realizó de la siguiente manera: se le dio apertura a uno de los extremos de la fibra y se conectó a una jeringa vacía y el otro extremo se abrió y se conectó al vial de 250 μL , y finalmente, se inyectó aire a través de la fibra (**Figura 3.2G**). Antes del análisis por HPLC, se adicionaron de 2 a 3 gotas de HCl 0,1 M hasta ajustar el pH a 2, obteniéndose luego por adición de gotas de agua un volumen final de la muestra de 100 μL (**Figura 3.2H**). Se inyectaron 20 μL por duplicado en el sistema de HPLC.

III.4.3. Calibrado del método de LPME-HPLC

Las disoluciones dopadas de quercetina se prepararon a partir de la disolución madre (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a través de diluciones apropiadas en viales de 20 mL que contenían las disoluciones de carga bajo condiciones optimizadas. Se preparó de esta manera un rango de concentración de 0,5 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, debido a que el contenido de quercetina evaluado como antinutricional en alimentos es relativamente alto. Para la LPME de la quercetina, se llevó a cabo el análisis por triplicado con el uso de blancos y se usaron las condiciones optimizadas para las tres fases: de carga, SLM y aceptora. Las curvas de calibrado se construyeron con la información recogida del área de los picos en el cromatograma y la concentración de la quercetina en las muestras dopadas. Esta curva se utilizó para el cálculo de la linealidad, el límite de detección (LOD) y la repetitividad. La estimación del LOD se basó en el área del pico detectado para una relación señal-ruido de tres [Vial y Jardy, 1999].

III. Estudio y aplicación de la microextracción en fase líquida a la determinación de polifenoles antinutricionales de la dieta mediterránea. Caso de la quercetina en alimentos vegetales

Parte Experimental

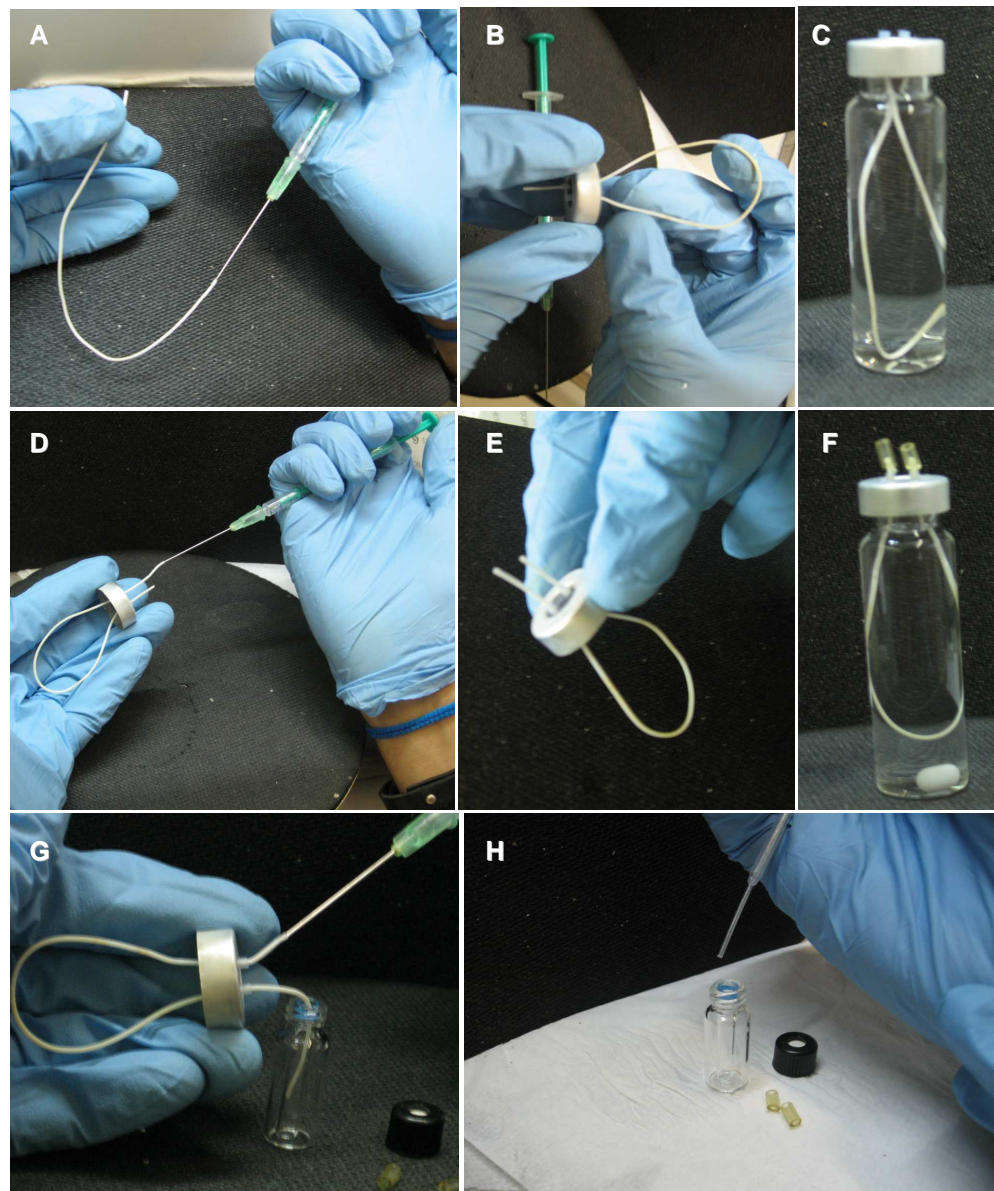


Figura 3.2. Sistema de LPME. (A, B, C) Pasos de impregnación de la fibra con la fase orgánica. (D) Lavado de la fibra con agua y llenado con la fase aceptora. (E) Fibra lista para su uso. (F) Proceso de LPME. (G) Recolección de la fase aceptora. (H) Ajuste del pH para el análisis de la muestra por HPLC.

III.4.4. Condiciones de separación cromatográfica para mediante HPLC

Para el análisis de la quercetina obtenida por el método de LPME-HPLC, se utilizó un cromatógrafo de líquidos Thermo-Fisher (Barcelona, España) equipado con autosampler AS3000, bombas de gradiente P4000, un detector UV con matriz de diodos UV6000LP con facilidad de medida en el rango 192-800 nm y programa de cómputo de datos ChromQuest versión 4.2.34. En la **Figura 3.3** se detallan los distintos paneles que componen el sistema de HPLC. La separación se realizó en una columna HAILSil C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m) con una mezcla de $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 10 mM (pH ajustado a 2,5 con H_3PO_4) como fase móvil A y MeOH como fase móvil B. El gradiente de elución fue de 20 % B (0-2 min), 20-60 % B (2-6 min), 60-80 % B (6-10 min) y 80 % (3 min) a 1 mL/min y temperatura ambiente. El volumen de inyección fue de 20 μ L por duplicado y la longitud de onda para la detección de la quercetina fue 260 nm.



Figura 3.3. Sistema de CLAR Thermo-Fisher. Panel de disolventes y desgasificador “on-line”, panel de bombas de gradiente, automuestreador y detector UV con matriz de diodo.

III.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.5.1. Procedimiento de LPME para el análisis de la quercetina

III.5.1.1. Descripción del contexto de la LPME aplicado a la quercetina

La quercetina es un flavonoide del tipo flavonol con un gran número de grupos OH en su estructura (**Figura 3.4**) cuya característica le aporta muchas de sus propiedades terapéuticas y antinutricionales a través de su capacidad donante de radicales H[•] [Lemanska y col., 2001]. Debido a este tipo de estructura es conocida su difícil solubilidad en disoluciones acuosas [Herrero- Martínez y col., 2005] donde la molécula de agua no es capaz de solvatar y llevar la quercetina al seno de la disolución, posiblemente por la formación de puentes de hidrógeno intramolecular. Solo en disoluciones acuosas básicas, donde la quercetina se disocia liberando protones, se logra una buena solubilidad. Por otro lado, en disolventes orgánicos activos como el MeOH, la quercetina presenta una alta solubilidad en forma no disociada, donde este disolvente es capaz de solvatar adecuadamente la molécula y disolverla. Es por esta última razón que se prefiere preparar disoluciones acuosas a partir de disoluciones madres concentradas de quercetina en MeOH [Herrero- Martínez y col., 2005].

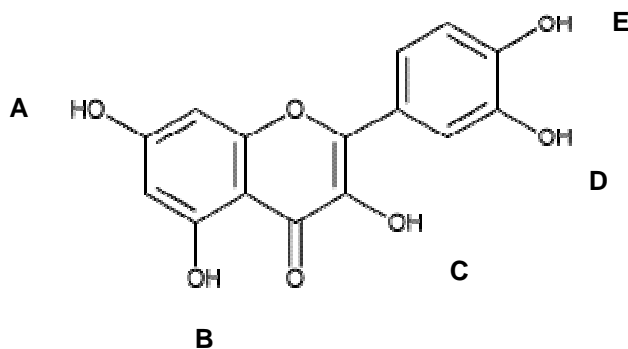


Figura 3.4. Estructura de la quercetina.

Las propiedades de acidez de la quercetina revelan que el grupo OH con mayores características ácidas es el grupo **A** (ver **Figura 3.4**) y en este orden le siguen el **E**, el **B** y el **C**. De esta manera la quercetina presenta los principales valores de pKa: 7,09; 8,60; 11,35 y 13,22; respectivamente [Herrero-Martínez y col., 2005]. Por otro lado y en adición a esto, a un pH > 9 en la disolución acuosa se obtiene la mayor cantidad de quercetina en forma disociada con un porcentaje mayor del 80%,

III. Estudio y aplicación de la microextracción en fase líquida a la determinación de polifenoles antinutricionales de la dieta mediterránea. Caso de la quercetina en alimentos vegetales

Resultados y Discusión

mientras que a valores de pH menores que 7 la quercetina se encuentra prácticamente en su forma no dissociada, en cuya manera puede precipitar fácilmente en medio acuoso como se ha observado en estudios relacionados [Herrero-Martínez y col., 2005].

Es necesario tener en cuenta los valores anteriores para seleccionar correctamente la membrana líquida correspondiente al tratamiento de este flavonoide mediante LPME, ya que esta técnica se basa en la extracción y re-extracción del analito a través de tres fases, desde la disolución acuosa de carga (externa a la SLM empleada) hacia otra aceptora en el lumen del capilar de fibra hueca, pasando por una fase orgánica o membrana líquida soportada (SLM) por impregnación en los poros del capilar indicado. Como fuerza impulsora, se empleó un gradiente de pH o un gradiente aniónico [Jonsson y Mathiasson, 1992]. De esta manera se puede obtener una extracción y pre-concentración simultánea de la quercetina y para ello es importante que la quercetina sea soluble en todo momento tanto en forma dissociada como no dissociada, y ya sea en la fase de carga como en la aceptora. En las **Figuras 3.5 y 3.6** se pueden observar las características de los dos sistemas de LPME en regímenes de gradiente de pH y gradiente aniónico empleados para la quercetina.

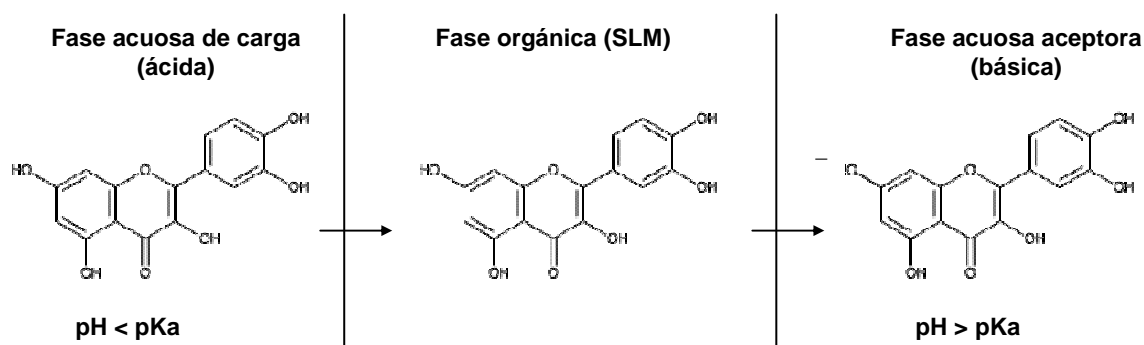


Figura 3.5. LPME de la quercetina en regimen de gradiente de pH.

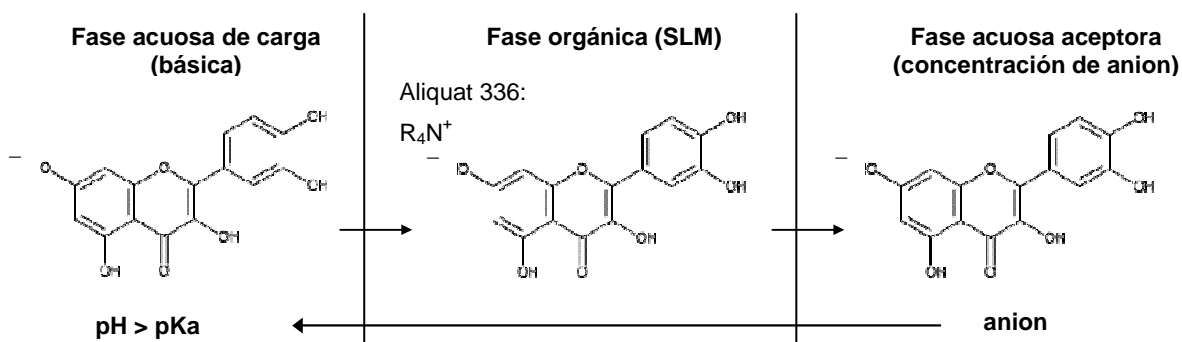


Figura 3.6. LPME de la quercetina en regimen de gradiente aniónico.

III. Estudio y aplicación de la microextracción en fase líquida a la determinación de polifenoles antinutricionales de la dieta mediterránea. Caso de la quercetina en alimentos vegetales

Resultados y Discusión

Estudios preliminares indicaron una baja eficiencia del transporte de la quercetina. Interpretamos que cuando utilizamos gradiente de pH (**Figura 3.5**), la quercetina debe atravesar la primera interfase en su forma no disociada, para lo cual se necesita de un $\text{pH} < \text{pKa}$ (7,09) lo que limita su solubilidad. A continuación, en la fase orgánica puede estabilizarse la disolución correspondiente de la quercetina y, finalmente, debe disociarse para atravesar la segunda interfase hacia la fase aceptora. Por otro lado y cuando utilizamos gradiente aniónico, esta fuerza impulsora produce un flujo de iones en ambos sentidos de la membrana (**Figura 3.6**). Este sistema podría resultar el más eficaz ya que la molécula atraviesa las fases siempre en forma disociada, lo cual le permite una alta solubilidad en las fases acuosas de carga y aceptora, lo que a su vez podría traer como inconveniente la estabilización de la molécula en la fase de carga, o bien en la fase membrana por formación de un par iónico con el transportador, lo que no va a favorecer la re-extracción hacia la fase aceptora (en el lumen del capilar). En forma general, debido a las características estructurales de la quercetina, para su estudio por LPME se debe tener muy en cuenta el pH de ambas fases acuosas involucradas y del tipo de disolvente orgánico a impregnar en los poros de la membrana hueca "hollow fiber".

En los siguientes experimentos, el EF se utilizó como respuesta a seguir en el estudio del proceso de LPME y se definió como la relación entre la concentración de analito en la fase aceptora y la concentración inicial de éste en la fase de carga [Kou y col., 2004; Yamini y col., 2006; Fontanals y col., 2006]. El proceso de LPME depende de muchos factores que influyen en la obtención de valores altos de EF, valores que determinan mejores límites de detección (LOD). En este caso se utilizó la LPME combinada con la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y en la **Figura 3.7** se ilustra el cromatograma típico de la quercetina junto a su espectro de absorción UV

En la **Figura 3.7** se observa que el gradiente empleado para el análisis de la quercetina por HPLC permitió una elución del analito a un tiempo de retención entre 11,5 y 12 min. Es necesario este tiempo prolongado ya que existen otras estructuras fenólicas más polares y más ácidas como por ejemplo los glicósidos de flavonoides, que pueden ser extraídos de la planta por LPME conjuntamente con la quercetina y solaparse durante la separación en fase reversa en la columna C18. La longitud de onda seleccionada para el análisis fue de 260 nm, cercana a uno de los máximos de absorción de la molécula y un valor de compromiso en el análisis de flavonoides.

La dificultad observada en los estudios preliminares indicados nos indujo a realizar un estudio más detallado del comportamiento de este flavonoide en este tipo de sistema de microextracción. Para ello se estudiaron sistemas de membrana a diferentes valores de pH en la fase de carga y empleando diversas fases orgánicas (SLM) en las que se varió su composición incluyendo el diluyente, constituido por un disolvente orgánico no activo, el modificador, como disolvente orgánico activo y el extractante, especie química que facilita el transporte del analito hacia la fase aceptora en el sistema de membranas.

III. Estudio y aplicación de la microextracción en fase líquida a la determinación de polifenoles antinutricionales de la dieta mediterránea. Caso de la quercetina en alimentos vegetales

Resultados y Discusión

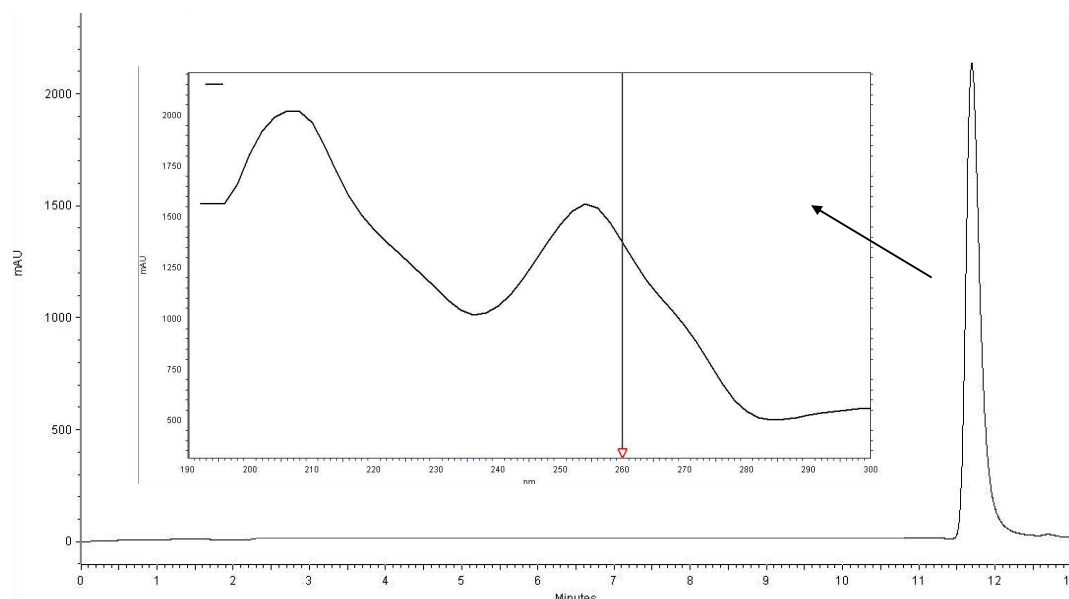


Figura 3.7. Cromatograma de la HPLC obtenido para la quercetina (11,7 min) y espectro UV en el rango 180-300 nm (detección a 260 nm).

III.5.1.2. Estudio del tipo de fase orgánica (SLM)

Se realizaron una serie de experimentos variando la composición de fases orgánicas y tomando como base los tres tipos de disolventes, dodecano (DOD), dihexiléter (DHE) y decanol (DEC) empleados en el estudio preliminar de manera individualizada y con los cuales se habían obtenido valores muy bajos de EF. Teniendo en cuenta los esquemas de las **Figuras 3.5** y **3.6**, realizamos una serie de experimentos en los que se varió la composición de la fase orgánica, estableciendo un compromiso entre los procesos de extracción y re-extracción. En las siguientes tablas se ilustra la composición de las diferentes fases orgánicas empleadas para la quercetina, donde se combinaron el diluyente, el modificador y el extractante, tanto en el régimen de gradiente de pH (**Tabla 3.1**) como de gradiente aniónico (**Tabla 3.2**).

III. Estudio y aplicación de la microextracción en fase líquida a la determinación de polifenoles antinutricionales de la dieta mediterránea. Caso de la quercetina en alimentos vegetales

Resultados y Discusión

Tabla 3.1. Componentes de SLM en régimen de gradiente de pH para la LPME de la quercetina

Tipo	Disolvente ^a			Disolv.+Extract. ^b		Diluyente+Modificador+Extractante ^b			
	A	B	C	1	2	3	4	5	6
Diluyente	DOD	–	–	–	–	DOD	DOD	–	DOD
Modificador	–	DHE	DEC	DHE	DHE	DEC	DEC	DHE	DEC
Extractante	–	–	–	TOA	TBP	TOA	TBP	TOA+TBP	TOA+TBP

^a Estudio preliminar. ^b Mezclas (%): **1** (75:25), **2** (75:25), **3** (50:25:25), **4** (50:25:25), **5** (70:15:15), **6** (50:20:15:15). DOD: dodecano, DHE: dihexiléter, DEC: decanol, TOA: trioctilamina, TBP: tributilfosfato.

Tabla 3.2. Componentes de SLM en régimen de gradiente iónico para la LPME de la quercetina

Tipo	Disolvente+Extractante ^a		Diluyente+modificador+Extractante ^a	
	7	8	9	10
Diluyente	–	DOD	DOD	DOD
Modificador	DHE	DEC	DEC	DEC
Extractante	ALIQUAT 336	ALIQUAT 336	ALIQUAT 336	ALIQUAT 336

^a Mezclas (%): **7** (80:20), **8** (75:5:20), **9** (65:15:20), **10** (50:30:20). DOD: dodecano, DHE: dihexiléter, DEC: decanol, ALIQUAT 336: cloruro de metiltrioctilamonio.

Estas combinaciones se establecieron teniendo en cuenta las características estructurales de la molécula de quercetina y su interacción con los componentes de la SLM. Se utilizó el DHE como disolvente medianamente activo (sistemas 1, 2, 5 y 7) y el DEC como disolvente activo (sistema 6), el cual puede establecer puentes de hidrógeno con la quercetina y provocar una estabilización irreversible de la molécula en esta fase. Para disminuir este posible efecto se adicionó DOD como diluyente cuando se trabajó con DEC (sistemas 3, 4, 6 y 8-10). Se utilizaron, además, una serie de extractantes en proporción de 20-25% para realizar un transporte facilitado bajo los gradientes indicados de pH y aniónico, tales como el TOA y el TBP, los cuales a través de mecanismos de solvatación facilitan la extracción de compuestos fenólicos [Jung y col., 2002], y por otro lado el Aliquat 336, que es capaz de formar un par iónico con la molécula y facilitar el transporte mediante un flujo de especies cargadas [Jonsson y Mathiasson, 1999; Schlosser y col., 2005; Yamini y col., 2006]. Estos extractantes facilitan la extracción de compuestos con características ácidas en sistemas de dos fases líquidas [Qin y col., 2001; Li y col., 2002; Mei y col., 2002; Matsumoto y col., 2003; Yankov y col., 2004; Schlosser y col., 2005] pero en el presente sistema, constituido por tres fases líquidas, el proceso se hace más complejo ya que de algún modo se debe favorecer la extracción hacia la fase orgánica y a su vez desfavorecer la estabilización de la molécula en esta fase para su re-extracción en la fase aceptora.

Para los sistemas bajo régimen de gradiente de pH (**Tabla 3.1**), se utilizaron como fases de carga disoluciones acuosas de quercetina (0,5 µg/mL) a pH 2, saturadas con 500mM de NaCl añadido, para

III. Estudio y aplicación de la microextracción en fase líquida a la determinación de polifenoles antinutricionales de la dieta mediterránea. Caso de la quercetina en alimentos vegetales

Resultados y Discusión

provocar un efecto de "salting out" que favorezca la emigración hacia los poros de la membrana hueca y como fase aceptora NaOH 1M a pH12. De esta manera se garantiza que la molécula en fase de carga se encuentre en forma no disociada y se establezca un gradiente de pH entre las dos disoluciones acuosas (**Figura 3.5**). Por otro lado y en el caso de los sistemas de gradiente aniónico (**Tabla 3.2**), se emplearon disoluciones acuosas de 0,1 M de NaOH a pH11 como fase de carga y NaCl 2M a pH6 como fase aceptora, para establecer un flujo de iones de la quercetina disociada en un sentido y de iones cloruro en el otro (**Figura 3.6**). Todas las muestras se sometieron a una agitación de 500 rpm durante 3h de experimento.

Los resultados obtenidos en la LPME de la quercetina bajo estos dos tipos de transporte con el uso de diferentes SLM se resumen en el gráfico de la **Figura 3.8**. En el caso de los disolventes sin ningún tipo de aditivo (A-C), el mejor resultado se había obtenido con el DHE, seguido del DEC y el DOD. Esto indicaba que la quercetina no se extraía adecuadamente con el empleo de un disolvente apolar como el DOD y que, por otro lado, podría ser estabilizada en la SLM por interacción con el DEC, siendo el DHE el disolvente más idóneo por sus características estructurales y de polaridad. En general, el uso de otros diez sistemas de membranas no favoreció la extracción de la quercetina y en el caso de los sistemas 2 y 8, se observó un ligero aumento en el EF.

En relación al gradiente de pH, y en el caso de los sistemas 1 y 2, la presencia de TBP mejora el EF ya que es un extractante que forma complejos solvatados menos estables que con TOA [Wardell y King, 1978], lo que permite una más fácil liberación del analito hacia la fase aceptora. Sin embargo, este fenómeno no se observa para los sistemas 3 y 4, donde la presencia de un modificador más activo como el DEC parece favorecer la estabilización de la quercetina en la SLM por solvatación. El uso de una mezcla de estos dos extractantes en los sistemas 5 y 6 no ofrece una mejoría, lo que indicó una competencia negativa para el transporte de la quercetina en su interacción con TBP y TOA en la SLM durante el proceso extractivo.

En el caso de los sistemas que usan Aliquat (gradiente aniónico), el sistema 8 que utiliza la combinación de DOD+DEC+Aliquat (75:5:20), es decir, una muy poca cantidad de DEC, permitió el mejor resultado extractivo. Esto indicó de alguna manera que una pequeña proporción en la SLM de un modificador más activo que el DHE, como es el caso del DEC, es suficiente para favorecer la extracción de la quercetina en un primer paso extractivo y no estabiliza en demasía la molécula en la SLM, favoreciendo a su vez el segundo paso de re-extracción hacia la fase aceptora.

No obstante la obtención de una mejoría en la LPME de la quercetina, los mejores valores de EF obtenidos resultaron ser muy bajos. Este fenómeno se ha observado para otros tipos de moléculas fenólicas como el salbutamol y la terbutalina en sistemas de tres fases con el uso de membranas tipo "hollow fiber" [Yamini y col., 2006] que luego de realizar experimentos con una veintena de fases orgánicas diversas se han obtenido EF desde valores menores que la unidad hasta solo la decena. Se hace necesario en este contexto, considerar las características de las fases de carga yceptoras que puedan favorecer el paso de la quercetina a través de la SLM en ambos regímenes de gradiente, así como considerar el contenido del analito en cada fase después del proceso extractivo.

III. Estudio y aplicación de la microextracción en fase líquida a la determinación de polifenoles antinutricionales de la dieta mediterránea. Caso de la quercetina en alimentos vegetales

Resultados y Discusión

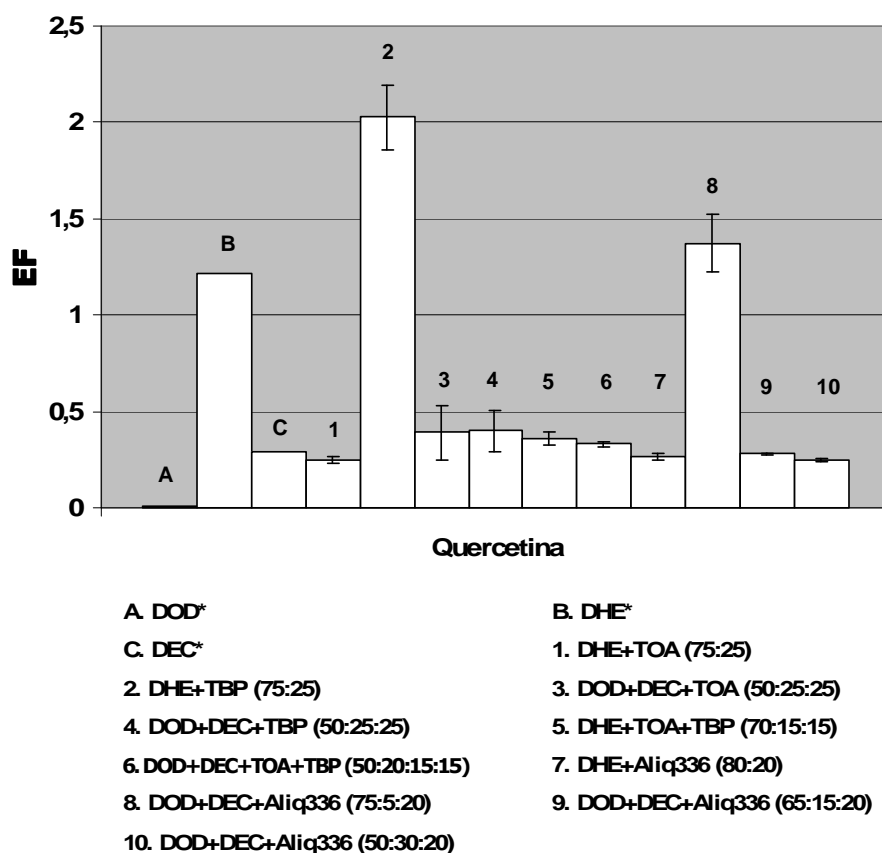


Figura 3.8. LPME de la quercetina con el uso de diferentes fases orgánicas. Condiciones A-C y 1-6: concentración 0,5 µg/mL en 20 mL de fase de carga a pH2, 500 mM NaCl, velocidad de agitación de 500 rpm, 40 µL de NaOH 1M (pH12) como fase aceptora y tiempo de extracción de 3 h. Condiciones 7-10: concentración 500 µg/L en 20 mL de fase de carga de NaOH 0,1M a pH11, velocidad de agitado de 500 rpm, 40 µL de NaCl 2M (pH6) como fase aceptora y tiempo de extracción de 3 h.

III.5.1.3. Influencia del pH de la fase de carga bajo régimen de gradiente de pH

En la LPME con el uso de un gradiente de pH (**Figura 3.5**), una de las variables más importantes a ajustar es el valor del pH de las disoluciones acuosas de carga y aceptora, que garanticen un flujo óptimo del analito en el sentido deseado. Como la quercetina presenta su primer valor de pKa alrededor de 7, es necesario considerar varios valores de pH en la fase acuosa de carga que puedan favorecer el transporte de la molécula mediante gradiente de pH. Estos valores fueron establecidos para la quercetina a pH 2 y pH 5, de tal manera que por un lado y bajo las condiciones del estudio, este compuesto no precipitara en la fase de carga a pH muy bajos (pH2) y garantizara por otro lado la permanencia de la forma no disociada de la molécula a pH cercanos al pKa (pH5). En cuanto a la

III. Estudio y aplicación de la microextracción en fase líquida a la determinación de polifenoles antinutricionales de la dieta mediterránea. Caso de la quercetina en alimentos vegetales

Resultados y Discusión

fase aceptora bajo las condiciones de gradiente de pH, es conocido que para la LPME un pH que considere un valor a partir de un $pK_a+3,3$ ($>10,3$ en este caso) es suficiente para el establecimiento del transporte [Jonsson y col., 1993]. Por esta razón se fijó un valor de pH 12 para la fase aceptora con el uso de una disolución de NaOH 1M. En la **Tabla 3.3** se muestran las condiciones de LPME empleadas en este caso, donde se seleccionaron las condiciones de las fases orgánicas 2 y 4 del estudio anterior.

En estos experimentos se utilizaron como fases de carga, disoluciones acuosas de quercetina ($0,5 \mu\text{g/mL}$) a pH2 y 5, saturadas con 500mM de NaCl añadido, para conseguir el efecto de “salting out” que favorezca la solubilidad hacia la fase orgánica. La muestra se sometió a una agitación de 500 rpm durante 3h de experimento de transporte y se empleó como fase aceptora NaOH 1M a pH12. De esta manera se garantiza que la molécula en fase de carga se encuentre en forma no dissociada y se establezca un gradiente de pH entre las disoluciones acuosas.

Tabla 3.3. Componentes del sistema de membranas en régimen de gradiente de pH para la LPME de la quercetina con fase de carga a pH2 y 5

Fase de carga	SLM (sistemas 2 y 4)	Fase aceptora
pH2	DHE+TBP (75:25)	NaOH 1M (pH12)
pH5	DHE+TBP (75:25)	NaOH 1M (pH12)
pH2	DOD+DEC+TBP (50:25:25)	NaOH 1M (pH12)
pH5	DOD+DEC+TBP (50:25:25)	NaOH 1M (pH12)

DOD: dodecano, DHE: dihexiléter, DEC: decanol, TBP: tributilfosfato.

Previo al inicio del experimento se realizaron ensayos de solubilidad de la quercetina en las fases de carga yceptoras. Los resultados indicaron que este flavonoide es insoluble en disolución acuosa a pH2 a partir de una concentración de $5 \mu\text{g/mL}$ y muy soluble en disolución de NaOH 1M a pH12, lo cual corroboró su solubilidad y acidez como molécula polihidroxilada. Por esta razón se realizaron los estudios con una concentración de quercetina en la fase de carga de $0,5 \mu\text{g/mL}$.

Los resultados obtenidos en la LPME de la quercetina bajo estas condiciones se ilustran en la **Figura 3.9**.

III. Estudio y aplicación de la microextracción en fase líquida a la determinación de polifenoles antinutricionales de la dieta mediterránea. Caso de la quercetina en alimentos vegetales

Resultados y Discusión

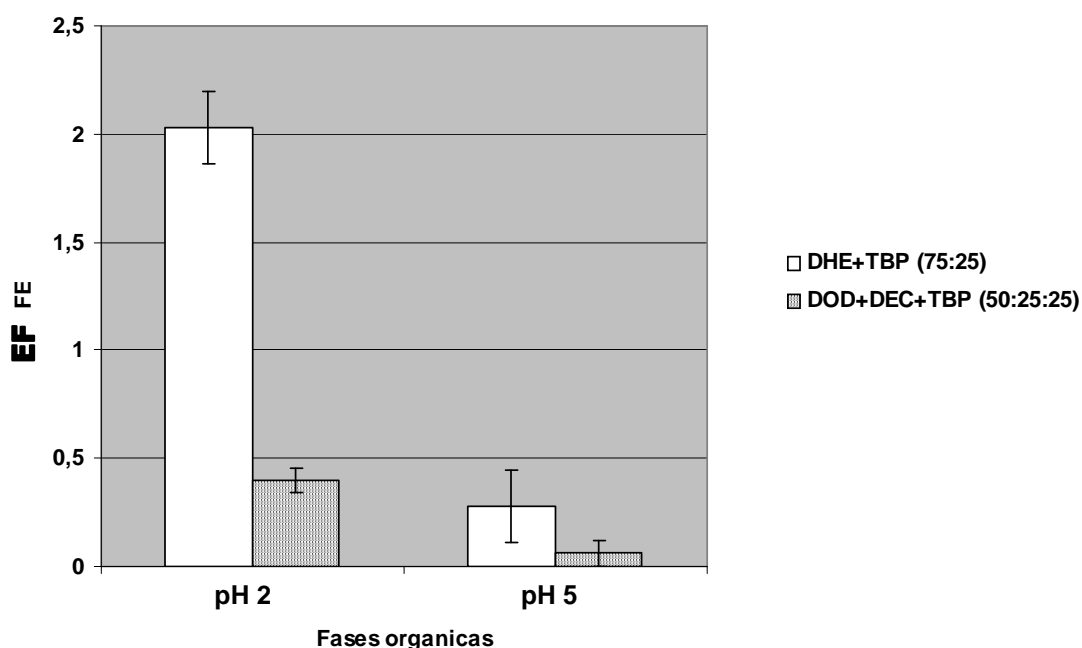


Figura 3.9. LPME de la quercetina con el uso de dos fases orgánicas y distintos valores de pH en la fase de carga. Condiciones: concentración de quercetina de 0,5 µg/mL en 20 mL de fase de carga a pH2 y pH5, 500 mM NaCl, velocidad de agitado de 500 rpm, 40 µL de NaOH 1M (pH12) como fase aceptora y tiempo de extracción de 3 h.

En la **Figura 3.9** se puede observar que la fase orgánica que emplea la mezcla DHE+TBP permite un mejor transporte que el sistema DOD+DEC+TBP tanto a pH2 como a pH5, lo cual ratifica que bajo gradiente de pH, el transporte de la quercetina se ve favorecido por la presencia de un disolvente poco activo como el DHE. Por otro lado, si se realiza una comparación de las condiciones de fase de carga empleadas, se puede conocer que el transporte se facilita cuando se utiliza un valor de pH2 en la fase acuosa de carga, que en correspondencia con el valor de pH12 en la fase aceptora, se establece un gradiente de pH mayor favoreciendo la fuerza impulsora del transporte de la molécula.

III.5.1.4. Influencia del pH de la fase aceptora bajo régimen de gradiente aniónico

En el caso del transporte que se establece con el uso de un extractante de tipo iónico como el Aliquat 336, donde el analito migra a través de la SLM en forma dissociada, el pH de la fase aceptora puede influir en el transporte. Para establecer el gradiente iónico, basta que el pH de la fase de carga sea mayor que el pKa del analito para garantizar la forma dissociada de la molécula. Para la

III. Estudio y aplicación de la microextracción en fase líquida a la determinación de polifenoles antinutricionales de la dieta mediterránea. Caso de la quercetina en alimentos vegetales

Resultados y Discusión

quercetina como el 80% de la molécula se encuentra en forma disociada a $\text{pH} > 9$ [Herrero-Martínez y col., 2005], el pH de la fase de carga se fijó a $\text{pH} 11$ con una disolución de NaOH $0,1\text{M}$, con lo cual a su vez se garantiza una relativamente baja concentración de iones OH^- en esta fase que no interfieran competitivamente durante la extracción de intercambio aniónico [Yamini y col., 2006]. En cuanto a las características de la fase aceptora en el lumen del capilar es necesario utilizar una disolución concentrada de un ion que permita el flujo en sentido inverso a través de la membrana (**Figura 3.6**) como es el caso del Cl^- , por lo que se utilizó una disolución de NaCl 2M . Esta disolución presenta un valor de pH de 6 y debido a que el primer pK_a de la quercetina es 7 , se consideró además un $\text{pH} 8$ en la fase aceptora por adición de unas gotas de NaOH 1M . De esta manera, se pudo observar la influencia del pH de la fase aceptora en la LPME de la quercetina. Finalmente se utilizó la SLM con Aliquat 336 como transportador aniónico, la que contiene DOD+DEC+Aliquat (75:5:20). En la **Tabla 3.4** se muestran las condiciones de LPME empleadas en este estudio.

Tabla 3.4. Componentes del sistema de membranas en régimen de gradiente aniónico para la LPME de la quercetina con fase aceptora a $\text{pH} 6$ y 8

Fase de carga	SLM (sistema 8)	Fase aceptora
NaOH $0,1\text{M}$ ($\text{pH} 11$)	DOD+DEC+Aliquat (75:5:20)	NaCl 2M ($\text{pH} 6$)
NaOH $0,1\text{M}$ ($\text{pH} 11$)	DOD+DEC+Aliquat (75:5:20)	NaCl 2M ($\text{pH} 8$)

DOD: dodecano, DEC: decanol, Aliquat 336: cloruro de metiltrioctilamonio.

En el presente estudio se utilizaron como fases de carga disoluciones acuosas de quercetina ($0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$) con NaOH $0,1\text{M}$ a $\text{pH} 11$. La muestra se sometió a una agitación de 500rpm durante 3h de extracción y se empleó como fase aceptora NaCl 2M a $\text{pH} 6$ o $\text{pH} 8$. De esta manera se garantiza que la molécula en fase de carga se encuentre en forma disociada y se establezca un gradiente aniónico entre las disoluciones acuosas.

Previo al inicio del experimento se realizaron ensayos de solubilidad de la quercetina en las fases de carga yceptoras. Los resultados indicaron que este flavonoide es muy soluble en disolución acuosa de NaOH $0,1\text{M}$ a $\text{pH} 11$ y es poco soluble en disolución de NaCl 2M a $\text{pH} 6$, donde comienza a ser soluble a partir de un valor de pH de 8 . Estos ensayos corroboraron la solubilidad y acidez de esta molécula polihidroxilada.

En la **Figura 3.10** se detallan los valores de EF obtenidos en este estudio para los sistemas 6 y 10 .

III. Estudio y aplicación de la microextracción en fase líquida a la determinación de polifenoles antinutricionales de la dieta mediterránea. Caso de la quercetina en alimentos vegetales

Resultados y Discusión

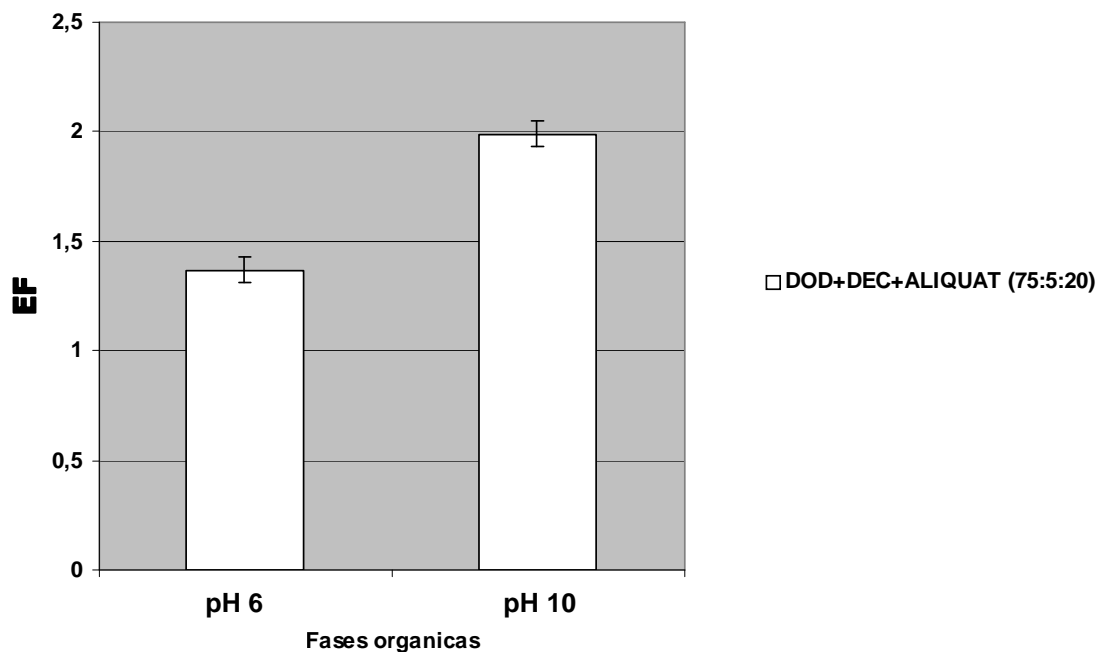


Figura 3.10. LPME de la quercetina con el uso distintos valores de pH en la fase aceptora de NaCl 2M. Condiciones: concentración de quercetina de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ en 20 mL de fase de carga a pH11 con NaOH 0,1M, velocidad de agitado de 500 rpm, 40 μL de NaCl 2M (pH6 y 8) como fasesceptoras y tiempo de extracción de 3 h.

Como se observa en la **Figura 3.10**, el transporte se ve facilitado cuando la fase aceptora se encuentra a un $\text{pH} > \text{pK}_a$ de la quercetina. Cuando la disolución de NaCl 2M se encuentra a un pH6, inferior y cercano al primer pK_a de la quercetina con valor de 7, lo que desfavorece su re-extracción hacia la fase aceptora, contrariamente al caso con fase aceptora a pH 8 en la que la quercetina está en forma aniónica, provocando una mejor reextracción y de ahí su mayor valor de EF. No obstante, y como se ha obtenido hasta ahora, los valores de EF siguen siendo bajos, lo cual es un indicador de que existen otros factores que impiden el correcto transporte de la quercetina en este tipo de sistema.

A continuación se seleccionaron las mejores condiciones obtenidas para cada tipo de transporte y se determinó el contenido de quercetina remanente en cada fase después de la extracción.

III. Estudio y aplicación de la microextracción en fase líquida a la determinación de polifenoles antinutricionales de la dieta mediterránea. Caso de la quercetina en alimentos vegetales

Resultados y Discusión

III.5.1.5. Comportamiento de la quercetina bajo LPME

Con el propósito de conocer qué tipo de interacciones se establecen entre la quercetina y el sistema de membranas, se seleccionaron las mejores condiciones obtenidas para la LPME en régimen de gradiente de pH y gradiente aniónico para determinar la proporción de quercetina que queda en cada una de las fases después del proceso extractivo. Las mejores condiciones para los dos tipos de transporte mostraron un EF alrededor de 2 (**Figuras 3.9 y 3.10**) y se detallan en la **Tabla 3.5** a continuación.

Tabla 3.5. Componentes del sistema de membranas en régimen de gradiente de pH y aniónico para la LPME de la quercetina

Sistema	Fase de carga	SLM o fase orgánica	Fase aceptora
2	HCl (pH2)	DHE+TBP (75:25)	NaOH 1M (pH12)
8	NaOH 0,1M (pH11)	DOD+DEC+Aliquat (75:5:20)	NaCl 2M (pH8)

DOD: dodecano, DHE: dihexiléter, DEC: decanol, Aliquat 336: cloruro de metiltrioctilamonio.

Posterior a la LPME realizada bajo las condiciones detalladas en la Tabla anterior, se analizaron por HPLC las tres fases involucradas de la siguiente manera. Se tomó una alícuota de la fase de carga (FD) y se ajustó a pH2 previa inyección en el sistema de HPLC. La fase orgánica o SLM se analizó mediante la inmersión de la membrana en 1,5 mL de MeOH para extraer la SLM. Finalmente, la fase aceptora (FA) se recolectó y se ajustó su pH antes del análisis por HPLC. La cantidad de quercetina remanente en cada fase fue cuantificada y el porcentaje obtenido se muestra en la **Figura 3.11**.

Como se ilustra en la siguiente Figura, el transporte mediante gradiente de pH se ve obstaculizado durante la re-extracción de la quercetina en la interface SLM-FA, por esta razón después de 3h de extracción casi el 60% queda en FD y el otro 40% en la SLM, pasando hacia la FA una cantidad muy pequeña del analito. Por lo tanto, en régimen de gradiente de pH el paso limitante se encuentra en la re-extracción. Si se observa el esquema del proceso en la **Figura 3.4**, para llevar a cabo la re-extracción de la quercetina desde la SLM es necesario que la molécula se disocie luego de ser extraída en su forma neutra. A pesar del empleo de una disolución de NaOH a una concentración elevada de 1M y un pH de 12 en la FA, que constituye unas condiciones fuertemente básicas que garantizan una disociación de la molécula, bajo estas condiciones, la quercetina se resiste a atravesar la interface SLM-FA, posiblemente debido a una alta estabilización del complejo de solvatación quercetina-TBP en la SLM, lo que facilita el proceso extractivo pero que luego impide la liberación del analito hacia la FA (proceso de re-extracción). Se conoce que la quercetina es uno de los flavonoides menos lipofílicos con un valor de coeficiente de partición octanol-agua de 1,82

III. Estudio y aplicación de la microextracción en fase líquida a la determinación de polifenoles antinutricionales de la dieta mediterránea. Caso de la quercetina en alimentos vegetales

Resultados y Discusión

[Rothwell y col., 2005], y que compuestos fenólicos estudiados bajo sistemas de membranas líquidas soportadas con un valor de coeficiente de partición octanol-agua cercano a 3 son fácilmente disueltos en la fase orgánica pero difíciles de re-extraer posteriormente en la fase aceptora, mostrando bajas eficiencias de extracción [Chimuka y col., 2000]. Estos antecedentes permiten entender las dificultades encontradas en el presente trabajo en el uso de la LPME para la extracción de la quercetina. Este fenómeno puede ser mejorado con la búsqueda de un transportador que permita doblemente una adecuada extracción y una baja estabilización del complejo en la SLM.

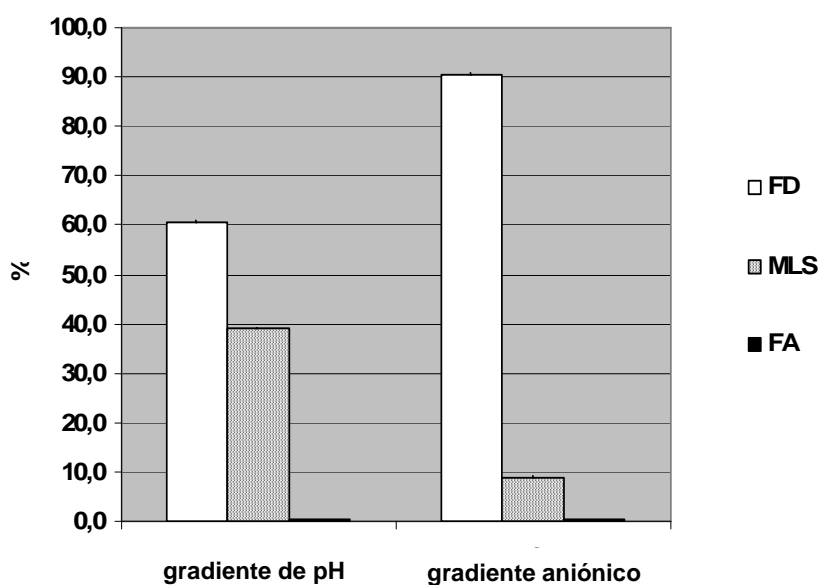


Figura 3.11. Contenido porcentual de la quercetina en cada fase (FD: fase de carga, SLM: membrana líquida soportada o fase orgánica, FA: fase aceptora) después de la LPME. Condiciones: concentración de quercetina de 0,5 µg/mL en 20 mL de fase de carga, velocidad agitación 500 rpm, 40 µL fase aceptora y tiempo transporte 3 h. SLM gradiente de pH: DHE+TBP (75:25). SLM gradiente aniónico: DOD+DEC+Aliquat (75:5:20).

Por otro lado, los resultados obtenidos para la LPME bajo gradiente aniónico fueron diferentes. En la **Figura 3.11** se muestra con claridad que el paso limitante para estas condiciones aparece en la primera extracción, es decir en el transporte que se establece en la interfase FD-SLM, donde prácticamente toda la quercetina (90%) permanece en disolución. Este resultado puede ser explicado igualmente que los anteriores teniendo en cuenta las características estructurales de la molécula de quercetina. Bajo gradiente aniónico, la quercetina debe migrar a través de las fases en forma disociada (**Figura 3.6**), pero probablemente su alta solubilidad en medio acuoso básico (NaOH a pH11) prevalece frente a la capacidad del sistema de extracción. El transportador Aliquat 336 no es

III. Estudio y aplicación de la microextracción en fase líquida a la determinación de polifenoles antinutricionales de la dieta mediterránea. Caso de la quercetina en alimentos vegetales

Resultados y Discusión

capaz en este caso de extraer la quercetina desde el medio acuoso básico hacia la SLM, y lo hace solo en un 10% aproximadamente.

Teniendo en cuenta los resultados para ambos tipos de transportes, la LPME no es el método ideal para realizar una alta preconcentración de la quercetina en muestras acuosas. El número de grupos fenólicos de la molécula y el sistema aromático que posee la estructura (**Figura 3.4**) propicia la formación de enlaces por puente de hidrógeno intra e intermolecular, que en muchas ocasiones dificulta cualquier proceso extractivo. Una variante futura podría ser la derivatización de la molécula que minimice este tipo de interacciones mediante el bloqueo de sus sitios activos. No obstante, para observar la selectividad de la LPME a través de la limpieza de la muestra o “clean up” característica de este método extractivo y en vista de una posible aplicación futura, se realizó el análisis de la quercetina en varios tipos de alimentos de la dieta mediterránea.

III.5.2. Aplicabilidad del método de LPME en alimentos de la dieta mediterránea

En primer término se realizó una calibración del método con el empleo de las condiciones optimizadas del sistema 2 (**Tabla 3.6**). Para ello se emplearon disoluciones acuosas de quercetina en un rango de 0,5-10 $\mu\text{g/mL}$. En la **Figura 3.12** y **Tabla 3.7** se detallan los resultados del calibrado del método LPME-HPLC, para el cual se obtuvo una adecuada correlación (0,998), así como una adecuada repetitividad de 1,3% para un nivel de concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo, debido a los inconvenientes encontrados para el método, el LOD se obtuvo en el orden de ppb, siendo posible para la LPME la obtención de LOD en ppt para el caso de compuestos fenólicos como los clorofenoles [Liu y col., 2005], los alquilfenoles [Liu y col., 2006] y dinitrofenoles [Berhanu y col., 2006].

III. Estudio y aplicación de la microextracción en fase líquida a la determinación de polifenoles antinutricionales de la dieta mediterránea. Caso de la quercetina en alimentos vegetales

Resultados y Discusión

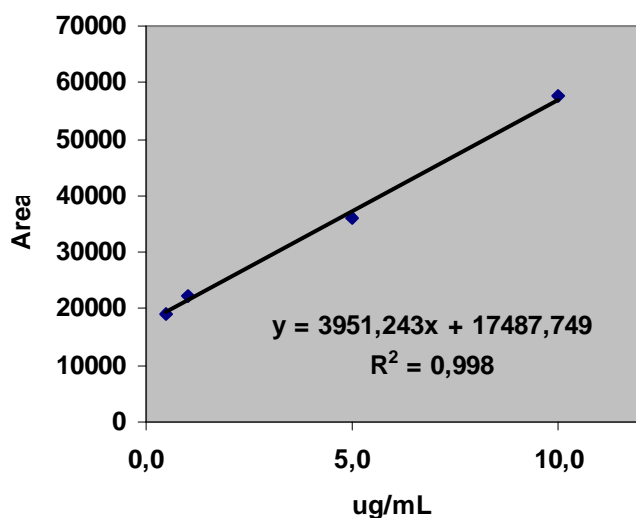


Figura 3.12. Curva de calibrado del método de LPME-HPLC para la quercetina.

Tabla 3.6. Calibrado del método de LPME con el uso de membranas huecas (hollow fiber) en el análisis de quercetina en alimentos de la dieta mediterránea

Compuesto	Rango (µg/mL)	pendiente ± SD	ordenada en origen ± SD	r^2	LOD ^a (µg/L)	Repetitividad ^b (%)
Quercetina	0,5-10	3951 ± 140	17488 ± 785	0,998	7,9	1,3

^a LOD: límite de detección determinado por el método de señal-ruido. ^b Determinado a 10 (µg/mL).

Se analizaron tres muestras distintas de alimentos que comúnmente se consumen en los países del mediterráneo: alubias como legumbre (*Vicia faba*), el brócoli como crucífera (*Brassica oleracea*) y el té verde como bebida (*Camellia sinensis*). En el caso de estas dos últimas, particularmente son alimentos ricos en quercetina y derivados. En la **Figura 3.13** se muestran los cromatogramas de los extractos acuosos (línea continua), que para el presente método constituyeron las fases de carga, solapados con los cromatogramas de las fasesceptoras (línea discontinua) obtenidas después de la LPME. Para los tres extractos se observó un nivel relativamente alto de preconcentración, así como un elevado efecto de “clean up”, especialmente para el brócoli y el té verde, conjuntamente con una adecuada selectividad en la extracción de la quercetina, que fue identificada a los 11,2 min aproximadamente. Como dato adicional se pudieron detectar además otros dos flavonoides: la catequina y la rutina, alrededor de 6 y 10 min, respectivamente.

III. Estudio y aplicación de la microextracción en fase líquida a la determinación de polifenoles antinutricionales de la dieta mediterránea. Caso de la quercetina en alimentos vegetales

Resultados y Discusión

En la **Tabla 3.7** se detallan los resultados del análisis cuantitativo de la quercetina en los tres extractos acuosos obtenidos por cocción a partir de 1,5 g de material vegetal. El contenido de quercetina osciló entre 1,6 y 10,8 mg/g, en el orden de la concentración hallada en estudios anteriores para estos alimentos [Hollman y Arts, 2000].

Tabla 3.7. Aplicabilidad del método de LPME con el uso de membranas tipo “hollow fiber” en el análisis de quercetina en alimentos de la dieta mediterránea

Tipo de alimento	Nombre común	Especie	Contenido (mg/g) ^a	SD
Legumbre	Alubia bayo	<i>Vicia faba</i>	1,6	0,2
Crucífera	Brócoli	<i>Brassica oleracea</i>	2,8	0,3
Bebida	Té verde	<i>Camellia sinensis</i>	10,8	2,4

^a Obtenido a partir de la decocción de 1,5g de material vegetal seco.

Estos resultados con muestras reales indicaron una mayor capacidad extractiva de la esperada según la sensibilidad del método obtenida en el presente estudio para muestras modelo. Este fenómeno puede ser explicado teniendo en cuenta que en las muestras reales existe la presencia de un gran número de compuestos en concentración significativa tales como los polifenoles (ejemplo la catequina y la rutina identificadas) que pueden tener un efecto positivo en el proceso extractivo, favoreciéndose el transporte del conjunto de compuestos a través del sistema de membranas durante la LPME.

III. Estudio y aplicación de la microextracción en fase líquida a la determinación de polifenoles antinutricionales de la dieta mediterránea. Caso de la quercetina en alimentos vegetales

Resultados y Discusión

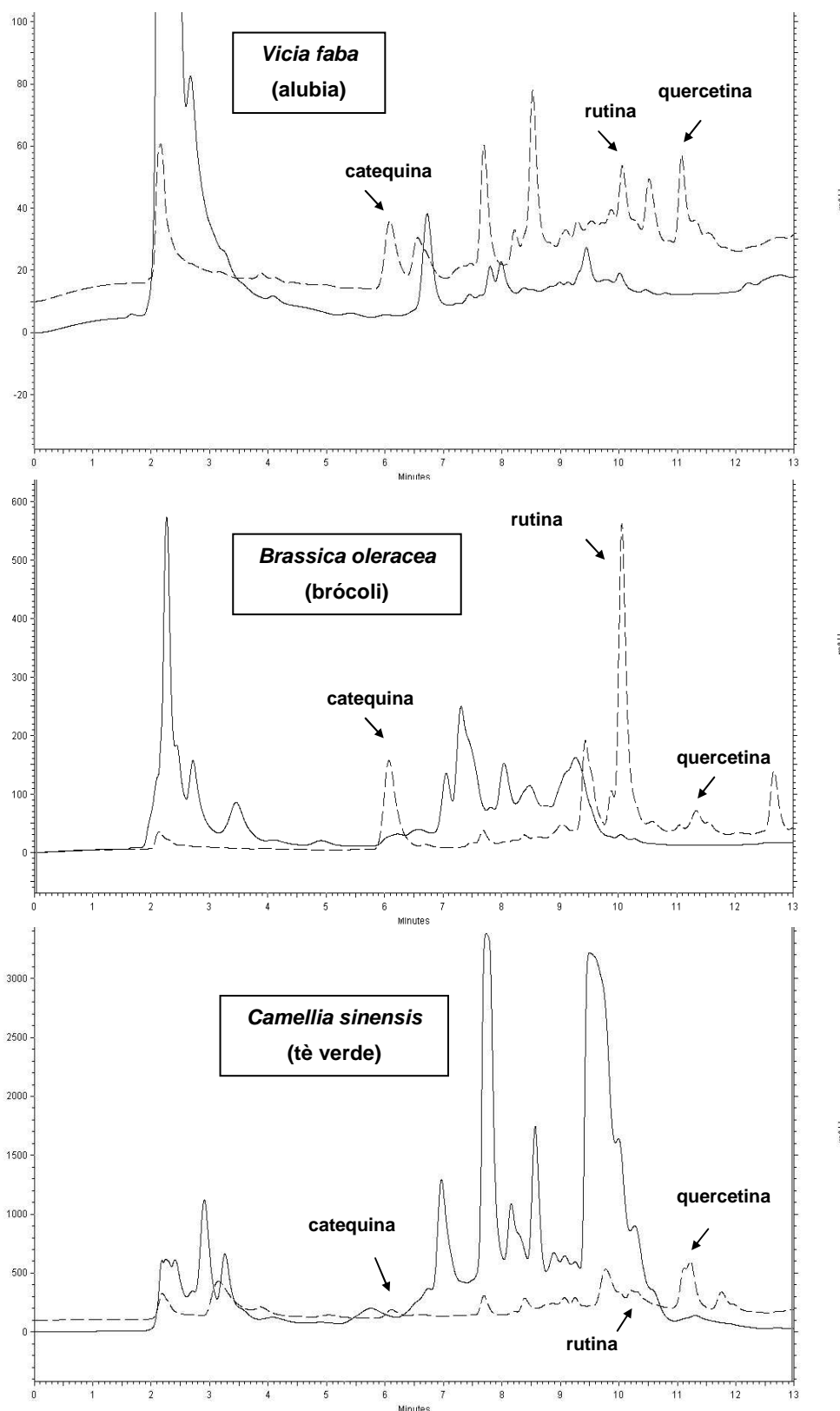


Figura 3.13. Cromatogramas del extracto acuoso de *Vicia faba*, *Brassica oleracea* y *Camellia sinensis* antes (línea continua) y después (línea discontinua) del proceso de LPME. Identificación de catequina (6,1 min), rutina (10,1 min) y quercetina (11,2 min).

III.6. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente capítulo se pueden extraer las siguientes conclusiones más significativas:

1. La LPME no resultó un método eficiente para la extracción y pre-concentración de la quercetina en muestras modelo.
2. La LPME demostró que el transporte facilitado de la quercetina con el uso de modificadores poco activos y extractantes que formen complejos poco estables en la membrana líquida permitía una relativamente mayor eficiencia de extracción.
3. La aplicabilidad del método de LPME-HPLC en alimentos permitió una adecuada selectividad en la pre-concentración de la quercetina y un buen efecto “clean-up” en extractos de muestras reales.
4. El método de LPME-HPLC resultaría ser una herramienta analítica económica y fácil de usar en futuros estudios de análisis de quercetina en alimentos si se perfecciona su eficiencia de extracción mediante la disminución de las interacciones del analito con los componentes del sistema de membrana líquida.

III. Estudio y aplicación de la microextracción en fase líquida a la determinación de polifenoles antinutricionales de la dieta mediterránea. Caso de la quercetina en alimentos vegetales

Bibliografía

III.7. BIBLIOGRAFÍA

- Andreoli, R.; Manini, P.; Bergamaschi, E.; Brustolin, A.; Mutti, A. Solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for determination of monoaromatic hydrocarbons in blood and urine. Application to people exposed to air pollutants. *Chromatographia* (1999), 50(3/4), 167-172.
- Angerer J., Schaller K. H. (eds) (1988) Analyses of hazardous substances in biological materials. Methods for biological monitoring. VCH, Weinheim, pp 52–66.
- Angerer, J.; Hoersch, B. Determination of aromatic hydrocarbons and their metabolites in human blood and urine. *Journal of Chromatography B* (1992), 580(1-2), 229-55.
- Astier, A. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of urinary metabolites of benzene, nitrobenzene, toluene, xylene and styrene. *Journal of Chromatography B* (1992), 573(2), 318-22.
- Bardstü, K. F.; Ho, T. S.; Rasmussen, K. E.; Pedersen-Bjerggaard, S.; Jonsson, J. A. Supported liquid membranes in hollow fiber liquidphase microextraction (LPME) – Practical considerations in the three-phase mode. *Journal of Separation Science* (2007), 30, 1364–1370.
- Berhanu, T.; Liu, J.; Romero R.; Megersa, N.; Jonsson, J.A. Determination of trace levels of dinitrophenolic compounds in environmental water samples using hollow fiber supported liquid membrane extraction and high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* (2006), 1103, 1–8.
- Burrini, C. Simultaneous HPLC determination of hippuric acid, *o*-, *m*-, and *p*-methylhippuric acids, mandelic acid, and phenylglyoxylic acid in urine. *Medicina del Lavoro* (1998), 89(5), 404-411.
- Charalabaki, M.; Psillakis, E.; Mantzavinos, D.; Kalogerakis, N. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater treatment plant effluents using hollow fibre liquid-phase microextraction. *Chemosphere* (2005), 60, 690–698.
- Fontanals, N.; Barri, T.; Bergstro, S.; Jonsson, J. A. Determination of polybrominated diphenyl ethers at trace levels in environmental waters using hollow-fiber microporous membrane liquid–liquid extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* (2006), 1133, 41–48.
- Fujii, T.; Kawabe, S.; Horike, T.; Taguchi, T.; Ogata, M. Simultaneous determination of the urinary metabolites of toluene, xylene and styrene using high-performance capillary electrophoresis. Comparison with high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* (1999), 730(1), 41-47.
- Jonsson, J. A.; Lovkvist, P.; Audunsson, G.; Nilve, G. Mass transfer kinetics for analytical enrichment and sample preparation using supported liquid membranes in a flow system with stagnant acceptor liquid. *Analytical Chimica Acta* (1993), 277(1), 9-24.
- Jönsson, J. A.; Mathiasson, L. Liquid membrane extraction in analytical sample preparation: I. Principles Trends in Analytical Chemistry (1999a), 18, 318–325.
- Jonsson, J. A.; Mathiasson, L. Liquid membrane extraction in analytical sample preparation II. Applications. Trends in Analytical Chemistry (1999b), 18, 325-334.
- Jung, V.; Chimukab, L.; Jönsson, J. Å.; Niedack, N.; Bowens, P.; Alsanius, B. Supported liquid membrane extraction for identification of phenolic compounds in the nutrient solution of closed hydroponic growing systems for tomato. *Analytica Chimica Acta* (2002), 474, 49–57.
- Kou, D.; Wang, X.; Mitra, S. Supported liquid membrane microextraction with high-performance liquid chromatography–UV detection for monitoring trace haloacetic acids in water. *Journal of Chromatography A* (2004), 1055, 63–69.

III. Estudio y aplicación de la microextracción en fase líquida a la determinación de polifenoles antinutricionales de la dieta mediterránea. Caso de la quercetina en alimentos vegetales

Bibliografía

- Laffon, B.; Lema, M.; Mendez, J. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of urinary mandelic and phenylglyoxylic acids as indirect evaluation of styrene exposure. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* (2001), 753(2), 385-393.
- Lee, J.; Lee, H. K.; Rasmussen, K. E.; Pedersen-Bjergaard, S. Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: A review. *Analytica Chimica Acta* (2008), 624, 253-268.
- Li, Z.; Qin, W.; Dai, Y. Liquid-Liquid Equilibria of Acetic, Propionic, Butyric, and Valeric Acids with Trioctylamine as Extractant. *Journal of Chemical and Engineering Data*, (2002), 47, 843-848.
- Liu, J.; Jonsson, J. A.; Mayer P. Equilibrium Sampling through Membranes of Freely Dissolved Chlorophenols in Water Samples with Hollow Fiber Supported Liquid Membrane. *Analytical Chemistry* (2005), 77, 4800-4809.
- Liu, J-F.; Hu, X-L.; Peng, J-F.; Jonsson, J. A.; Mayer, P.; Jiang, G. B. Equilibrium Sampling of Freely Dissolved Alkylphenols into a Thin Film of 1-Octanol Supported on a Hollow Fiber Membrane. *Analytical Chemistry* (2006), 78, 8526-8534.
- Marchei, E.; Joya, X.; Garcia-Algar, O.; Vall, O.; Pacifici, R.; Pichini, S. Ultrasensitive detection of nicotine and cotinine in teeth by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* (2008), 22(16), 2609-2612.
- Matsumoto, M.; Takahashi, T.; Fukushima, K. Synergistic extraction of lactic acid with alkylamine and tributylphosphate: effects of amines, diluents and temperature. *Separation and Purification Technology* (2003), 33, 89-93.
- Mei, F.; Qin, W.; Dai, Y. Extraction Equilibria of Benzoic Acid with Tributyl Phosphate in Kerosene and 1-Octanol. *Journal of Chemistry and Engineering Data* (2002), 47, 941-943.
- Merken, H. M.; Beecher, G. R. Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2000), 48, 577-599.
- Moon, D. H.; Paik, N. W.; Shim, Y. Analysis of some metabolites of organic solvents in urine by high-performance liquid chromatography with β -cyclodextrin. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* (1997), 694(2), 367-374.
- Mortaheb, H. R.; Amini, M. H.; Sadeghian, F.; Mokhtarani, B.; Daneshyar, H. Study on a new surfactant for removal of phenol from wastewater by emulsion liquid membrane. *Journal of Hazardous Materials* (2008), 160, 582-588.
- Murtomaa, M.; Tervaniemi, Olli-Matti; Parviainen, J.; Ruokojaervi, P.; Tuukkanen, J.; Viluksela, M. Dioxin exposure in contaminated sawmill area: the use of molar teeth and bone of bank vole (*Clethrionomys glareolus*) and field vole (*Microtus agrestis*) as biomarkers. *Chemosphere* (2007), 68(5), 951-957.
- Pascual J. A.; Diaz D.; Segura J.; Garcia-Algar O.; Vall O.; Zuccaro P.; Pacifici R.; Pichini S. A simple and reliable method for the determination of nicotine and cotinine in teeth by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry RCM* (2003), 17(24), 2853-5.
- Qin, W.; Cao, Y.; Luo, X.; Liu, G.; Dai, Y. Extraction mechanism and behavior of oxalic acid by trioctylamine. *Separation and Purification Technology* (2001), 24, 419-426.
- Reese, E.; Kimbrough, R. D. Acute toxicity of gasoline and some additives. *Environmental Health Perspectives* (1993), 101(SUPPL. 6), 115-31.
- Schlosser, S.; Kertesz, R.; Martak, J. Recovery and separation of organic acids by membrane-based solvent extraction and pertraction. An overview with a case study on recovery of MPCA. *Separation and Purification Technology* (2005), 41, 237-266.

III. Estudio y aplicación de la microextracción en fase líquida a la determinación de polifenoles antinutricionales de la dieta mediterránea. Caso de la quercetina en alimentos vegetales

Bibliografía

- Shen, Y. In Vitro cytotoxicity of BTEX metabolites in HeLa cells. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* (1998), 34(3), 229-234.
- Tamada, J. A.; Kertes, A. S.; King, C. J. Extraction of carboxylic acids with amine extractants. 1. Equilibria and law of mass action modeling. *Industrial and Engineering Chemistry Research* (1990a), 29(7), 1319-1326.
- Tamada, J. A.; Kertes, A. S.; King, C. J. Extraction of carboxylic acids with amine extractants. 2. Chemical interactions and interpretation of data. *Industrial and Engineering Chemistry Research* (1990b), 29(7), 1327-1333.
- Tolnai, B.; Gelencser, A.; Gal, C.; Hlavay, J. Evaluation of the reliability of diffusive sampling in environmental monitoring. *Analytica Chimica Acta* (2000), 408(1-2), 117-122.
- Trtic-Petrovic, T.; Liu, J-F.; Jonsson, J. A. Equilibrium sampling through membrane based on a single hollow fibre for determination of drug-protein binding and free drug concentration in plasma. *Journal of Chromatography B* (2005), 826, 169-176.
- Vial, J; Jardy, A. Experimental comparison of the different approaches to estimated LOD and LOQ of an HPLC method. *Analytical Chemistry* (1999), 71, 2672-2677.
- Wang, Ch-Y.; Huang, Ch-T.; Hsieh, Y-Z. Determination of metabolites of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene by β -cyclodextrin modified capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science* (2003), 26, 69-74.
- Wardell JM, King CJ, 1978. Solvent equilibriums for extraction of carboxylic acids from water. *Journal of Chemical and Engineering Data* 23 (2), 144-148.
- Wodzki, R.; Nowaczyk, J. Propionic and acetic acid pertraction through a multimembrane hybrid system containing TOPO or TBP. *Separation and Purification Technology* (2002), 26, 207-220.
- Yamini, Y.; Reimann, C. T.; Vatanara, A.; Jonsson, J. A. Extraction and preconcentration of salbutamol and terbutaline from aqueous samples using hollow fiber supported liquid membrane containing anionic carrier. *Journal of Chromatography A* (2006), 1124, 57-67.
- Yankov, D.; Molinier, J.; Albet, J.; Malmayrb, G.; Kyuchoukov, G. Lactic acid extraction from aqueous solutions with tri-n-octylamine dissolved in decanol and dodecane. *Biochemical Engineering Journal* (2004), 21, 63-71.
- Yimrungruang D, Cheevaporn V, Boonphakdeeb T, Watchalayann P, Helander HF. Characterization and Health Risk Assessment of Volatile Organic Compounds in Gas Service Station Workers. *EnvironmentAsia* 2 (2008) 21-29.
- Zhao, G.; Liu, J-F.; Nyman, M.; Jonsson, J. A. Determination of short-chain fatty acids in serum by hollow fiber supported liquid membrane extraction coupled with gas chromatography. *Journal of Chromatography B* (2007), 846, 202-208.

CAPÍTULO IV

DETERMINACIÓN DE BTEX Y METABOLITOS

EN DIENTES HUMANOS COMO BIOMARCADORES.

UTILIZACIÓN DE LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

IV.1. RESUMEN

En el presente estudio se establecieron diversas metodologías analíticas basadas en la microextracción en fase sólida (SPME) para la caracterización de benceno, tolueno, etilbenceno y *p*-xileno (BTEX) y algunos de sus metabolitos como el fenol (P), *p*-cresol (*p*C), ácido mandélico (MA), ácido hipúrico (HA) y ácido 4-metilhipúrico (MHA) en muestras de dientes humanos con el objetivo de establecer un método que permita correlacionar el nivel de exposición a estas sustancias tóxicas y también poder predecir su influencia en la salud bucal.

Los métodos de SPME consistieron en una extracción de los BTEX y metabolitos con una solución básica extractante a partir del diente, seguido de SPME con fibras de polidimetilsiloxano (PDMS) y poliacrilato (PA) y posterior análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se realizó previamente un estudio de los parámetros cinéticos que rigen la adsorción de estos compuestos en los dientes, la subsiguiente extracción con la disolución extractante y la eficiencia de SPME utilizando disoluciones dopadas. Los tiempos de dopaje (adsorción) y extracción con NaOH 1M a partir de dientes modelo de bovino fueron establecidos a 4h para ambos casos. Los tiempos de adsorción y desorción de la fibra para todos los compuestos estuvo en los rangos de 10-75 y 10-40 min, respectivamente. El estudio de algunos parámetros de validación de los métodos de SPME para cada grupo de compuestos: BTEX, fenoles y ácidos aromáticos, determinados de forma consecutiva a partir de la misma muestra, mostró una adecuada linealidad (r^2 entre 0,984-0,999 en el rango de concentración empleado con una precisión menor del 15%). Los límites de detección (LOD) estuvieron en el orden de 0,6-0,9 pg para los BTEX por SPME-GC-MS y 2-333 ng para todos los compuestos por SPME-HPLC. Los valores de K_D de estos compuestos fueron superiores a los reportados en la literatura con el uso de estos métodos. En el análisis de muestras de dientes humanos se identificaron BTEX y fenoles en prácticamente todas las muestras, mostrando un contenido entre 7 y 1967 ng/g de BTEX y entre 36 y 99 μ g/g de fenoles. Los ácidos carboxílicos no pudieron ser identificados en estas muestras dentales.

IV. Determinación de BTEX y metabolitos en dientes humanos como biomarcadores. Utilización de la microextracción en fase sólida

Introducción

IV.2. INTRODUCCIÓN

El benceno, tolueno, etilbenceno y *o*-, *m*- y *p*-xilenos, comúnmente denominados BTEX, se utilizan ampliamente como materia prima en industrias de polímeros, de disolventes y en petroquímicas, así como disolventes orgánicos en laboratorios de química, componentes de combustibles para vehículos, productos en síntesis química, entre otros usos. Constituyen compuestos orgánicos volátiles contaminantes del aire, agua y suelos [Hinwood et al, 2007; Lee et al, 2007; Ezquerro et al, 2004] y sus fuentes de emisión principales son la combustión de madera, combustibles, pinturas industriales, adhesivos, agentes desgrasantes, aerosoles, el tráfico urbano y el humo del tabaco. Las personas que trabajan en medios donde se utilizan estas sustancias se hayan expuestos directamente a estos compuestos orgánicos volátiles [Moon y col., 1997], los cuales son altamente tóxicos y se absorben con facilidad por vía respiratoria y piel [Reese, 1993]. Es bien conocido que los fenoles y ácidos aromáticos (**Figura 4.1**) constituyen los metabolitos de los BTEX [Bieniek, 1994].

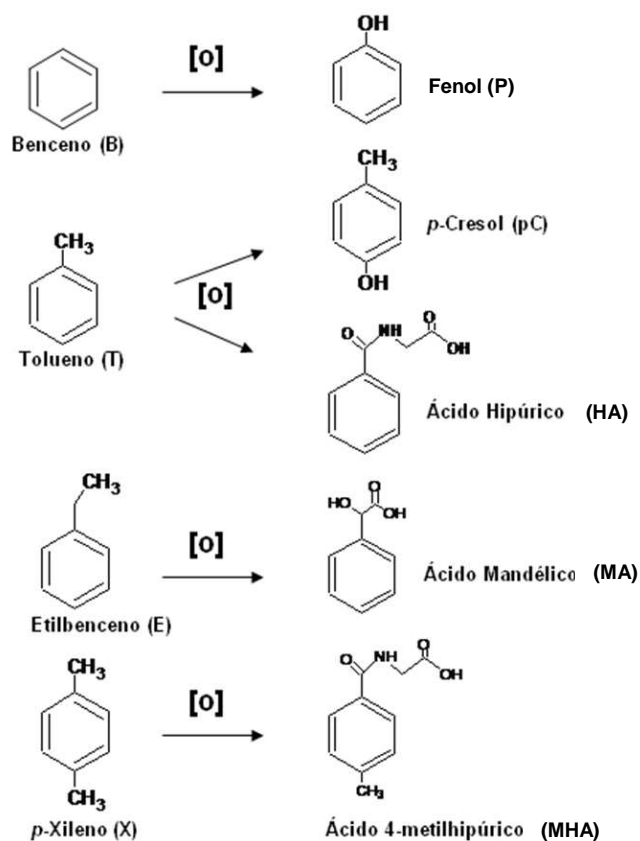


Figura 4.1. Estructuras de los BTEX y algunos de sus metabolitos.

IV. Determinación de BTEX y metabolitos en dientes humanos como biomarcadores. Utilización de la microextracción en fase sólida

Introducción

La exposición prolongada puede tener serias consecuencias en la salud, provocando enfermedades neurológicas o cáncer. En los últimos años, los BTEX han sido ampliamente estudiados con el objetivo de asociarlos a riesgos de la salud por exposición [Shen, 1998; Andreoli y col., 1999; Tolnai y col., 2000; Wang y col., 2003; Hinwood y col., 2007; Yimrungruang y col., 2008]. La exposición al benceno puede provocar tumores y leucemia, el tolueno y los xilenos pueden tener efectos negativos en el sistema nervioso, el hígado y los riñones, mientras que el etilbenceno puede ocasionar trastornos del sistema respiratorio y riñones.

En primer término, después de la absorción de los BTEX por el organismo, la cadena alquílica de los alquilbencenos es oxidada hasta formar ácidos carboxílicos aromáticos pasando a la sangre, para luego ser eliminados principalmente por la orina y el sudor. De esta manera, el ácido hipúrico (HA) es el principal producto oxidado del tolueno, el ácido mandélico (MA) y el ácido fenilgloxílico son metabolitos mayoritarios del etilbenceno y los ácidos 2-, 3-, 4-metilhipúricos (MHA) provienen de la oxidación de los isómeros del xileno [Angerer y col., 1992].

Un diagnóstico específico del grado de exposición medioambiental u ocupacional de los BTEX puede ser medido a través del análisis de estos metabolitos en fluidos biológicos como la sangre y la orina con el uso de técnicas que combinen la microextracción en fase sólida (SPME) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la cromatografía de gases (GC) y la electroforesis capilar (CZE) [Angerer y col., 1988; Bieniek, 1996; Moon y col., 1997; Bergamaschi y col., 1999; Fujii y col., 1999; Laffon y col., 2001; Sperlinková y col., 2004]. La técnica de HPLC permite la determinación simultánea de los ácidos carboxílicos [Astier y col., 1992; Burrini, 1998] en un tiempo que oscila entre 20-50 min. Los tiempos de análisis por GC son más cortos pero se necesitan pasos previos de extracción y derivatización que hacen más laborioso el método. La CZE muestra los menores tiempos de análisis (10 min) pero no es comúnmente usado [Wang y col., 2003].

En la **Tabla 4.1** se muestran algunas de las características químicas de los BTEX y varios de sus metabolitos, así como de los métodos analíticos utilizados para su determinación en medios contaminados. Según se observa en la **Tabla 4.1**, desde los BTEX, pasando por los fenoles hasta los ácidos carboxílicos, se puede apreciar que la acidez y la polaridad aumentan en este sentido, mientras que la volatilidad va desde muy volátiles hasta no volátiles. Estas características permiten un análisis selectivo de estos grupos de compuestos en matrices diversas y dificulta un análisis simultáneo de las nueve sustancias en una misma matriz. No obstante una determinación de niveles altos de cualquiera de los metabolitos puede ser un indicador de una exposición a BTEX significativa.

Para el estudio de este tipo de compuestos en matrices complejas es imprescindible un paso de pre-concentración antes de la separación cromatográfica o de electroforesis con vistas a determinar cantidades en trazas de estas sustancias. La microextracción en fase sólida (SPME), fundamentalmente en su variante "headspace" constituye una técnica rápida, selectiva, fácilmente automatizable y libre de disolventes orgánicos [Arthur y Pawliszyn, 1990; Pawliszyn, 1997, 1999; Penton, 1999], que simplifica el análisis de compuestos volátiles y no volátiles en matrices complejas sólidas y líquidas. En los estudios de SPME para el análisis de BTEX, fenoles y ácidos carboxílicos,

IV. Determinación de BTEX y metabolitos en dientes humanos como biomarcadores. Utilización de la microextracción en fase sólida

Introducción

los mejores resultados se obtienen en muestras líquidas [Ezquerro y col., 2004] a pH2 y saturadas con NaCl [van Doorn y col., 1998; Baciocchi y col., 2001]. Los estudios de efecto de la temperatura en la SPME de estos analitos ha demostrado que la eificiencia de extracción óptima se alcanza en el rango de 20-30 °C [Huang y col., 1997; Ezquerro y col., 2004; Lee y col., 2007]. La determinación de BTEX [Ezquerro y col., 2004; Lee y col., 2007], fenoles [Buchholz y Pawliszyn, 1994; Barták y col., 1997; van Doorn y col., 1998; Baciocchi y col., 2001] ácidos carboxílicos aromáticos [Fan y Deng, 2002] por SPME seguido de las técnicas de GC, HPLC o CZE permiten obtener resultados satisfactorios con altas eficiencias de separación, simplicidad, bajos volúmenes de inyección y tiempos de análisis cortos.

Tabla 4.1. Algunas propiedades químicas y métodos de análisis de BTEX y metabolitos.

Compuesto	Fórmula	pKa	Polaridad	Volatilidad	Métodos	Aplicación
Benceno	C ₆ H ₆	-	-	+++	Técnicas "headspace"	aire
Tolueno	C ₇ H ₈	-	-	+++	SPME	agua
Etilbenceno	C ₈ H ₁₀	-	-	+++	SPE	suelo
Xileno	C ₈ H ₁₀	-	-	+++		
Fenol	C ₆ H ₆ O	9,89	++	++	Técnicas "headspace"	Aire, agua, suelo
Cresol	C ₇ H ₈ O	10,17	++	++	LLE SPME, SPE	Fluidos biológicos
Ácido Mandélico	C ₈ H ₈ O ₃	3,85	+++	-	LLE	
Ácido Hipúrico	C ₉ H ₉ NO ₃	3,62	+++	-	SPE	Fluidos biológicos
Ácido 4-metilhipúrico	C ₁₀ H ₁₁ NO ₃	3,85	+++	-		

Leyenda: SPME, microextracción en fase sólida. SPE, extracción en fase sólida. LLE, extracción líquido-líquido

Es bien conocido que los fluidos biológicos son adecuados biomarcadores de la exposición a BTEX durante un período corto de tiempo. Hasta la actualidad, ninguna investigación ha sido realizada con el uso de dientes humanos como biomarcadores de la acumulación de BTEX. Sólo han sido estudiados contaminantes medioambientales de naturaleza inorgánica u orgánica en tejidos dentales tales como metales pesados: plomo, cadmio, cinc y manganeso, que son secuestrados por la fase mineral del diente durante su formación y crecimiento [Gerlach y col., 2000; Nowak y Chmielnicka, 2000; Tvinnereim y col., 2000; Ericson y col., 2001; Kang y col., 2004; Arora y col., 2006; Costa de Almeida y col., 2007], las dioxinas en dientes de mamíferos [Murtomaa y col., 2007],

IV. Determinación de BTEX y metabolitos en dientes humanos como biomarcadores. Utilización de la microextracción en fase sólida

Introducción

el flúor como indicador de la exposición a fluoruros [Kierdorf y Kierdorf, 1999], así como la nicotina y cotinina, estudiadas en dientes humanos para monitorear la exposición acumulativa al humo del tabaco en niños como fumadores pasivos [Pascual y col., 2003; Marchei y col., 2008].

En el presente estudio se desarrollan métodos para la determinación consecutiva de BTEX y metabolitos en dientes humanos con el propósito de obtener una herramienta analítica útil para la categorización de la exposición acumulativa de BTEX y su relación con la salud dental. Varios métodos de SPME-HPLC (o SPME-GC-MS) para el análisis simultáneo de BTEX, fenoles y ácidos carboxílicos son investigados por primera vez en disoluciones acuosas usando dos fibras diferentes de carboxen-polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) y poliacrilato (PA). La metodología desarrollada ha permitido determinar niveles de BTEX en muestras dentales, lo que permite el uso de dientes humanos como biomarcadores. Además, se realiza un análisis detallado del comportamiento de estas sustancias frente a la SPME que permitirá adquirir información valiosa sobre el uso de esta técnica aplicada al estudio de estos compuestos en diversos biosistemas.

IV. Determinación de BTEX y metabolitos en dientes humanos como biomarcadores. Utilización de la microextracción en fase sólida

Objetivos

IV.3. OBJETIVOS

Debido a que no existe información sobre el análisis de BTEX y sus metabolitos en muestras dentales, el presente trabajo tiene como objetivo fundamental el establecimiento de metodologías analíticas basadas en microextracción en fase sólida (SPME) para el estudio simultáneo de estas sustancias en dientes humanos con el propósito de implementar una herramienta analítica que permita estudios de correlación entre exposición de BTEX e higiene bucal. Para ello se desarrollaron las siguientes etapas de estudio:

1. Dopaje de BTEX y metabolitos en dientes modelos.
2. Extracción de dientes dopados con disolución básica de NaOH.
3. Parámetros cinéticos de la SPME combinada con HPLC y GC-MS.
4. Parámetros de validación de los métodos de SPME-HPLC y SPME-GC-MS.
5. Aplicación de los métodos de SPME en dientes humanos.

Hipótesis

Los métodos de SPME-GC-MS y SPME-HPLC constituyen herramientas analíticas adecuadas para el estudio de BTEX y sus metabolitos en dientes humanos como biomarcadores de la exposición a BTEX.

IV.4. PARTE EXPERIMENTAL

Exponemos aquí el desarrollo metodológico del estudio realizado, el cual está ordenado en las siguientes etapas: descripción de los procedimientos generales de preparación de muestras, procedimientos para la SPME, parámetros de validación de los métodos de SPME-GC-MS y SPME-HPLC, así como las condiciones cromatográficas de análisis de BTEX y sus metabolitos.

IV.4.1. Reactivos y preparación de muestras

Las siguientes sustancias patrones fueron utilizadas para preparar las disoluciones madres en metanol (MeOH) de calidad para HPLC (Sigma-Aldrich, Madrid, España): 99.8% benceno (SDS, Peypin, Francia), $\geq 99\%$ tolueno (Merck, Hohenbrunn, Alemania), $\geq 99\%$ etilbenceno, 99% *p*-xileno, 99% clorobenceno, 99,5% fenol, 99% *p*-cresol, 98% ácido mandélico, $\geq 97\%$ ácido hipúrico, y 98% ácido 4-metilhipúrico, estos últimos de Sigma-Aldrich (Madrid, España). Las sales y ácidos utilizados fueron de Panreac (Madrid, España): 99,5% dihidrógenofosfato de potasio KH_2PO_4 , 99,5% fosfato de sodio $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 98% hidróxido de sodio NaOH, 99,5% cloruro de sodio NaCl, ácido acético glacial, 37% ácido clorhídrico HCl, y 85% ácido fosfórico H_3PO_4 . El agua desionizada fue obtenida a través de un sistema de purificación Millipore (Milford, Estados Unidos).

Para la SPME y con el objetivo de evitar pérdidas por evaporación de los BTEX y fenoles, las disoluciones de patrones fueron preparadas, justo antes de cada estudio y análisis cromatográfico, en viales sellados de 20 mL o 250 μL sin espacio de cabeza. Estas disoluciones madre fueron preparadas disolviendo las cantidades apropiadas de cada patrón en MeOH- H_2O (1:1). Las disoluciones dopadas fueron realizadas en viales de 20 mL que contenían 10 mL de NaOH 1M. Estas disoluciones fueron usadas para los estudios de los parámetros de SPME y el calibrado de los métodos SPME-HPLC y SPME-GC-MS.

Los dientes de bovino fueron usados como modelos de matrices biológicas para el estudio de las etapas de dopaje y extracción de los analitos en dientes. Estos dientes fueron previamente conservados en disolución acuosa al 1% de cloramina T (Sigma-Aldrich) para evitar la degradación de los dientes. Los dientes humanos fueron gentilmente donados por pacientes de la Clínica Dental del Servicio Catalán de Salud (Drassanes, Barcelona) a través de la Dra. Cristina Gracia, entre los meses de Octubre-Noviembre 2008. Cada diente humano fue lavado con agua después de su extracción por el dentista y depositado en viales de 20 mL que contenían la disolución extractante de NaOH 1M. La información sobre la edad, profesión y el hábito de fumar se indicó para cada donante.

IV. Determinación de BTEX y metabolitos en dientes humanos como biomarcadores. Utilización de la microextracción en fase sólida

Parte Experimental

IV.4.2. Procedimientos de dopaje y extracción a partir de las muestras dentales

Los dientes de bovino, previamente lavados con agua, se adicionaron en viales de 20 mL (Sugelabor, Madrid, España) que contenían las disoluciones de dopaje de 25 µg/mL de cada uno de los patrones BTEX y de los metabolitos correspondientes (**Figura 4.2A**). Se sellaron sin dejar espacio de cabeza y se depositaron en un baño de ultrasonido Branson 1210 (Missouri, Estados Unidos) para el estudio de dopaje por duplicado a 2, 4, 8 y 12 h de tiempo de contacto. Después de cada tiempo de dopaje, se tomó una alícuota de 250 µL de la solución dopante y se analizó por HPLC. La disminución de la concentración en estas disoluciones de dopaje se consideró como la cantidad de analitos adsorbidos en el diente.

Para el estudio de extracción con la disolución extractante de NaOH 1M, los dientes inmediatamente después de su dopado, se lavaron externamente con agua y se sumergieron en otros viales de 20 mL que contenían NaOH 1M (**Figura 4.2B**). Se estudió la cinética de extracción de todos los analitos en un solo paso en baño de ultrasonidos a 4, 8 y 10 h. Para cada intervalo de tiempo se tomó una alícuota de 250 µL de la solución extractante y se analizó por HPLC. Esta evaluación determinó la extensión de la extracción y el conocimiento de la adsorción por el diente de cada compuesto.

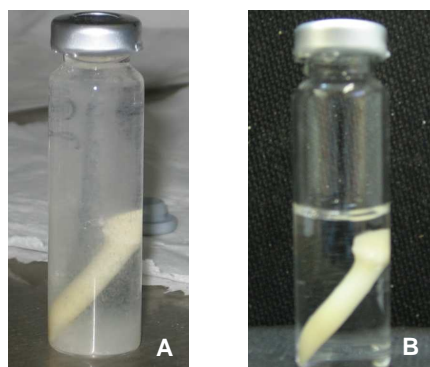


Figura 4.2. Estudio de dopaje de dientes de bovino (A) y estudio de la extracción de los BTEX y metabolitos a partir de los dientes dopados (B).

A continuación se describen los pasos de pretratamiento de la muestra, las condiciones de separación cromatográfica, el estudio de los parámetros de extracción y desorción, así como algunos parámetros de validación para los métodos de SPME-HPLC y SPME-GC-MS en el análisis de BTEX y metabolitos a partir de disoluciones dopadas.

IV.4.3. Método de SPME-HPLC para el análisis de BTEX y metabolitos

IV.4.3.1. Procedimiento de SPME

Para la SPME-HPLC, se emplearon dos fibras: 85 µm carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) para los BTEX al ser una fibra útil en el análisis de compuestos no polares volátiles y una segunda fibra de poliácrlato (PA) para los metabolitos (fenoles y ácidos carboxílicos), indicada en el análisis de compuesto polares, ideal para fenoles [Wardencki y col., 2004]. Ambas fibras descritas se precondicionaron durante 30 min a 30 °C en los disolventes que serán usados posteriormente en el paso de desorción: el MeOH para la fibra CAR/PDMS y la mezcla MeOH/10 mM Na₃PO₄, 2:8 v/v, (fase móvil usada en HPLC) para la fibra PA en el estudio SPME de BTEX y metabolitos, respectivamente. El MeOH fue seleccionado como medio de desorción para los BTEX al ser un disolvente adecuado para su solubilidad y facilitar la compatibilidad con el sistema de determinación por HPLC. Por otro lado, para la desorción de los fenoles y ácidos carboxílicos, se utilizó la mezcla de fase móvil a pH7 usada en el análisis por HPLC ya que, siguiendo el mismo razonamiento anterior, constituye un medio adecuado para la solubilidad de estos compuestos y adicionalmente se favorece la separación cromatográfica. La muestra, previo análisis por SPME, se precondicionó durante 10 min a 30 °C. La extracción consecutiva de los analitos se realizó como se detalla a continuación. Para el análisis de BTEX, la fibra se sumergió en el espacio de cabeza del vial sellado de 20 mL (variante "headspace") que contenía la disolución dopada (**Figura 4.3A**). Después que el equilibrio de extracción entre los BTEX en la fibra y la fase vapor en el vial fue alcanzado, la fibra se extrajo del vial y se desorbió por inmersión en un vial de 250 µL con MeOH (**Figura 4.3D**). Seguidamente a la extracción de los BTEX, se adicionaron algunas gotas de HCl a la disolución dopada hasta obtener un valor de pH cercano a 2 y la muestra se saturó con NaCl (300 g/L). Luego la fibra PA se sumergió en la cabeza del vial (variante "headspace") para la extracción de la fracción volátil de los fenoles (**Figura 4.3B**). Cuando el equilibrio de extracción se alcanzó, la fibra se desorbió en un segundo vial de 250 µL con fase móvil (**Figura 4.3D**). Finalmente, la fibra PA se sumergió en la muestra acondicionada a pH 2 para extraer la fracción no volátil de los fenoles y los ácidos carboxílicos (**Figura 4.3C**) y se desorbió en un tercer vial de 250 µL de fase móvil (**Figura 4.3D**). De los tres viales de 250 µL se inyectaron por duplicado 20 µL en el HPLC para el análisis de cada grupo de compuestos: BTEX, fenoles y fenoles+ácidos carboxílicos. Durante los pasos de acondicionamiento de la SPME, la muestra fue agitada en baño de agua a 500 rpm con agitadores magnéticos de teflón (0,8 x 2,0 cm) en un agitador-calefactor (Selecta Asincro, Barcelona, España) según **Figura 4.3E**. Después que cada paso de extracción-desorción fue ejecutado, la fibra se limpió por inmersión en MeOH o fase móvil durante un periodo de 10 a 20 min, y se secó al aire durante 1 min.

IV. Determinación de BTEX y metabolitos en dientes humanos como biomarcadores. Utilización de la microextracción en fase sólida

Parte Experimental

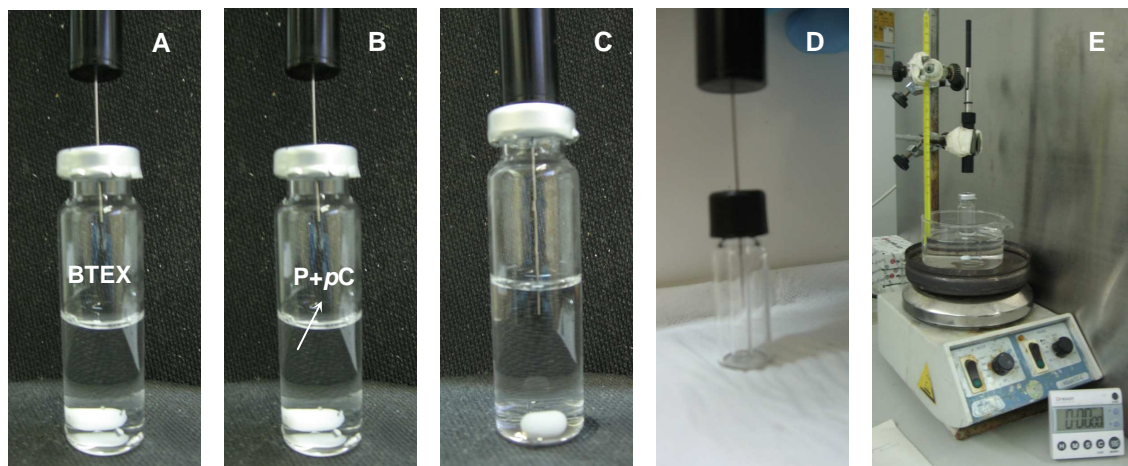


Figura 4.3. Procedimiento de SPME-HPLC para el análisis consecutivo de BTEX y metabolitos. (A) SPME de BTEX en la fase vapor, (B) SPME de la fracción volátil de fenoles, (C) SPME de la fracción no volátil de fenoles y ácidos carboxílicos, (D) desorción de los analitos en MeOH o fase móvil, (E) equipamiento SPME.

IV.4.3.2. Condiciones de separación mediante HPLC

Para el análisis de los BTEX y metabolitos por HPLC se utilizó un cromatógrafo de líquidos Thermo-Fisher (Barcelona, España) equipado con automuestreador AS3000, bombas de gradiente P4000, un detector UV con matriz de diodos UV6000LP, con posibilidad de medida en el rango 192-800 nm y programa de cómputo de datos ChromQuest versión 4.2.34. Este mismo equipo HPLC se utilizó para los estudios del capítulo anterior. La separación cromatográfica de todos los compuestos se realizó en una columna Alltech C18 (250 x 4,6 mm, 10 μ m) con una mezcla de $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 10 mM (pH ajustado a 7,0 con H_3PO_4) como fase móvil A y MeOH como fase móvil B y. El gradiente de elución fue de 20 % B (0-2 min), 20-60 % B (2-6 min), 60-80 % B (6-10 min) y 80 % B (10-18 min) a 1 mL/min y 50 $^{\circ}\text{C}$ de temperatura en el horno. El volumen de inyección fue de 20 μ L y se realizó por duplicado. La longitud de onda en la detección de picos para los BTEX y fenoles fue de 260 nm y para los ácidos carboxílicos de 220 nm. En el caso de los picos del E y pX, los cuales eluyen parcialmente solapados, ambos fueron analizados en el cromatograma como mezcla E+pX.

IV.4.3.3. Estudio de los tiempos de adsorción y desorción para SPME-HPLC

Para alcanzar una SPME efectiva de los BTEX y sus metabolitos, ambos tiempos de extracción y desorción fueron estudiados con el uso de disoluciones dopadas a concentración conocida. Para

IV. Determinación de BTEX y metabolitos en dientes humanos como biomarcadores. Utilización de la microextracción en fase sólida

Parte Experimental

obtener las disoluciones dopadas en viales de 20 mL, una alícuota de la disolución de patrones (2500 µg/mL) se diluyó en 10 mL de NaOH 1M lográndose una dilución de 250 veces para los BTEX y 50 veces para los metabolitos. Luego los viales fueron sellados inmediatamente. El tiempo de extracción se estudió en el intervalo de 10 a 75 min y los compuestos extraídos en la fibra fueron luego desorbidos durante 30 min en MeOH o fase móvil. Para determinar el tiempo de desorción, cada fibra se sumergió en viales de 20 mL con las disoluciones dopadas con el tiempo de extracción anteriormente establecido y los analitos extraídos en la fibra luego fueron desorbidos en un rango de tiempo de 10 a 40 min en 250 µL de MeOH o fase móvil. Cada disolución dopada fue utilizada para cada período de extracción y desorción estudiados. Cada estudio se realizó por triplicado y la inyección en el equipo de HPLC fue de 100 µL por duplicado para todos los analitos.

IV.4.3.4. Parámetros de validación del método SPME-HPLC

Las disoluciones dopadas de los patrones de BTEX y metabolitos se prepararon a partir de disoluciones madre (2000 µg/mL) a través de diluciones apropiadas en viales de 20 mL que contenían 10 mL de NaOH 1M. El rango de concentración obtenido fue de 2,5 a 25 µg/mL (25-250 µg). Los viales se sellaron inmediatamente y para la SPME de cada grupo de analitos (BTEX, fenoles y ácidos carboxílicos) se usaron las condiciones previamente establecidas del tiempo de extracción y desorción. Se llevó a cabo el análisis por triplicado y se realizaron tres extracciones consecutivas para cada grupo de analitos. Las curvas de calibrado se construyeron con la información recogida del área de los picos en el cromatograma y la cantidad en µg de cada analito en la muestra dopada. Se determinaron los parámetros básicos tales como la linealidad, límites de detección (LOD) y repetitividad (RSD). La estimación de los LOD se basó en el área del pico más pequeño detectado para una relación señal-ruido de tres [Vial y Jardy, 1999] y las constantes de distribución (K_D) de los BTEX, fenoles y ácidos carboxílicos se calcularon como se describe en trabajos anteriores [van Door y col., 1998].

IV.4.4. Método de SPME-GC-MS para el análisis de BTEX

IV.4.4.1. Procedimiento de SPME

Para el análisis de BTEX por SPME-GC-MS se utilizó una fibra de 85 µm carboxen/polidimetilsiloxano CAR/PDMS (Supelco, Madrid, España), especialmente indicada para el análisis en trazas de compuestos volátiles no polares de bajo peso molecular [Wardencki y col., 2004]. Antes de la SPME, la fibra se pre-condicionó a 250°C durante 30 min y la muestra se mantuvo 10 min a 30°C. La extracción se realizó por inmersión de la fibra en el espacio de cabeza del vial

IV. Determinación de BTEX y metabolitos en dientes humanos como biomarcadores. Utilización de la microextracción en fase sólida

Parte Experimental

sellado de 20 mL (variante “headspace”) que contenía la muestra (**Figura 4.4A**) a 30°C. Durante el acondicionamiento y la extracción, la muestra fue agitada en un baño de agua a una velocidad constante de 500 rpm con agitadores magnéticos de teflón (0,8 x 2,0 cm) y una temperatura de 30°C, utilizando un agitador-calefactor (Selecta Asincro, Barcelona, España) según se muestra en la **Figura 4.4B**. Para el análisis de los BTEX en el GC-MS, el paso de desorción se llevó a cabo directamente en el inyector del GC (**Figura 4.4C**). Después de cada paso de extracción-desorción fue ejecutado, la fibra se limpió a 250°C por 10 min.

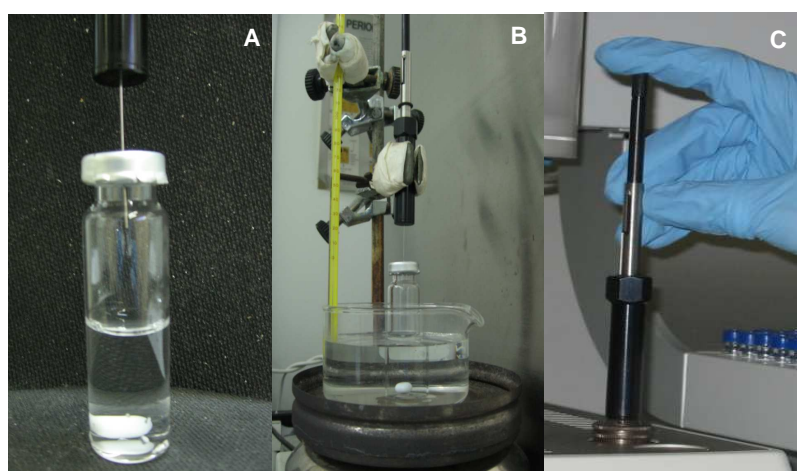


Figura 4.4. Sistema de SPME-GC-MS. (A) extracción, (B) equipamiento SPME, (C) desorción para el análisis por GC-MS en el inyector del equipo.

Para el análisis de los BTEX por GC-MS, se utilizó un cromatógrafo de gases Thermo Scientific TRACE GC Ultra™ (**Figura 4.5A**), equipado con un inyector “splits/splitless” y acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolar Thermo Scientific DSQ™ II (Thermo-Fisher, Barcelona, España). Los analitos se separaron en una columna capilar BP-5 (30-m x 0,25-mm WCOT sílice fundido, 0,5 µm de fase estacionaria BP-5) de SGE Analytical Science (Barcelona, España). La temperatura del horno se programó de la siguiente manera: 35 °C (3 min), 5 °C/min hasta 90 °C y 100 °C/min hasta 250 °C (10 min), usando helio a un flujo de 1 mL/min. El inyector se equipó con un “liner” de 0,8 mm de diámetro interno para SPME, la temperatura del inyector se mantuvo a 290 °C y la inyección de la muestra a través de la fibra de SPME en el inyector se realizó en modo “splitless” con un tiempo inicial de 3 min seguido de un modo “split” con una relación 1:50. Se usó la ionización por impacto electrónico para los BTEX y el clorobenceno como patrón interno (**Figura 4.5B**).

IV. Determinación de BTEX y metabolitos en dientes humanos como biomarcadores. Utilización de la microextracción en fase sólida

Parte Experimental

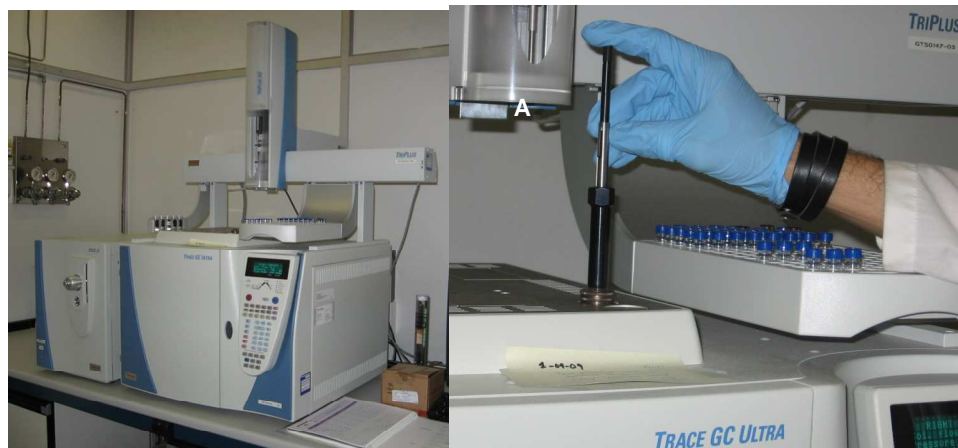


Figura 4.5. Equipo TRACE GC ULTRA Thermo para el análisis de BTEX por SPME-GC-MS.

IV.4.4.3. Estudio de los tiempos de adsorción y desorción para SPME-GC-MS

En el análisis de BTEX por SPME-GC-MS se empleó el mismo tiempo de extracción previamente mejorado para los BTEX a través del método de SPME-HPLC. El tiempo de desorción se estableció teniendo en cuenta el tiempo de permanencia de la fibra en el inyector del equipo de GC, de tal manera que no quedarán analitos adsorbidos en la fibra luego de una inyección a 250°C.

IV.4.4.4. Parámetros de validación del método SPME-GC-MS

Las disoluciones dopadas de los patrones de BTEX, se prepararon a partir de disoluciones madre (2000 µg/mL) a través de diluciones apropiadas en viales de 20 mL que contenían 10 mL de NaOH 1M. El rango de concentración obtenido fue de 2 a 20 µg/L (20-200 ng). Los viales se sellaron inmediatamente para mantener un sistema cerrado. Para la SPME de los BTEX, se usaron las condiciones mejoradas previamente para el tiempo de extracción y desorción. Se llevó a cabo el análisis por triplicado y una sola extracción para cada nivel de concentración. Las curvas de calibrado se construyeron con la información recogida del área de los picos en el cromatograma y la cantidad en ng de BTEX en la muestra dopada. Se determinaron algunos parámetros tales como la linealidad, límites de detección (LOD) y repetitividad (RSD). La estimación de los LOD se basó en el área del pico más pequeño detectado para una relación señal-ruído de tres [Vial y Jardy, 1999] y las constantes de distribución (K_D) de los BTEX se calcularon como se describe en trabajos anteriores [van Door y col., 1998].

IV.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.5.1. Separación cromatográfica de BTEX y metabolitos mediante HPLC

Los BTEX y sus metabolitos (fenoles y ácidos carboxílicos) son compuestos aromáticos sustituidos (**Figura 4.1**). El análisis de los BTEX y fenoles se realiza fundamentalmente por GC, mientras que los ácidos carboxílicos por HPLC. Estos metabolitos de los BTEX necesitan de un paso previo de derivatización para ser analizados por GC y obtener un mejor pico cromatográfico respecto a las moléculas libres. Para evitar un largo de tiempo de preparación de muestra, se llevó a cabo el análisis directo de los nueve compuestos por HPLC. El uso de diferentes condiciones cromatográficas permitió encontrar las mejores condiciones de separación para todos los compuestos. Los espectros ultravioletas de los BTEX y sus metabolitos fueron obtenidos. Los ácidos carboxílicos MA, HA y MHA absorben a 210, 220 y 230 nm, respectivamente, mientras que los fenoles y los BTEX absorben alrededor de los 260 nm. La integración de los picos de los fenoles y los BTEX a 220 nm, los cuales eluyen al final del cromatograma, se ve afectada por la presencia de MeOH en la fase móvil (> 50 %), debido a la fuerte absorbancia de este disolvente a esa longitud de onda. Para evitar este problema y eliminar un posible efecto de blanco a bajas longitudes de onda, la separación cromatográfica se estableció a 260 nm para los BTEX y fenoles, y 220 nm para los ácidos.

Como se muestra en la **Figura 4.6**, las condiciones cromatográficas establecidas permitieron una adecuada separación de los nueve compuestos en 18 min, con la excepción de los isómeros E y pX, los cuales se solapan parcialmente. La mejor separación se encontró a 50 °C y las muestras disueltas en la fase móvil, obteniéndose una adecuada resolución de picos. La resolución de los picos correspondientes a los ácidos carboxílicos se incrementó con el aumento del pH en el rango de 3-7. La mejor combinación de parámetros se obtuvo para una fase móvil A a pH7, conteniendo MeOH como modificador orgánico y fase móvil B. Esta es la primera vez que se realiza la separación simultánea de estas tres familias de compuestos aromáticos por HPLC.

IV.5.2. Estudios de dopaje de dientes y extracción de los BTEX y metabolitos

El procedimiento de dopaje de los dientes (de bovino como modelos) constituyó un paso difícil en el desarrollo del método analítico debido a las características tan poco dóciles del material dental. El estudio del procedimiento de dopaje se llevó a cabo por triplicado para conocer la cinética de adsorción de los BTEX y sus metabolitos por parte del diente en condiciones in-vitro. La disolución de patrones (en MeOH-H₂O 1:1) y un baño de ultrasonido fueron usadas para el establecimiento del tiempo de dopaje. Los resultados se muestran en la **Figura 4.7** donde se ilustra la concentración de los compuestos adsorbidos en el diente (µg/g) respecto al tiempo de dopaje. La mayor adsorción de

IV. Determinación de BTEX y metabolitos en dientes humanos como biomarcadores. Utilización de la microextracción en fase sólida

Resultados y Discusión

los BTEX, fenoles y ácidos carboxílicos se obtuvo a las 8, 4 y 12 h, respectivamente. En los gráficos de cinética de adsorción de BTEX y fenoles se observa un comportamiento inusual después de 8 y 4 h, respectivamente. Estos resultados podrían estar causados o por la desnaturalización del diente durante el prolongado tiempo de ultrasonidos con la posterior pérdida de BTEX y fenoles desde el diente hacia la disolución de dopaje o la migración de estos compuestos volátiles en la cabeza del vial de 20 mL que se forma después del largo período de dopaje. El tiempo óptimo para obtener un diente dopado se estableció a 4 h para los nueve compuestos.

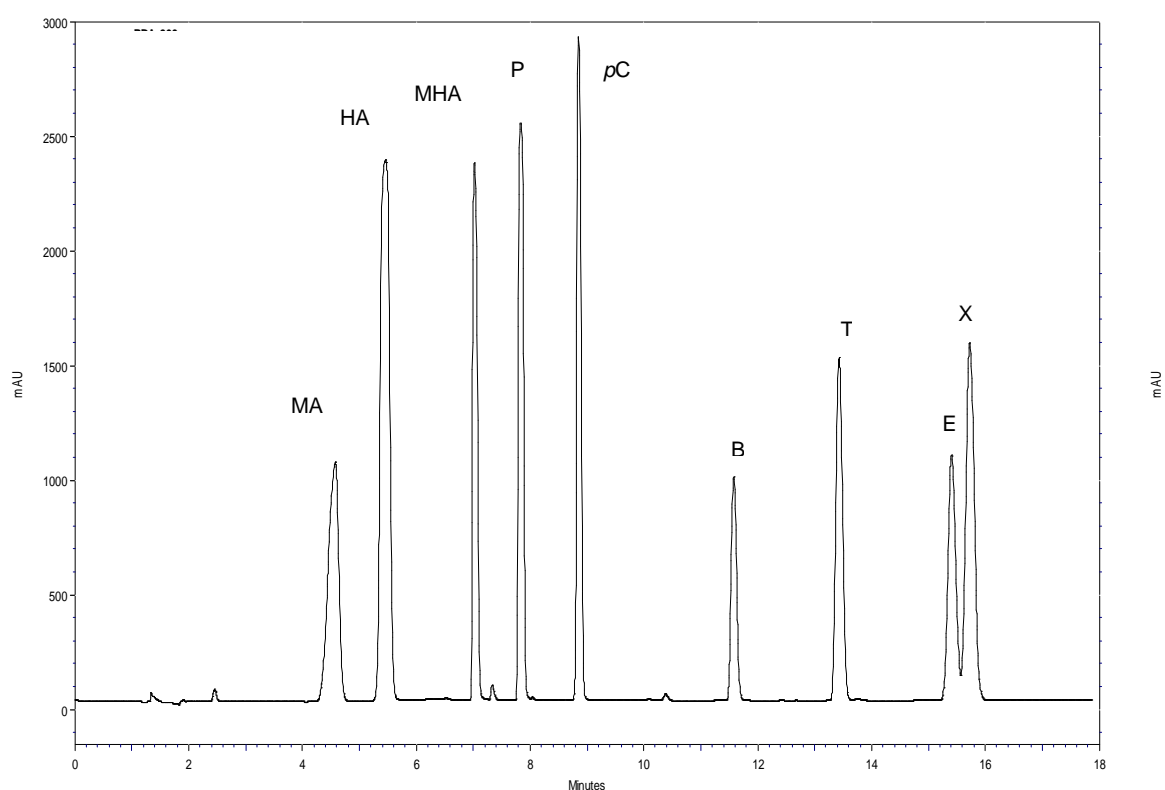


Figura 4.6. Cromatograma HPLC de BTEX, fenoles y ácidos carboxílicos a 260 nm. Columna Alltima C18, gradiente de 10 mM Na₃PO₄, pH7 (20%) y MeOH (80%) a 1 mL/min (T: 50°C).

El estudio del tiempo de extracción de estos compuestos a partir del diente dopado se realizó con una disolución básica de NaOH 1M como medio extractante con el objetivo de recuperar tanto los BTEX como sus metabolitos en un solo paso extractivo. Este estudio de la cinética de extracción se realizó en un baño de ultrasonidos. Investigaciones anteriores en el análisis de BTEX y fenoles por SPME para muestras sólidas como los suelos, describen el paso de extracción con agua [Baciacchi, 2001, Ezquerro, 2004].

IV. Determinación de BTEX y metabolitos en dientes humanos como biomarcadores. Utilización de la microextracción en fase sólida

Resultados y Discusión

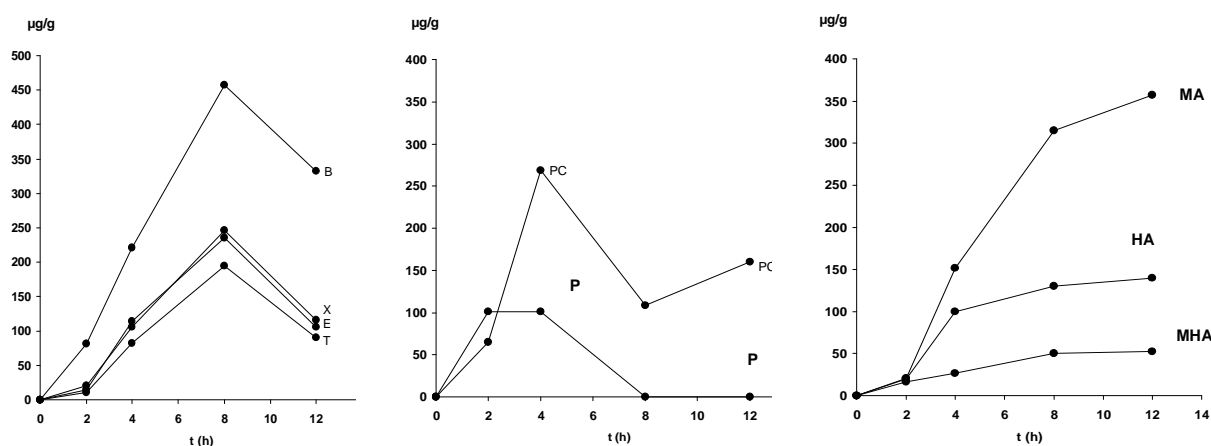


Figura 4.7. Cinética de adsorción de BTEX y metabolitos en dientes de bovino.

La extracción de ácidos carboxílicos a partir de muestras de suelo con el uso de una disolución de NaOH 1M ha sido descrita para el análisis posterior por SPME [Fan y Deng, 2002]. Debido a la diferencia de polaridad y acidez de estos nueve compuestos, el NaOH a 1M de concentración se seleccionó como disolución extractante de la mezcla de BTEX y metabolitos a partir de dientes contaminados. Durante esta extracción, los BTEX y una fracción volátil de los fenoles pasarían inmediatamente a la cabeza del vial donde serían luego preconcentrados por la fibra de SPME, mientras que los ácidos carboxílicos y el resto de los fenoles quedarían en la disolución básica extractante para su posterior SPME por inmersión de la fibra. Los resultados en el estudio de la cinética de extracción de los BTEX y metabolitos a partir de dientes dopados se ilustra en la **Figura 4.8**, el cual se realizó tomando alícuotas en cada intervalo de tiempo y analizándolas directamente por HPLC.

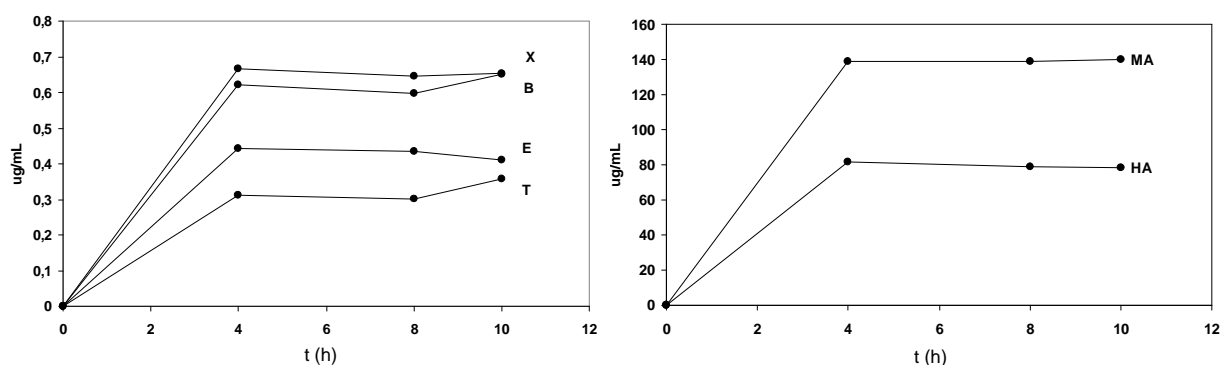


Figura 4.8. Cinética de extracción de BTEX y metabolitos con NaOH 1M en ultrasonidos a partir de dientes dopados.

IV. Determinación de BTEX y metabolitos en dientes humanos como biomarcadores. Utilización de la microextracción en fase sólida

Resultados y Discusión

En el análisis directo de la disolución de dopaje durante el estudio de la cinética de extracción se observó un fuerte efecto matriz (**Figura 4.9**) que no permitió identificar la presencia de los fenoles y el MHA por solapamiento con otras sustancias extraídas de los dientes de bovino usados como dientes modelo. Por esta razón no se pudo conocer el comportamiento para estos metabolitos. Finalmente, 4h constituyó el tiempo de extracción seleccionado para posteriores experimentos.

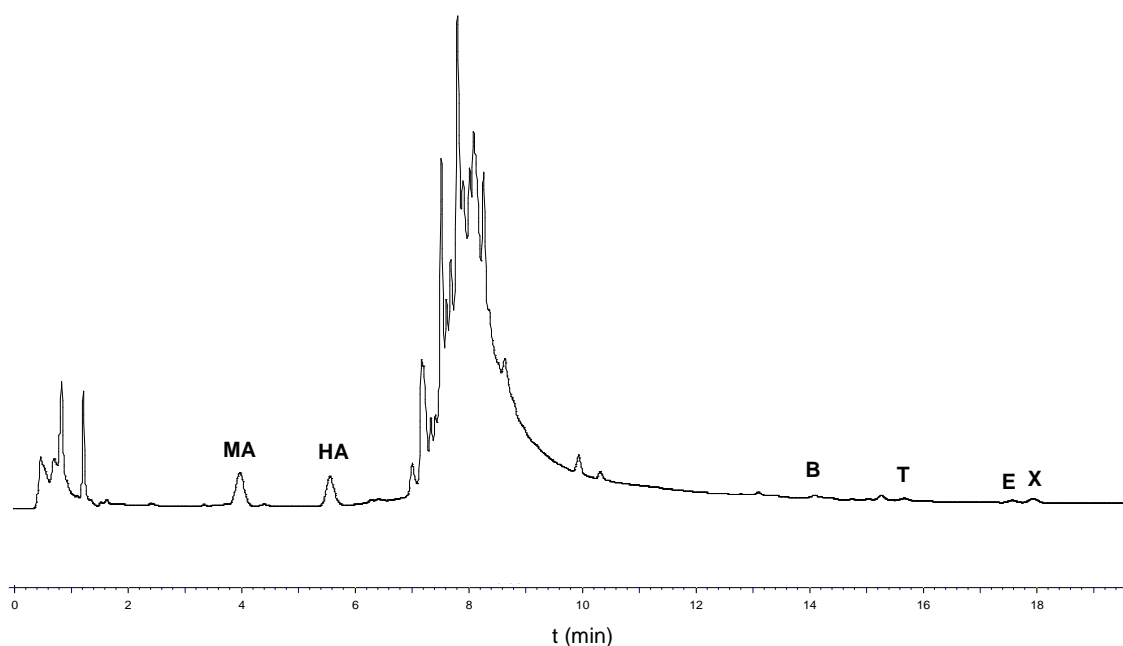


Figura 4.9. Perfil cromatográfico de BTEX y metabolitos después de 4 h de extracción con NaOH 1M en baño ultrasónico a partir del diente dopado.

IV.5.3. Procedimientos de SPME para los BTEX, fenoles y ácidos carboxílicos

IV.5.3.1. Selección de las condiciones de SPME

La SPME es un método de extracción en equilibrio basado en la partición que se establece para la concentración de los analitos entre una muestra y la fase sólida de una fibra [Arthur y Pawliszyn, 1990]. La eficiencia de extracción puede estar afectada por el tipo de fibra, la matriz de la muestra, la temperatura y los parámetros cinéticos tiempo de extracción y desorción, entre otros.

La selección de una apropiada fibra es importante para la SPME. Compuestos de bajo peso molecular o volátiles como los BTEX usualmente requieren de una fibra tipo polidimetilsiloxano, la cual es relativamente no polar y puede fácilmente extraer los bencenos sustituidos de características

IV. Determinación de BTEX y metabolitos en dientes humanos como biomarcadores. Utilización de la microextracción en fase sólida

Resultados y Discusión

no polares. El comportamiento de esta fibra es similar al del hexano en la LLE [Buchholz y Pawliszyn, 1994]. Se conoce además que la fibra carboxen-polidimetilsiloxano es la mejor para la extracción simultánea de bajas concentraciones de BTEX a partir del espacio de cabeza de la muestra en estudio [Ezquerro y col., 2004] o por inmersión en muestras líquidas que contengan trazas de BTEX [Lee y col., 2007]. En cuanto a los fenoles y ácidos carboxílicos, se requiere una fibra polar más selectiva, donde la fibra de poliacrilato claramente muestra mejor sensibilidad que otras [Barták y col., 1997; Huang y col., 1997; van Doorn y col., 1998].

Durante el paso de extracción con 10 mL de la disolución de NaOH 1M a partir del diente por ultrasonido, los BTEX, que son altamente volátiles e insolubles, migraron fácilmente desde la disolución básica hacia la fase vapor en el vial de 20 mL. Este primer paso permitió la separación de los BTEX en el espacio de cabeza de la muestra por SPME, mientras que los metabolitos permanecieron secuestrados en la disolución acuosa en forma disociada debido a sus características ácidas ($pK_a < pH$). Cuando el pH de la muestra se disminuyó hasta un valor de 2 por adición de HCl en un segundo paso, el equilibrio ácido-base de estos compuestos (fenoles y ácidos) se desplazó significativamente hacia la forma neutra (no disociada), lo que le confirió, en primer lugar a los fenoles, la capacidad de migrar hacia la fase vapor y ser extraídos por SPME de forma selectiva. En un tercer paso, por inmersión de la fibra se pudo extraer el resto de los fenoles y los ácidos carboxílicos. Estableciendo las condiciones adecuadas, se pudieron realizar tres extracciones sucesivas de los BTEX, fenoles y ácidos aromáticos con una alta selectividad.

En detalles adicionales, la presencia de NaCl (300 g/L) disminuyó la solubilidad en agua y aumentó la afinidad de estos metabolitos con la fibra por efecto de "salting-out". Además, un agitado de la muestra aceleró la transferencia de masa de estos compuestos volátiles (fenoles) y no volátiles (ácidos) a través de la matriz acuosa. La combinación de ambos efectos (acidificación y "salting-out") permitió la migración de los fenoles a la fase vapor y extracción por SPME, así como la de los ácidos carboxílicos hacia la fibra de SPME por inmersión, tal y como se han descritos en otros trabajos [Buchholz y Pawliszyn, 1994; Barták y col., 1997].

IV.5.3.2. Tiempos de extracción (adsorción) y desorción en SPME

El tiempo para alcanzar el equilibrio de extracción determina la cantidad máxima de analito que puede ser adsorbido por la fibra. El tiempo de extracción fue la primera variable de SPME estudiada en disoluciones dopadas mediante la aplicación de SPME de manera sucesiva para cada grupo de compuestos sobre una misma muestra como se indica anteriormente. La **Figura 4.10** muestra las curvas de cinéticas de extracción obtenidas para los BTEX, fenoles y ácidos carboxílicos a partir de disoluciones dopadas en rangos de 10-75 min. Los valores máximos se observaron a 30, 75 y 30 min, respectivamente. Los tiempos de extracción se seleccionaron como los tiempos en los cuales la fibra extrae cerca del 100 % de la masa extractable en equilibrio de estos compuestos. Los valores de

IV. Determinación de BTEX y metabolitos en dientes humanos como biomarcadores. Utilización de la microextracción en fase sólida

Resultados y Discusión

estos tiempos de extracción están en concordancia con investigaciones previas de estos analitos en disoluciones dopadas [Ezquerro y col., 2004; Huang y col., 1997; Fan y Deng, 2002].

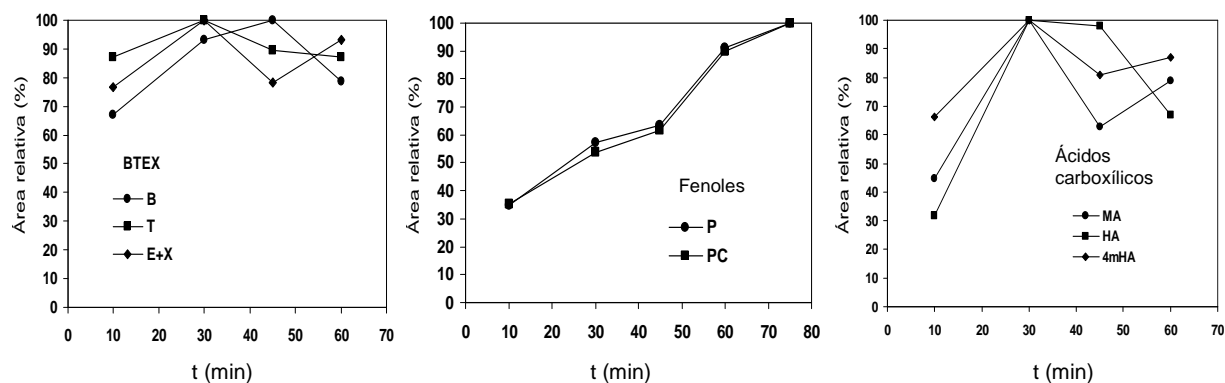


Figura 4.10. Influencia del tiempo de extracción en la SPME de BTEX y metabolitos a partir de disoluciones dopadas a 30 °C usando fibras de 85 µm PDMS y PA, y 30 min de tiempo de desorción.

Para los BTEX, la cantidad extraída se incrementa rápidamente en los 10 min iniciales, donde más del 70 % es extraído, y tiende a alcanzar un valor constante después de los 20 min, sin embargo, el equilibrio se alcanza sobre los 60 min para los fenoles, donde se extrajo el 90 %. Los lentos tiempos de equilibrado para los fenoles con la fibra de PA es debido a dos causas fundamentales. La primera tiene relación con la relativa baja presión de vapor en equilibrio que poseen los fenoles, lo cual provoca una lenta transferencia de masas desde la fase acuosa hacia la fase vapor [Zhang y Pawliszyn, 1993]. En segundo lugar, la naturaleza de la fibra de PA como polímero sólido que no permite una fácil difusión hacia y a través del recubrimiento de la fibra [Buchholz y Pawliszyn, 1994]. Por otro lado, los ácidos aromáticos tuvieron un comportamiento distinto después de alcanzado el equilibrio a los 30 min, a partir de este momento los valores comienzan a ser inestables. Esto puede ser causado por un proceso de difusión lenta de los analitos desde la fibra de PA hacia la disolución acuosa.

Los experimentos relacionados con el estudio del paso de desorción se realizaron a tiempos de 10, 20, 30 y 40 min (**Tabla 4.2**). Para realizar el análisis por SPME-HPLC, es recomendable desorber la muestra en la fase móvil que se utiliza para la separación cromatográfica o al menos en uno de sus componentes, lo cual proveerá al sistema de una adecuada resolución y forma de picos en el cromatograma. Sin embargo, debido a la baja solubilidad de los BTEX en disoluciones acuosas, el estudio de la cinética de desorción se realizó en dos medios distintos, el MeOH como componente de la fase móvil, idóneo para la desorción de los BTEX, y la fase móvil del sistema de HPLC (mezcla Na_3PO_4 10 mM y MeOH, 2:8). Con el estudio de estas dos variables (medios de desorción) fue posible garantizar la mejor recuperación de los BTEX durante la desorción de la fibra, lo cual se observa en los valores de área de pico del cromatograma HPLC que se muestran en la **Tabla 4.2**.

IV. Determinación de BTEX y metabolitos en dientes humanos como biomarcadores. Utilización de la microextracción en fase sólida

Resultados y Discusión

Estos resultados permitieron la selección del MeOH como el mejor medio de desorción en todo el rango de tiempo estudiado.

Table 4.2. Datos cromatográficos^a (áreas de pico) obtenidos después de la SPME de BTEX con el uso de una fibra de 85 µm CAR/PDMS y desorción en dos disolventes distintos

Compuesto	en fase móvil ^b (x 10 ⁴)				en MeOH (x 10 ⁴)			
	10 min	20 min	30 min	40 min	10 min	20 min	30 min	40 min
B	22	35	29	40	44	39	49	41
T	13	22	14	25	50	50	51	45
E+pX	18	32	17	38	238	224	214	224

^a valores realizados con tres réplicas

^b mezcla de Na₃PO₄ 10 mM y MeOH, 2:8 (pH7)

Luego de definir el MeOH como medio orgánico más idóneo que el acuoso (fase móvil de HPLC) para desorber los BTEX desde la fibra, la cinética de desorción se realizó teniendo en cuenta los tiempos de extracción establecidos con anterioridad para cada grupo de compuestos (**Figura 4.11**). Los mejores resultados se obtuvieron a 10, 40 y 30 min de desorción para los BTEX, fenoles y ácidos carboxílicos, respectivamente. El proceso de desorción de los BTEX ocurrió rápidamente en los primeros 10 min y más del 80 % fue extraído en MeOH. Así, para los fenoles, después de 20 min de desorción en la fase móvil, más del 80 % de los compuestos extraídos fue disuelto. En el caso de los ácidos aromáticos, el máximo se observó a los 30 min, pero el equilibrio se alcanzó a los 40 min.

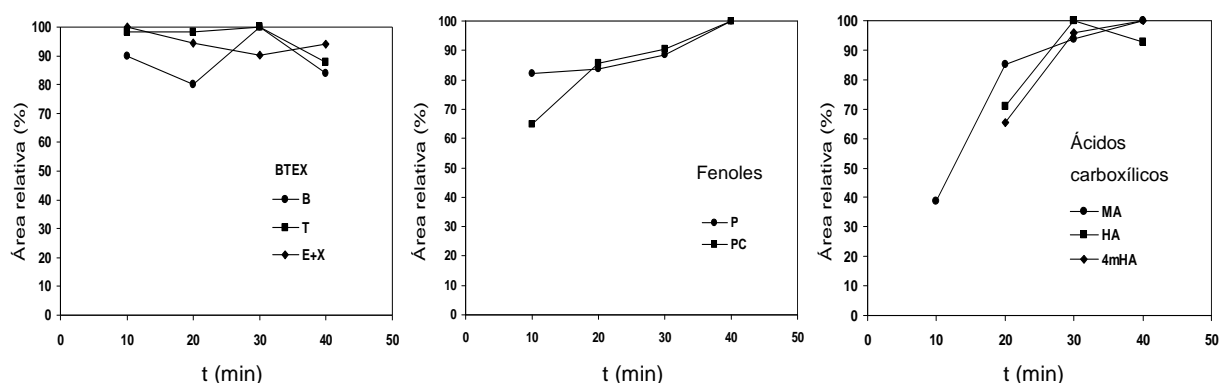


Figura 4.11. Influencia del tiempo de desorción en la SPME de BTEX y metabolitos a partir de disoluciones dopadas a 30 °C usando fibras de 85 µm PDMS y PA y tiempos de extracción optimizados.

IV.5.4. Resultados en la validación de los métodos SPME-HPLC y SPME-GC-MS

El rango lineal, la linealidad, la pendiente y la ordenada en el origen con sus respectivas desviaciones a partir de las curvas de calibrado, los coeficientes de correlación, LOD, la precisión y las constantes de distribución para los métodos de SPME combinados con GC-MS y HPLC fueron calculados a partir de que las condiciones óptimas de análisis que se establecieron anteriormente.

La linealidad del método de SPME-HPLC se estudió a partir de disoluciones dopadas a 2,5; 5; 10 y 25 µg/mL de BTEX y metabolitos, usando los tiempos de extracción y desorción mejorados previamente (**Tabla 4.3**). Los coeficientes de correlación (r^2) fueron superiores a 0,994 para todos los compuestos. Se realizaron análisis por triplicado, así como tres extracciones sucesivas para cada disolución obteniéndose una precisión menor del 15 %. Los LOD estuvieron en el rango de 2-333 µg (0,2-33.3 µg/mL). Las curvas de calibrado para cada grupo de compuestos y para cada método se detallan en la **Figura 4.12**. Los resultados del estudio de parámetros de validación de los métodos de SPME para los fenoles fueron similares tanto para el estudio de la fracción volátil como la no volátil. Esto indicó la capacidad del sistema para analizar los fenoles tanto en fase vapor como en disolución. Como la determinación de todos estos analitos se realiza de forma consecutiva sobre la misma muestra a partir de la extracción primero de los BTEX en la fase vapor, luego de los fenoles en esta fase y finalmente de los fenoles+ácidos desde la disolución, no existe posibilidad de pérdida cuantitativa para el caso de los fenoles, los cuales pueden ser extraídos desde la fracción volátil en la variante “headspace” seguido de la extracción desde la fracción no volátil mediante la inmersión de la fibra.

Los valores de K_D para BTEX se determinaron por primera vez para el método SPME-HPLC y todos los valores fueron mayores que los reportados para SPME-GC según se ilustra en la **Tabla 4.3** [Buchholz y Pawliszyn, 1994; Barták y col., 1997; van Doorn y col., 1998; Langenfeld y col., 1996; Nardi, 2003]. Estas constantes fueron determinadas teniendo en cuenta la concentración de analito en la muestra y en la fibra después de la SPME, lo cual indicó el nivel de distribución de estos compuestos en las condiciones de extracción. Las K_D fueron calculadas mediante la pendiente de las curvas que correlacionan ambas concentraciones como se ilustra en la **Figura 4.13** y **4.14**. Estos resultados demostraron la sensibilidad del método de SPME-HPLC, excepto para los ácidos carboxílicos, los cuales no mostraron una buena afinidad por este sistema extractivo de SPME, más indicado para el estudio de compuestos volátiles y semi-volátiles.

Por otro lado, para obtener una buena separación de los isómeros *pX* y *E*, se llevó a cabo el estudio de parámetros de validación de un método de SPME-GC-MS para los BTEX (**Tabla 4.4**). La separación cromatográfica para el análisis por GC-MS (**Figura 4.15**) se estableció a partir de estudios recientes realizados por Lee y col. [2007] para este tipo de compuestos, tales como la temperatura de desorción, tiempo de desorción, y programa de temperatura en el horno del GC. La linealidad se estudió a partir de disoluciones dopadas a 2, 5, 10, 15 y 20 ng/mL de BTEX. Es bien conocido que la técnica de GC-MS es más sensible que la de HPLC. Así, los LOD para los BTEX por esta técnica

IV. Determinación de BTEX y metabolitos en dientes humanos como biomarcadores. Utilización de la microextracción en fase sólida

Resultados y Discusión

fueron inferiores: 0,6-0,9 pg (0,06-0,09 pg/mL), así como mejores los valores de K_D obtenidos respecto al anterior método de SPME-HPLC. Los coeficientes de correlación (r^2) y precisión fueron similares para el análisis de los BTEX por ambos métodos de SPME. El cromatograma GC-MS obtenido para los BTEX, así como las curvas de calibrado del método "headspace"-SPME-GC-MS se muestran en detalle en la **Figura 4.15**.

Table 4.3. Rango lineal, límites de detección (LOD) y precisión (RSD) del método de SPME-HPLC para BTEX y metabolitos *

Compuesto	Rango total (µg)	Rango lineal (µg)	$y=ax+b$ **		r^2	LOD *** (ng)	RSD (%) (nivel, µg)	K_D
			$a \pm SD (x 10^3)$	$b \pm SD (x 10^5)$				
B	0-250	25-250	1,10 ± 0,06	0,56 ± 0,08	0,994	75	1,0 (100)	264
T	0-250	25-250	7,9 ± 0,4	5,2 ± 0,6	0,994	11	1,8 (100)	916
E+pX	0-250	25-250	48 ± 1	23 ± 2	0,998	2	0,4 (100)	2468
P (fracción volátil)	0-260	27-260	12,4 ± 0,3	- 2,6 ± 0,5	0,998	55	9,2 (25)	344
P (fracción no volátil)			7,8 ± 0,3	- 0,7 ± 0,5	0,996	43	5,2 (5)	663
pC (fracción volátil)	0-250	24-250	9,23 ± 0,03	- 0,74 ± 0,04	1	8	1,8 (50)	687
pC (fracción no volátil)			7,82 ± 0,07	- 0,61 ± 0,09	0,999	49	6,6 (5)	1029
MA	0-240	29-240	0,46 ± 0,02	- 0,70 ± 0,03	0,998	333	4,9 (5)	6
HA	0-240	30-240	21,2 ± 0,5	- 2,0 ± 0,7	0,999	18	14,4 (2.5)	98
MHA	0-260	30-260	32 ± 2	- 5 ± 3	0,994	61	9,7 (25)	207

* Tres réplicas y tres extracciones consecutivas para cada grupo de analitos: BTEX por headspace-SPME-GC-MS, fenoles por headspace-SPME-HPLC y SPME-HPLC, y ácidos carboxílicos por SPME-HPLC. ** Correlación lineal entre área del pico cromatográfico y la masa (µg).

***Determinado por el método de señal-ruído

IV. Determinación de BTEX y metabolitos en dientes humanos como biomarcadores. Utilización de la microextracción en fase sólida

Resultados y Discusión

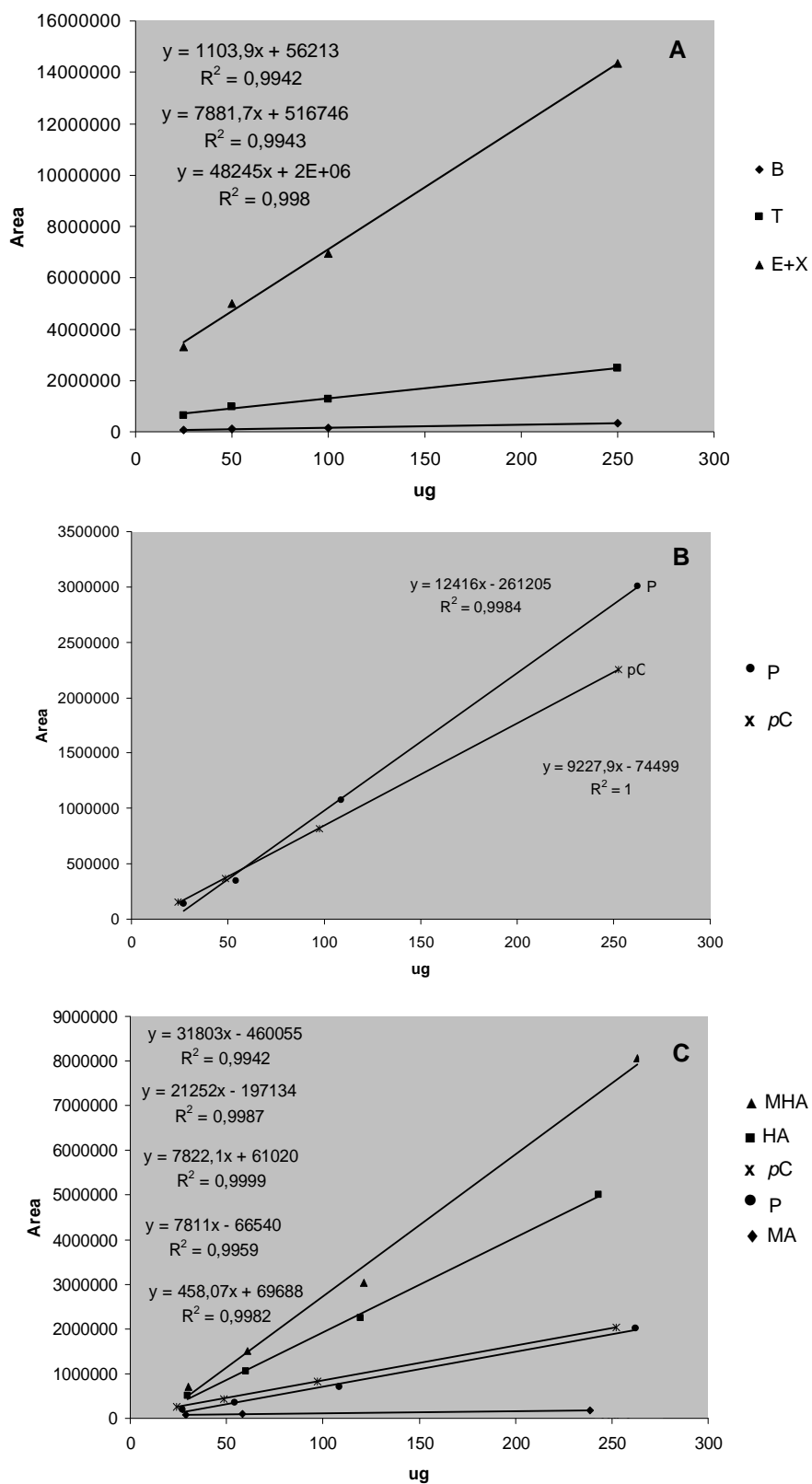


Figura 4.12. Curvas de calibrado de los métodos: “headspace”-SPME-HPLC para el análisis de BTEX y fenoles (A y B) y SPME-HPLC para fenoles y ácidos carboxílicos (C).

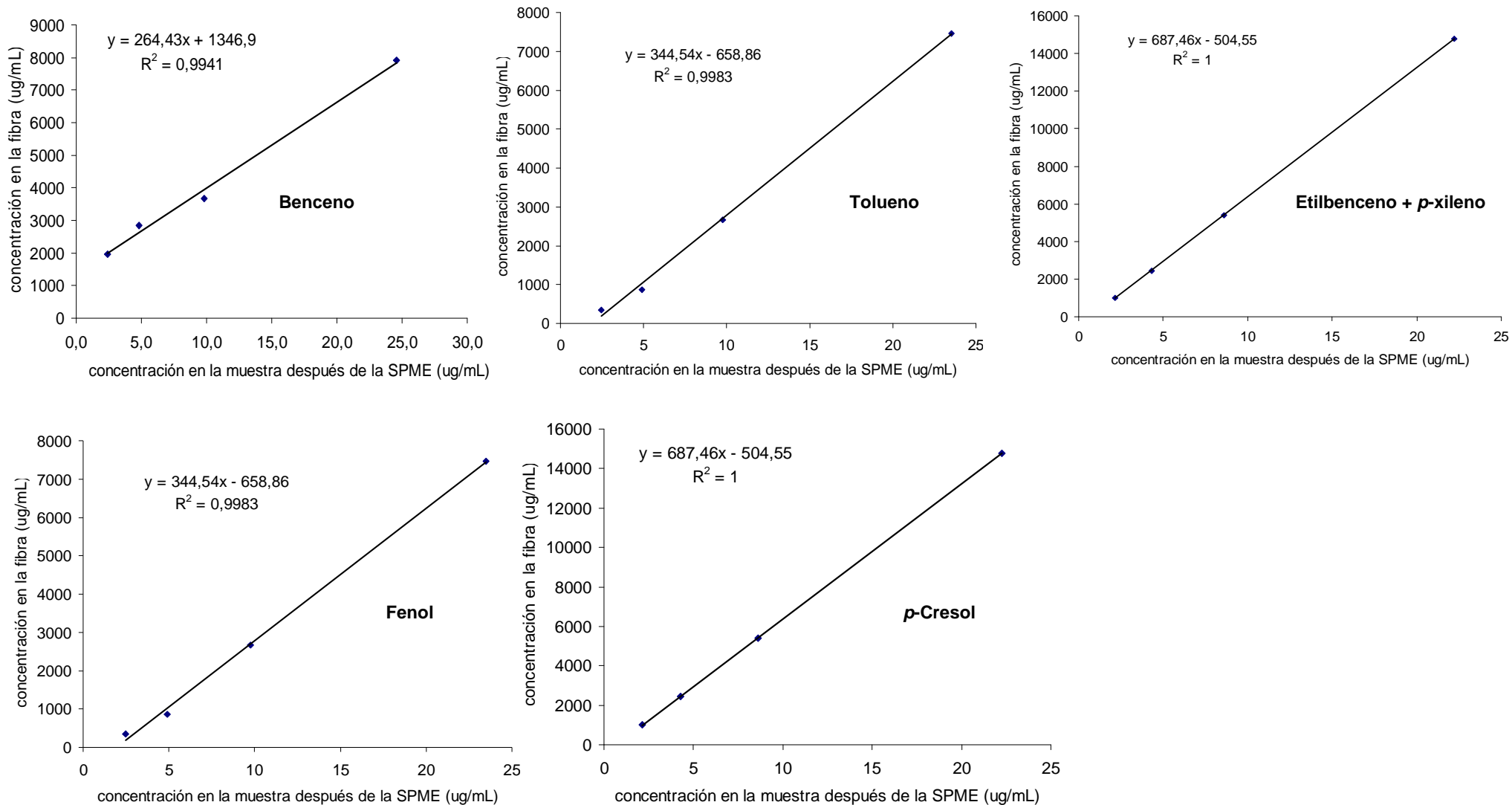


Figura 4.13. Determinación de las K_D para BTEX y fenoles mediante el método de "headspace"-SPME-HPLC.

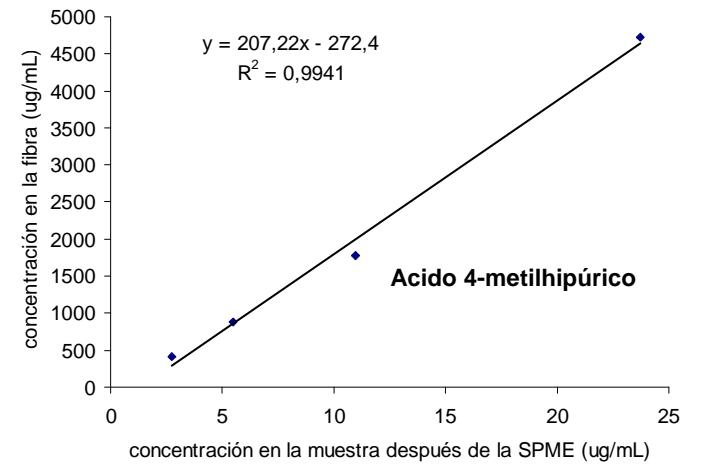
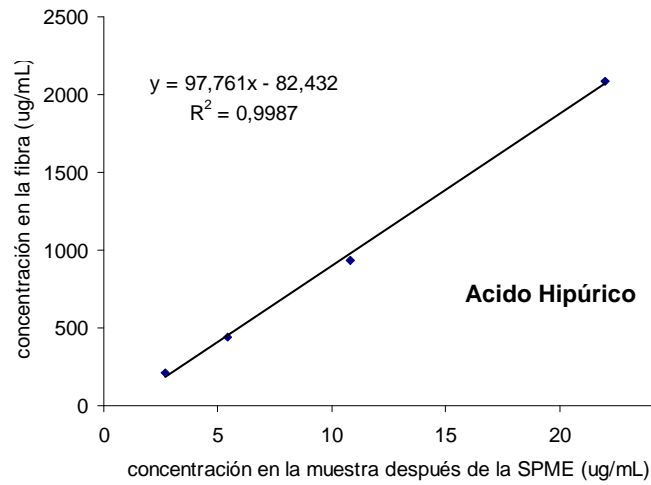
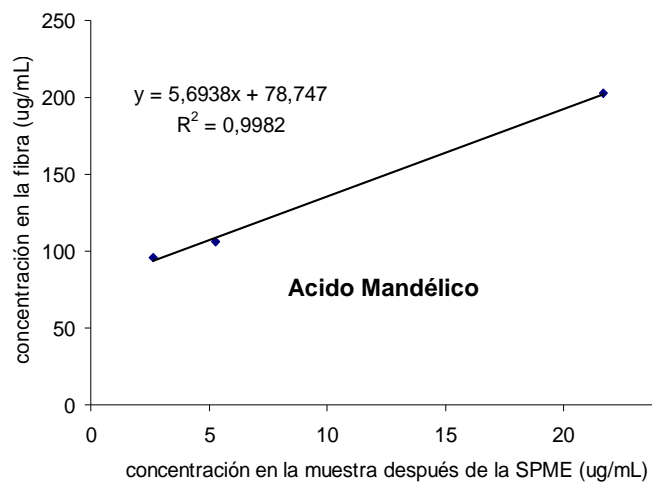
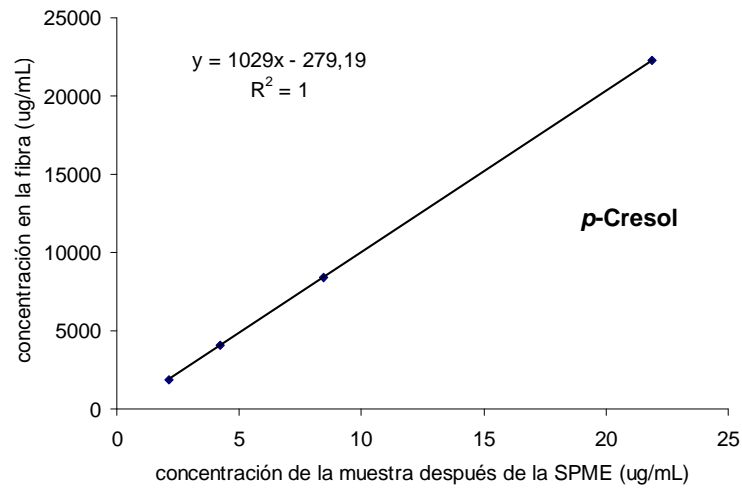
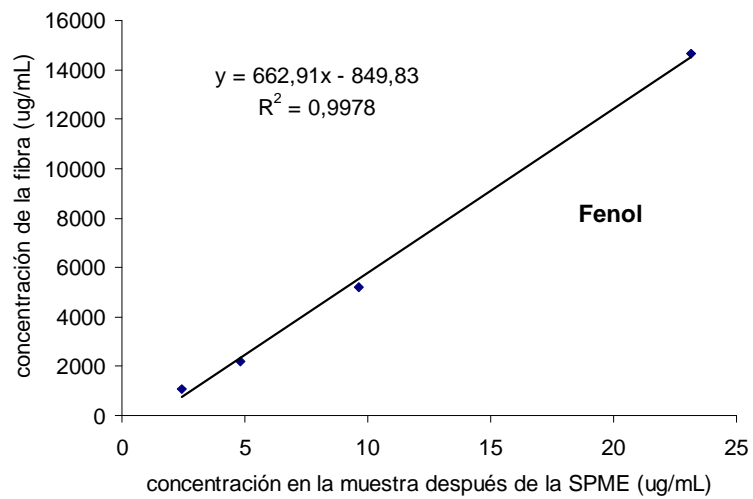


Figura 4.14. Determinación de las K_D para fenoles y ácidos carboxílicos en el método de SPME-HPLC.

Table 4.4. Rango lineal, límites de detección (LOD) y precisión del método SPME-GC-MS para BTEX *

Compuesto	t_R (min)	Rango total (ng)	Rango lineal (ng)	$y=ax+b$ **		r^2	LOD *** (pg)	RSD (%) (nivel, ng)	K_D
				$a \pm SD$	$b \pm SD$				
Benceno (B)	4,81	0-200	20-200	$0,019 \pm 0,001$	$- 0,3 \pm 0,1$	0,987	0,6	3,6 (20)	10091
Tolueno (T)	7,90	0-200	20-200	$0,039 \pm 0,003$	$- 0,3 \pm 0,3$	0,990	0,8	0,8 (20)	9849
Etilbenceno (E)	11,16	0-200	20-200	$0,069 \pm 0,009$	$- 2 \pm 1$	0,984	0,9	1,6 (20)	5624
<i>p</i> -Xileno (<i>p</i> X)	11,54	0-200	20-200	$0,071 \pm 0,005$	$- 1,4 \pm 0,7$	0,996	0,9	2,4 (20)	5459

* Tres réplicas, una SPME y análisis por GC-MS mediante el método de patrón interno (clorobenceno). ** Correlación lineal entre el área del pico cromatográfico y la masa (μ g). *** Determinado por el método de señal-ruido.

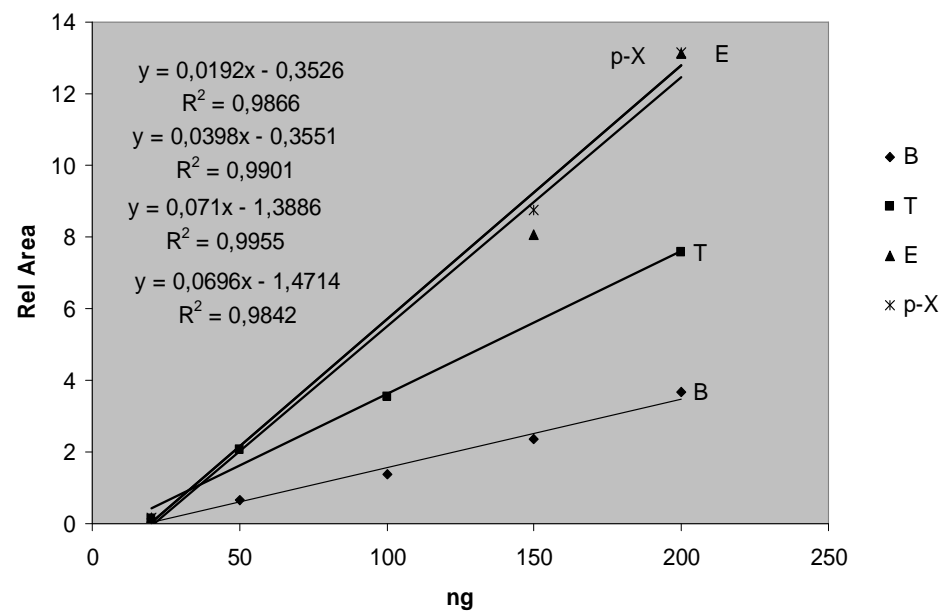
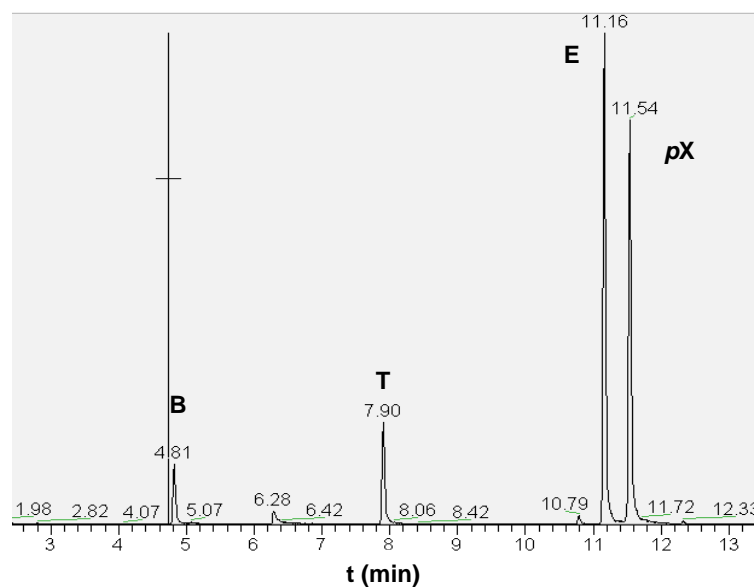


Figura 4.15. Cromatograma del análisis de BTEX por “headspace”-SPME-GC-MS y las curvas de calibrado del método.

IV.5.5. Resultados en la aplicación de los métodos de SPME en dientes humanos

El método propuesto de SPME se utilizó para la determinación de BTEX y metabolitos en dientes humanos. Los métodos seleccionados de *headspace*-SPME-GC-MS, *headspace*-SPME-HPLC y SPME-HPLC para el análisis consecutivo de los tres grupos de compuestos: BTEX, fenoles y ácidos carboxílicos, respectivamente, se realizaron a partir de cada muestra operando bajo las condiciones mejoradas en los estudios previos. Los resultados se detallan en la **Tabla 4.5**.

Los BTEX y fenoles fueron identificados en casi todas las muestras de dientes, indicándose el LOD para aquellas donde no se identificaron estas sustancias. En el caso de los ácidos carboxílicos no se identificaron en ninguna muestra dental bajo el presente método. El mayor contenido de BTEX se obtuvo para los dientes 2 y 7, con una concentración mayor de 1 µg/g. Estas muestras de dientes pertenecían a un hombre anciano fumador y a un joven no fumador, lo cual indicó que la presencia de los BTEX no es necesariamente causada por el humo del cigarro y sí podría estar relacionada con algún tipo de exposición a estas sustancias en ambientes de trabajo o de la vida cotidiana. Otra muestra dental interesante resultó ser la número 3, con un alto contenido de E y *p*X (cerca de 1 µg/g). Esta muestra de diente pertenecía a un hombre joven que trabaja en la industria de disolventes. En relación a los fenoles, la cuantificación de P y *p*C fue similar para todas las muestras de diente en el rango 36-99 µg/g. Es bien conocido que los fenoles se encuentran en la dieta común del ser humano y por esta razón, estos resultados obtenidos para P y *p*C podrían no ser un indicador de la exposición a BTEX.

Los resultados indicaron además, una capacidad de los métodos de SPME de identificar y cuantificar adecuadamente trazas de BTEX y fenoles en dientes humanos, pero para el caso de los ácidos carboxílicos MA, HA y MHA, no fue posible su identificación por el método de SPME-HPLC. Por esta razón se hizo necesario establecer otra metodología específica para la determinación de ácidos carboxílicos en muestras dentales, la cual se describe en el próximo capítulo.

Table 4.5. Determinación de BTEX y metabolitos por SPME-GC-MS y SPME-HPLC en dientes humanos

Muestra dental	Peso del diente (g)	Edad (años)	Profesión o lugar de trabajo	Concentración de BTEX (ng/g) y metabolitos (µg/g) *								
				B	T	E	<i>pX</i>	<i>P</i> *	<i>pC</i> *	MA	HA	MHA
1	2	28 *	Dpto. Pintura	26	18	25	25	42	99	< 0,2	< 0,009	< 0,03
2	1,542	71 *	Mecánico	1386	1967	1519	1883	54	69	< 0,2	< 0,01	< 0,04
3	1,706	32	Ind. Disolventes	76	200	958	728	42	36	< 0,2	< 0,01	< 0,04
4	1,541	56 *	Construcción	37	23	< 6x10 ⁻⁴	< 6x10 ⁻⁴	51	36	< 0,2	< 0,01	< 0,04
5	2,09	59	Construcción	126	95	72	84	84	69	< 0,2	< 0,009	< 0,03
6	1,683	24	Construcción	51	19	8	12	48	69	< 0,2	< 0,01	< 0,04
7	2,096	29	Construcción	1085	1640	1665	1978	54	72	< 0,2	< 0,009	< 0,03
8	2,007	42	Construcción	118	42	10	10	45	75	< 0,2	< 0,009	< 0,03
9	2,075	71 *	Fábrica de Café	19	15	7	10	51	36	< 0,2	< 0,009	< 0,03
10	1,202	35	Ind. Farmacéutica	78	23	12	18	72	57	< 0,3	< 0,01	< 0,05

* Fumador. ** Tres réplicas y tres SPME consecutivas para cada grupo de analitos: BTEX por *headspace*-SPME-GC-MS, fenoles por *headspace*-SPME-HPLC y SPME-HPLC, y ácidos carboxílicos por SPME-HPLC

IV.6. CONCLUSIONES

De los resultados descritos en el presente capítulo se pueden extraer las siguientes conclusiones más relevantes:

1. El presente estudio de la extracción en un solo paso de los BTEX y sus metabolitos a partir de muestras dopadas de dientes con NaOH seguido de un procedimiento específico y consecutivo que combinó la SPME con la GC-MS y la HPLC, permitió desarrollar varias metodologías de análisis de estas sustancias en muestras modelo.
2. El método de SPME-GC-MS resultó ser el más idóneo para el estudio de los BTEX en muestras modelo, obteniéndose una buena sensibilidad, mientras que en el análisis de sus metabolitos por SPME-HPLC (fenoles y ácidos carboxílicos) los límites de detección fueron relativamente altos.
3. El método de SPME permitió la cuantificación de BTEX y fenoles por primera ocasión en dientes humanos como posibles biomarcadores, mientras que los ácidos carboxílicos no se pudieron detectar dada la limitada sensibilidad del método.

IV. Determinación de BTEX y metabolitos en dientes humanos como biomarcadores. Utilización de la microextracción en fase sólida

Bibliografía

IV.7. BIBLIOGRAFÍA

- Andreoli, R.; Manini, P.; Bergamaschi, E.; Brustolin, A.; Mutti, A. Solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for determination of monoaromatic hydrocarbons in blood and urine. Application to people exposed to air pollutants. *Chromatographia* (1999), 50(3/4), 167-172.
- Angerer J., Schaller K. H. (eds) (1988) Analyses of hazardous substances in biological materials. Methods for biological monitoring. VCH, Weinheim, pp 52–66.
- Angerer, J.; Hoersch, B. Determination of aromatic hydrocarbons and their metabolites in human blood and urine. *Journal of Chromatography B* (1992), 580(1-2), 229-55.
- Arora, M.; Kennedy, B. J.; Elhlou, S.; Pearson, N. J.; Walker, D. M.; Bayl, P.; Chan, S. W. Y. Spatial distribution of lead in human primary teeth as a biomarker of pre- and neonatal lead exposure. *Science of the Total Environment* (2006), 371(1-3), 55-62.
- Arthur, C. L.; Pawliszyn, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry* (1990), 62(19), 2145-8.
- Baclocchi, R.; Attina, M.; Lombardi, G.; Boni, M. R. Fast determination of phenols in contaminated soils. *Journal of Chromatography A* (2001), 911(1), 135-141.
- Barták, P.; Cap, L. Determination of phenols by solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A* (1997), 767(1+2), 171-175.
- Bergamaschi, E.; Brustolin, A.; De Palma, G.; Manini, P.; Mozzoni, P.; Andreoli, R.; Cavazzini, S.; Mutti, A. Biomarkers of dose and susceptibility in cyclists exposed to monoaromatic hydrocarbons. *Toxicology Letters* (1999), 108(2-3), 241-247.
- Bieniek, G. Concentrations of phenol, o-cresol, and 2,5-xyleneol in the urine of workers employed in the distillation of the phenolic fraction of tar. *Occupational and Environmental Medicine* (1994), 51(5), 354-6.
- Bieniek, G. Simultaneous determination of phenol, cresol, xyleneol isomers and naphthols in urine by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications* (1996), 682(1), 167-172.
- Buchholz, K. D.; Pawliszyn, J. Optimization of solid-phase microextraction conditions for determination of phenols. *Analytical Chemistry* (1994), 66(1), 160-7.
- Costa de Almeida, G. R.; Saraiva, M. C. P.; Barbosa, F. Jr.; Krug, F. J.; Cury, J. A.; Rosario de S., Maria da L.; Buzalaf, M. Afonso R.; Gerlach, R. F. Lead contents in the surface enamel of deciduous teeth sampled in vivo from children in uncontaminated and in lead-contaminated areas. *Environmental Research* (2007), 104(3), 337-345.
- Ericson, J. E.; Rinderknecht, A.; Gonzalez, E. J.; Crinella, F. M.; Kleinman, M. T. Measurements of Manganese with Respect to Calcium in Histological Enamel Cross Sections: Toward a New Manganese Biomarker. *Environmental Research* (2001), 86(1), 46-50.
- Ezquerro, O.; Ortiz, G.; Pons, B.; Tena, M. T. Determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in soils by multiple headspace solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A* (2004), 1035(1), 17-22.
- Fan, X; Deng, Y. Separation and identification of aromatic acids in soil and the Everglades sediment samples using solid-phase microextraction followed by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A* (2002), 979(1-2), 417-424.
- Fujii, T.; Kawabe, S.; Horike, T.; Taguchi, T.; Ogata, M. Simultaneous determination of the urinary metabolites of toluene, xylene and styrene using high-performance capillary electrophoresis. Comparison with high-

IV. Determinación de BTEX y metabolitos en dientes humanos como biomarcadores. Utilización de la microextracción en fase sólida

Bibliografía

- performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* (1999), 730(1), 41-47.
- Gerlach, R. F.; de Souza, A. P.; Cury, J. A.; Line, S. R. P. Effect of lead, cadmium and zinc on the activity of enamel matrix proteinases in vitro. *European Journal of Oral Science* (2000), 108, 327-334.
- Hinwood, A. L.; Rodríguez, C.; Runnion, T.; Farrar, D.; Murray, F.; Horton, A.; Glass, D.; Sheppard, V.; Edwards, J. W.; Denison, L.; Whitworth, T.; Eiser, Ch.; Bulsara, M.; Gillett, R. W.; Powell, J.; Lawson, S.; Weeks, I.; Galbally, I. Risk factors for increased BTEX exposure in four Australian cities. *Chemosphere* (2007), 66, 533-541.
- Huang, S-D.; Cheng, Ch-P.; Sung, Y-H. Determination of benzene derivatives in water by solid-phase microextraction. *Analytica Chimica Acta* (1997), 343(1-2), 101-108.
- Kang, D.; Amarasiriwardena, D.; Goodman, A. H. Application of laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS) to investigate trace metal spatial distributions in human tooth enamel and dentine growth layers and pulp. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2004), 378(6), 1608-1615.
- Kierdorf, U.; Kierdorf, H. Dental fluorosis in wild deer: its use as a biomarker of increased fluoride exposure. *Environmental Monitoring and Assessment* (1999), 57(3), 265-275.
- Laffon, B.; Lema, M.; Mendez, J. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of urinary mandelic and phenylglyoxylic acids as indirect evaluation of styrene exposure. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* (2001), 753(2), 385-393.
- Langenfeld, J. J.; Hawthorne, S. B.; Miller, D. J. Quantitative Analysis of Fuel-Related Hydrocarbons in Surface Water and Wastewater Samples by Solid-Phase Microextraction. *Analytical Chemistry* (1996), 68, 144-155.
- Lee, M-R.; Chang, Ch-M.; Dou, J. Determination of benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes in water at sub-ng/L levels by solid-phase microextraction coupled to cryo-trap gas chromatography-mass spectrometry. *Chemosphere* (2007), 69(9), 1381-1387.
- Marchei, E.; Joya, X.; Garcia-Algar, O.; Vall, O.; Pacifici, R.; Pichini, S. Ultrasensitive detection of nicotine and cotinine in teeth by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* (2008), 22(16), 2609-2612.
- Moon, D. H.; Paik, N. W.; Shim, Y. Analysis of some metabolites of organic solvents in urine by high-performance liquid chromatography with β -cyclodextrin. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* (1997), 694(2), 367-374.
- Murtomaa, M.; Tervaniemi, Olli-Matti; Parviainen, J.; Ruokojaervi, P.; Tuukkanen, J.; Viluksela, M. Dioxin exposure in contaminated sawmill area: the use of molar teeth and bone of bank vole (*Clethrionomys glareolus*) and field vole (*Microtus agrestis*) as biomarkers. *Chemosphere* (2007), 68(5), 951-957.
- Nardi, L. Determination of siloxane-water partition coefficients by capillary extraction-high-resolution gas chromatography Study of aromatic solvents. *Journal of Chromatography A* (2003), 985, 39-45.
- Nowak, B.; Chmielnicka, J. Relationship of Lead and Cadmium to Essential Elements in Hair, Teeth, and Nails of Environmentally Exposed People. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (2000), 46(3), 265-274.
- Pascual J. A.; Diaz D.; Segura J.; Garcia-Algar O.; Vall O.; Zuccaro P.; Pacifici R.; Pichini S. A simple and reliable method for the determination of nicotine and cotinine in teeth by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry RCM* (2003), 17(24), 2853-5.
- Pawliszyn, J. *Solid Phase Microextraction, Theory and Practice*, Wiley-VCH, New York, 1997.
- Pawliszyn, J. (Ed.), *Applications of Solid Phase Microextraction*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999.

IV. Determinación de BTEX y metabolitos en dientes humanos como biomarcadores. Utilización de la microextracción en fase sólida

Bibliografía

- Penton Z., in: S.A. Scheppers-Wercinski (Ed.), *Solid Phase Microextraction, A Practical Guide*, Marcel Dekker, New York, **1999**, p. 27.
- Reese, E.; Kimbrough, R. D. Acute toxicity of gasoline and some additives. *Environmental Health Perspectives* (**1993**), 101(SUPPL. 6), 115-31.
- Shen, Y. In Vitro cytotoxicity of BTEX metabolites in HeLa cells. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* (**1998**), 34(3), 229-234.
- Sperlinková, I.; Dabrowska, L.; Stransky, V.; Kučera, J.; Tichy, M. Human urine certified reference material CZ 6009: creatinine, styrene metabolites (mandelic acid and phenylglyoxylic acid). *Anal Bioanal Chem* (**2004**) 378, 1208–1212.
- Tolnai, B.; Gelencser, A.; Gal, C.; Hlavay, J. Evaluation of the reliability of diffusive sampling in environmental monitoring. *Analytica Chimica Acta* (**2000**), 408(1-2), 117-122.
- Tvinnereim, H. M.; Eide, R.; Riise, T. Heavy metals in human primary teeth: some factors influencing the metal concentrations. *Science of the Total Environment* (**2000**), 255(1-3), 21-27.
- van Doorn H.; Grabanski C. B.; Miller D. J.; Hawthorne S. B. Solid-phase microextraction with pH adjustment for the determination of aromatic acids and bases in water. *Journal of chromatography A* (**1998**), 829(1-2), 223-33.
- Vial, J; Jardy, A. Experimental comparison of the different approaches to estimated LOD and LOQ of an HPLC method. *Analytical Chemistry* (**1999**), 71, 2672-2677.
- Wang, Ch-Y.; Huang, Ch-T.; Hsieh, Y-Z. Determination of metabolites of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene by β -cyclodextrin modified capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science* (**2003**), 26, 69–74.
- Wardencki, W.; Michulec, M.; Curyło, J. A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. *International Journal of Food Science and Technology* (**2004**), 39, 703–717.
- Yimrungruang D, Cheevaporn V, Boonphakdeeb T, Watchalayann P, Helander HF. Characterization and Health Risk Assessment of Volatile Organic Compounds in Gas Service Station Workers. *EnvironmentAsia 2* (**2008**) 21-29.
- Zhang, Z.; Pawliszyn, J. Headspace solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry* (**1993**), 65(14), 1843-52.

CAPÍTULO V

*MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA MEDIANTE MEMBRANAS
LÍQUIDAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS
COMO METABOLITOS DE BTEX EN DIENTES HUMANOS*

V.1. RESUMEN

En el presente estudio se estableció una metodología analítica basada en la microextracción en fase líquida (LPME) soportada en membrana hueca capilar para la determinación de los ácidos carboxílicos ácido mandélico (MA), ácido hipúrico (HA) y ácido 4-metilhipúrico (MHA), conocidos metabolitos de BTEX y su aplicación a la determinación de estos metabolitos en muestras de dientes humanos con el objetivo de establecer una metodología para una posible correlación entre la exposición a estas sustancias tóxicas y la salud bucal.

Se desarrolló un método de LPME seguido de HPLC con el uso de membranas huecas capilares (hollow fiber) de polipropileno para el análisis de los ácidos aromáticos mencionados. Para ello, se realizó un estudio con disoluciones dopadas de estos ácidos y utilizando distintos tipos de furzas impulsoras para el transporte a través de la membrana líquida, incluyendo, transporte no facilitado con dodecano, dihexiléter o decanol, y transporte facilitado con el uso de los transportadores trioctilamina (TOA), óxido de trioctilfosfina (TOPO), tributilfosfato (TBP) y cloruro de trioctilamonio (Aliquat 336). En unos casos, se empleó como fuerza impulsora un gradiente de pH y en otros, un gradiente de aniones. Se utilizó el factor de enriquecimiento (EF) como parámetro a seguir. Los resultados obtenidos indicaron una variedad de situaciones relacionadas con la naturaleza del transportador y fueron interpretados en términos de estabilidad del complejo analito-transportador formado en la fase orgánica, mostrando efectos negativos y positivos en el transporte. En transporte no facilitado, se seleccionó el sistema de gradiente de pH y utilizando decanol como membrana líquida, se estudiaron otros parámetros que afectan los EF. Se obtuvieron los valores de EF más altos para un tiempo de transporte de 20h, 500 rpm de velocidad de agitación, NaOH 1M como fase aceptora y la presencia de 500 mM de sal añadida en la fase de carga (disoluciones dopadas). La validación del método de LPME permitió obtener las siguientes características analíticas del método: linealidad del 0,991-0,999 en el rango de concentración empleado, LOD de 0,2-1,6 ng, una repetitividad del 7,0-10,1 % y una reproducibilidad del 5,3-8,1 %. La aplicación del método de LPME en el análisis de dientes humanos permitió determinar MA y HA en cantidades entre 2-11 µg/g y 0,2-70 µg/g, respectivamente.

V. Microextracción en fase líquida mediante membranas líquidas para la determinación de ácidos carboxílicos como metabolitos de BTEX en dientes humanos

Introducción

V.2. INTRODUCCIÓN

En años recientes, los BTEX y sus metabolitos tales como los ácidos carboxílicos: ácido mandélico (MA), ácido hipúrico (HA) y ácido metilhipúrico (MHA), que se producen en el organismo por oxidación de la cadena alquílica del etilbenceno, xileno y tolueno (**Figura 5.1**), respectivamente [Angerer y col., 1992] después de la absorción de los BTEX a través de los pulmones y la piel [Reese, 1993] para luego ser eliminados por la orina y el sudor, han sido evaluados para la determinación del nivel de exposición a medios contaminados y conocer el nivel de riesgo a la salud asociada a la presencia de los BTEX en el organismo [Moon y col., 1997; Shen, 1998; Andreoli y col., 1999; Tolnai y col., 2000; Wang y col., 2003; Yimrungruang y col., 2008].

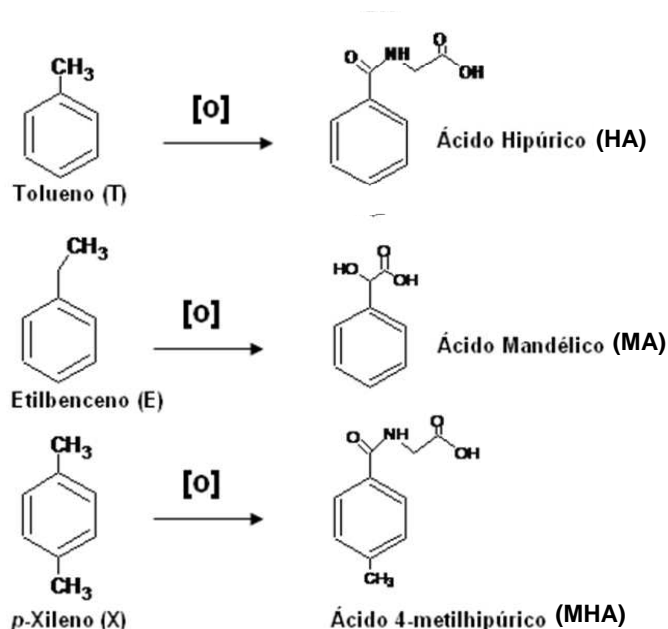


Figura 5.1. Estructuras de algunos metabolitos de los BTEX.

La concentración de estos tres ácidos en muestras biológicas permite conocer el grado de exposición a los BTEX. Algunos procedimientos analíticos consistentes en una combinación de pasos previos de pre-concentración seguidos de una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o electroforesis capilar (ZCE) han sido empleados para determinar estos metabolitos de BTEX en fluidos biológicos tales como la orina y la sangre en trabajadores expuestos a niveles altos de BTEX [Angerer y col., 1988; Astier y col., 1992; Moon y col., 1997; Burrini y col., 1998; Fujii y col., 1999; Laffon y col., 2001; Wang y col., 2003].

La microextracción en fase líquida (LPME) en combinación con la HPLC o la ZCE es una de los más interesantes métodos de pre-concentración de muestras complejas en aplicaciones

V. Microextracción en fase líquida mediante membranas líquidas para la determinación de ácidos carboxílicos como metabolitos de BTEX en dientes humanos

Introducción

medioambientales y bioanalíticas [Jonsson y Mathiasson, 1999a, 1999b; Lee y col., 2008] debido al nivel de enriquecimiento del analito que se logra, su capacidad de limpieza (“clean-up”) de la muestra y el bajo nivel de consumo de disolventes orgánicos. El método consiste en la extracción de los analitos desde una disolución acuosa hacia una membrana líquida soportada (SLM) en los poros de las paredes de un capilar de fibra hueca (porosa) tipo “hollow fiber” y posteriormente, mediante una re-extracción, éstos pasan hacia una fase aceptora acuosa que se encuentra en el lumen del capilar de fibra hueca. Algunas alternativas en la LPME han sido empleadas ampliamente para la recuperación y la concentración de ácidos carboxílicos a partir de diversas matrices [Schlosser y col., 2005].

Ningún método hasta la actualidad ha sido establecido para el estudio de estos metabolitos de BTEX en dientes humanos como biomarcadores. Recientes investigaciones en el análisis de niveles acumulativos de algunos compuestos orgánicos en dientes, tales como dioxinas en dientes de mamíferos [Murtomaa y col., 2007] y nicotina y cotidina en dientes de niños para la evaluación de la exposición al humo del tabaco [Pascual y col., 2003; Marchei y col., 2008], son algunos de los pocos ejemplos de aplicación.

El presente estudio consiste en el desarrollo de un método para el estudio simultáneo de MA, HA y MHA como metabolitos de BTEX en dientes humanos para establecer un método analítico sencillo y eficaz que permita evaluar la exposición acumulativa de BTEX y su posible relación con la salud dental. Este estudio incluye un análisis detallado del comportamiento de estas sustancias en un sistema de membranas líquidas de tipo “hollow fiber” que permitirá adquirir información valiosa sobre el uso de la LPME aplicada al estudio de estos compuestos en muestras diversos.

V. Microextracción en fase líquida mediante membranas líquidas para la determinación de ácidos carboxílicos como metabolitos de BTEX en dientes humanos

Objetivos

V.3. OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como objetivo fundamental el establecimiento de una metodología analítica basada en la microextracción en fase líquida (LPME) para el estudio de ácidos carboxílicos como metabolitos de los BTEX en dientes humanos con el propósito de implementar una herramienta analítica para una posible evaluación de la correlación entre la exposición a BTEX y la salud bucal. Para ello se desarrollaron las siguientes etapas de estudio:

1. Estudio de algunos factores que rigen la LPME de ácidos carboxílicos.
2. Parámetros de validación del método de LPME-HPLC para los ácidos carboxílicos.
3. Aplicación del método de LPME para el análisis de los ácidos carboxílicos en dientes humanos.

Hipótesis

El método de LPME-HPLC es una herramienta analítica eficaz para el estudio de ácidos carboxílicos en dientes humanos, lo que puede significar su papel como biomarcadores de la exposición a BTEX.

V. Microextracción en fase líquida mediante membranas líquidas para la determinación de ácidos carboxílicos como metabolitos de BTEX en dientes humanos

Parte Experimental

V.4. PARTE EXPERIMENTAL

La exposición de este capítulo corresponde al desarrollo experimental del estudio realizado, el cual está ordenado en las siguientes etapas: descripción de los procedimientos generales de preparación de muestras, procedimiento de LPME, validación del método de LPME-HPLC, así como las condiciones cromatográficas de análisis de los metabolitos de BTEX.

V.4.1. Reactivos y preparación de muestras

Las siguientes sustancias patrones fueron utilizadas para preparar las disoluciones madres en metanol (MeOH) de calidad para HPLC (Sigma-Aldrich, Madrid, España): 98% ácido mandélico, $\geq 97\%$ ácido hipúrico, y 98% ácido 4-metilhipúrico. Los siguientes reactivos y disolventes orgánicos fueron usados de Sigma-Aldrich (Madrid, España): cloruro de metiltrioctilamonio (Aliquat 336), $>98\%$ dodecano, $>97\%$ dihexiléter, 97% *n*-decanol, 99% tributilfosfato (TBP), 99% óxido de trioctilfosfina (TOPO), 98% trioctilamina (TOA) y sorbitan trioleato (SPAN 85). Las sales y ácidos utilizados fueron de Panreac (Madrid, España): 99,5% fosfato de sodio $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 98% hidróxido de sodio NaOH, 99,5% cloruro de sodio NaCl, ácido acético glacial, 37% ácido clorhídrico HCl, y 85% ácido fosfórico H_3PO_4 . El agua desionizada fue purificada con el uso de un equipo Millipore (Milford, EEUU).

Para la LPME, una disolución patrón de cada ácido carboxílico (2000 mg/L) fue preparada disolviendo 20 mg del patrón en 10 mL de MeOH-H₂O (1:1). La disolución de trabajo (20 mg/L) que contiene los tres ácidos fue preparada por dilución apropiada de la disolución madre. Las disoluciones madre y de trabajo fueron almacenadas a 4 °C. Veinte mililitros de cada disolución de carga fue preparada tomando una alícuota de la disolución de trabajo y diluyéndola en el volumen requerido de 0,5M o 0,01M NaOH hasta obtener 100 $\mu\text{g/L}$, y luego se ajustó al pH de trabajo por adición de gotas de HCl. La disolución aceptora (NaOH 1M a pH12,6; Na_3PO_4 1M a pH11,7 o NaCl 2M a pH6,0) fueron preparadas disolviendo cantidades adecuadas de cada reactivo en 1 L de agua.

Los dientes humanos fueron gentilmente donados por pacientes de la Clínica Dental del Servicio Catalán de Salud (Drassanes, Barcelona) a través de la Dra. Cristina Gracia, entre los meses de Marzo-Abril 2009. Cada diente humano fue lavado con agua después de su extracción por el dentista y depositado en viales de 20 mL que contenían la disolución extractante de NaOH 1M. La edad, profesión y cualificación de fumador fueron apuntados para cada donante.

V.4.2. Procedimiento de microextracción en fase líquida (LPME)

Para la LPME de los ácidos carboxílicos se estableció una modificación del procedimiento de extracción en discontinuo descrito con anterioridad [Liu y col., 2005; Berhanu y col., 2006], la cual

V. Microextracción en fase líquida mediante membranas líquidas para la determinación de ácidos carboxílicos como metabolitos de BTEX en dientes humanos

Parte Experimental

consistió básicamente en dos alteraciones: el uso de un volumen menor de muestra o fase de carga de 20 mL debido al tamaño y tipo de muestra dental a estudiar (en el método descrito se emplearon hasta 1L de muestra) y el paso de impregnación realizado en baño de ultrasonidos por varios minutos que garantizara una adecuada formación de la SLM (en el método descrito previamente se utilizó solo una inmersión de la fibra en el disolvente orgánico a impregnar por varios segundos).

La preparación del capilar de fibra hueca (formación de la SLM), así como el procedimiento general de LPME realizado para el estudio de los ácidos carboxílicos se llevó a cabo de la misma manera que se describe en el Capítulo III.

V.4.3. Parámetros de validación del método de LPME-HPLC

Las disoluciones dopadas de los patrones de los ácidos carboxílicos, se prepararon a partir de disoluciones madre (2000 µg/mL) a través de diluciones apropiadas en viales de 20 mL que contenían las disoluciones de carga a pH2 bajo condiciones mejoradas, obteniéndose un rango de concentración de 0,1 a 250 µg/L (0,002 a 5 µg). Para llevar a cabo el procedimiento de LPME se llevó a cabo el análisis por triplicado con el uso de blancos y se usaron las condiciones mejoradas para las tres fases: de carga, SLM y aceptora. Las curvas de calibrado se construyeron con la información recogida del área de los picos en el cromatograma y la cantidad en µg de ácidos carboxílicos de las muestras dopadas. Estas se usaron para el cálculo de la linealidad, límites de detección (LOD), repetitividad, reproducibilidad y recobrado. La estimación de los LOD se basó en el área del pico más pequeño detectado para una relación señal-ruído de tres [Vial y Jardy, 1999].

V.4.4. Condiciones de separación cromatográfica mediante HPLC

Para el análisis de los ácidos carboxílicos obtenidos por el método de LPME-HPLC, se utilizó un cromatógrafo de líquidos Thermo-Fisher (Barcelona, España) equipado con autosampler AS3000, bombas de gradiente P4000, un detector UV con arreglo de diodo UV6000LP con facilidad de medida en el rango 192-800 nm y programa de cómputo de datos ChromQuest versión 4.2.34, igual al utilizado en el Capítulo III. La separación se realizó en una columna GraceSmart C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) con una mezcla de Na₃PO₄ 12H₂O 10 mM (pH ajustado a 2,5 con H₃PO₄) como fase móvil A y MeOH como fase móvil B. El gradiente de elución fue de 20 % B (0-2 min), 20-60 % B (2-6 min), 60-80 % B (6-10 min) y 80 % (1 min) a 1 mL/min y 50 °C de temperatura en el horno. El volumen de inyección fue de 20 µL por duplicado y la longitud de onda de 220 nm.

V.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.5.1. Procedimiento de LPME para el análisis de los ácidos carboxílicos

V.5.1.1. Selección de las condiciones de LPME

Básicamente, en la LPME con el uso de membranas de fibra hueca “hollow fiber”, los analitos son extraídos en un sistema de tres fases a partir de una disolución de carga acuosa, a través de un disolvente orgánico previamente inmovilizado en los poros del capilar de fibra hueca y hacia una fase aceptora que se encuentra en el volumen interior (lumen) de esta [Liu y col., 2005, 2006]. En los siguientes experimentos, el factor de enriquecimiento (EF) se utilizó como respuesta a seguir en el estudio del proceso de LPME y se definió como la concentración del analito en la fase aceptora dividido por la concentración en la fase de carga inicial [Kou y col., 2004; Yamini y col., 2006; Fontanals y col., 2006]. Los diferentes parámetros que rigen el proceso de LPME deben ser estudiados para lograr los mayores valores de EF, significando con esto menores LOD del método.

Para llevar a cabo el propósito del presente estudio, el efecto de diferentes factores en la LPME de los ácidos carboxílicos MA, HA y MHA como metabolitos de los BTEX, a partir de disoluciones extractantes de NaOH, fueron evaluados a través de la investigación de su aplicabilidad en la determinación de estos compuestos por vez primera en dientes humanos como biomarcadores. Para ello fueron fijados algunos parámetros como el volumen de 40 μ L de la fase aceptora adecuado para el posterior análisis por HPLC y el volumen de la fase de carga de 20 mL con NaOH, establecido como disolución extractante de los dientes en el capítulo anterior.

V.5.1.2. Tipo de disolvente orgánico para la membrana líquida soportada (SLM)

En el presente sistema de membrana líquida, la resistencia a la transferencia másica es la suma de la resistencia en y entre las fases e interfaces involucradas: fase de carga, membrana líquida (SLM) y fase aceptora. La velocidad del transporte para compuestos con altos valores de K_D es controlada por la transferencia de masas en la fase de carga (barrera de difusión hasta la interfase con la membrana), mientras que para los compuestos con bajos valores de K_D el transporte va a depender de la transferencia de masas en la fase membrana, SLM [Kou y col., 2004]. En el presente trabajo, los ácidos carboxílicos pertenecen al segundo grupo de compuestos. Por esta razón, el disolvente orgánico es uno de los componentes a seleccionar para lograr un transporte adecuado en la SLM. Algunos alcanos, alcoholes alifáticos, éteres alifáticos e hidrocarburos aromáticos han sido comúnmente empleados como disolventes orgánicos para la creación de la SLM en la LPME aplicada al análisis de los ácidos carboxílicos [Schlosser y col., 2005].

V. Microextracción en fase líquida mediante membranas líquidas para la determinación de ácidos carboxílicos como metabolitos de BTEX en dientes humanos

Resultados y Discusión

En relación al paso de impregnación de la fibra hueca para la formación de la SLM, algunos estudios incluyen la inmersión de la fibra hueca en el disolvente orgánico por 5-10 s [Kou y col., 2004; Trtic-Petrovic y col., 2005; Berhanu y col., 2006; Liu y col., 2005, 2006; Yamini y col., 2006; Zhao y col., 2007] o el llenado desde el lumen con el disolvente orgánico [Charalabaki y col., 2005; Fontanals y col., 2006]. En el presente estudio se adoptó el procedimiento de impregnación donde el disolvente orgánico se inyecta en el lumen del capilar de fibra hueca debido a que la simple inmersión de la fibra en el disolvente por unos segundos no resultó ser suficiente para la obtención de una adecuada SLM, obteniéndose valores de EF muy bajos. Investigaciones recientes [Bardstu y col., 2007] permitieron conocer que la impregnación por llenado de la fibra provee de mejor repetitividad en los resultados. Además, para evitar la pérdida del disolvente orgánico impregnado en los poros de la fibra hueca hacia la disolución de carga y aceptora, se recomienda eliminar el exceso de disolvente orgánico de las paredes internas y externas de la fibra mediante la inyección lenta de agua a través del lumen y por ultrasonido en baño de agua, respectivamente [Bardstu y col., 2007].

Según se observa en la **Tabla 5.1**, de los diferentes modos de impregnación de la fibra hueca con el disolvente orgánico para la formación de la SLM, la inmersión simple de la fibra previamente llenada con la fase aceptora no garantizó unos adecuados valores de EF y la extracción del MHA. Un tiempo mayor de 5 min en baño de ultrasonidos durante la impregnación del disolvente orgánico en los poros de la fibra tampoco fue adecuado para una correcta formación de la SLM, quizás por el deterioro del material de polipropileno durante un tiempo prolongado de ultrasonido. En nuestro estudio, se pudo establecer como paso de impregnación la inmersión durante 5 min de ultrasonidos en disolvente orgánico de la fibra previamente llenada con el mismo disolvente orgánico para garantizar el llenado repetitivo de los poros, así como una posterior limpieza del exceso de disolvente orgánico mediante la inyección lenta de 200 μL de agua a través de la fibra para eliminar el exceso en las paredes internas y, antes de ser usada, una inmersión en agua y agitación durante 1 min para eliminar el exceso de las paredes externas. De esta manera se garantizó una adecuada formación de la SLM reflejado en un mejoramiento de los valores del EF para todos los analitos (**Tabla 5.1**). En este caso, los experimentos se realizaron con dihexiléter como fase orgánica, 20 mL de disolución a 1 $\mu\text{g/mL}$ de los analitos como fase de carga a pH 2 y 15 cm de fibra hueca (40 μL) con NaOH 1 M a pH 12.

Tabla 5.1. Estudio de formación de la SLM con dihexiléter para la LPME durante 5 h.

Compuesto	Inmersión simple	Ultrasonidos (5 min)	Ultrasonidos (10 min)
Ácido mandélico	0,08 \pm 0,04	136 \pm 14	32 \pm 8
Ácido hipúrico	0,042 \pm 0,002	16 \pm 1	4 \pm 1
Ácido 4-metilhipúrico	-	35 \pm 2	12 \pm 4

V. Microextracción en fase líquida mediante membranas líquidas para la determinación de ácidos carboxílicos como metabolitos de BTEX en dientes humanos

Resultados y Discusión

El efecto de tres tipos de SLM fue estudiado a partir de los resultados en el paso de impregnación anteriormente mejorado y el uso de los disolventes *n*-dodecano, dihexiléter y *n*-decanol. Después de 4 h de LPME, se determinaron los ácidos carboxílicos en las tres fases líquidas: de carga, orgánica y aceptora, mediante HPLC. Ninguno de los analitos se detectó en las fases orgánicas *n*-dodecano y dihexiléter, significando que la transferencia másica de la interface orgánica-aceptora fue mayor que la correspondiente a la interface de carga y orgánica. Sin embargo, con la excepción del MA y el dihexiléter, estos dos disolventes orgánicos no resultaron adecuados como SLM para el análisis de estos ácidos carboxílicos por LPME con el uso de estas fibras (**Figura 5.2**).

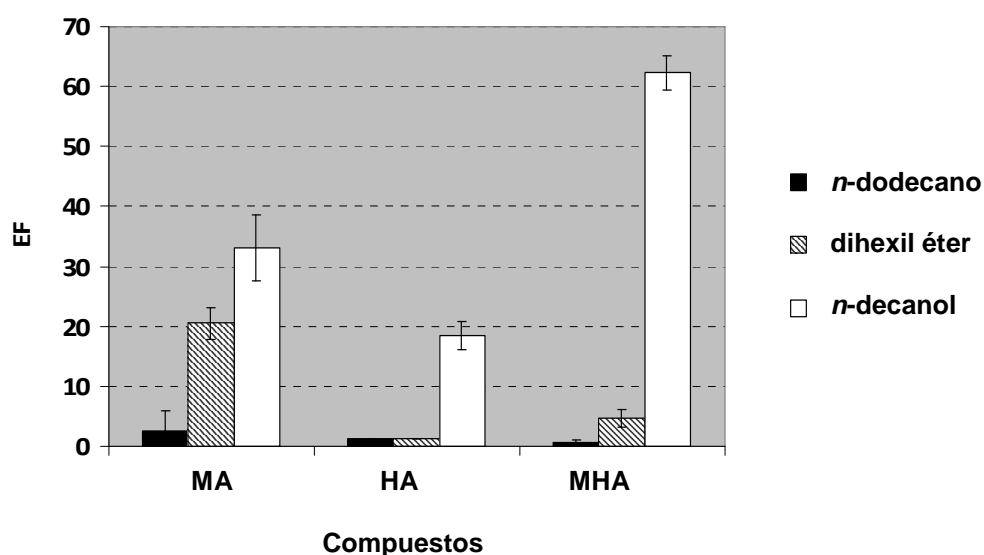


Figura 5.2. Efecto del tipo de membrana líquida soportada (SLM) en el factor de enriquecimiento (EF) para el ácido mandélico (MA), ácido hipúrico (HA) y 4-metil hipúrico (MHA). Condiciones: concentración para cada analito 100 µg/L en 20 mL de fase de carga a pH2, 500 mM NaCl, velocidad de agitación de 400 rpm, 40 µL de NaOH 1M (pH12) como fase aceptora y tiempo de transporte de 3 h.

Los mejores valores se obtuvieron para el *n*-decanol, debido a su mayor capacidad de transferencia másica para estos compuestos polares. Este disolvente fue adecuado para la LPME con pérdidas de los analitos en la SLM de 31, 10 y 9%, respecto al total extraído en la fase aceptora, de MA, HA y MHA, respectivamente. Estos resultados demostraron además, una menor transferencia de masas entre la SLM y la fase aceptora que entre la fase de carga y la SLM para el MA respecto a los ácidos hipúricos. Debido a la mayor velocidad de transporte de los analitos con el *n*-decanol como SLM, este disolvente orgánico se seleccionó como fase orgánica para los siguientes experimentos.

V.5.1.3. Gradiente de pH en transporte no facilitado

La fuerza de transporte más comúnmente empleada para compuestos con características ácidas es el gradiente de pH entre la fase de carga y aceptora [Jung y col., 2002; Kou y col., 2004; Berhanu y col., 2006; Zhao y col., 2007]. El rango de valores de pKa de los ácidos carboxílicos en estudio oscila entre 3,62 y 3,85. Para la transporte de ácidos débiles como estos, el pH de la disolución de carga debe ser al menos dos unidades de pH menor que el pKa del ácido para asegurar que la fracción de analitos en su forma no disociada en la fase de carga sea del 99 %, y que el pH de la fase aceptora sea 3,3 unidades mayor que el mayor valor de pKa de la mezcla para garantizar así que la fracción de analitos en forma no disociada sea menor que el 0,05 % [Jonsson y col., 1993].

En este estudio, para el gradiente de pH en la LPME, el valor de pH de la fase de carga se ajustó a un valor de 2 y para atrapar los analitos en forma cargada en la fase aceptora que se encuentra en el lumen del capilar de fibra hueca, el pH de esta se ajustó aproximadamente a un valor de 12. Este rango suficientemente amplio de valores de pH permitió que casi todos los analitos estuvieran completamente protonados y entonces migraran a través de la SLM y fueran luego fácilmente re-extraídos por la fase aceptora. De esta manera, otros compuestos neutros y básicos no podrían ser extraídos bajo estas condiciones, mejorando la selectividad del sistema de extracción y pre-concentración. Así, el método de LPME regido por un gradiente de pH provee de altos valores de EF y selectividad para compuestos ácidos [Jung y col., 2002; Berhanu y col., 2006; Zhao y col., 2007].

Después de la selección del *n*-decanol como disolvente orgánico para la preparación de la SLM, la adición de un tensoactivo (en este caso se usó el sorbitan trioleato SPAN 85) fue estudiado para conocer su aplicación en LPME con vistas a disminuir la tensión superficial en las interfases que se generan entre la SLM y ambas fases acuosas (de carga y aceptora). La **Figura 5.3** ilustra los efectos de la concentración (porcentaje en peso) de tensoactivo en la SLM durante la LPME de los ácidos carboxílicos. Los valores de EF para todos los analitos no aumentó con el uso de este tensoactivo y, con la excepción del MHA, el transporte fue menor con la adición del SPAN 85.

En las extracciones líquido-líquido (LLE), este tipo de tensoactivo a permitido un mejoramiento de la extracción [Mortaheb y col., 2008], y es conocido que la concentración de tensoactivos disminuyen la tensión superficial de las interfases líquidas y permiten una mayor área de contacto entre las fases. Pero, por otro lado, a mayor tensoactivo añadido, la película de la interfase se incrementa causando altas resistencias durante la transferencia de masas [Mortaheb y col., 2008]. En el presente sistema de membrana líquida, el uso del SPAN 85 en la SLM no tiene un efecto positivo para el transporte de los ácidos carboxílicos, probablemente debido al predominio de un aumento de la resistencia a la transferencia másica en ambas interfases: fase de carga-SLM y SLM-aceptora.

V. Microextracción en fase líquida mediante membranas líquidas para la determinación de ácidos carboxílicos como metabolitos de BTEX en dientes humanos

Resultados y Discusión

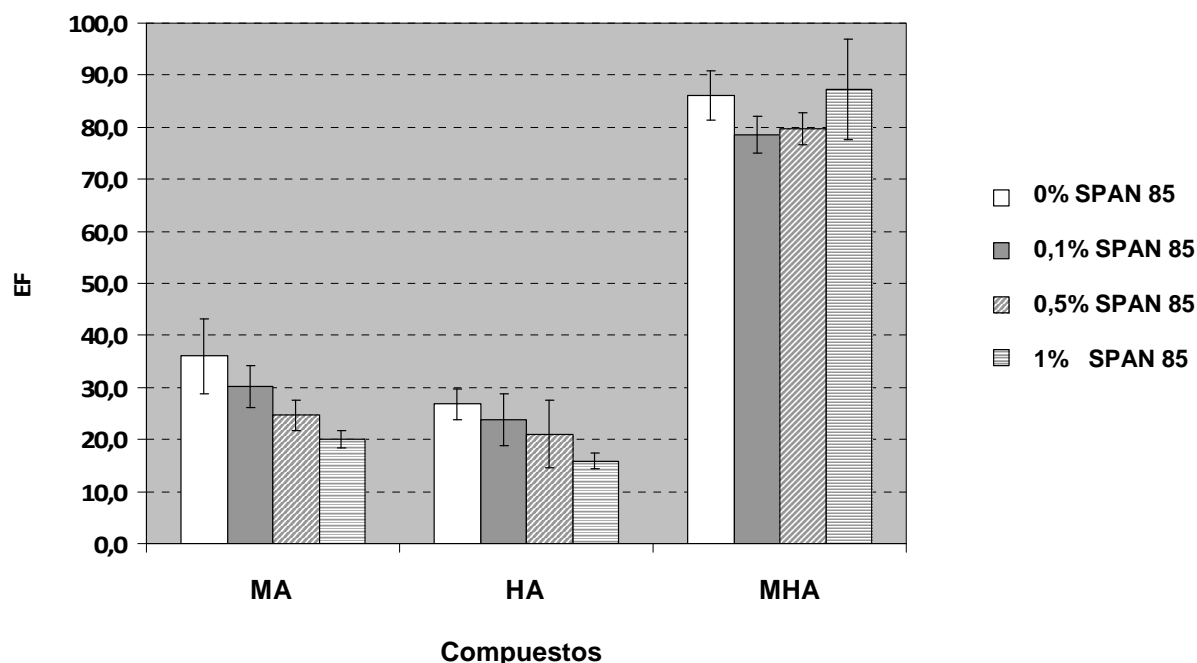


Figura 5.3. Efecto de la concentración del tensoactivo SPAN 85 en el factor de enriquecimiento para el MA, HA y MHA. Condiciones: concentración de 100 $\mu\text{g/L}$ en 20 mL de fase de carga a pH2, 500 mM NaCl, velocidad de agitación 500 rpm, 40 μL de NaOH 1M (pH12) como fase aceptora y tiempo de transporte de 3 h.

V.5.1.4. Gradiente de pH en transporte facilitado

Es conocido que en la LLE de ácidos carboxílicos como el ácido acético y el ácido fórmico, la K_D de estos compuestos cuando se extraen con alquilaminas es mayor comparado con disolventes de fosforilo y otros disolventes convencionales [Wardell y King, 1978]. Esto es demostrado por la fuerte basicidad de Lewis de las aminas durante la formación de complejos de solvatación que incluyen pares iónicos o formación de puentes de hidrógeno entre el ácido y la amina terciaria en la fase orgánica [Tamada y col., 1990a, 1990b]. En el caso de extractantes de tipo alquifosforilo y alcofosforilo (TOPO y TBP, respectivamente), del sustituyente alquilo al alcoxi se incrementa la basicidad de Lewis del oxígeno del grupo fosforilo P-O, y aumenta la K_D de los ácidos carboxílicos extraídos (**Figura 5.4**).

V. Microextracción en fase líquida mediante membranas líquidas para la determinación de ácidos carboxílicos como metabolitos de BTEX en dientes humanos

Resultados y Discusión

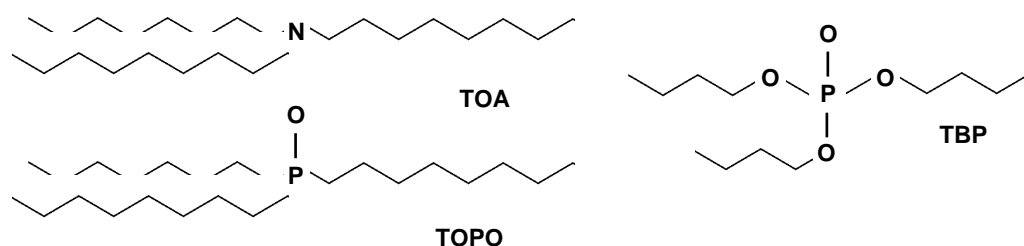


Figura 5.4. Estructuras de los extractantes trioctilamina (TOA), óxido de trioctilfosfina (TOPO) y tributilfosfato (TBP).

Para este tipo de extractantes, la K_D de los ácidos aumenta en el orden fosfato < fosfonato < óxido de fosfina, donde la capacidad donante de electrones del oxígeno del grupo fosforilo aumenta. En los estudios realizados por Wardell y King [1978], se puede extraer que los valores relativos de K_D obtenidos en la extracción del ácido acético cuando la mezcla de disolventes contiene un 25 % del extractante, son de 22 para TOA, 10 para TOPO, por 1 de TBP, demostrando una capacidad extractiva en el orden TOA > TOPO > TBP.

Algunos estudios donde se emplean SLM para la extracción de compuestos ácidos tales como compuestos fenólicos [Jung y col., 2002], ácidos haloacéticos [Kou y col., 2004] y ácidos grasos de cadena corta [Zhao y col., 2007] indicaron que el uso de transportadores como los extractantes en proporción de 5-20 % en la SLM incrementan la velocidad de transporte. En nuestra investigación, estudiamos concentraciones de 10 y 20 % de los extractantes trioctilamina (TOA), óxido de trioctilfosfina (TOPO) y tributilfosfato (TBP) en *n*-decanol como diluyente, en el transporte facilitado por gradiente de pH para 3 h de LPME de los ácidos carboxílicos (**Figura 5.5**). En este caso, los resultados mostraron un comportamiento inverso a lo anteriormente expuesto para estos extractantes, donde el orden de extracción fue TBP > TOPO > TOA.

En el presente sistema de membrana líquida, los ácidos carboxílicos necesitan traspasar dos interfases desde la fase de carga hacia la SLM que contiene los extractantes y luego una re-extracción desde la SLM hacia la fase aceptora en el lumen del capilar de fibra hueca. Como se explicó anteriormente, durante la primera transferencia de masas, se espera el siguiente orden de extracción: TOA > TOPO > TBP [Wardell y King, 1978], pero debido a la estabilización y/o solubilidad de los complejos de solvatación formados en *n*-decanol como diluyente polar que promueve además la formación de enlaces por puente de hidrógeno [Qin y col., 2001; Li y col., 2002; Mei y col., 2002; Matsumoto y col., 2003; Yankov y col., 2004], la segunda transferencia másica en la interface orgánica-aceptora podría estar controlada por la estabilidad de los complejos de solvatación ácido-extractante en el orden TOA > TOPO > TBP, lo que implica en definitiva una re-extracción en el orden TBP > TOPO > TOA. En esta re-extracción los iones OH^- de la fase aceptora (NaOH 1 M) rompen el enlace de hidrógeno y permiten el paso de los ácidos desprotonados hacia la fase aceptora. Por esta

V. Microextracción en fase líquida mediante membranas líquidas para la determinación de ácidos carboxílicos como metabolitos de BTEX en dientes humanos

Resultados y Discusión

razón se obtiene un mejor transporte con TBP, ya que al formar el complejo solvatado menos estable de los tres, también implica la mayor facilidad para el proceso de re-extracción indicado (**Figura 5.5**).

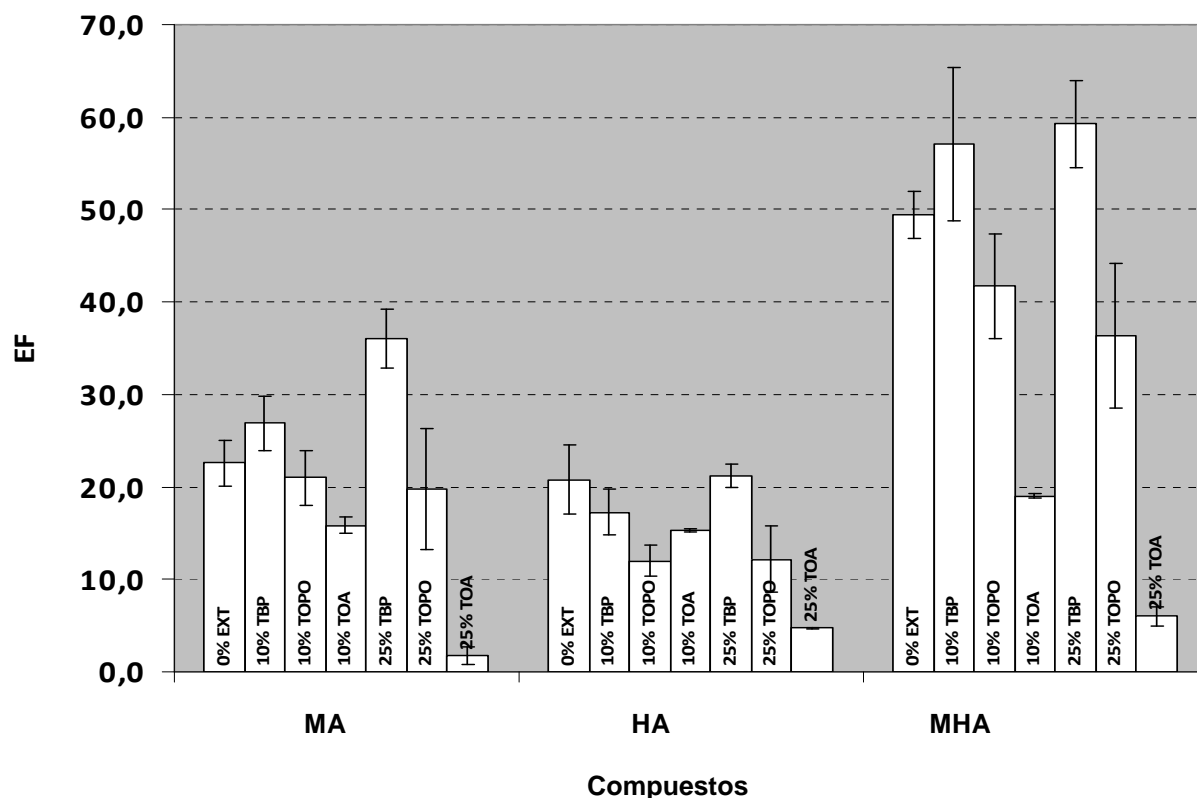


Figura 5.5. Efecto de los extractantes: tributilfosfato (TBP), óxido de trioctilfosfina (TOPO) y trioctilamina (TOA) en *n*-decanol sobre el EF para el MA, HA y MHA. Condiciones: concentración de 100 µg/L en 20 mL de fase de carga a pH2, 500 mM NaCl, velocidad de agitación 500 rpm y 40 µL de NaOH 1M (pH12) como fase aceptora y tiempo de transporte de 3 h.

Estos resultados pueden ser confirmados a través de la determinación de la cantidad de analito que permanece en el interior de la SLM después de la LPME (determinada por diferencia entre el total y la suma de las cantidades finales en fase de carga y fase aceptora). Como se ilustra en la **Tabla 5.2**, el porcentaje del total de analitos extraídos que queda retenido en la SLM después de la LPME sigue el mismo orden de estabilidad de los complejos de solvatación que se forman durante la transferencia de masas en la SLM: TOA > TOPO > TBP (95,1-97,9; 15,4-19,3 y 5,5-10 %, respectivamente). Por esta razón, la mejor extracción se obtiene con 25 % de TBP en *n*-decanol.

V. Microextracción en fase líquida mediante membranas líquidas para la determinación de ácidos carboxílicos como metabolitos de BTEX en dientes humanos

Resultados y Discusión

Table 5.2. Porcentaje remanente en la SLM respecto al total extraído en 3 h de LPME

Compuesto	0 %	25 % TBP	25 % TOPO	25 % TOA
Ácido mandélico	12,2 ± 2,9	10,0 ± 5,4	15,4 ± 0,7	95,1 ± 1,6
Ácido hipúrico	10,3 ± 4,7	10,5 ± 2,9	19,3 ± 0,4	94,5 ± 0,5
Ácido 4-metilhipúrico	16,1 ± 1,3	5,5 ± 0,1	17,4 ± 1,8	97,9 ± 0,1

En algunos casos, el transporte de ácidos carboxílicos con el uso de extractantes puede ser menor respecto al sistema sin transportador [Wodzki y Nowaczyk, 2002]. La **Figura 5.5** ilustra este resultado con valores bajos de EF para el transporte con TOA y TOPO comparada con la SLM sin transportador, en este caso, debido a la ya explicada estabilización del complejo correspondiente en fase orgánica (SLM). Los mejores EF se obtuvieron para TBP, pero fueron similares respecto al sistema sin extractante. En este sistema de membrana líquida con transportadores, los compuestos son extraídos por ambos tipos de transportes en régimen de gradiente de pH: facilitado y no facilitado [Wodzki y Nowaczyk, 2002], y en nuestro caso, el transporte de los ácidos carboxílicos no fue significativamente facilitada por la presencia de los extractantes. También se podría señalar que la co-extracción de componentes polares de la matriz en estudio durante el análisis de muestras reales puede verse incrementada con el uso de extractantes, significando una menor selectividad del sistema [Jung y col., 2002; Kou y col., 2004].

V.5.1.5. Gradiente aniónico en transporte facilitado

En el presente experimento se estudió la LPME de los ácidos carboxílicos usando una SLM que contiene la amina cuaternaria: cloruro de metiltrioctilamonio (Aliquat 336) como transportador catiónico. Este transportador ha sido usado para el transporte mediante membranas líquidas de compuestos anfipróticos y ácidos a partir de disoluciones de carga básicas y disolución aceptora neutra que contiene una alta concentración de iones Cl^- [Jonsson y Mathiasson, 1999a, 1999b; Schlosser y col., 2005; Yamini y col., 2006]. La fuerza impulsora del transporte de los analitos consiste en el gradiente de concentración de iones Cl^- que se establece entre la fase de carga y la aceptora, donde la transferencia de masas se lleva a cabo a través de un exceso de concentración de iones Cl^- en la fase aceptora (NaCl 2 M a pH6) comparada con la fase de carga (NaOH 0,01 a pH11). Debido al gradiente de concentración de aniones, el par iónico formado entre la base conjugada del ácido y el transportador difunde a través de la SLM y luego dicha base conjugada se intercambia con los iones Cl^- durante la re-extracción por parte de la fase aceptora [Yamini y col., 2006].

V. Microextracción en fase líquida mediante membranas líquidas para la determinación de ácidos carboxílicos como metabolitos de BTEX en dientes humanos

Resultados y Discusión

La **Figura 5.6** muestra una comparación entre la LPME por 3 h de los ácidos carboxílicos en los tres regimenes diferentes: gradiente de pH en transporte no facilitado, gradiente de pH en transporte facilitado y gradiente aniónico con Aliquat 336, usando *n*-decanol como diluyente. Para los ácidos mandélico e hipúrico, la presencia de la Aliquat 336 en la SLM incrementa los valores del EF en 2-3 veces. Por otro lado, el MHA se extrajo menos usando este transportador catiónico, quizás debido a la formación de pares iónicos con el transportador muy hidrófobos y estables en la fase membrana debido a la presencia, en el MHA, del metilo en la estructura del grupo fenilo. Este hecho disminuye la capacidad de transferencia del MHA hacia la fase aceptora durante la re-extracción.

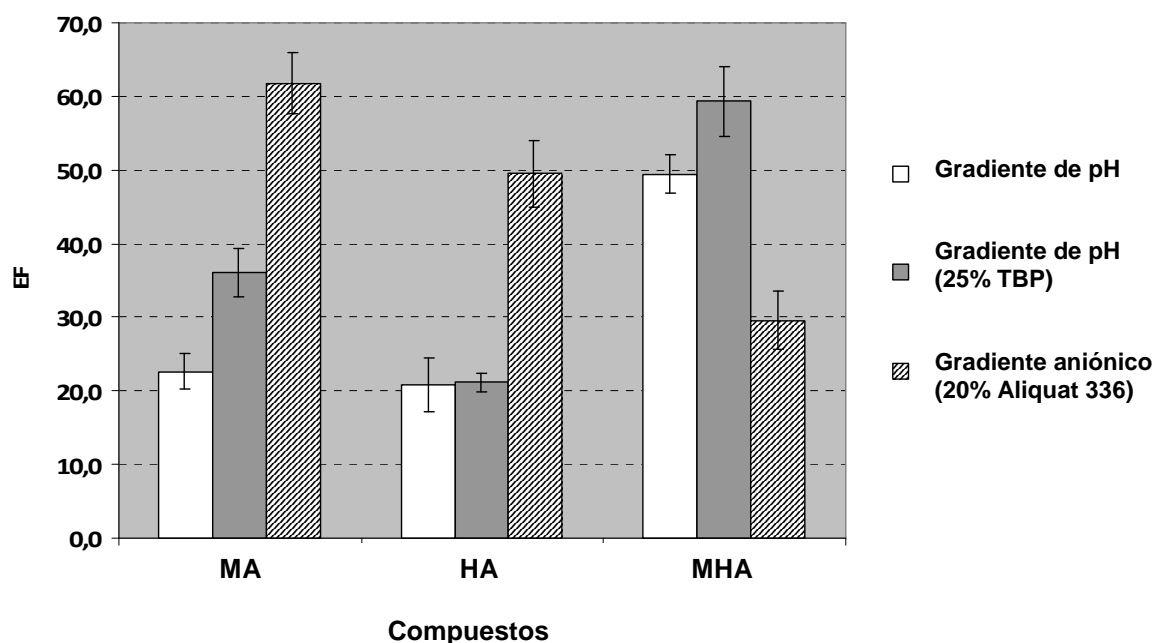


Figura 5.6. Efecto del tipo de transporte en el EF para el MA, HA y MHA. Condiciones generales: concentración de 100 µg/L en 20 mL de fase de carga, 500 mM NaCl, velocidad de agitación 500 rpm, 40 µL de fase aceptora, y tiempo de transporte de 3h. Gradiente de pH: *n*-decanol como SLM, fase de carga a pH2, NaOH 1M como fase aceptora a pH11,4. Gradiente de pH (25% TBP): *n*-decanol con 25% TBP como SLM, fase de carga a pH2, NaOH 1M como fase aceptora a pH11,4. Gradiente aniónico: 20% Aliquat 336 en *n*-decanol como SLM, NaOH 0,01M como fase de carga a pH11 y NaCl 2M como fase aceptora a pH6.

La concentración de 0,01 M de NaOH en la disolución de carga se estableció previamente debido a que los valores de EF para los ácidos carboxílicos fueron muy bajos cuando la concentración de NaOH en la fase de carga era de 0,5 M. El mejoramiento de los EF fue de 10 a 20 veces y este fenómeno ha sido observado en estudios recientes en LPME [Yamini y col., 2006] con la aparición de turbidez en la disolución de carga debido a la transferencia hacia esta fase de una cantidad de transportador en forma de par iónico con el OH⁻. Adicionalmente, la presencia de una alta

V. Microextracción en fase líquida mediante membranas líquidas para la determinación de ácidos carboxílicos como metabolitos de BTEX en dientes humanos

Resultados y Discusión

concentración de iones OH^- en la disolución de carga compite con las formas disociadas de los ácidos en el transporte de estos, provocando una disminución de la extracción de los analitos y por lo tanto una disminución del transporte de éstos.

V.5.1.6. Tiempo de transporte

El presente estudio de LPME con el uso de diferentes SLM bajo regímenes de transporte facilitado y no facilitado para el análisis de ácidos carboxílicos demostraron que, en general, los valores de EF en presencia de algunos transportadores no se vieron incrementados.

El tiempo de transporte es un factor crítico en sistemas de LPME en tres fases con dos interfaces líquidas donde los analitos necesitan un tiempo para difundir a través de cada fase hasta llegar a la aceptora. Se seleccionaron los sistemas para cada tipo de transporte que mostraron mejores valores de EF en los estudios anteriores: *n*-decanol, *n*-decanol (25% TBP) y *n*-decanol (20% Aliquat 336) para realizar el estudio de la influencia del tiempo de transporte. En la **Figura 5.7** se ilustran los resultados obtenidos.

Para el sistema con transporte no facilitado (**Figura 5.7A**) el EF de los analitos se incrementa con un mayor tiempo de transporte hasta alcanzar un valor máximo a las 20 h. El tiempo de transporte resultó ser relativamente largo, pero es posible preparar un número grande de muestras en paralelo y después del transporte realizar el análisis un segundo día. Por otro lado, para el caso de los sistemas que emplean un transporte facilitado (**Figura 5.7A** y **5.7B**) los procesos de extracción y re-extracción no se ven tan favorecidos con el tiempo, obteniéndose rampas menos pronunciadas, y solo en el caso del sistema que emplea 25% TBP (**Figura 5.7B**) no se alcanza el equilibrio a las 20 h de transporte. La menor velocidad de transporte obtenida para estos dos sistemas facilitados puede ser explicada a través de una interacción relativamente mayor de los analitos con los componentes de la membrana, fenómeno que se discutió con anterioridad tanto para gradiente de pH como gradiente aniónico.

A la vista de los resultados y para el estudio de la influencia de algunos parámetros experimentales (velocidad de agitación, salinidad y tipo de disolución aceptora), se seleccionó como SLM el disolvente *n*-decanol dado su superioridad en el transporte a largo tiempo bajo la fuerza impulsora del gradiente de pH. El estudio se realizó durante un periodo de 3 horas, considerado suficiente para evaluar la influencia de los parámetros indicados.

V. Microextracción en fase líquida mediante membranas líquidas para la determinación de ácidos carboxílicos como metabolitos de BTEX en dientes humanos

Resultados y Discusión

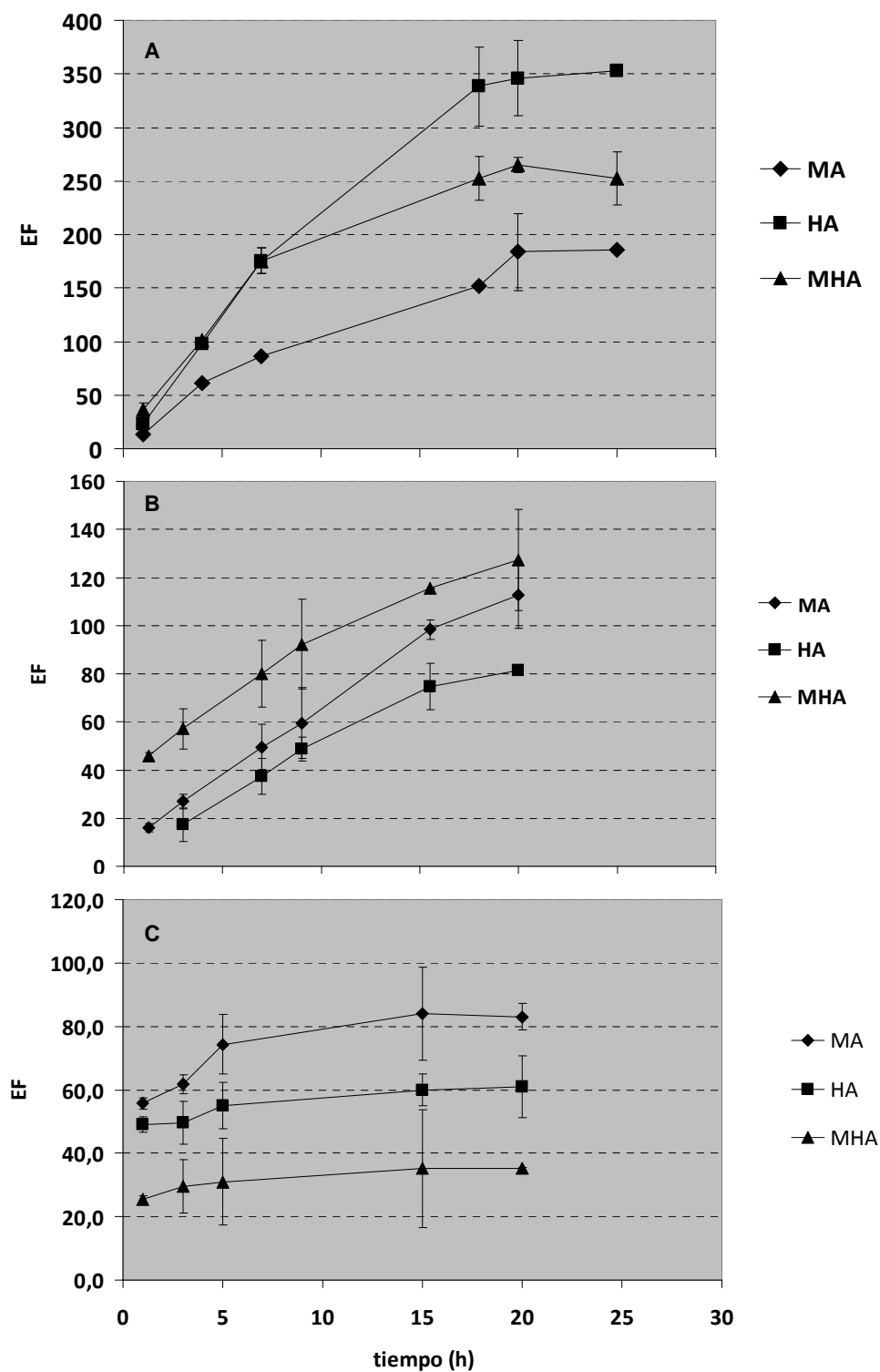


Figura 5.7. Efecto del tiempo de transporte en el EF para el MA, HA y MHA mediante tres tipos de transporte: no facilitado (A), facilitado con 25% TBP (B) y facilitado con 20% Aliquat 336 (C). Condiciones: concentración de 100 $\mu\text{g/L}$ en 20 mL de fase de carga a pH2, 500 mM NaCl, 500 rpm y 40 μL de NaOH 1M como fase aceptora a

V.5.1.7. Velocidad de agitación

Como el proceso de LPME es dinámico, el sistema está sujeto a varios efectos. El paso de agitación de la muestra es uno de los procesos dinámicos que permite la obtención de mayores valores de EF [Charalabaki y col., 2005; Berhanu y col., 2006; Fontanals y col., 2006, Yamini y col., 2006]. Debido a que una mayor velocidad de agitación provoca la disminución de la interfase de difusión entre la fase acuosa y la superficie de la SLM cuando el régimen de agitación se establece, la transferencia de masa y los EF aumentan. En nuestro caso, la agitación magnética fue seleccionada ya que sería la forma más segura de evitar la formación de burbujas y disturbios en la SLM durante la interacción de las muestras de dientes con la fibra hueca.

La **Figura 5.8** ilustra los valores de EF obtenidos para los ácidos carboxílicos en la LPME con velocidad de agitación entre 0 y 500 rpm. Esto permitió un aumento de la eficiencia de extracción (EE) debido al incremento del coeficiente de transferencia másica en la fase de carga. Cuando la velocidad de agitación aumenta en el rango estudiado, los EF se ven incrementados en un pequeño rango de valores para los tres analitos. Además, a medida que se aumenta la agitación de la muestra, desde el régimen estático hasta la mayor velocidad, los resultados son más homogéneos, significando mayor precisión en los valores de desviación estándar. Una velocidad de agitación de 500 rpm fue seleccionada para realizar los siguientes experimentos.

V.5.1.8. Salinidad

La LPME de ácidos débiles puede estar afectada por la adición de sales [Kou y col., 2004; Berhanu y col., 2006] debido al incremento de la fuerza iónica de la disolución de carga acuosa con la consiguiente disminución de la solubilidad de los compuestos orgánicos en su forma no disociada y el aumento de los valores de K_D . El efecto de la salinidad se estudió por adición de NaCl para obtener unos valores de concentración añadida de 0, 50, 150, 300 y 500 mM en la disolución de carga, usando los valores estudiados del tiempo de transporte y velocidad de agitación (**Figura 5.9**). Se encontró que el incremento en la concentración de sal resultó en un aumento de los EF en aproximadamente dos veces respecto a la no adición. La presencia de una concentración añadida de 500 mM de NaCl se utilizó en los próximos experimentos.

V. Microextracción en fase líquida mediante membranas líquidas para la determinación de ácidos carboxílicos como metabolitos de BTEX en dientes humanos

Resultados y Discusión

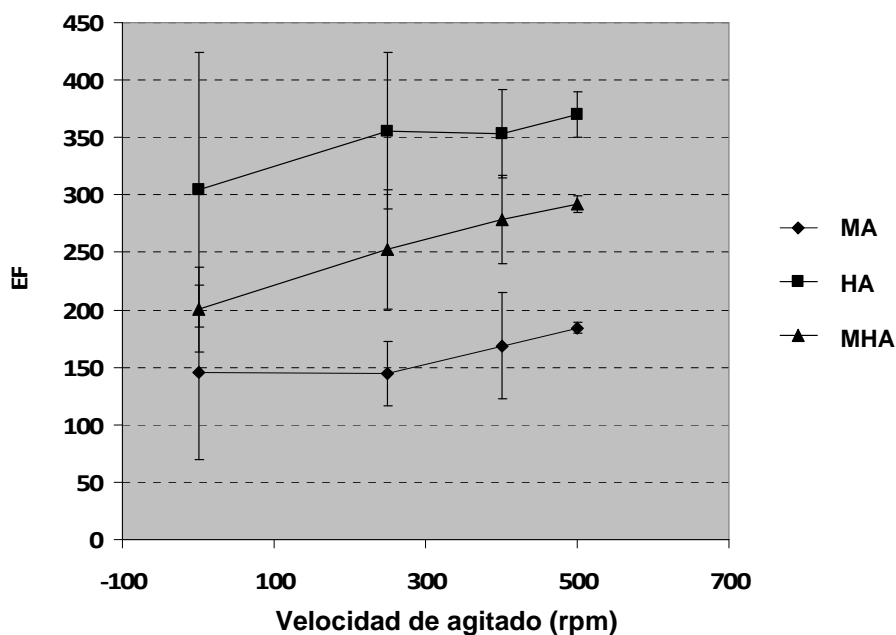


Figura 5.8. Efecto de la velocidad de agitación en el EF para MA, HA y MHA. Condiciones: concentración de 100 $\mu\text{g/L}$ en 20 mL de fase de carga a pH2, 500 mM NaCl, *n*-decanol como SLM, 40 μL de NaOH 1M como fase aceptora a pH11,4 y tiempo de transporte de 20h.

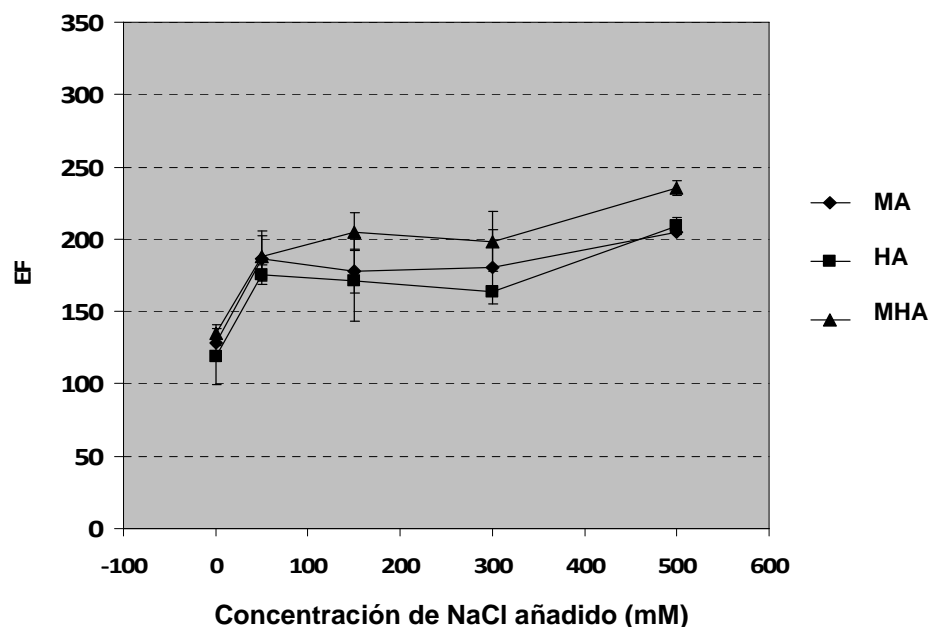


Figura 5.9. Efecto de la salinidad en el EF para el MA, HA y MHA. Condiciones: concentración de 100 $\mu\text{g/L}$ en 20 mL de fase de carga a pH2, velocidad de agitación 500 rpm, *n*-decanol como SLM, 40 μL de NaOH 1M como fase aceptora a pH11,4 y tiempo de transporte de 20h.

V.5.1.9. Disolución aceptora

Debido a que el presente método de LPME se basa en la diferencia de pH entre la fase de carga y aceptora, se estudiaron dos disoluciones "buffers" como fases aceptoras. Así y dado que el contenido de la fase móvil del sistema de HPLC usado para el análisis de las disoluciones aceptoras contiene H_3PO_4 (pH 2,5), se utilizaron dos disoluciones de NaOH y Na_3PO_4 a 1M (pH11-12) como posibles fases aceptoras. En estudios anteriores, una alta concentración de "buffer" fue empleada para incrementar la capacidad de la fase aceptora como receptora de los analitos [Kou y col., 2004].

En la **Figura 5.10** se ilustran los resultados obtenidos para estas dos disoluciones aceptoras, encontrándose una mayor capacidad de la disolución de NaOH 1M como fase aceptora con una mayor repetitividad.

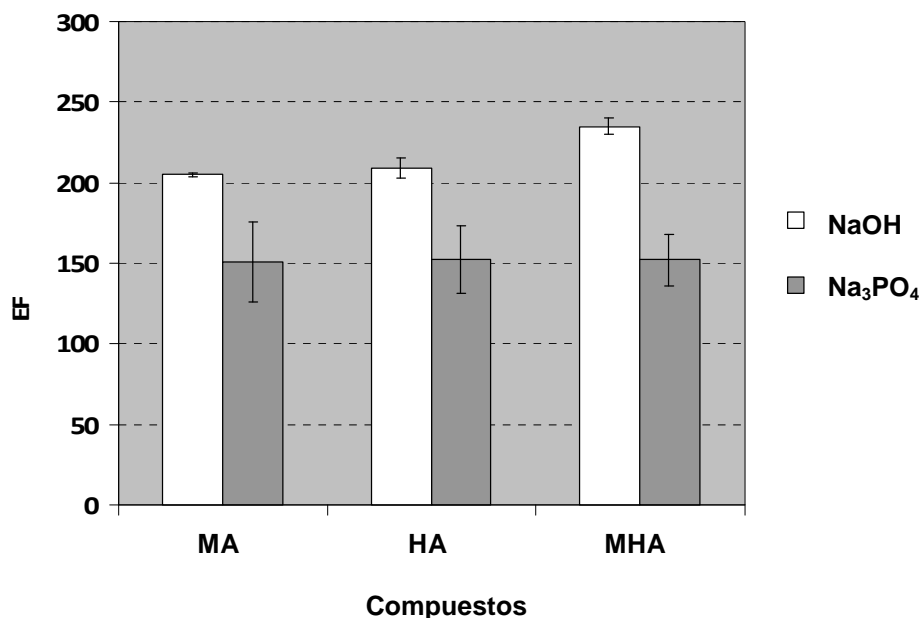


Figura 5.10. Efecto del tipo de buffer como fase aceptora en el EF para la LPME del MA, HA y MHA. Condiciones: concentración de 100 μ g/L en 20 mL de fase donora a pH2, velocidad de agitación 500 rpm, 500 mM NaCl, *n*-decanol como SLM y tiempo de transporte de 20h.

En cuanto al análisis de estas disoluciones aceptoras mediante HPLC, no se observaron grandes diferencias cualitativas en las formas de los picos ni su posición en el cromatograma. No obstante, la adición de unas gotas de HCl para el ajuste del pH a un valor de 2 de la disolución aceptora antes del análisis por HPLC, es un paso importante para evitar la formación de picos múltiples durante la separación cromatográfica debido a que el pH de la fase móvil es de 2,5. Este factor de dilución,

V. Microextracción en fase líquida mediante membranas líquidas para la determinación de ácidos carboxílicos como metabolitos de BTEX en dientes humanos

Resultados y Discusión

necesario para el análisis cuantitativo del método LPME-HPLC, fue tenido en cuenta para todos los experimentos. La disolución de NaOH 1M fue seleccionada como fase aceptora al obtenerse mayores valores de EF para los ácidos carboxílicos.

V.5.2. Resultados en la validación del método LPME-HPLC

Algunos parámetros de validación del presente método de LPME-HPLC para el análisis de ácidos carboxílicos se determinaron con un tiempo de transporte de 20 h a partir de disoluciones de carga dopadas que contenían 500 mM de NaCl añadido, el uso de agitación a 500 rpm y un rango de concentraciones para todos los analitos de 0,1 a 250 $\mu\text{g/L}$, significando 0,002-5 μg en 20 mL de muestra o fase de carga. Se utilizó el disolvente orgánico *n*-decanol y 40 μL de una disolución de NaOH 1M como fase aceptora. Las curvas de calibrado del método mostraron adecuados valores de linealidad para todos los analitos en este amplio rango de concentraciones con coeficientes de correlación (r^2) desde 0,991 a 0,999 (Figura 5.11).

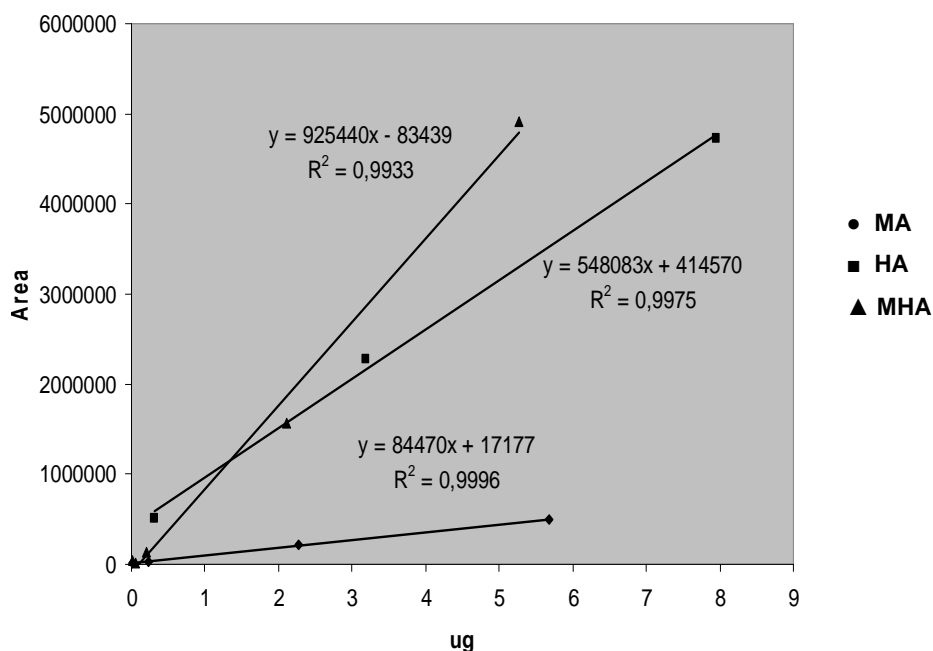


Figura 5.11. Curvas de calibrado obtenidas para el análisis de los ácidos carboxílicos MA, HA y MHA mediante el método de LPME-HPLC.

V. Microextracción en fase líquida mediante membranas líquidas para la determinación de ácidos carboxílicos como metabolitos de BTEX en dientes humanos

Resultados y Discusión

Los límites de detección (LOD) para cada analito fueron obtenidos como el contenido en ng que ofrece una señal analítica (área del pico cromatográfico) tres veces la señal ruido del sistema. Según los resultados mostrados en la **Tabla 5.3**, los valores de LOD fueron adecuados para identificar niveles traza de estos compuestos, en el orden de menos de 2 ng (0,1 µg/L en la muestra). La repetitividad del método se estableció teniendo en cuenta la precisión intra-día y se expresó como desviación estándar relativa de tres réplicas de análisis a un nivel de 2 µg (100 µg/L de disolución de carga dopada), la cual mostró valores entre 7 y 10,1 %, adecuados para este tipo de método. Además, se estableció la reproducibilidad del método mediante la precisión inter-día a través de la extracción por triplicado de muestras dopadas a un nivel de 2 ng (100 µg/L de disolución de carga dopada), teniendo en cuenta un período de tres días. La reproducibilidad expresada como desviación estándar relativa se encontró en el rango de 5,3 y 6,9 %. El método mostró una buena repetitividad y reproducibilidad a bajas concentraciones de estos analitos. La eficiencia de extracción (EE), definida como la fracción de analitos extraídos [Kou y col., 2004] bajo las condiciones mejoradas de LPME, se encontró en el rango de 13-157 % para todos los analitos y todo el rango de concentración estudiado (**Tabla 5.3**).

Table 5.3. Resultados en la validación del método de LPME-HPLC para los ácidos carboxílicos^a

Compuesto	Rango lineal (µg)	Coefficiente de regresión (r^2)	LOD ^b (ng)	Repetitividad ^c RSD (%)	Reproducibilidad ^d RSD (%)	EE ^e (%)
MA	0,002-5,7	0,999	1,6	7,0	6,9	13-73
HA	0,01-7,9	0,991	0,2	10,1.	8,1	32-157
MHA	0,002-5,3	0,994	0,2	9,5	5,3	41-98

^a Análisis por triplicado.

^b Basado en el método de señal-ruido.

^c Precisión intra-día, calculado mediante tres réplicas de disoluciones dopadas samples a 100 µg/L.

^d Precisión inter-día, evaluado mediante tres réplicas en un período de tres días a partir de disoluciones dopadas a 100 µg/L.

^e Eficiencia de extracción, definida como porcentaje de analitos extraídos para todo el rango de concentración bajo las condiciones establecidas para LPME.

V.5.3. Resultados en la aplicación del método de LPME-HPLC en dientes humanos

La utilidad del presente método de LPME-HPLC se mostró en su aplicación para el análisis de los ácidos carboxílicos MA, HA y MHA como metabolitos de los BTEX en dientes humanos, mediante un análisis inicial de dos muestras dentales (dientes 11 y 13) a través de los tres tipos distintos de transporte estudiados con anterioridad (gradiente de pH en transporte tanto facilitado como no

V. Microextracción en fase líquida mediante membranas líquidas para la determinación de ácidos carboxílicos como metabolitos de BTEX en dientes humanos

Resultados y Discusión

facilitado y gradiente aniónico en transporte facilitado). El experimento se llevó a cabo tomando como disolución de carga 2 mL de la disolución obtenida de la extracción de MA, HA y MHA de estas muestras seleccionadas de dientes humanos después de ser tratadas con NaOH 1M. Los resultados se ilustran en las **Figura 5.12A** y **5.12B**, donde se han solapado los cromatogramas correspondientes a las disoluciones aceptoras obtenidas para cada tipo de transporte. Estos resultados demostraron que el transporte facilitado con el uso del transportador catiónico Aliquat 336, preconcentra muchos compuestos (probablemente aniónicos, obtenidos en el tratamiento con la disolución de NaOH 1M) desde la fase de carga y que están presentes en los dientes, produciendo un fuerte efecto matriz y una menor selectividad para los ácidos carboxílicos de interés, los cuales quedan solapados por la matriz extraída y prácticamente no pueden ser identificados. En este caso, la fase aceptora se tornó fuertemente coloreada de naranja después de la LPME y se conoce que estos compuestos son incoloros en disolución acuosa. Para los otros dos tipos de transporte, se observó un buen efecto de limpieza ("clean-up") y preconcentración característicos del método para los tres ácidos carboxílicos, lo cual permitió mejores resultados de identificación y cuantificación de estas sustancias en las muestras de diente humano en cuestión. En la **Figura 5.12** se detalla la identificación de dos de los ácidos carboxílicos.

Los resultados en el análisis de los ácidos carboxílicos MA, HA y MHA para 8 muestras de dientes humanos por LPME-HPLC se realizó mediante el método anteriormente mejorado que emplea el transporte no facilitado con el uso de gradiente de pH y *n*-decanol como SLM. El contenido de estos ácidos en estas muestras de dientes se detalla en la **Tabla 5.4**, donde se puede observar por primera vez la identificación de MA y HA en este tipo de muestra biológica empleada en esta ocasión como biomarcador de la exposición a BTEX.

Tabla 5.4. Determinación de ácidos carboxílicos como metabolitos de BTEX por LPME-HPLC en dientes humanos como biomarcadores.*

Muestra dental	Peso del diente (g)	Edad (años)	Fumador	Profesión o lugar de trabajo	Contenido (µg/g)		
					MA	HA	MHA
11	1,764	49	no	Camarógrafo (TV)	2,0	0,2	< 1x10 ⁻⁴
12	1,203	27	no	Cocinero	1,3	70,2	< 2x10 ⁻⁴
13	1,005	63	no	Cocinero	2,0	2,0	< 2x10 ⁻⁴
14	1,341	46	si	Industria del plástico	10,6	< 1x10 ⁻⁴	< 1x10 ⁻⁴
15	1,895	63	no	Empleada de hogar	3,4	< 1x10 ⁻⁴	< 1x10 ⁻⁴
16	1,431	48	si	Vendedor de pescado	1,9	< 1x10 ⁻⁴	< 1x10 ⁻⁴
17	2,602	42	no	Encofrador	2,1	< 0,8x10 ⁻⁴	< 0,8x10 ⁻⁴
18	1,196	33	si	Construcción	6,1	< 2x10 ⁻⁴	< 2x10 ⁻⁴

* En los casos donde no se identificaron las sustancias, se mostraron los LOD correspondientes.

V. Microextracción en fase líquida mediante membranas líquidas para la determinación de ácidos carboxílicos como metabolitos de BTEX en dientes humanos

Resultados y Discusión

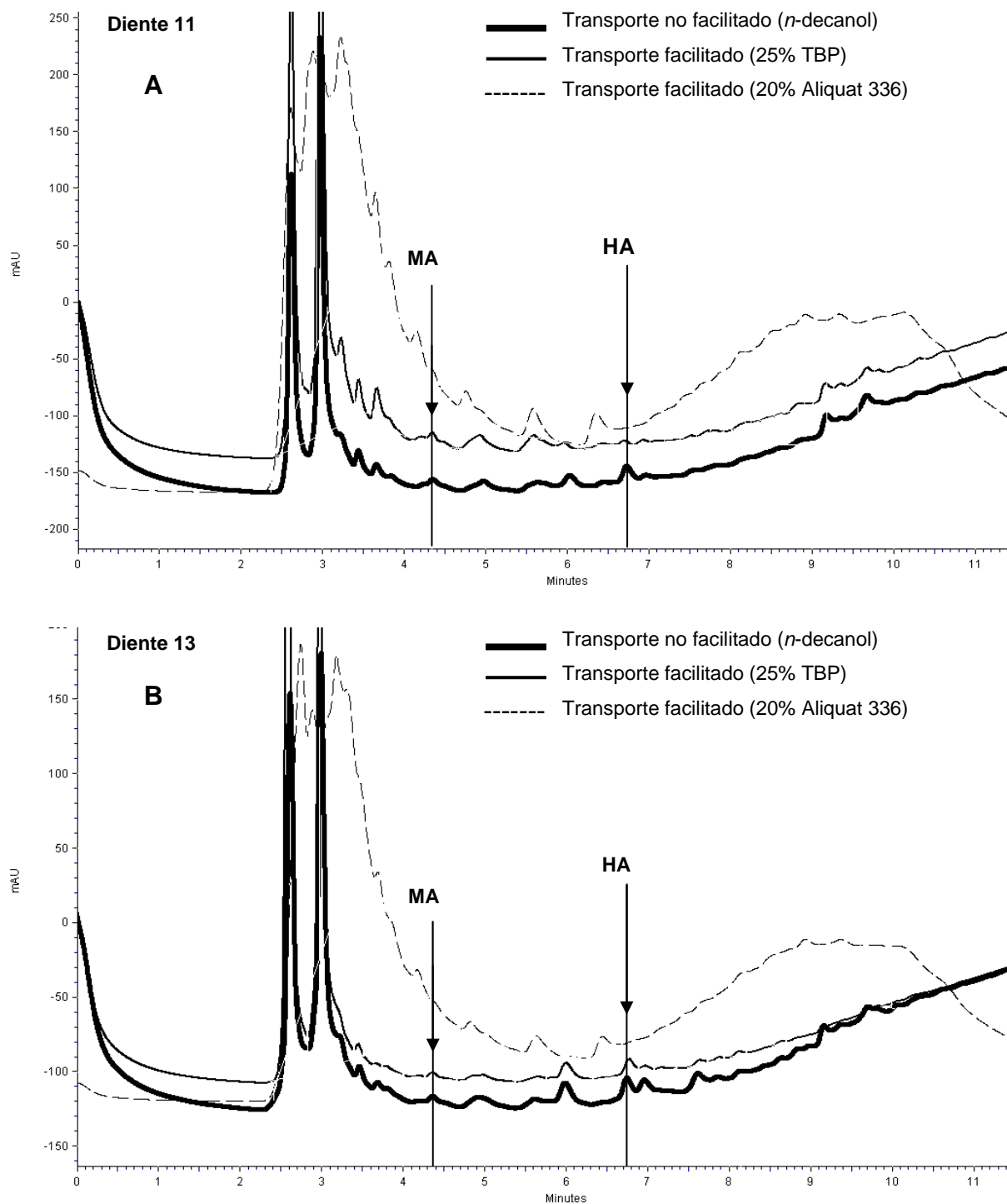


Figura 5.12. Solapamiento de cromatogramas de las fases aceptoras obtenidas con el uso de diferentes transportes después de la LPME de los dientes humanos 11 y 13: fase donora a pH2, velocidad de agitación 500 rpm, 500 mM NaCl añadido, 40 μ L NaOH 1M como fase aceptora (pH11,4) y tiempo de transporte 20h.

V. Microextracción en fase líquida mediante membranas líquidas para la determinación de ácidos carboxílicos como metabolitos de BTEX en dientes humanos

Resultados y Discusión

Las muestras dentales fueron pesadas y extraídas con 10 mL de NaOH 1M durante 4 h en baño ultrasónico y después de la extracción, las disoluciones fueron ajustadas a pH2 con HCl concentrado, se adicionó NaCl para obtener 500 mM de sal añadida y se llevó a un volumen de fase de carga de 20 mL con agua para obtener así las condiciones mejoradas para la fase de carga. En el caso de la fase aceptora, se utilizaron 40 μ L de la disolución de NaOH (pH12,6) y como SLM se utilizó *n*-decanol.

Como se observa en la **Tabla 5.4**, para todas las muestras de dientes, el MA fue identificado en valores de 1 a 11 μ g/g de concentración, y el HA se determinó en una alta concentración (70 μ g/g) para la muestra de diente número 12. En la **Figura 5.13** se muestra un ejemplo del efecto "clean-up" y de preconcentración obtenido con la LPME para esta muestra 12, mediante la comparación entre los cromatogramas de la fase de carga de 20 mL (antes de la LPME) y la fase aceptora de 40 μ L (después de la LPME). Por otro lado, el HA solo se pudo determinar en tres muestras dentales, mientras que el MHA no pudo ser identificado en ninguna de las muestras de diente humano estudiadas. En los casos de la no identificación del ácido carboxílico, se mostraron los LOD correspondientes a cada muestra (**Tabla 5.4**).

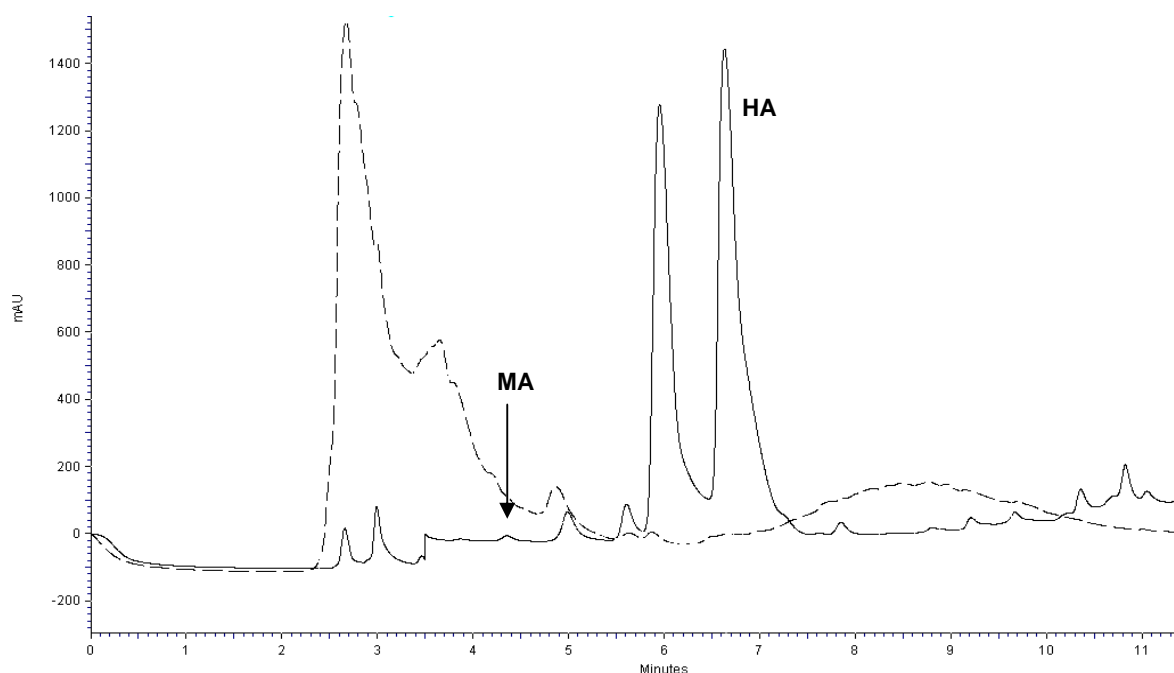


Figura 5.13. Solapamiento de cromatogramas de las fases de carga inicial (línea discontinua) y aceptora después de la LPME (línea continua) para la muestra de diente humano #12.

V. Microextracción en fase líquida mediante membranas líquidas para la determinación de ácidos carboxílicos como metabolitos de BTEX en dientes humanos

Resultados y Discusión

Debido a que el método de LPME-HPLC se estudió en disoluciones dopadas, podría ser posible extender su aplicabilidad hacia otro tipo de muestras biológicas, ya sean sólidas o líquidas. Como dato curioso y para conocer las posibilidades de extender el campo de aplicación del presente método para el estudio de los ácidos carboxílicos como metabolitos de los BTEX, se analizaron otros tres tipos de fluidos biológicos tales como uñas, cabello y orina de una misma persona que trabaja en laboratorios de análisis químico. Los resultados en la **Tabla 5.5** muestran que sólo se pudo identificar y cuantificar el HA en la muestra de orina en una concentración de 13,3 µg/mL (**Figura 5.14**). En el caso del resto de las muestras se mostraron los LOD correspondientes. Estos resultados son un indicador de la posibilidad de extender la aplicación del método a otros tipos de muestras biológicas.

Tabla 5.5. Determinación de ácidos carboxílicos como metabolitos de BTEX por LPME-HPLC en otros fluidos biológicos como posibles biomarcadores.*

Muestra	Cantidad	Edad (años)	Profesión (lugar)	MA	HA	MHA
uña	0,764 g	33	Químico (laboratorio)	$< 2 \times 10^{-3}$	$< 0,3 \times 10^{-3}$	$< 0,3 \times 10^{-3}$
cabello	0,501 g	33	Químico (laboratorio)	$< 3 \times 10^{-3}$	$< 0,4 \times 10^{-3}$	$< 0,4 \times 10^{-3}$
orina	10 mL	33	Químico (laboratorio)	$< 0,2 \times 10^{-3}$	13,3	$< 0,02 \times 10^{-3}$

* Los valores se determinaron para un individuo no fumador en µg/g para las muestras de uña y cabello, y en µg/mL en el caso de la muestra de orina. En el caso de la no identificación de la sustancia bajo LPME-HPLC, se mostraron los correspondientes LOD.

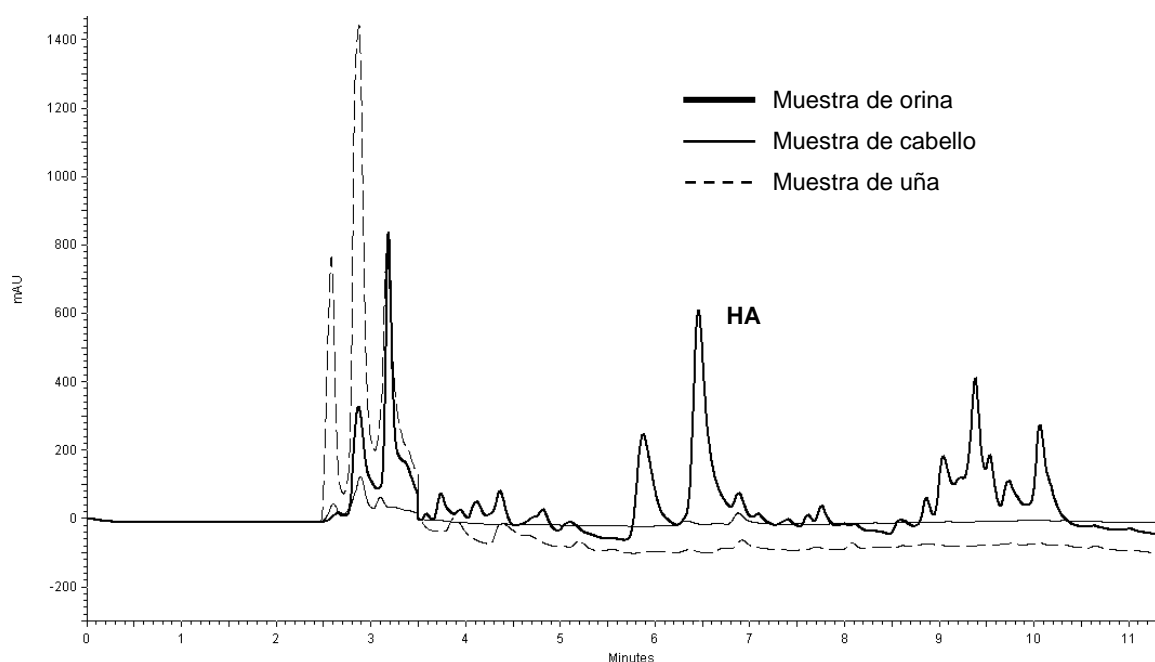


Figura 5.14. Cromatograma de las fases aceptoras obtenida después de la LPME de una muestra de uña (línea discontinua), cabello (línea clara continúa) y orina (línea oscura continúa).

V.6. CONCLUSIONES

De los resultados descritos en el presente capítulo se pueden extraer las siguientes conclusiones más relevantes:

1. La LPME resultó un método eficiente para el análisis de los ácidos carboxílicos como metabolitos de los BTEX en muestras modelo.
2. La LPME mostró que el transporte no facilitado a través de la membrana líquida para estos compuestos hidrofílicos permitía una mayor selectividad y pre-concentración de las sustancias y un mejor efecto "clean-up" a partir de muestras reales.
3. El método tándem de LPME-HPLC resultó ser económico y fácil de usar como herramienta para futuros estudios de correlación entre el nivel de exposición a los BTEX y la salud bucal, y podría ser extendida su aplicabilidad a otros tipos de muestras biológicas.

V. Microextracción en fase líquida mediante membranas líquidas para la determinación de ácidos carboxílicos como metabolitos de BTEX en dientes humanos

Bibliografía

V.7. BIBLIOGRAFÍA

- Andreoli, R.; Manini, P.; Bergamaschi, E.; Brustolin, A.; Mutti, A. Solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for determination of monoaromatic hydrocarbons in blood and urine. Application to people exposed to air pollutants. *Chromatographia* (1999), 50(3/4), 167-172.
- Angerer J., Schaller K. H. (eds) (1988) Analyses of hazardous substances in biological materials. Methods for biological monitoring. VCH, Weinheim, pp 52–66.
- Angerer, J.; Hoersch, B. Determination of aromatic hydrocarbons and their metabolites in human blood and urine. *Journal of Chromatography B* (1992), 580(1-2), 229-55.
- Astier, A. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of urinary metabolites of benzene, nitrobenzene, toluene, xylene and styrene. *Journal of Chromatography B* (1992), 573(2), 318-22.
- Bardstü, K. F.; Ho, T. S.; Rasmussen, K. E.; Pedersen-Bjergaard, S.; Jonsson, J. A. Supported liquid membranes in hollow fiber liquidphase microextraction (LPME) – Practical considerations in the three-phase mode. *Journal of Separation Science* (2007), 30, 1364–1370.
- Berhanu, T.; Liu, J.; Romero R.; Megersa, N.; Jonsson, J.A. Determination of trace levels of dinitrophenolic compounds in environmental water samples using hollow fiber supported liquid membrane extraction and high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* (2006), 1103, 1–8.
- Burrini, C. Simultaneous HPLC determination of hippuric acid, *o*-, *m*-, and *p*-methylhippuric acids, mandelic acid, and phenylglyoxylic acid in urine. *Medicina del Lavoro* (1998), 89(5), 404-411.
- Charalabaki, M.; Psillakis, E.; Mantzavinos, D.; Kalogerakis, N. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater treatment plant effluents using hollow fibre liquid-phase microextraction. *Chemosphere* (2005), 60, 690–698.
- Fontanals, N.; Barri, T.; Bergstro, S.; Jonsson, J. A. Determination of polybrominated diphenyl ethers at trace levels in environmental waters using hollow-fiber microporous membrane liquid–liquid extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* (2006), 1133, 41–48.
- Fujii, T.; Kawabe, S.; Horike, T.; Taguchi, T.; Ogata, M. Simultaneous determination of the urinary metabolites of toluene, xylene and styrene using high-performance capillary electrophoresis. Comparison with high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* (1999), 730(1), 41-47.
- Jonsson, J. A.; Lovkvist, P.; Audunsson, G.; Nilve, G. Mass transfer kinetics for analytical enrichment and sample preparation using supported liquid membranes in a flow system with stagnant acceptor liquid. *Analytical Chimica Acta* (1993), 277(1), 9-24.
- Jönsson, J. A.; Mathiasson, L. Liquid membrane extraction in analytical sample preparation: I. Principles Trends in Analytical Chemistry (1999a), 18, 318–325.
- Jonsson, J. A.; Mathiasson, L. Liquid membrane extraction in analytical sample preparation II. Applications. Trends in Analytical Chemistry (1999b), 18, 325-334.
- Jung, V.; Chimukab, L.; Jönsson, J. Å.; Niedack, N.; Bowens, P.; Alsanius, B. Supported liquid membrane extraction for identification of phenolic compounds in the nutrient solution of closed hydroponic growing systems for tomato. *Analytica Chimica Acta* (2002), 474, 49–57.
- Kou, D.; Wang, X.; Mitra, S. Supported liquid membrane microextraction with high-performance liquid chromatography–UV detection for monitoring trace haloacetic acids in water. *Journal of Chromatography A* (2004), 1055, 63–69.

V. Microextracción en fase líquida mediante membranas líquidas para la determinación de ácidos carboxílicos como metabolitos de BTEX en dientes humanos

Bibliografía

- Laffon, B.; Lema, M.; Mendez, J. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of urinary mandelic and phenylglyoxylic acids as indirect evaluation of styrene exposure. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* (2001), 753(2), 385-393.
- Lee, J.; Lee, H. K.; Rasmussen, K. E.; Pedersen-Bjergaard, S. Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: A review. *Analytica Chimica Acta* (2008), 624, 253-268.
- Li, Z.; Qin, W.; Dai, Y. Liquid-Liquid Equilibria of Acetic, Propionic, Butyric, and Valeric Acids with Trioctylamine as Extractant. *Journal of Chemical and Engineering Data*, (2002), 47, 843-848.
- Liu, J.; Jonsson, J. A.; Mayer P. Equilibrium Sampling through Membranes of Freely Dissolved Chlorophenols in Water Samples with Hollow Fiber Supported Liquid Membrane. *Analytical Chemistry* (2005), 77, 4800-4809.
- Liu, J-F.; Hu, X-L.; Peng, J-F.; Jonsson, J. A.; Mayer, P.; Jiang, G. B. Equilibrium Sampling of Freely Dissolved Alkylphenols into a Thin Film of 1-Octanol Supported on a Hollow Fiber Membrane. *Analytical Chemistry* (2006), 78, 8526-8534.
- Marchei, E.; Joya, X.; Garcia-Algar, O.; Vall, O.; Pacifici, R.; Pichini, S. Ultrasensitive detection of nicotine and cotinine in teeth by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* (2008), 22(16), 2609-2612.
- Matsumoto, M.; Takahashi, T.; Fukushima, K. Synergistic extraction of lactic acid with alkylamine and tributylphosphate: effects of amines, diluents and temperature. *Separation and Purification Technology* (2003), 33, 89-93.
- Mei, F.; Qin, W.; Dai, Y. Extraction Equilibria of Benzoic Acid with Tributyl Phosphate in Kerosene and 1-Octanol. *Journal of Chemistry and Engineering Data* (2002), 47, 941-943.
- Moon, D. H.; Paik, N. W.; Shim, Y. Analysis of some metabolites of organic solvents in urine by high-performance liquid chromatography with β -cyclodextrin. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* (1997), 694(2), 367-374.
- Mortaheb, H. R.; Amini, M. H.; Sadeghian, F.; Mokhtarani, B.; Daneshyar, H. Study on a new surfactant for removal of phenol from wastewater by emulsion liquid membrane. *Journal of Hazardous Materials* (2008), 160, 582-588.
- Murtomaa, M.; Tervaniemi, Olli-Matti; Parviainen, J.; Ruokojärvi, P.; Tuukkanen, J.; Viluksela, M. Dioxin exposure in contaminated sawmill area: the use of molar teeth and bone of bank vole (*Clethrionomys glareolus*) and field vole (*Microtus agrestis*) as biomarkers. *Chemosphere* (2007), 68(5), 951-957.
- Pascual J. A.; Diaz D.; Segura J.; Garcia-Algar O.; Vall O.; Zuccaro P.; Pacifici R.; Pichini S. A simple and reliable method for the determination of nicotine and cotinine in teeth by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry RCM* (2003), 17(24), 2853-5.
- Qin, W.; Cao, Y.; Luo, X.; Liu, G.; Dai, Y. Extraction mechanism and behavior of oxalic acid by trioctylamine. *Separation and Purification Technology* (2001), 24, 419-426.
- Reese, E.; Kimbrough, R. D. Acute toxicity of gasoline and some additives. *Environmental Health Perspectives* (1993), 101(SUPPL. 6), 115-31.
- Schlosser, S.; Kertesz, R.; Martak, J. Recovery and separation of organic acids by membrane-based solvent extraction and pertraction. An overview with a case study on recovery of MPCA. *Separation and Purification Technology* (2005), 41, 237-266.
- Shen, Y. In Vitro cytotoxicity of BTEX metabolites in HeLa cells. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* (1998), 34(3), 229-234.

V. Microextracción en fase líquida mediante membranas líquidas para la determinación de ácidos carboxílicos como metabolitos de BTEX en dientes humanos

Bibliografía

- Tamada, J. A.; Kertes, A. S.; King, C. J. Extraction of carboxylic acids with amine extractants. 1. Equilibria and law of mass action modeling. *Industrial and Engineering Chemistry Research* (1990a), 29(7), 1319-1326.
- Tamada, J. A.; Kertes, A. S.; King, C. J. Extraction of carboxylic acids with amine extractants. 2. Chemical interactions and interpretation of data. *Industrial and Engineering Chemistry Research* (1990b), 29(7), 1327-1333.
- Tolnai, B.; Gelencser, A.; Gal, C.; Hlavay, J. Evaluation of the reliability of diffusive sampling in environmental monitoring. *Analytica Chimica Acta* (2000), 408(1-2), 117-122.
- Trtic-Petrovic, T.; Liu, J-F.; Jonsson, J. A. Equilibrium sampling through membrane based on a single hollow fibre for determination of drug-protein binding and free drug concentration in plasma. *Journal of Chromatography B* (2005), 826, 169-176.
- Vial, J.; Jardy, A. Experimental comparison of the different approaches to estimated LOD and LOQ of an HPLC method. *Analytical Chemistry* (1999), 71, 2672-2677.
- Wang, Ch-Y.; Huang, Ch-T.; Hsieh, Y-Z. Determination of metabolites of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene by β -cyclodextrin modified capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science* (2003), 26, 69-74.
- Wardell, J. M.; King, C. J. Solvent equilibria for extraction of carboxylic acids from water. *Journal of Chemical and Engineering Data* (1978), 23(2), 144-148.
- Wodzki, R.; Nowaczyk, J. Propionic and acetic acid pertraction through a multimembrane hybrid system containing TOPO or TBP. *Separation and Purification Technology* (2002), 26, 207-220.
- Yamini, Y.; Reimann, C. T.; Vatanara, A.; Jonsson, J. A. Extraction and preconcentration of salbutamol and terbutaline from aqueous samples using hollow fiber supported liquid membrane containing anionic carrier. *Journal of Chromatography A* (2006), 1124, 57-67.
- Yankov, D.; Molinier, J.; Albet, J.; Malmayrb, G.; Kyuchoukov, G. Lactic acid extraction from aqueous solutions with tri-n-octylamine dissolved in decanol and dodecane. *Biochemical Engineering Journal* (2004), 21, 63-71.
- Yimrungruang D, Cheevaporn V, Boonphakdeeb T, Watchalayann P, Helander HF. Characterization and Health Risk Assessment of Volatile Organic Compounds in Gas Service Station Workers. *EnvironmentAsia 2* (2008) 21-29.
- Zhao, G.; Liu, J-F.; Nyman, M.; Jonsson, J. A. Determination of short-chain fatty acids in serum by hollow fiber supported liquid membrane extraction coupled with gas chromatography. *Journal of Chromatography B* (2007), 846, 202-208.

CONCLUSIONES DE LA TESIS

A la vista de los resultados recogidos en la memoria presente, podemos extraer las siguientes conclusiones más relevantes:

CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS BIOACTIVOS DE ESPECIES DE *ERYTHROXYLUM*

1. Los métodos de evaluación fitoquímica y biológica (antioxidante y antiviral) de seis especies del género permitieron identificar el *E. minutifolium* como la especie de mayor actividad en la búsqueda de los agentes bioactivos.
2. Una metodología de fraccionamiento guiado por bioensayos antioxidantes y antivirales (frente al HSV-1) permitió realizar la caracterización química y biológica del extracto EtOH de *E. minutifolium*.
3. En la fracción de mayor acción antioxidante (fracción polar) se identificaron como responsables de la actividad, glicósidos de flavonoide con valor quimiotaxonómico, a través de técnicas cromatográficas DFC y MEC juntamente con técnicas UV y NMR.
4. En la fracción de mayor acción antiviral (fracción menos polar), con un valor similar a medicamentos antivirales (Acyclovir), se identificaron como responsables de la actividad, triterpenos de tipo lupano y oleanano, mediante técnicas DFC, HPLC-GC-MS y técnicas espectroscópicas de MS y NMR.

COMPORTAMIENTO DE LA QUERCETINA BAJO UN MÉTODO DE LPME-HPLC. APLICACIÓN A SU DETERMINACIÓN EN ALIMENTOS VEGETALES

5. El transporte de quercetina en membranas líquidas viene controlado por la estabilidad de los complejos analito-transportador que se forman en fase membrana, limitando la eficiencia del mismo.
6. La aplicabilidad del método de LPME-HPLC en alimentos de origen vegetal permitió una adecuada selectividad en la pre-concentración de la quercetina y un buen efecto "clean-up" a partir de muestras reales.

DETERMINACIÓN DE BTEX Y METABOLITOS EN DIENTES HUMANOS COMO BIOMARCADORES. UTILIZACIÓN DE LA SPME Y LPME

7. De entre las metodologías desarrolladas, el método de SPME-GC-MS resultó ser el más adecuado para el estudio de los BTEX en muestras modelo, obteniéndose una buena sensibilidad.
8. El método de SPME-HPLC en el análisis de los metabolitos de BTEX (fenoles y ácidos carboxílicos) en muestras modelo mostró límites de detección relativamente altos.
9. Las metodologías de SPME permitieron la cuantificación de BTEX y fenoles por primera ocasión en dientes humanos, indicando su posible uso como biomarcadores.
10. El método de LPME-HPLC resultó ser el más idóneo para el estudio de los ácidos carboxílicos en muestras modelo, obteniéndose una adecuada sensibilidad y eficiencias de extracción.
11. La LPME mostró que el transporte no facilitado a través de la membrana líquida para los ácidos carboxílicos produce una adecuada selectividad en la pre-concentración y un claro efecto “clean-up” en el tratamiento de dientes humanos.
12. Los métodos de SPME y LPME resultaron ser económicos y fáciles de usar como herramientas analíticas para futuros estudios de correlación entre el nivel de exposición a los BTEX y la salud bucal, y puede ser extendida su aplicación a otros tipos de muestras biológicas.

ANEXOS

ANEXO 1

González JL, González KL, Vélez H, González JA, Payo A, Molina J, Prieto S, **2006**.
Flavonoid glycosides from Cuban *Erythroxylum* species. *Biochemical Systematics and
Ecology* 34, 539-542.

Flavonoid glycosides from Cuban *Erythroxylum* species

Johannes L. González-Guevara ^{a,*}, Herman Vélez-Castro ^a,
Kethia L. González-García ^a, Armando L. Payo-Hill ^b,
José A. González-Lavaut ^a, Jorge Molina-Torres ^c,
Sylvia Prieto-González ^a

^a Centro de Química Farmacéutica, MINSAP, Av. 200 y 21, Apdo. Postal 11600 Atabey, Playa, Habana, Cuba

^b Instituto de Ecología y Sistemática, CITMA, Carr. Varona, Km 3½, Boyeros, Habana, Cuba

^c CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato, Apdo. Postal 629, 36500 Irapuato, Gto., Mexico

Received 7 September 2005; accepted 9 January 2006

Keywords: *Erythroxylum*; Erythroxylaceae; Flavonols; HPLC; Rutin; Quercetin; Ombuin rutinosides

1. Subject and source

The 250 species of shrubs or small to medium-sized trees of the genus *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) are widespread in tropical regions from South America, Africa, Southeast Asia and Australia. The genus *Erythroxylum* is present in the flora of Cuba with 22 species, 16 of which are endemic (Oviedo, 2001). It has been used in ethno-medical practices with anti-inflammatory, anti-bacterial, tonic and stimulant properties, for liver, renal and vesicular affections, as a powerful diuretic, and in the treatment of venereal diseases, muscular affections (rheumatism and atrosis), and respiratory affections (bronchitis, pneumonia, catarrh, tuberculosis, asthma) (Roig, 1974; Bisse, 1988; Cano and Volpato, 2004).

Aerial parts of *Erythroxylum* species were collected in the Province of Pinar del Río (Cuba) in May 2003, except *Erythroxylum minutifolium*, which was collected in April 2001. Voucher specimens were deposited at the herbarium of the Pedagogical Institute of Pinar del Río under the following numbers: No. 9200 (*E. minutifolium* Griseb. var. *minutifolium*), 9193 (*Erythroxylum areolatum* Linn.), 9191 (*Erythroxylum confusum* Britt.), and 9209 (*Erythroxylum suave* Lunan.). All species were identified by Dr. Ramona Oviedo (Institute of Ecology and Systematics, Cuba).

2. Previous work

The chemotaxonomy of the genus has been reviewed (Hegnauer, 1981), and attention has been focused on the tropane alkaloids (Griffin and Lin, 2000). There are many reports about the flavonoids in aerial parts of the species of *Erythroxylum* (Paris and Delaveau, 1963; Bohm et al., 1981, 1982, 1988; Iñigo and Pomilio, 1985; Bonefeld et al.,

* Corresponding author. Tel.: +53 271 50 13; fax: +53 733 74 61.

E-mail addresses: johannesluis.gonzalez@uab.es (J.L. González-Guevara), jmolina@ira.cinvestav.mx (J. Molina-Torres).

1986), and these compounds have proved to be chemotaxonomically useful (Bohm et al., 1988; Johnson et al., 1997, 1998, 2002, 2003; Johnson and Schmidt, 1999, 2004).

In *Erythroxyllum*, the prominent flavonoid compounds are flavonols (Hegnauer, 1981), and the majority of them occur as 3-*O*-monoglycosides with glucose, galactose, arabinose, xylose, and rhamnose, and as 3-*O*-diglycosides with various combinations of those sugars. Kaempferol, quercetin, and ombuin are the main aglycones of *Erythroxyllum* flavonols (Bohm et al., 1988). Moreover, Johnson et al. (1997, 1998) have characterized 3', 4' and 7-*O*-monoglycosides of taxifolin, fisetin, luteolin, eriodictyol and dihydroxykaempferol in leaves of cultivated coca. In a previous study, we have examined the antiherpetic activity of four *Erythroxyllum* species, and we found a very low alkaloid content and a high concentration of leaf flavonoids during the preliminary phytochemical screening of these species (González et al., 2004).

3. Present study

Dried ground leaves of *E. minutifolium* (350 g) were successively extracted in a Soxhlet (2 L) with solvents of increasing polarity: *n*-hexane, CHCl₃, and EtOH. The ethanolic extract (13.7% related to dry plant) was enriched in flavonoid constituents by *n*-BuOH–H₂O (1:1, v/v) partition. The *n*-BuOH fraction (2.4% related to EtOH extract) was then chromatographed on a Sephadex LH-20 column with EtOH as eluent. Twenty fractions (6 ml) were collected. Column chromatography afforded three main flavonoid fractions, which were detected by TLC (silica gel 60 F254 on glass, 10 × 20 cm, Merck) with AlCl₃ (1% in EtOH) to give yellow spots. The crystallization step with ethanol of 6, 8 and 12 fractions, yielded 22.1 mg of ombuin-3-rutinoside-5-glucoside (**1**), 164.3 mg of ombuin-3-rutinoside (**2**), and 151.3 mg of quercetin-3-rutinoside (**3**).

All structures were established through ¹H and ¹³C NMR (Bruker DRX-600, Germany) and UV (HACH DR/4000U, USA) analyses and comparison with the literature data (Agrawal, 1989). This is the first report of the complete spectroscopic data of flavonols **1** and **2**, as a free glycoside.

3.1. 7,4'-Di-*O*-methylquercetin-3-*O*-β-rutinoside-5-*O*-β-glucoside (ombuin-3-rutinoside-5-glucoside) (**1**)

Pale yellow amorphous solid; C₃₅H₄₄O₂₁; UV λ_{max}^{MeOH} nm: 252, 262 (sh), 302 (sh), and 346. No shifts were observed on addition of NaOAc and NaOAc/H₃BO₃. ¹H NMR (599.19 MHz, DMSO): δ 0.99 (3H, d, *J* = 6.1 Hz, H-6'''), 3.05–3.60 (overlapped signals, sugar protons), 3.72 (1H, d, H-6''), 3.87 (3H, s, OMe'), 3.90 (3H, s, OMe), 4.42 (1H, *J*_{ee} = 1 Hz, H-1'''), 4.83 (1H, d, *J*_{aa} = 7.3 Hz, H-1^{IV}), 5.25 (1H, d, *J*_{aa} = 7.3 Hz, H-1''), 6.87 (1H, d, *J*_m = 2.2 Hz, H-6), 6.91 (1H, d, *J*_m = 2.2 Hz, H-8), 7.03 (1H, d, *J*_o = 8.8 Hz, H-5'), 7.55 (1H, d, *J*_m = 2.1 Hz, H-2'), 7.75 (1H, dd, *J*_m = 2.1 Hz, *J*_o = 8.8 Hz, H-6'), ¹³C NMR (150.858 MHz, DMSO): δ 17.50 (C-6'''), 55.51 (OMe), 55.88 (OMe), 60.80 (C-6^{IV}), 66.68 (C-6''), 68.02 (C-5'''), 69.71 (C-4^{IV}), 69.83 (C-4''), 70.18 (C-2'''), 70.47 (C-3'''), 71.74 (C-4'''), 73.39 (C-2^{IV}), 73.94 (C-2''), 75.59 (C-3^{IV}), 75.68 (C-5''), 76.38 (C-3''), 77.47 (C-5^{IV}), 95.59 (C-8), 100.55 (C-1'''), 101.29 (C-1''), 102.32 (C-1^{IV}), 103.61 (C-6), 108.82 (C-10), 111.25 (C-5'), 115.63 (C-2'), 121.22 (C-6'), 122.35 (C-1'), 135.85 (C-3), 145.68 (C-3'), 149.75 (C-4'), 154.41 (C-9), 157.41 (C-2), 158.15 (C-5), 163.52 (C-7), 172.94 (C-4).

3.2. 7,4'-Di-*O*-methylquercetin-3-*O*-β-rutinoside (ombuin-3-rutinoside) (**2**)

Yellow amorphous solid; C₂₉H₃₂O₁₆; UV λ_{max}^{MeOH} nm: 256, 268 (sh), 298 (sh), and 352. No shifts were observed on addition of NaOAc and NaOAc/H₃BO₃. ¹H NMR (599.19 MHz, DMSO): δ 0.99 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, H-6'''), 3.00–3.50 (overlapped signals, sugar protons), 3.72 (1H, H-6''), 3.87 (3H, s, OMe), 3.88 (3H, s, OMe), 4.41 (1H, *J*_{ee} = 1 Hz, H-1'''), 5.39 (1H, d, *J*_{aa} = 7.3 Hz, H-1''), 6.36 (1H, d, *J*_m = 2.2 Hz, H-6), 6.67 (1H, d, *J*_m = 2.2 Hz, H-8), 7.05 (1H, d, *J*_o = 8.7 Hz, H-5'), 7.55 (1H, d, *J*_m = 2.3 Hz, H-2'), 7.72 (1H, dd, *J*_m = 2.3 Hz, *J*_o = 8.7 Hz, H-6'). ¹³C NMR (150.858 MHz, DMSO): δ 17.49 (C-6'''), 55.51 (OMe), 55.87 (OMe), 66.74 (C-6''), 68.04 (C-5'''), 69.77 (C-4''), 70.21 (C-2'''), 70.49 (C-3'''), 71.72 (C-4'''), 73.93 (C-2''), 75.74 (C-5''), 76.32 (C-3''), 92.10 (C-8), 100.59 (C-1'''), 101.07 (C-1''), 97.74 (C-6), 104.88 (C-10), 111.28 (C-5'), 115.70 (C-2'), 121.34 (C-6'), 122.74 (C-1'), 135.71 (C-3), 145.74 (C-3'), 150.01 (C-4'), 156.51 (C-9), 156.26 (C-2), 160.76 (C-5), 165.00 (C-7), 177.39 (C-4).

3.3. Quercetin-3-O- β -rutinoside (rutin) (3)

Yellow amorphous solid; C₂₇H₂₈O₁₆; UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm: 258.5, 268 (sh), 298 (sh), 352; +NaOAc: 273, 392; +NaOAc/H₃BO₃: 262, 381. All NMR spectral data were identical to those previously reported (Agrawal, 1989).

3.4. HPLC quantitative analysis

The analytical evaluation was carried out with 1 g of dried ground material (leaves and branches, separately), which was extracted twice with methanol–water (8:2 and 1:1). The filtrates were combined and concentrated. The extract volume was then adjusted to 30 mL with methanol, and filtered (0.45 μm , Sartorius AG, Germany). The HPLC system consisted of a Merck–Hitachi liquid chromatograph (Darmstadt, Germany) equipped with a quaternary low-pressure pump Model L-7100, a 20 μL loop, and a variable wavelength UV detector Model L-7400 (Merck–Hitachi, Darmstadt, Germany) that was set to 354 nm. Separation was performed on a Hypersil ODS C18 column (10 μm , 250 \times 4.0 mm, Knauer) at room temperature. Methanol (30%) with 1% phosphoric acid was used as mobile phase A, and methanol as eluent B. The elution gradient was 25% B during 5 min; then a linear increase to 80% B in 5 min and then back to 25% B in 5 min. The flow rate was kept constant at 1 mL/min. The calibration curves were based on the evaluation of triplicate standards at three concentration levels. For each compound in the samples, peaks were identified by comparison of the retention times and UV spectra of the reference standards. Quantitative analysis was performed based on external standards, using a concentration level of 0.125 mg/mL, analyzed in duplicate before and after each batch of samples. The samples were analyzed by triplicate.

The method permitted with satisfactory linearity ($r = 0.98$) a specific measurement of these flavonols. The flavonol quantitative analysis showed that the overall intra-day variation was less than 5%. In these species, the glycosidic derivatives were identified, while quercetin, as an aglycone, was not detected. This was expected in agreement to Bohm et al. (1988), who studied the flavonoid variation in several *Erythroxylum* species, where quercetin occurs only as both mono- and diglycosides in this genus. The quantitative results showed a significant rutinoid variation between the different samples. The amount of **3** ranges from 0.2 to 14.7 mg/g dry weight among the species and different organs (Table 1). The concentration in leaves was always higher in relation to branches in all four species. This result points to a major accumulation of this metabolite in leaves, i.e., 14.7 mg/g for leaves of *E. suave*. This compound was not detected in branches of *E. confusum* and *E. areolatum*. The ombuin glycosides **1** and **2** were identified in all samples. Compound **2** ranges from 2.0 to 3.3 mg/g dry weight and the unique triglycosidic derivate (**1**) was quantified in the range from 1.6 to 6.7 mg/g.

4. Chemotaxonomic significance

The flavonoids of four species (leaves and branches) of *Erythroxylum* were investigated, and ombuin-3-rutinoside-5-glicoside (**1**) and ombuin-3-rutinoside (**2**) were found in all of them. This confirms previous results that ombuin

Table 1
Flavonol content in leaves and branches of four *Erythroxylum* species ($n = 3$)

Sample	Ombuin-3-rut 5-glu (1)		Ombuin-3-rut (2)		Quercetin-3-rut (3)		Quercetin (4)	
	Mean \pm SD ^a	CV (%)	Mean \pm SD ^a	CV (%)	Mean \pm SD ^a	CV (%)	Mean \pm SD ^a	CV (%)
A	2.12 \pm 0.04	1.92	3.30 \pm 0.05	1.55	5.12 \pm 0.02	0.44	–	–
B	1.61 \pm 0.03	1.57	0.71 \pm 0.03	3.95	0.22 \pm 0.01	4.58	–	–
C	1.66 \pm 0.03	1.78	0.24 \pm 0.01	0.98	0.43 \pm 0.01	1.96	–	–
D	3.5 \pm 0.1	2.75	0.70 \pm 0.03	3.86	–	–	–	–
E	6.76 \pm 0.08	1.25	0.93 \pm 0.01	1.24	0.63 \pm 0.02	2.83	–	–
F	4.89 \pm 0.04	0.87	0.46 \pm 0.02	3.53	–	–	–	–
G	3.13 \pm 0.12	3.72	0.74 \pm 0.01	1.55	14.74 \pm 0.23	1.54	–	–
H	6.45 \pm 0.18	2.82	1.33 \pm 0.02	1.42	0.81 \pm 0.01	0.45	–	–

^a Data are presented as mg/g dry sample material, and expressed as mean \pm SD of triplicate analyses for each sample. A: *E. minutifolium* leaves, B: *E. minutifolium* branches, C: *E. confusum* leaves, D: *E. confusum* branches, E: *E. areolatum* leaves, F: *E. areolatum* branches, G: *E. suave* leaves, H: *E. suave* branches. rut: rutinoside, glu: glucoside.

glycosides are characteristic chemosystematic markers for the genus *Erythroxylum*. The rutinoid **2** has been reported previously from 18 species of this genus (Paris and Delaveau, 1963; Bohm et al., 1981, 1982, 1988; Iñigo and Pomilio, 1985; Bonefeld et al., 1986; Iñigo et al., 1988), but **1** from only two species: *E. argentinum* and *E. cuneifolium* (Iñigo and Pomilio, 1985; Iñigo et al., 1988). To date, no other natural source for this rare and unusual flavonol has been reported. However, this compound may have been overlooked in most of the flavonoid surveys of the genus, as the chromatographic properties of flavonoid **1** are similar to those of flavonoid **2**. Therefore, it would be interesting to reinvestigate species of *Erythroxylum* for ombuin-3-rutinoid-5-glucoside using the HPLC method described.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Armando Urquiola Cruz (Instituto Pedagógico de Pinar del Río, Cuba) and Eng. Alfonso Alvarez (Centro de Química Farmacéutica, Cuba) for providing plant material, Dr. Ramona Oviedo (Institute of Ecology and Systematic, Cuba) for identification of the material plant. Special thanks to Dr. Osmany Cuesta for his invaluable contributions and NAPRALERT Database for free access to information. This work was partially supported by the Ministry of Public Health, Republic of Cuba (Proyecto 0008001) and CONACYT/Mexico (Proyecto Integral: E120. 941/2002 and J200.265/2003).

References

- Agrawal, P.K., 1989. Carbon-13 NMR of Flavonoids. Elsevier, The Netherlands.
- Bisse, J., 1988. Arboles de Cuba. Científico Técnica, La Habana, Cuba, p. 146.
- Bohm, B.A., Phillips, D.W., Ganders, F.R., 1981. J. Nat. Prod. 44, 676.
- Bohm, B.A., Ganders, F.R., Plowman, T., 1982. Syst. Bot. 7, 121.
- Bohm, B.A., Loo, T., Nicholls, K.W., Plowman, T., 1988. Phytochemistry 27, 833.
- Bonefeld, M., Friedrich, H., Kolodziej, H., 1986. Phytochemistry 25, 1205.
- Cano, J.H., Volpato, G., 2004. J. Ethnopharmacol. 90, 293.
- González, J.L., González, J.A., Pino, S., Echmendía, O.A., Carballo, M.T., García, M., Molina, J., Prieto, S., 2004. Acta Farm. Bonaerense 23, 506.
- Griffin, W.J., Lin, G.D., 2000. Phytochemistry 53, 623.
- Hegnauer, R., 1981. J. Ethnopharmacol. 3, 279.
- Iñigo, R.P.A., Pomilio, A.B., 1985. Phytochemistry 24, 347.
- Iñigo, R.P.A., De Iglesias, D.I.A., Catalan, C.A.N., 1988. Phytochemistry 27, 1230.
- Johnson, E.L., Schmidt, W.F., 1999. Z. Naturforsch. C 54, 881.
- Johnson, E.L., Schmidt, W.F., 2004. Z. Naturforsch. C 59, 769.
- Johnson, E.L., Schmidt, W.F., Norman, H.A., 1997. Z. Naturforsch. C 52, 577.
- Johnson, E.L., Schmidt, W.F., Norman, H.A., 1998. Biochem. Syst. Ecol. 26, 743.
- Johnson, E.L., Schmidt, W.F., Cooper, D., 2002. Plant Physiol. Biochem. 40, 89.
- Johnson, E.L., Schmidt, W.F., Emche, S.D., Mossoba, M.M., Musser, S.M., 2003. Biochem. Syst. Ecol. 31, 59.
- Oviedo, R., 2001. Thesis, Institute of Ecology and Systematic, La Habana, Cuba.
- Paris, R.R., Delaveau, P., 1963. C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. 256, 301.
- Roig, J.T., 1974. Plantas medicinales, aromáticas y venenosas de Cuba. Ciencia y Técnica, Instituto del Libro, La Habana, Cuba, p. 103.

ANEXO 2

González JL, García M, Echemendía OA, Sánchez R, Prieto S, Valiente M.
Anti-herpes simplex virus type 1 activity and chemical characterization of fractions obtained from
Erythroxylum minutifolium extract.

To be submitted

Anti-herpes simplex virus type 1 activity and chemical characterization of fractions obtained from *Erythroxylum minutifolium* extract

Johannes L. González^a, Miladys García^b, Olga A. Echemendía^b, Raquel Sánchez^c, Sylvia Prieto^d, Manuel Valiente^a

^a *Departament de Química, Centre GTS, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Espanya*

^b *Instituto Finlay, 11600 La Lisa, Ciudad de la Habana, Cuba*

^c *Institut d'Analítica Industrial IKAI-KONIK, 08190 Sant Cugat, Barcelona, Espanya*

^d *Departamento de Química, Centro de Química Farmacéutica, 6990 Playa, La Habana, Cuba*

Abstract

Erythroxylum species are used in Cuba as herbal medicines related to viral processes. The in vitro activity of *Erythroxylum minutifolium* Griseb. var. *minutifolium* ethanol extract against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) was investigated for the first time to identify the bioactive agents. Activity-guided fractionation of the ethanol bioactive extract with a significant 50% effective concentration (EC₅₀) against two different HSV-1 strains (EC₅₀=18.1 and 36.9 µg/mL) led to the chemical characterization of three different fractions. Major glycosides of ombuin and quercetin flavonols were identified and quantified by HPLC in the inactive fraction. Condensed tannins as proanthocyanidins were identified by TLC as main chemical group in the medium antiherpetic fraction (EC₅₀=9.1 and 23.4 µg/mL). Fatty acids, phytol, pentacyclic triterpenes, and alpha-tocopherol were identified in the most antiviral fraction (EC₅₀=2.6 and 6.1 µg/mL) by GC-MS. In conclusion, pentacyclic triterpenes based on lupane and oleanane structures were found to have the major responsibility in the inhibitory activity against HSV-1 obtained for *E. minutifolium* extract.

Keywords

Erythroxylum minutifolium (Erythroxylaceae), anti-HSV-1 activity, pentacyclic triterpenes, proanthocyanidins, flavonoid glycosides

1. Introduction

The genus *Erythroxylum* is present in the Cuban flora with 22 species, 16 of which are endemic. These species are used as herbal medicines with anti-inflammatory, anti-bacterial, tonic and stimulant properties, for liver, renal and vesicular afflictions, as a powerful diuretic, and in the treatment of venereal diseases, muscular and articulated afflictions (rheumatism, arthritis), and respiratory affections (bronchitis, pneumonia, flue, tuberculosis, asthma) (Roig, 1974; Cano and Volpato, 2004). Nevertheless, some of these

ethnobotanical properties related to viral processes are rarely studied on Cuban *Erythroxylum* species.

Polar extracts from *E. laurifolium* species were found to have moderate activity against herpes simplex virus type 1, HSV-1 (Lohézic et al., 1999; Fortin et al., 2002) and hydroalcoholic extracts from the Cuban species *E. areolatum* and *E. confusum* showed to be potent anti-HSV-1 inhibitors (González et al., 2004). In these studies, antiviral properties of the extracts were correlated to the presence of high amount of polyphenols and triterpenes. According to previous chemical reports,

* Correspondence: M. Valiente, ^a*Departament de Química, Centre GTS, Universitat Autònoma de Barcelona*. Fax: (34) 935811985, Phone: (34) 935812903, e-mail: Manuel.Valiente@uab.es

extracts of Cuban species contain pentacyclic triterpenes (González et al., 2008) a high concentration of polyphenols, being the glycosides of ombuin and quercetin their major chemical components, and characteristic chemosystematic markers for the genus (González et al., 2006).

Herpetic infection is common in humans and is responsible for labial herpes, genital herpes, keratitis, and encephalitis. The infection of HSV-1 has been successfully treated with acyclovir, but drug-resistant strains of HSV-1 frequently develop following therapeutic treatment (Kimberlin and Whitley, 1998). Therefore, new antiviral agents are urgently needed. Plant extracts and a large number of molecules, like polyphenols, terpenes and sugar-containing compounds, were found to be promising antiherpetic agents (Khan et al., 2005).

In this work, we report the anti-HSV-1 study of the *E. minutifolium* ethanolic extract by bioassay guided procedure. Antiherpetic activity was evaluated with reference and isolated HSV-1 strains, and the identification of main metabolites in each fraction was also carried out by different chromatographic techniques in order to establish a correlation with the traditional use of *E. minutifolium* in the treatment of viral processes.

2. Materials and Methods

2.1. Plant material, extracts and fractions

Aerial parts of *E. areolatum* Linn. (collected in January/2002), *E. alaternifolium* var. *alaternifolium* (April/2001), *E. confusum* Britt. (May/2003), *E. havanense* Jacq. (April/2001), *E. minutifolium* Griseb. var. *minutifolium* (July/2002) and *E. suave* Lunan. (April/2001) were collected in the Province of Pinar del Río (Cuba) and deposited at the herbarium of the Pedagogical Institute of Pinar del Río. The voucher specimens were coded as 9193, 9201, 9191, 9207, 9200 and 9209, respectively. All species were identified by botanist Dr. R. Oviedo (Institute of Ecology and Systematics, Cuba).

The EtOH extract of *E. minutifolium* (300 g) was prepared by exhaustive extraction in a Soxhlet (2 L) for 12 h. The EtOH extract was concentrated under reduced pressure affording syrup (47.1 g). Ketone (1:3 w/v) was added to obtain a soluble material **A** (30.5 g) and an insoluble residue **B** (17.2 g). Fraction **A** was separated and concentrated to syrup. Finally, chloroform (1:3 w/v) was added affording a soluble material **C** (23.1 g) and an insoluble residue **D** (3.2 g).

2.2. General experimental procedures

All reagents and pure standards (>99%) were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). All organic solvents were products of Merck (Hohenbrunn, Germany). H₂O was purified by a Milli-Q_{plus} system from Millipore (Milford, MA, USA). The analysis of fraction **B** was carried out by TLC on silica gel 60 F254 plates, 10 x 20 cm (Merck, Darmstadt, Germany) with both Ce(SO₄)₂ saturated in H₂SO₄ and vanillin solutions, using the following solvent systems: hexane-EtOAc (9:1, 8:2, 7:3), CH₃Cl-MeOH (9:1; 8:2; 7:3) and *n*-BuOH-HOAc-H₂O (60:15:25). Fraction **C**, obtained as described below, was analyzed by GC-MS as follows: Konik MS Q12 quadrupole system (Konik-Tech, Barcelona, Spain); column, DB-WAX J&W, 30m x 0.25 mm i.d., 0.25 μm; injection 1 μL; splitless mode; oven temperature, 40°C for 2 min, to 120°C at 30°C/min, then to 250°C at 2.8°C/min, and held for 70 min; injector temperature, 250°C; detector ionization mode, EI(+); electron energy, 70 eV; source temperature, 120°C; transfer line temperature, 250°C; scan range, m/z 40-460; scan rate: 600 ms/ionM; carrier gas, helium; flow, 1.2 mL/min; identification of compounds was carried out by comparison of MS spectra with the use of NIST MS Search 2.0 program. Fraction **D** was analyzed by HPLC as previously described (González et al., 2006).

2.3. Cells and viruses

Two strains of HSV-1, reference strain 8WC (Carlos III institute, Madrid, Spain), and another strain isolated from patient treated with acyclovir (Virology Department of the “Pedro Kouri” Tropical Medicine Institute, Cuba), were propagated on VERO (African’s monkey green kidney) cells (ATCC Number: CCL-22). The procedure was followed as described by González et al. (2004).

2.4. Cytotoxic and antiviral assays

Cytotoxicity of extract and fractions was evaluated using an assay based in the colour change, which occurred following the reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) by mitochondrial enzymes, and antiviral activity was evaluated *in vitro* by the CPE

method. Both procedures were followed as described by González et al. (2004).

3. Results and Discussion

The evaluation of the anti-HSV-1 activity indicated that *E. minutifolium* ethanol extract and its fractions were no toxic to the cell line used, > 1000 µg/mL, (Table 1). This extract inhibited the reproduction of the HSV-1 reference strain in Vero cells (EC₅₀=18.1 µg/mL) and was also active against the strain isolated from patients (EC₅₀=36.9 µg/mL). These patients were treated with acyclovir, and the HSV-1 strain was resistant to this therapy. Thus, the EC₅₀ obtained with this strain showed major values. According to the reports on anti-HSV-1 activity of *Erythroxylum* extracts (Lohézic et al., 1999; Fortin et al., 2002; González et al., 2004) our results showed lower EC₅₀ values.

Table 1 Anti-HSV-1 activity of extract and fractions of *E. minutifolium* species^a

Sample ^b	Virus inhibitory effect (HSV-1) ^c			
	Reference strain		Isolated strain	
	EC ₅₀ (µg/mL) ^d	SI ^e	EC ₅₀ (µg/mL) ^d	SI ^e
Extract	18.1 ± 4.3	> 55.13	36.9 ± 5.5	> 27.11
A	67.2 ± 3.6	> 14.88	84.9 ± 8.7	> 11.78
B	9.1 ± 1.9	>109.65	23.4 ± 2.3	> 42.66
C	2.6 ± 0.7	>390.62	6.1 ± 0.5	>164.20
D	not active	–	not active	–

^a Results are expressed as a mean of triplicate or quadruplicate experiments

^b **A**: Me₂CO fraction, **B**: insoluble Me₂CO fraction, **C**: CHCl₃ fraction, **D**: insoluble CHCl₃ fraction

^c Fifty percent cytotoxic concentration (CC₅₀) for all samples were >1000 µg/mL

^d Fifty percent inhibitory concentration

^e Selectivity index (SI=CC₅₀/EC₅₀)

A bioassay guided fractionation of this bioactive extract permitted to obtain during the first precipitation step a less active fraction **A** (EC_{50} =67.2 μ g/mL and 84.9 μ g/mL) and a significant active fraction **B** (EC_{50} = 9.1 μ g/mL and EC_{50} = 23.4 μ g/mL) enrichment in proanthocyanidins. This polyphenolics, identified by TLC in this last fraction, are one of the well known metabolites with a significant HSV-1 inhibitory activity (Khan et al., 2005).

The fractionation of **A** afforded the most antiviral fraction **C** (EC_{50} =2.6 and 6.1 μ g/mL) and inactive precipitate **D** (**Table 1**). Fraction **C** decreased six to seven times the EC_{50} of the total extract and its chemical characterization by GC-MS (**Table 2** in Supplementary material) led to identify fatty acids, phytol, alpha-tocopherol and pentacyclic triterpenes as main metabolites. These triterpenes were classified as 3-hydroxy and 3-oxo pentacyclic triterpenes of lupanes and oleananes (**1-4**) as shown in **Figure 1**.

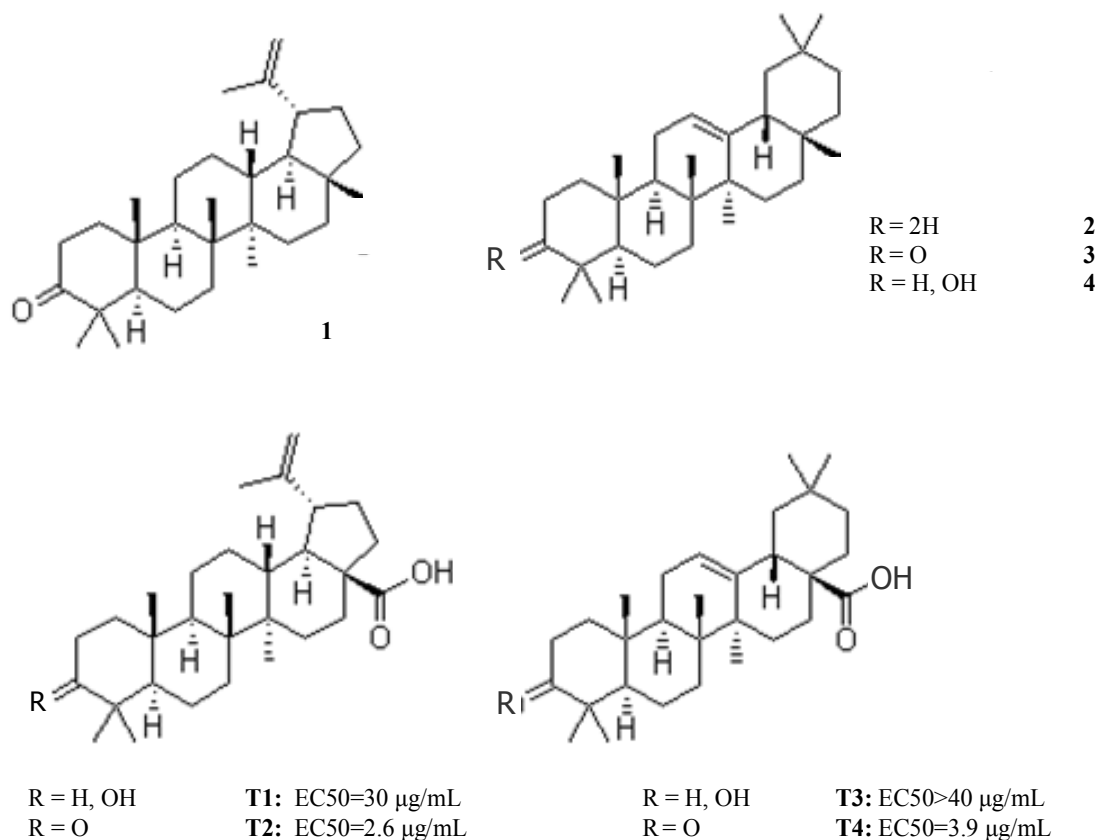


Figure 1. Pentacyclic triterpenes (**1-4**) identified by GC-MS in the anti-HSV-1 fraction **C** of *E. minutifolium* extract by GC-MS and some typical anti-HSV-1 lupane and oleanane triterpenes (**T1-T4**). **1:** lupen-3-one. **2:** olean-12-ene. **3:** olean-12-en-3-one. **4:** olean-12-en-3-ol. **T1:** betulinic acid, Ryu et al., 1993. **T2:** betulonic acid, Kurokawa et al, 1999. **T3:** oleanolic acid, Chiang et al, 2002. **T4:** oleanonic acid (moronic acid), Kurokawa et al., 1999.

It is known that these lupane and oleanane structures with 3-hydroxyl, 3-oxo and 28-carboxyl-group have an important anti-HSV-1 activity in vitro (**Figure 1**) (Ryu et al., 1993; Kurokawa et al., 1999; Chiang et al., 2002). Although, 3-oxo-triterpenes are four to ten times as potent as the corresponding parent 3-hydroxy-triterpenes (Ryu et al., 1993). For that reasons, triterpenes **1-4** have an important role in the strong anti-HSV-1 activity of this fraction, which EC_{50} value (2.6 $\mu\text{g/mL}$) was similar to the 1.9 $\mu\text{g/mL}$ of Acyclovir (Chiang et al., 2002), the most commonly used drug for treatment of HSV infections. Nevertheless, a possible synergistic effect of the different constituents of **C** could also be taken into account.

The chemical characterization of inactive fraction **D** by TLC and HPLC permitted to identify basically three flavonol glycosides: ombuin-3-rutinoside-5-glucoside, ombuin-3-rutinoside and rutin (**Figure 2** in Supplementary material), which are characteristic chemosystematic markers for the genus (González et al., 2006). It is known that the HSV activity of flavonols decrease with a number of hydroxyl substitution, and 3-hydroxyl group might be an active site for the anti-HSV-1 activity of free flavonols (Kaul et al., 1985; Khan et al., 2005; Lyu et al., 2005). In our case, these identified glycoside flavonols have 3-position substituted by rutinoside molecule and the inactivity of the fraction **D** could be caused by the presence of glycosylated and methylated hydroxyl groups in the structures.

4. Conclusions

In the present study the ethanol extract from Cuban *E. minutifolium* species leaves exhibited a significant anti-HSV-1. These results demonstrate the traditional use of these Cuban species for the treatment of diseases related to viral processes. The fractionation of the ethanol extract permitted to identify some compounds that could be responsible

of the strong anti-HSV-1 properties: proantocyanidins in fraction **B** ($EC_{50}=9.1 \mu\text{g/mL}$) and pentacyclic triterpenes in fraction **C** ($EC_{50}=2.6 \mu\text{g/mL}$). Characteristic glycoside flavonols of *Erythroxylum* genus, isolated from the inactive fraction **D**, were also identified. In Cuba, this less polar fraction of *E. minutifolium* extract is at present on clinical studies as a phytomedicine to substitute other anti-herpes drugs for the treatment of labial herpes. Further investigations are in progress to evaluate the antiherpetic activity of their constituents with the objective of the more specific anti-HSV-1 formulations.

Acknowledgments

Supported by the Programme *Alβan*, the European Union Programme of High Level Scholarships for Latin America. This work was also supported by the Ministry of Public Health, Republic of Cuba (Project 0008001, for the studies in Cuba) and the Spanish Commission for Research and Development CICYT (Project CTQ2005-09430-C05-01, for the studies in Spain).

References

- Cano, J.H., Volpato, G., 2004. Herbal mixtures in the traditional medicine of Eastern Cuba. *Journal of Ethnopharmacology* 90, 293–316.
- Chiang, L.C., Chiang, W., Chang, M.Y., Ng, L.T., Lin, C.C., 2002. Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds in vitro. *Antiviral Research* 55, 53–62.
- Fortin, H., Vigor, C., Lohezic-Le, D.F., Robin, V., Le Bosse, B., Boustie, J., Amoros, M., 2002. In vitro antiviral activity of thirty-six plants from La Reunion Island. *Fitoterapia* 73, 346-350.
- González, J.L., González, J.A., Pino, S., Echemendía, O.A., Carballo, M.T., García, M., Molina, J., Prieto, S., 2004. Phytochemical screening and in-vitro antiherpetic activity of four *Erythroxylum* species. *Acta Farmacéutica*

- Bonaerense (now: Latin American Journal of Pharmacy) 23, 506-509.
- González, J.L., González, K.L., Vélez, H., González, J.A., Payo, A., Molina, J., Prieto, S., 2006. Flavonoid glycosides from Cuban *Erythroxylum* species. Biochemical Systematics and Ecology 34, 539-542.
- González, J.A., García, N., Gordo, O., Vélez, H., 2008. Una Entidad Química Aislada de *Erythroxylum confusum* Britton: Palmitato de β -Amirina. Latin American Journal of Pharmacy 27, 85-8.
- Kaul, T.N., Middleton, E.Jr., Ogra, P.L., 1985. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. Journal of Medical Virology 15, 71-79.
- Khan, M.T.H., Ather, A., Thompson, K.D., Gambari, R., 2005. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. Antiviral Research 67, 107-119.
- Kimberlin, D.W., Whitley, R.J., 1998. Human herpesvirus-6: neurologic implications of a newly-described viral pathogen. Journal of Neurovirology 4, 474-485.
- Kurokawa, M., Basnet, P., Ohsugi, M., Hozumi, T., Kadota, S., Namba, T., Kawana, T., Shiraki, K., 1999. Anti-herpes simplex virus activity of moronic acid purified from *Rhus javanica* in vitro and in vivo. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 289, 72-78.
- Lohezic, F., Amoros, M., Boustie, J., Girre, L., 1999. In-vitro antiherpetic activity of *Erythroxylon laurifolium* (Erythroxylaceae). Pharmacy and Pharmacology Communications 5, 249-253.
- Lyu, S-Y., Rhim, J-Y., Park, W-B., 2005. Antiherpetic Activities of Flavonoids against Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) and Type 2 (HSV-2) In Vitro. Archives of Pharmacal Research 28, 1293-1301.
- Roig, J.T., 1974. Plantas medicinales, aromáticas y venenosas de Cuba. ed. Ciencia y Técnica, Havana.
- Ryu, S.Y., Lee, C.K., Ahn, J.W., Lee, S.H., Zee, O.P., 1993. Antiviral activity of triterpenoid derivatives. Archives of Pharmacal Research 16, 339-42.

ANEXO 3

González JL, Valiente M. Practical considerations in the hollow fiber liquid phase microextraction of quercetin for plant food applications.

To be submitted

Practical considerations in the hollow fiber liquid phase microextraction of quercetin for plant food applications

Johannes Luis González, Manuel Valiente

Departament de Química, Centre GTS, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Espanya

Correspondence: Professor Manuel Valiente, Department of Chemistry, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus, Bellaterra 08193, Spain
E-mail: Manuel.Valiente@uab.es
Fax: +34-93-5811985

Keywords: Hollow fiber liquid phase microextraction / Supported liquid membrane / Quercetin / Plant foods

Abstract

Quercetin is one of the most important flavonoid very widely present in fruits and vegetables, which constitute an important part of Mediterranean diet. A recent unpublished study, demonstrated the difficulties in the analysis of quercetin in beans as antinutritional compound during the pre-treatment method. In this work, the behaviour of quercetin through hollow fiber supported liquid membrane system as a future microextraction technique in the characterization of plant foods was investigated. Ten different liquid membranes were evaluated by using both pH gradient and anionic gradient transports with the use of different solvents and carriers for the facilitated transport. An appropriate pH in donor and acceptor solutions was studied for these two types of transports, and the quantity of quercetin remaining in each phase was determined. The results indicated a variety of situations related to the liquid membrane composition, carrier nature and the structural properties of quercetin, providing both positive and negative effects. Qualitative evaluation of some plant foods was carried out with a good selectivity and clean-up effect. Selective identification of quercetin was made by chromatographic HPLC technique.

1 Introduction

The flavonol quercetin is one of the most abundant flavonoid in plants and plant foods [Aherne and O'Brien, 2002]. Primarily present in onions, apples, kale, broccoli and black tea, it is part of the daily nutrition. Early interest in polyphenols was related to their antinutritional effects, due to their ability to bind proteins and minerals with further effects in the absorption and digestibility of food [Soetan, 2008]. Quercetin is one of the flavonols that undergoes extensive microbial metabolism in the gastrointestinal ecosystem [Singh, 2003]. Hence, identification and monitoring of this compound in plant foods are very important.

Commonly, HPLC was often used as a separation technique to determine quercetin [Zhang and Cui, 2005]. Prior to HPLC analysis, an effective preconcentration step with a good clean up effect is

always necessary. Recently, three-phase liquid-phase microextraction (LPME) based on a supported liquid membrane (SLM) sustained in small porous hollow fibers [Bardstu et al., 2007] has shown to be an attractive alternative for sample preparation of some groups of phenolic compounds [Liu et al., 2005; Liu et al., 2006; Berhanu et al., 2006; Yamini et al., 2006; Melwanki and Huang, 2006; Ye et al., 2007], because of strong reduction of the use of organic solvents, the possibility to enrich the analytes substantially without any solvent evaporation procedures, the high selectivity and excellent clean up from complex samples. In addition, analytes may be directly injected into HPLC system without any complementary procedures. Recent unpublished studies of static LPME based on SLM technique with the use of hollow fiber followed by HPLC for the analysis of

flavonols in beans as antinutritional compounds, demonstrated certain difficulties during the extraction of quercetin. Considering these experience and to carry out the aim of the present work, different factors in the static LPME of this flavonol, such as the pH of the donor and acceptor phases, as well as the type of transport and the composition of SLM, were evaluated in model samples to knowing the behavior of quercetin through this liquid membrane system. In this technique, analyte was extracted from an aqueous sample (donor phase, DS) through a water-immiscible organic phase in the pores of the hollow fiber as SLM and back extracted into another aqueous phase (acceptor phase, AS) inside the lumen of the hollow fiber. The enriched aqueous acceptor phase was injected into the LC. Furthermore, an approach to the applicability of LPME-HPLC method on some plant foods was studied for the future implementation.

2 Experimental

2.1 Reagents and samples

Standards and reagents: $\geq 98\%$ quercetin, methyltrioctylammonium chloride (Aliquat 336), and organic solvents: HPLC grade methanol, $>98\%$ dodecane, $>97\%$ dihexyl ether, 97% n-decanol, 99% tributyl phosphate (TBP), 98% trioctylamine (TOA), were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). The salts and acids: 99.5% NaCl, 98% NaOH and 98% $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 37% HCl and 85% H_3PO_4 , were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Water was purified by a Milli-Qplus system from Millipore (Milford, MA, USA).

A standard stock solution of quercetin ($1000 \mu\text{g}/\text{mL}$) was prepared by dissolving 10 mg of standard in 10 mL of HPLC-grade methanol and stored at $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Twenty milliliters of DS were prepared by taking appropriate amount of the stock solution of quercetin and diluting to the required volume of acidic water (saturated with NaCl) at pH2 and pH5 for pH gradient transport, and 0.1 M NaOH solution at pH11 for ionic gradient transport to obtain $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$. Solutions of 1 M NaOH at pH 12 and 2 M NaCl at pH 6 and 10 for anionic gradient transport,

were prepared by dissolving appropriate amount in 1000 mL of water.

Plant-food extracts, bean (*Vicia faba*) and broccoli (*Brassica oleracea*), were prepared by decoction of 1.5 g with 50 mL of water during 10 min , and green tea (*Camellia sinensis*) by infusion for 5 min . Twenty milliliters of each extract were placed in 20-mL vial for LPME method.

2.2 General extraction procedure

A quite modification of the extraction procedure previously described [Liu et al., 2005; Berhanu et al. 2006] was followed in this study. A hollow fiber Accurel[®] PP polypropylene Q3-2 ($200\text{-}\mu\text{m}$ wall thickness, $600\text{-}\mu\text{m}$ inner diameter, $0.2 \mu\text{m}$ pore size), obtained from Membrana GmbH (Wuppertal, Germany), was cut manually into approximately 15 cm length, meaning approximately $40\text{-}\mu\text{L}$ lumen, leaving both ends free for subsequent use. Then, the lumen of a single hollow fiber was flushed and filled with the organic solvent using a syringe and the two ends were sealed with a small piece of silicone tubing. The fiber was immersed in a vial with 20 mL of organic solvent and five minutes in ultrasonic bath was established as an impregnation step to form the SLM. After that, the two ends were opened and the lumen was slowly flushed with $200 \mu\text{L}$ of distilled water to remove any organic solvent inside the lumen. Three hundred microliters of AS were then flushed into the lumen to guaranty the removing of air bubbles and filling it completely. The two ends of the fiber were sealed again. Subsequently, the filled and sealed fiber was soaked in distilled water for 1 min and this ready SLM device was transferred to the 20-mL vial of DS. After the LPME at 500rpm of agitation and 3-h extraction for all studies, the AS containing the quercetin was collected from the lumen into 2-mL vials with inserts of $250 \mu\text{L}$. The collection of the sample was as follows: one of the ends of the sealed fiber was opened and connected to a retracted syringe needle and the other end then opened and put in the vial. Next, the syringe plunger was pushed in, to dispense the AS containing the quercetin into the vial and approximately $40 \mu\text{L}$

solution was collected. Prior the HPLC analysis, 2-3 drops of 0.1 M HCl were added and adjusted to pH2 value obtaining 100 μ L of final volume. After capping, the vial was put on the autosampler of the HPLC system for the injection of 20 μ L of each sample by duplicate.

2.3 Chromatographic conditions

A high-pressure liquid chromatograph equipped with an autosampler AS3000, gradient pumps P4000 and UV detector UV6000LP, with measurement facility at 192-800 nm, equipped with ChromQuest Software (Thermo-Fisher, USA) was used. The separation was performed on a HAlSil C18 column (250 x 4.6 mm, 5 μ m) with a mixture of 10mM Na₃PO₄ 12H₂O (pH adjusted to 2.5 with concentrated H₃PO₄) as mobile phase A, and methanol as mobile phase B. The elution gradient was 20% B (0-2 min), 20-60% B (2-6 min), 60-80% B (6-10 min), 80% B (3 min) at a 1 mL/min flow-rate. The sample volume was 100 μ L, the injection volume was 20 μ L by duplicate and the wavelength used for peaks integration was 260 nm.

3 Results and discussion

3.1 LPME context applied to quercetin analysis

Due to the polyhydroxyaromatic structure of quercetin, its difficult solubility as non-dissociated form in aqueous solutions is well-known [Herrero-Martínez et al., 2005]. For that reason is preferred to prepare aqueous solutions of quercetin from MeOH concentrated stock solutions. High solubility is obtained in alkaline solutions because of its acidic properties (pKa 7.09, 8.60, 11.35 and 13.22), where 80% of quercetin appears in dissociated form at pH>9. These conditions are necessary to consider if it is desired to use the LPME technique for phenolic compounds [Liu et al., 2005; Liu et al., 2006; Melwanki and Huang, 2006], since this technique is based on the extraction and re-extraction of the analyte through three phases, from an aqueous DS through an organic solvent as SLM into an aqueous AS inside the lumen of the hollow fiber by means of a pH or an ionic gradient [Jonsson and Mathiasson, 1992]. In this way, it is important that quercetin is

soluble in each phase during the extraction process as much dissociated as non-dissociated form.

Previous unpublished studies in the LPME of quercetin indicated very low enrichment factor (EF) values, which can be caused by the loss of the analyte in the DS or in the SLM. Some of the problems that can cause a very low extraction of quercetin can be discussed of the following way. By pH gradient transport, the mass transfer carried out due to the difference of pH between donor and acceptor solution. For quercetin, the pH<pKa in DS is needed to cross the first interface in its non-dissociated form. In these conditions the precipitation of quercetin in donor solution could happen. In addition, it could be stabilized in organic phase by interaction with the components of SLM (solvents and carriers). Finally, it must dissociate to cross the second interface towards the AS (pH>pKa), meaning an additional process. On the other hand, by ionic gradient transport, the driving force is an ion flow in both senses of the liquid membrane. This system could be the most effective since the molecule always crosses the phases in dissociated form, which allows to a high solubility in the aqueous phases, but with the inconvenient of the non desirable stabilization of the molecule in DS. In general, due to the characteristics of the quercetin structure, the composition of the SLM and the pH values of aqueous phases must be consider for LPME studies.

3.2 Supported liquid membrane composition

To study the behavior of quercetin during its transport through the SLM towards the AS in the three-phase LPME process, it is very important a suitable selection of the different components of the SLM such as organic solvent and carriers to minimize the loss of analyte. The composition of the SLM can favor the transport and a commitment is to establish both a good extraction during the transport in the first interface donor-SLM and a suitable liberation of the analyte towards the lumen of the hollow fiber in the second interface SLM-acceptor.

The composition of different organic phases (Table 1) was studied and the results are shown in Figure 1, where inactive and active solvents were used

with addition of some carriers in both pH gradient and anionic gradient transports.

Table 1. Composition of SLM for LPME of quercetin

System	Component ^{a)}	Composition (% w/w)
1	DHE/TOA	75:25
2	DHE/TBP	75:25
3	DOD/DEC/TOA	50:25:25
4	DOD/DEC/TBP	50:25:25
5	DHE/TOA+TBP	70:15:15
6	DOD/DEC/TOA+TBP	50:20:15:15
7	DHE/Aliquat	80:20
8	DOD/DEC/Aliquat	75:5:20
9	DOD/DEC/Aliquat	65:15:20
10	DOD/DEC/Aliquat	50:30:20

^{a)} DOD: dodecane, DHE: dihexyl ether, DEC: n-decanol, TOA: trioctylamine, TBP: tributylphosphate, Aliquat: methyltrioctylammonium chloride

Dihexyl ether (DHE) was used as moderately active solvent and a mixture of n-decanol (DEC) and dodecane (DOD) was used to decrease the formation of hydrogen bonds between DEC and quercetin that could cause an irreversible stabilization of the molecule in the SLM. They were used in combination of some carriers in proportion of 20-25% to facilitate the transport, such as trioctylamine (TOA) and tributylphosphate (TBP),

which through solvating mechanisms facilitate the phenolic compound extraction [Jung et al., 2002], and, on the other hand, methyltrioctylammonium chloride (Aliquat 336), that is able to form an ionic pair with the molecule and to facilitate the transport by means of a flow of charged species [Jonsson and Mathiasson, 1999; Schlosser et al., 2005; Yamini et al., 2006].

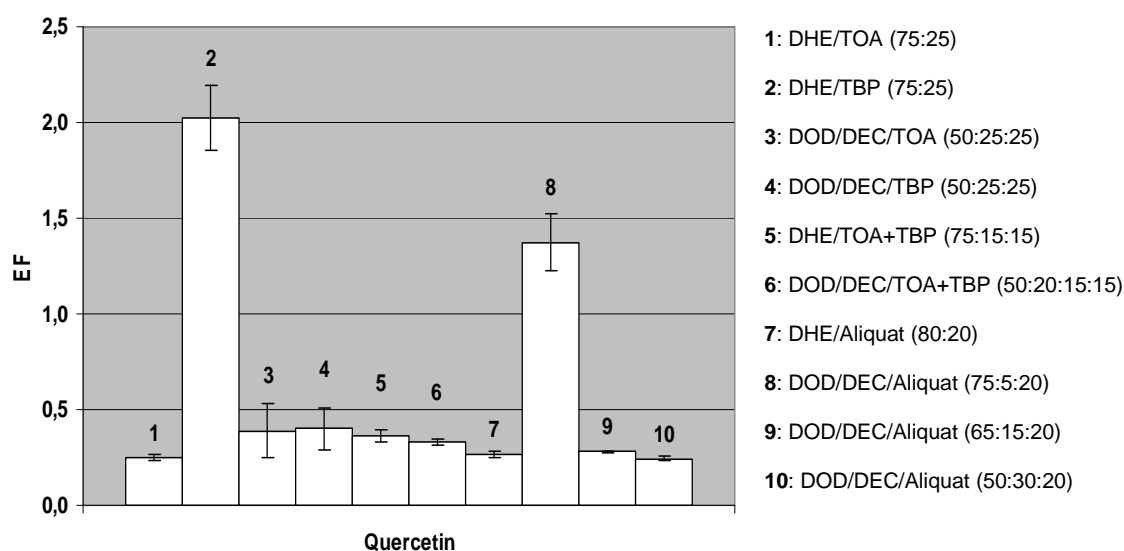


Figure 1. Effect of SLM composition on the EF of quercetin. General conditions: 0.5 µg/mL of quercetin in 20-mL donor solution; stirring speed of 500 rpm; 40 µL of acceptor solution and 3-h extraction time. Conditions for 1-6: donor solution at pH2 with HCl, 500 mM of NaCl and 1M NaOH at pH12 as acceptor solution. Conditions for 7-10: donor solution at pH11 with 0.1M NaOH and 2M NaCl at pH6 as acceptor solution.

In relation to pH gradient, and in the case of systems 1 and 2, the TBP presence increase the enrichment factor (EF) because this carrier form solvating complexes less stable than TOA [Wardell and King, 1978], and allows to a easier liberation of the analyte towards the AS. Nevertheless, this phenomenon is not observed for systems 3 and 4, where the presence of a more active solvent as DEC seems to favor the stabilization of quercetin in the SLM. The use of a mixture of these two carriers in systems 5 and 6 did not offer an improvement, which indicated a negative competition in the extraction of quercetin. In the case anionic gradient with the use of Aliquat 336, the system 8 that uses a very little amount of DEC, allowed the best extractive result. This somehow indicated that a small proportion in the SLM of a more active solvent (DEC) than the DHE, was sufficient to favor the extraction of quercetin and favoring as well the re-extraction.

Despite the obtaining of an improvement in the LPME of quercetin, the best EF turned out to be very low. This phenomenon has been observed for other types of phenolic molecules as salbutamol and terbutaline in three-phase liquid membrane systems with the use of hollow fiber [Yamini et al., 2006]. It is necessary against this background, to consider the characteristics of donor and acceptor phases that can favor the extraction of quercetin through the SLM in both type of transports.

3.3 Donor and acceptor phase composition

In the LPME with the use of a pH gradient, one of the variables to fit is the pH of aqueous phases to guarantee an optimal flow of the analyte through the SLM. For quercetin ($pK_a > 7$), it is necessary to consider several pH values that can favor the transport of the molecule by means of pH gradient. A pH range of DS was established between pH2 and pH5, in such a way that, on the one hand, quercetin would not precipitate to very low pH (pH2) and, on the other hand, would guarantee the permanence of non-dissociated form to pH near pK_a (pH5). A value of pH12 for AS with the use of 1M NaOH solution was fixed since a value from

$pK_a + 3.3$ have been previously considered sufficient for the pH gradient transport [Jonsson et al., 1993].

Systems 2 and 4 (Table 1) were selected for this study and the results obtained under these conditions (Figure 2) showed that SLM with the mixture of DHE/TBP allowed a better extraction of quercetin than DOD/DEC/TBP mixture as much to pH2 as to pH5. These results confirm that under pH gradient, the transport of the quercetin is favored by the presence of a little active solvent like DHE. On the other hand, the transport is facilitated when a wider range of pH was established.

In the case of anionic transport that settles down with the use of Aliquat 336 carrier, the analyte migrates through SLM in dissociated form and the pH of AS can influence the transport. In order to establish the ionic gradient, it is enough that the pH of DS is major that pK_a of the analyte to guarantee the dissociated form of the molecule [Jonsson et al., 1993]. For quercetin, which 80% of the molecule is in dissociated form at $pH > 9$ [Herrero-Martínez et al., 2005], the pH of DS was fixed to pH11 with 0.1M NaOH solution, consequently a low ion concentration is guaranteed as well in this phase to avoid a competition during the anionic transport of quercetin towards the AS [Yamini et al., 2006]. As far as the characteristics of the AS inside the hollow fiber, it is necessary to use a concentrated solution of an ion, for example Cl^- that allows the flow in inverse sense through the membrane. For that reason, 2M NaCl (pH6) was used as AS and pH8 was also considered by addition to drops of 1M NaOH, because of the $pK_a > 7$ of quercetin. Finally, the system 8 (Table 1) was used since this mixture showed the best result by anionic gradient transport in the studies previously described.

As it is observed in Figure 2, the results show that the transport is facilitated when the pH of AS is $> pK_a$ of quercetin (pH8). When the solution of 2M NaCl is pH6, inferior and near of $pK_a = 7$, may be a fraction of quercetin molecules is forced to pass in non-dissociated form towards the interior of the membrane during its re-extraction, which is not favored with respect to the anionic transport. However, the EF values continue being low, which

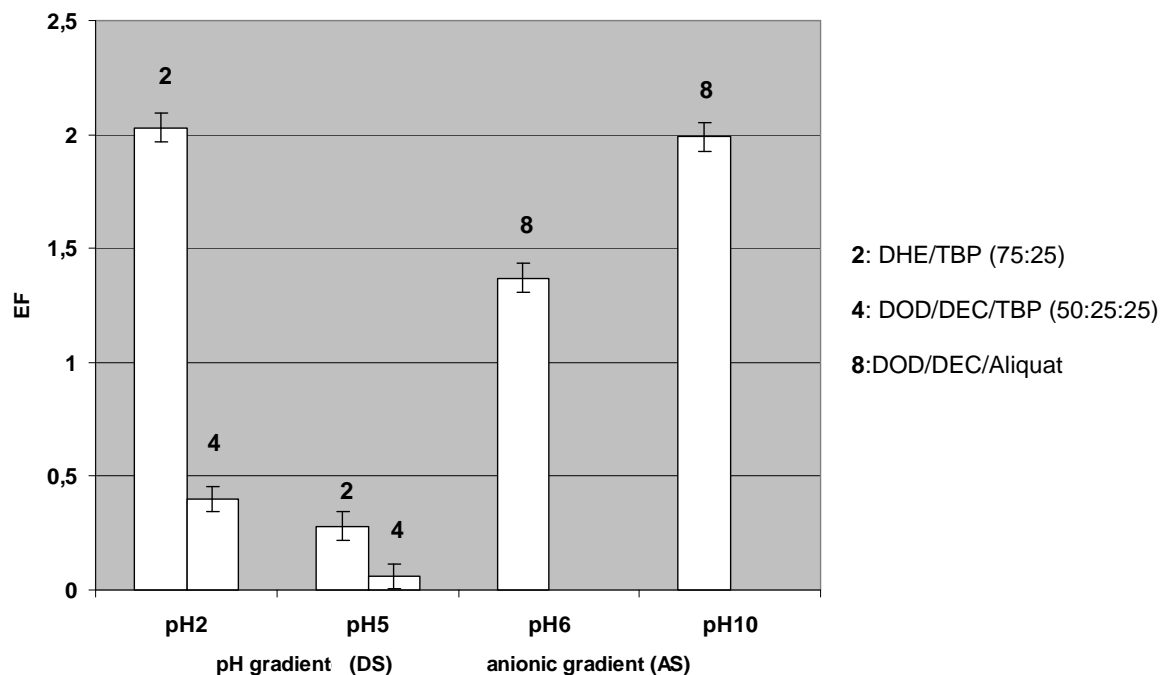


Figure 2. Effect of donor and acceptor phase composition on the EF of quercetin. General conditions: 0.5 µg/mL of quercetin in 20-mL donor solution; stirring speed of 500 rpm; 40 µL of acceptor solution and 3-h extraction time. Conditions for **2** and **4**: donor solution (DS) at pH2 and pH5 with HCl, 500 mM of NaCl and 1M NaOH at pH12 as acceptor solution. Conditions for **8**: acceptor solution (AS) at pH6 and pH10 with 2M NaCl and 0.1M NaOH at pH11 as donor solution.

is an indicator of the presence of other situations or interactions that influence the correct transport of quercetin.

3.4 Three-phase hollow fiber liquid membrane system

In order to approach to the nature of interactions between quercetin and liquid membrane system, the best conditions obtained for the LPME in both type of transports (systems 2 and 8) were selected to determine the proportion of quercetin remaining in each phase after the extractive process.

As shown in **Figure 3**, after 3h of extraction by pH gradient transport almost 60% of quercetin remained in DS and the other 40% in the SLM, meaning a very small amount of analyte in AS. Therefore, in regime of pH gradient the critical step is in re-extraction. To carry out the re-extraction of quercetin from the SLM it is necessary that the molecule dissociates after being extracted in its

neutral form. In spite of use of concentrated NaOH solution as AS at pH12, that strongly constitutes alkaline conditions that could guarantee a dissociation of the molecule, under these conditions, quercetin resists to cross the second interface. This phenomenon is possibly due to a high stabilization of the solvating complex quercetin-TBP in the SLM, meaning a faster extraction than re-extraction process. It is known that quercetin is one of the less lipophilic flavonoids, with a value of partition coefficient octanol-water of 1.82 [Rothwell et al., 2005], and phenolic compounds with a value near 3 under liquid membrane systems easily are dissolved in the organic phase but are difficult re-extract in the AS, showing low extraction efficiencies [Chimuka et al., 2000]. These antecedents allowed understanding the difficulties found in the present work in the use of LPME for quercetin. This phenomenon can be improved with the search of

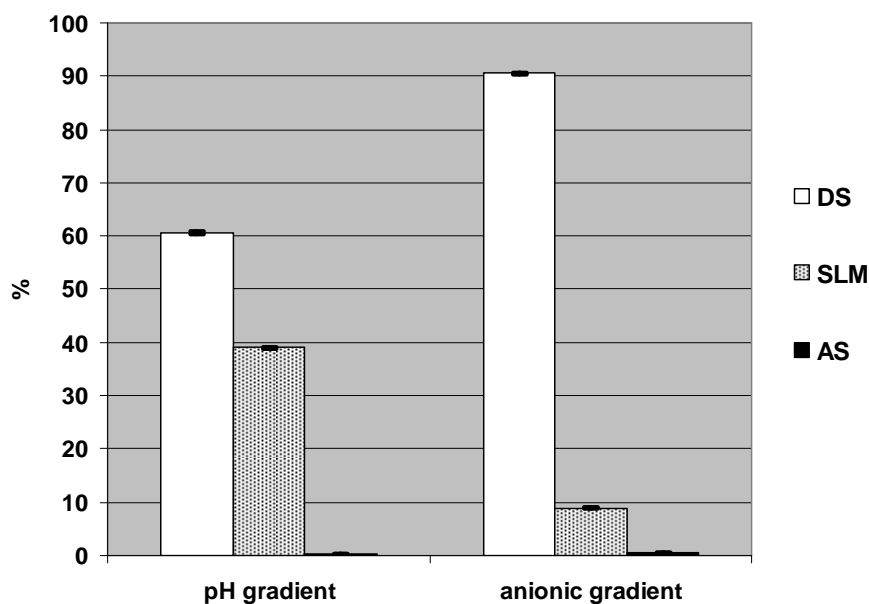


Figure 3. Mass balance of quercetin in the three-phases liquid membrane system after LPME. General conditions: 0.5 µg/mL of quercetin in 20-mL donor solution (DS); stirring speed of 500 rpm; 40 µL of acceptor solution (AS) and 3-h extraction time. Conditions for pH gradient: donor solution at pH2 with HCl; 500 mM of NaCl; 1M NaOH at pH12 as acceptor solution; supported liquid membrane (SLM): DHE/TBP (75:25). Conditions for anionic gradient: 0.1M NaOH at pH11 as donor solution; 2M NaCl at pH10 as acceptor solution; SLM: DOD/DEC/Aliquat (75:5:20).

carrier which doubly allows to a suitable extraction and a low stabilization of the complex in the SLM.

On the other hand, the results obtained for LPME under anionic gradient were different. In **Figure 3** is shown that the critical step appears in the first extraction, meaning a slower transport during the extraction than re-extraction, where practically all quercetin (90%) remains in the sample. This result can be also explained considering the structural characteristics of the quercetin molecule. Under anionic gradient, quercetin must migrate through the phases in dissociated form, but probably its high solubility in alkaline solutions, in this case 0.1M NaOH at pH11, prevails against the capacity of the system to establish an anion flow in both senses. The carrier Aliquat 336 is not able in this case to extract the quercetin from this alkaline solution, remaining in SLM approximately 10% of analyte after 3h of extraction process.

Considering the results for both types of transports, LPME is not the best method to realize an extraction

of quercetin from aqueous samples. The number of hydroxyl groups of the molecule and the aromatic system of its structure cause the formation of inter- and inter-molecular hydrogen bonds that in many occasions make difficult any extractive process. A future variant could be a derivatisation step before the LPME that diminishes this type of interaction by means of the blockade of its active sites.

3.5 Applicability of LPME on some plant foods

However, to observe the selectivity of the LPME, the clean up of real samples and in views of a possible future application, the analysis of the quercetin in several types of foods of the Mediterranean diet was carried out. Three different samples of plant foods: bean (*Vicia faba*), broccoli (*Brassica oleracea*) and green tea (*Camellia sinensis*) were used. In the case of broccoli and green tea, particularly are rich in quercetin and derivatives [Aherne and O'Brien, 2002]. In **Figure 4** is shown the chromatograms of the sample extracts or DS (solid line), overlapped

with the chromatograms of acceptor solutions (discontinue line) obtained after 3-h LPME.

For the three extracts a relatively high level of pre-concentration was observed, as well as a high effect of clean up, especially for broccoli and green tea.

Nevertheless, a suitable selectivity in the quercetin extraction, which was identified near 11.2 min, was obtained. Other two flavonoids could be detected in addition with a good resolution: catechin and rutin, around 6 and 10 min, respectively.

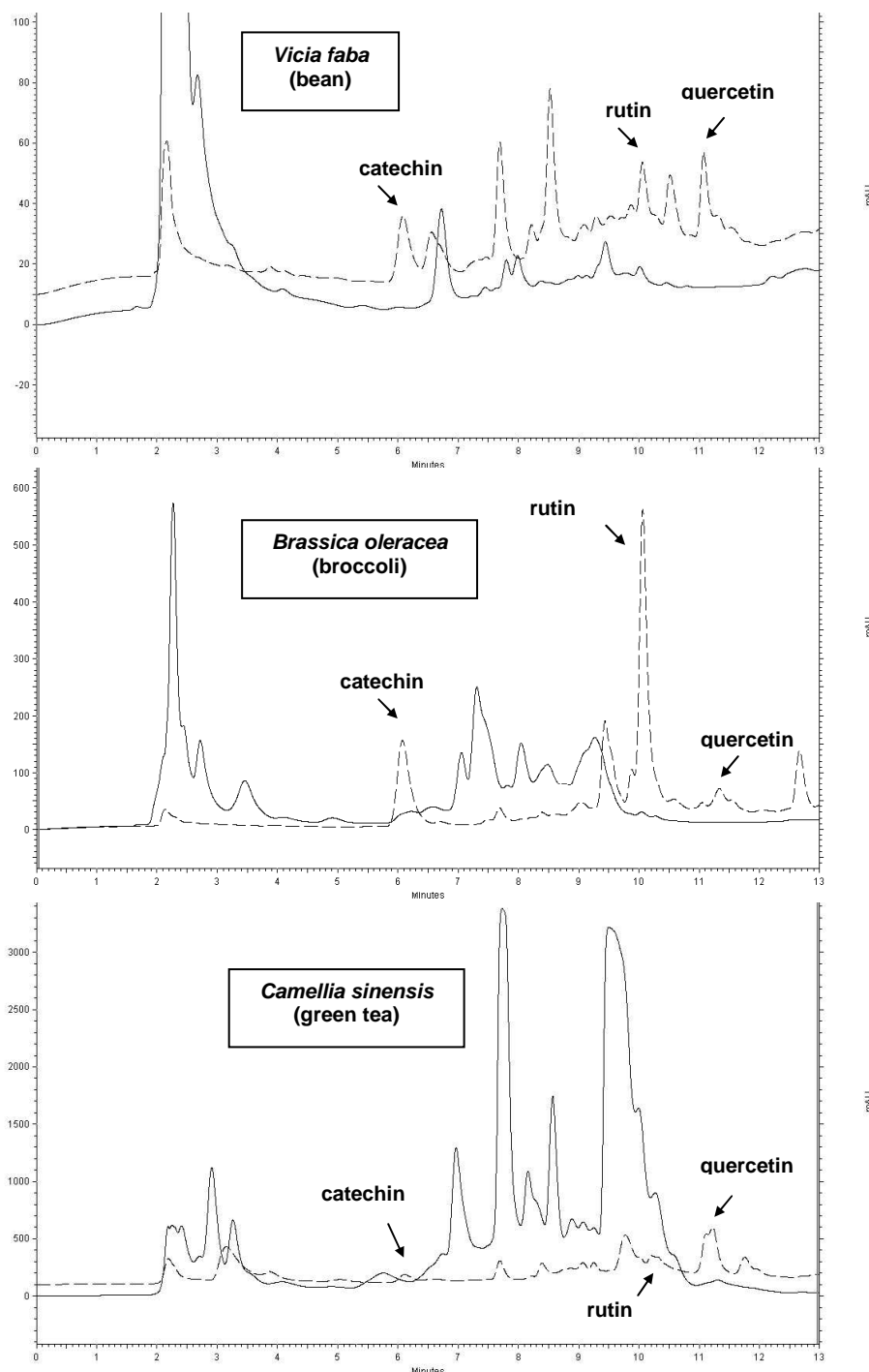


Figure 4. Chromatograms of the aqueous extract of *Vicia faba*, *Brassica oleracea*, *Camellia sinensis* before (solid line) and after (discontinue line) LPME process. Identification of catechin (6.1 min), rutin (10.1 min) and quercetin (11.2 min).

4 Concluding remarks

The LPME was not a good pre-treatment method for the extraction and pre-concentration of quercetin in samples model. It demonstrated that the facilitated transport of quercetin with the use of a little active solvents and carriers that form less stable complexes in the SLM allowed greater extraction efficiency. The applicability of the LPME-HPLC method in plant foods allowed to a suitable selectivity in the pre-concentration of quercetin and a good clean up effect from real samples. This method would turn out to be an economic analytical tool and easy to use in future studies of analysis of quercetin as antinutritional agent in plant foods if its extraction efficiency by means of the diminution of the interactions of the analyte with the components of the membrane system is well optimized.

Acknowledgements

The Spanish Ministry for Science and Education is acknowledged for the financial support provided (Project: CTM2006-13091-C2-02).

References

- Aherne, S. A., O'Brien, N. M., *Nutrition* 2002, 18, 75–81.
- Bardstü, K. F., Ho, T. S., Rasmussen, K. E., Pedersen, S., Jonsson, J. A., *J. Sep. Sci.* 2007, 30, 1364 – 1370.
- Berhanu, T., Liu, J., Romero, R., Megersa, N., Jönsson, J. A., *J. Chromatogr. A* 2006, 1103, 1 – 8.
- Chimuka, L., Mathiasson, L., Jönsson, J. A., *Anal. Chim. Acta* 2000, 416, 77 – 86.
- Herrero-Martínez, J. M., Sanmartín, M., Rosés, M., Bosch, E., Ràfols, C., *Electrophoresis* 2005, 26, 1886 – 1895.
- Jönsson, J. A., Mathiasson, L., *Trends Anal. Chem.* 1992, 11, 106 – 114.
- Jönsson, J. A., Lovkvist, P., Audunsson, G., Nilve, G., *Anal. Chim. Acta* 1993, 277, 9 – 24.
- Jönsson, J. A., Mathiasson, L., *Trends Anal. Chem.* 1999, 18, 325 – 334.
- Jung, V., Chimuka, L., Jönsson, J. A., Niedack, N., Bowens, P., Alsanius, B., *Anal. Chim. Acta* 2002, 474, 49–57.
- Liu, J., Jönsson, J. A., Mayer, P., *Anal. Chem.* 2005, 77, 4800 – 4809.
- Liu, J., Hu, X., Peng, J., Jönsson, J. A., Mayer, P., Jiang, G. B., *Anal. Chem.* 2006, 78, 8526 – 8534.
- Melwanki, M. B., Huang, S. D., *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 2078 – 2084.
- Rothwell, J. A., Day, A. J., Morgan, M. R. A., *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 4355 – 4360.
- Schlosser, S., Kertesz, R., Martak, J., *Sep. Purif. Technol.* 2005, 41, 237 – 266.
- Singh, B., Bhat, T. K., Singh, B., *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 5579 – 5597.
- Soetan, K. O., *African J. Biotechnol.* 2008, 25, 4713 – 4721.
- Wardell, J. M., King, C. J., *J. Chem. Eng. Data* 1978, 23, 144 – 148.
- Yamini, Y., Reimann, C. T., Vatanara, A., Jönsson, J. A., *J. Chromatogr. A* 2006, 1124, 57–67.
- Ye, C., Zhou, Q., Wang, X., Xiao, J., *J. Sep. Sci.* 2007, 30, 42 – 47.
- Zhang, Q., Cui, H., *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 1171 – 1178.

ANEXO 4

González JL, Valiente M. Simultaneous determination of BTEX and their metabolites in teeth as environmental biomarkers using solid-phase microextraction followed by HPLC and GC/MS.

To be submitted

Simultaneous determination of BTEX and their metabolites in teeth as environmental biomarkers using solid-phase microextraction followed by HPLC and GC/MS

Johannes L. González, Manuel Valiente*

Departament de Química, Centre GTS, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Espanya.

Abstract

The present study concerns with one-step simple extraction of BTEX and its metabolites (phenols and aromatic acids) from spiked tooth using NaOH solution followed by SPME-HPLC (or GC-MS) determination. Optimization of both the spiking procedure and extraction step of these analytes from tooth was carried out. Two fibers coated either with carboxen-polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) or polyacrylate (PA) were used to establish a methodology for determining the level of environmental exposure of dental tissues. The optimization of SPME variables, such as the absorption and desorption times, was also determined for all analytes at 30 C using spiked solutions. For BTEX analysis, a HS-SPME-GC/MS method was established. Finally, the features of the SPME-HPLC and HS-SPME-GC/MS methods were determined. Linearity for SPME-HPLC method was established using spiked solutions with both BTEX and metabolites of 2.5, 5.0, 10.0, 25.0 µg/mL, and working at the optimum absorption and desorption times. The obtained results indicate a good linearity (r^2 above 0.994) for all analytes. Triplicate analyses including three SPME extractions for each spiked sample were performed with a precision lower than 15%. LODs were 2–333 ng for SPME-HPLC and 0.6-0.9 pg for SPME-GC/MS methods in spiking solutions. The Kd values were determined for the first time to SPME-HPLC method and all Kd values were higher than those reported for SPME-GC. Micrograms per tooth gram of BTEX and fenols were quantified in ten human teeth and aromatic acids were not identified.

Keywords: Solid-phase microextraction; HPLC, GC-MS, Benzene, Toluene, Ethylbenzene, *p*-Xylene; Phenol; *p*-Cresol; Mandelic acid, Hippuric acid; 4-Methylhippuric acid; human teeth samples

1. Introduction

Benzene, toluene, ethylbenzene, and *o*-, *m*-, and *p*-xylenes (BTEX) are widely used not only for industrial raw materials but also as solvents, primary components of motor vehicle gasoline, and starting products in a variety of chemical syntheses. Factory workers, in particular, are occupationally exposed to these solvents [Moon et al, 1997]. These applications have rendered BTEX ubiquitous in the environment. In addition, these volatile organic compounds are highly toxic and they are easily absorbed via the lungs and the skin may also be a significant absorption route [Reese, 1993]. Human exposition to these compounds can have serious health consequences like neurological diseases or cancer. In recent years, BTEX and corresponding metabolites have been widely studied, owing to the

health risks associated with exposure to these organic compounds [Shen, 1998; Andreoli et al, 1999; Tolnai et al, 2000; Wang et al, 2003; Hinwood et al, 2007; Yimrungruang et al, 2008].

It is well known that the phenols are metabolites of benzene and its alkyl derivatives [Bieniek, 1994]. Primarily, alkylbenzenes are oxidized at the alkyl side chain, which in turn, give rise to aromatic carboxylic acids. Hippuric acid (HA) is the chief metabolite of toluene, mandelic acid (MA) and phenylglyoxylic acid (PGA) are also major metabolites of ethylbenzene, and 2-, 3-, 4-methylhippuric acid (mHA) are metabolites of xylene isomers [Angerer et al, 1992]. Thus, they are diagnostically more specific for determining the extent of occupational or environmental exposure. The assessment of BTEX metabolite concentrations

* Correspondence: M. Valiente, ^aDepartament de Química, Centre GTS, Universitat Autònoma de Barcelona.

Fax: (34) 935811985, Phone: (34) 935812903, e-mail: Manuel.Valiente@uab.es

on biological materials permits the degree of exposure.

HPLC, GC and capillary zone electrophoresis (CZE) are used to determine BTEX and their metabolites in biological fluids, such as urine and blood, when monitoring of workers exposed [Angerer et al, 1988; Bieniek, 1996; Moon et al, 1997; Bergamaschi et al, 1999; Fujii et al, 1999; Laffon et al, 2001; Sperlingova et al, 2004]. HPLC methods facilitate the simultaneous determination of MA, PGA, mHA metabolites [Astier et al, 1992; Burrini, 1998], and the analysis time is usually between 20-50 min. The retention time of gas chromatography methods is shorter but the main disadvantage of GC methods is the need for an extraction step with an additional derivatization procedure of samples that makes the determination more laborious and time consuming. CZE is found to be superior to HPLC and GC; analysis time is much shorter (10 min) [Wang et al, 2003]. However, this method is not commonly used yet.

The previous pre-concentration step before the chromatographic analysis of BTEX and metabolites is necessary to determine traces of these compounds in liquid and solid samples. Solid-phase microextraction (SPME) and headspace-SPME (HS-SPME) are the rapid, selective, easily automated and solvent-free techniques, [Arthur and Pawliszyn, 1990; Pawliszyn, 1997, 1999; Penton, 1999] that simplifies the analysis of volatiles and non-volatiles compounds in environmental matrixes such as water or soil. In the SPME optimization studies for BTEX, phenols and aromatic acids determination, the best results are obtained in liquid samples [Ezquerro et al, 2004] at pH 2 and saturated with NaCl [van Doorn et al, 1998; Baciocchi et al, 2001]. The studies of the temperature effects in the SPME of these analytes demonstrates that the optimum extraction efficiency is achieved in the range 20-30 °C [Huang et al, 1997; Ezquerro et al, 2004; Lee et al, 2007]. The determination of BTEX [Ezquerro et al, 2004; Lee et al, 2007], phenols [Buchholz and Pawliszyn, 1994; Barták et al, 1997; van Doorn et al, 1998; Baciocchi et al, 2001], and aromatic acids [Fan and Deng, 2002] by SPME followed to GC,

HPLC and CZE techniques allows satisfactory results with high separation efficiency, simplicity, low injection volume, and short analytical time.

It is well known, that body fluids are an adequate biomarker to asses exposure to BTEX during a short period of time. Up to now, no report has been found in the use of teeth as biomarkers cumulative human exposure to BTEX. This may contribute to ascertain the evolution of some environmental contaminants on human dental tissues such as heavy metals, mainly lead, cadmium, zinc and manganese, that are sequestered by mineral phase of teeth during their formation [Gerlach et al, 2000; Nowak and Chmielnicka, 2000; Tvinnereim et al, 2000; Ericson et al, 2001; Kang et al, 2004; Arora et al, 2006; Costa de Almeida et al, 2007], dioxin in mammals teeth as biomarkers [Murtomaa et al, 2007], fluor determination of human teeth used as a biomarker of increased fluoride exposure [Kierdorf and Kierdorf, 1999] and nicotine and cotinine that were studied in teeth for monitoring cumulative exposure to environmental tobacco smoke [Pascual et al, 2003; Marchei et al, 2008].

The aim of this study is to develop a method for consecutive determination of BTEX and metabolites in human teeth to obtain a promising and future tool for categorizing cumulative exposure to BTEX and its relation with dental health. A SPME-HPLC (or HS-SPME-GC/MS) method for simultaneous analysis of BTEX, phenols and aromatic acids is investigated for the first time in spiked solution at pH 2 and saturated with NaCl using two different SPME fibers coated with carboxen-polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) and polyacrylate (PA) to establish a methodology for determining the level of environmental exposure to BTEX, using dental samples as new biomarkers. The HS-SPME-GC/MS method for BTEX analysis is also investigated. The optimization of the spiking and extraction step of BTEX and metabolites is investigated from spiked teeth, and the optimization of SPME variables, such as the absorption and desorption times, is also studied for all analytes at 30 °C in spiked solutions. Finally, the features of the SPME-HPLC and HS-

SPME-GC/MS methods are established and used to determine BTEX and metabolites in human teeth.

2. Experimental

2.1. Chemicals and samples

Acetonitrile (Chromasolv grade) and methanol (Chromasolv grade) were supplied by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Anhydrous potassium dihydrogenphosphate (KH_2PO_4 , 99.5%) were obtained from Merck (Hohenbrunn, Germany). Trisodium phosphate ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 99.5%), acetic acid glacial and 85% orthophosphoric acid were obtained from Panreac (Madrid, Spain). Deionised water was purified through a Millipore purification system from Millipore (Milford, MA, USA). The following chemicals were used to prepare stock solutions in methanol: benzene (99.8%) from SDS (Peypin, France), toluene ($\geq 99\%$) from Merck, ethylbenzene ($\geq 99\%$), *p*-xylene (99%), chlorobenzene (99%), phenol (99.5%), *p*-cresol (99%), (R)-(-)-mandelic acid (98%), hippuric acid ($\geq 97\%$), and 4-methylhippuric acid (98%) from Sigma-Aldrich.

In order to reduce losses by evaporation of BTEX and phenols, the standard solutions were prepared, just before each study and chromatographic analysis, in sealed 20 mL- or 250 μL -vials without free headspace since BTEX and phenols migrate easily from solution to the headspace. The stock solution was prepared by dissolving appropriate amounts of each standard in methanol/water (1:1). The appropriate dilutions to obtain spiked solutions were carried out in 20 mL-vials containing 10 mL of 1M NaOH solution. These spiked solutions were used to optimize the SPME parameters and for the calibration of SPME-HPLC and SPME-GC/MS methods.

Bovine teeth were used as a model biological matrix for the optimization of spiking and extraction steps. These teeth were previously stored in 1% chloramine T (Sigma-Aldrich) aqueous solution to avoid tooth degradation. Human teeth were collected at dental clinic of Drassanes in Barcelona between October and November 2008. Individual human tooth was washed with water by the dentist

post-extraction, and placed in 20-mL glass vial containing 1M NaOH solution. Age, profession and smoking characteristic were determined for each donor.

2.2. Spiking and extraction procedures

Clean teeth were immersed in 20-mL glass vials sealed with aluminum caps with 3.0 mm thick PTFE septa (Sugelabor, Madrid, Spain), containing standard solution (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) without headspace. The teeth were shaken using an ultrasonic bath and the kinetic of absorption of BTEX and metabolites was studied by duplicate at 2, 4, 8 and 12h. After the each spiking time period, an aliquot of 250 μL of spiking solution was analyzed by HPLC. The depletion of the concentration in the spiking solution was considered as the analyte absorption in the spiked tooth.

The spiked teeth were immersed in 20-mL glass vials sealed with aluminum caps with 3.0 mm thick PTFE septa, containing 1M NaOH without headspace to extract all analytes in one step. The kinetic of extraction of BTEX and metabolites was studied in an ultrasonic bath at 4, 8 and 10h. An aliquot of 250 μL for each extraction time was analyzed by HPLC.

2.3. SPME procedure

An 85 μm CAR/PDMS fiber (Supelco, Madrid, Spain.) was used for BTEX extraction and an 85 μm PA fiber (Supelco) was used to extract the phenols and aromatic acids. Prior to the extraction of analytes, CAR/PDMS fiber was preconditioned with methanol for 30 min at 30 $^\circ\text{C}$ and PA fiber with the mobile phase solvents (methanol/10 mM Na_3PO_4 , 20:80 v/v) used in the HPLC analysis. For the consecutively SPME of analytes, BTEX and phenols were extracted from the headspace of 20mL-vial (HS-SPME), while the aromatic acids and the non-volatile phenols fraction were extracted by vertically immersion of the PA fiber in the spiked solutions. Each 10 mL of spiked solution was kept for 10 min at 30 $^\circ\text{C}$ before each SPME procedure. During preconditions and extractions, the sample solutions were continuously agitated at a constant velocity of

500 rpm with a Teflon-coated stir bar (0.8 cm x 2.0 cm) on a magnetic stirrer. Extraction and desorption temperature was at 30 °C and a water bath was used. After each extraction-desorption operation was completed, the fiber was cleaned by immersing it in methanol or the HPLC mobile phase for 10 to 20 min and dried in the air for 1 min.

For HS-SPME-HPLC of BTEX, the CAR/PDMS fiber was immersed vertically in the headspace of the 20 mL-vial, containing 10 mL of spiked solution. After the extraction equilibrium was reached between the fiber and the BTEXs, the fiber was withdrawn from the headspace and desorbed by immersing it in a 250 µL-vial with methanol. For HS-SPME-GC/MS of BTEX, desorption step was carried out in a GC injector port. Following the BTEX extraction, some drops of concentrated HCl (JTBaker, Tarragona, Spain) were then added to spiked solution within a pH value of 2. The solution was also saturated with NaCl (300 g/L). The PA fiber was then immersed in the headspace of the 20 mL-vial to extract the phenols, and after the extraction equilibrium was reached, the fiber was desorbed into 250 µL-vial with HPLC mobile phase solvents. Consecutively, the PA fiber was vertically immersed in the spiked solution (pH 2) to extract the aromatic acids and the dissolved phenol fraction. After the extraction equilibrium was reached, the fiber with extracted analytes was then desorbed into 250 µL-vial with HPLC mobile phase solvents. The analytes desorbed were then injected into the HPLC system for separation.

To ensure effective SPME extraction of BTEX and metabolites, both extraction time and desorption time parameters were optimized. The stock solution of standards (2500 µg/mL) was diluted in a 10 mL of 1M NaOH solution, 250 times for BTEX and 50 times for phenols and acids to obtain the spiked samples of analytes. These solutions were placed in the 20-mL glass vials and immediately sealed with aluminum caps with 3.0 mm thick PTFE septa. The optimized extraction time was studied from 10 to 75 min. The extracted analytes on the fiber were then desorbed for 30 min. To determine the optimized desorption time, each

fiber was immersed into 20 mL-vial with the spiked solution for an extraction time optimized before. The extracted analytes on the fiber were then desorbed from 10 to 40 min into 250 µL-vial with HPLC mobile phase solvents or methanol. A fresh 10 mL of spiked solution was used for each extraction and desorption time period.

2.4. Validation of SPME method in spiked solutions

The spiked solutions were prepared from stock solution (2000 µg/mL) by appropriate dilutions of the standards in a 20 mL-vial containing 10 mL of 1M NaOH solution for a concentration ranging from 2.5 to 25 µg/mL. The vials were immediately sealed with aluminum caps with 3.0 mm thick PTFE septa. For the SPME of each analyte, the optimized conditions of extraction and desorption time were used. Triplicate analyses and three extractions (until the complete extraction of the analytes) were performed. Calibration curves were constructed by plotting the peak area against the concentration of each analyte in the spiked solutions and were used for the calculation of linearity, limit of detection (LOD) and precision of all analytes. The estimation of LODs was based on the lowest detectable peak with a signal-to-noise ratio of three [Vial and Jardy, 1999] and the distribution constants (K_d) of BTEX, phenols and aromatic acids were calculated as described by van Door et al [1998].

2.5. Chromatographic conditions

A high-pressure liquid chromatograph equipped with an autosampler AS3000, gradient pumps P4000 and UV detector UV6000LP, with measurement facility at 192-800 nm, equipped with ChromQuest Software (Thermo-Fisher, USA) was used. The separation was performed on an Alltech C-18 cartridge column (250 x 4.6 mm, 10 µm) with a mixture of 10mM Na₃PO₄ 12H₂O (pH adjusted to 7.0 with concentrated orthophosphoric acid) as mobile phase A, and methanol as mobile phase B. The elution gradient was 20% B (0-2 min), 20-60% B (2-6 min), 60-80% B (6-10 min), 80% B (10-18 min) at a 1 mL/min flow-rate and 50 °C of temperature. The

sample volume was 100 μ L and the wavelength used for peaks integration was 260 nm for BTEX and phenols, and 220 nm for aromatic acids. As ethylbenzene was not well separated from the *p*-xylene isomer in the chromatogram; both compounds were analyzed as a mix peak in this case.

A Thermo Scientific TRACE GC UltraTM equipped with a split/splitless injector and coupled to a Thermo Scientific DSQTM II single quadrupole GC/MS system (Barcelona, Spain) was used for BTEX study. Analytes were separated with a SGE Analytical Science (Barcelona, Spain) capillary column (30-m x 0.25-mm WCOT fused silica, 0.5- μ m BP-5 stationary phase). The GC oven temperature program was as follows: 35 °C held 3 min, rate 5 °C/min to 90 °C, rate 100 °C/min to 250 °C, held 10 min, using helium at a constant flow rate of 1 mL/min. The injector was equipped with a 0.8-mm I.D. liner and injector temperature was maintained at 290 °C for the 85 μ m CAR/PDMS fiber, with split-less mode at initial time followed by a 1:50 split ratio at 3 min. Electron impact ionization (EI) was used as ionization mode for BTEX and chlorobenzene as internal standard.

3. Results and discussion

3.1. Chromatographic separation by HPLC

BTEX, phenols and aromatic acids are compounds with different substitutions in the aromatic ring (**Figure 1**). The analysis of BTEX and phenols is fundamentally carried out by GC, while aromatic acids by HPLC. The analysis of phenols and aromatic acids by GC require a previous derivatization step to obtain a significantly better peak shape than the free molecules. To avoid a long time sample preparation, the direct analysis of these nine compounds in the HPLC system was carried out. The use of different HPLC chromatographic conditions permitted to found the best chromatographic separation for the nine compounds. The chromatography conditions were found on the basis of the following experiments.

UV absorption spectra of BTEX and metabolites were obtained. The aromatic acids absorb at 210,

220 and 230 nm, respectively, while phenols and BTEX absorb around 260 nm. The peak integration of phenols and BTEX at 220 nm is affected by the presence of methanol in the mobile phase (> 50%) due to the strong absorbance of this solvent. To avoid this problem and to eliminate the possible blank effect at low wavelength, the chromatographic separation was established at 260 nm for BTEX and phenols, and at 220 nm for aromatic acids.

As shown in the **Figure 2**, the column permitted an adequate separation in 18 min of analysis with the exception of ethylbenzene and *p*-xylene isomers, which were not well separated in the chromatogram of samples. The optimal separation was found at 50 °C and the samples were dissolved in mobile phase to obtain an adequate resolution of the peaks. The resolution of aromatic acids was rising with increasing pH in the range 3–7. The best combination of overall performance was achieved with mobile phase pH 7 containing methanol as organic modifier due to the presence of –OH groups in the structure of these compounds. This is the first report about the simultaneous separation of these three families of aromatic compounds by HPLC.

3.2. Spiking and extraction procedures

Spiking procedure of tooth is a difficult step in the development of analytical method due to the characteristic of this material. The optimization of the spiking procedure was carried by triplicate to know the kinetic of absorption of BTEX and metabolites in tooth. The standard solution (made in methanol/water, 1:1) and ultrasonic bath were used for the spiking optimization. The results are shown in the graphics of concentration of compounds absorbed in the tooth (μ g/g) *versus* time of absorption (**Figure 3**).

The highest absorption for BTEX, phenols and aromatic acids was at 8, 4 and 12 h, respectively. In the graphics of the kinetic of BTEX and phenols absorption is shown an unusual behavior after 8 and 4 h, respectively. These results may be caused either the denaturalization of the tooth during the long time ultrasonication with the further BTEX and phenols release from the tooth to the solution or the

migration of these volatile compounds to the headspace formed in the 20-mL vial after a long

spiking time. The optimal time to obtain the spiked tooth was 4h for the nine compounds.

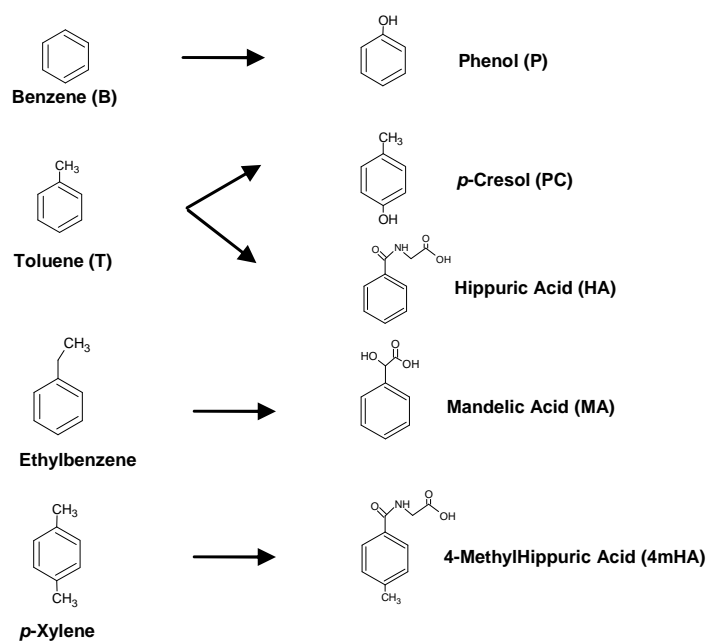


Figure 1. Molecular structures of BTEX and five metabolites.

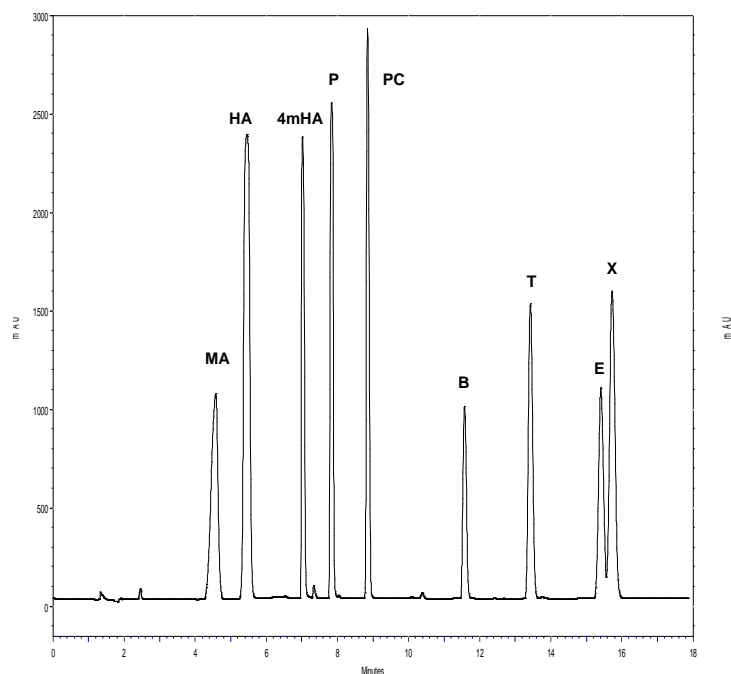


Figure 2. HPLC chromatogram of BTEX, phenols and aromatic acids at 260 nm. Alltima C18 column, gradient of mobile phase 10 mM trisodium phosphate, pH7 (20%) and methanol (80%) at 1 mL/min (T=50°C).

The extraction step was optimized with a solution of NaOH 1M as extracting from spiked tooth to recover the BTEX and metabolites in one step. The extraction was investigated through the kinetic of extraction with NaOH 1M in ultrasonic bath. Studies of BTEX and phenols in solid samples (soils) describe the extraction step with water [Bacocchi, 2001, Ezquerro, 2004]. Moreover, the extraction of aromatic acids from soils with 1M NaOH solution is described by Fan and Deng

[2002]. Because of the different polarity and acidity of these nine compounds, 1M NaOH solution was selected to extract all mixture from the spiked teeth. The kinetic of extraction of BTEX and metabolites with 1M NaOH is shown in **Figure 4**. Phenols and 4-methylhippuric acid were not determined due to the matrix effect. Four hours was the optimal time extraction selected to extract the BTEX and metabolites in one-step extraction from spiked tooth.

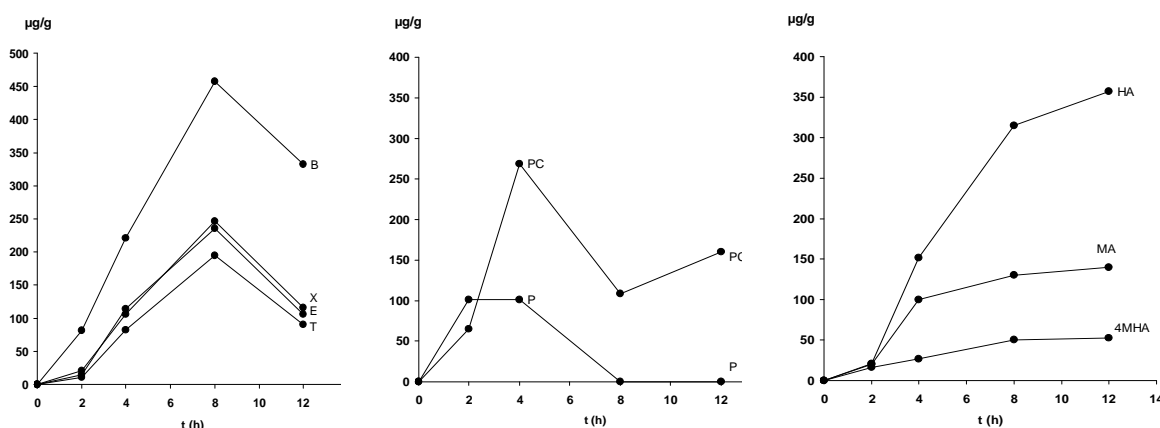


Figure 3. Kinetic of BTEX and metabolites absorption in tooth.

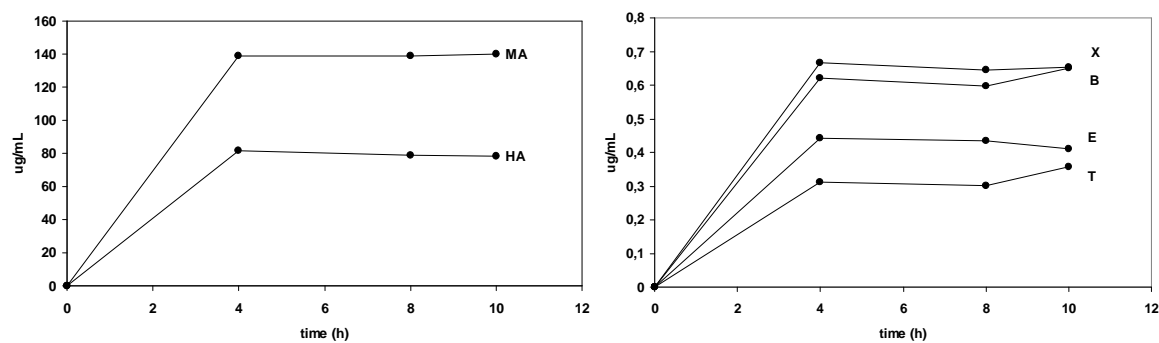


Figure 4. Influence of the extraction time on the extraction of BTEX, phenols and aromatic acids from spiked teeth with 1M NaOH in ultrasonic bath.

3.3. Selection of SPME conditions in spiked solutions

3.3.1. General conditions

SPME is an equilibrium extraction method based on partition between the concentration of analytes in a sample and that in the solid-phase fiber coating [Arthur and Pawliszyn, 1990]. The SPME efficiency of analytes from samples could be

affected by type of fiber, sample matrix, temperature, absorption time, desorption time, and other factors.

The selection of an appropriate coating is important for the SPME method. Low molecular weight or volatile compounds as BTEX usually require a PDMS-coated fiber. PDMS fiber is relatively non-polar and can easily extract the non-polar substituted benzenes. Its behavior is similar to

that of hexane in a liquid-liquid extraction [Buchholz and Pawliszyn, 1994]. It is also known that CAR/PDMS fiber is the best coating for simultaneous extraction of low-concentration BTEX from headspace [Ezquerro et al, 2004] or by immersion in liquid samples, that contain trace-level of BTEX [Lee et al, 2007]. For phenols and aromatic acids, a more selective polar coating is required for their extraction, where the PA coating clearly shows better sensitivity than other fibers [Barták et al, 1997; Huang et al, 1997; van Doorn et al, 1998].

During the extraction step with 10 mL of 1M NaOH solution from the tooth by ultrasonication, the volatile and non-soluble BTEX easily migrate from basic solution to the headspace of the 20-mL vial. This step allowed the separation of BTEX in the headspace to extract by HS-SPME, whereas the phenols and aromatic acids were kept in the aqueous solution in their dissociated form. When the pH is lowered up to pH 2 with the addition of HCl, their acid-base equilibrium shift significantly toward the neutral form, which has a greater affinity for the fiber, thereby increasing the amount extracted. The presence of the NaCl (300 g/L) decreases their solubility in the aqueous solution and forces more of these analytes into the fiber by salting-out effect. Although a stir bar accelerates the mass transfer of volatile and semi-volatile analytes through the aqueous matrix. The combination of both acidification and salting-out effects permitted the migration of phenols to headspace and the HS-SPME extraction of them [Buchholz and Pawliszyn, 1994; Barták et al, 1997]. After that, the SPME of aromatic acids by immersion of the fiber in the aqueous solution was carried out. These consecutively SPME steps with three number of extraction (exhaustive extraction of each analyte) from the same sample allowed the specific extraction of each group of analytes without interferences between them.

3.3.2. Absorption and desorption times

The time to reach absorption equilibrium determines the maximum amount of analyte that can be extracted by the fiber. The extraction time

was the first SPME variable studied in spiked solutions through the consecutively SPME of each group of analytes as described above. **Figure 5** shows the extraction curves obtained for BTEX, phenols and aromatic acids in spiked solution for extraction times ranged to 10-75 min. The maximums were observed at 30, 75 and 30 min, respectively. The extraction times were selected as the time it takes for the fiber to absorb near 100 % of the equilibrium extractable mass of analytes. This extraction time is in agreement with a previous report for these analytes in spiked solutions [Ezquerro et al, 2004; Huang et al, 1997; Fan and Deng, 2002]. For BTEX, the amounts increased rapidly within the first 10 min and tended to reach constant values (more than 70 % of the extracted analytes) after 20 min, whereas the equilibrium was reached within 60 min (more than 90 % of the extracted analytes) for phenols. The slower equilibration times with PA coating for phenols extraction is due to two main causes. First, the relatively low equilibrium vapour pressure of phenols provokes a slow transfer from the aqueous layer through the headspace to the fiber [Zhang and Pawliszyn, 1993]. Secondly, the nature of the PA fiber as a polymeric solid do not permit an easily diffusion into and through the coating [Buchholz and Pawliszyn, 1994]. However, the aromatic acids behavior was different after to reach the maximum extraction at 30 min, where the values start to be unstable. It may be caused for the migration of analytes after the equilibrium from the coating layer of the polar PA fiber to aqueous phase.

Desorption experiments were carried out for 10, 20, 30 and 40 min. Because of the low solubility of BTEX in aqueous solutions, methanol and HPLC mobile phase solvents were used to find the optimal solvent for desorption of CAR/PDMS fiber with extracted BTEX. The results obtained permitted the selection of methanol as the best solvent for desorption of BTEX from the fiber in all desorption time range. The desorption-time profiles for all analytes are shown in **Figure 6**. A selection was made by choosing 10, 40 and 30 min as optimized desorption time for BTEX, phenols and aromatic

acids, respectively. The BTEX desorption process occurred rapidly for the first 10 min, and more than 80 % of the extracted analytes were desorbed in methanol. Also, for phenols, after 20 min of

desorption, more than 80 % of the extracted analytes were desorbed. For aromatic acids, the maximum was observed at 30 min, but the equilibrium was reached at 40 min.

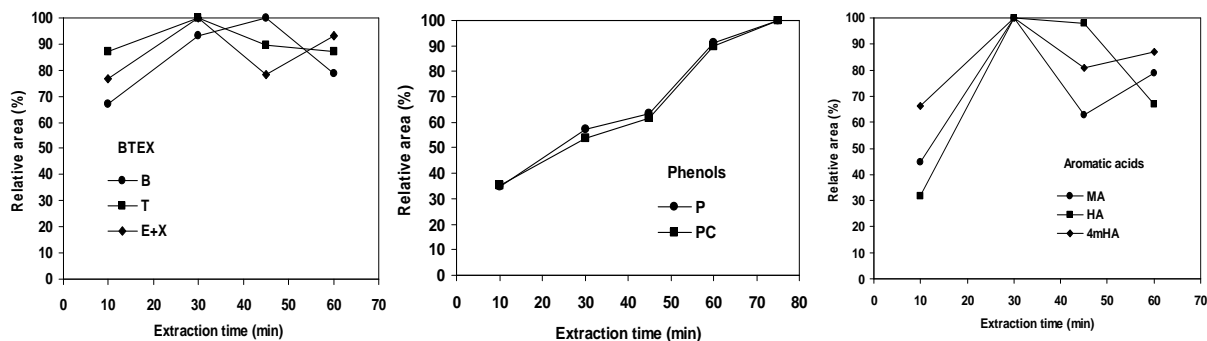


Figure 5. Influence of the absorption time on the SPME of BTEX, phenols and aromatic acids in spiked solutions at 30 °C using 85 μ m PDMS and PA fibers and 30 min-desorption time.

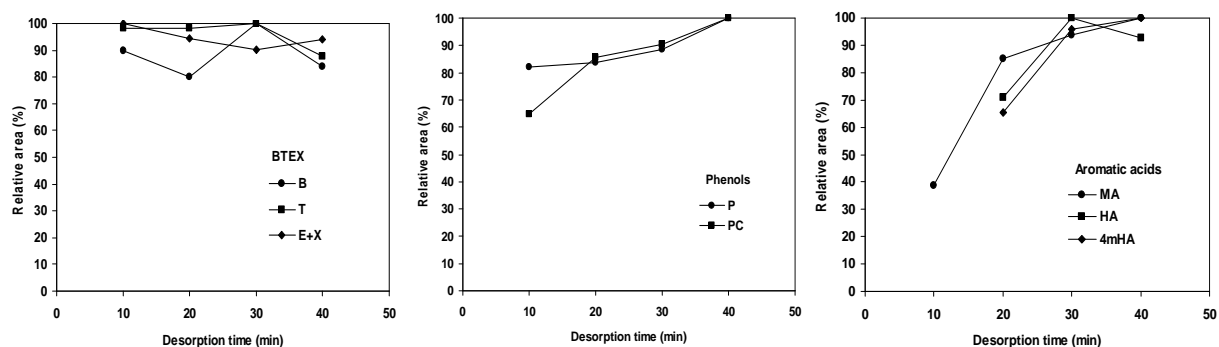


Figure 6. Influence of the desorption time on the SPME of BTEX, phenols and aromatic acids in spiked solutions at 30 °C using 85 μ m PDMS and PA fibers and previous optimized absorption times (30, 75 and 30 min, respectively).

3.4. SPME method validation

The linear ranges, the linearity, the slope and intercept with their standard deviations, the correlation coefficients, the LODs, the precision and the distribution constant (K_d) were calculated when the optimum conditions for SPME-HPLC and SPME-GC/MS procedures were established. For BTEX, the method validation was carried out by HS-SPME followed by HPLC and GC/MS separation techniques (Table 1 and Table 2, respectively). Some GC/MS parameters set were in accordance with Lee et al [2007], such as the desorption temperature, desorption time and GC oven

temperature program. For phenols, the method validation was established by SPME-HPLC from both the immersion of the fiber in the headspace and in the spiking solution (Table 1).

Table 1**Linear range, limit of detection (LOD) and precision of BTEX, phenols and aromatic acids in spiked solutions by SPME-HPLC**

Compound	Studied range (μg)	Linear range (μg)	Slope \pm Sm	Intercept \pm Sb	r^2	LOD ** (ng)	RSD (%) (mass level, μg)	Kd
Mandelic acid	0-240	29-240	0.6 ± 0.02	$- 0.70 \pm 0.03$	0.998	333	4.9 (5)	6
Hippuric acid	0-240	30-240	21.2 ± 0.5	$- 2.0 \pm 0.7$	0.999	18	14.4 (2.5)	98
4-methylhippuric acid	0-260	30-260	32 ± 2	$- 5 \pm 3$	0.994	61	9.7 (25)	207
Phenol (HS-SPME)	0-260	27-260	12.4 ± 0.3	$- 2.6 \pm 0.5$	0.998	55	9.2 (25)	344
Phenol (SPME)			7.8 ± 0.3	$- 0.7 \pm 0.5$	0.996	43	5.2 (5)	310
<i>p</i> -Cresol (HS-SPME)	0-250	24-250	9.23 ± 0.03	$- 0.74 \pm 0.04$	1	8	1.8 (50)	687
<i>p</i> -Cresol (SPME)			7.82 ± 0.07	$- 0.61 \pm 0.09$	0.999	49	6.6 (5)	319
Benzene	0-250	25-250	1.10 ± 0.06	0.56 ± 0.08	0.994	75	1.0 (100)	264
Toluene	0-250	25-250	7.9 ± 0.4	5.2 ± 0.6	0.994	11	1.8 (100)	916
Ethylbenzene+Xylene	0-250	25-250	48 ± 1	23 ± 2	0.998	2	0.4 (100)	2468

* Three replicates and three consecutive SPME for each group of analytes: BTEX by HS-SPME-GC/MS method, phenols by both HS-SPME-HPLC and SPME-HPLC methods, and acids by SPME-HPLC method. **Determined by signal-to-noise ratio method

The linearity of SPME-HPLC method was studied by extracting standard solutions spiked 2.5, 5, 10, 25 µg/mL BTEX and metabolites, using the optimum absorption and desorption times. The r^2 were above 0.994 for all analytes. Triplicate analysis with three SPME extractions for each spiked sample was performed with a precision lower than 15%. LODs were 2–333 ng in spiking solution (0.2–33.3 ng/mL). The Kd values were determined for the first time by SPME-HPLC method and all Kd values were higher than the reported by SPME-GC [Arthur et al, 1992; Buchholz and Pawliszyn, 1994; Barták et al, 1997; van Door et al, 1998; Langenfeld et al, 1996; Nardi, 2003]. These values demonstrate the sensitivity of SPME-HPLC method studied. The features of both HS-SPME and SPME methods for

phenols analysis showed similar validation parameters.

To obtain a good separation of the isomers *p*-xylene and ethylbenzene, the validation of HS-SPME-GC/MS method was carried out for BTEX (Table 2). The linearity was examined from standard solutions containing 2, 5, 10, 15 and 20 ng/mL of BTEX. It is well known that the GC/MS technique is more sensitive than the HPLC technique. For that reason the LODs (0.6–0.9 pg) and Kd values obtained by this technique were better than the HS-SPME-HPLC method. The r^2 and precision were quite similar for the BTEX analysis by both SPME methods.

Table 2

Linear range, limit of detection (LOD) and precision of BTEX in spiked solutions by HS-SPME-GC/MS *

Compound	Studied range (ng)	Linear Range (ng)	Slope ± Sm	Intercept ± Sb	r^2	LOD ** (pg)	RSD (%) (mass level, ng)	Kd
Benzene	0-200	20-200	0.019 ± 0.001	- 0.3 ± 0.1	0.987	0.6	3.6 (20)	10091
Toluene	0-200	20-200	0.039 ± 0.003	- 0.3 ± 0.3	0.990	0.8	0.8 (20)	9849
Ethylbenzene	0-200	20-200	0.069 ± 0.009	- 2 ± 1	0.984	0.9	1.6 (20)	5624
<i>p</i> -Xylene	0-200	20-200	0.071 ± 0.005	- 1.4 ± 0.7	0.996	0.9	2.4 (20)	5459

* For three replicates and one SPME. ** Determined by signal-to-noise ratio method

3.5. Application in human teeth

The proposed SPME method was used to quantify BTEX and metabolites in human teeth. The selected HS-SPME-GC/MS, HS-SPME-HPLC and SPME-HPLC methods for the consecutive analysis of BTEX, phenols and aromatic acids, respectively, were operated under the optimum conditions. Consecutive SPME were performed for all analytes from the same tooth sample. The results in Table 3 show that BTEX was present in almost all human teeth. The major content of BTEX was obtained for teeth samples 2 and 7, with more than 1 µg/g. These teeth samples belong to a smoking old man and non-smoking young man. This result shows that

the presence of BTEX in these human teeth samples is not necessary caused by tobacco smoke and might be related by some exposure of BTEX. Another interesting sample was tooth 3 with an important content of ethylbenzene and *p*-xylene (near 1 µg/g). This tooth sample belongs to a young woman which works in solvent industry. In relation of phenols, the quantification of both phenol and *p*-cresol was similar for all human teeth in the range 36-99 µg/g. It is well known that phenols appear in a common human diet. For that reason, the similar results obtained for phenols in all teeth samples could be not an indicator of BTEX exposure.

The results indicated the suitability of the consecutive SPME method for analyzing trace BTEX and phenols in human teeth, but for the other

metabolites, such as mandelic and hippuric acids were not identified.

Table 3

BTEX and metabolites determination by SPME-GC/MS and SPME-HPLC methods in human teeth as biomarkers

Sample teeth	Age (years)	Smoker	Profession or work place	Amount of BTEX (ng/g) and metabolites (µg/g) *								
				B	T	E	X	P*	pC*	MA	HA	4mHA
1	28	yes	Painting	26	18	25	25	42	99	-	-	-
2	71	yes	Mechanic	1386	1967	1519	1883	54	69	-	-	-
3	32	no	Solvent industry	76	200	958	728	42	36	-	-	-
4	56	yes	Construction company	37	23	-	-	51	36	-	-	-
5	59	no	Construction company	126	95	72	84	84	69	-	-	-
6	24	no	Construction company	51	19	8	12	48	69	-	-	-
7	29	no	Construction company	1085	1640	1665	1978	54	72	-	-	-
8	42	no	Construction company	118	42	10	10	45	75	-	-	-
9	71	yes	Coffee factory	19	15	7	10	51	36	-	-	-
10	35	no	Pharmaceutical Ind.	78	23	12	18	72	57	-	-	-

* Three replicates and three consecutive SPME for each group of analytes: BTEX by HS-SPME-GC/MS method, phenols by both HS-SPME-HPLC and SPME-HPLC methods, and acids by SPME-HPLC method

4. Conclusions

The present study of one-step simple extraction of BTEX and metabolites (phenols and aromatic acids) from tooth sample with NaOH solution followed by an specific and consecutive SPME-GC/MS or SPME-HPLC procedure for each analyte indicate an adequate precision of the method with a good linearity for analyzing this compounds in human teeth. Better sensitivity was obtained by HS-SPME combined with GC/MS in the analysis of BTEX. In contrast to many advantages of SPME (simple, rapid, sensitive, accurate, solvent-free, no sample pre-treatment), it showed that in the case of SPME-HPLC procedure, the LODs were a little high with respect of other methods. Therefore, as far as the determination of non-volatile (mandelic and hippuric acids) compounds by consecutive SPME

extraction is concerned, it is necessary to find another procedure with a high sensitivity to obtain lower LODs to determine these metabolites in human teeth.

Acknowledgements

The Spanish Ministry for Science and Education is acknowledged for the financial support provided (Project: CTM2006-13091-C2-02). Dra Cristina Gracia Ruiz from CAP Drassanes, ICS (Barcelona) are acknowledged for providing identified teeth samples. "Amb el suport del Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu".

References

- Andreoli, R.; Manini, P.; Bergamaschi, E.; Brustolin, A.; Mutti, A. Solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for determination of monoaromatic hydrocarbons in blood and urine. Application to people exposed to air pollutants. *Chromatographia* (1999), 50(3/4), 167-172.
- Angerer J., Schaller K. H. (eds) (1988) Analyses of hazardous substances in biological materials. Methods for biological monitoring. VCH, Weinheim, pp 52–66.
- Angerer, J.; Hoersch, B. Determination of aromatic hydrocarbons and their metabolites in human blood and urine. *Journal of Chromatography* (1992), 580(1-2), 229-55.
- Arora, M.; Kennedy, B. J.; Elhlou, S.; Pearson, N. J.; Walker, D. M.; Bayl, P.; Chan, S. W. Y. Spatial distribution of lead in human primary teeth as a biomarker of pre- and neonatal lead exposure. *Science of the Total Environment* (2006), 371(1-3), 55-62.
- Arthur, C. L.; Pawliszyn, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry* (1990), 62(19), 2145-8.
- Astier, A. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of urinary metabolites of benzene, nitrobenzene, toluene, xylene and styrene. *Journal of Chromatography* (1992), 573(2), 318-22.
- Bacocchi, R.; Attina, M.; Lombardi, G.; Boni, M. R. Fast determination of phenols in contaminated soils. *Journal of Chromatography, A* (2001), 911(1), 135-141.
- Barták, P.; Cap, L. Determination of phenols by solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography, A* (1997), 767(1+2), 171-175.
- Bergamaschi, E.; Brustolin, A.; De Palma, G.; Manini, P.; Mozzoni, P.; Andreoli, R.; Cavazzini, S.; Mutti, A. Biomarkers of dose and susceptibility in cyclists exposed to monoaromatic hydrocarbons. *Toxicology Letters* (1999), 108(2-3), 241-247.
- Bieniek, G. Concentrations of phenol, o-cresol, and 2,5-xylene in the urine of workers employed in the distillation of the phenolic fraction of tar. *Occupational and Environmental Medicine* (1994), 51(5), 354-6.
- Bieniek, G. Simultaneous determination of phenol, cresol, xylene isomers and naphthols in urine by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography, B: Biomedical Applications* (1996), 682(1), 167-172.
- Buchholz, K. D.; Pawliszyn, J. Optimization of solid-phase microextraction conditions for determination of phenols. *Analytical Chemistry* (1994), 66(1), 160-7.
- Burrini, C. Simultaneous HPLC determination of hippuric acid, *o*-, *m*-, and *p*-methylhippuric acids, mandelic acid, and phenylglyoxylic acid in urine. *Medicina del Lavoro* (1998), 89(5), 404-411.
- Costa de Almeida, G. R.; Saraiva, M. C. P.; Barbosa, F. Jr.; Krug, F. J.; Cury, J. A.; Rosario de S., Maria da L.; Buzalaf, M. Afonso R.; Gerlach, R. F. Lead contents in the surface enamel of deciduous teeth sampled in vivo from children in uncontaminated and in lead-contaminated areas. *Environmental Research* (2007), 104(3), 337-345.
- Ericson, J. E.; Rinderknecht, A.; Gonzalez, E. J.; Crinella, F. M.; Kleinman, M. T. Measurements of Manganese with Respect to Calcium in Histological Enamel Cross Sections: Toward a New Manganese Biomarker. *Environmental Research* (2001), 86(1), 46-50.
- Ezquerro, O.; Ortiz, G.; Pons, B.; Tena, M. T. Determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in soils by multiple headspace solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography, A* (2004), 1035(1), 17-22.
- Fan, X; Deng, Y. Separation and identification of aromatic acids in soil and the Everglades sediment samples using solid-phase microextraction followed by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography, A* (2002), 979(1-2), 417-424.
- Fujii, T.; Kawabe, S.; Horike, T.; Taguchi, T.; Ogata, M. Simultaneous determination of the urinary metabolites of toluene, xylene and styrene using high-performance capillary electrophoresis. Comparison with high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography, B:*

Biomedical Sciences and Applications (1999), 730(1), 41-47.

Gerlach, R. F.; de Souza, A. P.; Cury, J. A.; Line, S. R. P. Effect of lead, cadmium and zinc on the activity of enamel matrix proteinases in vitro. *European Journal of Oral Science* (2000), 108, 327-334.

Hinwood, A. L.; Rodriguez, C.; Runnion, T.; Farrar, D.; Murray, F.; Horton, A.; Glass, D.; Sheppard, V.; Edwards, J. W.; Denison, L.; Whitworth, T.; Eiser, Ch.; Bulsara, M.; Gillett, R. W.; Powell, J.; Lawson, S.; Weeks, I.; Galbally, I. Risk factors for increased BTEX exposure in four Australian cities. *Chemosphere* (2007), 66, 533-541.

Huang, S-D.; Cheng, Ch-P.; Sung, Y-H. Determination of benzene derivatives in water by solid-phase microextraction. *Analytica Chimica Acta* (1997), 343(1-2), 101-108.

Kang, D.; Amarasiriwardena, D.; Goodman, A. H. Application of laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS) to investigate trace metal spatial distributions in human tooth enamel and dentine growth layers and pulp. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2004), 378(6), 1608-1615.

Kierdorf, U.; Kierdorf, H. Dental fluorosis in wild deer: its use as a biomarker of increased fluoride exposure. *Environmental Monitoring and Assessment* (1999), 57(3), 265-275.

Laffon, B.; Lema, M.; Mendez, J. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of urinary mandelic and phenylglyoxylic acids as indirect evaluation of styrene exposure. *Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications* (2001), 753(2), 385-393.

Langenfeld, J. J.; Hawthorne, S. B.; Miller, D. J. Quantitative Analysis of Fuel-Related Hydrocarbons in Surface Water and Wastewater Samples by Solid-Phase Microextraction. *Analytical Chemistry* (1996), 68, 144-155.

Lee, M-R.; Chang, Ch-M.; Dou, J. Determination of benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes in water at sub-ng/L levels by solid-phase microextraction coupled to cryo-trap gas chromatography-mass

spectrometry. *Chemosphere* (2007), 69(9), 1381-1387.

Marchei, E.; Joya, X.; Garcia-Algar, O.; Vall, O.; Pacifici, R.; Pichini, S. Ultrasensitive detection of nicotine and cotinine in teeth by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* (2008), 22(16), 2609-2612.

Moon, D. H.; Paik, N. W.; Shim, Y. Analysis of some metabolites of organic solvents in urine by high-performance liquid chromatography with β -cyclodextrin. *Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications* (1997), 694(2), 367-374.

Murtomaa, M.; Tervaniemi, Olli-Matti; Parviainen, J.; Ruokojaervi, P.; Tuukkanen, J.; Viluksela, M. Dioxin exposure in contaminated sawmill area: the use of molar teeth and bone of bank vole (*Clethrionomys glareolus*) and field vole (*Microtus agrestis*) as biomarkers. *Chemosphere* (2007), 68(5), 951-957.

Nardi, L. Determination of siloxane-water partition coefficients by capillary extraction-high-resolution gas chromatography Study of aromatic solvents. *Journal of Chromatography A* (2003), 985, 39-45.

Nowak, B.; Chmielnicka, J. Relationship of Lead and Cadmium to Essential Elements in Hair, Teeth, and Nails of Environmentally Exposed People. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (2000), 46(3), 265-274.

Pascual J. A.; Diaz D.; Segura J.; Garcia-Algar O.; Vall O.; Zuccaro P.; Pacifici R.; Pichini S. A simple and reliable method for the determination of nicotine and cotinine in teeth by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* (2003), 17(24), 2853-5.

Pawliszyn, J. *Solid Phase Microextraction, Theory and Practice*, Wiley-VCH, New York, 1997.

Pawliszyn, J. (Ed.), *Applications of Solid Phase Microextraction*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999.

Penton Z., in: S.A. Scheppers-Wercinski (Ed.), *Solid Phase Microextraction, A Practical Guide*, Marcel Dekker, New York, 1999, p. 27.

Reese, E.; Kimbrough, R. D. Acute toxicity of gasoline and some additives. *Environmental Health Perspectives* (1993), 101(SUPPL. 6), 115-31.

Shen, Y. In Vitro cytotoxicity of BTEX metabolites in HeLa cells. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* (1998), 34(3), 229-234.

Sperlingova, I.; Dabrowska, L.; Stransky, V.; Kučera, J.; Tichy, M. Human urine certified reference material CZ 6009: creatinine, styrene metabolites (mandelic acid and phenylglyoxylic acid). *Anal Bioanal Chem* (2004) 378, 1208–1212.

Tolnai, B.; Gelencser, A.; Gal, C.; Hlavay, J. Evaluation of the reliability of diffusive sampling in environmental monitoring. *Analytica Chimica Acta* (2000), 408(1-2), 117-122.

Tvinnereim, H. M.; Eide, R.; Riise, T. Heavy metals in human primary teeth: some factors influencing the metal concentrations. *Science of the Total Environment* (2000), 255(1-3), 21-27.

van Doorn H.; Grabanski C. B.; Miller D. J.; Hawthorne S. B. Solid-phase microextraction with pH adjustment for the determination of aromatic acids and bases in water. *Journal of chromatography A* (1998), 829(1-2), 223-33.

Vial, J; Jardy, A. Experimental comparison of the different approaches to estimated LOD and LOQ of an HPLC method. *Analytical Chemistry* (1999), 71, 2672-2677.

Wang, Ch-Y.; Huang, Ch-T.; Hsieh, Y-Z. Determination of metabolites of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene by β -cyclodextrin modified capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science* (2003), 26, 69–74.

Yimrungruang D, Cheevaporn V, Boonphakdeeb T, Watchalayann P, Helander HF. Characterization and Health Risk Assessment of Volatile Organic Compounds in Gas Service Station Workers. *EnvironmentAsia 2* (2008) 21-29.

Zhang, Z.; Pawliszyn, J. Headspace solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry* (1993), 65(14), 1843-52.

ANEXO 5

González JL, Valiente M. Hollow fibre supported liquid membrane extraction for BTEX metabolites
analysis in human teeth as biomarkers.

To be submitted

Hollow fibre supported liquid membrane extraction for BTEX metabolites analysis in human teeth as biomarkers

Johannes Luis González, Manuel Valiente*

Departament de Química, Centre GTS, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Espanya

Abstract

The use of human teeth as biomarkers has been previously applied to characterize environmental exposure mainly to metal contamination. Difficulties arise when the contaminants are volatile or its concentration level is very low. The present study concerns with the development of a methodology based on the transport through hollow fibre supported liquid membranes, HFSLM, to characterize three different metabolites of BTEX contaminants (mandelic acid, hippuric acid and methylhippuric acid). The related driving force for the liquid membrane has been studied by using both non facilitated and facilitated transport. An appropriate pH gradient was applied when a non facilitated transport was implemented through the HFSLM. In this case enrichment factors of several hundred were accomplished. Different ionic and non ionic water insoluble compounds were used as metabolite carriers for the facilitated transport at HFSLM. The results obtained indicate a variety of situations related to the carrier nature and providing both a positive and a negative effect. Such behaviour has been interpreted in terms of the stability of the corresponding metabolite-carrier complexes at the organic phase. Different solvents were used for the liquid membrane, including, dodecane, dihexyl ether and *n*-decanol, being *n*-decanol most suitable. Other parameters affecting the extraction process, such as extraction time, stirring speed, acceptor buffer and salt content were studied in spiking solution to obtain the best enrichment factors for all analytes. Validation of the optimized method included linearity, limits of detection, repeatability and reproducibility experiments and application of the method to the analysis of these compounds in human teeth were carried out. Selective determination of the metabolites was made by chromatographic HPLC technique.

Keywords:

Hollow fibre supported liquid membrane extraction; Mandelic acid, Hippuric acid; 4-Methylhippuric acid; HPLC, human teeth samples

1. Introduction

In recent years, benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX) and corresponding metabolites, such as mandelic acid (MA), hippuric acid (HA) and 4-methyl hippuric acid (4mHA) have been widely investigated, outstanding to the health risks associated with the occupationally BTEX exposure [Moon et al, 1997; Shen, 1998; Andreoli et al, 1999; Tolnai et al, 2000; Wang et al, 2003; Yimrungruang et al, 2008], due to the high toxicity of these volatile organic compounds, which are easily absorbed via the lungs and the skin [Reese, 1993]. Mandelic and hippuric

acids are aromatic carboxylic acids obtained by oxidation of the alkyl side chain of ethylbenzene, xylenes and toluene [Angerer et al, 1992]. Their concentrations on biological samples permit to know the degree of occupational or environmental BTEX exposure.

Some analytical procedures consisting in the combination of previous pre-concentration step followed by HPLC or capillary zone electrophoresis (ZCE) are used to monitoring BTEX metabolites content in biological fluids, such as urine and blood of workers exposed to BTEX levels [Angerer et al, 1988; Astier et al., 1992; Moon et al, 1997; Burrini et

* Corresponding author. Tel.: +34-93-5812903; fax: +34-93-5811985.

Email Address: Manuel.Valiente@uab.es

al., 1998; Fujii et al, 1999; Laffon et al., 2001; Wang et al., 2003]. Hollow fibre supported liquid membrane (HFSLM) extraction or hollow fibre membrane liquid-phase microextraction (LPME) in combination with HPLC or CZE is one of the most interesting pre-treatment method of complex samples in the environmental and bioanalytical applications [Jonsson and Mathiasson, 1999; Lee et al, 2008], due to high enrichment, efficient sample clean-up, and the low consumption of organic solvent. This method consists in the extraction of target analytes from aqueous samples into an organic liquid membrane (OLM) sustained in the pores in the wall of a small porous hollow fibre, and further into an acceptor phase presents inside the lumen of hollow fibre. Several alternatives in membrane-based solvent extraction such as HFSLM are widely applied for recovery and concentration of carboxylic acids from different matrixes [Schlosser et al., 2005].

No method has been established for BTEX metabolites analysis in human teeth as biomarkers. Recent approaches in the analysis of cumulative organic compounds in teeth, such as dioxin in mammals teeth [Murtomaa et al, 2007] and the study of nicotine and cotinine in human teeth for monitoring cumulative exposure to environmental tobacco smoke [Pascual et al, 2003; Marchei et al, 2008], are some of the few applications.

The aim of the present study is to develop a method for simultaneous determination of MA, HA and 4mHA as BTEX metabolites in human teeth to establish a capable and future tool for categorizing cumulative exposure to BTEX and its relation with dental health. For the first time, a HFSLM extraction method followed by HPLC analysis was investigated in spiked solutions to obtain a methodology for determining the level of environmental exposure to BTEX in dental samples as new biomarkers. The investigation consisted in the optimisation of different parameters involve in the three-phase extraction procedure: type of organic solvent used as OLM, type of transport through the study of non-facilitated and facilitated (with carriers) transports, extraction time, stirring speed, salinity and type of

buffers as acceptor solutions. Finally, the validation of the HFSLM-HPLC method was established and used to determine BTEX metabolites content (MA, HA, and 4mHA) in human teeth.

2. Experimental

2.1. Chemicals and samples

Standards and reagents: 98% mandelic acid (MA), >97% hippuric acid (HA), 98% 4-methylhippuric acid (4mHA), methyltrioctylammonium chloride (Aliquat 336), and organic solvents: HPLC grade methanol, >98% dodecane, >97% dihexyl ether, 97% *n*-decanol, 99% tributyl phosphate (TBP), 99% trioctylphosphine oxide (TOPO), 98% trioctylamine (TOA), were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). The salts and acids: 99.5% NaCl, 98% NaOH and 98% Na₃PO₄·12H₂O, 37% HCl and 85% H₃PO₄, were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Water was purified by a Milli-Qplus system from Millipore (Milford, MA, USA).

A standard stock solution of each acid analytes (2000 mg L⁻¹) was prepared by dissolving 20 mg of standard in 10 mL of HPLC-grade methanol-water (1:1). A working solution (20 mg L⁻¹) containing the three analytes was prepared by mixing appropriate amount of the stock solution and diluting with water to a given volume. The standard stock solutions and working solution were stored at 4 °C. Twenty millilitres of donor sample solutions were prepared by taking appropriate amount of the working solution and diluting to the required volume of 0.5 M or 0.01 M NaOH to obtain 100 µg L⁻¹ and then adjusting to expected pH value by drop wise adding concentrated chloride acid. Acceptor solutions (1 M NaOH at pH 12.6, 1 M Na₃PO₄ at pH 11.7 or 2 M NaCl at pH 6.0) were prepared by dissolving appropriate amount in 1000 mL of water.

Human teeth were collected at dental clinic of Drassanes in Barcelona between March and April 2009. Individual human tooth was washed with water by the dentist post-extraction, and placed in 20-mL glass vial containing 10mL of 1M NaOH solution. Each vial was sealed and 4h of ultrasonication were used as optimised extraction time of analytes from teeth (unpublished results).

Then, 9 mL of water and 1 mL of concentrated acid chloride were added to obtain the 20-mL samples at pH2 for HFSLM extraction procedure. Age, profession and smoking characteristic were determined for each donor.

2.2. General extraction procedure

A quite modification of the extraction procedure previously described [Liu et al., 2005; Berhanu et al. 2006] was followed in this study. A hollow fibre Accurel® PP polypropylene Q3-2 (200- μm wall thickness, 600- μm inner diameter, 0.2 μm pore size), obtained from Membrana GmbH (Wuppertal, Germany), was cut manually into approximately 15 cm length, meaning approximately 40- μL lumen, leaving both ends free for subsequent use. Then, the lumen of a single hollow fibre was flushed and filled with the organic solvent using a syringe () and the two ends were sealed with a small piece of silicone tubing. The fibre was immersed in a vial with 20 mL of organic solvent and five minutes in ultrasonic bath was established as an impregnation step to form the organic liquid membrane. After that, the two ends were opened and the lumen was slowly flushed with 200 μL of distilled water to remove any organic solvent inside the lumen. Three hundred microliters of acceptor solution were then flushed into the lumen to guaranty the removing of air bubbles and filling it completely. The two ends of the fibre were sealed again. Subsequently, the filled and sealed fibre was soaked in distilled water for 1 min and this ready HFSLM device was transferred to the 20-mL vial of donor sample solution. After the HFSLM extraction, the acceptor solution containing the analytes was collected from the lumen into 2-mL vials with inserts of 250 μL . The collection of the sample was as follows: one of the ends of the sealed fibre was opened and connected to a retracted syringe needle and the other end then opened and put in the vial. Next, the syringe plunger was pushed in, to dispense the acceptor solution containing analyte into the vial and approximately 40 μL solution was collected. Prior the HPLC analysis, 2-3 drops of 0.1 M HCl were added and adjusted to pH2 value obtaining 100 μL of final

volume. After capping, the vial was put on the autosampler of the HPLC system for the injection of 20 μL of each sample by duplicate.

2.3. Chromatographic conditions

A high-pressure liquid chromatograph equipped with an autosampler AS3000, gradient pumps P4000 and UV detector UV6000LP, with measurement facility at 192-800 nm, equipped with ChromQuest Software (Thermo-Fisher, USA) was used. The separation was performed on a GraceSmart RP 18 column (250 x 4.6 mm, 5 μm) with a mixture of 10mM $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (pH adjusted to 2.5 with concentrated H_3PO_4) as mobile phase A, and methanol as mobile phase B. The elution gradient was 20% B (0-2 min), 20-60% B (2-6 min), 60-80% B (6-10 min), 80% B (1 min) at a 1 mL/min flow-rate and 50 °C of temperature. The sample volume was 100 μL , the injection volume was 20 μL by duplicate and the wavelength used for peaks integration was 220 nm.

3. Results and discussion

Basically, in the HFSLM, the analytes are extracted in a three-phase system from an aqueous donor sample solution through an organic solvent, previously immobilized in the porous of the hollow fibre, into an aqueous acceptor solution inside the lumen of this fibre [Liu et al, 2005, 2006]. In the present experiments, the enrichment factor (EF) was used as response variable for the optimisation of the HFSLM extraction process and defined as the ratio of the analyte concentration in the acceptor solution to that in the initial donor sample solution [Kou et al, 2004; Yamini et al, 2006; Fontanals et al, 2006]. HFSLM extraction should be optimized to provide the highest EF, meaning lower detection limits and the time required to reach the maximum enrichment depends on several factors.

For the purpose of the present study, the effects of different factors on the HFSLM extraction of BTEX metabolites (MA, HA, 4mHA) from the spiked NaOH solution were evaluated by investigating the applicability of the proposed method to determine for the first time these analytes in human teeth as

biomarkers. Although, some parameters such as acceptor volume of 40 μL that was adequate for a 20- μL HPLC injection, the donor sample volume of 20 mL with NaOH as a main component used in previous (unpublished) studies as extractable solution for the initial BTEX metabolites extraction from teeth, were fixed.

3.1. Type of organic solvent for OLM

In the three-phase liquid membrane system, the overall mass transfer resistance is the sum of mass transfer resistance in and between phases: the donor sample solution, the donor–membrane boundary layer, the membrane, the membrane–acceptor boundary layer, and the acceptor solution. The mass transfer in the donor phase is the rate-limiting step for compounds with a large K_D , and the extraction speed for compounds that have a small K_D is controlled by the mass transfer in the membrane [Kou et al, 2004]. The BTEX metabolites MA, HA and 4mHA in the present work belong to the second group of compounds due to the hydrophilic behaviour. For that reason, the organic solvent is one of the parameter to select for an adequate OLM formation. Some *n*-alkanes, aliphatic alcohols, aliphatic ethers and aromatic hydrocarbons are commonly used as organic solvents in the liquid membrane extraction of carboxylic acids [Schlosser et al, 2005].

In relation to the impregnation step, several papers include dipping into the organic solvent for 5-10 s coating from the outside [Kou et al, 2004; Trtic-Petrovic et al, 2005; Berhanu et al, 2006; Liu et al, 2005, 2006; Yamini et al, 2006; Zhao et al, 2007] or filling from the inside with organic solvent [Charalabaki et al, 2005; Fontanals et al, 2006] as coating procedures. In our experience, the procedure of coating where the organic solvent was filled from the inside of the hollow fibre was adopted since the simple dipping procedure for a few seconds was not enough for the OLM formation

obtaining very low enrichments. Recent investigations of Bardstu et al [2007] allowed to know that coating by filling from inside provided the best fibre-to-fibre repeatability. Although, to avoid leakage of organic solvent to the sample and to the acceptor solution, removal of excess organic solvent from the inside and outside of the coated hollow fibre by both flushing the internal lumen with water and ultrasonication in a water bath, respectively, is recommended [Bardstu et al, 2007]. The 5-min ultrasonication in organic solvent of the previous filled hollow fibre with organic solvent as an impregnation step and cleaning of inside and outside of the fibre with water were carried out to guaranty an adequate OLM formation.

The effect of three OLM obtained through the impregnation of the hollow fibre with *n*-dodecane, dihexyl ether and *n*-decanol was investigated. After 4-h HFSLM extraction, determination of analytes in the three phases: donor, liquid membrane and acceptor, was carried out by HPLC. None of compounds were detected in *n*-dodecane and dihexyl ether phases, meaning that the mass transfer of liquid membrane-acceptor was higher than donor-liquid membrane. Nevertheless, with the exception of MA and dihexyl ether, these two organic phases are not suitable as OLM for these acids (Fig. 1). The best EF values were obtained with *n*-decanol, due to its major capacity of overall mass transfer for these polar compounds. This solvent was suitable for the HFSLM extraction with loses of analytes in the OLM after the extraction of 31, 10, and 9% for MA, HA and 4mHA, respectively. These results demonstrated a lesser mass transfer between liquid membrane and acceptor phase than donor phase and liquid membrane for MA in relation to hippuric acids. Due to the higher rate of uptake profiles of analytes than the others, *n*-decanol was selected as organic solvent in the following experiments.

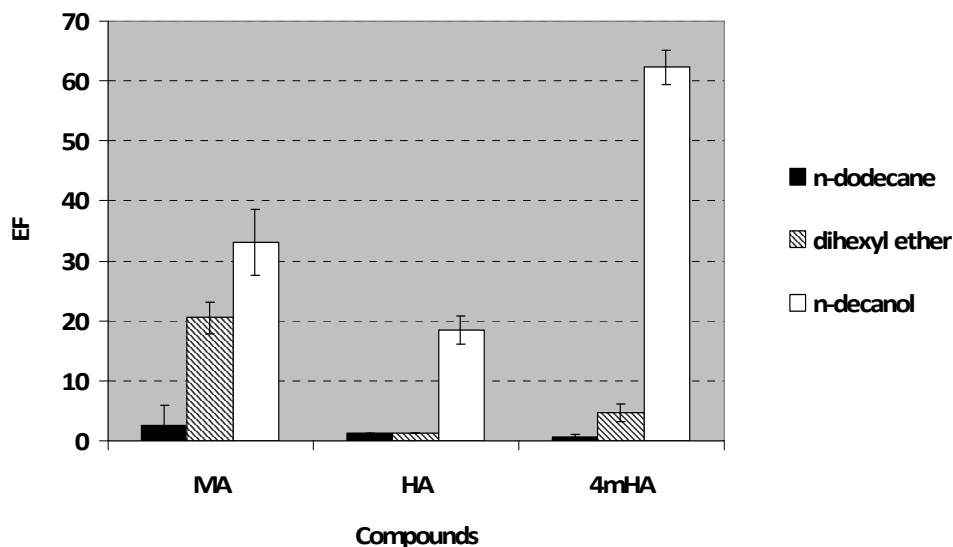


Fig. 1. Effect of organic liquid membrane (OLM) on the enrichment factor of mandelic acid (MA), hippuric acid (HA) and 4-methyl hippuric acid (4mHA). Conditions: concentration for each analyte was $100 \mu\text{g L}^{-1}$ in 20-mL donor solution at pH2, 500 mM NaCl, stirring speed of 400 rpm, 40 μL of 1M NaOH (pH12) as acceptor solution and extraction time of 3 h.

3.2. Type of transport

3.2.1. Non-facilitated pH gradient transport

The most common driving force in the HFSLM of acidic compounds is the pH gradient between the donor sample solution and acceptor solution inside the fibre as non-facilitated transport [Jung et al., 2002; Kou et al., 2004; Berhanu et al., 2006; Zhao et al., 2007]. The pKa range of the analytes varies from 3.62 to 3.85. For extraction of weak acids, the donor sample solution pH must be at least 2 pH units lower than the pKa of the acid to assure that the fraction of analytes in the non dissociated form in the donor sample is beyond 0.99 and 3.3 pH units higher than the highest pKa value in the acceptor solution to ensure that the analytes in the non dissociated form is below 0.0005 [Jonsson et al., 1993]. In this study, for pH gradient transport, the pH of donor sample solution was adjusted to 2 values and to trap charged analytes into the acceptor solution, the pH of the acceptor phase was approximately 12. This sufficiently wide range of pH allowed almost all compounds were fully protonated, then, to migrate through the liquid membrane and they were therefore easily trapped at the acceptor

side of the membrane unit. Disturbing neutral and basic compounds could not be extracted in these conditions. Therefore, the HFSLM extraction method by pH gradient regime provided both high EF and high selectivity as described before for the acidic compounds [Jung et al, 2002; Berhanu et al, 2006; Zhao et al, 2007].

3.2.2. Facilitated pH gradient transport

Some studies in the supported liquid membrane extraction of acidic compounds such as phenolic compounds [Jung et al, 2002], haloacetic acids [Kou et al., 2004] and short-chain fatty acids [Zhao et al., 2007] indicated that the use of extractants between 5-20% increase the extraction. Different concentrations of tertiary amine and phosphoryl carriers or extractants: trioctylamine (TOA), trioctylphosphine oxide (TOPO) and tributyl phosphate (TBP) in *n*-decanol as diluent solvent were investigated in the facilitated pH gradient transport for 3-h HFSLM extraction of BTEX metabolites (Fig. 2). It is known that in the liquid-liquid extractions of carboxylic acids, such as acetic and formic acids, the equilibrium distribution

coefficients (K_D) of alkylamines are high compared to those for phosphoryl solvents and more conventional solvents [Wardell and King, 1978]. It is demonstrated by the strong Lewis basicity of the amines in the formation of complexes as solvating products involve ion pairs or hydrogen-bond formation between the acid and the tertiary amine in the solvent phase [Tamada et al, 1990a, 1990b]. In the case of alkyl- and alkoxy-phosphoryl extractants (TOPO and TBP, respectively), exchanging alkyl for alkoxy substituents increases the Lewis basicity of the phosphoryl oxygen P-O, and increases K_D for organic acids. Among phosphoryl compounds, K_D increase in the order phosphate < phosphonate < phosphine oxide, where the electron-donating ability of the phosphoryl oxygen increases. In the studies of Wardell and King [1978], the K_D values in the acetic acid extraction when a solvent mixture containing 25 % of extractants, for TOA was two times the K_D of TOPO and twenty times the K_D of TBP. These results demonstrate the extraction capacity of these extractants in the order TOA > TOPO > TBP.

In our investigation, the use of these three extractants at 10 and 25% for 3h-HFSLM extraction of organic acids provided inverse results (Fig. 2), where the order of the extraction was TBP > TOPO > TOA. In this three-phase system, MA, HA and 4mHA need to be extracted two times: from donor

sample to the organic phase with extractants in the porous of the membrane and after from this phase to the acceptor solution. As explained above, during the first mass transfer of carboxylic acids, the order of extraction TOA > TOPO > TBP is expected [Wardell and King, 1978], but due to the stabilisation and/or solubility of these type of complexes in *n*-decanol as polar diluents which promotes hydrogen-bond formation [Qin et al., 2001; Li et al., 2002; Mei et al., 2002; Matsumoto et al., 2003; Yankov et al., 2004], the second mass transfer during the L-L membrane-acceptor extraction could be controlled by acid-extractant complexes stability in the order TOA > TOPO > TBP, meaning the following extraction order: TBP > TOPO > TOA, where an OH⁻ anion from acceptor phase breaks the hydrogen bond to release the deprotonated acids into the lumen of hollow fibre (Fig. 2). These results could be explained in details by the determination of analyte amounts in OLM after the extraction. As shown in table 1, the percentage of total extracted analytes retained in OLM (25% of extractant) after the HFSLM extraction followed the same order of expected stability of the complexes during the first mass transfer: TOA > TOPO > TBP (95.1-97.9, 15.4-19.3, and 5.5-10 %, respectively). For that reason, the best extraction was obtained with 25% of TBP as OLM.

Table 1. Percentage of the extraction with respect of total HFSLM extraction in different OLMs

Compound	<i>n</i> -decanol (0% extractants)	<i>n</i> -decanol (25% TBP)	<i>n</i> -decanol (25% TOPO)	<i>n</i> -decanol (25% TOA)
MA	12.2 ± 2.9	10.0 ± 5.4	15.4 ± 0.7	95.1 ± 1.6
HA	10.3 ± 4.7	10.5 ± 2.9	19.3 ± 0.4	94.5 ± 0.5
4mHA	16.1 ± 1.3	5.5 ± 0.1	17.4 ± 1.8	97.9 ± 0.1

Hollow fibre supported liquid membrane (HFSLM) extraction of BTEX metabolites (mandelic acid, MA, hippuric acid, HA and 4methyl hippuric acid, 4mHA) using different organic liquid membranes (OLMs) followed by HPLC with diode array detection were carried out by duplicate analysis of spiked donor sample solution at 1 µg mL⁻¹.

In some cases, the extraction of the organic acids with extractants could be lower than in the reference system with no carrier [Wodzki and Nowaczyk, 2002]. Fig. 2 illustrates this result with lower EF for

the acids extraction with TOA and TOPO compared to no carrier in the OLM, in this case, due to the stabilisation of solvating complexes. The best EF were obtained with TBP in *n*-decanol, but the values

were similar with respect of *n*-decanol without extractants. In the extraction system with carriers, compounds were extracted by both non-facilitated and facilitate pH gradient transport [Wodzki and Nowaczyk, 2002], and, in our case, the organic acid extraction was not significantly facilitated by the

presence of extractants. In addition, some coextraction of polar matrix components during analysis of real samples could be increased by the use of extractants, meaning lower selectivity of the system [Jung et al, 2002; Kou et al., 2004].

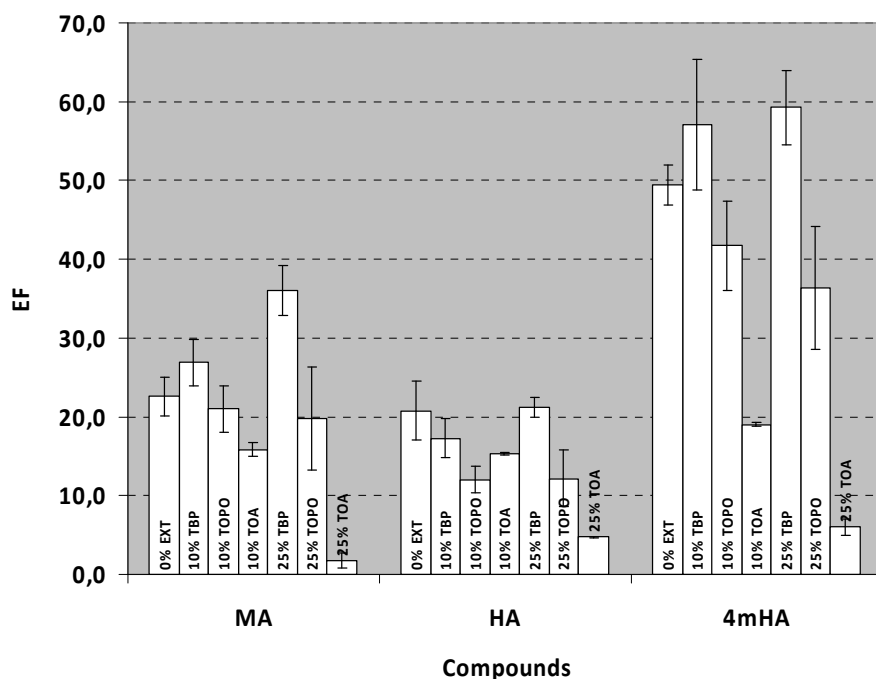


Fig. 2. Effect of extractants (EXT): tributyl phosphate (TBP), trioctylphosphine oxide (TOPO) and trioctylamine (TOA) in *n*-decanol on the enrichment factor of mandelic acid (MA), hippuric acid (HA) and 4-methyl hippuric acid (4mHA). Conditions: concentration for each analyte was 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ in 20-mL donor solution at pH2, 500 mM NaCl, stirring speed of 500 rpm and 40 μL of 1M NaOH (pH12) as acceptor solution, and extraction time was 3 h.

3.2.3. Facilitated anionic gradient transport

In the present experiment, the extraction of BTEX metabolites using HFSLM containing quaternary ammonium reagent (Aliquat 36) as cationic carrier was investigated. This carrier has been used for liquid membrane extraction of amphiprotic and acidic compounds from a basic donor into a neutral acceptor containing a high concentration of Cl^- ions [Jonsson and Mathiasson, 1999; Schlosser et al., 2005; Yamini et al., 2006]. The driving force for the transport of analytes was the concentration gradient of Cl^- between the donor sample solution and the acceptor solution, where the mass transfer was carried out due to an excess concentration of Cl^- in acceptor solution (2M NaCl at pH6) compared to the

donor sample solution (0.01M NaOH at pH11). Due to the concentration gradient, the ion-pair formed between acid and carrier diffuses across the membrane and after the deprotonate acid was abstracted from the organic phase while Cl^- was given back to the carrier [Yamini et al., 2006].

Fig. 3 shows a comparison between 3h-HFSLM extraction of MA, HA and 4mHA at three different regimes: non-facilitated pH gradient, facilitated pH gradient with TBP and facilitated anionic gradient with Aliquat 336, using *n*-decanol as diluent. For MA and HA, the presence of Aliquat 336 in OLM increased the EF values in 2-3 times. On the other hand, 4mHA was less extracted using this cationic carrier, may be due to formation of very hydrophobic

ion-pairs with carrier because of the presence of an additional methyl substituent in the phenyl group. This possible hydrophobicity diminishes the releasing of 4mHA into acceptor NaCl solution during the second mass transfer.

The concentration of 0.01M NaOH in donor sample solution was previously optimised since the EF

values of these acids were decreased in 10 to 20 times when 0.5M NaOH was used. This phenomenon was recently observed [Yasmini et al., 2006] with a turbidity formation in the donor sample due to transfer of some carrier as ion-pairs with OH⁻ anion.

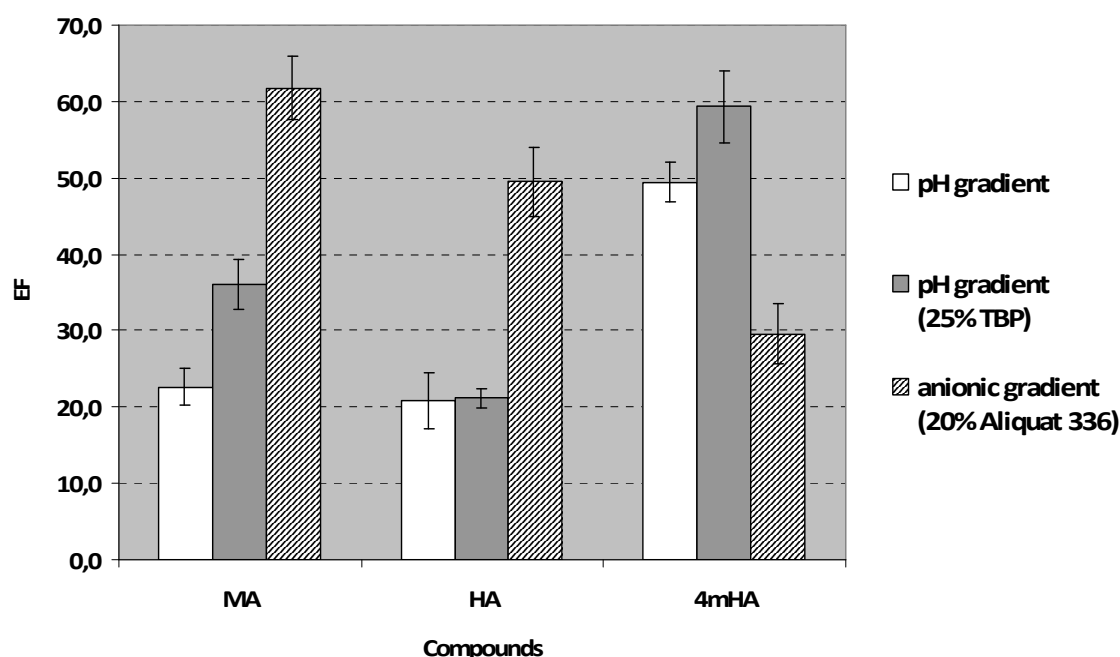


Fig. 3. Effect of transport on the enrichment factor of mandelic acid (MA), hippuric acid (HA) and 4-methyl hippuric acid (4mHA). General conditions: concentration for each analyte was 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ in 20-mL donor solution, 500 mM NaCl, stirring speed of 500 rpm, 40 μL of acceptor solution, and extraction time was 3 h. For pH gradient: *n*-decanol as liquid membrane, donor solution at pH2, 1M NaOH as acceptor solution at pH11.4. For pH gradient with tributyl phosphate (TBP): 25% TBP in *n*-decanol as liquid membrane, donor solution at pH2, 1M NaOH as acceptor solution at pH11.4. For anionic gradient: 20% Aliquat 336 in *n*-decanol as liquid membrane, 0.01M NaOH as donor solution at pH11 and 2M NaCl as acceptor solution at pH6.

3.3. Effect of other parameters

Present investigation of different OLM at non-facilitated and facilitated transport regimes in the HFSLM of BTEX metabolites demonstrated that, in general, the EF values in the presence of such carriers were not significantly increased. For the rest of the study, the simplest pH gradient transport with *n*-decanol as liquid membrane was chosen.

3.3.1. Extraction time

The extraction time is a critical factor in the three-phase HFSLM extraction system with two liquid-liquid interfaces, where analytes need to have time

to diffuse through each phase to get into the acceptor solution. For the non-facilitated pH gradient transport, the effect of extraction time on the EF for all the analytes in the HFSLM extraction process was studied as shown in Fig. 4. The EF of analyte extracted increases with longer extraction time until a maximum was obtained near the equilibrium at 20h. The extraction time for the three cases of transport was relatively long, but it is possible to prepare many samples in parallel and after the extraction do the analysis in a second day. On the basis of these findings, 20h of extraction time was selected for the subsequent experiments.

3.3.2. Stirring speed

As the HFSLM extraction process was done in kinetic uptake regime, the system is subjected to the effect of many dynamic processes. Agitation of the sample by shaking or stirring is one of the dynamic process that permits higher EF values [Charalabaki et al, 2005; Berhanu et al, 2006; Fontanals et al, 2006, Yamini et al, 2006]. Due to faster agitation rate decreased the diffusion layer in the aqueous phase around the surface of the membrane when agitation regime is established, mass transfer and

consequently EF increases. In our case, agitation by stirring was selected for its optimisation and shaking mode was not used to avoid the formation of air bubbles.

Stirring was found to improve extraction efficiency, because it increased the mass transfer coefficient in the donor phase. When the stirring speed increased in the studied range, EF values increased in a small range for all analytes. Stirring speed of 500 rpm was selected for the following experiments.

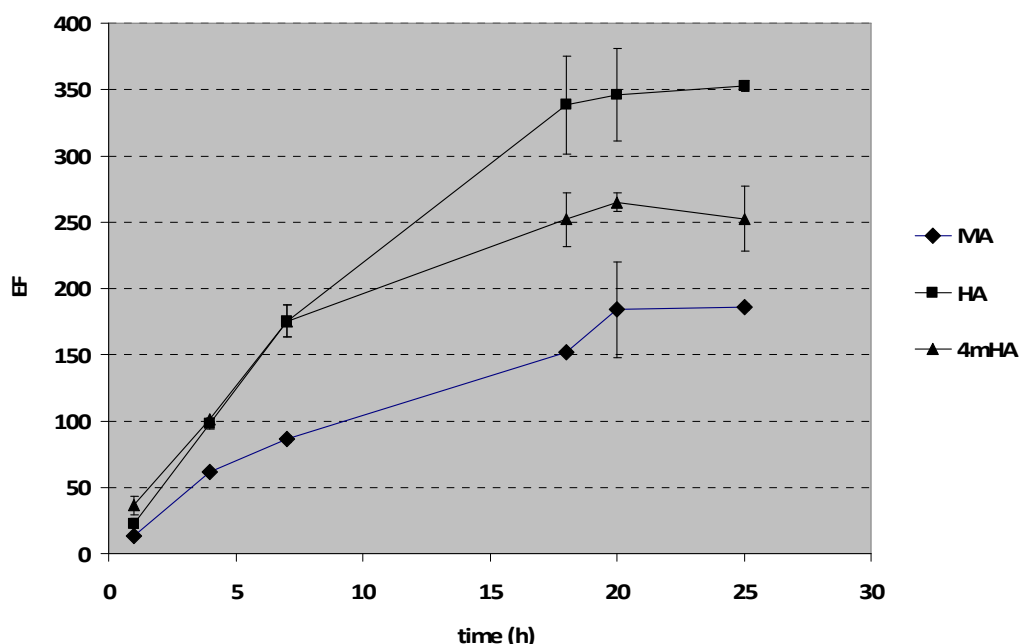


Fig. 4. Effect of extraction time on the enrichment factor of mandelic acid (MA), hippuric acid (HA) and 4-methyl hippuric acid (4mHA) by non-facilitated pH gradient transport. Conditions: concentration for each analyte was $100 \mu\text{g L}^{-1}$ in 20-mL donor solution at pH2, 500 mM NaCl, stirring speed of 500 rpm, *n*-decanol as liquid membrane and 40 μL of 1M NaOH as acceptor solution at pH11.4.

3.3.3. Salinity

HFSLM extraction of weak acids can be affected by addition of salts [Kou et al., 2004; Berhanu et al., 2006] due to increasing of the ionic strength of aqueous donor solution to lower the solubility of organic compounds in their non dissociated form that increases K_D . Effect of the salinity was studied by adding 0, 50, 150, 300 and 500 mM of NaCl to the donor sample solution using the optimised extraction time and stirring speed. It was found that increasing in the salt concentration resulted in higher EF, but only in approximately two times. Also,

salinity had little effect on the EF for all analytes. The additional concentration of 500mM NaCl in donor sample solution was used in the subsequent experiments.

3.3.4. Buffer as acceptor solution

Since the extraction is based on difference in pH values between donor and acceptor phases, an appropriate buffer solution was studied as acceptor solution [Kou et al., 2004; Liu et al., 2005]. Because of the Na_3PO_4 content in the mobile phase used in the HPLC analysis of the acceptor phases after the

HFSLM extraction, 1M NaOH and 1M Na₃PO₄ buffers were investigated this time. High concentration of buffers was used to increase the reservoir capacity of the acceptor solution [Kou et al., 2004]. The results for these two buffers showed major capacity for 1M NaOH solution as acceptor phase with better repeatability. This acceptor solution was selected for the HFSLM extraction method since the major EF values were obtained for all analytes.

3.4. Method validation

The performance of the proposed HFSLM extraction method was determined by extracting for 20h donor aqueous solutions containing 500 mM NaCl stirred at 500 rpm and spiked with all target analytes at concentrations ranging from 0.1 to 250 µg L⁻¹, meaning 0.002-5 µg range in 20-mL donor sample solution. The organic solvent was *n*-decanol and 40 µL of 1M NaOH as acceptor solution. The calculated calibration curves gave a high level of linearity for all target analytes with averaged correlation coefficients (*r*²) in the range of 0.991-0.999 (Table

2). Limit of detection (LOD) for each analyte was obtained as the sample content (ng), which gave a peak area in the HPLC chromatogram three times the background noise. The LOD were found to be in the low nanograms level ranging 0.2 and 1.6 ng. The repeatability of the method representing the infra-day precision and expressed as relative standard deviation (RSD) was determined by triplicate analysis at 2-µg level (100 µg L⁻¹ of spiked donor solution concentration level) and was found to vary between 7% and 10.1%. Furthermore, the reproducibility of the method meaning the inter-day precision was studied by extracting three replicate samples at 2-µg level (100 µg L⁻¹) over a period of three working days. The reproducibility expressed as RSD was found ranging from 5.3 to 6.9%. The method showed very good repeatability and reproducibility at such low concentration of analytes. The extraction efficiency (EE), defined as the fraction of analytes extracted [Kou et al., 2004] under optimised HFSLM conditions, was reported in the range of 13-157% for all target analytes and all studied concentration range.

Table 2. Analytical performance of HFSLM-HPLC-DAD^a

Compound	Linear Range (µg)	Regression coefficient (<i>r</i> ²)	LOD ^b (ng)	Repeatability ^c RSD (%)	Reproducibility ^d RSD (%)	EE ^e (%)
MA	0.002-5.7	0.999	1.6	7.0	6.9	13-73
HA	0.01-7.9	0.991	0.2	10.1	8.1	32-157
4mHA	0.002-5.3	0.994	0.2	9.5	5.3	41-98

^a Hollow fibre supported liquid membrane (HFSLM) extraction of BTEX metabolites (mandelic acid, MA, hippuric acid, HA and 4methyl hippuric acid, 4mHA) followed by HPLC with diode array detection were carried out by triplicate.

^b Based on the lowest detectable peak with a signal-to-noise ratio of three.

^c Infra-day precision, calculated by extracting three triplicate samples spiked at 100 µg L⁻¹.

^d Inter-day precision, evaluated by extracting three triplicate samples over a period of three working days.

^e Extraction efficiency, defined as a percentage of analytes extracted, under optimised hollow fibre supported liquid membrane (HFSLM) conditions in the all range of concentration.

3.5. Application to human teeth

In order to consider the applicability of the present HFSLM-HPLC method to the analysis of BTEX metabolites in human teeth, the analysis of a sample tooth (number 1) by the three different transports studied before (*n*-decanol, *n*-decanol with 25% TBP, and *n*-decanol with 20% Aliquat 336) was

carried out by taking 2 mL of extractable solution for each HFSLM extraction. The results showed in fig. 5 by overlapping of the HPLC chromatograms of the different acceptor solutions, demonstrated that facilitated transport with cationic carrier Aliquat 336 pre-concentrate a lot of compounds from the donor sample solution. In this case, the acceptor solution

became an intensive orange solution, and these carboxylic acids are colourless in aqueous solution. For the other two types of transport, the clean-up

and the pre-concentration step permitted better results in the BTEX metabolites identification.

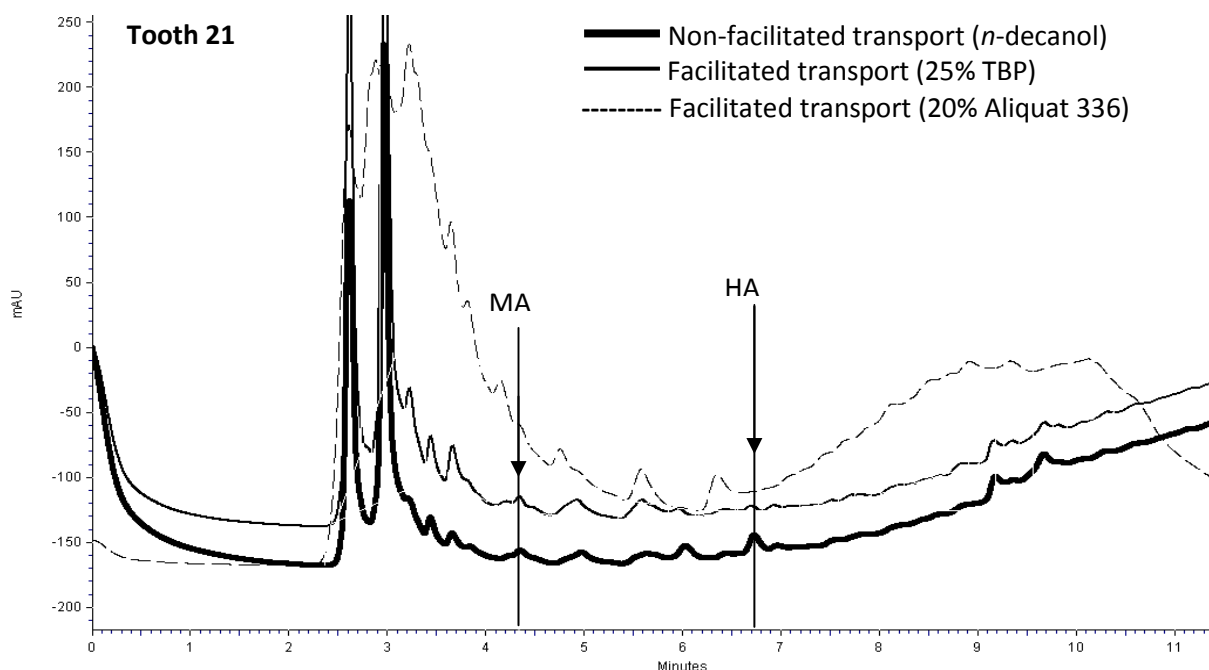


Fig. 5. Overlapped HPLC chromatograms of acceptor solutions obtained in the HFSLM extraction of human tooth 1 with three different organic liquid membranes.

The results in the HFSLM-HPLC analysis of eight real samples was obtained by the optimised non-facilitated transport with *n*-decanol as OLM, and the content of carboxylic acids in these human teeth is showed in Table 3. The samples were weighted and extracted with 10 mL of 1M NaOH for 4h in ultrasonic bath, and after the extraction, the solutions were adjusted to pH2 with concentrated acid chloride, NaCl was added and 20 mL of volume

was adjusted to obtain the optimised conditions for donor sample solution. Fourteen microlitres of the acceptor solution 1M NaOH (pH12.6) and *n*-decanol as OLM were used. For all human teeth, MA was identified in 1 to 11 µg/g of concentration, and HA was quantified in a high level (70 µg/g) in tooth 2. On the other hand, 4mHA was not identified in these human teeth tooth.

Table 3. BTEX metabolites analysis by HFSLM-HPLC method in human teeth as biomarkers

Sample tooth	Age (years)	Smoker	Actual profession or work place	BTEX metabolites content (µg/g)		
				MA	HA	4mHA
1	49	no	TV camera	2.0	0.2	< 1x10 ⁻⁴
2	27	no	cooker	1.3	70.2	< 2x10 ⁻⁴
3	63	no	cooker	2.0	2.0	< 2x10 ⁻⁴
4	46	yes	plastic industry	10.6	< 1x10 ⁻⁴	< 1x10 ⁻⁴
5	63	no	house made	3.4	< 1x10 ⁻⁴	< 1x10 ⁻⁴
6	48	yes	fish sealer	1.9	< 1x10 ⁻⁴	< 1x10 ⁻⁴
7	42	no	construction company	2.1	< 0.8x10 ⁻⁴	< 0.8x10 ⁻⁴
8	33	yes	construction company	6.1	< 2x10 ⁻⁴	< 2x10 ⁻⁴

4. Conclusion

The present work showed that facilitated transport of hydrophilic compounds such as carboxylic acids through a HFSLM system containing *n*-decanol with different carriers permitted a small increase in the extraction efficiency for all analytes due to the stabilisation of the solvating complexes in the OLM, and a bad clean-up during the analysis of real samples in the case of anionic transport. A simple HFSLM method without organic solvent additives was selected and the method optimisation showed that EF depends of organic solvent in the OLM, extraction time, stirring speed, and salt concentration in the donor solution. The application of HFSLM-HPLC method to human teeth in the BTEX metabolites analysis provided acceptor solutions with adequate EFs and clean-up. This method was economical and easy to use as viable tool for future studies in the correlation between BTEX exposures and dental healthy, and could be extended to analyse other type of body fluids, such as urine, nails, and hairs.

Acknowledgements

The Spanish Ministry for Science and Education is acknowledged for the financial support provided (Project: CTM2006-13091-C2-02). Dra Cristina Gracia Ruiz from CAP Drassanes, ICS (Barcelona) are acknowledged for providing identified teeth samples. "*Amb el suport del Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu*".

References

Andreoli, R.; Manini, P.; Bergamaschi, E.; Brustolin, A.; Mutti, A. Solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for determination of monoaromatic hydrocarbons in blood and urine. Application to people exposed to air pollutants. *Chromatographia* (1999), 50(3/4), 167-172.

Angerer, J.; Hoersch, B. Determination of aromatic hydrocarbons and their metabolites in human

blood and urine. *Journal of Chromatography* (1992), 580(1-2), 229-55.

Angerer J., Schaller K. H. (eds) (1988) *Analyses of hazardous substances in biological materials. Methods for biological monitoring.* VCH, Weinheim, pp 52–66.

Astier, A. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of urinary metabolites of benzene, nitrobenzene, toluene, xylene and styrene. *Journal of Chromatography* (1992), 573(2), 318-22.

Bardstü KF, Ho TS, Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S, Jonsson JA. Supported liquid membranes in hollow fiber liquidphase microextraction (LPME) – Practical considerations in the three-phase mode. *J. Sep. Sci.* 2007, 30, 1364 – 1370.

Berhanu, T.; Liu, J.; Romero R.; Megersa, N.; Jonsson, J.A. Determination of trace levels of dinitrophenolic compounds in environmental water samples using hollow fiber supported liquid membrane extraction and high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* (2006), 1103, 1–8.

Burrini, C. Simultaneous HPLC determination of hippuric acid, o-, m-, and p-methylhippuric acids, mandelic acid, and phenylglyoxylic acid in urine. *Medicina del Lavoro* (1998), 89(5), 404-411.


Charalabaki M, Psillakis E, Mantzavinou D, Kalogerakis N. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater treatment plant effluents using hollow fibre liquid-phase microextraction. *Chemosphere* 60 (2005) 690–698.

Fontanals N, Barri T, Bergstro S, Jonsson JA. Determination of polybrominated diphenyl ethers at trace levels in environmental waters using hollow-fiber microporous membrane liquid–liquid extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1133 (2006) 41–48.


Fujii, T.; Kawabe, S.; Horike, T.; Taguchi, T.; Ogata, M. Simultaneous determination of the urinary metabolites of toluene, xylene and styrene using high-performance capillary electrophoresis.

- Comparison with high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications* (1999), 730(1), 41-47.
- Jonsson JA, Lovkvist P, Audunsson G, Nilve´ G. Mass transfer kinetics for analytical enrichment and sample preparation using supported liquid membranes in a flow system with stagnant acceptor liquid. *Anal. Chim. Acta* 277 (1993) 9.
- Jonsson JA, Mathiasson L. Liquid membrane extraction in analytical sample preparation II. Applications. *trends in analytical chemistry*, vol. 18, no. 5, 1999.
- Jung V, Chimukab L, Jönsson J.-Å., Niedack N, Bowens P, Alsanus B. Supported liquid membrane extraction for identification of phenolic compounds in the nutrient solution of closed hydroponic growing systems for tomato. *Analytica Chimica Acta* 474 (2002) 49–57.
- Kou D, Wang X, Mitra S. Supported liquid membrane microextraction with high-performance liquid chromatography–UV detection for monitoring trace haloacetic acids in water. *Journal of Chromatography A*, 1055 (2004) 63–69.
- Laffon, B.; Lema, M.; Mendez, J. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of urinary mandelic and phenylglyoxylic acids as indirect evaluation of styrene exposure. *Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications* (2001), 753(2), 385-393.
- Lee J, Lee HK, Rasmussenb KE, Pedersen-Bjergaard S. Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: A review. *Analytica Chimica Acta* 624 (2008) 253-268.
- Li Z, Qin W, Dai Y. Liquid-Liquid Equilibria of Acetic, Propionic, Butyric, and Valeric Acids with Trioctylamine as Extractant. *J. Chem. Eng. Data* 2002, 47, 843-848.
- Liu J-F, Hu X-L, Peng J-F, Jonsson JA, Mayer P, Jiang GB. Equilibrium Sampling of Freely Dissolved Alkylphenols into a Thin Film of 1-Octanol Supported on a Hollow Fiber Membrane. *Anal. Chem.* 2006, 78, 8526-8534.
- Liu, J.; Jonsson, J.A.; Mayer P. Equilibrium Sampling through Membranes of Freely Dissolved Chlorophenols in Water Samples with Hollow Fiber Supported Liquid Membrane. *Anal. Chem.* (2005), 77, 4800-4809.
- Marchei, E.; Joya, X.; Garcia-Algar, O.; Vall, O.; Pacifici, R.; Pichini, S. Ultrasensitive detection of nicotine and cotinine in teeth by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* (2008), 22(16), 2609-2612.
- Matsumoto M, Takahashi T, Fukushima K. Synergistic extraction of lactic acid with alkylamine and tri-nbutylphosphate: effects of amines, diluents and temperature. *Separation and Purification Technology* 33 (2003) 89-93.
- Mei F, Qin W, Dai Y. Extraction Equilibria of Benzoic Acid with Tributyl Phosphate in Kerosene and 1-Octanol. *J. Chem. Eng. Data* 2002, 47, 941-943.
- Moon, D. H.; Paik, N. W.; Shim, Y. Analysis of some metabolites of organic solvents in urine by high-performance liquid chromatography with β -cyclodextrin. *Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications* (1997), 694(2), 367-374.
- Mortaheb HR, Amini MH, Sadeghian F, Mokhtarani B, Daneshyar H. Study on a new surfactant for removal of phenol from wastewater by emulsion liquid membrane. *Journal of Hazardous Materials* 160 (2008) 582–588.
- Murtomaa, M.; Tervaniemi, Olli-Matti; Parviainen, J.; Ruokojaervi, P.; Tuukkanen, J.; Viluksela, M. Dioxin exposure in contaminated sawmill area: the use of molar teeth and bone of bank vole (*Clethrionomys glareolus*) and field vole (*Microtus agrestis*) as biomarkers. *Chemosphere* (2007), 68(5), 951-957.
- Qin W, Cao Y, Luo X, Liu G, Dai Y. Extraction mechanism and behavior of oxalic acid by trioctylamine *Separation and Purification Technology* 24 (2001) 419–426.
- Pascual J. A.; Diaz D.; Segura J.; Garcia-Algar O.; Vall O.; Zuccaro P.; Pacifici R.; Pichini S. A

- simple and reliable method for the determination of nicotine and cotinine in teeth by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* (2003), 17(24), 2853-5.
- Reese, E.; Kimbrough, R. D. Acute toxicity of gasoline and some additives. *Environmental Health Perspectives* (1993), 101(SUPPL. 6), 115-31.
- Schlosser S, Kertesz R, Martak J. Recovery and separation of organic acids by membrane-based solvent extraction and pertraction. An overview with a case study on recovery of MPCA. *Separation and Purification Technology* 41 (2005) 237–266.
- Shen, Y. In Vitro cytotoxicity of BTEX metabolites in HeLa cells. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* (1998), 34(3), 229-234.
- Tamada, J. A., Kertes, A. S., and King, C. J., Extraction of carboxylic acids with amine extractants. 2. Chemical interactions and interpretation of data. *Ind. Eng. Chem. Res.* 29, 1327 (1990a).
- Tamada, J. A., Kertes, A. S., and King, C. J., Extraction of carboxylic acids with amine extractants. 1. Equilibria and law of mass action modeling. *Ind. Eng. Chem. Res.* 29, 1319 (1990b).
- Tolnai, B.; Gelencser, A.; Gal, C.; Hlavay, J. Evaluation of the reliability of diffusive sampling in environmental monitoring. *Analytica Chimica Acta* (2000), 408(1-2), 117-122.
- Trtic-Petrovic T, Liu J-F, Jonsson JA. Equilibrium sampling through membrane based on a single hollow fibre for determination of drug–protein binding and free drug concentration in plasma. *Journal of Chromatography B*, 826 (2005) 169–176.
- Wang, Ch-Y.; Huang, Ch-T.; Hsieh, Y-Z. Determination of metabolites of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene by β -cyclodextrin modified capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science* (2003), 26, 69–74.
- Wardell JM, King CJ. Solvent equilibriums for extraction of carboxylic acids from water. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 1978, 23 (2), 144-148.
- Wodzki R, Nowaczyk J. Propionic and acetic acid pertraction through a multimembrane hybrid system containing TOPO or TBP. *Separation and Purification Technology* 26 (2002) 207–220.
- Yamini Y, Reimann CT, Vatanara A, Jonsson JA. Extraction and preconcentration of salbutamol and terbutaline from aqueous samples using hollow fiber supported liquid membrane containing anionic carrier. *Journal of Chromatography A*, 1124 (2006) 57–67.
- Yankov D, Molinier J, Albet J, Malmayb G, Kyuchoukov G. Lactic acid extraction from aqueous solutions with tri-n-octylamine dissolved in decanol and dodecane. *Biochemical Engineering Journal* 21 (2004) 63–71.
- Yimrungruang D, Cheevaporn V, Boonphakdeeb T, Watchalayann P, Helander HF. Characterization and Health Risk Assessment of Volatile Organic Compounds in Gas Service Station Workers. *EnvironmentAsia* 2 (2008) 21-29.
- Zhao G, Liu J-F, Nyman M, Jonsson JA. Determination of short-chain fatty acids in serum by hollow fiber supported liquid membrane extraction coupled with gas chromatography. *Journal of Chromatography B*, 846 (2007) 202–208.



La interacción entre la actividad humana y los diferentes biosistemas no siempre se ha llevado a cabo en un modo sostenible, por un lado debido a un uso indiscriminado de los recursos naturales y por otro producto de una postura egocéntrica en detrimento de los ecosistemas, generando una contaminación ambiental de manera sistemática. En este sentido, en el presente trabajo de tesis se han desarrollado un conjunto de metodologías analíticas basadas en técnicas separativas para el estudio de diferentes tipos de biosistemas donde la acción del hombre ha jugado un papel central, y que servirán en un futuro para profundizar en el conocimiento de esta interacción. Estas metodologías analíticas se implementaron para el estudio de dos biosistemas fundamentales: el reino vegetal como fuente natural de principios activos tanto en el campo terapéutico como nutricional, y por otro lado, en las implicaciones de la contaminación en la salud humana.



En un primer estudio se establecieron metodologías analíticas para la identificación de los principales agentes antioxidantes y antivirales en especies de *Erythroxylum*. En un segundo término se estudió el comportamiento de la quercetina bajo un método de microextracción en fase líquida para su análisis en alimentos de origen vegetal. En tercer y cuarto lugar se desarrollaron métodos de microextracción en fase sólida y líquida para el estudio en dientes humanos de compuestos orgánicos volátiles y sus metabolitos, que puedan contribuir a una posible categorización de la exposición acumulativa y su relación con la salud bucal.

TECNIO

Be tech. Be competitive



Grup de Tècniques
de Separació en Química
UAB



PARC DE RECERCA UAB