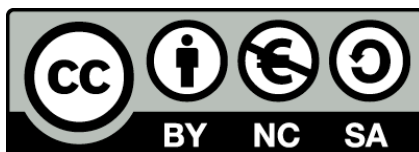




UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

# Desarrollo de metodologías analíticas para la caracterización y autenticación de fármacos y alimentos derivados de productos naturales de origen vegetal y ricos en polifenoles

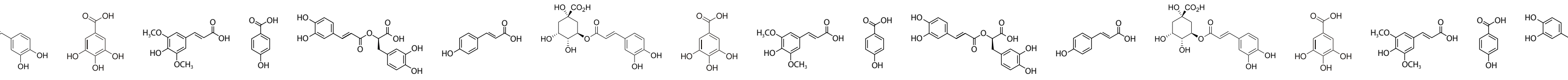
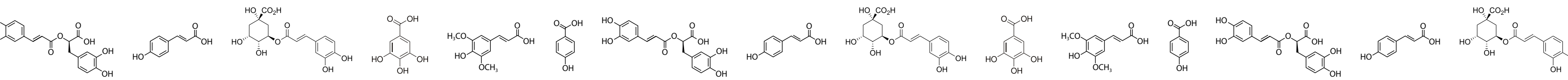
Sergio Barbosa Barbero



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència Reconeixement- NoComercial – CompartirIgual 4.0. Espanya de Creative Commons.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia Reconocimiento - NoComercial – CompartirIgual 4.0. España de Creative Commons.

This doctoral thesis is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.



Sergio Barbosa Barbero

Tesis Doctoral

2020



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Desarrollo de metodologías analíticas para la caracterización y autenticación de fármacos y alimentos derivados de productos naturales de origen vegetal y ricos en polifenoles

Sergio Barbosa Barbero







UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

FACULTAD DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y QUÍMICA ANALÍTICA

PROGRAMA DE DOCTORADO  
QUÍMICA ANALÍTICA Y MEDIO AMBIENTE

---

**Desarrollo de metodologías analíticas  
para la caracterización y autenticación de fármacos  
y alimentos derivados de productos naturales  
de origen vegetal y ricos en polifenoles**

---

Tesis presentada por Sergio Barbosa Barbero  
para obtener el grado de Doctor por la Universidad de Barcelona

Directores: Dr. Oscar Nuñez Burcio y Dr. Lluís Puignou García

Barcelona, octubre 2020



El Dr. Oscar Núñez Burcio y el Dr. Lluís Puignou García, profesor agregado Serra Húnter y catedrático del Departamento de Ingeniería Química y Química Analítica respectivamente,

HACEN CONSTAR:

Que el presente trabajo de investigación titulado **“Desarrollo de metodologías analíticas para la caracterización y autenticación de fármacos y alimentos derivados de productos naturales de origen vegetal y ricos en polifenoles”** ha sido realizado bajo nuestra dirección por el Sr. Sergio Barbosa Barbero en el Departamento de Ingeniería Química y Química Analítica de la Universidad de Barcelona y que todos los resultados presentados son fruto de las experiencias realizadas por el citado doctorando.

Y para que conste, expedimos y firmamos el presente certificado.

Barcelona, octubre 2020

**Dr. Lluís Puignou García**

*Catedrático de Universidad  
del Departamento de Ingeniería Química  
y Química Analítica  
de la Universitat de Barcelona*

**Dr. Oscar Núñez Burcio**

*Profesor Agregado (Serra Húnter)  
Departamento de Ingeniería Química  
y Química Analítica  
de la Universitat de Barcelona*





*Dedicado a mi Moncheta y a mi hija Nahia*



# AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis directores Dr. Oscar Núñez y Dr. Lluís Puignou por guiarme y orientarme en el desarrollo de esta tesis.

A toda la gente del laboratorio del grupo CECEM, Raquel, Juanfran, Ane, Guillem, Nerea, Noemí, Alex y Miriam que me han acompañado a lo largo de estos años.

También quiero darles las gracias a los Dres. José Barbosa y Mercedes Barbero que han colaborado tanto a nivel personal como académico.

A Leonor Olaso y José Antonio Aguilar por la ayuda y esfuerzo prestado en el día a día para que pueda estudiar.

A Izar Pla, gran amigo y compañero, por su colaboración y ayuda en la maquetación de este trabajo.

Y finalmente solo me queda mencionar a la persona más importante que ha hecho posible la realización de esta tesis, Montse Aguilar Olaso por su compañía y gran ayuda durante 8 años y espero que sean muchos más. Sin tí no podría haberlo realizado.



# ÍNDICE

<b>Resumen .....</b>	<b>v</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>vii</b>
<b>Abreviaturas y Acrónimos.....</b>	<b>ix</b>
<b>Objetivo y estructura.....</b>	<b>xiii</b>
<b>CAPÍTULO 1: Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Productos naturales y su autenticidad .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Estrategias para la autenticación de productos naturales .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.1. Métodos dirigidos .....</b>	<b>13</b>
1.2.1.1. Publicación I: Capítulo de libro. The role of polyphenols and polyphenolic fingerprinting profiles in the characterization and authentication of natural food products” .....	21
<b>1.2.2. Métodos no dirigidos .....</b>	<b>81</b>

<b>CAPÍTULO 2: Arándano rojo americano</b> .....	<b>91</b>
<b>2.1. <i>Vaccinium macrocarpon</i></b> .....	<b>93</b>
2.1.1. Polifenoles y Ácidos fenólicos.....	97
2.1.2. Metodología analítica para la determinación de polifenoles .....	107
2.1.3. Técnicas quimiométricas .....	113
<b>2.2. Artículos científicos</b> .....	<b>118</b>
2.2.1. Publicación II: Detection and quantitation of frauds in the authentication of cranberry-based extracts by UHPLC-HRMS (orbitrap) polyphenolic profiling and multivariate calibration methods.....	119
2.2.2. Publicación III: UHPLC-HRMS (orbitrap) fingerprinting in the classification and authentication of cranberrybased natural products and pharmaceuticals using multivariate calibration methods .....	137
<b>2.3. Discusión de resultados</b> .....	<b>151</b>
2.3.1. Tratamiento de muestra.....	151
2.3.2. Instrumentación .....	153
2.3.3. Análisis de datos.....	154
2.3.4. Caracterización de polifenoles.....	155
2.3.5. Resultados .....	156
 <b>CAPITULO 3: Pimentón</b> .....	 <b>167</b>
3.1. El género <i>Capsicum</i> L.....	169
3.2. El género <i>Capsicum</i> en Europa y su posterior difusión .....	171
3.3. El pimiento para pimentón .....	176
3.3.1 Pimentón de la Vera .....	183
3.3.2 Pimentón de Murcia.....	184
<b>3.4. Artículos científicos</b> .....	<b>186</b>
3.4.1. Publicación IV: Determination of Phenolic Compounds in Paprika by Ultrahigh Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry: Application to Product Designation of Origin Authentication by Chemometrics .....	187

---

3.4.2. Publicación V: Targeted UHPLC-HRMS (Orbitrap) Polyphenolic and Capsaicinoid Profiling for the Chemometric Characterization and Classification of Paprika with Protected Designation of Origin (PDO) Attributes .....	211
3.4.3. Publicación VI: Classification and Authentication of Paprika by UHPLC-HRMS Fingerprinting and Multivariate Calibration Methods (PCA and PLS-DA) .....	229
<b>3.5. Discusión de resultados .....</b>	<b>241</b>
3.5.1. Tratamiento de muestra .....	241
3.5.2. Instrumentación .....	242
3.5.3. Análisis de datos .....	243
3.5.4. Resultados.....	244
<b>CAPITULO 4: Conclusiones .....</b>	<b>261</b>
4.1. Arándano Rojo Americano .....	263
4.1.1. Método dirigido por LC-HRMS.....	263
4.1.2. Método no dirigido por LC-HRMS .....	264
4.2. Pimentón .....	265
4.2.1. Método dirigido por LC-LRMS .....	265
4.2.2 Método dirigido por LC-HRMS.....	266
4.2.3. Método no dirigido por LC-HRMS .....	267
<b>Bibliografía .....</b>	<b>269</b>





# RESUMEN

En los últimos años, el consumo de productos naturales ha aumentado enormemente. Cada vez más, los consumidores prefieren una línea natural para la alimentación, medicinas, cosméticos y hasta perfumería, en lugar de consumir productos procesados o preparados sintéticamente. La obtención de productos naturales suele tener un coste más elevado que la de productos sintéticos o procesados, debido a múltiples factores como por ejemplo la necesidad de cumplir con ciertos parámetros de calidad. Por ello, cada vez es más fácil encontrar en el mercado productos naturales con diferentes logos o etiquetas que garantizan su composición natural, su elaboración y su procedencia. La regulación de los productos naturales varía a nivel mundial y además depende del tipo de producto comercializado. Sin embargo, el fraude en los productos naturales sigue siendo una práctica muy extendida que busca principalmente el beneficio económico, ya sea a través de un aumento en las ventas o mediante la reducción de los costes de producción. Esta práctica es muy difícil de combatir, debido principalmente a la globalización del comercio, la complejidad de las cadenas de suministro, las diferencias políticas regulatorias entre cada país y el hecho de que la responsabilidad legal principal se delega de forma predeterminada en los fabricantes. El fraude es un término colectivo que abarca la sustitución, la adición, la manipulación, la tergiversación de ingredientes o envases, o declaraciones falsas o engañosas sobre un producto para beneficio económico. Por tanto, el fraude de un producto natural abarca desde la adulteración del producto hasta un etiquetado incorrecto con la finalidad de obtener un beneficio económico a costa del consumidor. Sin embargo, se debe considerar que el fraude no solo tiene consecuencias económicas sino que también representa importantes problemas de salud cuando se agregan sustancias prohibidas (y puede que tóxicas). Por lo tanto, se requiere el desarrollo de nuevas metodologías analíticas para garantizar la integridad y autenticidad de los productos naturales, considerando también que su adulteración se ha vuelto cada vez más sofisticada, a menudo especialmente diseñada para evitar la detección mediante análisis de rutina.

La cromatografía de líquidos es una de las técnicas de separación más eficaces para garantizar la integridad y autenticidad de los productos naturales. Normalmente se emplean dos enfoques principales: análisis dirigidos y no dirigidos. El análisis dirigido se basa en la determinación específica de un grupo dado de sustancias químicas seleccionadas como los compuestos polifenólicos. La concentración y distribución de estos compuestos obtenidos por LC acoplada a espectrometría de masas de baja resolución (LRMS) o espectrometría de masas de alta resolución (HRMS), pueden emplearse como descriptores químicos para lograr la autenticación de los productos naturales mediante métodos quimiométricos. Por el contrario, los enfoques no dirigidos (basados en la obtención del perfil metabolómico) se basan en las respuestas instrumentales LC-LRMS y LC-HRMS sin asumir ningún conocimiento previo de sus componentes.

En este trabajo, se han desarrollado varias estrategias por LC-LRMS y LC-HRMS dirigidas y no dirigidas en combinación con métodos quimiométricos multivariados (análisis de componentes principales y análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales) para abordar la clasificación y autenticación de los varios productos naturales y alimentos de origen vegetal ricos en polifenoles. Las diferentes metodologías se aplicaron con éxito en muestras de arándanos rojos, arándano azul, uva, frambuesa y productos farmacéuticos a base de arándano rojo, para garantizar su composición en función de la fruta de origen, así como muestras de pimentón de la Vera, pimentón de Murcia y pimentón procedente de la República Checa con la finalidad de garantizar las denominaciones de origen (DOP) y sus diferentes variedades de sabor.

# ABSTRACT

In recent years, the consumption of natural products has increased enormously. Nowadays, consumers prefer a natural production line for food, medicine, cosmetics and even perfumery, instead of consuming processed or synthetically prepared products. Obtaining natural products usually has a higher cost than synthetic or processed ones, due to multiple factors such as the need to comply with certain quality parameters. For this reason, it is becoming easier to find natural products on the market with different logos or labels that guarantee their natural composition, their production and their origin. The regulation of natural products varies worldwide and also depends on the type of product marketed. However, fraud in natural products continues to be a very widespread practice that seeks primarily economic benefit, either through an increase in sales or by reducing production costs. This practice is very difficult to prevent, mainly due to the globalization of trade, the complexity of supply chains, the regulatory political differences between each country and the fact that the main legal responsibility is delegated by default to the manufacturers. Fraud is a collective term that encompasses the substitution, addition, manipulation, misrepresentation of ingredients or packaging, or false or misleading statements about a product for financial gain. Therefore, the fraud of a natural product ranges from the adulteration of the product to an incorrect labeling in order to obtain an economic benefit at the expense of the consumer. However, it must be considered that fraud not only has economic consequences but also represents significant health problems when prohibited (and maybe toxic) substances are added. Therefore, the development of new analytical methodologies is required to guarantee the integrity and authenticity of natural products, considering also that their adulteration has become increasingly sophisticated, often specially designed to avoid detection by routine analysis.

Liquid chromatography is one of the most effective separation techniques to ensure the integrity and authenticity of natural products. Two main approaches are typically used: targeted and non-targeted analysis. Targeted analysis is based on the specific determination of a given group of selected chemicals such as polyphenolic compounds. The concentration and distribution of these compounds obtained by LC coupled to low-resolution mass spec-

trometry (LRMS) or high-resolution mass spectrometry (HRMS) can be used as chemical descriptors to achieve the authentication of natural products by chemometric methods. In contrast, non-targeted approaches (based on metabolomic fingerprinting) are based on the LC-LRMS and LC-HRMS instrumental responses without assuming any prior knowledge of their components.

In this work, several targeted and non-targeted LC-LRMS and LC-HRMS strategies have been developed in combination with multivariate chemometric methods (principal component analysis and partial least squares discriminant analysis) to address the classification and authentication of several natural products and plant-based foods rich in polyphenols. The different methodologies were successfully applied with samples of cranberries, blueberries, grapes, raspberries and cranberry-based pharmaceutical products, to guarantee their composition depending on the fruit of origin, as well as samples of La Vera, Murcia and Czech Republic paprika in order to guarantee the designations of origin (PDO) and their different flavor varieties.

# ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b>A</b>	ACN	Acetonitrilo
	AEMPS	Agencia española de medicamentos y productos sanitarios
	AFSSA	Agencia francesa de seguridad sanitaria de los alimentos
	APCI	Ionización química a presión atmosférica
	APPI	Fotoionización a presión atmosférica
<b>B</b>	BOE	Boletín Oficial del Estado
<b>C</b>	C8	Octil
	C18	Octadecil
	CP-ANN	Red neuronal artificial de contrapropagación
<b>D</b>	DAD	Detector de diodos
	DAMAC	4-dimetilamonicinnamaldehido
	DOP	Denominación de origen protegido
	dp	Tamaño de partícula
<b>E</b>	EDQM	Farmacopea europea
	EM	Espectrometría de masas
	EMA	Agencia europea de medicamentos
	ESI(-)	Electrospray en modo negativo
	ESI(+)	Electrospray en modo positivo
	ESI	Electrospray
<b>F</b>	FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos
	FID	Detector de ionización de llama

<b>F</b>	FTICR	Resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier
	FT-IR	Infrarrojo con transformada de Fourier
	Full Scan	Barrido completo
	FWHM	Anchura a media altura
<b>G</b>	GC	Cromatografía de gases
<b>H</b>	HC	Agrupamiento jerárquico
	HCA	Análisis de agrupamiento jerárquico
	H-ESI	Electrospray a elevada temperatura
	HILIC	Cromatografía de interacción hidrofílica
	HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
<b>I</b>	IGP	Indicación geográfica protegida
	IT	Analizador de masas de trampa de iones
	IT-TOF	Analizador de masas con una trampa de iones y tiempo de vuelo
	ITU	Infecciones del tracto urinario
<b>L</b>	LC-HRMS	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución
	LC-MS/MS	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem
	LC-MS	Cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas
	LDA	Análisis discriminante lineal
	LIT-Orbitrap	Analizador de masas con una trampa de iones lineal y un Orbitrap
	LRMS	Espectrometría de masas de baja resolución
	LTQ-Orbitrap	Analizador de masas con una trampa lineal cuadrupolar y un Orbitrap
<b>M</b>	m/z	Relación masa/carga
	MALDI	Ionización por desorción laser asistida por matriz
	MS/MS o MS2	Espectrometría de masas en tándem
	MS	Espectrometría de masas
<b>N</b>	NIR	Espectroscopía del infrarrojo cercano
<b>P</b>	PACs	Proantocianidinas
	PCA	Análisis por componentes principales
	PCs	Componentes principales
	PLS	Regresión de mínimos cuadrados parciales
	PLS-DA	Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales

---

<b>Q</b>	Q-Orbitrap	Analizador de masas con un cuadrupolo lineal y Orbitrap
	QqQ	Analizador de masas de triple cuadrupolo
	Q-TOF	Analizador de masas con cuadrupolo lineal y tiempo de vuelo
	QTRAP	Analizador de masas con cuadrupolo lineal y trampa iónica
<b>R</b>	RMN	Resonancia magnética nuclear
<b>S</b>	SIMCA	Modelado independiente suave de analogía de clase
	SLDA	Análisis discriminador lineal gradual
	SPE	Extracción en fase sólida
	SPME	Micro extracción en fase sólida
	SPP	Columnas con partículas superficialmente porosas, de núcleo fundido o de núcleo sólido
	SRM	Selected Ion Monitoring
STM	Columnas cromatográficas con tamaño de partículas por debajo de 2µm	
<b>T</b>	TIC	Cromatografía de iones totales
	TOF	Analizador de masas de tiempo de vuelo
	TSG	Especialidades tradicionales garantizadas
<b>U</b>	u.a.	Unidades arbitrarias
	UHPLC	Cromatografía de líquidos de ultra alta eficacia
	UHPLC-QTOF	Cromatografía de líquidos de ultra alta eficacia acoplada a un analizador con cuadrupolo lineal y tiempo de vuelo
	USP	Farmacopea de Estados Unidos





# OBJETIVO Y ESTRUCTURA



# OBJETIVO Y ESTRUCTURA DE LA TESIS

El objetivo principal de la presente Tesis es desarrollar metodologías analíticas, rápidas y fiables, para la caracterización, clasificación y autenticación de fármacos y productos naturales alimenticios de origen vegetal y ricos en polifenoles, empleando cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas de alta y baja resolución, aplicando métodos dirigidos y no dirigidos, y utilizando métodos quimiométricos supervisados y no supervisados para el tratamiento de datos.

Con la finalidad de alcanzar el objetivo principal se plantearon otros objetivos más concretos que se mencionan a continuación:

- Estudiar mediante el análisis de componentes principales (PCA), si los perfiles polifenólicos de diferentes productos naturales y preparaciones farmacéuticas, obtenidos mediante el método desarrollado UHPLC-HRMS, son suficientemente discriminantes para caracterizar muestras de diferentes productos comerciales en función de la fruta de origen.
- Estudiar si los datos de las huellas metabolómicas UHPLC-HRMS, obtenidos en modo ESI tanto positivo como negativo, explorando también la posibilidad de fusión de datos, pueden ser considerados como una fuente de posibles descriptores químicos para la caracterización y clasificación de productos naturales de origen vegetal, así como la autenticación de fármacos a base de extractos de plantas medicinales como el arándano rojo mediante el análisis de componentes principales (PCA) y análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA).

- Evaluar una metodología mediante regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) para cuantificar los porcentajes de extractos de frutas (uva, arándano y frambuesa) utilizados para la adulteración en extractos de arándano rojo.
- Desarrollar un método UHPLC-ESI-QqQ para la determinación de 36 polifenoles en pimentón y evaluar su aplicación para la clasificación y autenticación mediante PCA y PLS-DA de muestras de pimentón de la Vera y pimentón de Murcia con DOP, así como en muestras procedentes de la República Checa.
- Evaluar la caracterización, clasificación y autenticación de muestras de pimentón de la Vera, pimentón de Murcia y pimentón de la República Checa, mediante un método por UHPLC-HRMS (Orbitrap) utilizando un enfoque dirigido, mediante el perfil polifenólico y capsaicínico, y no dirigido, mediante la huella metabolómica, aplicando métodos supervisados y no supervisados como PCA y PLS-DA.

Así, la presente tesis se ha estructurado en tres capítulos:

- El Capítulo 1 incluye una introducción general sobre la importancia de los productos naturales en la sociedad actual, así como de algunos parámetros de calidad que se aplican en estos productos. También se incluye con más detalle las estrategias a seguir para la autenticación de productos naturales y, en particular, las técnicas de cromatografía de líquidos acopladas a la espectrometría de masas utilizadas para la autenticación de productos naturales, mediante métodos dirigidos y no dirigidos, y aplicando técnicas quimiométricas. En este capítulo se incluye un Capítulo de Libro titulado *“The role of polyphenols and polyphenolic fingerprinting profiles in the characterization and authentication of natural food products”* (Nova Science Publishers, Inc. (2017), *Advances in Chemistry Research*. 40: 1-58).
- El capítulo 2 se centra en la metodología desarrollada para la caracterización de arándano rojo Americano y otras frutas, y consta de tres secciones. La primera sección es una introducción sobre *Vaccinium macrocarpon* o arándano rojo americano y su aplicación en productos naturales. Además, describe con detalle la importancia de los polifenoles, así como los métodos analíticos más relevantes para su determinación mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas y las técnicas quimiométricas utilizadas para la clasificación y autenticación de productos naturales. En la segunda sección se incluyen los artículos de investigación relacionados con la clasificación y autenticación de productos naturales y farmacéuticos a base de arándano rojo, que son *“Detection and Quantitation of Frauds in the Authentication of Cranberry-Based Extracts by UHPLC-HRMS (Orbitrap) Polyphenolic Profiling and Multivariate Calibration Methods”* (*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2018) 66(35):

9353-9365) and “UHPLC-HRMS (orbitrap) fingerprinting in the classification and authentication of cranberry-based natural products and pharmaceuticals using multivariate calibration methods” (Analytical Methods, (2019) 11(26): 3341-334). Finalmente, en la sección 3, se discuten los resultados obtenidos.

- El capítulo 3 se centra en la metodología desarrollada para la caracterización de varias variedades cultivadas de *Capsicum annuum* L. var. *annuum* y se subdivide en 5 apartados. Los apartados 1 y 2 describen el género *Capsicum* L. y su posterior difusión por Europa. El apartado 3 describe el pimentón, los principales productos elaborados en España, así como sus componentes principales (capsaicinas y capscinas). En el apartado 4 se incluyen los artículos relacionados con la clasificación y autenticación del pimentón, que son “*Determination of Phenolic Compounds in Paprika by Ultrahigh Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry: Application to Product Designation of Origin Authentication by Chemometrics*” (Journal of Agricultural and Food Chemistry, (2020) 68(2): 591-602), “*Classification and Authentication of Paprika by UHPLC-HRMS Fingerprinting and Multivariate Calibration Methods (PCA and PLS-DA)*”. (Foods, (2020) 9(4): 486) and “*Targeted UHPLC–HRMS (Orbitrap) Polyphenolic and Capsaicinoid Profiling for the Chemometric Characterization and Classification of Paprika with Protected Designation of Origin (PDO) Attributes*”. (Molecules. (2020) 25(7): 1623). Finalmente, en el último apartado se discuten los resultados obtenidos.

Finalmente, la tesis doctoral finaliza con las principales conclusiones extraídas de esta Tesis y la bibliografía.



# CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN





# INTRODUCCIÓN

## 1.1 Productos naturales y su autenticidad

Los productos naturales pueden ser simples pero pueden llegar a ser mezclas muy complejas constituidas por una gran variabilidad de compuestos tales como lípidos, carbohidratos, proteínas, vitaminas, ácidos orgánicos y compuestos orgánicos volátiles, entre otros [1].

En los últimos años el consumo de productos naturales ha aumentado enormemente. Cada vez más, los consumidores prefieren una línea natural para la alimentación, medicinas, cosméticos y hasta perfumería, en lugar de consumir productos procesados o preparados sintéticamente. Si bien las preferencias de los consumidores con respecto a los productos naturales a menudo están influenciadas por factores organolépticos (por ejemplo, color, sabor, aroma, etc.) y socioeconómicos (producción ecológica, origen y calidad garantizados, entre otros.), la sociedad está cada vez más interesada en productos que claramente no sean nocivos o bien que posean un valor añadido al contener compuestos específicos con propiedades beneficiosas para la salud [2].

La obtención de productos naturales suele tener un coste más elevado que la de productos sintéticos o procesados, debido a múltiples factores como pueden ser el valor de las materias primas, los procesos intrínsecos para su obtención o bien la necesidad de cumplir con ciertos parámetros de calidad. Todo ello repercute directamente en el precio final, pero a cambio proporciona un valor añadido y los fabricantes entran en un mercado en el que los consumidores están mucho más interesados. Por ello, cada vez es más fácil encontrar en el mercado productos naturales con diferentes logos o etiquetas que garantizan su composición natural, su elaboración y su procedencia. La regulación de los productos naturales varía a nivel mundial y además depende del tipo de producto comercializado. Por ejemplo, los productos vegetales pueden clasificarse

como complementos alimenticios, medicamentos, productos homeopáticos, cosméticos e incluso biocidas según la legislación específica [3].

El uso de plantas medicinales es una tradición arraigada en muchos países. Sin embargo, la calidad de la información científica que sostiene el uso de cada una de ellas es muy variable. En España, la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), a través del Real Decreto 1345/2007, del 11 de octubre, determina que sólo puedan denominarse como medicamentos aquellos productos elaborados con plantas que hayan superado los estándares de calidad, eficacia, seguridad e información que se exige a los medicamentos [4]. Por otro lado, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) establece actualizaciones periódicas de las Farmacopeas Europeas (*European Directorate for the Quality of Medicines*, EDQM) y, además, ha publicado una serie de monografías sobre la calidad y la autenticación de hierbas que proporcionan especificaciones metodológicas relevantes para la evaluación de la calidad [3]. Otros parámetros de calidad que cada vez adquieren más relevancia son la elaboración y la procedencia del producto. En este contexto, con el objetivo de preservar la reputación de los productos y apoyar las buenas prácticas en actividades rurales y agrícolas, la legislación europea ha establecido varios parámetros de calidad relativos a la protección de las indicaciones geográficas y de las denominaciones de origen de los productos agrícolas y alimenticios (Reglamento del Consejo, CEE n ° 510/2006 [5]), como son la Denominación de Origen Protegida (DOP) que vincula los productos con el área geográfica definida donde se producen, la Indicación Geográfica Protegida (IGP) que vincula los productos a un área geográfica donde al menos se produjo una etapa de la producción y Especialidades Tradicionales Garantizadas (TSG) que protege los métodos tradicionales de producción [6].

Lamentablemente, el fraude en los productos naturales sigue siendo una práctica muy extendida que busca principalmente el beneficio económico, ya sea a través de un aumento en las ventas o mediante la reducción de los costes de producción. Esta práctica es muy difícil de combatir, debido principalmente a la globalización del comercio, la complejidad de las cadenas de suministro, las diferencias políticas regulatorias entre cada país y el hecho de que la responsabilidad legal principal para la seguridad de los productos comercializados se delega de forma predeterminada en los fabricantes [3]. El fraude es un término colectivo que abarca la sustitución, la adición, la manipulación, la tergiversación de ingredientes o envases, o declaraciones falsas o engañosas sobre un producto para beneficio económico [7]. Por tanto, el fraude de un producto natural abarca desde la adulteración del producto hasta un etiquetado incorrecto con la finalidad de obtener un beneficio económico a costa del consumidor.

Actualmente, es fácil encontrar varios ejemplos de los diferentes tipos de fraude relacionados con productos naturales. Un caso conocido de productos naturales que

han sido adulterados son aquellos elaborados a base de hierbas que se suponen que pueden prevenir o tratar ciertas enfermedades, como la disfunción eréctil. Este tipo de productos suelen comercializarse como suplemento dietético, por lo que en la Unión Europea se consideran legalmente como alimentos de categoría especial y por lo tanto no se someten a ninguna evaluación de seguridad antes de su comercialización [8,9]. Los principios activos aprobados en Europa, que contienen los productos farmacéuticos que se utilizan para tratar la disfunción eréctil son sildenafil, vardenafil, tadalafil y avanafil [10]. Sin embargo se han encontrado productos naturales a base de hierbas que dicen tratar la disfunción eréctil, pero que en realidad han sido adulterados con estos principios activos, lo que provoca un problema grave de salud pública, debido a que la ingesta de estas sustancias no es adecuada para personas con problemas de corazón, ya que puede disminuir la presión arterial (hipotensión) y en combinación con nitratos orgánicos causar la muerte [11,12].

Los productos naturales relacionados con la alimentación son también propensos a ser adulterados. El aceite de oliva, el té, el vino y las especias son productos donde con frecuencia se han dado situaciones fraudulentas, junto con algunos otros alimentos [13]. Por ejemplo, en el caso del aceite de oliva etiquetado como virgen extra, el hecho de que su producción sea limitada y su alta demanda, lo hacen susceptible de ser adulterado con aceites de semillas comestibles más baratos (soja, maíz, canola, algodón, girasol, maní y almendra), o incluso con otros aceites de oliva de menor calidad (aceite de oliva refinado, aceite de orujo de oliva, etc.) [14]. En el caso del vino, una parte importante de su valor comercial está relacionado con su historia y su procedencia. Las botellas mal etiquetadas con respecto a su origen, clasificación y cosecha parecen ser el tipo de fraude más común. En este sentido, etiquetar una botella con una fecha y procedencia determinada hace que su valor pueda ser extremadamente elevado. Por ello, es fácil encontrar numerosos casos de fraudes relacionados con el vino a lo largo de la historia. Uno de los casos recientes más conocidos es el de los propietarios de Chateau Pontet-Canet quienes, en 1973, fueron descubiertos mezclando el vino de Rioja con el suyo propio y pasando la mezcla como Burdeos de calidad. Casi al mismo tiempo, se descubrió que la Casa de Cruse, mercaderes de Burdeos, había vendido vinos procedentes de Midi como de Burdeos [15].

Todos estos ejemplos ponen en relieve la importancia de desarrollar nuevas metodologías analíticas con la finalidad de identificar fraudes y garantizar al consumidor la autenticidad del producto que desea adquirir. La autenticación se puede definir como la capacidad de asignar un producto desconocido a una clase conocida de productos por medio de sus características físico-químicas pero también por factores sensoriales. En la industria es una necesidad importante en el ámbito de la trazabilidad, la seguridad y el control de calidad [16]. No obstante, los métodos utilizados para la adulteración de los productos naturales

son cada vez más sofisticados y en algunos casos están especialmente diseñados para evitar los métodos de análisis aplicados por las autoridades competentes. La gran diversidad de productos que hay en el mercado, los diferentes métodos para adulterar su composición y la necesidad de verificar su origen unido a las complejas matrices que deben analizarse, pone de manifiesto la dificultad en aplicar una metodología analítica eficaz para garantizar la autenticidad de un producto.

A la hora de desarrollar un método analítico hay que considerar varios factores importantes como la composición, la estructura de los compuestos que se quieren determinar o los niveles de concentración, que en algunos casos se corresponde con niveles trazas ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ,  $\text{ng}/\text{Kg}$ , etc.). La gran diversidad química de los compuestos a determinar dificulta la extracción y preparación de las muestras, así como su separación, determinación e identificación.

En los últimos años se han desarrollado múltiples métodos analíticos capaces de autenticar diferentes productos naturales. Entre las técnicas utilizadas se encuentran metodologías basadas en el ADN, métodos espectroscópicos que incluyen la espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), espectroscopia del infrarrojo cercano (NIR), Raman y Resonancia magnética nuclear (RMN), o evaluaciones visuales y sensoriales que aplicadas junto con la microscopia siguen siendo útiles como un sistema de autenticación rápido y económico [17,18]. Sin embargo, entre los métodos más aplicados en la autenticación de productos naturales se encuentran los métodos cromatográficos. El análisis mediante cromatografía de gases (GC) con un detector de ionización de llama (FID) es, por ejemplo, uno de los recomendados en algunas monografías para la autenticación de aceites esenciales [19]. Del mismo modo, la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detector de diodos en serie (DAD), se ha utilizado de forma eficiente, por ejemplo, para la autenticación de productos como el vino, permitiendo caracterizarlos según sus variedades [20]. El análisis de la composición cualitativa y cuantitativa de las muestras por cromatografía proporciona datos suficientemente aptos como para resaltar defectos en la calidad de los productos. Además, estos equipos trabajan en un amplio intervalo de linealidad y tienen requisitos de mantenimiento relativamente sencillos.

No obstante, la espectrometría de masas y especialmente la espectrometría de masas en tándem, normalmente acopladas a HPLC o cromatografía de líquidos de ultra elevada eficacia (UHPLC), es una de las técnicas más exitosas para la autenticación de productos naturales. Esta técnica permite desarrollar métodos dirigidos, altamente específicos y sensibles, pudiendo cuantificar analitos a concentraciones inferiores a  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , en el caso de moléculas de bajo peso molecular [21]. Un ejemplo de su aplicación es el método desarrollado por R. Rocchi y colaboradores [22], que utilizan un UHPLC

acoplado a un espectrómetro de masas con cuadrupolo y trampa iónica lineal (qTRAP), para determinar el origen y la edad de muestras de azafrán utilizando crocines como biomarcadores, que son un grupo de carotenoides solubles en agua, formados a partir de zeaxantina por escisión enzimática.

Sin embargo, los métodos dirigidos detectan solo unos pocos compuestos a la vez y, por lo tanto, proporcionan información limitada, lo que es insuficiente para proteger al consumidor contra el fraude y la adulteración de productos naturales [23]. En este sentido, la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas de alta resolución (LC-HRMS) está ganando popularidad, debido a la gran capacidad de esta metodología para proporcionar información más completa sobre la masa exacta, la composición elemental y la estructura molecular de los compuestos determinados. Este tipo de analizadores permite además identificar compuestos desconocidos que pueden ser propuestos como biomarcadores, así como clasificar las muestras en función de su perfil metabolómico. Los analizadores más utilizados para la autenticación de productos naturales por LC-HRMS son el tiempo de vuelo (TOF) y el Orbitrap, aunque también se emplean instrumentos híbridos que ofrecen mejores prestaciones como el cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF), cuadrupolo-Orbitrap (Q-Orbitrap) y trampa lineal cuadrupolar-Orbitrap (LTQ-Orbitrap) [24]. Un ejemplo de su aplicación es el método desarrollado por Chen y colaboradores [25], quienes utilizan un UHPLC-QTOF para la autenticación y evaluación de Ginsengs asiáticos y estadounidenses de diversos productos comerciales utilizados con fines medicinales.

En el siguiente apartado se tratarán con más detalle las estrategias a seguir para la autenticación de productos naturales y, en particular, las técnicas de cromatografía de líquidos acopladas a la espectrometría de masas utilizadas para la autenticación de productos naturales.

## **1.2 Estrategias para la autenticación de productos naturales**

Los controles de autenticidad verifican que un producto cumple con todos los parámetros correspondientes a su etiquetado, y tienen como principal objetivo detectar cualquier tipo de variación que haya sufrido un determinado producto, ya sean diluciones, adiciones o la simple sustitución de determinados ingredientes por otros de menor valor.

Actualmente, los controles efectuados por las autoridades competentes para el cumplimiento de las normativas establecidas para cada producto, consisten principalmente en inspecciones *“in situ”* de los lugares de producción. Durante estas inspecciones se controlan los registros, materias primas, sistemas de producción,

maduración, etc., y se recogen diferentes muestras que son analizadas por laboratorios independientes, para así asegurar que todo el proceso es conforme a la normativa vigente. Sin embargo, los análisis realizados por parte de las agencias reguladoras se limitan a análisis de rutina, que no siempre detectan adulteraciones.

Estos análisis están basados principalmente en la determinación de un componente, por lo que proporcionan una información limitada y claramente insuficiente, a menos que se sospeche de un proceso de adulteración específico. A este componente se le conoce como marcador analítico y puede estar vinculado directa o indirectamente con la autenticación del producto. Un componente vinculado de forma directa con la autenticación del producto recibe el nombre de marcador primario, mientras que si está vinculado de forma indirecta se le conoce como marcador secundario [26].

Un ejemplo de adulteración que relaciona estos dos conceptos es la adulteración de leche en polvo infantil, o de alimentos específicos para mascotas, con melamina. La melamina es un compuesto formado por tres moléculas iguales de cianamida y, en consecuencia, con gran contenido en nitrógeno, que suele utilizarse para la fabricación de resinas o como adhesivo para obtener maderas aglomeradas y contrachapado. La razón principal por la que se utilizó este compuesto en la adulteración de los productos anteriormente comentados es que las autoridades competentes miden el valor nutricional de muchos alimentos por su contenido en proteínas, y éste se cuantifica con la determinación del nitrógeno total mediante el método Kjeldahl. En este caso, el nitrógeno actúa como marcador secundario para autenticar el contenido proteico del alimento declarado en la etiqueta, y el hecho de añadir melamina a un producto alimenticio, hace que aumente el contenido de nitrógeno del alimento que de forma fraudulenta aumenta su contenido proteico y en consecuencia su valor en el mercado. Como resultado de su adición, miles de mascotas resultaron afectadas o murieron en EEUU en 2007 y en China, más de 300000 niños resultaron afectados y seis de ellos murieron en el año 2008 [27,28]. En consecuencia, el gobierno Chino aumentó los controles de todos los alimentos y la administración de alimentos y medicamentos de EEUU (FDA) validó un método por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) para detectar y cuantificar melamina y ácido cianúrico en alimentos, con la finalidad de resolver este problema [29]. En este caso la melamina y el ácido cianúrico actúan como marcador primario ya que están vinculados de forma directa con la autenticación del producto. El método consiste en una extracción con ácido fórmico, seguido de una serie de etapas de centrifugación, filtración y dilución. Finalmente, se cuantifican ambos compuestos utilizando un analizador de triple cuadrupolo monitorizando dos transiciones para cada uno de ellos (*multiple reaction monitoring*, MRM).

Este suceso puso en evidencia la falta de métodos analíticos disponibles, por parte de las autoridades competentes, para detectar adulteraciones y, por lo tanto, la necesidad

de establecer nuevas metodologías para detectar fraudes. En la actualidad, el número de publicaciones relacionadas con la autenticación está aumentando de forma exponencial desde el año 2000 [30] y han surgido nuevas metodologías capaces de autenticar diferentes productos naturales.

El análisis metabolómico por cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría masas de alta y baja resolución, en combinación con técnicas quimiométricas, está emergiendo como una de las mejores estrategias para la autenticación de productos naturales [31]. Sin embargo, al ser una metodología de trabajo reciente, existe cierta confusión en la terminología utilizada para describir estos procedimientos, al menos en lo que hace referencia al mundo de la alimentación.

El termino metabolómico empezó a aplicarse en farmacología y toxicología, por lo que el hecho de aplicarse en otros campos de investigación está generando gran controversia entre los investigadores. La mayoría de productos naturales comerciales están orientados hacia la alimentación, por lo que es muy conveniente aclarar la aplicación de esta terminología.

La metabolómica describe el estudio de múltiples metabolitos en una célula, un tejido o un organismo, a partir de la detección de tantas moléculas como sea posible. Por lo tanto, este enfoque genera grandes cantidades de datos que se espera que puedan caracterizar al sistema biológico que se está investigando. En metabolómica, las señales monitorizadas corresponden a sustancias químicas, llamados metabolitos, accesibles a partir del análisis, que son productos finales más allá de complejos mecanismos de transcripción, transducción y regulación [32].

En el campo de los alimentos, existen dos enfoques complementarios: perfil metabolómico “profiling” y huella dactilar o huella metabolómica “fingerprinting”. Estos dos conceptos, pese a ser completamente diferentes, son utilizados de forma indistinta por algunos investigadores [33], mientras que otros hablan de perfil no dirigido en lugar de “fingerprinting” [34]. Es por este motivo que varios autores se han pronunciado sobre estos dos conceptos con la finalidad de definirlos [32,35-38].

El perfil metabolómico “Metabolite profiling” implica la medición simultánea de un conjunto de metabolitos [39]. Generalmente, se parte del conocimiento previo sobre el tipo de muestra que se quiere analizar. Los compuestos determinados pueden ser compuestos conocidos, o que pertenezcan a la misma familia, o que contengan unas características estructurales similares. Las concentraciones o señales de estos compuestos se utilizan como marcadores secundarios para resolver un problema de autenticación determinado. Por el contrario, la huella metabolómica “Metabolic fingerprinting” implica el análisis de

tantos compuestos como seamos capaces de detectar, sin la necesidad de identificarlos. Generalmente, se corresponden a todas las señales obtenidas en un mismo método, aunque también podría consistir en datos recompilados a partir de otros métodos analíticos o combinados de métodos analíticos complementarios [26].

En este contexto, los últimos avances en Química Analítica, como las técnicas de UHPLC-HRMS y los programas de software para procesar grandes conjuntos de datos analíticos obtenidos, han sido muy utilizados para el rápido desarrollo de la metabolómica en los últimos diez años [40].

La utilización de los equipos UHPLC para los análisis metabolómicos en la autenticación de productos naturales, está relacionada con el desarrollo de las columnas cromatográficas. En cromatografía de líquidos (LC), está bien establecido que una reducción del tamaño de partícula ( $d_p$ ) en la columna cromatográfica proporciona una importante ganancia en el rendimiento cromatográfico [41]. De hecho, la reducción de  $d_p$  proporciona mejoras significativas en términos de eficiencia, ya que permite separaciones más rápidas y con mayor número de platos teóricos ( $N$ ), lo que reduce la cantidad de fase móvil necesaria para la separación, y en consecuencia reduce el coste del análisis.

Actualmente, se comercializan columnas cromatográficas por debajo de  $2\mu\text{m}$  (columnas sub- $2\mu\text{m}$ ), que permiten una mejor resolución que las columnas convencionales de  $5$  o  $3,5\mu\text{m}$ . Estas columnas son más eficientes, ya que proporcionan el mismo número de platos teóricos con una longitud mucho más pequeña, debido a que el tamaño de partícula es inversamente proporcional al número de platos. De hecho, una columna de  $50\text{mm}$  empaquetada con partículas de  $2\mu\text{m}$  es equivalente a una columna de  $150\text{mm}$  empaquetada con partículas de  $5\mu\text{m}$ , ya que ambas proporcionan una eficiencia de  $10.000$  platos. Además, la velocidad lineal óptima de la fase móvil es inversamente proporcional al tamaño de partícula y, por lo tanto, la separación es tres veces más rápida cuando se trabaja con columnas de  $2\mu\text{m}$  que cuando se trabaja con columnas convencionales de  $5\mu\text{m}$  [42].

Sin embargo, el hecho de reducir el tamaño de partícula provoca un aumento no deseado de la presión del sistema [43]. Bajo condiciones óptimas de flujo, las columnas empaquetadas con partículas de  $1,7\mu\text{m}$  generan una presión  $25$  veces mayor que la de las partículas de  $5\mu\text{m}$  para una longitud de columna idéntica. Esto provoca una limitación importante en la instrumentación al utilizar la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) convencional, que solo es capaz de soportar  $400$  bares de presión. La entrada en el mercado de los equipos UHPLC proporcionó la instrumentación necesaria para la utilización de columnas sub- $2\mu\text{m}$ . La principal ventaja de estos equipos es que pueden trabajar con presiones elevadas de hasta  $1500$  bares, lo que permite alcanzar el



flujo óptimo de trabajo al utilizar columnas sub-2 $\mu$ m, reduciendo de esta forma el tiempo de análisis.

La estrategia más recientemente introducida para mejorar el rendimiento cromatográfico es el uso de columnas con partículas superficialmente porosas (SPP), también llamadas de núcleo fundido o núcleo sólido. La principal ventaja de estas columnas es que con un tamaño de partícula mayor que las columnas sub-2 $\mu$ m convencionales, se consiguen resultados similares en los parámetros de selectividad, retención, capacidad de carga y simetría de pico [44]. Sin embargo, el hecho de trabajar con un mayor tamaño de partícula reduce significativamente la presión del sistema, lo que es una importante ventaja en cromatografía de líquidos.

La combinación del UHPLC, que permite utilizar las columnas sub-2 $\mu$ m o SPP, con la espectrometría de masas supuso un avance muy importante en el análisis metabolómico en muestras complejas. La espectrometría de masas no solo mejora considerablemente la sensibilidad y selectividad del método analítico, sino que además permite la identificación de compuestos desconocidos. Los espectrómetros de masas están constituidos por dos componentes principales. El primer componente es la fuente de ionización. En cromatografía de líquidos, los analitos están en disolución en la fase móvil. En las fuentes de ionización más utilizadas, esta solución se introduce mediante nebulización en la fuente, donde se producen iones a presión atmosférica y se enfocan al analizador [45]. Las fuentes de ionización más utilizadas en LC son el electrospray (ESI), la ionización química a presión atmosférica (APCI) y más recientemente, la fotoionización a presión atmosférica (APPI) [2]. La principal diferencia entre estas tres fuentes de ionización reside en el mecanismo de ionización. En ESI, los iones preformados en fase líquida son desolvatados y evaporados. En cambio, en APCI y APPI, la ionización se produce en fase gaseosa. Sin embargo, en APCI la muestra se ioniza mediante la aplicación de un elevado voltaje (descarga de electrones), mientras que en APPI la muestra se ioniza utilizando fotones, generalmente proporcionados por luz ultravioleta. Generalmente, se reconoce al ESI como la ionización más versátil, aplicada a analitos con polaridad moderada o alta, mientras que APCI y APPI se recomienda especialmente para moléculas que difícilmente se ionizan por ESI. Por otro lado, ESI funciona mejor con caudales más bajos, mientras que APCI muestra menos ruido a caudales altos [46]. En cuanto a APPI proporciona una sensibilidad similar o ligeramente mejor para algunas aplicaciones específicas, como es el caso de la determinación de polifenoles [47].

El segundo componente es el analizador. Actualmente existen un gran número de analizadores, de hecho es uno de los componentes más flexibles en espectrometría de masas. No obstante, podemos distinguir entre dos tipos de analizadores: los de baja resolución (*low resolution mass spectrometry*, LRMS) y los de alta resolución (*high resolution*

*mass spectrometry*, HRMS). Si bien ambos podrían llegar a tener sensibilidades similares dependiendo de la aplicación, la espectrometría de masas de alta resolución presenta una selectividad mucho mayor, permitiendo distinguir entre compuestos isobáricos (sustancias con la misma proporción nominal de masa/carga pero diferentes composiciones elementales), es decir, permite una identificación inequívoca de la masa exacta de un compuesto y, como consecuencia, permite una mejor identificación y determinación de nuevos compuestos desconocidos o sospechosos, que los analizadores de baja resolución [24]. Los analizadores de baja resolución más utilizados son el triple cuadrupolo (QqQ) o la trampa de iones (IT), mientras que los analizadores de alta resolución más utilizados son el tiempo de vuelo (TOF) y el Orbitrap. No obstante, en los últimos años han surgido nuevos instrumentos híbridos que son combinaciones de los instrumentos anteriormente mencionados y se nombran mediante la combinación de las abreviaturas en el orden en que viajan los iones a través de los analizadores. El objetivo de un instrumento híbrido es combinar las ventajas de cada analizador evitando al mismo tiempo la combinación de sus debilidades. Los instrumentos híbridos más utilizados son el QTOF, IT TOF, QOrbitrap y LIT Orbitrap [45].

Finalmente, el último avance importante de los últimos años que ha permitido aplicar nuevas estrategias para la autenticación de productos naturales, son los nuevos programas de software que permiten el tratamiento de grandes cantidades de datos a través de la quimiometría.

La quimiometría es la aplicación de métodos matemáticos y estadísticos, así como de los principios de la buena ciencia de la medida, para extraer de forma eficiente información útil de datos químicos [48]. Si bien el uso de la quimiometría en la autenticación de productos naturales todavía está en sus inicios, la mejora considerable en los programas de software está permitiendo su aplicación, ya que permite el tratamiento de los datos en un tiempo reducido. Aunque hay varios tipos de métodos quimiométricos disponibles, en general se pueden clasificar en dos categorías: supervisados y no supervisados. En los métodos no supervisados, el propósito es identificar grupos o relaciones entre muestras, sin ningún conocimiento previo de clases o grupos. Sin embargo, los métodos supervisados se guían por información preliminar que servirá de referencia para los resultados finales objeto de estudio. Los métodos no supervisados más comúnmente utilizados en el análisis de autenticación de productos naturales son el análisis de componentes principales (PCA) y el agrupamiento jerárquico (HC). Por otro lado, se pueden utilizar muchos algoritmos para realizar métodos supervisados, como el análisis discriminante lineal (LDA), modelado independiente suave de analogía de clase (SIMCA), regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS), análisis discriminante por regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) o el discriminante por regresión de mínimos cuadrados parciales (OPLS-DA) entre otros [49-51].

Todos estos avances han permitido la aplicación de nuevas estrategias para la autenticación de productos naturales. Actualmente, podemos distinguir entre dos grandes grupos: los métodos dirigidos y los métodos no dirigidos, los cuales serán tratados en los siguientes apartados.

### 1.2.1 Métodos dirigidos

Un análisis dirigido cubre la detección o cuantificación de uno o más objetivos analíticos predefinidos. Estas dianas analíticas se caracterizan química y biológicamente, y se establece su importancia antes de la adquisición de datos.

Los métodos dirigidos que se aplican con un único marcador analítico suelen estar respaldados por un material de referencia certificado, que es una contribución importante en la validez del método y una posible acreditación. Los métodos dirigidos son preferibles en problemas de autenticidad cuando el objetivo sospechoso es un marcador primario, ya que ofrece información directa sobre la autenticidad del producto [26]. Para aplicar este tipo de estrategia se debe caracterizar la muestra e identificar un compuesto que esté presente en el producto utilizado para adulterarlo, pero no en el producto original o viceversa. Un ejemplo es el trabajo realizado por Guijarro-Díez [52] que identifica la adulteración de muestras de azafrán con extractos de gardenia a través de la determinación de genepósido. El genepósido es un compuesto que se encuentra presente en los extractos de gardenia pero no en el azafrán, por lo que se puede identificar su adulteración determinando este compuesto. Para ello, utiliza un método isocrático empleando como fase móvil agua/acetonitrilo (85:15) con una columna C18 y un analizador QTOF en modo negativo para identificar la presencia de genepósido con un límite de cuantificación de 30ng/mL.

Sin embargo, este tipo de estrategia suele ser lenta debido a la necesidad de identificar previamente el componente diana, y tiene la desventaja de ser específico para un tipo de producto y adulterante, por lo que se corre el riesgo de que una vez se conozca el método de análisis, se pueda adulterar el producto con otro componente que no disponga de ese marcador único.

Por otro lado, el análisis del perfil químico de un alimento es la mejor opción cuando no existe un marcador único, ya que ofrece mucha más información. Este tipo de estrategia proporciona un mayor poder de clasificación y permite abordar problemas de autenticación más complejos que un método analítico basado en un marcador único o doble [26]. Los compuestos determinados deben ser conocidos, por lo que, o bien se identifican previamente, o bien se selecciona un tipo de compuestos que pertenezcan a la misma familia o que contengan características estructurales similares, y que sean representativos de la

muestra que se desea analizar. En cromatografía de líquidos, los compuestos generalmente más utilizados para la realización de un método dirigido basado en múltiples marcadores secundarios, son carbohidratos, carotenoides, aminoácidos, compuestos fenólicos u otros compuestos orgánicos que se detectan por LC [53].

Un ejemplo sería el trabajo realizado por Simón y col. [54] que proponen el análisis del perfil fenólico no antociánico como una herramienta útil para autentificar vinos envejecidos con madera de cerezo, castaño y acacia, ya sea en barriles o añadiendo astillas. Para ello determinan la composición fenólica no antocianinica de cuatro vinos tintos, uno blanco y otro rosado envejecidos en barricas o añadiendo astillas de cinco tipos de maderas seleccionadas. La separación cromatográfica se realizó en un sistema de cromatografía Agilent serie 1100 equipado con un detector de diodos y un espectrómetro de masas cuadrupolar (Agilent serie 1100 MSD) con una interfaz de electrospray. La fase móvil binaria utilizada consistió en ácido acético al 2% en agua de calidad HPLC como disolvente A y acetonitrilo de calidad HPLC como disolvente B. Se identificaron un total de 68 compuestos fenólicos no antociánicos, 15 encontrados solo en vinos envejecidos con madera de acacia, 6 con madera de cerezo y 1 con madera de castaño. Por otro lado, se detectaron algunas diferencias en la composición fenólica no antociánica de los vinos en relación con los niveles de compuestos proporcionados por cada especie de madera. Además, se detectó una evolución diferente de los flavonoles y flavanoles en los vinos durante su envejecimiento en barriles o en contacto con astillas.

Este ejemplo pone en evidencia que el perfil polifenólico puede sufrir variaciones en función del proceso de elaboración del producto. Sin embargo, la composición polifenólica puede verse afectada por otros factores, como pueden ser condiciones climáticas, los recursos hídricos, el área de cultivo, las técnicas de cultivo, el manejo del suelo, el grado de maduración de frutas y verduras empleadas, etc. Por lo tanto, el perfil polifenólico se puede utilizar como un descriptor químico para autentificar por ejemplo el origen geográfico o la tipología de la materia prima empleada en el producto [55]. Un ejemplo sería el trabajo realizado por Gou y col. [56] quienes determinaron el perfil polifenólico de 51 muestras de zumo de kiwi, elaborados con siete variedades diferentes de kiwi, procedentes de cinco regiones de China, con la finalidad de autentificar la tipología de la fruta empleada y el origen geográfico mediante análisis estadísticos multivariados. Se determinaron un total de 21 polifenoles pertenecientes a cuatro clases de compuestos, mediante cromatografía líquida de ultra elevada eficacia acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC-HESI-QTOF). Para la separación cromatográfica emplearon una columna Waters XTerra MS C18 (250 x 4.6mm, 5µm) aplicando un gradiente de elución de agua con 0.5% ácido acético como disolvente A y agua/acetonitrilo 1:1 (v/v) con 0.5% ácido acético como disolvente B. La epicatequina, catequina, procianidina B1 y los derivados del ácido cafeico fueron los compuestos fenólicos predominantes. El análisis de componentes principales (PCA) permitió una clara separación de los zumos según las variedades de kiwi utilizadas. El

análisis discriminatorio lineal gradual (SLDA) proporcionó una clasificación satisfactoria de las muestras, con una tasa de éxito del 100% según las variedades de kiwi y una tasa de éxito del 92,2% según los orígenes geográficos. El resultado mostró que los perfiles polifenólicos de los zumos de kiwi contienen suficiente información para autenticar la tipología de las frutas y su origen geográfico.

Otra estrategia consiste en identificar previamente aquellos compuestos que repercuten de forma directa en la autenticación del producto, sin tener en cuenta un tipo de familia de compuestos en concreto, y aplicarlos como biomarcadores para la autenticación del producto. Un ejemplo sería el trabajo realizado por Sun y col. [57] quienes comparan productos procesados y sin procesar elaborados con *Aconiti Lateralis Radix*, que es una raíz obtenida de *Aconitum carmichaelii* Debx ampliamente utilizada en hierbas medicinales chinas. Para ello, se desarrolló un método por UHPLC-ESI-QqQ con una columna BEH shield RP18 (100 mm x 2.1mm, 1.7 $\mu$ m) aplicando un gradiente de elución de agua con 0.1% de ácido fórmico como disolvente A y acetonitrilo como disolvente B a flujo de 0.3mL/min. Los datos se obtuvieron operando en modo positivo mediante full scan con un intervalo de masas de entre 100-1000m/z. Posteriormente se seleccionaron los picos comunes obtenidos en los cromatograma de UHPLC-HRMS y se identificaron utilizando el software Agilent Mass Hunter. 18 compuestos característicos fueron identificados y se seleccionaron para la discriminación del producto crudo y dos productos procesados (*Heishunpian* y *Baifupian*). Los análisis quimiométricos, que incluyen la combinación de mapa de calor con análisis de agrupamiento jerárquico (HCA) y análisis de componentes principales (PCA), se utilizaron para visualizar la discriminación de los productos crudos y los procesados. Los métodos quimiométricos HCA y PCA proporcionaron una clara discriminación de *Aconiti Lateralis Radix*, *Heishunpian* y *Baifupian*. Finalmente, se aplicó la red neuronal artificial de contrapropagación (CP-ANN) para confirmar los resultados de HCA, PCA y para explorar el efecto de los 18 compuestos en la diferenciación de las muestras y la racionalidad del procesamiento. Los resultados mostraron que esta estrategia podría usarse con éxito para la comparación de productos crudos y productos procesados de *Aconiti Lateralis Radix* y además, que se podría usar como un procedimiento general para comparar medicamentos a base de hierbas y productos procesados.

En la Tabla 1.1 se muestran ejemplos de métodos de análisis para la autenticación de productos naturales mediante métodos dirigidos por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas, que resuelven diferentes problemas de autenticidad como pueden ser el origen geográfico, la tipología del producto utilizado o el proceso de fabricación empleado, entre otros.

**Tabla 1.1.** Métodos dirigidos utilizando cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas para la autenticación de productos naturales.

Producto	Compuestos	Propósito del análisis	Separación cromatográfica y espectrometría de masas	Año	Método Quimiométrico	Ref.
Extractos naturales	Polifenoles	Determinación de polifenoles y autenticación de extractos de frutas	Columna Kinetex C18 (100x4.6mm, 2.6µm) Gradiente de elución (1mL·min <sup>-1</sup> ): A) agua con 0.1% ácido fórmico B) metanol H-ESI (-) QqQ (modo de adquisición MRM)	2015	PCA	[58]
Productos farmacéuticos a base de arándanos y extractos naturales	Polifenoles	Determinación de perfiles polifenólicos en la caracterización y clasificación de preparados farmacéuticos a base de arándanos y extractos naturales.	Columna Hypersil Gold C18 (50x2.1mm, 1.9µm) Gradiente de elución (0.285mL·min <sup>-1</sup> ): A) agua con 0.1% ácido fórmico B) metanol H-ESI (-) / APCI (-) / APPI (-) QqQ (modo de adquisición MRM)	2016	PCA	[47]
Muestras comerciales de azafrán	Derivados de Kaempferol	Control de calidad de muestras de azafrán	Columna Ascentis Express Fused-core C18 (100x2.1mm, 2.7µm) Gradiente de elución (0.4mL·min <sup>-1</sup> ): A) agua con 0.1% ácido fórmico B) acetonitrilo con 0.1% ácido fórmico H-ESI (-) Q-TOF (Full Scan 100-1700m/z)	2017	—	[52]
Zumos de kiwi	Polifenoles	Origen geográfico	Columna Waters XTerra MS C18 (250x4.6mm, 5µm) Gradiente de elución (0.8mL·min <sup>-1</sup> ): A) agua con 0.5% ácido acético B) agua:acetonitrilo 1:1 (v/v) con 0.5% ácido acético H-ESI (-) Q-TOF (Modo Full Scan 50-1500m/z)	2017	ANOVA, PCA y SLDA	[56]
Zumo de arándanos	Polifenoles	Autenticación de zumos de arándanos	Columna Phenomenex C18 (100x2.1mm, 2.6µm) Gradiente de elución (0.3mL·min <sup>-1</sup> ): A) agua con 0.1% ácido fórmico B) metanol con 0.1% ácido fórmico H-ESI (+/-) Q-TOF (modo Full Scan 50-1000m/z)	2018	PCA-DA y OPLS-DA	[59]

Producto	Compuestos	Propósito del análisis	Separación cromatográfica y espectrometría de masas	Año	Método Quimiométrico	Ref.
Pimentón	Polifenoles y carbohidratos	Origen geográfico	<p>Columna Synchronis C18 (100x2.1mm, 1.7µm)</p> <p>Gradiente de elución (0.25mL·min<sup>-1</sup>): A) agua con 0.01% ácido acético B) acetonitrilo</p> <p>H-ESI (-)</p> <p>LITQ-Orbitrap (modo Full Scan 100-1000m/z)</p>	2017	PCA	[60]
Granos de cacao	Carbohidratos	Estados de fermentación	<p>Columna BEH X-Bridge Amide (150x4.6 mm, 3.5µm)</p> <p>Gradiente de elution (0.4mL·min<sup>-1</sup>): A) agua con 0.1% hidróxido de amonio B) acetonitrilo con 0.1% hidróxido de amonio</p> <p>H-ESI (+)</p> <p>TOF (modo Full Scan 50-1200m/z)</p>	2018	ANOVA, PCA y PLS-DA	[61]
Arroz	Lípidos	Diferenciación de variedades de arroz	<p>Columna Acquity UPLC BEH C18 (50x2.1 mm, 1.7µm)</p> <p>Gradiente de elución (0.5mL·min<sup>-1</sup>): A) agua con 10mM hidróxido de amonio B) acetonitrilo:isopropanol 90:10 (v/v)</p> <p>H-ESI (-)</p> <p>Q-TOF (modo Full Scan 50-1200m/z)</p>	2015	PCA y OPLS-DA	[62]
Hojas de morera	Polifenoles	Clasificación de hojas de morera	<p>Columna BlueOrchid C18 (50x2mm, 1.8µm)</p> <p>Gradiente de elución (0.2mL·min<sup>-1</sup>): A) agua con 0.1% ácido fórmico B) acetonitrilo con 0.1% ácido fórmico</p> <p>H-ESI (-)</p> <p>IT (modo Full Scan 100-2000m/z)</p>	2016	CA y PCA	[33]
Carne de cerdo	Lípidos	Caracterización y discriminación de la carne de cerdo doméstica de China	<p>Columna CSH C18 (50x2.1mm, 1.7µm)</p> <p>Gradiente de elución (0.4 mL·min<sup>-1</sup>): A) Acetonitrilo: agua (60:40) con 10nm de formiato amónico y 0.1% ácido fórmico B) Isopropanol :Acetonitrilo (90:10) con 10nm de formiato amónico y 0.1% ácido fórmico</p> <p>ESI (-)(+)</p> <p>QTOF (modo Full Scan 50-2000m/z)</p>	2019	PLS-DA	[63]

Producto	Compuestos	Propósito del análisis	Separación cromatográfica y espectrometría de masas	Año	Método Quimiométrico	Ref.
Hierbas medicinales	18 Compuestos orgánicos identificados	Comparación de hierbas medicinales	Columna BEH shield RP18 column (100x2.1mm, 1.7µm) Gradiente de elución (0.3 mL·min <sup>-1</sup> ): A) agua con 0.1% ácido fórmico B) Acetonitrilo ESI (+) QqQ (modo Full Scan 100-1000m/z)	2019	HCA, PCA y CP-ANN	[57]
Azafrán	Genepósido	Adulteración de azafrán con extractos de gardenia	Columna Ascentis Express Fused-core C18 (100x2.1mm, 2.7µm) Gradiente de elución (0.3mL·min <sup>-1</sup> ): agua con 0.1% ácido fórmico y Acetonitrilo (85:15) ESI (-) QTOF (modo Full Scan 100-1700m/z)	2017	—	[64]
Vinos	Polifenoles	Composición polifenólica de los vinos en contacto con maderas de diferentes tipos	Hypersil ODS C18 (200 x4mm, 5µm) Gradiente de elución (0.7mL·min <sup>-1</sup> ): A) agua con 2% ácido acético B) Acetonitrilo ESI (-) Q (modo Full Scan 100-3000m/z)	2014	CDA	[54]

CA: cluster analysis, CDA: Canonical discriminant analysis

Como se puede observar en la Tabla 1.1 el modo de separación más utilizado es la fase invertida con columnas C18 junto con una fase móvil acidificada compuesta por agua como disolvente A y metanol o acetonitrilo como disolvente B. No obstante, la elección de la columna y de la fase móvil empleada dependerá en gran medida de los compuestos que se desean determinar.

Con respecto a la fuente de ionización, generalmente se utiliza ESI en modo negativo o modo positivo, aunque en ocasiones se exploran ambos según el tipo de compuestos que se desea determinar. Sin embargo, otras fuentes de ionización por presión atmosférica (API) también se han descrito en la literatura como por ejemplo el trabajo realizado por Parets y col. [47] que comparó el uso de H-ESI, APCI y APPI usando cuatro disolventes orgánicos como dopantes (tolueno, acetona, clorobenceno y anisol) y dos columnas C18 (Hypersil Gold 50x2.1mm,1.9µm y Synchronis 100x2.1mm,1,7µm), para la determinación



de 29 polifenoles en extractos de frutas de uvas y arándanos y productos farmacéuticos a base de arándanos. Obviamente, la columna de Synchronis separó los compuestos fenólicos de forma más eficiente debido a su mayor longitud y menor tamaño de partícula. Sin embargo, aunque se observaron múltiples coeluciones de los polifenoles estudiados con la columna Hypersil, no se observó supresión de la ionización en ESI para esta familia de compuestos, lo que permitió reducir el tiempo de análisis de 23,5min a 13,5min con esta columna, siempre y cuando se redujese el efecto matriz. H-ESI y APPI asistido por acetona mostraron buenos resultados para la ionización de los compuestos polifenólicos determinados, proporcionando una buena sensibilidad para la mayoría. Sin embargo, al abordar la clasificación y autenticación de los extractos analizados, los autores describieron que los resultados obtenidos por UHPLC-APPI-MS/MS fueron más satisfactorios y la discriminación de las clases de muestra fue excelente en comparación con UHPLC- ESI-MS/MS, atribuyendo este comportamiento a la mayor robustez de la fuente APPI en presencia de efecto matriz, permitiendo el análisis incluso con la columna Hypersil más corta.

A continuación se incluye el siguiente Capítulo de Libro:

Publicación I: Capítulo de libro

“The role of polyphenols and polyphenolic fingerprinting profiles in the characterization and authentication of natural food products”

S. Barbosa, N. Pardo-Mates, L. Puignou, O. Núñez

Publicado en la Editorial Nova Science Publisher.

En este capítulo se indica el papel de los polifenoles y los perfiles polifenólicos para lograr la caracterización y autenticación de productos alimenticios naturales. Así mismo se discuten, mediante ejemplos relevantes, las metodologías analíticas típicamente utilizadas para la determinación de polifenoles y las estrategias utilizadas para correlacionar el contenido de polifenoles o los perfiles polifenólicos con la autenticación de alimentos basadas en técnicas quimiométricas. Por último, se exponen algunos ejemplos relacionados con la identificación y cuantificación de fraudes alimentarios.



**1.2.1.1. Publicación I: Capítulo de libro.**

*The role of polyphenols and polyphenolic fingerprinting profiles in the characterization and authentication of natural food products.*

S. Barbosa, N. Pardo-Mates, L. Puignou, O. Núñez  
Publicado en la Editorial Nova Science Publisher.



*Chapter 1*

**THE ROLE OF POLYPHENOLS AND  
POLYPHENOLIC FINGERPRINTING  
PROFILES IN THE CHARACTERIZATION  
AND AUTHENTICATION OF NATURAL  
FOOD PRODUCTS**

***Sergio Barbosa<sup>1</sup>, Naiara Pardo-Mates<sup>1</sup>, Lluís Puignou<sup>1,2</sup>  
and Oscar Núñez<sup>1,2,3,\*</sup>***

<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering and Analytical Chemistry,  
University of Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Research Institute of Food Nutrition and Food Safety,  
University of Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Serra Húnter Fellow, Generalitat de Catalunya, Spain

**ABSTRACT**

Food authentication is the ability to assign an unknown food product to a known class of products by means of its physico-chemical or even sensorial characterization and a learning model. In the food industry, the

---

\* Corresponding author: Email: oscar.nunez@ub.edu.

characterization and authentication of natural food products, as well as processed foodstuffs, is an important need to achieve traceability, food safety and quality control. Nowadays, food manufacturers, as well as the public in general, have become very interested in the quality of food products, which are very complex mixtures consisting of naturally occurring compounds and other substances coming from technological processes, agrochemical treatments, or packaging materials. Although consumer preferences regarding food products are often influenced by organoleptic (e.g., color, taste, aroma, etc.) and socioeconomic (e.g., ecological production, guaranteed origin and quality, etc.) factors, people are increasingly more interested in the presence of some specific compounds with health beneficial properties, thereby giving rise even to the production of functionalized foods. Unfortunately, food product adulterations are common and frequently employed practices in order to reduce food production costs. For example, fruit-processed products are commonly adulterated by addition of water, sugars, fruits of inferior commercial values, secondary extracts of fruits and colors, etc. In other cases, the fraud is related to an incorrect labelling of the food product, for example, when refined or lower quality olive oils are labeled as extra-virgin olive oils. Thus, the development of analytical methodologies to achieve food authentication and to identify food frauds is required.

Polyphenols, aromatic secondary metabolites ubiquitously spread through the plant kingdom comprising more than 8000 substances with highly diverse structures, consists of a family of bioactive phytochemical compounds in foods that caught the attention of consumers over the last few years. This interest is due to their antioxidant properties, the great abundance in our diet and their role in the prevention of various diseases. The relevance of polyphenols in food products comes also from their contribution to sensorial properties. The type of polyphenols and their concentration levels in fruit- and vegetable-based products depends not only on the fruit/vegetable employed but in multiple parameters such as climate conditions, water resources, growing area, cultivation techniques, soil management and degree of maturation of fruits and vegetables, etc. As a result, polyphenol distribution and content in a natural food product can be exploited as a source of analytical data to establish food authentication.

In this chapter, the role of polyphenols and polyphenolic fingerprinting profiles to achieve the characterization and authentication of natural food products will be addressed. Analytical methodologies typically employed for the determination of polyphenols and the strategies used to correlate polyphenol content or polyphenolic fingerprinting profiles with food authentication based on chemometric techniques will be discussed by means of relevant examples. Coverage of all kind of applications is beyond the scope of the present contribution, so we will focus on the most relevant applications published. Some

examples dealing with the identification and quantitation of food frauds will also be presented.

## 1. INTRODUCTION

Nowadays, improved methods for the determination of authenticity, standardization and efficacy of nutritional properties of natural food products are required to guarantee their quality and for the growth and regulation of the market. Authentication can be defined as the ability to assign an unknown product to a known class of products by means of its physico-chemical characteristics but also sensorial factors. In the food industry, it is an important need in the scope of traceability, food safety and quality control [1]. Today, authentication tools can even be used for marketing purposes, especially when characteristic commercial brands of very well differentiated products for consumers are created. Within this context, the authentication of quality assignments such as protected designation of origin (PDO) is of prime interest. A PDO is the name of an area, a specific place or, in exceptional cases, the name of a country, used as a designation for an agricultural product or a foodstuff which comes from such an area, place or country, whose quality or properties are significantly or exclusively determined by the geographical environment, including natural and human factors, and whose production, processing and preparation takes place within that determined geographical area. For a natural food product or foodstuff, to receive the PDO status, the entire product must be traditionally and entirely manufactured (prepared, processed and produced) within the specific region and thus acquire unique properties, highly valued by consumers [2, 3]. Thus, authentication plays a very important role in preventing frauds in products with PDO.

Food manufacturers as well as the public in general, have become very interested in the quality of food products, which are very complex mixtures consisting of naturally occurring compounds and other substances coming from technological processes, agrochemical treatments, or packaging materials. Although consumer preferences regarding food products are

often influenced by organoleptic (e.g., color, taste, aroma, etc.) and socioeconomic (e.g., ecological production, guaranteed origin and quality, etc.) factors, people are increasingly more interested in the presence of some specific compounds with health beneficial properties, thereby giving rise even to the production of functionalized foods. Unfortunately, food product adulterations are common and frequently employed practices in order to reduce food production costs. For example, in the fruit industry, one of the most common frauds is to add a co-fruit, a fruit that is less expensive or easier to obtain, to the authentic juice [4]. The high cost of the fruit, and the possibility of poor harvest conflicting with high consumer demands, makes this industry very susceptible to adulteration. For instance, nowadays, sweet orange (*C. sinensis*) juices, whose consumption have significantly increased in the last years, is commonly adulterated with tangerine (*C. reticulata*), lemon (*C. limon*) and/or grapefruit (*C. paradise*) [5]. In other cases, the fraud can be related to a purposely incorrect labelling of the food product, for example, when refined or lower quality olive oils are labeled as extra-virgin olive oils. Thus, the development of analytical methodologies to achieve food authentication and to identify food frauds is required. Also, food producers are interested in these issues because they do not wish to be subjected to unfair competition from unscrupulous producers who would gain an economic advantage from the misrepresentation of the food they are selling [6].

Polyphenols are aromatic secondary metabolites ubiquitously spread through the plant kingdom comprising more than 8,000 substances with highly diverse structures. The range of molecular masses that can be found within this huge family of compounds goes from low small molecules (>100 Da) such as phenolic acids to big molecules (>30,000 Da) of highly polymerized compounds. These bioactive compounds in foods have caught the attention of consumers over the last few years. The main reasons for the interest in polyphenols deals with the recognition of their antioxidant properties, their great abundance in our diet, and the probable role that these compounds are playing in the prevention of various diseases [7–9]. These compounds, which also constitute the most important active substances found in many medicinal plants and herbs, modulate the



activity of a wide range of enzymes and cell receptors [10]. A very important feature of polyphenols comes from their contribution to sensorial properties. For instance, the contents of compounds such as anthocyanins and proanthocyanidins have a strong influence on the color attributes of natural food products [11, 12]. Other compounds including phenolic acids, catechins and several flavonoids are playing an important role in food quality, as they are affecting natural food products flavor and color properties [13]. Bitterness and astringency sensorial characteristics of natural foods have also been found to be dependent on tannin compounds [14]. Furthermore, the type of polyphenols and their concentration levels in fruit- and vegetable-based products not only depends on the fruit/vegetable employed but also on multiple parameters such as climate conditions, water resources, growing area, cultivation techniques, soil management and degree of maturation of fruits and vegetables, etc. As a result, polyphenol distribution and content in a natural food product can be exploited as a source of analytical data to establish food authentication in both the prevention of adulteration frauds and in the correct assignment of PDOs. For example, for certain fruits characteristic phenolic compounds have been successfully used to detect the adulteration of fruit juices, nectars and jams with other cheaper fruits [4, 15–17]. Thus, polyphenols resulted to be very promising for the determination of food authenticity due to their taxonomic specificity in fruits [16].

The analysis of polyphenols in natural food products is relatively complex due to the complexity of food matrices with a huge variety of chemical compounds, but also due to the great variety of polyphenols that can be present, which differ in polarity and size (from simple phenolic acids to tannins), and to the fact that many of these compounds are found in food products at low concentration levels [18]. This great chemical diversity of polyphenols has hindered the sample extraction and treatment as well as their separation, determination and identification. Reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detection (DAD) has been commonly employed for the determination of several classes of polyphenols in foodstuffs [19–22]. Nevertheless, liquid chromatography coupled to electrospray ionization and tandem mass

spectrometry (LC-ESI-MS/MS) is nowadays one of the most successful techniques applied to the qualitative and quantitative determination of polyphenols in natural food products [18, 21]. Other atmospheric pressure ionization techniques such as atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and, recently, atmospheric pressure photoionization (APPI) have also been reported for the mass spectrometric ionization and detection of polyphenols [23–27]. Nowadays, high-resolution mass spectrometry (HRMS) and accurate mass measurements achieved with time-of-flight (TOF) and Orbitrap analyzers have gained popularity due to their great ability to provide more comprehensive information concerning the exact molecular mass, elemental composition and detailed molecular structure of a given compound [28]. In the last years, scientists are taking advantage of LC-HRMS methods for the characterization, determination and identification of polyphenols in food products [18, 29].

Finally, it is noteworthy that beyond the qualitative and quantitative studies of polyphenols, an emerging trend relies on the analysis of compositional profiles and fingerprints as a source of information to be exploited for classification and authentication purposes [30, 31]. The number of applications involving a chemometric data analysis has increased dramatically in the last years, especially because both LC-MS and LC-HRMS provide data of exceptional quality to be further analyzed by chemometric methods such as principal component analysis (PCA) and partial least square-discriminant analysis (PLS-DA). Data to be analyzed comprise concentrations of polyphenols of interest (profiling approach) or instrumental signals consisting of intensity counts as a function of  $m/z$  and retention time (fingerprinting approach). Further data treatments have proved to be highly efficient to facilitate the extraction of relevant information on functional and descriptive characteristics of food products to be exploited for characterization, classification and authentication [32, 33]. But fingerprinting profiling characterization useful to achieve food product authentication can also be attainable with more conventional detection systems such as ultraviolet-visible (UV-vis) detection in combination with liquid chromatography or alternative separation techniques such as capillary zone electrophoresis (CZE)[34–37].

This chapter aims to address the role of polyphenols and polyphenolic fingerprinting profiles in the characterization and authentication of natural food products. Separation-based analytical methodologies typically employed for the determination of polyphenols such as CZE and LC methods and the strategies used to correlate polyphenol content or polyphenolic fingerprinting profiles with food authentication based on chemometric techniques, as well as to achieve identification and quantitation of frauds, will be discussed by means of relevant examples.

## **2. CHROMATOGRAPHIC SEPARATION AND RELATED TECHNIQUES**

### **2.1. Liquid Chromatography Techniques**

Today, high-performance liquid chromatography techniques are among the most common methodologies used in the identification, characterization, and determination of polyphenolic compounds. Thereby, HPLC have been widely employed in the analysis of fruits and beverages and for quality and authenticity control of food products. In this section, several applications dealing with the role of polyphenolics in the characterization and authentication of natural food products will be addressed.

Among the different HPLC modes, high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) has been employed in the last years in food product authenticity aspects. HPTLC have several advantages over HPLC such as its ability to look for several classes of substances with less effort, allowing a rapid and simultaneous evaluation and authentication of samples on the basis of chromatographic fingerprints [38]. For instance, David et al. established a method for the authentication of 12 commercially fruit teas including raspberry, strawberry, blueberry, rose hip and wild berry using HPTLC fingerprinting [38]. Tea is one of the most consumed beverages all around the world and fruit teas proved a dietary source of biologically active compounds such as polyphenols and anthocyanins.

Many functional foodstuffs of fruit origin, including red fruit tea, have entered the markets providing new developments in the domain of quality control and food security issues. The chromatographic analysis was performed on silica gel 60F254 HPTLC aluminum sheets (20 x 10 cm) using n-butanol/formic acid/water (12:3:4.5) as the mobile phase. The HPTLC fingerprints of red fruit and tea extracts obtained in visible light and in fluorescence at 366 nm after the derivatization with Natural Product/Polyethylene glycol (NP/PEG) reagents (for more detail see ref. [39]) indicated different characteristic colored zones allowing a clear differentiation between all teas and fruit extracts analyzed. Fingerprinting data was then processed by chemometrics using principal component analysis, showing that samples were grouped in two macro-clusters related to the type of teas (mono- and multi-fruit). Within each cluster, the teas were well grouped according to their producer. Thus, chemometric results demonstrate the classification of the analyzed teas according to their type and producers.

In another work, Miuta et al. [20] used conventional thin-layer chromatography (TLC) for the preliminary identification of anthocyanins and anthocyanidins to obtain the fingerprint of berry fruits used in the preparation of juices. In this case, the TLC separation was performed on cellulose pre-coated plates with hydrochloric acid-glacial acetic acid-water as mobile phase. The authors attempted to achieve the authenticity of fruit juices according to the label inscription. TLC method showed the global anthocyanins and the major anthocyanidins that were characteristic for each berry fruit. For the same purpose, the authors also employed reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) in which the chromatographic fingerprints allowed the identification of 17 glycosylated anthocyanidins and 5 major anthocyanidins (delphinidin, cyaniding, petunidin, pelargonidin, and malvidin) in the analyzed samples. The separation was carried out employing an ODS-2 Hypersil column using acetonitrile-buffer (1.7% phosphoric acid) 10:90 and acetonitrile-buffer (1.7% phosphoric acid) 30:70 as mobile phase. The results demonstrated that the obtained chromatographic fingerprints from berry fruits corroborate by the spectroscopic data can constitute a database for the

identification of the presence on these fruits in different fruit juices in the market in order to establish the authenticity of fruit juices in conformity with the declared label inscription.

Regarding conventional HPLC techniques, several methods can be found in the literature dealing with the characterization, classification and authentication of different natural food products including fruits and beverages such as apples [40], berry fruits [20, 34, 35], bilberries [41], apple fruits [42], melon peels [43], wines [19, 37, 44], grape hybrids [45], natural ciders [46], red fruits and vegetable juices [12]. Generally, the separation is achieved by reversed-phase chromatography using C18 columns. Methanol and acetonitrile are typically employed as organic modifiers in the mobile phase. In the other hand, ultraviolet (UV) and fluorescence detection are usually used. In addition, higher performance in the classification power of these techniques may be achieved when combining data coming from different detection systems such as the case of UV absorption and fluorescence detectors. For instance, Serrano-Lourido et al. [37] developed a method for the classification and characterization of Spanish red wines according to their appellation of origin based on chromatographic profiles and chemometric methods. The quality and organoleptic properties of wines are typically influenced by several oenological factors such as origin, grape variety, winemaking practices, ageing and vintage. Due to the fact that these factors are normally also related with the final wine price, there is an increasing interest in relating physicochemical properties of wines such as the composition of polyphenolic compounds with the oenological features. Frequently, assays to evaluate wine sensorial parameters are often established by a group of panelist experts, but such an approach could be very unpractical when dealing with a large amount of samples. Thus, more straightforward strategies based on analytical methods are explored. In the mentioned work, UV-vis and fluorescence chromatographic profiles were combined and analyzed in order to extract information of different families of phenolic compounds. Chromatographic separation was performed on a Kinetex C18 reversed-phase column under gradient elution with 0.1% formic acid aqueous solution and acetonitrile as mobile phase. Exploratory

data sets consisted of chromatographic profiles recorded at four wavelengths in UV-vis absorption mode (280, 310, 370 and 520 nm) and in fluorescence detection ( $\lambda_{\text{ex}} = 260$  nm and  $\lambda_{\text{em}} = 360$  nm). Thirteen phenolic compounds which allowed the discrimination of wines of three different Spanish appellations (Penedes, Rioja and Ribera del Duero) were selected by means of principal component analysis. Afterwards, these compounds were employed by the authors to build partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) models which allowed the discrimination of wines according to the different Spanish appellations of origin.

More recently, Larrauri et al. [19] demonstrated the applicability of determining polyphenols as food descriptors to be used for characterization, classification, and authentication of white wines. For that purpose, a reversed-phase HPLC-UV method employing the Kinetex C18 column under gradient elution with 0.1% formic acid aqueous solution and methanol as mobile phase was employed for the separation and determination of 19 polyphenolic compounds at three different wavelengths (280, 310 and 370 nm) in mono- and polyvarietal Alella (Catalonia, Spain) white wines. Limit of detection (LOD) values in the range of 3 and 220  $\mu\text{g/L}$  were obtained, with repeatability values below 1% (% relative standard deviation, RSD) for most of the analyzed polyphenols. Polyphenolic compositional data was further exploited to characterize the analyzed white wines by PCA. As an example, Figure 1 shows the obtained results.

PCA results showed that PC1 and PC2 retained more than 50% of variance from the employed data set. The scatter plot of scores of PC1 versus PC2 (Figure 1a) revealed that the wines were distributed according to the type of grapes used for their elaboration. Monovarietal wines from Pansa Blanca are located on the left side, whereas wines combining Pansa Blanca and Garnacha Blanca are on the right. In addition, the QC replicates appear in a compact group in the center of the graph, showing the good precision of the proposed model. Hence, PC1 clearly discriminated samples according to mono- and polyvarietal classes. The authors observed that the overall polyphenol amount was also reflected in PC1, because the richer wines appeared on the right and those with lower concentrations

were mainly on the left. In contrast, PC2 seemed to be related to ageing, because the oldest wines predominated at the top and the youngest counterparts at the bottom. The study of variables from the map of loadings (Figure 1b) showed some content correlations, such as gallic acid and epicatechin, and caffeic acid and related compounds. The authors deduced that caftaric and other hydroxycinnamic acids were especially abundant in polyvarietal wines. The rest of the polyphenols were also more abundant in the polyvarietal class, although the differences were not as marked.

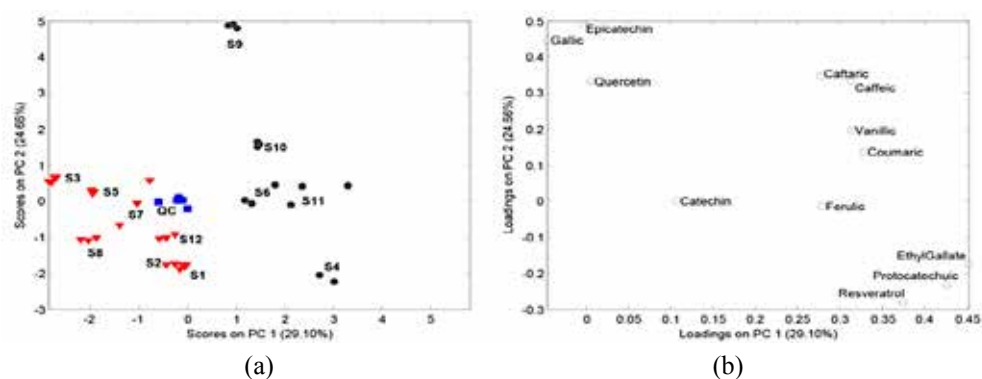


Figure 1. Characterization of Alella (Catalonia, Spain) white wines by PCA. (a) Plot of scores of PC1 vs PC2. Sample assignation: triangles, monovarietal (Pansa Blanca); circles, polyvarietal wines (Pansa Blanca plus Garnacha Blanca); and squares, quality controls (QC) obtained by mixing the analyzed samples. (b) Plot of loadings of PC1 vs PC2. Data were first autoscaled to equalize the contribution of all variables to the PCA model. Reproduced with permission from Open Access Reference [19].

Juice quality and authenticity is one of the most important areas where HPLC techniques are typically employed, and polyphenolic content or polyphenolic fingerprinting is a very useful tool for that purpose [4, 12, 17, 46–48]. For example, the content of 49 polyphenols in sweet orange, tangerine, lemon and grapefruit juices from 18 cultivars grown in Spain were determined by reversed-phase HPLC with photodiode array (PDA) detection [4]. In general, *Citrus* polyphenolic profiles consist of 81-97% of flavanones, 0.3-13.6% of flavones, 0.1-6.0% of flavonols, 0.6-9.6% of hydroxycinnamic acids and 0.2-0.4% of coumarins (only found in

grapefruit juices). The authors identified several markers that allow to distinguish with practical certainty grapefruit and lemon juices between them and from the other *Citrus* species, becoming a reliable and useful tool to detect juice adulteration. For example, naringenin-7-*O*-neohesperidoside, naringenin-7-*O*-neohesperidoside-4'-*O*-glucose, naringenin-*O*-hexosylhexoside, hesperetin-7-*O*-neohesperidoside, naringenin-*O*- rhamnosylmalonylhexoside, isosakuranetin-7-*O*-neohesperidoside, hesperetin-7-*O*-rutinoside, apigenin-6-*C*-hexoside-*O*-hexoside, apigenin-7-*O*-neohesperidoside and scopoletin-*O*-hexoside were found to be markers of grapefruit juices. In contrast, eriodictyol-7-*O*-rutinoside-4'-*O*-glucoside, eriodictyol-7-*O*-rutinoside, diosmetin-6,8-di-*C*-glucoside, diosmetin-8-*C*-glucoside, luteolin-7-*O*-rutinoside, diosmetin-6-*C*-glucoside and diosmetin-6,8-di-*C*-hexosideacylhexoside were markers of lemon juices.

In another work, Obón et al. [12] used International Federation of Fruit-Juice Producers (IFU) method No. 71 with minor modifications to identify anthocyanins, betacyanins, synthetic and natural pigments, and other polyphenols in red fruits and vegetable juices with the aim to evaluate the quality and to achieve authenticity control of fruit based products, as well as for the detection of fraudulent mixtures with synthetic or natural red food pigments. The separation was carried out employing a Zorbax SB-C18 column using formic acid/water (10:90, *v/v*) and formic acid/acetonitrile (10:90, *v/v*) as mobile phase. This method has been implemented with simultaneous UV-Visible and fluorescence detection. The authors were able to identify 58 compounds in the analysis of 9 red fruits and vegetables including 28 anthocyanins, 4 betacyanins, 1 natural and 6 synthetic pigments, 11 hydroxycinnamic acids, 6 hydroxybenzoic acids, and 2 catechins in a 30 min chromatogram.

The chemometric classification of apple juices according to variety and geographical origin based on polyphenolic content profiles was also reported [47]. The authors analyzed 58 apple juice samples belonging to 5 apple varieties and from 6 regions in Shaanxi province of China, being 51 of the samples from PDO districts. Polyphenolic content was determined by HPLC with PDA detection (280 nm for flavan-3-ols and



dihydrochalcones, 320 nm for hydroxycinnamic acids, and 360 nm for flavonols) by using a Waters C18 column and gradient elution with 2% acetic acid in water (solvent A) and 0.5% acetic acid in water and acetonitrile (50:50 *v/v*) (solvent B) as mobile phase components. When required, identification of polyphenols was conducted using a Q-Exactive quadrupole-Orbitrap mass analyzer. The authors employed chemometric techniques including PCA and stepwise linear discriminant analysis (SLDA) on polyphenolic profiles of the apple juice samples to develop discriminant models. As an example, Figure 2 shows the results reported by employing SLDA. As can be seen, SLDA achieved satisfactory discrimination of apple juices according to variety (Figure 2a) and geographical origin (Figure 2b), providing respectively 98.3 and 91.2% success rate in terms of prediction ability. The results reported by the authors clearly show that polyphenols could serve as characteristic indices to verify the variety and geographical origin of apple juices.

More recently, Pardo-Mates et al. [35] employed a HPLC-UV method to the analysis and characterization of fruit-based and fruit-processed products. The authors developed a method for the determination of 17 polyphenols using a Kinetex C18 reversed-phase column under gradient elution with acceptable sensitivity (LODs below 0.16 mg/L), linearity ( $r^2$  higher than 0.995), precision (RSD below 6.8%), and method trueness (relative errors lower than 11%). In this work, data corresponding to polyphenolic peak areas and HPLC-UV chromatographic fingerprints were analyzed by exploratory PCA to extract information of the most significant variables contributing to characterization and classification of the analyzed fruit-based extracts regarding the fruit of origin. Figure 3 shows the plot of scores of (a) PC1 *vs* PC2 and (b) PC2 *vs* PC3 obtained when using as analytical data for PCA the phenolic peak area information. As can be seen, QCs (obtained by mixing all the samples) appeared in a compact group in the center area of the plot showing the good repeatability and robustness of the proposed HPLC-UV and chemometric methods. A preliminary classification of the analyzed fruit-based extracts showed that the most conflictive zone is in the center of the graph, where grape-based

samples appeared mixed with some cranberry-based samples and close to the other two groups of samples (blueberry and raspberry ones).

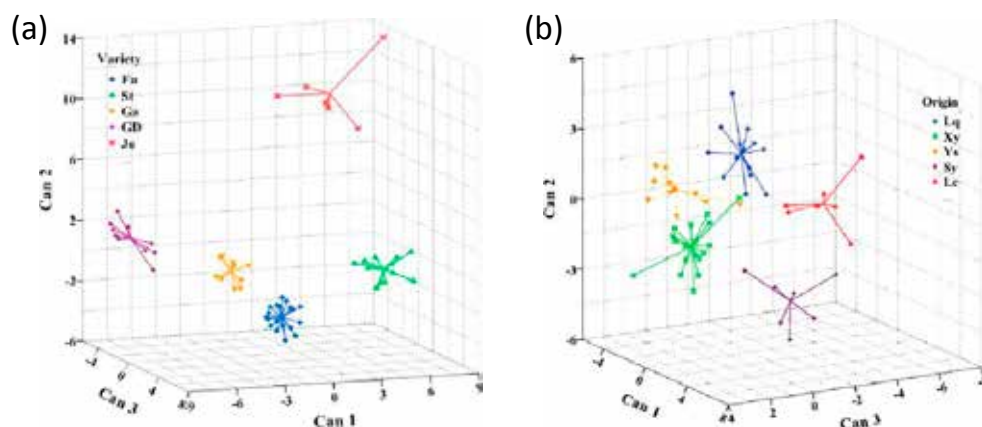


Figure 2. (a) SLDA plot showing grouping of samples according to apple variety. Fu, Fuji; St, Starkrimson; Ga, Gala; GD, Golden Delicious; Jo, Jonagold. (b) SLDA plot showing grouping of samples according to geographical origin. Lq, Liquan; Xy, Xunyi; Ys, Yongshou; Sy, Sanyuan; Lc, Luochua. Reproduced with permission from Reference [47]. Copyright (2013) American Chemical Society.

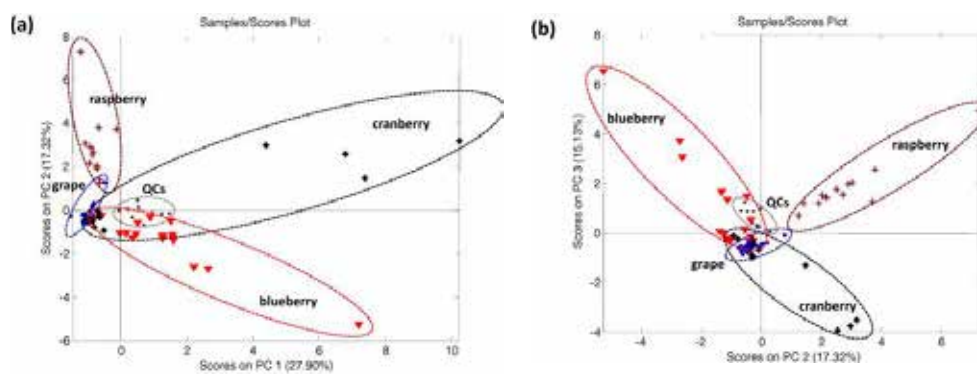


Figure 3. Score plots of (a) PC1 vs PC2 and (b) PC2 vs PC3 obtained when using as analytical data for PCA the phenolic peak area information of the analyzed fruit-based extracts. Reproduced with permission from Reference [35]. Copyright (2017) Elsevier.

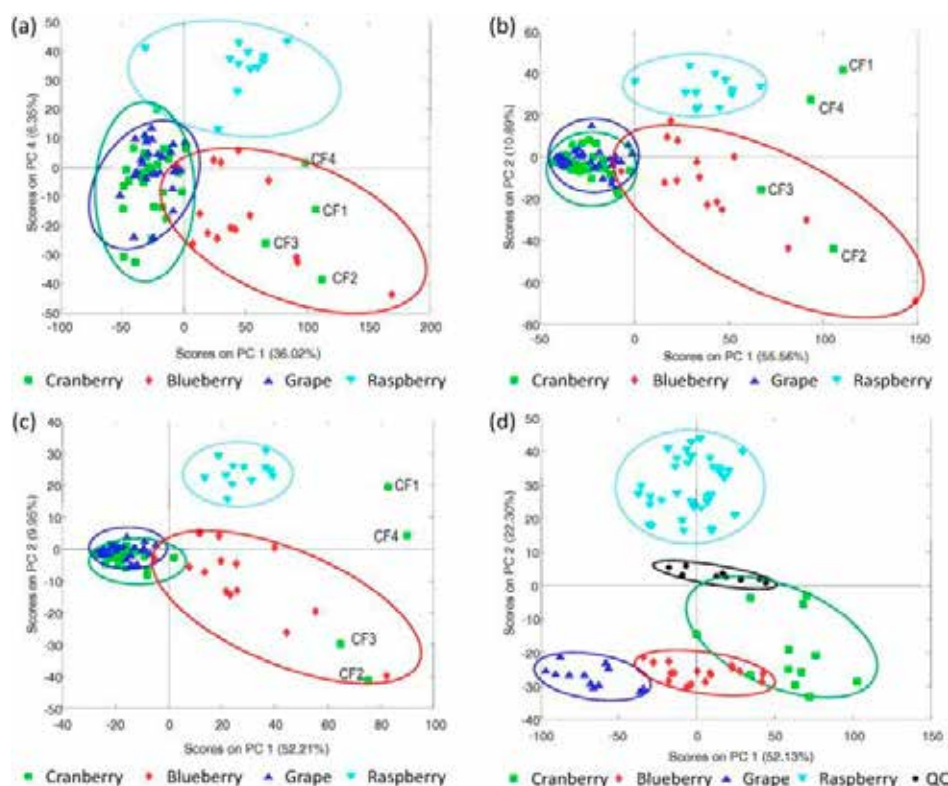


Figure 4. Score plots of PC1 vs PC2 obtained with all analyzed fruit-based extracts when using as analytical data for PCA: (a) the full HPLC-UV chromatographic fingerprints; (b) the HPLC-UV chromatographic fingerprints segmented from 3 to 23 min; (c) the HPLC-UV chromatographic fingerprints segmented from 4.7 to 6.5 min + 8 to 14 min + 15 to 17 min + 29 to 30 min; (d) the HPLC-UV chromatographic fingerprints segmented from 3 to 23 min only with replicates of fruit samples. Reproduced with permission from Reference [35]. Copyright (2017) Elsevier.

The close analysis of the plot of loadings performed by the authors showed that among the 17 polyphenolic compounds analyzed, some of them were clearly characteristic markers of some group of samples while others were not discriminant at all. For example, chlorogenic, vanillic and syringic acids seemed to be the most characteristic and discriminants for blueberry-based samples. The most relevant compounds in raspberry-based samples were protocatechuic acid, protocatechualdehyde and ethyl gallate, and finally, for cranberry-based samples, the most significant compounds were *p*-salicylic, *p*-coumaric and ferulic acids. However, because grape-

based samples appeared grouped close to the less discriminant areas, the authors found difficult to assign characteristic and/or discriminant polyphenols.

As previously commented, Pardo-Mates et al. also employed the HPLC-UV chromatographic fingerprints as data for exploratory PCA, and Figure 4 shows the reported results.

As can be seen, certain discrimination among samples was achieved (Figure 4a) when using HPLC-UV chromatographic fingerprints obtained at 280 nm. The authors simplified the HPLC-UV chromatographic fingerprints by focusing on specific time segments that may contain richer information in reference to each fruit class (Figures 4b and 4c), although similar discrimination was achieved. The authors focused then only on fruit-based samples (removing fruit-processed products such as juices and raisins), and by employing the HPLC-UV chromatographic fingerprint within the segment from 3 to 23 min, a good classification and discrimination among the analyzed group of samples was achieved (Figure 4d).

In the mentioned work, HPLC-UV chromatographic data was further treated by partial least square regression to determine the percentages of adulteration in cranberry-fruit extracts (using blueberry-, grape-, and raspberry-extracts as adulterants) [35]. The authors found that even mixture samples containing low percentages of adulterants (down to 2.5% adulterant level) could be distinguished from genuine cranberry extracts. Highly satisfactory results were reported, with overall errors in the quantification of adulterations below 4.3%.

## 2.2. Capillary Electrophoresis Techniques

Capillary electrophoresis (CE) is an analytical technique that allows the separation of different types of analytes, above all polar and charged compounds based on the differential migration of the analytes through a capillary under an applied electric field. Recently, the utilization of CE has increased as an alternative to LC because of several advantages as

relatively short analysis times, ease of operation, minimum sample and reagent consumptions, separation of bioactive compounds in biological matrices, and it permits the simultaneous analysis of analytes with very different physicochemical properties in a single run [34,49]. CE is an analytical technique that can also be employed in targeted analysis and in profiling analysis allowing to obtain information that can be directly correlated to food quality, safety and authenticity issues, among others [50].

The main detection system used with CE technique is usually diode-array detection (DAD). Thus, CE techniques with DAD detection have been described in the literature for the analysis of polyphenols and phenolic compounds in different matrices such as vegetables, wine and fruit products. Similarly to other separation techniques, the characterization and classification of natural food products can be tackled from the compositional profiles as a source of analytical information and the compositional data can be treated by chemometrics such as PCA and PLS methods. For instance, Navarro et al. [34] developed a capillary zone electrophoresis (CZE) method for the characterization of fruit-based products and cranberry-based pharmaceutical preparations using the compositional profiles of polyphenols. The separation was performed using fused-silica capillaries (60 cm x 75  $\mu\text{m}$  i.d.) and a 35 mM sodium tetraborate buffer solution at pH 9.4 with 5% (v/v) methanol as a background electrolyte. Samples were loaded into the capillary by pressure-assisted hydrodynamic injection (3.5 kPa), and the electrophoretic separations were performed by applying a capillary voltage of +25 kV. Electrophoretic data was processed at 280 nm. To evaluate the applicability of the proposed CZE method, different kinds of samples were analyzed including fruits (cranberry, blueberry, grapes, and raisins), 6 juices, and commercially available cranberry-based pharmaceutical products such as pharmaceutical natural extracts, powder capsules, syrup, and sachets. Electrophoretic profiles and other compositional data (e.g., selected peaks) were considered by the authors to be used for the characterization and classification purposes, and the corresponding data was subjected to PCA, and the reported results are depicted in Figure 5.

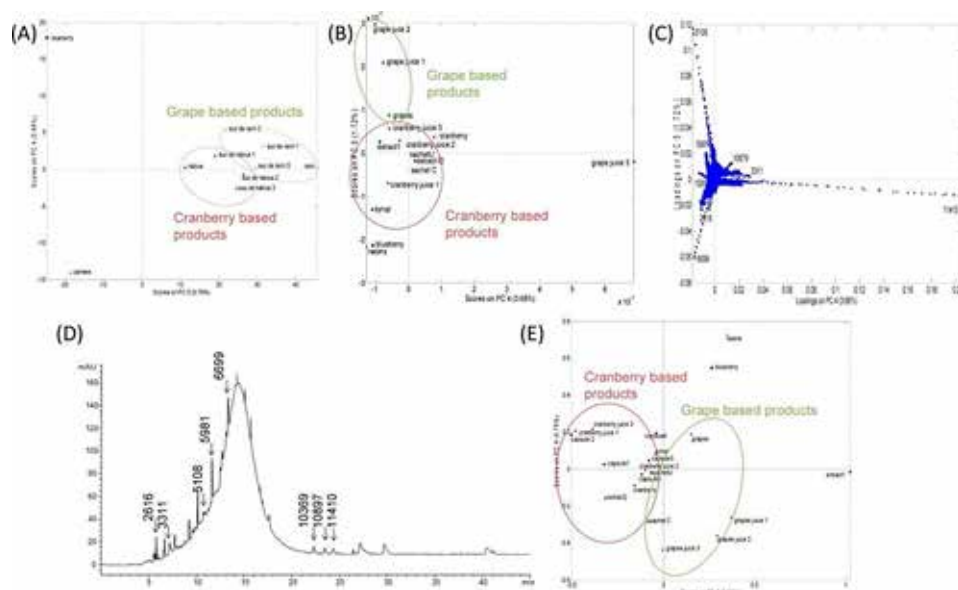


Figure 5. (A) PCA result (PC3 vs PC4 score plot) using electrophoretic polyphenolic profiles obtained with sample extraction method 1.2 for fruits and juice samples; (B) PCA results (PC4 vs PC5 score plot) using electrophoretic polyphenolic profiles obtained with sample extraction method 2.1 for all samples except pharmaceutical capsules. (C) Loading plot using peak signal areas and sample extraction method 2.1. (D) Electropherogram obtained for a cranberry commercial capsule using sample extraction method 2.1. Discriminant peak signals are indicated with an arrow. (E) PCA result (PC3 vs PC4 score plot) using eight discriminant peak signal areas and sample extraction method 2.1. (More details regarding the employed sample extraction methods in reference [34]). Reproduced with permission from Reference [34]. Copyright (2014) American Chemical Society.

At the end, only eight discriminant peak signal areas were selected by the authors for the characterization of food products based on their fruit of origin. This results demonstrated that the proposed CZE method was useful for the authentication of commercial natural and pharmaceutical products.

In another work, Franquet-Griell et al. [51] developed a CZE method for the determination of 20 polyphenols in Spanish wines. In this case the separation was performed using fused-silica capillaries (60 cm x 75  $\mu\text{m}$  i.d) and a 30 mM sodium tetraborate buffer solution at pH 9.2 with 5% isopropanol as the background electrolyte. A capillary voltage of +25 kV with pressure-assisted (3.5 kPa) from minute 18 was applied for the

separation. A batch of 49 commercially available Spanish wines from three different regions (Catalunya, La Rioja and Castilla-La Mancha) was then analyzed with the proposed CZE method and the polyphenolic compositional data were treated by PCA. Results showed that a good distribution of the analyzed wines depending on the three elaboration areas was found and tyrosol, gallic, protocatechuic, *p*-coumaric, and caffeic acids were found to be representative discriminant polyphenolic compounds to achieve wine classification. In the other hand, Helmja et al. [49] developed a CE method for the determination of polyphenols in the characterization of several vegetables, including tomatoes, eggplants, chilli peppers and potatoes. The separation was performed in a fused silica capillary (75 cm x 75  $\mu$ m i.d.) and a 25 mM sodium tetraborate buffer solution at pH 9.3 was used as the background electrolyte. A capillary voltage of +25 kV was applied for the separation. By comparing the corresponding electropherograms obtained from vegetable skins with that of a reference standard, seven polyphenols such as genistein, rutin, naringenin, chlorogenic acid, myricetin, quercetin and caffeic acid were identified in the tomato skin extract, and only few polyphenols were identified in the other vegetables analyzed.

### **3. LOW RESOLUTION MASS SPECTROMETRY METHODS**

Chromatographic techniques coupled to mass spectrometry are one of the most active areas in food analysis. Due to their high separation capacity, chromatographic procedures are widely used for the characterization and authentication of food. The separations based on liquid chromatography are the most numerous, as can be deduced from the many published works, using both polyphenolic profiles and metabolomic profiles. However, gas chromatography (GC) still plays an important role in food analysis using chemometric profiles to characterize and authenticate foods.

### 3.1. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Techniques

Liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) and tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) are among the techniques of choice to cope with the increasing need of analytical methodologies to analyze a large number of target compounds in very complex food matrices[52,53]. As previously commented, polyphenols are compounds that are present in a wide variety of products, so the characterization of food through its polyphenolic content is one of the strategies used for its authentication. In this sense LC-MS and LC-MS/MS techniques can be very useful strategies to characterize foods. There are several modern approaches in LC methods which enable the characterization of foods. Among the analytical methodologies available, HPLC and ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) coupled to mass spectrometry (MS) with electrospray ionization (ESI) or atmospheric pressure chemical ionization (APCI) are used principally [18,54]. The main difference between the two sources of ionization lies in the ionization mechanism. In ESI, the ions preformed in liquid phase are desolvated and evaporated. Instead, in APCI, ionization occurs in the gas phase due to ion-molecule reactions between the plasma generated from the mobile phase and the analytes. Another important difference is related to the optimal mobile phase flow rate. While ESI works optimally at low flow rates, the APCI allows working without loss of sensitivity at flows of 1 mL/min. In addition, the latter ionization technique is less affected by ionic components present in the matrix, although the high working temperature of the APCI limits its application to non-thermolabile substances.

The most used analyzers in low resolution mass spectrometry are the triple quadrupole (QqQ) and the ion-trap (IT). In general, when working with triple quadrupole instruments, the selectivity of the analysis given by such analyzers has prevailed over the possibility to give a general overview of the compounds in the sample due to the limited sensitivity of these instruments when carrying out a full scan acquisition [55]. Even so, it is used in a satisfactory way in order to extract the polyphenolic profile of some foods. An example would be the work done by Abad-García et al.



[17] who used a HPLC-DAD-ESI-MS/MS method with a triple quadrupole instrument working in full-scan in both positive and negative ionization modes, and a second independent run in MS/MS product ion scan mode, to perform the characterization of phenolics in citrus fruit juices (sweet orange, tangerine, lemon and grapefruit) of Spanish cultivars. With this strategy, the authors were able to identify 58 phenolic compounds belonging to different families (flavanones, flavones, flavonols, dihydroflavonol-*O*-diglycosides, hydroxycinnamic acids and coumarins) by means of the mechanisms and fragmentation patterns previously established with phenolic compounds standards. In another work from the same research group [48], the data set composed by the phenolic compound profiles of 83 citrus juices (determined with the proposed HPLC-DAD-ESI-MS/MS method) was evaluated by chemometrics using cluster analysis (CA) and PCA to differentiate them according to the citrus species (sweet orange, tangerine, lemon and grapefruit). However, the authors found that most of the information contained in the full data set could be captured if only 15 phenolic compounds (those in concentrations higher than 10 mg/L) were introduced in the chemometric models. Figure 6 and Figure 7 show the CA and PCA results, respectively, when only information from these 15 abundant phenolic compounds was employed.

With this reduced data set, at least for clusters were observed at a similarity level of 0.70 (Figure 6A). These clusters were identified as follows: cluster A, made up of lemon juices; cluster D, consisting of grapefruit juices; cluster B, containing mainly sweet orange juices and tangerine juices of the Satsumas and hybrid (Fortuna and Clemenvilla) cultivars; and cluster D, due to tangerine juices of the Clementina subclass and sweet orange juices of the Salustiana cultivar belonging to the 'Blanca' subclass. The authors highlighted the interesting behaviour of sweet orange and tangerine juices: in spite of being different citrus species, they were mixed in clusters B and C, suggesting the presence of similar phenolic profiles. Regarding Satsuma tangerine juices (Cluster B), despite being tangerine juices, they were included in the sweet orange juice cluster (cluster C) at a similarity level of 0.4 to generate cluster B' as can be observed in the dendrogram of Figure 6B. This cultivar of tangerine

presented a phenolic profile clearly different from the rest of the tangerine juices and more similar to the sweet orange juices. Increasing the level of similarity from 0.4 to 0.6, four clusters were distinguished: cluster C, due to sweet orange juices, and clusters A, B, and D consisting of tangerine juices grouped according to subclass type (A contained the juices of tangerine hybrid varieties (Fortuna and Clemenvilla); B included juices of the group of Satsumas; and D, tangerine juices of the Clementina subclass).

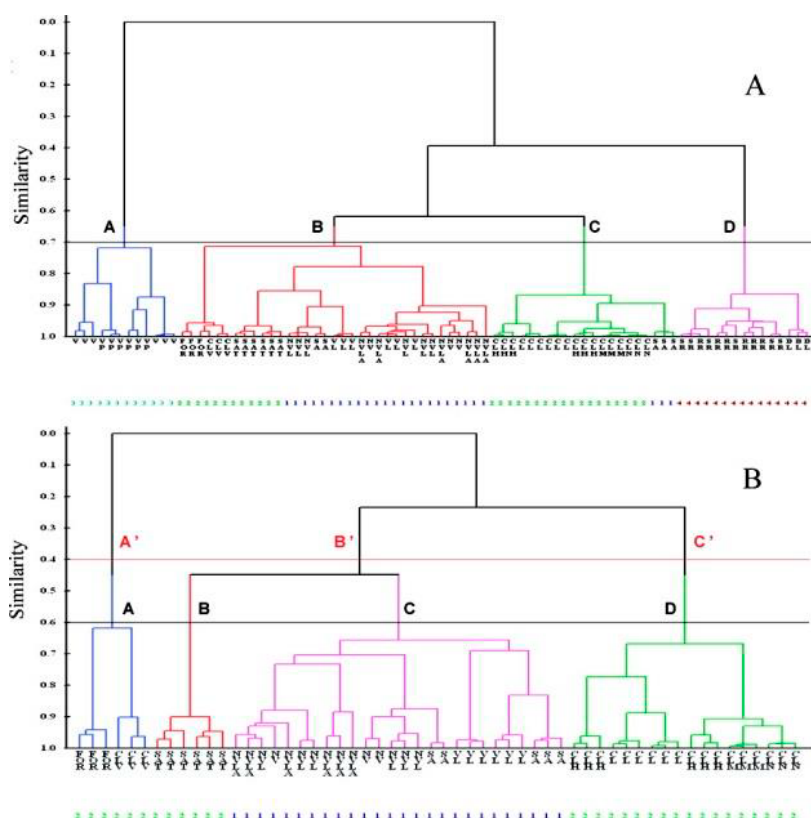


Figure 6. Dendrogram of cluster analysis. Samples codes: 1, sweet orange juice category; 2, tangerine juice category; 3, lemon juice category; and 4, grapefruit category (A); considering only the variables whose concentrations were close to or higher than 10 mg/L at least in one of the four species of the studied Citrus; and (B) dendrogram of CA considering only the variables whose concentrations were close to or higher than 10 mg/L at least in one of two the species of the studied Citrus juices. Sample codes: 1, orange juice category; and 2, tangerine juice category. Reproduced with permission from Reference [48]. Copyright (2012) American Chemical Society.

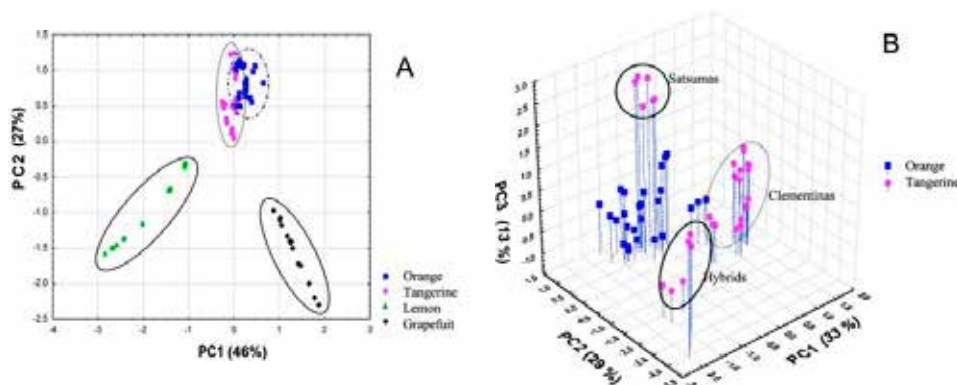


Figure 7. Principal component score plot of Citrus fruit juices considering only the variables whose concentrations were close to or higher than 10 mg/L at least in one of the four species of the studied Citrus juices. (A) PCA model of all Citrus fruits: 1, sweet orange juices; 2, tangerine juices; 3, lemon juices; and 4, grapefruit juices. (B) PCA model comprising only sweet oranges and tangerines; 1, sweet orange juices; and 2, tangerine juices. Reproduced with permission from Reference [48]. Copyright (2012) American Chemical Society.

In the PCA results obtained in the same work (Figure 7), the bidimensional plot of the sample scores in the space defined by the two first principal components showed a natural separation of citrus juices according to species (Figure 7A). Two groups, lemon and grapefruit juices, were clearly separated between them and from the rest of the groups (sweet orange and tangerine juices). The tridimensional plot of the sample scores in the space defined by the three principal components in PCA analysis showed a natural classification in four well separated groups (Figure 7B). A group contained sweet orange juices and the other three groups were made up of tangerine juices: one consisted of juices of the Satsuma tangerine cultivar and the other two were juices of hybrid cultivars and Clementina cultivars. These results correlate well with those obtained by CA since the samples from two categories are grouped in four well-defined areas. Thus, polyphenolic content profile obtained by the proposed HPLC-DAD-ESI-MS/MS method in combination with CA and PCA methods showed natural sample grouping among citrus species and even among citrus subclasses. Using the reduced data set, the authors also developed fast and routine methods for predicting the percentage of grapefruit in

adulterated sweet orange juices using principal component regression (PCR) and PLS regression. The PLS model provided suitable estimation errors.

Another example would be that of Zalaru et al. [56], where the chemical composition of *Coreopsis tinctoria* fruit extracts was investigated by using LC-MS/MS in a triple quadrupole instrument to highlight the potential of ultrasound assisted extraction in the fast preparation of extracts rich in polyphenols using different solvents (55%, 78% and 96% hydrous ethanol) and to evaluate the antioxidant potential of formulated extracts. Compound identification was realized according to their molecular mass and existing literature data. Some of the compounds (chlorogenic acid, luteolin, caffeic acid and apigenin) were identified by comparing retention time, and Q1  $m/z$  values and MS/MS spectra with the results of standards tested under the same conditions. Other compounds were tentatively identified based on literature data and analyzing their fragmentation pathways.

Puigventós et al. [57] developed a LC-ESI-MS/MS method for the analysis and authentication of fruit-based products and fruit-based pharmaceutical preparations. A Kinetex C18 reversed-phase column under gradient elution with 0.1% formic acid aqueous solution and methanol mobile phases was used for the simultaneous determination of 26 polyphenols, allowing an acceptable separation in less than 22 min. Figure 8 shows the concentration levels of 10 selected polyphenols in some of the analyzed samples. Catechin, chlorogenic acid, epicatechin, epigallocatechin, quercetin, and quercitrin were found at very high concentrations levels with catechin, epicatechin, and quercitrin being the most abundant ones (with concentrations higher than 3000 mg/kg in some of the samples). The interesting differences observed among the concentration levels of polyphenolic compounds suggest that the polyphenolic content profile derived from LC-ESI-MS/MS analysis could be proposed as a feature well suited for the authentication of fruit-based

products. Polyphenolic content profiles were analyzed chemometrically by the authors to draw relevant patterns dealing with the characteristics of natural and processed products. Because polyphenolic contents in the extracts and pharmaceutical preparations were 100- to 1000-fold higher than those occurring in the fruits and related food samples, a normalization pretreatment with respect to the overall polyphenolic concentration was proposed in order to provide similar influences on the chemometric model to all the samples. Normalized data was then treated by PCA, which was able to distinguish the analyzed samples and pharmaceutical preparations among the two fruits of origin (cranberry and grape).

Additionally, LC-MS/MS methods using ion-trap mass analyzers have also been reported in the literature to characterize foods. For instance, Ibrahima et al. [58] determined the phenolic profile of the ethanolic extract (90%) of *Securigera securidaca* flowers by HPLC-DAD-MS/MS equipped with an ion trap, working in both positive and negative mode. A total of 47 phenolic compounds were tentatively identified by comparing retention times and MS data from detected peaks with those reported in the literature and by searching the Natural Products Phytochemical Dictionary (CRC). However, although the structural information is obtained thanks to the fact that the complete MS/MS spectra can be recorded, the sensitivity was lower than the one reached with QqQ instruments, although SRM transitions were also employed. In another example, Saha et al. [59] used LC-MS/MS in an IT instrument in negative ionization mode to characterize the polyphenols in *Terminalia arjuna* bark extracts. Compositional analysis revealed that this bark extract contained up to 44% of polyphenols and a dialysis study showed that 70% of the polyphenols had molecular weight greater than 3.5 kDa. Hydrolysis and thiolysis studies of high molecular weight polyphenols indicated that they were proanthocyanidins, and some of them were finally characterized by the authors by means of their fragmentation and with the help of data reported in the literature.

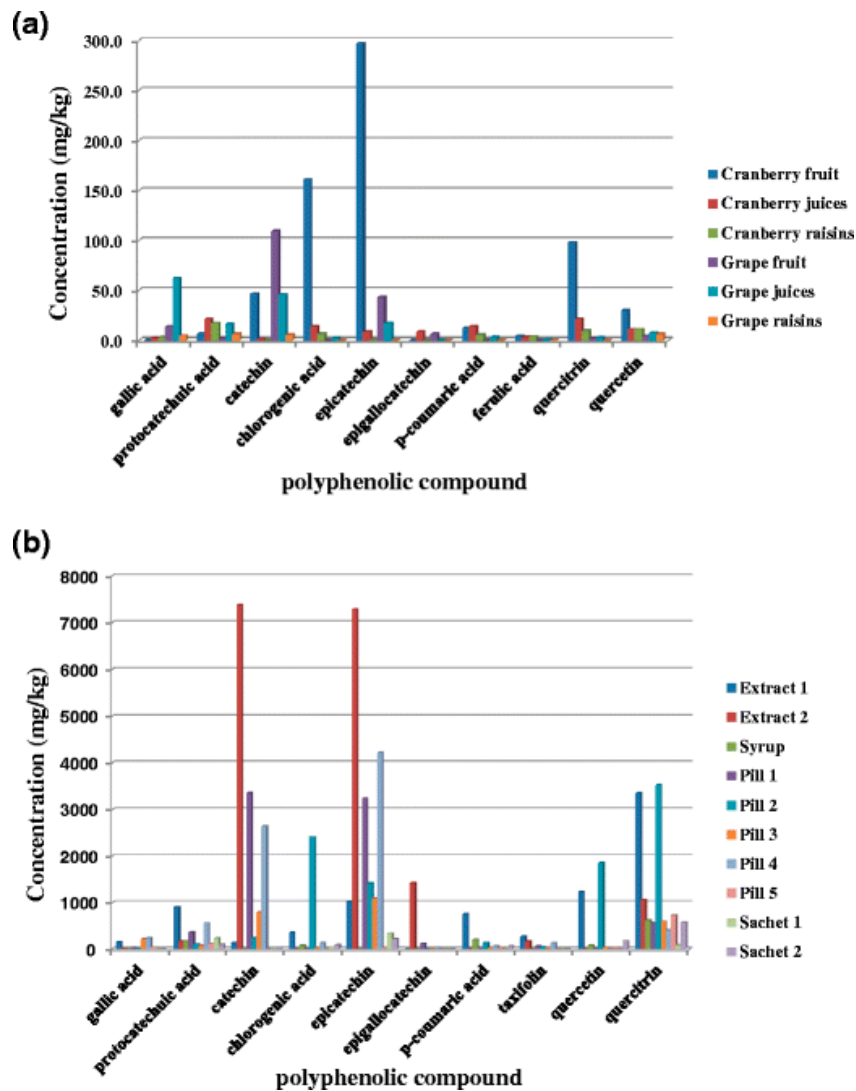


Figure 8. Concentration levels of 10 selected polyphenols in (a) cranberry and grape fruit, juices, and raisins; and (b) cranberry-based pharmaceutical preparations. Reproduced with permission from Reference [57]. Copyright (2015) Springer.

Another mass analyzer used in the characterization of foods is the Qtrap, a hybrid instrument that combines a quadrupole and a linear ion-trap in a configuration similar to that of a QqQ instrument. The advantage of this kind of instrumentation is that similar sensitivity is achieved than with traditional QqQ instruments while obtaining more confirmatory information because full MS/MS spectra can be recorded being able to

follow more than two SRM transitions [55], as well as performing MS<sup>n</sup> fragmentation. An example would be the work reported by Son et al. [60], which characterized nine polyphenols from Korean prostrate spruce *Euphorbia supina* (a weed typically used in folk medicine in Korea against a variety of diseases). The polyphenol mixture was isolated from *E. supina* by extraction with methanol at 80°C, followed by elution in ethyl acetate on a silica gel cartridge. The polyphenols were characterized by HPLC-MS/MS with a Qtrap analyzer in negative and positive ionization modes and by comparison with literature data. Quercetin and kaempferol derivatives formed 84.8% of the total polyphenolic content.

Obviously, if no fragmentation is obtained for a given food, the use of ion trap or QTrap analyzers will not be useful to achieve alternative confirmation. High resolution mass spectrometry (HRMS) and accurate mass measurements are then emerging as the best options for the analysis of food in order to guarantee confirmation and identification of polyphenols. The use of HRMS in the polyphenolic characterization of natural food products will be addressed in the next sections.

Although ESI is the most common ionization source for polyphenolic profiling in natural food products, several works are recently devoted to the use of other atmospheric pressure ionization techniques less affected to matrix effects, such as the case of APPI, in order to achieve the characterization and authentication of foodstuffs. In a recent published work by Parets et al. [27], UHPLC-APPI-MS/MS in a triple quadrupole instrument was applied to the analysis and authentication of fruit-based products and pharmaceutical preparations. Two sub-2 µm C18 reversed-phase columns, Synchronis (100x2.1 mm, 1.7 µm) and Hypersil Gold (50x 2.1 mm, 1.9 µm), were proposed under gradient elution with 0.1% formic acid aqueous solution and methanol mobile phases for the determination of the polyphenolic profile of 29 polyphenols in 32 grape-based and cranberry-based natural products and pharmaceutical preparations. The authors compared heated electrospray (H-ESI), APCI and dopant assisted APPI ionization modes selecting both H-ESI and acetone-assisted APPI as the most suitable for the determination of targeted polyphenols. Subsequently, polyphenolic profiling data were then analyzed by PCA to

extract information on the significant polyphenols contributing to the classification of the analyzed natural extracts according to the type of fruit. Figure 9 shows, as an example, the PCA results obtained with UHPLC-APPI-MS/MS polyphenolic profiles. The authors reported more satisfactory results in the discrimination of sample classes in comparison to UHPLC-ESI-MS/MS polyphenolic profiles. This improvement was attributed to the more robust behavior of the APPI source in the presence of matrix effect issues. Grape and cranberry samples were better distinguished in the case of the long column, which allowed the analyte resolution to be improved chromatographically so the occurrence of matrix effects was minimized. Apart from fruit origin, differences within the cranberry group were observed. It can be seen that juices and berry samples appeared together in the bottom-left part of the scores plot. Besides, sachets, syrup and some capsules (e.g., C6, C8, etc.) were located in the same area, thus suggesting that polyphenolic contents were similar to those occurring in natural samples. From the plot of loadings it was deduced that syringic, salicylic, gallic and caffeic acids, and polydatin were highly characteristic of grape products. These compounds were almost absent in cranberry juices so they were considered as representative grape markers. Gentisic and protocatechuic acids were also up expressed in grape-related samples. Regarding descriptors of cranberry products, ferulic, chlorogenic and sinapic acids were found to be quite specific compounds. Also, in general, quercetin and quercitrin were up expressed in cranberry juices with respect to the grape counterparts. From the point of view of authentication, PCA results suggested that no issues were found and all the samples were reasonably considered genuine.

An interesting work was the one reported by de Simón et al. [61] where the non-anthocyanic phenolic composition of four red wines, one white, and one rosé aged using barrels and chips of cherry, chestnut, false acacia, ash and oak wood was studied by LC-DAD-ESI/MS, to identify the phenolic compounds that woods other than oak contribute to wines, and if some of them could be used as chemical markers of ageing with them. Chromatographic separations were performed on an Agilent series 1100 (Palo Alto, CA) chromatography system equipped with a diode array



detector and a quadrupole mass spectrometer (Agilent series 1100 MSD) with an electrospray interface. The binary mobile phase consisted of solvents A (2% acetic acid in HPLC grade water) and B (HPLC grade acetonitrile). A total of 68 non-anthocyanic phenolic compounds were identified, 15 found only in wines aged with acacia wood, 6 with cherry wood, and 1 with chestnut wood. Thus, the non-anthocyanic phenolic profile could be proposed as a useful tool to identify wines aged in contact with these woods. In addition, some differences in the non-anthocyanic phenolic composition of wines were detected related to both the levels of compounds provided by each wood species and the different evolution of flavonols and flavanols in wines during ageing in barrels or in contact with chips.

Finally, polyphenolic profiling is not the only useful tool for food authentication when using LC-MS techniques. Nowadays, the field of metabolomics, a systematic study of the unique chemical fingerprints of samples, has recently found its application in many research areas including food quality and authenticity assessment. Advanced data mining tools are required to process and interpret complex data obtained within metabolomic-based studies [62]. Although metabolomic fingerprinting is typically performed with HRMS instrumentation, in general, metabolomic studies in food authentication are mainly discriminative and predictive with aiming to create statistical models to predict class memberships [63]. Therefore, it is possible to find works in the literature addressing food authentication by metabolomics while using liquid chromatography coupled to low resolution mass spectrometry. An example would be the work reported by Vaclavik et al. [62], in which LC-MS/MS in a QTrap system was used for comprehensive fingerprinting of several fruit juices. Metabolomic data processing tools were used for authentication, i.e., classification of juices and adulteration detection. The developed statistical model was able to reliably detect 25% of orange juice adulteration with apple or grapefruit juices.

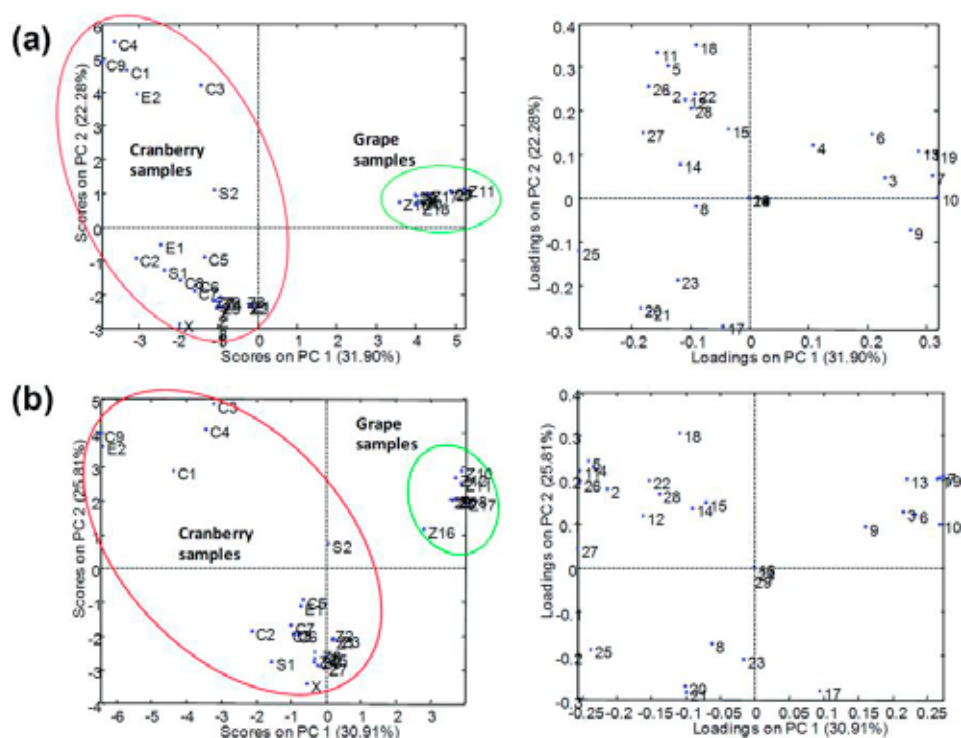


Figure 9. PCA results (scatter plots of scores and loadings of PC1 and PC2) using the normalized peak areas of the UHPLC-APPI-MS/MS polyphenolic profile obtained with (a) Synchronis C18 (100 x 2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ) and (b) Hypersil Gold C18 (50 x 2.1 mm, 1.9  $\mu\text{m}$ ) reversed-phase columns as analytical data. Z, juices; C, capsules; S, sachets, E, extracts; X, syrup. Polyphenols: 1, gallic acid; 2, homogentisic acid; 3, protocatechuic acid; 4, protocatechualdehyde; 5, (+)-catechin hydrate; 6, gentisic acid; 7, *p*-salicylic acid; 8, chlorogenic acid; 9, vanillic acid; 10, caffeic acid; 11, (-)-epicatechin; 12, (-)-epigallocatechin gallate; 13, syringic acid; 14, syringaldehyde; 15, ethyl gallate; 16, umbelliferone; 17, *p*-coumaric acid; 18, taxifolin; 19, polydatin; 20, ferulic acid; 21, sinapic acid; 22, resveratrol; 23, quercitrin hydrate; 24, fisetin; 25, quercetin dehydrate; 26, kaempferol; 27, procyanidin A2; 28, procyanidin B2; and 29, procyanidin C1. Reproduced from Open Access Reference [27], The Royal Society of Chemistry (2016).

### 3.2. Gas Chromatography-Mass Spectrometry Techniques

Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) is another technique applied in the separation and identification of phenolic

compounds, without forgetting its usefulness in food characterization and authentication. The main concerns of GC analysis, which are not applicable to LC techniques, are the derivatization and volatility of phenolic compounds. In GC, the identification of phenolic compounds from food matrices may involve cleaning or pretreatment steps such as removal of lipids from the extract [64], the release of phenolic compounds [65] and chemical modification steps, such as the transformation to more volatile derivatives [64–66]. For derivatize and create volatile derivatives, compounds of the trimethylsilyl family (TMS) are used such as N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA), trimethylchlorosilane (TMCS), N,O-bis(trimethylsilyl)acetamide, hexamethyldisilazane (HMDS) and dimethyldichlorosilane (DMCS). The silylation reaction is simple, free of undesirable side products and produces extremely volatile products without interference in the analysis. Therefore, silyl derivatization is a very good option for identifying phenolic compounds. On the other hand, other works make a much simpler extraction, using chloroform, hexane, dichloromethane, methanol or ethanol that inject directly to identify volatile polyphenols or extract the metabolomic profile for food characterization or authentication [67–69]. Silica capillaries of 30 m lengths, with internal diameters of 25–32  $\mu\text{m}$  and a 0.25  $\mu\text{m}$  stationary phase particle size are the most used columns for the identification of phenolic compounds in GC techniques.

The use of gas chromatography with mass spectrometry has been generalized providing more selectivity and sensitivity in the analyzers, with the ion-trap and the quadrupole detectors being the most used in low resolution mass spectrometry. Thanks to this, both targeted and untargeted GC-MS approaches are widely used in food characterization and authentication works. An example would be the work done by Tayade et al. [70], which characterized the extracts of *Rhodiola imbricata* Edgew. root (Rose root or Arctic root or Shrolo root), an important food crop and medicinal plant in the Indian trans-Himalayan cold desert. Chemometric profile of the n-hexane, chloroform, dichloroethane, ethyl acetate, methanol, and 60% ethanol root extracts of *R. imbricata* were performed by hyphenated gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) technique

using an ion trap mass analyzer. Interpretation on mass spectrum obtained by GC-MS was done by using the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database, with NIST MS search program v.2.0g. The chemometric profile revealed the presence of 63 phytochemotypes including phytosterols, terpenoids, fatty acids, fatty acid esters, alkyl halides, phenols, alcohols, ethers, alkanes and alkenes as the main group of phytochemotypes in the different root extracts of *R. Imbricata*.

### 3.3. Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry Techniques

Lately, capillary electrophoresis is gaining popularity as a valuable tool for the determination of bioactive compounds. This is due to several advantages such as high speed of analysis, the small amount of sample required and, most important, the extremely limited solvent consumption. All these characteristics are making CE techniques a worthy and complementary alternative to other chromatographic techniques in the characterization of natural food products. Separation principles on CE are based on the differences in the mass to charge ratios of the compounds, providing a different migration within the capillary when an electric field is applied, whereas separation principles in, for instance, reversed-phase separation is based on the differences in polarity among the compounds. Therefore, since both CE and RP-HPLC separation principles are based on different physicochemical principles, complementary information can be obtained when determining, for instance, polyphenolic fingerprinting profiles.

Thus, some works can be found in the literature dealing with the use of CE coupled to mass spectrometry (CE-MS) for the characterization of phenolics. For example, Quirantes-Piné et al. [71] developed a CE-MS method to perform the qualitative characterization of phenolic and other polar compounds in a lemon verbena (*Lippia citriodora*) extract. Separation was carried out using fused-silica capillaries of 100 cm total length (50  $\mu\text{m}$  i.d.) and employing a 60 mM ammonium acetate at pH 9.25 and 5% v/v 2-propanol as background electrolyte. A capillary separation

voltage of 30 kV was applied. The use of two different MS analyzers, an ion trap and a time-of-flight (TOF), enabled the authors to tentatively identify the major components of the analyzed extract. Thus, using this method 16 compounds were determined, some of them previously identified by HPLC methods, although four compounds were found for the first time in lemon verbena such as asperuloside, tuberonic acid glucoside or 5'-hydroxyjasmonic acid 5'-*O*-glucoside, shanzhiside and ixoside. These results demonstrate that CE-MS could generate complementary data to those obtained by LC-MS, being a particularly suited technique for the analysis of plant metabolites.

#### **4. HIGH RESOLUTION MASS SPECTROMETRY METHODS**

Nowadays, high resolution mass spectrometry (HRMS) and accurate mass measurements are emerging as the best options for the analysis of food samples in order to guarantee confirmation and identification in the characterization of natural food products. Basically, there are four types of HRMS instruments: magnetic sector, time-of-flight (TOF), Orbitrap, and Fourier transform ion cyclotron resonance (FTICR) instruments. The most frequently used with LC or UHPLC methods are TOF and Orbitrap analyzers. In general, TOF instruments present a resolution (instrument's ability to measure the mass of two closely related ions precisely) of approximately 10,000 – 40,000 FWHM with accuracies in the mass determination of 1-5 ppm, while the resolution of Orbitrap instruments is in the range 10,000 – 140,000 with 1-2 ppm mass accuracy (for comparison, a conventional quadrupole MS instrument shows a resolution of 1,000 FWHM and accuracies of 500 ppm).

Recent advances in both LC-TOF-MS and LC-Orbitrap-MS methods have reduced instrument costs, simplified analysis, and improved accuracy, and today these advances offer bench-top instrumentation that is amenable to screening and identification of a great variety of compounds in food, not only of targeted ones, but also of non-target or unknown chemicals.

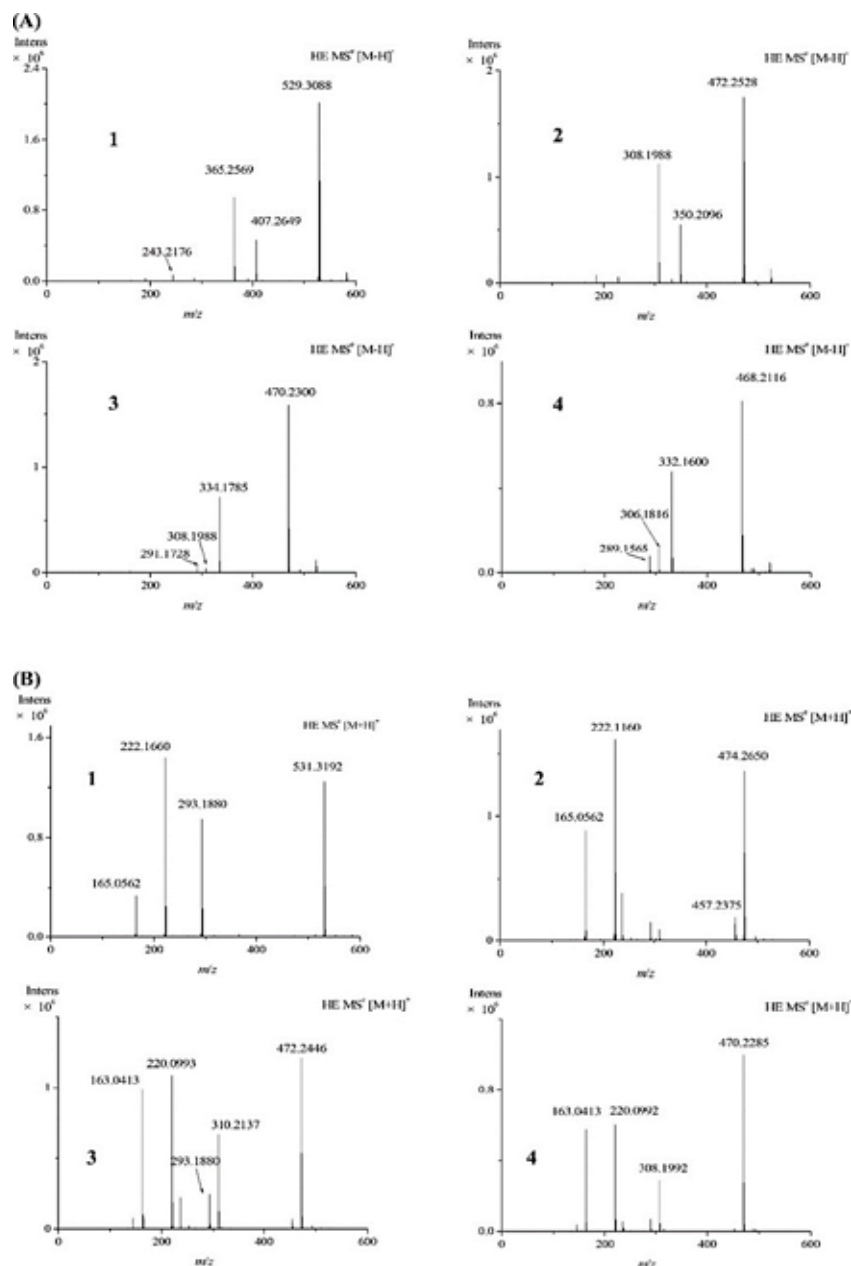


Figure 10. Typical MSE spectra of four polyamine derivatives tentatively identified in *Lycium ruthenicum* fruit at ramped collision energy (20–60 eV): (A) negative mode; (B) positive mode. (1) N,N-bis(dihydrocaffeoyl) spermine; (2) N,N-bis(dihydrocaffeoyl) spermidine; (3) caffeoyl-(dihydrocaffeoyl) spermidine; (4) N,N-dicaffeoylspermidine. Reproduced with permission from Reference [79]. Copyright (2016) American Chemical Society.

Accurate mass measurements improve the probability of a correct analysis when monitoring  $m/z$  ions in an MS spectrum, as the number of possible compounds with a specific  $m/z$  value will decrease as the accuracy is improved (lower ppm errors). The analysis of polyphenols in natural food products is relatively complex due to the complexity of food matrices with a huge variety of chemical compounds, but also due to the great variety of polyphenols that can be present, which differ in polarity and size (from simple phenolic acids to tannins), and to the fact that many of these compounds are found in food products at low concentration levels. Moreover, HRMS will allow removing interferences from other compounds and their fragment ions, adducts, and stable isotopic peaks. So, as the mass resolution increases, the more selective the method will be, at least to remove interferences.

Moreover, the improvements in high resolution mass spectrometry as well as in the software programs required to process the large analytical data sets created with these techniques have been responsible for the rapid development of metabolomics which is becoming also very popular in food safety issues and food authentication [72–74].

All these characteristics, make LC-HRMS a powerful tool in the characterization, classification and authentication of natural food products. During the last years, the number of LC-HRMS applications dealing with the polyphenolic characterization and authentication of food products is growing at a high speed. Thus, in this section only some examples will be addressed.

As previously commented, LC-HRMS using TOF or hybrid quadrupole-TOF (Q-TOF) or ion trap-TOF (IT-TOF) instruments are among the most frequently HRMS methodologies employed for the polyphenolic characterization in, for instance, wines [75–77], fruits and fruit juices [45,78–86], olive oils [87,88], plant herbs and teas [86,89,90], and berries [91]. For example, Wu et al. [79] carried out the characterization of polyphenols from the *Lycium ruthenicum* fruit (long used in folk medicine) by UHPLC-Q-TOF/MS<sup>E</sup>. In MS characterization studies usually it is essential to perform several MS experiments for obtaining structural information by initially conducting low collision

energy (LE) experiments, followed by higher collision energy (HE) MS/MS experiments to obtain fragment ion information. Therefore, the traditional MS/MS approach generally requires multiple steps for obtaining the fragmentation patterns of target compounds. Alternatively, the MS<sup>E</sup> data acquisition (where E represents every data) method employed by Wu et al. provides two parallel alternating scans using either LE to obtain information on the molecular ion or HE to obtain full-scan accurate mass fragments, precursor ion, and neutral loss data [92]. All these data can be obtained from a single analytical run which considerably reduces investigation time. As an example, Figure 10 depicts the typical MS<sup>E</sup> spectra of four polyamine derivatives tentatively identified in *Lycium ruthenicum* fruit at ramped collision energy. With this strategy, a total of 26 polyphenols were tentatively identified by the authors, of which 19 represent the first reports of these polyphenols in these natural product.

Very recently, Guo et al. [85] performed a multivariate statistical analysis of the polyphenolic constituents in kiwifruit juices by UHPLC-HRMS (TOF instruments) in order to trace fruit varieties and geographical origins. For that purpose, fifty-one kiwifruit juice samples of seven kiwifruit varieties (Hayward, Hongyang, Xuxiang, Winmei, Jinkui, Huayou and Jinyan) obtained from five regions of China (Zhouzhi county in Shaanxi, Meixian county in Shaanxi, Xixia city in Henan, Dujiangyan city in Sichuan, and Jianshi county in Hubei) were analyzed. Twenty-one phenolic compounds were detected in the kiwifruit juices belonging mainly to four classes: flavan-3-ols, hydroxybenzoic acids, hydroxycinnamic acids and flavonols. The flavan-3-ols predominated among the four phenolic groups, accounting for 70.1% of the total phenolic content, being hydroxycinnamic acids the second major group. PCA and SLDA chemometric methods were employed when processing the obtained chemical data. Fifteen phenolic compounds were selected as markers in SLDA procedure and six discriminant functions were obtained. The recognition ability and the prediction ability resulted both of 100%. When plotting the scores of the first three functions for each sample in a three dimensional scatter diagram, the linear discriminant analysis acquired an unambiguous classification between the seven varieties of kiwifruit juices



independently of the geographical origin. Additionally, 14 phenolic compounds were selected as markers and used in discriminant functions as input to also achieve an unambiguous classification of the kiwifruit juices regarding their geographical origins. The authors highlighted the fact that the juices from Mexian and Zhouzhi, which lie within a radius of only 40 km, could be perfectly distinguished each other. Thus, the results obtained in the mentioned work showed that polyphenolic profiling of kiwifruit juices contain enough information to trace fruit varieties and geographical origins.

Delcambre and Sasucier [77] proposed the use of UHPLC-ESI-Q-TOF-MS as a promising technique to better understand the quality and authenticity of red wines. The authors developed the first shotgun polyphenomics analysis of wine, yielding significantly more information than previous fast methods such as direct injection-ESI-MS. This rapid method required no sample preparation as just a 0.45  $\mu\text{m}$  PTFE filtration was performed prior to analysis. Separation was carried out in a PLRP-S reversed-phase (50 x 2.1 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) column, kept at 50°C, and the flow rate was 0.5 mL/min.

A short gradient elution using water and acetonitrile both acidified with 0.1% formic acid as mobile phase was employed. As an example, Figure 11 shows the MS spectra obtained for the same Merlot wine sample when comparing isocratic elution (A), direct injection without column (B) and the proposed short gradient elution approach (C).

The third elution condition (Figure 11C) allowed the detection of 103 compounds compared to 36 and 20 for isocratic (Figure 11A) and direct injection (Figure 11B), respectively. To test the robustness and the applicability of the proposed method, a series of red varietal wines (Pinot Noir, Merlot, and Syrah) were analyzed by the authors with the short gradient analysis. This included 44 red wines in total: 11 Pinot Noir, 23 Merlot, and 10 Syrah. However, instead of using the classical metabolomics strategy for quantification (multivariate analysis of all spectra and normalization by the use of internal or external standards), the authors decided to adopt another strategy for attempting to distinguish the

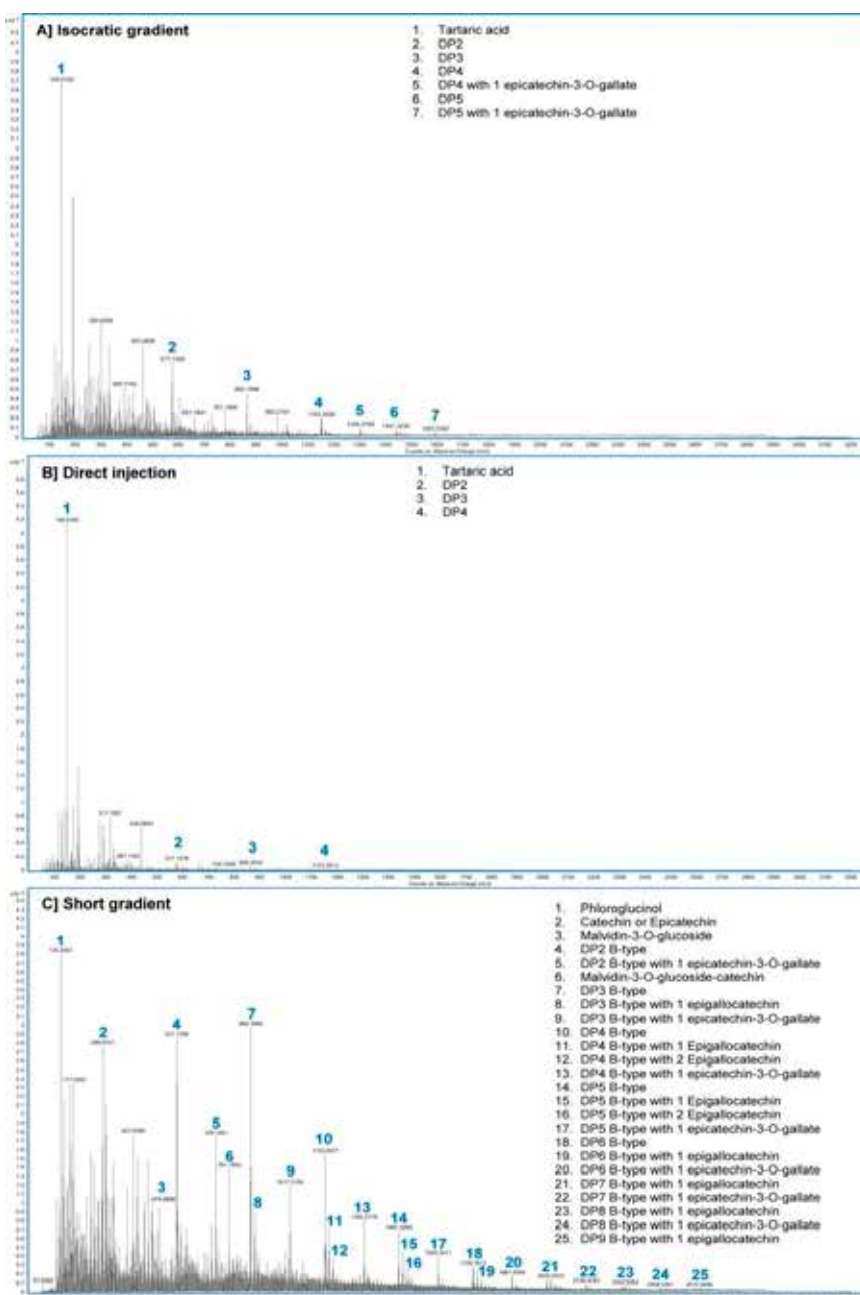


Figure 11. MS spectra obtained for the same Merlot wine sample with different separation conditions: (A) isocratic elution, (B) direct injection, and (C) short gradient. For each analysis, the total ion current was extracted with the same acquisition time range. Reproduced with permission from Reference [77]. Copyright (2013) American Chemical Society.

varieties. The proposed method by Delcambre and Saucier was based on an ion ratio obtained within each wine analyzed. After the initial test, the spectra obtained were compared to detect the phenolic profile differences. Two major peaks showed a different proportion depending on the varieties considered. For this reason these two ions were arbitrarily selected to discriminate between varieties,  $m/z = 479.0831$  and  $m/z = 781.1985$  and their corresponding ratio calculated (479/781). The total average ratio of each varietal wine was different, also confirmed by one-way analysis of variance (ANOVA). Statistical test applied to this ratio demonstrated that the average ion ratio was distinct for the three varietal wines considered (Merlot, Pinot Noir, and Syrah). This original metabolomics approach, through the use of the 479/781 ratio, yielded very good results without the use of external or internal standards.

The invention of the Orbitrap analyzer and its proof-of-principle by Makarov at the end of the 1990s [93] started a sequence of technology improvements which resulted in the commercial introduction of this analyzer by Thermo Fisher Scientific as a part of the hybrid LTQ Orbitrap instrument in 2005 [94,95]. Since then, the use of LC-HRMS using Orbitrap instrumentation as well as hybrid instruments such as quadrupole-Orbitrap (Q-Orbitrap) and linear ion trap quadrupole-Orbitrap (LTQ-Orbitrap) has also gained popularity for the characterization of polyphenols in food natural products such as, for instance, apple juices [47], seeds of grape pomace [96], honey [97], pear leaves [98], tomatoes [99], spices [100][101], beer [102] and red wine [103], among others. For example, Quifer-Rada et al. [102] performed a comprehensive characterization of beer polyphenols by liquid chromatography coupled with an electrospray ionization hybrid linear ion trap quadrupole Orbitrap high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-HRMS). Beer samples were analyzed in full scan mode at a resolving power of 30,000 at  $m/z$  400 and data-dependent MS/MS events acquired at a resolving power of 15,000. The most intense ions detected during full scan MS triggered data-dependent scanning. Data-dependent scanning was carried out without the use of a parent ion list. Ions that were not intense enough for a data-dependent scan were analyzed in  $MS^n$  mode with the Orbitrap resolution

also set at 15,000 at  $m/z$  400. The data-dependent scan experiment was very useful for the identification of unknown phenolic compounds since it provided high resolution and accurate mass product ion spectra from precursor ions that are unknown beforehand within a single run. Combining data-dependent scan and MS<sup>n</sup> experiments, the authors were able to tentatively identify 47 phenolic compounds in beer including simple phenolic acids, hydroxycinnamoylquinic acids, flavanols, flavonols, flavones, alkylmethoxyphenols, alpha- and iso-alpha-acids, hydroxylphenylacetic acids and prenylflavonoids. According to the authors, 7 of these phenolic compounds have never been determined before in beer: feruloylquinic acid, caffeic acid-O-hexoside, coumaric acid-O-hexoside, sinapic acid-O-hexoside, catechin-O-dihexoside, kaempferol-O-hexoside, and apigenin-C-hexoside-pentoside. Similar strategy was used by the same research group for the characterization of polyphenols in red wine [103], culinary herbs and spices such as rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay [101], and tomato [99] samples.

LC-ESI-LTQ-Orbitrap-HRMS was also employed by Gasic et al. [97] to find chemical markers for the authentication of unifloral *Salvia officinalis* L. honey, which originates from the Croatian North Adriatic coast. Quantitative data on the targeted compounds (25 phenolic compounds, 14 carbohydrates and 25 minerals) together with the total phenolic contents and radical scavenging activities were used as data for multivariate analysis, which provided useful information for the accurate authentication of unifloral sage honey and its discrimination from other unifloral types of honey.

Similarly, Mudric et al. [100] employed UHPLC in combination with LTQ-Orbitrap HRMS for polyphenolic and carbohydrate profiling of spice peppers (*Capsicum annum* L.) varieties Lemeska and Lakosnicka paprika. A total of 49 polyphenolics were identified, twenty-five of them were quantified using available standards, while the other compounds were confirmed by means of the exact mass search of their deprotonated molecule [M-H]<sup>-</sup> and its MS<sup>4</sup> fragmentation pathway. According to the authors, five polyphenolic compounds were tentatively identified for the first time in paprika: 5-O-*p*-coumaroylquinic acid, luteolin 7-O-(2''-O-

pentosyl-4''-O-hexosyl)hexoside, quercetin 3-O-(2''-O-hexosyl) rhamnoside, isorhamnetin 3-O-[6''-O-(5-hydroxyferuloyl)hexoside]-7-O-rhamnoside, and luteolin 7-O-[2''-O-(5''-O-sinapoyl)pentosyl-6''-O-malonyl]hexoside. The authors employed polyphenolic and carbohydrates quantified data for principal component analysis in order to evaluate specific grouping patterns among the analyzed red spice paprika. PCA resulted in a eight-component model which explained 92.12% of the total data variance. Separation of samples based on geographic origin was achieved through the PC2 axis. Moreover, discrimination of samples according to the production year was also achieved.

An interesting work dealing with polyphenolic profiling using Orbitrap HRMS is the one reported by Aksic et al. [98], whom studied the polyphenolic profiles in leaves of 22 pear cultivars of divers origin (*P. communis*, *P. pyrifolia*, and *P. pyrifolia* × *P. communis*) and different resistance to psylla (one of the most serious arthropod pests of pear). The authors aimed to show which differences in the polyphenolic profile of leaves from resistant and susceptible cultivars could be utilized as information in subsequent breeding programs. The total intensities of all characterized phenolic compounds, obtained from the full scan spectra processed through ToxID software, were used by the authors as variables together with total phenolic content and the radical scavenging activity for PCA. The initial matrix 22 (the number of pear leaf samples) × 62 (total intensities of phenolics, TPC, and RSA) was processed using the covariance matrix with autoscaling. PCA resulted in seven PCs explaining 75.0% of the variation of the data set. The first principal component accounted for 25.2%, the second 11.7%, and the third component 10.6% of the total variance. In Figure 12A (PCA scatter plot) it is evident that the cultivars were clustered in two main groups along the PC1 axis. The first group included six cultivars originating from *P. pyrifolia* and one interspecies hybrid (*P. pyrifolia* × *P. communis*). The loading plot (Figure 12B) revealed the most influential variables responsible for this classification: *p*-hydroxybenzoic acid 4-O-hexoside, kaempferol 3-O-rutinoside, apigenin 7-O-rutinoside, apigenin 7-O-hexoside, ferulic acid,

hispidulin 7-O-hexoside, and kaempferol 3-O-(6''-O-p-coumaroyl)-hexoside.

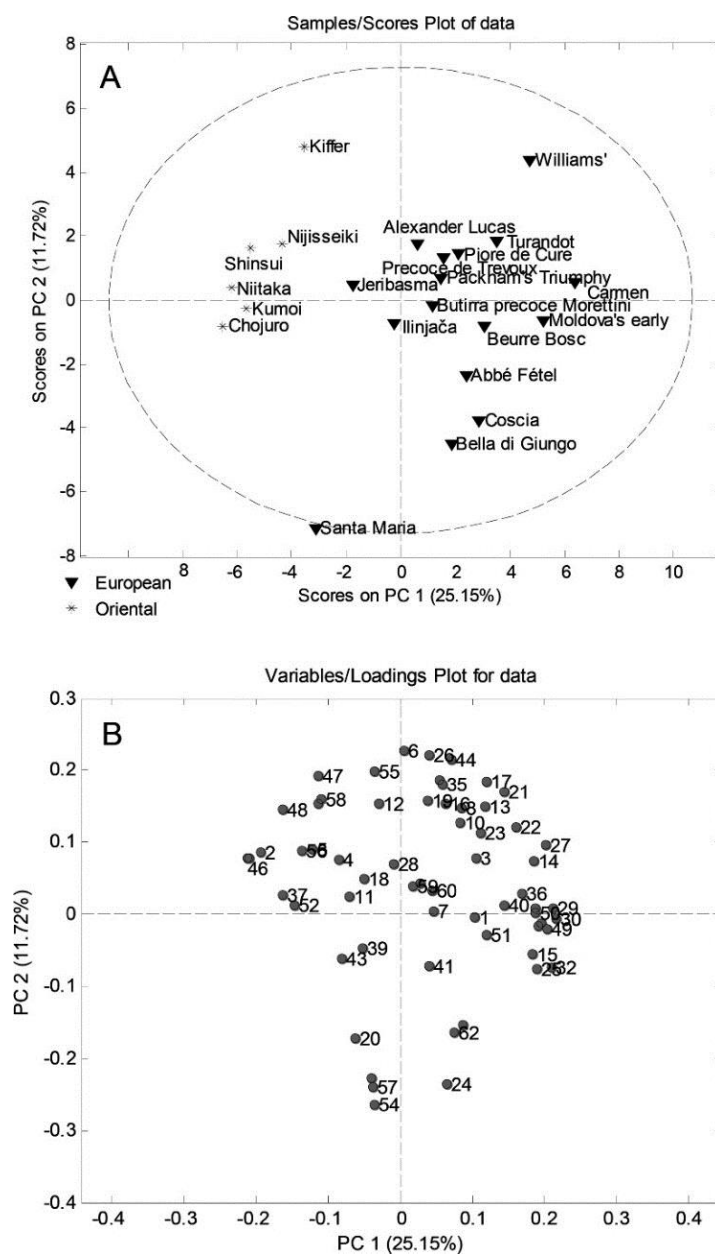


Figure 12. (A) PC scores plot of pear leaf samples; (B) Loadings plot of pear leaf samples. Reproduced with permission from Reference [98]. Copyright (2015) American Chemical Society.

Finally, some works can also be found in the literature proposing the use of other HRMS instruments for the characterization of polyphenolics in natural food products. This is the case, for instance, of the work reported by Rockenbach et al. [96] who employed liquid chromatography coupled to electrospray-Fourier transform ion cyclotron resonance (LC-ESI-FTICR-HRMS), in combination with other techniques such as CE and HPLC-DAD-MS<sup>n</sup>, for the characterization of flavan-3-ols in seeds of grape pomace from the vinification of different grape varieties with a view to their exploitation as a source of natural antioxidants. LC-ESI-FTICR-HRMS enabled the assignment of the elemental composition of 251 different flavan-3-ol components in Cabernet Sauvignon variety, including isomers of 28 different molecular classes.

## CONCLUSION

As discussed in this chapter, the enormous relationship that exists between the type of polyphenols and their concentration levels in natural food products, which is not only related to the type and variety of fruit or vegetable of origin in that food, but also with multiple external parameters such as the geographical area of production, cultivation and processing techniques, etc. has made the polyphenolic profile of natural food an indispensable tool for the characterization, classification and, above all, authentication of these natural foodstuffs. Thus, any technique capable of obtaining a polyphenolic profile as a discriminant fingerprint between foods will be useful to authenticate the quality and origin of natural foods. Among the most common techniques, those based on separation principles such as liquid chromatography, gas chromatography and capillary electrophoresis, are among the most suitable for this purpose, and several examples have been presented.

The determination of polyphenols in food products has been carried out using separation techniques with multiple detection systems such as UV-visible detection, fluorescence detection, etc. However, the coupling of liquid chromatography with mass spectrometry is the most widely used

technique for the determination of target polyphenols, and numerous works using all kinds of analyzers, quadrupoles, triple quadrupoles, ion trap, linear ion trap, etc. can be found in the literature. However, the point of inflection in the characterization of polyphenols in natural food products appears with the great advances in high resolution mass spectrometry, either using time-of-flight analyzers or Orbitrap analyzers. The high resolution attainable by these instruments together with the accurate mass measurements improve the probability of a correct analysis when monitoring  $m/z$  ions in an MS spectrum, as the number of possible compounds with a specific  $m/z$  value will decrease as the accuracy is improved (lower ppm errors). It is important to take into account that the analysis of polyphenols in natural food products is relatively difficult due to the complexity of food matrices with a huge variety of chemical compounds, but also due to the great variety of polyphenols that can be present, which differ in polarity and size, and to the fact that many of these compounds are found in food products at low concentration levels. HRMS will allow removing interferences from other compounds and their fragment ions, adducts, and stable isotopic peaks. So, as the mass resolution increases, the more selective the method will be, at least to remove interferences, and the most suitable will be for the tentative identification of new polyphenols.

It is important to mention that many of these methods of characterization, classification and authentication of natural food products would not be possible without the great advances in software programs for data processing as well as in chemometric techniques. The large amount of chemical data generated with the analytical techniques available today requires statistical models that allow the comparison of polyphenolic profiles to be used as fingerprints in food authentication. Thus, numerous studies using different chemometric methods such as PCA, PLS, DA, etc. are described in the literature, and some relevant examples have been addressed in the present chapter.

Finally, the great diversity of plants, fruits and vegetables around the world, which can give rise to a great variability of natural food products, together with the important antioxidant properties, among others, of the



polyphenols makes the characterization of polyphenolic profiles in natural products a hot topic for both researchers and society, and surely the number of publications dedicated to this field will grow considerably in the coming years.

### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness under the project CTQ2015-63968-C2-1-P, and from the Agency for Administration of University and Research Grants (Generalitat de Catalunya, Spain) under the project 2014 SGR-539.

### REFERENCES

- [1] Lees, M. Food Authenticity and Traceability, *Eurofins Scientific*, Nantes, France, 2000.
- [2] Council Regulation (EC) No 510/2006 of 20 March 2006 on the protection of geographical indications and designations of origin for agricultural products and foodstuffs, *Off. J. European Union* L93, (2006), 12-25.
- [3] Council Regulation (EU) No 1151/2012 of the European Parliament and of the Council of 21 November 2012 on quality schemes for agricultural products and foodstuffs, *Off. J. European Union* L343, (2102), 1-29.
- [4] Abad-García, B; Garmón-Lobato, S; Sánchez-Ilárduya, MB; Berrueta, LA; Gallo, B; Vicente, F; Alonso-Salces, RM. Polyphenolic contents in Citrus fruit juices: Authenticity assessment, *Eur. Food Res. Technol.*, 238 (2014), 803–818. doi:10.1007/s00217-014-2160-9.
- [5] Muntean, E. Simultaneous Carbohydrate Chromatography and Unsuppressed Ion Chromatography in Detecting Fruit Juices

- Adulteration, *Chromatographia.*, 71 (2010), 69–74. doi:10.1365/s10337-010-1598-6.
- [6] Reid, LM; O'Donnell, CP; Downey, G. Recent technological advances for the determination of food authenticity, *Trends Food Sci. Technol.*, 17 (2006), 344–353. doi:10.1016/j.tifs.2006.01.006.
- [7] Manach, C; Scalbert, A; Morand, C; Rémésy, C; Jime, L. Polyphenols: food sources and bioavailability, *Am. J. Clin. Nutr.*, 79 (2004), 727–747.
- [8] Scalbert, A; Manach, C; Morand, C; Rémésy, C; Jiménez, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 45 (2005), 287–306. doi:10.1080/1040869059096.
- [9] Bach-Faig, A; Berry, EM; Lairon, D; Reguant, J; Trichopoulou, A; Dernini, S; Medina, FX; Battino, M; Belahsen, R; Miranda, G; Serra-Majem, L. Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates, *Public Health Nutr.*, 14 (2011), 2274–2284. doi:10.1017/S1368980011002515.
- [10] Middleton, E, Jr. Kandaswami, C; Theoharides, TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer, *Pharmacol. Rev.*, 52 (2000), 673–751.
- [11] Bueno, JM; Ramos-Escudero, F; Sáez-Plaza, P; Muñoz, AM; José Navas, M; Asuero, AG. Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part I: General Considerations Concerning Polyphenols and Flavonoids, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 42 (2012), 102–125. doi:10.1080/10408347.2011.632312.
- [12] Obón, JM; Díaz-García, MC; Castellar, MR. Red fruit juice quality and authenticity control by HPLC, *J. Food Compos. Anal.*, 24 (2011), 760–771. doi:10.1016/j.jfca.2011.03.012.
- [13] Boulton, RB. the Copigmentation of Anthocynins and Its Role in the Color of Red Wine: Comments on a Critical Review, *Am. J. Enol. Vitic.*, 52 (2001), 67–87.
- [14] Lesschaeve, I; Noble, AC. Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences, *Am. J. Clin. Nutr.*, 81 (2005), 3305–3355.

- [15] Dragovic-Uzelac, V; Delonga, K; Levaj, B; Djakovic, S; Pospisil, J. Phenolic profiles of raw apricots, pumpkins, and their purees in the evaluation of apricot nectar and jam authenticity, *J. Agric. Food Chem.*, 53 (2005), 4836–4842. doi:10.1021/jf040494+.
- [16] Fügel, R; Carle, R; Schieber, A. Quality and authenticity control of fruit purées, fruit preparations and jams - A review, *Trends Food Sci. Technol.*, 16 (2005), 433–441. doi:10.1016/j.tifs.2005.07.001.
- [17] Abad-García, B; Garmón-Lobato, S; Berrueta, LA; Gallo, B; Vicente, F. On line characterization of 58 phenolic compounds in Citrus fruit juices from Spanish cultivars by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection coupled to electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry, *Talanta*, 99 (2012), 213–224. doi:10.1016/j.talanta.2012.05.042.
- [18] Lucci, P; Saurina, J; Núñez, O. Trends in LC-MS and LC-HRMS analysis and characterization of polyphenols in food, *TrAC Trends Anal. Chem.*, 88 (2017), 1–24. doi:10.1016/j.trac.2016.12.006.
- [19] Larrauri, A; Núñez, O; Hernández-Cassou, S; Saurina, J. Determination of Polyphenols in White Wines by Liquid Chromatography: Application to the Characterization of Alella (Catalonia, Spain) Wines Using Chemometric Methods, *J. AOAC Int.*, 100 (2017), 323–329. doi:10.5740/jaoacint.16-0407.
- [20] Filip, M; Vlăsa, M; Copaciu, F; Coman, V. Identification of anthocyanins and anthocyanidins from berry fruits by chromatographic and spectroscopic techniques to establish the juice authenticity from market, *J. Planar Chromatogr. – Mod. TLC.*, 25 (2012), 534–541. doi:10.1556/JPC.25.2012.6.8.
- [21] Ignat, I; Volf, I; Popa, VI. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruit and vegetables, *Food Chem.*, 126 (2011), 1821–1835.
- [22] Tasioula-Margari, M; Tsabolatidou, E. Extraction, Separation, and Identification of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil by HPLC-DAD and HPLC-MS, *Antioxidants*, 4 (2015), 548–562. doi:10.3390/antiox4030548.

- [23] Carini, M; Aldini, G; Furlanetto, S; Stefani, R; Facino, RM. LC coupled to ion-trap MS for the rapid screening and detection of polyphenol antioxidants from *Helichrysum stoechas*, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 24 (2001), 517–526. doi:10.1016/S0731-7085(00)00431-3.
- [24] Rauha, JP; Vuorela, H; Kostianen, R. Effect of eluent on the ionization efficiency of flavonoids by ion spray, atmospheric pressure chemical ionization, and atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, 36 (2001), 1269–1280. doi:10.1002/jms.231.
- [25] Riffault, L; Colas, C; Destandau, E; Pasquier, L; André, P; Elfakir, C. Non-targeted molecular characterisation of a rose flower ethyl acetate extract using ultra-HPLC with atmospheric pressure photoionisation and quadrupole time-of-flight MS/MS, *Phytochem. Anal.*, 26 (2015), 189–201. doi:10.1002/pca.2552.
- [26] Jean-Denis, JB; Pezet, R; Tabacchi, R. Rapid analysis of stilbenes and derivatives from downy mildew-infected grapevine leaves by liquid chromatography-atmospheric pressure photoionisation mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.*, 1112 (2006), 263–268. doi:10.1016/j.chroma.2006.01.060.
- [27] Parets, L; Alechaga, É; Núñez, O; Saurina, J; Hernández-Cassou, S; Puignou, L. Ultrahigh pressure liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometry for the determination of polyphenolic profiles in the characterization and classification of cranberry-based pharmaceutical preparations and natural ext, *Anal. Methods.*, 8 (2016), 4363–4378. doi:10.1039/C6AY00929H.
- [28] Lucci, P; Martins, CPB. Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry in environmental and food analysis, chapter 8, in: O. Núñez, H. Gallart-Ayala, C.P.B. Martins, P. Lucci (Editors), *Fast Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Methods in Food and Environmental Analysis* (2015), Imperial College Press, London, UK, pp. 325-345.

- [29] Motilva, MJ; Serra, A; Macià, A. Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: An overview, *J. Chromatogr. A.*, 1292 (2013), 66–82. doi:10.1016/j.chroma.2013.01.012.
- [30] Hu, C; Xu, G. Mass-spectrometry-based metabolomics analysis for foodomics, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 52 (2013), 36–46. doi:10.1016/j.trac.2013.09.005.
- [31] Ibáñez, C; García-Cañas, V; Valdés, A; Simó, C. Novel MS-based approaches and applications in food metabolomics, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 52 (2013), 100–111. doi:10.1016/j.trac.2013.06.015.
- [32] Saurina, J. Characterization of wines using compositional profiles and chemometrics, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 29 (2010), 234–245. doi:10.1016/j.trac.2009.11.008.
- [33] Saurina, J; Sentellas, S. Determination of phenolic compounds in food matrices: applications to characterization and authentication, chapter 13, in: O. Núñez, H. Gallart-Ayala, C.P.B. Martins, P. Lucci (Editors), *Fast Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Methods in Food and Environmental Analysis* (2015), Imperial College Press, London, UK, pp. 517-547.
- [34] Navarro, M; Núñez, O; Saurina, J; Hernández-Cassou, S; Puignou, L. Characterization of fruit products by capillary zone electrophoresis and liquid chromatography using the compositional profiles of polyphenols: Application to authentication of natural extracts, *J. Agric. Food Chem.*, 62 (2014), 1038–1046. doi:10.1021/jf404776d.
- [35] Pardo-Mates, N; Vera, A; Barbosa, S; Hidalgo-Serrano, M; Núñez, O; Saurina, J; Hernández-Cassou, S; Puignou, L. Characterization, classification and authentication of fruit-based extracts by means of HPLC-UV chromatographic fingerprints, polyphenolic profiles and chemometric methods, *Food Chem.*, 221 (2017), 29–38. doi:10.1016/j.foodchem.2016.10.033.
- [36] Farrés-Cebrián, M; Seró, R; Saurina, J; Núñez, O. HPLC-UV Polyphenolic Profiles in the Classification of Olive Oils and Other Vegetable Oils via Principal Component Analysis, *Separations.*, 3 (2016), 33. doi:10.3390/separations3040033.

- [37] Serrano-Lourido, D; Saurina, J; Hernández-Cassou, S; Checa, A. Classification and characterisation of Spanish red wines according to their appellation of origin based on chromatographic profiles and chemometric data analysis, *Food Chem.*, 135 (2012), 1425–1431. doi:10.1016/j.foodchem.2012.06.010.
- [38] David, L; Hosu, A; Moldovan, B; Cimpoi, C. Evaluation and Authentication of Red Fruits Teas By High Performance Thin-Layer Chromatographic Fingerprinting., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 37 (2014), 1644–1653. doi:10.1080/10826076.2013.803206.
- [39] Reich, E; Schibli. *A. High-Performance Thin Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants*; Thieme: New York-Stuttgart, 2006.
- [40] Bai, L; Guo, S; Liu, Q; Cui, X; Zhang, X; Zhang, L; Yang, X; Hou, M; Ho, CT; Bai, N; Characterization of nine polyphenols in fruits of *Malus pumila* Mill by high-performance liquid chromatography, *J. Food Drug Anal.*, 24 (2015), 293–298. doi:10.1016/j.jfda.2015.10.002.
- [41] Primetta, AK; Jaakola, L; Ayaz, FA; Inceer, H; Riihinen, KR. Anthocyanin fingerprinting for authenticity studies of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.), *Food Control.*, 30 (2013), 662–667. doi:10.1016/j.foodcont.2012.09.009.
- [42] Alonso-Salces, RM; Herrero, C; Barranco, A; Berrueta, LA; Gallo, B; Vicente, F. Classification of apple fruits according to their maturity state by the pattern recognition analysis of their polyphenolic compositions, *Food Chem.*, 93 (2005), 113–123. doi:10.1016/j.foodchem.2004.10.013.
- [43] Mallek-Ayadi, S; Bahloul, N; Kechaou, N. Characterization, phenolic compounds and functional properties of *Cucumis melo* L. peels, *Food Chem.*, 221 (2017), 1691–1697. doi:10.1016/j.foodchem.2016.10.117.
- [44] Galgano, F; Caruso, M; Perretti, G; Favati, F. Authentication of Italian red wines on the basis of the polyphenols and biogenic

- amines, *Eur. Food Res. Technol.*, 232 (2011), 889–897. doi:10.1007/s00217-011-1457-1.
- [45] Liang, Z; Yang, Y; Cheng, L; Zhong, GY. Characterization of polyphenolic metabolites in grape hybrids, *Vitis - J. Grapevine Res.*, 52 (2013), 51–59.
- [46] Alonso-Salces, RM; Herrero, C; Barranco, A; López-Márquez, DM; Berrueta, LA; Gallo, B; Vicente, F. Polyphenolic compositions of Basque natural ciders: A chemometric study, *Food Chem.*, 97 (2006), 438–446. doi:10.1016/j.foodchem.2005.05.022.
- [47] Guo, J; Yue, T; Yuan, Y; Wang, Y. Chemometric Classification of Apple Juices According to Variety and, *J. Agric. Food Chem.*, 61 (2013), 6949–6963.
- [48] Abad-García, B; Berrueta, LA; Garmón-Lobato, S; Urkaregi, A; Gallo, B; Vicente, F. Chemometric characterization of fruit juices from spanish cultivars according to their phenolic compound contents: I. Citrus fruits, *J. Agric. Food Chem.*, 60 (2012), 3635–3644. doi:10.1021/jf300022u.
- [49] Helmja, K; Vaher, M; Gorbatsšova, J; Kaljurand, M. Characterization of bioactive compounds contained in vegetables of the Solanaceae family by capillary electrophoresis, *Proc. Est. Acad. Sci. Chem.*, 56 (2007), 172–186.
- [50] Acunha, T; Ibáñez, C; García-Cañas, V; Simó, C; Cifuentes, A. Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis and Foodomics, *Electrophoresis.*, 37 (2016), 111–141. doi:10.1002/elps.201500291.
- [51] Franquet-Griell, H; Checa, A; Núñez, O; Saurina, J; Hernández-Cassou, S; Puignou, L. Determination of polyphenols in spanish wines by capillary zone electrophoresis. Application to wine characterization by using chemometrics, *J. Agric. Food Chem.*, 60 (2012), 8340–8349. doi:10.1021/jf302078j.
- [52] Núñez, O; Gallart-Ayala, H; Martins, C; Lucci, PBP. Fast Liquid Chromatography– Mass Spectrometry Methods in Food and Environmental Analysis, *J. Chem. Inf. Model.*, 53 (1989), 160. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.

- [53] Núñez, O; Gallart-Ayala, H; Martins, CPB; Lucci, P. New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis, *J. Chromatogr. A.*, 1228 (2012), 298–323. doi:10.1016/j.chroma.2011.10.091.
- [54] Grosso, C; Ferreres, F; Gil-Izquierdo, A; Valentão, P; Sampaio, M; Lima, J; Andrade, PB. *Box-Behnken factorial design to obtain a phenolic-rich extract from the aerial parts of Chelidonium majus L.*, *Talanta.*, 130 (2014), 128–136. doi:10.1016/j.talanta.2014.06.043.
- [55] Alechaga, É; Lucci, P; Núñez, O. Confirmation strategies in food analysis by liquid chromatography-mass spectrometry in: A. Haynes (Editor), *Advances in Food Analysis Research*, Nova Science Publishers, Inc., (2015), New York, USA, pp. 1-35.
- [56] Zălaru, C; Crișan, CC; Călinescu, I; Moldovan, Z; Țârcomnicu, I; Litescu, SC; Tatia, R; Moldovan, L; Boda, D; Iovu, M. Polyphenols in *Coreopsis tinctoria* Nutt. fruits and the plant extracts antioxidant capacity evaluation, *Cent. Eur. J. Chem.*, 12 (2014), 858–867. doi:10.2478/s11532-014-0539-x.
- [57] Puigventós, L; Navarro, M; Alechaga, É; Núñez, O; Saurina, J; Hernández-Cassou, S; Puignou, L. Determination of polyphenolic profiles by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry for the authentication of fruit extracts, *Anal. Bioanal. Chem.*, 407 (2015), 597–608. doi:10.1007/s00216-014-8298-2.
- [58] Ibrahima, RM; El-Halawany, AM; Saleh, DO; El Nagggar, EMB; EL-Shabrawy, AERO; El-Hawary, SS. HPLC-DAD-MS/MS profiling of phenolics from *securigera securidaca* flowers and its anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic activities, *Brazilian J. Pharmacogn.*, 25 (2015) 134–141. doi:10.1016/j.bjp.2015.02.008.
- [59] Saha, A; Pawar, VM; Jayaraman, S. Characterisation of Polyphenols in *Terminalia arjuna* Bark Extract., *Indian J. Pharm. Sci.*, 74 (2012), 339–47. doi:10.4103/0250-474X.107067.
- [60] Song, Y; Jeong, SW; Lee, WS; Park, S; Kim, YH; Kim, GS; Lee, SJ; Jin, JS; Kim, CY; Lee, JE; Ok, SY; Bark, KM; Shin, SC. Determination of polyphenol components of Korean prostrate spurge (*Euphorbia supina*) by using liquid chromatography - Tandem mass



- spectrometry: Overall contribution to antioxidant activity, *J. Anal. Methods Chem.*, 2014, (2014). doi:10.1155/2014/418690.
- [61] De Simón, BF; Sanz, M; Cadahía, E; Martínez, J; Esteruelas, E; Muñoz, AM. Polyphenolic compounds as chemical markers of wine ageing in contact with cherry, chestnut, false acacia, ash and oak wood, *Food Chem.*, 143 (2014), 66–76. doi:10.1016/j.foodchem.2013.07.096.
- [62] Vaclavik, L; Lacina, O; Schreiber, A; Hajslova, J. Authenticity Assessment of Fruit Juices using LC-MS/MS and Metabolomic Data Processing, *Food Environ. Sci.*, (2012), 1–6. doi:6320212-01.
- [63] Cubero-Leon, E; Peñalver, R; Maquet, A. Review on metabolomics for food authentication, *Food Res. Int.*, 60 (2014), 95–107. doi:10.1016/j.foodres.2013.11.041.
- [64] Kuskoski, EM. Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry (CGC-MS) Analysis and Antioxidant Activities of Phenolic and Components of Guarana and Derivatives, *Open Anal. Chem. J.*, 6 (2012), 1–8. doi:10.2174/1874065001206010001.
- [65] Zadernowski, R; Czaplicki, S; Nacz, M. Phenolic acid profiles of mangosteen fruits (*Garcinia mangostana*), *Food Chem.*, 112 (2009), 685–689. doi:10.1016/j.foodchem.2008.06.030.
- [66] Wang, C; Zuo, Y. Ultrasound-assisted hydrolysis and gas chromatography-mass spectrometric determination of phenolic compounds in cranberry products, *Food Chem.*, 128 (2011), 562–568. doi:10.1016/j.foodchem.2011.03.066.
- [67] Tayade, AB; Dhar, P; Sharma, M; Chauhan, RS; Chaurasia, OP; Srivastava, RB. Antioxidant capacities, phenolic Contents, and GC/MS analysis of *rhodiola imbricata* Edgew. Root extracts from Trans-Himalaya, *J. Food Sci.*, 78 (2013), 402–410. doi:10.1111/1750-3841.12054.
- [68] Sagratini, G; Maggi, F; Caprioli, G; Cristalli, G; Ricciutelli, M; Torregiani, E; Vittori, S. Comparative study of aroma profile and phenolic content of Montepulciano monovarietal red wines from the Marches and Abruzzo regions of Italy using HS-SPME-GC-MS and

- HPLC-MS, *Food Chem.*, 132 (2012), 1592–1599. doi:10.1016/j.foodchem.2011.11.108.
- [69] Al-Owaisi, M; Al-Hadiwi, N; Khan, SA. GC-MS analysis, determination of total phenolics, flavonoid content and free radical scavenging activities of various crude extracts of *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori leaves, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 4 (2014), 964–970. doi:10.12980/APJTB.4.201414B295.
- [70] Tayade, AB; Dhar, P; Kumar, J; Sharma, M; Chauhan, RS; Chaurasia, OP; Srivastava, RB. Chemometric Profile of Root Extracts of *Rhodiola imbricata* Edgew. With Hyphenated Gas Chromatography Mass Spectrometric Technique, *PLoS One.*, 8 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0052797.
- [71] Quirantes-Piné, R; Arráez-Román, D; Segura-Carretero, A; Fernández-Gutiérrez, A. Characterization of phenolic and other polar compounds in a lemon verbena extract by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry, *J. Sep. Sci.*, 33 (2010), 2818–2827. doi:10.1002/jssc.201000228.
- [72] Antignac, JP; Courant, F; Pinel, G; Bichon, E; Monteau, F; Elliott, C; Le Bizec, B. Mass spectrometry-based metabolomics applied to the chemical safety of food, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 30 (2011), 292–301. doi:10.1016/j.trac.2010.11.003.
- [73] Cubero-Leon, E; Peñalver, R; Maquet, A. Review on metabolomics for food authentication, *Food Res. Int.*, 60 (2014), 95–107. doi:10.1016/j.foodres.2013.11.041.
- [74] Rubert, J; Zachariasova, M; Hajslova, J. Advances in high-resolution mass spectrometry based on metabolomics studies for food – a review, *Food Addit. Contam. Part A.*, 32 (2015), 1685–1708. doi:10.1080/19440049.2015.1084539.
- [75] Roullier-Gall, C; Witting, M; Gougeon, RD; Schmitt-Kopplin, P. High precision mass measurements for wine metabolomics., *Front. Chem.*, 2 (2014), 102. doi:10.3389/fchem.2014.00102.
- [76] Rubert, J; Lacina, O; Fauhl-Hassek, C; Hajslova, J. Metabolic fingerprinting based on high-resolution tandem mass spectrometry: A

- reliable tool for wine authentication?, *Anal. Bioanal. Chem.*, 406 (2014), 6791–6803. doi:10.1007/s00216-014-7864-y.
- [77] Delcambre, A; Saucier, C. High-throughput oenomics: Shotgun polyphenomics of wines, *Anal. Chem.*, 85 (2013), 9736–9741. doi:10.1021/ac4021402.
- [78] Arráez-Román, D; Fu, S; Sawalha, SMS; Segura-Carretero, A; Fernández-Gutiérrez, A. HPLC/CE-ESI-TOF-MS methods for the characterization of polyphenols in almond-skin extracts, *Electrophoresis.*, 31 (2010), 2289–2296. doi:10.1002/elps.200900679.
- [79] Wu, T; Lv, H; Wang, F; Wang, Y. Characterization of Polyphenols from *Lycium ruthenicum* Fruit by UPLC-Q-TOF/MSE and Their Antioxidant Activity in Caco-2 Cells, *J. Agric. Food Chem.*, 64 (2016), 2280–2288. doi:10.1021/acs.jafc.6b00035.
- [80] Vaclavik, L; Schreiber, A; Lacina, O; Cajka, T; Hajslova, J. Liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolomics for authenticity assessment of fruit juices, *Metabolomics.*, 8 (2012), 793–803. doi:10.1007/s11306-011-0371-7.
- [81] Kolniak-Ostek, J. Identification and quantification of polyphenolic compounds in ten pear cultivars by UPLC-PDA-Q/TOF-MS, *J. Food Compos. Anal.*, 49 (2016), 65–77. doi:10.1016/j.jfca.2016.04.004.
- [82] Jandrić, Z; Cannavan, A. An investigative study on differentiation of citrus fruit/fruit juices by UPLC-QToF MS and chemometrics, *Food Control.*, 72 (2017), 173–180. doi:10.1016/j.foodcont.2015.12.031.
- [83] Jandrić, Z; Islam, M; Singh, DK; Cannavan, A. Authentication of Indian citrus fruit/fruit juices by untargeted and targeted metabolomics, *Food Control.*, 72 (2017), 181–188. doi:10.1016/j.foodcont.2015.10.044.
- [84] Jandrić, Z; Roberts, D; Rathor, MN; Abraham, JA; Islam, M; Cannavan, A. Assessment of fruit juice authenticity using UPLC-QToF MS: A metabolomics approach, *Food Chem.*, 148 (2014), 7–17. doi:10.1016/j.foodchem.2013.10.014.
- [85] Guo, J; Yuan, Y; Dou, P; Yue, T. Multivariate statistical analysis of the polyphenolic constituents in kiwifruit juices to trace fruit varieties

- and geographical origins, *Food Chem.*, 232 (2017), 552–559. doi:10.1016/j.foodchem.2017.04.037.
- [86] Ricci, A; Parpinello, GP; Palma, AS; Tesli??, N; Brillì, C; Pizzi, A; Versari, A. Analytical profiling of food-grade extracts from grape (*Vitis vinifera* sp.) seeds and skins, green tea (*Camellia sinensis*) leaves and Limousin oak (*Quercus robur*) heartwood using MALDI-TOF-MS, ICP-MS and spectrophotometric methods, *J. Food Compos. Anal.*, 59 (2017), 95–104. doi:10.1016/j.jfca.2017.01.014.
- [87] Carrasco-Pancorbo, A; Neusüß, C; Pelsing, M; Segura-Carretero, A; Fernandez Gutiérrez, A. CE- and HPLC-TOF-MS for the characterization of phenolic compounds in olive oil, *Electrophoresis.*, 28 (2007), 806–821. doi:10.1002/elps.200600382.
- [88] García-Villalba, R; Carrasco-Pancorbo, A; Oliveras-Ferraros, C; Vázquez-Martín, A; Menéndez, JA; Segura-Carretero, A; Fernández-Gutiérrez, A. Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 51 (2010), 416–429. doi:10.1016/j.jpba.2009.06.021.
- [89] Dugo, P; Cacciola, F; Donato, P; Jacques, RA; Caramão, EB; Mondello, L. High efficiency liquid chromatography techniques coupled to mass spectrometry for the characterization of mate extracts, *J. Chromatogr. A.*, 1216 (2009), 7213–7221. doi:10.1016/j.chroma.2009.08.030.
- [90] Gong, L; Haiyu, X; Wang, L; Xiaojie, Y; Huijun, Y; Songsong, W; Cheng, L; Ma, X; Gao, S; Liang, R; Yang, H. Identification and evaluation of the chemical similarity of Yindan xinnaotong samples by ultra high performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry fingerprinting, *J. Sep. Sci.* 39 (2016), 611–622. doi:10.1002/jssc.201500836.
- [91] Ramirez, JE; Zambrano, R; Sepúlveda, B; Kennelly, EJ; Simirgiotis, MJ. Anthocyanins and antioxidant capacities of six Chilean berries by HPLC-HR-ESI-ToF-MS, *Food Chem.*, 176 (2015), 106–114. doi:10.1016/j.foodchem.2014.12.039.

- [92] Plumb, RS; Johnson, KA; Rainville, P; Smith, BW; Wilson, ID; Castro-Perez, JM; Nicholson, JK. UPLC/MSE; a new approach for generating molecular fragment information for biomarker structure elucidation., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 20 (2006), 1989-1994.
- [93] Makarov, A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis, *Anal. Chem.*, 72 (2000), 1156–1162. doi:10.1021/ac991131p.
- [94] Makarov, A; Denisov, E; Lange, O; Horning, S. Dynamic Range of Mass Accuracy in LTQ Orbitrap Hybrid Mass Spectrometer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 17 (2006), 977–982. doi:10.1016/j.jasms.2006.03.006.
- [95] Makarov, A; Denisov, E; Kholomeev, A; Balschun, W; Lange, O; Strupat, K; Horning, S. Performance Evaluation of a Hybrid Linear Ion Trap/Orbitrap Mass Spectrometer, *Anal. Chem.*, 78 (2006), 2113–2120. doi:10.1021/ac0518811.
- [96] Rockenbach, II; Jungfer, E; Ritter, C; Santiago-Schübel, B; Thiele, B; Fett, R; Galensa, R. Characterization of flavan-3-ols in seeds of grape pomace by CE, HPLC-DAD-MSn and LC-ESI-FTICR-MS, *Food Res. Int.*, 48 (2012), 848–855. doi:10.1016/j.foodres.2012.07.001.
- [97] Gašić, UM; Natić, MM; Mišić, DM; Lušić, DV; Milojković-Opsenica, DM; Tešić, ŽL; Lušić, D. Chemical markers for the authentication of unifloral *Salvia officinalis* L. honey, *J. Food Compos. Anal.*, 44 (2015), 128–138. doi:10.1016/j.jfca.2015.08.008.
- [98] Akšić, MMF; Dabić, DC; Gašić, UM; Zec, GN; Vulić, TB; Tešić, ZL; Natić, MM. Polyphenolic Profile of Pear Leaves with Different Resistance to Pear Psylla (*Cacopsylla pyri*), *J. Agric. Food Chem.*, 63 (2015), 7476–7486. doi:10.1021/acs.jafc.5b03394.
- [99] Vallverdú-Queralt, A; Jáuregui, O; Medina-Remón, A; Andrés-Lacueva, C; Lamuela-Raventós, RM. Improved characterization of tomato polyphenols using liquid chromatography/electrospray ionization liner ion trap quadrupole Orbitrap mass spectrometry and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass

- spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 24 (2010), 2986–2992. doi:10.1002/rcm.4731.
- [100] Mudric, SZ; Gašić, UM; Dramicanin, AM; Ciric, IZ; Milojkovic-Opsenica, DM; Popovic-Dordevic, JB; Momirovic, NM; Tešić, ZL. The polyphenolics and carbohydrates as indicators of botanical and geographical origin of Serbian autochthonous clones of red spice paprika, *Food Chem.*, 217 (2017), 705–715. doi:10.1016/j.foodchem.2016.09.038.
- [101] Vallverdú-Queralt, A; Regueiro, J; Martínez-Huélamo, M; Rinaldi Alvarenga, JF; Leal, LN; Lamuela-Raventos, RM. A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: Rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay, *Food Chem.*, 154 (2014), 299–307. doi:10.1016/j.foodchem.2013.12.106.
- [102] Quifer-Rada, P; Vallverdú-Queralt, A; Martínez-Huélamo, M; Chiva-Blanch, G; Jáuregui, O; Estruch, R; Lamuela-Raventós, R. A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS), *Food Chem.*, 169 (2015), 336–343. doi:10.1016/j.foodchem.2014.07.154.
- [103] Vallverdú-Queralt, A; Boix, N; Piqué, E; Gómez-Catalan, J; Medina-Rejon, A; Sasot, G; Mercader-Martí, M; Llobet, JM; Lamuela-Raventos, RM. Identification of phenolic compounds in red wine extract samples and zebrafish embryos by HPLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS, *Food Chem.*, 181 (2015), 146–151. doi:10.1016/j.foodchem.2015.02.098.

### 1.2.2 Métodos no dirigidos

En la actualidad, la gran cantidad de compuestos ilegales, así como las diferentes formas de adulterar un producto natural, hace que en ocasiones sea difícil identificar aquellos compuestos que se deben analizar. En este contexto, los métodos no dirigidos abarcan la complejidad de la autenticación moderna de productos naturales [26]. El enfoque principal de este tipo de estrategia es completamente diferente al anteriormente mencionado. Si bien en los métodos dirigidos se seleccionan una serie de marcadores primarios o secundarios, en este tipo de estrategia lo que se pretende es detectar tantos compuestos como sea posible. Es por este motivo que los principales analizadores para realizar este tipo de análisis son los de alta resolución, como el TOF y el Orbitrab, así como sus configuraciones híbridas, ya que presentan una alta sensibilidad, tienen un alto poder de resolución (de más de 100000FWHM) y una determinación de la relación masa/carga muy exacta (<5ppm), capaz de distinguir entre compuestos isobáricos en algunos casos. Además, la adquisición de los datos en modo de barrido completo o “full scan” de alta resolución, permite la combinación simultánea del análisis dirigido con el no dirigido, la identificación de nuevos compuestos y el análisis de datos retrospectivo [53]. Otro aspecto importante de este tipo de estrategia, que se consigue gracias a este tipo de instrumentación, es que permite enfocar la autenticación de un producto desde varias perspectivas en un solo análisis. La huella metabolómica permite no solo detectar el origen o el tipo de materia prima empleada, sino que también detecta compuestos no etiquetados, aditivos no autorizados o el uso de procesos tecnológicos prohibidos entre otros. Todo dependerá del enfoque que se considere oportuno para resolver el problema de interés [49].

Una vez elegido el enfoque de mayor interés, es importante que la preparación de la muestra sea lo más simple e inespecífica posible, con la finalidad de evitar una pérdida de compuestos, acompañada de la pérdida de información [36]. Normalmente, la muestra se extrae con agua y un porcentaje de disolvente orgánico, centrifugando y sonicando. Un ejemplo sería el trabajo realizado por Rubert y col. [65] quienes evaluaron el uso de ultrasonidos, así como diferentes disolventes de extracción como agua, metanol, acetonitrilo, etanol, metanol/agua (50/50, v/v), acetonitrilo/agua (75/25, v/v) y etanol/agua (70/30, v/v) en muestras de azafrán. Determinaron que el mayor número de metabolitos se obtuvo con metanol/agua (50/50, v/v) y etanol/agua (70/30, v/v) al sonicar la muestra. Además, concluyeron que la adición de agua fue crucial en términos de reproducibilidad y número de compuestos extraídos.

Los métodos no dirigidos basados en la obtención de señales analíticas autenticadoras a modo de huella digital (*fingerprints*), a menudo son cualitativos y se basan en la construcción y el uso de una base de datos adecuada. Esta base de datos se utiliza para comparar la huella metabolómica *fingerprint* de la muestra obtenida con la de

las muestras de referencia auténticas disponibles en la base de datos; eso sí, debe aplicarse el mismo método para cada caso. Cuando la muestra de referencia no está disponible en la base de datos, algo que suele suceder a menudo, se puede usar el análisis no dirigido para comparar entre las muestras objeto de estudio y las muestras de referencias. Este enfoque se suele utilizar porque la gran cantidad de compuestos no especificados o puntos de datos limitan la posibilidad de similitudes aleatorias entre diferentes muestras [36].

En cuanto a la adquisición de los datos, estos pueden obtenerse en modo positivo, en modo negativo o aplicar ambos. En este tipo de estrategia, lo importante es detectar el mayor número de señales posibles, por lo que en ocasiones, aplicar tanto el modo positivo como el modo negativo y unir toda la información en una sola matriz, permite resolver problemas de autenticación complejos. Además, los instrumentos HRMS como el QOrbitrap, permiten aislar de forma automática aquellas señales más abundantes, con la finalidad de que sean fragmentadas para una futura identificación, en el caso de que se considere oportuno.

No obstante, uno de los puntos más importantes a tener en cuenta es el preprocesamiento de datos. Una vez obtenidos los datos, es importante contar con un software que ayude a obtener la matriz de trabajo. Esta matriz está constituida por el tiempo de retención, los valores  $m/z$  y el área o señal de cada pico detectado. En este software, hay que fijar algunos datos como la tolerancia de masa para la alineación de picos, el umbral de intensidad total, el desplazamiento máximo de picos y el umbral S/N. En ocasiones, estos parámetros eliminan las interferencias químicas de la matriz, pero deben ajustarse adecuadamente para no eliminar señales que puedan ser relevantes [24].

Sin embargo, según el tipo de estudio que se está realizando, es necesario reducir el número de señales para simplificar la matriz obtenida. En estos casos, se pueden adoptar medidas como la eliminación de señales que no se detectan en un porcentaje mínimo de las muestras o la eliminación de aquellas señales que no se observan en los controles de calidad, que generalmente consisten en una mezcla formada por un volumen constante de todas las muestras analizadas [24].

Una vez obtenida la matriz de datos, debe evaluarse utilizando modelos estadísticos multivariados, ya sean supervisados o no supervisados, que finalmente permita autenticar el producto objeto de estudio [38]. Sin embargo, la gran diversidad de modelos quimiométricos, unido al hecho de que este tipo de estrategia está en sus inicios en el campo alimentario, hace que aún no exista un consenso claro de cómo validar estos procedimientos para su uso como rutina en controles de calidad. En este sentido varios trabajos han sido publicados con la finalidad de resolver este problema e incluso la USP (USP Pharmacopeial Convention., 2016, pp.2053–2067) ha propuesto

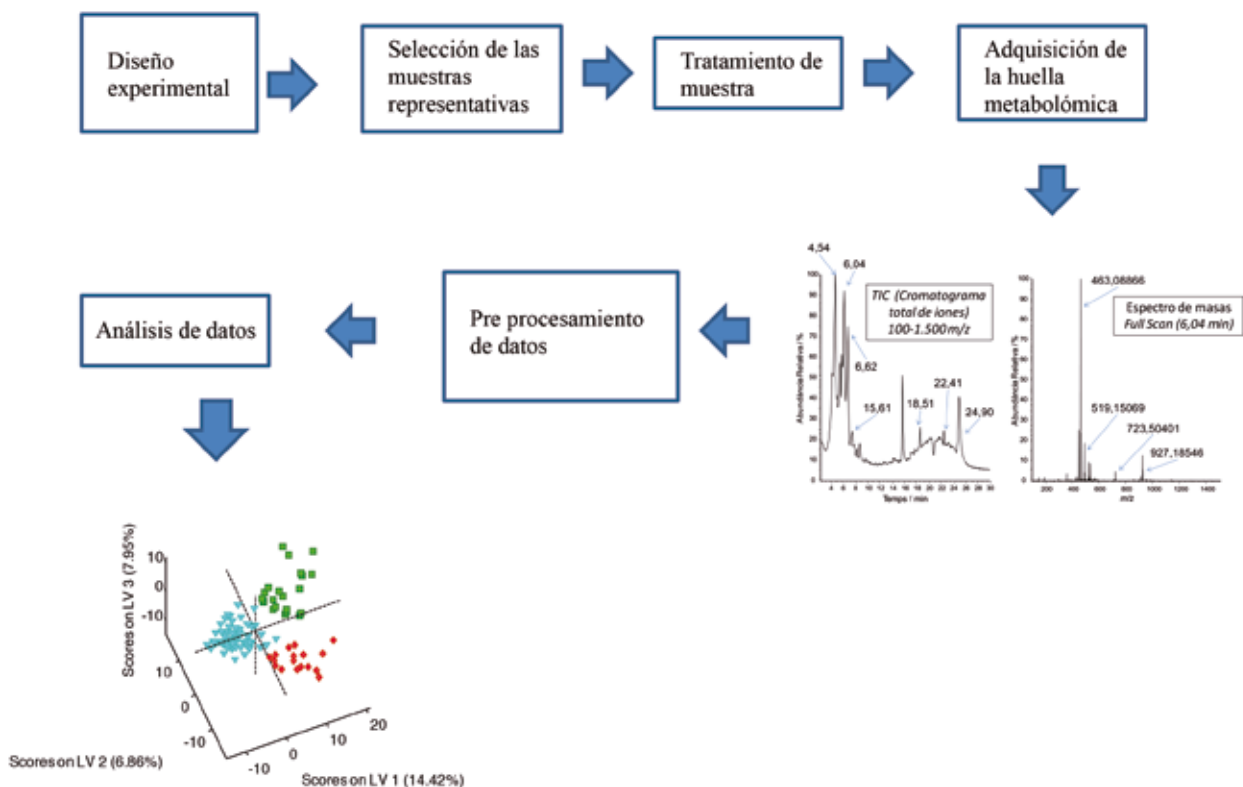


una guía para intentar armonizar la validación del método. Sin embargo, esta guía solo se puede tomar como un inicio, ya que está enfocada a otra técnica de análisis diferente (la guía es genética). No obstante, es importante remarcar su importancia de cara al futuro, ya que puede ser utilizada como punto de partida para futuras validaciones en los métodos no dirigidos [38,53,66,67].

En este tipo de estrategia no es necesario identificar los compuestos que son más relevantes para la autenticación del producto. No obstante, esta identificación es importante cuando se deben tomar medidas reglamentarias basadas en los resultados. En un tribunal de justicia, la identificación de la estructura química de un marcador primario o secundario es un activo importante en el proceso judicial [26]. Sin embargo, hay que tener presente que según el procedimiento empleado se pueden obtener diferentes biomarcadores. Los biomarcadores obtenidos dependen en gran medida del enfoque experimental global empleado, incluido el tratamiento de la muestra, la separación y la detección, así como la instrumentación específica utilizada [24]. Un ejemplo es el trabajo realizado por Díaz y col. [68], que compararon dos plataformas que diferían en columnas, fases móviles, gradientes, cromatógrafos, espectrómetros de masas (Orbitrap [Plataforma # 1] y Q-TOF [Plataforma # 2]), protocolos de procesamiento de datos y selección de marcadores, en muestras de vino con DOP de diferentes regiones. A nivel de características, se obtuvieron buenos modelos mediante el análisis discriminante por regresión de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA) para ambas plataformas, clasificando el 100% de las muestras en ambas plataformas. Sin embargo, los resultados mostraron que, a pesar de la capacidad de ambas plataformas para distinguir las clases de vino, se produjo una fuerte divergencia entre los metabolitos identificados involucrados en la discriminación. Se identificaron un total de 9 y 8 compuestos característicos para las Plataformas # 1 y # 2 respectivamente, aunque ninguno de ellos era común. Los modelos PCA creados utilizando solo los compuestos identificados dieron como resultado una separación clara cuando se empleó el Q-TOF, pero con el Q-Orbitrap, los vinos de la DOP Ribera del Duero y la DOP Rioja no estaban completamente separados. Cuando se consideraron los resultados obtenidos utilizando ambas plataformas comparadas, el modelo de PCA resultante realizado, incluyendo solo los compuestos identificados comunes para ambas plataformas, mostró un alto grado de similitud entre ellas.

Este trabajo muestra las complicaciones que pueden surgir en la comparación de plataformas metabolómicas no dirigidas, incluso cuando se utilizan enfoques centrados en los metabolitos identificados.

En la figura 1.1 se puede observar un esquema representativo del procedimiento a seguir para aplicar este tipo de estrategia.



**Fig. 1.1** Procedimiento de análisis para métodos no dirigidos.

Por último, en la Tabla 1.2 se refleja una recopilación de trabajos realizados hasta el momento que emplean métodos de análisis no dirigidos para resolver diferentes problemas de autenticidad.

**Tabla 1.2** Métodos no dirigidos que utilizan cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas para la autenticación de productos naturales.

Producto	Propósito del análisis	Separación cromatográfica y espectrometría de masas	Año	Método Quimiométrico	Ref.
Orégano	Adulteraciones	Columna Acquity HSS T3 (100x21mm, 1.8µm) Gradiente de elución (0.4mL·min <sup>-1</sup> ): A) agua con 0.1% ácido fórmico B) metanol con 0.1% ácido fórmico H-ESI (+/-) Q-TOF (modo Full Scan 50-1200m/z)	2016	PCA y OPLS-DA	[69]

Producto	Propósito del análisis	Separación cromatográfica y espectrometría de masas	Año	Método Quimiométrico	Ref.
Carne ovina	Color de la carne (envejecimiento, condiciones de almacenamiento y tiempos de visualización)	Columna ZIC p-HILIC (100x2.1mm, 5µm) Gradiente de elución (0.25mL·min <sup>-1</sup> ): A) acetonitrilo 0.1% ácido fórmico B) agua con 16mM Formiato de amonio ESI (+/-) Orbitrap (modo Full Scan 55-1100m/z)	2016	Fold change, t-test y PCA	[70]
Zumo de tomate y mandarina	Caracterización	Columna C30 (250 x 4.6mm, 3µm) Gradiente de elución (1.3mL·min <sup>-1</sup> ): A) metanol: tert-butil éter de metilo: agua con 2% acetato de amonio 60:35:5 (v/v/v) B) tert-butil éter de metilo: metanol: agua con 2% acetato de amonio (v/v/v) APCI (+) Q-TOF (modo Full Scan 100-1700m/z)	2017	Fold change y test t	[71]
Café	Caracterización	Columna Ascentis Express C18 (150x2.1mm, 2.7µm) Gradiente de elución (0.2mL·min <sup>-1</sup> ): A) agua con 0.1% ácido fórmico B) acetonitrilo con 0.1% ácido fórmico H-ESI (+/-) Q-TOF (modo Full Scan 100-1700m/z)	2018	PCA y PLS-DA	[72]
Tomate	Orgánicos y convencionales	Columna Phenomenex Luna C8 (100x2mm, 3µm) Gradiente de elución (0.35mL·min <sup>-1</sup> ): A) agua: metanol 98:2 (v/v) B) metanol: agua 98:2 (v/v) H-ESI (+) Q-Orbitrap modo Full Scan 74-1100m/z)	2018	PCA	[73]
Carne	Adulteración de carne de Ternera y cerdo	Columna Hypersil Gold C18 (100x2.1mm, 1.9µm) Gradiente de elución (0.4mL·min <sup>-1</sup> ): A) agua B) metanol ESI (+) LTQ-Orbitrap (modo Full Scan 50-2000m/z)	2016	PCA y PLS-DA	[74]
Fruta cítrica y zumo de fruta	Origen y Tipología de los frutos	Columna Acquity UPLC BEH C18 (100x2.1mm, 1.7µm) Gradiente de elución (0.4mL·min <sup>-1</sup> ): A) agua con 10mM acetato de amonio B) acetonitrilo H-ESI (+) Q-TOF (modo Full Scan 50-1200m/z)	2017	PCA, PLS-DA y SIMCA	[75]

Producto	Propósito del análisis	Separación cromatográfica y espectrometría de masas	Año	Método Quimiométrico	Ref.
Fresa salvaje	Origen geográfico	Columna XSelect CSH C18 (150x2.1mm, 1.6µm) Gradiente de elución (0.2mL·min <sup>-1</sup> ): A) agua con 0.1% ácido fórmico B) acetonitrilo: agua 80:20 (v/v) con 0.1% ácido fórmico H-ESI (+/-) LTQ-Orbitrap (modo Full Scan 200-1600m/z)	2016	PCA	[76]
Huevos	Frescura del producto	Columna Phenomenex Luna Omega C18 (150x2.1mm, 3.5µm) Gradiente de elución (0.3mL·min <sup>-1</sup> ): A) agua con 0.1% ácido fórmico and 5mM Formato de amonio B) metanol con 0.1% ácido fórmico and 5mM formato de amonio H-ESI (+/-) Q-Orbitrap (modo Full Scan 75-1000m/z)	2018	PCA	[77]
Queso Parmigiano Reggiano	Autenticación del producto (materia prima, origen geográfico y proceso de producción)	Columna Kinetex XB C18 (100x3mm, 2.6µm) Gradiente de elución (0.5mL·min <sup>-1</sup> ): A) water with 0.2% formic acid B) acetonitrile with 0.2% formic acid H-ESI (-) Orbitrap (modo Full Scan 50-900 m/z)	2017	PCA	[78]
Bayas de mirto	Origen geográfico y tipo de cultivo	Columna XSelect CSH C18 (150x2.1mm, 3.5µm) Gradiente de elución (0.2mL·min <sup>-1</sup> ): A) agua con 0.1% ácido fórmico B) acetonitrilo con 0.1% ácido fórmico ESI (-) LTQ-Orbitrap (modo Full Scan mode 200-1600m/z)	2017	PCA	[79]
Azafrán	Autenticación, origen geográfico e identificación de biomarcadores	Columna Ascentis Express C18 (100x2.1mm, 2.7µm) Gradiente de elución (0.4mL·min <sup>-1</sup> ): A) agua con 0.1% ácido fórmico or 10mM Formiato de amonio B) acetonitrilo con 0.1% ácido fórmico or 10mM Formiato de amonio H-ESI (+/-) Q-TOF modo Full Scan 100-1700m/z)	2015	PCA, PLS-DA y OPLS-DA	[80]
Huevos	Periodo de almacenamiento	Columna Thermo Scientific Accucore C18 (100x2.1mm, 2.6µm) Gradiente de elución (0.3mL·min <sup>-1</sup> ): A) agua con 0.1% ácido fórmico and 5mM acetato de amonio B) metanol con 0.1% ácido fórmico and 5mM acetato de amonio H-ESI (+) Q-TOF (modo Full Scan 100-1000m/z)	2018	PCA	[81]

Producto	Propósito del análisis	Separación cromatográfica y espectrometría de masas	Año	Método Quimiométrico	Ref.
Aceite de oliva	Clasificación de aceite de oliva	Columna Acclaim RSLC C18 (100x2.1mm, 2.2µm) Gradiente de elución (0.2mL·min <sup>-1</sup> ): A) agua: metanol 90:10 (v/v) con 5mM acetato de amonio B) metanol con 5mM acetato de amonio H-ESI (-) Q-TOF (modo Full Scan 50-1000m/z)	2018	PCA	[82]
Azafrán	Autenticación DOP	Columna Phenomenex Kinetex C18 (100x2.1mm, 1.7µm) Gradient elution (0.4 - 0.6mL·min <sup>-1</sup> ): A) agua con 5mM formiato o acetato de amonio B) metanol H-ESI (+/-) Q-TOF (modo Full Scan 100-1200m/z)	2016	PCA y OPLS-DA	[65]
Cerveza	Caracterización y clasificación según el procedimiento de elaboración	Columna Hypersil Gold aQ (100x2.1mm, 1.9µm) Gradiente de elución (0.6mL·min <sup>-1</sup> ): A) acetonitrilo 0.1% ácido fórmico B) agua con 0.1% ácido fórmico H-ESI (+/-) LTQ-Orbitrap (modo Full Scan 50-1000m/z)	2016	PCA y PLS-DA	[83]
Nueces de tigre	Autenticación del Origen geográfico (DOP)	Columna BEH C18 (100x2.1mm, 1.7µm) Gradiente de elución (0.4 - 0.5mL·min <sup>-1</sup> ): A) agua: metanol 95:5 (v/v) con 0.1% ácido fórmico y 5mM formiato de amonio B) 2-propanol: metanol: agua 65:30:5 (v/v/v) con 0.1% ácido fórmico and 5mM formiato de amonio H-ESI (+/-) Q-TOF (modo Full Scan 100-1200m/z)	2018	PCA y OPLS-DA	[84]
Té	Origen geográfico	Columna Hypersil Gold C18 (100x2.1mm, 1.9µm) Gradiente de elución (0.2mL·min <sup>-1</sup> ): A) agua con 0.1% ácido fórmico B) acetonitrilo H-ESI (+/-) Q-Orbitrap (modo Full Scan 100-1500m/z)	2018	PCA, HCA y PLS-DA	[85]
Musgo de Islandia	Autenticación	Columna BEH C18 (100x2.1mm, 1.7µm) Gradiente de elución (0.4mL·min <sup>-1</sup> ): A) agua con 0.1% ácido fórmico B) acetonitrilo con 0.1% ácido fórmico ESI (-) Q-TOF (modo Full Scan 50-1600m/z)	2018	PCA	[86]

Producto	Propósito del análisis	Separación cromatográfica y espectrometría de masas	Año	Método Quimiométrico	Ref.
Acori Tatarinowii Rhizoma	Caracterización y autenticación	Columna XR-ODS2 C18 (75mmx2.0mm, 2.3µm) Gradiente de elución (0.2mL·min <sup>-1</sup> ): A) agua con 0.1% ácido fórmico B) acetonitrilo ESI (-) Q-Orbitrap (modo Full Scan 120-1800m/z)	2019	PLS-DA	[87]
Té blanco, verde y negro	Caracterización y clasificación	Columna Zorbax Eclipse Plus C18 (100x2.1mm, 1.8µm) Gradiente de elución (0.4mL·min <sup>-1</sup> ): A) agua con 0.1% ácido fórmico B) metanol ESI (+) Q-TOF (modo Full Scan 100-1100m/z)	2017	PCA	[88]
Té negro	Clasificación según su origen, variedad y procesamiento	Columna Varian Amida-C18 (250x3.0mm, 5µm) Gradiente de elución (0.5mL·min <sup>-1</sup> ): A) agua con 0.005% ácido fórmico B) acetonitrilo ESI (-) Q-TOF (modo Full Scan 50-1000m/z)	2018	PCA, HCA, PLS-DA y ANOVA	[89]
Arroz	Discriminación entre orgánico y convencional	Columna BEH C18 (150mmx2.1mm, 1.7µm) Gradiente de elución (0.3 mL·min <sup>-1</sup> ): A) agua con 0.1% ácido fórmico B) acetonitrilo con 0.1% ácido fórmico ESI (+) Q-TOF (modo Full Scan 50-2000m/z)	2018	PCA, HCA, PLS-DA y OPLS-DA	[90]
Zumo de frutas de arándanos	Autenticación	Columna Phenomenex C18 (100mmx2.1mm, 2.6µm) Gradiente de elución (0.3mL·min <sup>-1</sup> ): A) agua con 0.1% ácido fórmico B) metanol con 0.1% ácido fórmico ESI (+/-) Q-TOF (modo Full Scan 50-1000m/z)	2018	PCA-DA y OPLS-DA	[59]
Polygoni Multiflori Radix (PMR)	Origen geográfico	Columna BEH shield RP18 (100mmx2.1mm, 1.7µm) Gradiente de elución (0.3mL·min <sup>-1</sup> ): A) agua con 0.1% ácido fórmico B) metanol con 0.1% ácido fórmico ESI (-) Q-TOF (modo Full Scan 100-1000m/z)	2016	PCA	[91]

Como se puede observar en la Tabla 2.2, para llevar a cabo este tipo de estrategia de nuevo se utiliza la separación en fase invertida con columnas C18, aunque hay métodos que utilizan una columna HSS T3, que proporciona una retención compensada entre moléculas polares y no polares, o columnas HILIC cuya principal ventaja es la fuerte retención de compuestos polares hidrofílicos, que no son retenidos en condiciones normales de fase inversa, sin la necesidad de aditivos de par iónico en la fase móvil. Un ejemplo de su aplicación es el trabajo realizado por Subbaraj y col. [70] que utilizan columnas HILIC para evaluar la estabilidad de la carne de ovino.

La fase móvil más utilizada es agua con acetonitrilo o agua con metanol acidificada con ácido fórmico aplicadas generalmente con un gradiente lineal. La fuente de ionización suele ser ESI, por su versatilidad para la mayoría de compuestos, acoplada a un analizador TOF o un Orbitrap. Un ejemplo sería el trabajo realizado por Zhang y col. [59] quienes utilizan como disolvente A, agua con 0.1% de ácido fórmico, y como disolvente B, metanol con 0.1% de ácido fórmico utilizando como fuente de ionización ESI en modo positivo y negativo, y como analizador un Q-TOF en modo full scan detectando los compuestos entre 100-1000m/z. Aplican un gradiente compuesto por una primera parte isocrática de 2 minutos con un 2% de disolvente B. Posteriormente aplican un gradiente lineal del minuto 2 al 14, en el que el porcentaje de eluyente B pasa del 2% al 95% y lo mantienen durante 3 minutos con la finalidad de que eluyan todos los compuestos. Finalmente, del minuto 17 al 17.1 pasan a las condiciones iniciales, manteniéndolas hasta el minuto 20 con la finalidad de equilibrar la columna para la siguiente inyección. Este tipo de gradiente suele denominarse “universal” y es típica su aplicación en los métodos no dirigidos donde se desconocen los compuestos a determinar.





# CAPÍTULO 2

## ARÁNDANO ROJO AMERICANO



# ARÁNDANO ROJO AMERICANO

## 2.1. *Vaccinium macrocarpon*

Los estudios realizados en este capítulo se centran en el *Vaccinium macrocarpon*, conocido con el nombre popular de arándano rojo, cuyas bayasson muy apreciadas y consumidas, y han recibido una gran atención debido a sus efectos beneficiosos para la salud humana.

El arándano es una planta con flores (Angiospermas) que pertenece al género *Vaccinium* L. de la familia de las Ericáceas. Es un género morfológicamente diverso de plantas leñosas que incluye pequeños árboles, arbustos o lianas, terrestres o epífitas. La mayoría de las especies del género producen frutos (bayas) comestibles de color negro, azulado, azul-negrusco o rojo. En alusión a este tipo de fruto, recientemente se ha dicho que el término de *Vaccinium* puede venir de *bacca* que significa baya [92-94].

La taxonomía del género *Vaccinium* L. es compleja y sujeta a debate, pero actualmente se considera que está constituido por unas 500 especies, con una amplia distribución geográfica [93]. De las numerosas especies que presenta el género son muy pocas las que tienen interés económico. Entre las especies de arándanos que presentan bayas de color azulado, conocidas en la terminología anglosajona como blubberies, destacan *Vaccinium angustifolium* Aiton, *V. ashei* Reade, *V. corymbosum* L., *V. myrtilloides* Michx. y *V. uliginosum* L. Mientras que, entre las especies de arándanos que presentan bayas de color rojo, conocidas en la terminología anglosajona como cranberries, destacan *V. oxycoccos* L. y *V. macrocarpon* Aiton. Así mismo, a *V. vitis-idaea* L. se la conoce con el nombre de lingonberry, y a *V. myrtillus* L. como bilberry. A estas especies hay que añadir los híbridos, ya sea entre especies o entre cultivares de una misma especie [95,96].



**Fig.2.1.** Aspecto de las flores de *V. macrocarpon* [97]

Bajo el nombre de craneberry (baya de grulla), después cranberry, los primeros colonos americanos denominaron a aquellos frutos rojos que desarrollaban unas pequeñas flores rosadas cuya forma recordaba el cuello, cabeza y pico de una grulla (Figura 2.1).

A este grupo pertenecen cuatro especies: *V. microcarpum* (Turcz. ex Rupr.) Schmalh., *V. erythrocarpum* (Michx.) Pers., *V. macrocarpon* Aiton y *V. oxycoccos* L., siendo las dos primeras raramente cultivadas. De estas cuatro especies, sólo *V. macrocarpon* es

exclusiva del continente americano, mientras que *V. oxycoccos* se distribuye por el norte de Europa, norte de Asia y norte de Norte América, aunque a esta especie se la conoce, entre otros, con los nombres populares de arándano europeo o European cranberry [98,99].

*Vaccinium macrocarpon* es conocido, entre otros, con los nombres populares de arándano rojo o arándano rojo americano, large cranberry o American cranberry. Esta especie es endémica de América del Norte y está presente en el noreste de Estados Unidos y en el sureste de Canadá, donde crece de manera natural en ambientes pantanosos, turberas, etc. [92]. Los pueblos indígenas de estas áreas los recolectaban, junto con otras bayas similares del género, y los usaban para una variedad de finalidades como conservante de carne y pescado, para teñir telas, y medicinalmente para tratar las infecciones de las vías urinarias, para tratar diversos problemas del sistema digestivo, del hígado, riñones y, bajo la forma de cataplasma, para el tratamiento de las heridas. Sin embargo, la principal utilización de este arándano era en la preparación del pemican, alimento de larga conservación a base de viandas concentradas y secas [100] [101]. Sin embargo, hay que señalar que el pemican presenta muchas variaciones, ya que en su elaboración, las bayas podían proceder de diversas plantas, no sólo procedentes del género *Vaccinium*, al igual que el tipo de carne utilizada, dependiendo de los tipos de animales disponibles en la zona [101].

En Estados Unidos y Canadá este “cranberry” se viene cultivando y seleccionando desde principios del siglo XIX. De hecho, fue la primera especie del género cultivada cuando Henry Hall de Dennis, en Cape Cod, Massachusetts, comenzó a cuidar unas cuantas plantas en 1816. Pero no fue hasta 1845 que se estableció que este arándano podía ser un producto comerciable [92]. Desde entonces se han obtenido más de 132 cultivares procedentes de las plantas silvestres y del cruzamiento entre los propios cultivares. Estados Unidos y Canadá son los principales productores de arándanos rojos, pero también es cultivado en Chile y Nueva Zelanda [102, 103].

Importada a Europa en 1760, *V. macrocarpon* fue cultivada primero como planta ornamental, principalmente en Inglaterra [104] y formó parte de las plantas cultivadas del prestigioso Royal Botanic Garden de Kew [105]. Posteriormente, esta planta escapó del cultivo y se detectó, en 1845, creciendo de manera silvestre en un pequeño pantano de Gales (Gran Bretaña). Más tarde, en 1869, fue detectada creciendo en grandes cantidades, ya naturalizada, en la Isla de Terschelling (Mar del Norte, Holanda). Más tarde, M. Maurer en Jena (Alemania) inició el cultivo de *V. macrocarpon* en un terreno turboso de 1200 m<sup>2</sup>, ensayo que prometía buenos resultados y que podría servir para aprovechar los terrenos turbosos y pantanosos en general [104]. Con el tiempo, su cultivo se extendió a otras partes del centro y norte de Europa, llegando hasta Turquía. Una consecuencia de su cultivo es que muchas de estas plantas se han diseminado, posiblemente a través de las aves, y actualmente se encuentra naturalizada en algunos países de Europa como en Inglaterra, Lituania, Suiza y, en los Países Bajos se la considera como una especie invasora [106,107].

*Vaccinium macrocarpon* es un pequeño arbusto, con tallos erectos y postrados (estolones) que crece en suelos ácidos (pH 3,5-5,5). El sistema radicular es muy superficial, por lo que en su medio natural vive y se desarrolla en suelos húmedos y pantanosos. Sus flores son de color rosado y los frutos son bayas subesféricas de color rojo brillante o rojo oscuro. La epidermis de las bayas es firme, sólida y cerosa por lo que se conservan muy bien y pueden permanecer en la planta durante varios meses sin deteriorarse. La pulpa es blanca, astringente y ácida [96] (Figura 2.2).



**Fig. 2.2.** Aspecto de *V. macrocarpon*. [108]

Dependiendo de su destino, la recolección de las bayas puede hacerse en estado seco o en estado húmedo. La cosecha de los arándanos en seco suele realizarse con máquinas cosechadoras o a mano. Estos arándanos cosechados en seco se utilizan como fruta fresca para cocinar. La recolección de los frutos en estado húmedo se efectúa inundando los campos y, después se golpean los tallos con una máquina especial para desprender los frutos que flotan en el agua y son empujados a un elevador mecánico que va recogiendo las bayas y depositándolas en contenedores (Figura 2.3) [109].



**Fig.2.3.** Recolección por inundación de *V. macrocarpon*

Una vez recolectadas, las bayas obtenidas se comercializan frescas, deshidratadas o congeladas, pero también se procesan para la elaboración de zumos, salsas, gelatinas, mermeladas, etc. En realidad, la mayor parte de estas bayas se comercializaban en estado fresco a principios del siglo XIX. Más tarde, sobre 1912 apareció la conserva de una gelatina de bayas acondicionada con azúcar y en 1920 se comercializó en lata de conserva la salsa de cranberry, una salsa que los anglosajones asocian a las festividades

culinarias de Navidad. Veinte años más tarde, aparecieron comercializadas las bayas deshidratadas y los zumos de este arándano [100].

Recientemente, se ha aprobado el Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1631 de la Comisión Europea de 30 de octubre de 2018 [110] por el que se autoriza la comercialización de extracto de arándano rojo en polvo como nuevo alimento, en la categoría específica de alimentos como complemento alimenticio, tal como se define en la Directiva 2002/46 CE [111], para la población adulta. En este reglamento se indica que la empresa que lo comercializa lo utilizará en bebidas a base de aroma de frutas, bebidas isotónicas, bebidas de té, aguas enriquecidas con vitaminas, yogures y bebidas de yogur. También, con fines terapéuticos, se comercializan diversos productos farmacéuticos con base de arándanos rojo en diferentes formatos como cápsulas, pastillas, sobres o jarabes.

Se ha caracterizado el contenido fenólico de diferentes especies de arándanos, entre ellas: *Vaccinium oxycoccos* L. (variedad europea), *Vaccinium microcarpum* (Turcz ex Rupr.) Schamalh. (arándano pequeño), *Vaccinium erythrocarpum* (Michx.) Pers. (arándano de montaña) y *Vaccinium macrocarpon* Aiton. (arándano grande, arándano americano) [98]. La variedad europea, que se cultiva en algunas partes de Europa central, Finlandia y Alemania, es una fruta más pequeña que la variedad americana del norte, con antiocianidinas y perfiles de ácidos fenólicos ligeramente diferentes [112].

La variedad *Vaccinium macrocarpon*, así como sus productos derivados, tiene un alto contenido fenólico que es el responsable de numerosos efectos beneficiosos para la salud humana, como la prevención de ciertos tipos de cánceres, gracias a su capacidad de inhibir el crecimiento de células tumorales, el tratamiento de las infecciones orales mediante la reducción de la patogénesis de las caries dentales [98], la protección contra enfermedades cardiovasculares [113], la prevención de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad y la agregación plaquetaria debido a sus propiedades antioxidantes [112,114-118]. No obstante, el consumo de productos derivados de los arándanos está relacionado principalmente con su capacidad para prevenir las infecciones del tracto urinario (ITU). Este fenómeno se atribuye a la capacidad de los compuestos fenólicos del arándano, y especialmente de un tipo de proantocianidina (PACs) de tipo A, para inhibir la adhesión de bacterias patógenas, como *Escherichia coli* y *Helicobacter pylori*, a las células de los tejidos del tracto urinario, previniendo la colonización bacteriana y la proliferación de las infecciones urinarias [115,119-122]. Estudios recientes *in vitro* indican que esta capacidad de adhesión de los productos derivados de los arándanos no depende solo del contenido total de PACs, sino también de su tamaño y estructura.

Como se ha comentado anteriormente, el arándano rojo americano es ampliamente consumido como alimento en forma de zumos, frutas frescas, frutos secos y también se utiliza para la preparación de productos farmacéuticos [115]. Estos productos difieren en gran medida en su contenido y distribución polifenólica.

### **2.1.1. Polifenoles y ácidos fenólicos**

Los compuestos polifenólicos se caracterizan por tener en su estructura más de un grupo hidroxilo (-OH) unido a un anillo aromático. Estos fitoquímicos poseen una gran variedad de actividades biológicas y numerosos beneficios para la salud humana. Como consecuencia de esto, en los últimos años ha aumentado el interés en la investigación sobre cómo estos compuestos influyen en las propiedades de los alimentos.

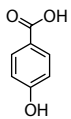
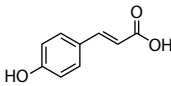
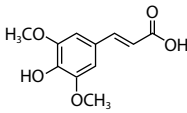
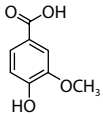
Los polifenoles se originan principalmente en las plantas, que los sintetizan en gran cantidad como producto de su metabolismo secundario. Estos compuestos se pueden encontrar prácticamente en todas las plantas. Su distribución cualitativa puede variar entre los diferentes órganos de las plantas y dentro de las diferentes poblaciones de la misma especie vegetal. En las plantas, los compuestos polifenólicos pueden actuar como contribuyentes a su pigmentación y en general están involucrados en la defensa contra la radiación ultravioleta o la agresión de agentes patógenos. En los alimentos, juegan un papel importante en las propiedades organolépticas, condicionando el amargor, el color, el sabor, el olor y también su estabilidad oxidativa [116].

Puede haber diferencias cualitativas en el contenido polifenólico en función de la variedad de la fruta, las condiciones ambientales durante el crecimiento, las condiciones de almacenamiento y los tratamientos efectuados después de la recogida.

Los compuestos polifenólicos pueden sufrir numerosas reacciones durante el procesamiento de los alimentos y su almacenaje, provocando la oxidación enzimática o química de los mismos. Su estabilidad también se ve influenciada por el pH y además sus propiedades se ven muy afectadas por las interacciones con la matriz alimentaria debido a la presencia de azúcares y ácido ascórbico. También, los fenoles pueden verse afectados por las condiciones de almacenamiento, como la temperatura, la atmósfera y la luz. El oxígeno es otro factor importante desestabilizante de los polifenoles, especialmente de antocianidinas, y su capacidad antioxidante en los productos [123].

Existen diversas clases y subclases de polifenoles, que se definen en función del número de anillos fenólicos que contienen y de los elementos estructurales que unen estos anillos entre sí. En términos generales los podemos clasificar como flavonoides y no-flavonoides (ácidos fenólicos, aldehídos fenólicos, estilbenos, cumarinas). Los principales grupos de polifenoles descritos en los arándanos incluyen: ácidos fenólicos, (derivados del ácido hidroxibenzoico y del ácido hidroxicinámico), flavonoides, estilbenos y taninos (proantocianidinas). Mientras que las principales familias polifenólicas están bien caracterizadas, las estructuras químicas de las proantocianidinas (PACs) son menos conocidas y necesitan una mayor investigación [119,124].

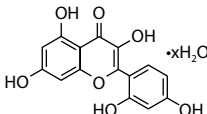
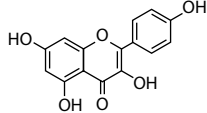
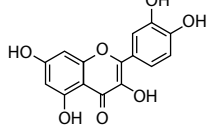
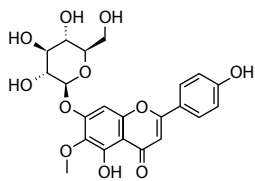
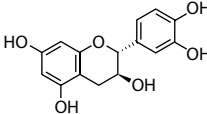
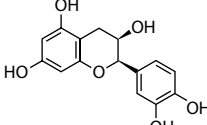
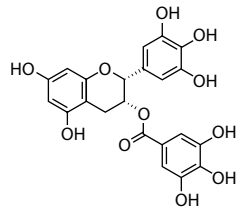
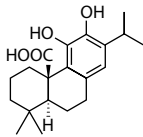
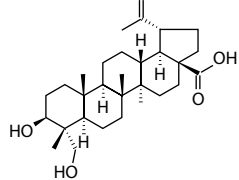
La Tabla 2.1 ilustra la clasificación de los polifenoles estudiados en este trabajo, según su estructura.

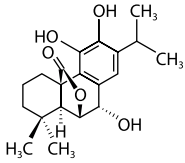
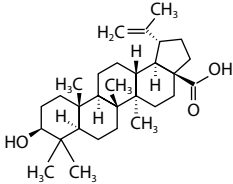
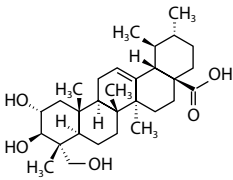
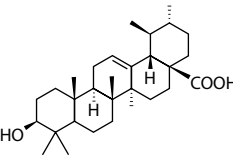
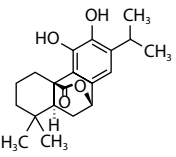
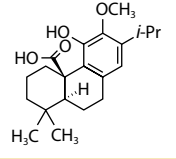
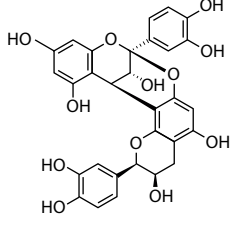
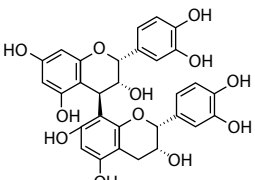
Compuestos	Fórmula	Número CAS	Estructura
<b>Ácidos Fenólicos</b>			
Ácido 4-Hidroxibenzoico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	99-96-7	
Ácido p-Cumárico	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	501-98-4	
Ácido Sináptico	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	530-59-6	
Ácido Vanílico	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	121-34-6	

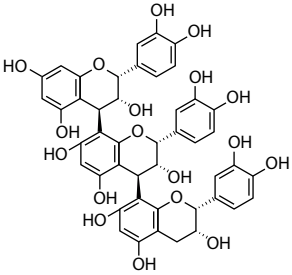
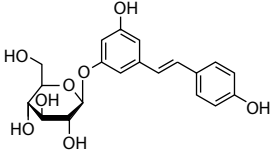
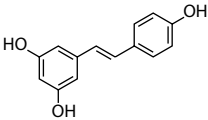
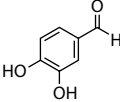
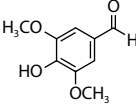
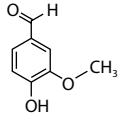
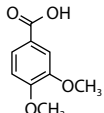
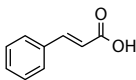
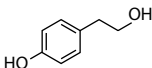


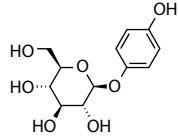
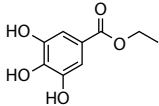
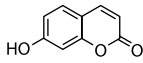
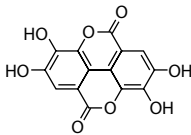
Compuestos	Fórmula	Número CAS	Estructura
Ácido Homovanílico	$C_9H_{10}O_4$	306-08-1	
Ácido Homogentísico	$C_8H_8O_4$	451-13-8	
Ácido Clorogénico	$C_{16}H_{18}O_9$	327-97-9	
Ácido Criptoclorogénico	$C_{16}H_{18}O_9$	905-99-7	
Ácido Gálico	$C_7H_6O_5$	149-91-7	
Ácido Ferúlico	$C_{10}H_{10}O_4$	537-98-4	
Ácido Gentísico	$C_7H_6O_4$	490-79-9	
Ácido Cafeico	$C_9H_8O_4$	331-39-5	
Ácido Siríngico	$C_9H_{10}O_5$	530-57-4	
Ácido Rosmarínico	$C_{18}H_{16}O_8$	20283-92-5	
<b>Flavones</b>			
Fisetina	$C_{15}H_{10}O_6$	528-48-3	
Taxifolina	$C_{15}H_{12}O_7$	480-18-2	

Compuestos	Fórmula	Número CAS	Estructura
Rutin	$C_{27}H_{30}O_{16}$	207671-50-9	
Quercetin	$C_{15}H_{14}O_9$	6151-25-3	
Quercitrin	$C_{21}H_{20}O_{11}$	522-12-3	
Nepetina-7-glucósido	$C_{22}H_{22}O_{12}$	569-90-4	
Hesperidina	$C_{28}H_{34}O_{15}$	520-26-3	
Cirsimaritin	$C_{17}H_{14}O_6$	6601-62-3	
Miricetina	$C_{15}H_{10}O_8$	529-44-2	
Luteolin-7-O-beta-d-glucuronide	$C_{21}H_{18}O_{12}$	38934-20-2	
Genkwanin	$C_{16}H_{12}O_5$	437-64-9	

Compuestos	Fórmula	Número CAS	Estructura
Morín hidrato	$C_{15}H_{10}O_7$	654055-01-3	
Kaempferol	$C_{15}H_{10}O_6$	520-18-3	
Quercetin	$C_{15}H_{10}O_7$	117-39-5	
Homoplantaginina	$C_{22}H_{22}O_{11}$	17680-84-1	
<b>Flavanoles</b>			
(+)-Catequina	$C_{15}H_{14}O_6$	7295-85-4	
(-)-Epicatequina	$C_{15}H_{14}O_6$	490-46-0	
(-)-Epigallocatequina galato	$C_{22}H_{18}O_{11}$	989-51-5	
<b>Polifenoles Terpenos</b>			
Ácido Carnósico	$C_{20}H_{28}O_4$	3650-09-07	
Anemosapogenina	$C_{30}H_{48}O_4$	85999-40-2	

Compuestos	Fórmula	Número CAS	Estructura
Rosmanol	$C_{20}H_{26}O_5$	80225-53-2	
Ácido Betulinico	$C_{30}H_{46}O_3$	472-15-1	
Ácido Asiático	$C_{30}H_{48}O_5$	464-92-6	
Ácido Ursólico	$C_{30}H_{48}O_3$	77-52-1	
Carnosolo	$C_{20}H_{26}O_4$	5957-80-2	
Ácido 12-metoxicarnósico	$C_{21}H_{30}O_4$	3650-09-07	
<b>Proantocianidinas</b>			
Proantocianidina A2	$C_{30}H_{24}O_{12}$	41743-41-3	
Proantocianidina B2	$C_{30}H_{26}O_{12}$	29106-49-8	

Compuestos	Fórmula	Número CAS	Estructura
Proantocianidina C1	$C_{45}H_{38}O_{18}$	37064-30-5	
<b>Estilbenos</b>			
Polidatín	$C_{20}H_{22}O_8$	65914-17-2	
Resveratrol	$C_{14}H_{12}O_3$	501-36-0	
<b>Aldehídos fenólicos</b>			
3,4-Dihidroxibenzaldehído	$C_7H_6O_3$	139-85-5	
Siringaldehído	$C_9H_{10}O_4$	134-96-3	
Vanilina	$C_8H_8O_3$	121-33-5	
<b>Ácido Benzóico</b>			
Ácido Verátrico	$C_9H_{10}O_4$	93-07-2	
<b>Ácidos Cinámicos</b>			
Ácido trans-Cinámico	$C_9H_8O_2$	140-10-3	
<b>Otros Polifenóles</b>			
Tirosol	$C_8H_{10}O_2$	501-94-0	

Compuestos	Fórmula	Número CAS	Estructura
Arbutín	$C_{12}H_{16}O_7$	497-76-7	
Galato de etilo	$C_9H_{10}O_5$	831-61-8	
Umbelliferon	$C_9H_6O_3$	93-35-6	
Ácido Elágico	$C_{14}H_6O_8$	746-66-4	

### 2.1.1.1. Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos contribuyen significativamente al conjunto total de polifenoles del arándano rojo y además son los responsables del sabor característico y único de estas bayas. En función de la posición del ácido carboxílico y del grupo hidroxilo en el anillo aromático podemos diferenciar dos clases: los derivados del ácido benzoico y los derivados del ácido cinámico. Los hidroxibenzoicos son principalmente el ácido gálico, el ácido vanílico y el ácido sirínico. Los ácidos hidroxicinámicos son más conocidos que los ácidos hidroxibenzoicos y están constituidos básicamente por el ácido *p*-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico y ácido sináptico [116,123]. Estos ácidos se encuentran como glicósidos, generalmente combinados con monosacáridos, y rara vez se encuentran en su forma libre, excepto en los alimentos procesados que se someten a procesos de congelación, esterilización o fermentación. Están presentes en todas las partes de la fruta, sin embargo se encuentran a concentraciones más elevadas en la parte exterior de la fruta madura. Las concentraciones disminuyen generalmente durante el transcurso de la maduración, pero las cantidades solo aumentan si aumenta el tamaño de la fruta [118].

### 2.1.1.2. Estilbenos

Los estilbenos son hidrocarburos aromáticos formados por dos anillos de benceno unidos por una cadena de dos carbonos. Se encuentran en pequeñas cantidades en la dieta humana. Uno de ellos, el resveratrol, ha sido ampliamente estudiado debido a sus efectos

anticancerígenos, entre otros efectos beneficiosos. Este polifenol, que puede encontrarse en cantidades significativas en las uvas y en el vino tinto, también está presente en los arándanos rojos [118,123].

### 2.1.1.3. Flavonoides

Los flavonoides, conocidos por su capacidad antioxidante, constituyen la subclase de polifenoles más abundante dentro del reino vegetal [121]. Son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto en común de difenilpirano ( $C_6-C_3-C_6$ ), formados por dos anillos fenilos (A y B) enlazados a través de un anillo C pirano heterocíclico. Existen diversos subgrupos de flavonoides. La clasificación de estos compuestos se hace en función del estado de oxidación del anillo heterocíclico (anillo C) y de la posición del anillo B. Los principales subgrupos de compuestos flavonoides son: flavonoles, flavones, flavanonas, isoflavonas, antiocianidinas y flavanoles [118]. Dentro de cada familia existe una gran variedad de compuestos, que se diferencian por el número y posición de los grupos hidroxilos y por los diferentes grupos funcionales que pueden presentar (metilos, azúcares, ácidos orgánicos). Las antiocianidinas, los flavonoles y los flavanoles, o flavan-3-ol, son los tres principales flavonoides mas comunes que podemos encontrar en los arándanos.

#### 2.1.1.3.1. Flavonoles

Alrededor de 40 flavonoles, que incluyen la quercetina, la miricetina, el kaempferol y sus derivados, han sido identificados en los arándanos rojos. Se han detectado niveles relativamente altos de quercetina en comparación con otras frutas. Al igual que las antiocianidinas, los flavonoles se encuentran normalmente como glicósidos, aunque también pueden estar acilados con un ácido fenólico. Los flavonoles son generalmente incoloros, pero absorben la luz UV y toman color amarillo a altas concentraciones [125]. Generalmente se encuentran en concentraciones relativamente bajas y principalmente en la piel de las frutas.

#### 2.1.1.3.2. Antocianinas

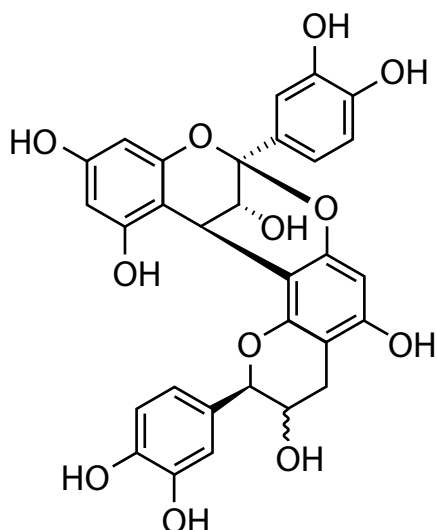
El color rojo que presentan algunas frutas es debido a su alto contenido en antocianinas. Las antocianinas son pigmentos hidrosolubles que se encuentran principalmente en los tejidos epidérmicos de muchos vegetales y se componen de una molécula de antocianidina unida mediante un enlace glicosídico a una o más moléculas de azúcar, proporcionándole una elevada estabilidad [123]. Hay seis antocianinas principales presentes en productos naturales, y dos de ellas, la cianidina y la peonidina, se encuentran

normalmente presentes en los arándanos. Pueden estar presentes en diferentes formas en función del pH, lo que es determinante para presentar color o ser incoloros [125]. Su concentración tiende a aumentar a medida que la fruta va madurando como respuesta a los factores climáticos (luz, temperatura). Las antocianinas son muy sensibles al aumento de la temperatura, y pueden degradarse debido al calor durante los procesamientos, por ejemplo, en la pasteurización de los zumos. Las frutas frescas contienen la polifenol-oxidasa, una enzima que es responsable de la oscuridad del tejido por conversión de sustancias fenólicas a quinonas, las que polimerizan dando lugar a pigmentos pardos. Al prensar la fruta, la polifenol-oxidasa entra en contacto con compuestos fenólicos, que se liberan de las vacuolas, lo que provoca la degradación de los flavonoides. Las antocianidinas también pueden ser degradadas por la enzima pectinasa, que se utiliza industrialmente para mejorar la extracción en los zumos [125].

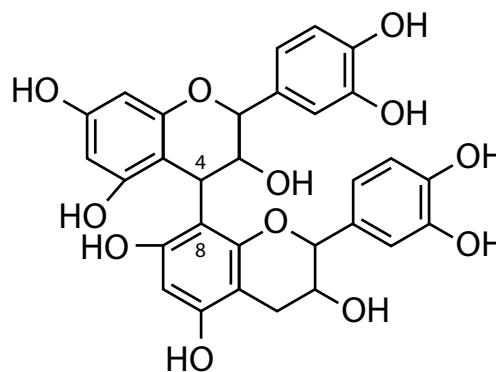
#### 2.1.1.3.3. Flavanoles (flavan-3-ol)

Los flavanoles existen tanto en forma monomérica (catequinas) como en forma polimérica (PACs). Estos últimos, también conocidos como taninos condensados, representan el 85% del contenido total de flavan-3-ol. Son un grupo de sustancias químicas que se caracterizan por sus unidades constituyentes, el tipo de enlace y el grado de polimerización. En la mayoría de frutas y plantas, las PACs corresponden a oligómeros y polímeros de flavan-3-ol con la (-)epicatequina como unidad monomérica principal. Cuando están unidos a través de un enlace desde el carbono C4 de la unidad superior al carbono C6 o C8 de la unidad inferior, estas moléculas se les denomina proantocianidinas de tipo B. Cuando presentan un enlace éter adicional entre el carbono C2 de la unidad superior y el grupo hidroxilo en las posiciones C7 o C5 de la unidad inferior, se les denomina PACs de tipo A [116,119,126]. Las Figuras 2.4 y 2.5 muestran un ejemplo de una PAC con enlace tipo A y otra con enlace tipo B, respectivamente. Las proantocianidinas constituidas únicamente por unidades de epicatequina se denominan procianidinas. Se lleva a cabo la degradación tiolítica de las procianidinas para determinar su grado de polimerización. El grado de polimerización es el número de monómeros unidos entre sí, a través de los enlaces tipo A o de tipo B, para formar un oligómero o polímero. Se ha descrito que los principales PACs del arándano rojo son oligómeros con un grado de polimerización entre cuatro y siete unidades, unidos al menos por dos enlaces de tipo A. Actualmente se han detectado PACs de tipo A con hasta doce grados de polimerización [115]. En los arándanos rojos podemos encontrar tanto PACs de tipo A como de tipo B [127]. Se ha realizado una estimación en la que se indica que el 65% de los PACs totales presentes en el arándano rojo son de tipo A, mientras que los PACs de tipo B son más abundantes en la uva o el chocolate [98]. Solo unos pocos como las ciruelas, los cacahuetes, los aguacates, la canela y el arándano rojo contienen PACs de tipo A, siendo el arándano rojo el que presenta una mayor concentración.





**Fig. 2.4.** Proantocianidina con enlace tipo A



**Fig.2.5.** Proantocianidina con enlace tipo B

Durante los últimos años, han aparecido en el mercado suplementos alimenticios con arándanos rojos (jarabes, concentrados en polvo, cápsulas), que permiten ingerir una dosis diaria de PACs necesaria para combatir infecciones. Aunque un gran número de estudios clínicos en personas han demostrado que los productos con arándano disminuyen la incidencia de infecciones urinarias (ITU) en mujeres con infecciones continuas, no se ha podido establecer una dosis recomendada lo que ha limitado mucho este tipo de terapia. Esto se debe principalmente a una falta de normalización de los productos PACs de tipo A. Recientemente la agencia francesa de seguridad sanitaria de los alimentos (AFSSA) ha llegado a la conclusión, a partir de los resultados obtenidos en estudios clínicos aleatorios, que la ingesta diaria de 36mg de PACs contribuyen a la disminución de los ITU [119].

Actualmente se sospecha que algunos productos, que se venden en los mercados como derivados de los arándanos rojos, provienen o contienen pequeñas adulteraciones de frutas más baratas como las uvas o el arándano azul que no contienen el tipo de PACs adecuados para combatir las infecciones. Para poder proteger al consumidor de las posibles mezclas con una declaración inexacta del tipo de constituyentes de los productos de fruta y además evitar la competencia desleal, es esencial comprobar la composición y la autenticidad de dichos preparados.

### 2.1.2. Metodologías analíticas para la determinación de polifenoles

La capacidad de prevenir la adherencia bacteriana, al igual que la mayoría de propiedades beneficiosas del arándano y sus productos derivados, se deben principalmente al contenido de polifenoles presentes. Por este motivo, actualmente ha aumentado el interés por desarrollar

métodos analíticos que permitan la identificación y la determinación de compuestos fenólicos en estos productos naturales. No existe un método efectivo para el análisis simultáneo de la amplia gama de polifenoles existente, debido a la gran diversidad química de estos compuestos, sus diferentes niveles de concentración en las muestras y la elevada complejidad de las matrices alimenticias. Además, para poder garantizar una identificación y una cuantificación fiables es necesario tratar la muestra para extraer los polifenoles, purificar y concentrar los extractos. La extracción eficaz de los compuestos polifenólicos en vegetales depende de su naturaleza química, el método de extracción utilizado, el tamaño de las partículas en la muestra, los tiempos de extracción, las condiciones de almacenamiento y la presencia de interferencias. Las técnicas más utilizadas para la extracción de los polifenoles a partir de muestras líquidas son la extracción líquido-líquido, la extracción en fase sólida (SPE) y la micro extracción en fase sólida (SPME), siendo el Sephadex LH-20, el absorbente más utilizado para eliminar las interferencias [115,126]. La solubilidad de los compuestos polifenólicos depende del tipo de disolvente utilizado, su polaridad, de su interacción con otras sustancias y de la formación de compuestos insolubles. No hay un procedimiento uniforme o completamente satisfactorio para la extracción de todos los compuestos fenólicos en productos vegetales. El metanol, el etanol, la acetona, el agua, el acetato de etilo y, en menor medida, el propanol y la dimetilformamida, se utilizan con frecuencia para la extracción y tratamiento de los productos naturales [128]. Las técnicas de extracción en fase sólida son muy laboriosas y requieren el uso de cartuchos de SPE (*Solid phase extraction*), dispositivos de SPE y/o SPME (*Solid phase Microextraction*). Gracias a los avances en la instrumentación analítica, se han podido utilizar métodos de preparación de muestra más rápidos y más simples, como el descrito por Sapozhnikova y sus colaboradores [114], que consiste en una simple dilución de la muestra con una disolución acuosa de ácido fórmico al 0.05% y su posterior filtración para evitar la introducción de partículas en el inyector LC. Este método proporciona una elevada sensibilidad para compuestos fenólicos en muestras diluidas, reduciendo los efectos de matriz y eliminando la etapa de purificación y de preconcentración.

Los flavonoides y los ácidos fenólicos se encuentran en las plantas principalmente como glicósidos o ésteres simples y están unidos a la pared celular. Una hidrólisis ácida puede liberar los flavonoides y los ácidos fenólicos combinados. Chen y sus colaboradores [129], determinaron el contenido polifenólico en zumos de arándano rojo antes y después de la hidrólisis ácida con HCl. Encontraron que la quercetina era uno de los principales flavonoides en los zumos de arándano hidrolizado, mientras que estaba ausente en los zumos sin hidrolizar.

Varios métodos colorimétricos se han descrito en la literatura para el análisis de polifenoles, tales como el ensayo de Folin-Ciocalteu, Folin-Denis, el uso de la vainillina y de la 4-dimetilaminocinnamaldehído (DMAC) o el método desarrollado por Brunswick Labs (BL) conocido por las siglas BL-DMAC. Hay que destacar que Boudesocque-Delaye ha

desarrollado un protocolo de control de calidad rápido basado en el ensayo BL-DMAC de referencia y la cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPTLC)-densitometría para el control de calidad rutinario en productos elaborados con arándanos (*Vaccinium macrocarpon*) [130]. No obstante, estos métodos no sirven para su cuantificación debido a las interferencias con otras moléculas (fenólicas y no fenólicas) presentes en las muestras analizadas, o porque solo una parte de las unidades monoméricas de los PACs se detectan, especialmente en el ensayo de DMAC [115].

Otra técnica que se ha utilizado para determinar polifenoles en alimentos ha sido la cromatografía de gases (GC). Para analizar un compuesto por GC debe ser volátil o bien, que lo sea un compuesto derivado de él. Así, por ejemplo, la silylación entre los compuestos polifenólicos y compuestos trimetilsilil, es uno de los procesos de derivatización de polifenoles más adecuadas [131]. El principal inconveniente de utilizar GC para la determinación de polifenoles es la preparación de las muestras, ya que incluye la eliminación de los lípidos del extracto, la liberación de los polifenoles de los enlaces éster y glicosídicos y, finalmente, la derivatización. Sin embargo, en combinación con la espectrometría de masas presenta una elevada sensibilidad y selectividad [132].

Por otra parte, la separación y la cuantificación de polifenoles de bajo a medio peso molecular se puede llevar a cabo mediante electroforesis capilar (CE), siempre y cuando se encuentren en su forma cargada. Se trata de una técnica que permite una separación eficiente en la mayoría de los casos y tiene un elevado poder de resolución, un tiempo de separación corto y se necesita poca cantidad de muestra y de reactivos [133]. Por otra parte, sus limitaciones son su baja sensibilidad y una mala reproducibilidad debido a la corta longitud de camino óptico del capilar utilizado como celda de detección y los pequeños volúmenes que se pueden introducir en el capilar. De entre las diferentes variantes que presenta esta técnica, la cromatografía electrocinética micelar (MEKC), la electrocromatografía capilar (CEC) y la electroforesis capilar de zona (CZE) son las más utilizadas. Los detectores en los que suelen estar acoplados son el detector ultravioleta, electroquímico o espectrometría de masas. Como ejemplo, Navarro y col., utilizaron CZE para la autenticación de productos elaborados con frutas mediante el análisis del perfil polifenólico [134].

No obstante, la cromatografía de líquidos es la técnica más utilizada para el análisis y cuantificación de compuestos fenólicos. Las columnas más utilizadas son las de fases  $C_{18}$ , difenil y  $C_8$  [114]. La fase móvil está generalmente formada por un sistema binario de disolventes, compuesto por agua acidificada y un disolvente orgánico polar como metanol o acetonitrilo. Para la identificación y la caracterización generalmente se utilizan detectores de UV-VIS, de diodos integrados en serie (DAD) y de UV-fluorescencia, como por ejemplo el trabajo realizado por Bakhytkyzy y sus colaboradores quienes usaron la detección de fluorescencia para la determinación de catequinas y proantocianidinas (PAC) en productos farmacéuticos elaborados con arándanos [135].

Sin embargo, la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) es hoy en día la técnica que ofrece las mejores prestaciones para la determinación cualitativa y cuantitativa de los compuestos fenólicos en frutas, debido a su elevada sensibilidad, selectividad y, en algunos casos, su mayor resolución, evitando la necesidad de aislar previamente los analitos. En la Tabla 2.2 se muestra una selección de métodos LC-MS/MS descritos en la literatura para el análisis de compuestos polifenólicos. Los analizadores de masas más utilizados son el tiempo de vuelo (TOF), el de triple cuadrupolo (QqQ) y la trampa de iones (IT), utilizando como fuentes de ionización el electrospray (ESI) y la ionización por desorción con laser asistida por matriz (MALDI). Los estudios publicados por Zhu y Zhao y sus colaboradores muestran su aplicación, tanto en modo de ionización negativo ESI(-) como en modo de ionización positivo ESI(+), para la detección de los compuestos polifenólicos. En estos estudios se comprobó que los iones obtenidos en modo ESI(-) tenían intensidades más elevadas en comparación al modo ESI(+) para la mayoría de los polifenoles estudiados [136,137].

Teixeira y sus colaboradores [138], han demostrado que la espectrometría de masas con electrospray es una poderosa herramienta para la identificación de polifenoles en muestras complejas. En sus trabajos utilizaron esta técnica para realizar un estudio exhaustivo de la composición de PACs de dos vinos tintos portugueses, elaborados con uvas teinturier, especialmente para la identificación de dímeros y trímeros. La espectrometría de masas en tándem (MS/MS) con trampa de iones proporciona información adicional acerca de las estructuras de estos compuestos, a través de los patrones de fragmentación de los iones pseudomoleculares. Así se han detectado 41 compuestos diferentes. Entre ellos se incluyen 8 dímeros y 13 trímeros.

Van Dooren y sus colaboradores [139], han desarrollado y validado un método UHPLC-QqQ de adición estándar rápido y sensible para la cuantificación simultánea de dímeros y trímeros de tipo A en un extracto seco de arándano. En este trabajo hablan de la importancia de cuantificar el contenido de proantocianidinas de tipo A y de que una posible combinación con el método DMAC y el método de Butanol-HCl podría ser factible para identificar posibles adulteraciones en este tipo de muestras.

Sapozhnikova propuso un método para la identificación simultánea de una amplia variedad de compuestos polifenólicos de diferentes clases en zumos de uva, té y café, utilizando un analizador de triple cuadruplo con una fuente de electrospray en modo negativo. Para su cuantificación se utilizó un patrón interno deuterado. Muchos investigadores coinciden en la necesidad de este tipo de patrones internos marcados con isótopos para la cuantificación de compuestos polifenólicos en matrices complejas, para tener en cuenta la posible pérdida de analito durante el tratamiento de la muestra, así como la corrección de posibles efectos de matriz [114].

La espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) también se ha propuesto para el análisis y caracterización de compuestos polifenólicos en productos naturales. Así, Vallverdú-Queralt y sus colaboradores utilizaron la cromatografía de líquidos acoplada a un analizador de masas orbitrap (Q-Orbitrap) para la identificación de polifenoles en tomates [140]. En otro trabajo, Rockenbach y sus colaboradores utilizaron la espectrometría de masas de resonancia ciclotónica de iones con transformada de Fourier (FTICR-MS) para caracterizar 251 compuestos flavan-3-ol diferentes en uva [141]. Por último, mencionar el trabajo realizado por Pérez-Jiménez y Torres que a través de la combinación de diferentes técnicas (HPLC-ESI-QqQ-MS/MS y MALDI-TOF/TOF MS) identificaron 70 proantocianidinas en el agua procedente del blanqueo de almendras. En su trabajo, las proantocianidinas detectadas fueron tanto de tipo A como de tipo B. Esto fue posible gracias a la sensibilidad y exactitud en la medida de la masa proporcionada por el QqQ y el TOF, respectivamente [142].

**Tabla 2.2.** Resumen de los métodos LC-MS(/MS) y LC-HRMS más relevantes descritos en la literatura para la determinación de polifenoles.

Compuestos	Muestra	Columna	Condiciones	MS	Fuente de ionización	Método de adquisición	Ref.
Polifenoles	Zumo de uva, Té verde y café	Phenomenex Inc. Luna C8(2) (100x4.6mm, 3µm, 100 Å i.d.)	- Solvente A: Tampón de formiato de amonio 0.2mM a pH 4.7 - Solvente B: MeOH - Flujo: 0.4mL/min - Vol. iny.: 20µL	QqQ	ESI (-) - Voltaje de la fuente: -4.5kV - Temperatura de la fuente: 500°C	MRM	[114]
Proantocianidinas	Arándanos rojos	Waters Atlantis C18 (250x2.1mm, 5µm i.d.)	- Solvente A: H <sub>2</sub> O/ácido fórmico (98:2) - Solvente B: ACN/H <sub>2</sub> O/ácido fórmico (80:18:2) -Flujo: 0.25mL/min -Vol. iny.: 10µL	IT	ESI (-) y ESI (+) - Voltaje de la fuente: 4.3kV - Voltaje del capilar: -11,0 y +3.0V - Temperatura del capilar: 300°C	Full Scan	[115]
Proantocianidinas	Arándanos rojos	Phenomenex 100 diol-5 Develosil (250x2.1mm, 5µm i.d.)	- Solvente A: ACN/ácido fórmico (98:2) - Solvente B: MeOH/H <sub>2</sub> O/ácido fórmico (95:3:18:2) -Flujo: 0.25mL/min -Vol. iny.: 15µL	IT	ESI (-) - Voltaje de la fuente: 4.2kV - Voltaje del capilar: -13.0V - Temperatura del capilar: 150°C	Full Scan	[115]

Compuestos	Muestra	Columna	Condiciones	MS	Fuente de ionización	Método de adquisición	Ref.
Polifenoles	Jarabe de arándano rojo	Zorbax Eclipse Plus C18 (150x4.6mm, 1.8µm i.d.)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Solvente A: H<sub>2</sub>O/ACN (90:10)</li> <li>1% ácido fórmico</li> <li>- Solvente B: ACN</li> <li>- Flujo: 0.5mL/min</li> <li>- Vol. iny.: 10µL</li> </ul>	TOF	<ul style="list-style-type: none"> <li>ESI (-)</li> <li>- Voltaje de la fuente: 4.5kV</li> <li>- Temperatura del gas de secado: 190°C</li> <li>- Flujo del gas de secado: 9.0L/min</li> <li>- Presión nebulizador: 2.0bar</li> </ul>	Full Scan	[ 120]
Polifenoles	Jarabe de arándano rojo	Zorbax Eclipse Plus C18 (150x4.6mm, 1.8µm i.d.)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Solvente A: H<sub>2</sub>O/ácido fórmico (90:10)</li> <li>- Solvente B: ACN</li> <li>- Flujo: 0.5mL/min</li> <li>- Vol. iny.: 10µL</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>ESI (+)</li> <li>- Voltaje de la fuente: 4.5kV</li> <li>- Temperatura del gas de secado: 190°C</li> <li>- Flujo del gas de secado: 9.0L/min</li> <li>- Presión nebulizador: 2.0bar</li> </ul>	Full Scan	[ 120]
Polifenoles	Arándanos rojos	Waters Acquity HSS T3 C18 (150x2.1mm, 1.8µm i.d.)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- acetonitrilo/ H<sub>2</sub>O / formic acid (5:95:0.1 to 40:60:0.1)</li> <li>- Flujo: 0.4mL/min</li> <li>- Vol. iny.: 5µL</li> <li>- T° 55°C</li> </ul>	Q	<ul style="list-style-type: none"> <li>ESI (-)</li> <li>- Voltaje del capilar: 3kV</li> <li>- Temperatura de la fuente: 300°C</li> <li>- Flujo gas de solvatación (N<sub>2</sub>): 800L/min</li> </ul>	SIM	[ 130]
Proantocianidinas	Arándanos Rojos	Waters Acquity BEH 18 (100x2.1mm, 1.8µm)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Solvente A: H<sub>2</sub>O 0.1% ácido fórmico</li> <li>- Solvente B: MeOH 0.1% ácido fórmico</li> <li>- Vol. iny.: 5µL</li> <li>- T° columna 40°C</li> <li>- T° muestra 4°C</li> </ul>	QqQ	<ul style="list-style-type: none"> <li>ESI(-)</li> <li>- Voltaje del capilar: 2.5kV</li> <li>- Temperatura de la fuente: 150°C</li> <li>- Temperatura de desolvatoación: 450°C</li> <li>- Flujo gas de solvatación: 900L/min</li> </ul>	MRM	[ 139]

Compuestos	Muestra	Columna	Condiciones	MS	Fuente de ionización	Método de adquisición	Ref.
Flavonoides	Arándanos Rojos	Gemini® C18 (150×4.6mm, 5µm, 110Å)	- Solvente A: H <sub>2</sub> O 0.1% ácido fórmico - Solvente B: ACN 0.1% ácido fórmico - Flujo: 1mL/min	QqQ	APCI (-) - Temperatura de la fuente: 500°C - Potencial enf.: -300V - Potencial ent.: -10V - Potencial des: -60V - Potencial sal.: -5V	MS <sup>2</sup>	[143]
Proantocianidinas	Arándanos Rojos	Develosil® 100Diol- (250×4.6mm, 5, 5µm)	- Solvente A: H <sub>2</sub> O 0.1% ácido fórmico - Solvente B: 0.1% ácido fórmico 95% MeOH, 5% H <sub>2</sub> O - Flujo: 1mL/min	QqQ	APCI (-) - Temperatura de la fuente: 500°C - Potencial enf.: -300V - Potencial ent.: -10V - Potencial des: -60V - Potencial sal.: -5V	MRM	[143]
Polifenoles	Jarabe de arándano rojo	Columna capilar C18 (360µm o.d., 75µm i.d., longitud 10.1cm, 3µm)	- Solvente A: H <sub>2</sub> O 0.1% ácido fórmico - Solvente B: ACN - Flujo: 0.3mL/min - Vol. iny. 1µL - Temp. iny.: 15°C	TOF	ESI (-) y ESI (+) - Voltaje del capilar: 3.7kV - Temperatura del gas de secado: 150°C - Flujo del gas de secado: 5.0L/min - Presión nebulizador: 0.5bar	Full-Scan	[144]

### 2.1.3. Técnicas quimiométricas

La automatización y computarización en los laboratorios ha llevado consigo diversas consecuencias. Una de ellas es la rápida adquisición de gran cantidad de datos. Ahora bien, sabemos que la posesión de dichos datos dista, muchas veces, de proporcionar respuestas adecuadas. Obtener datos no es sinónimo de poseer información; debemos interpretarlos y colocarlos en el contexto adecuado para convertirlos en información útil. La quimiometría es la disciplina que tiene esta finalidad.

Los intentos para definir la quimiometría han sido numerosos. Siebert ha proporcionado recientemente una definición sugerente: “La quimiometría es la aplicación de métodos

matemáticos y estadísticos, así como de los principios de la buena ciencia de la medida, para extraer de forma eficiente información útil de datos químicos” [48].

Uno de los paradigmas del análisis químico, la especificidad de la señal analítica, se transforma mediante la quimiometría. En muchos casos ya no es de obligado cumplimiento eliminar las interferencias para obtener un resultado correcto. Con ello, las etapas tediosas de pretratamiento químico de las muestras, para aislar los analitos de interés, pueden soslayarse dado que la selectividad se consigue mediante métodos quimiométricos, no físico-químicos.

La quimiometría contribuye, por tanto, a hacer realidad diversas tendencias de la química analítica actual: rapidez, abaratamiento de costes, miniaturización o transferibilidad entre instrumentos.

En la literatura existen diversos trabajos que utilizan técnicas quimiométricas para la caracterización de polifenoles en muestras naturales, aunque la mayoría utiliza perfiles cromatográficos o electroforéticos de los polifenoles obtenidos [134]. No obstante, algunos trabajos han aplicado métodos quimiométricos a partir de los datos obtenidos mediante LC-MS/MS. Como ejemplo, Abad-García i col. estudiaron mediante técnicas quimiométricas los perfiles polifenólicos obtenidos por HPLC-DAD\_MS/MS de zumos de cítricos, con el objetivo de diferenciarlos en función de la fruta utilizada para su elaboración (naranja, mandarina y limón) [145]. Esto les permitió desarrollar un sistema de clasificación con la finalidad de confirmar la autenticidad de los zumos.

### 2.1.3.1. Pretratamiento de los datos obtenidos

La mayoría de los métodos quimiométricos utilizados requieren de un pretratamiento de los datos experimentales obtenidos. El pretratamiento es la modificación de los datos antes de construir el modelo matemático con tal de hacer lineal la respuesta de las variables y eliminar las fuentes extrañas de variación que no son de interés para el análisis.

Existen diferentes pretratamientos de datos, como el escalado, el centrado, la correlación de la línea base, la normalización y las derivadas, que se seleccionan según el tipo de datos y de la información que se quiere obtener. En este trabajo nos centraremos en tres de estos pretratamientos.

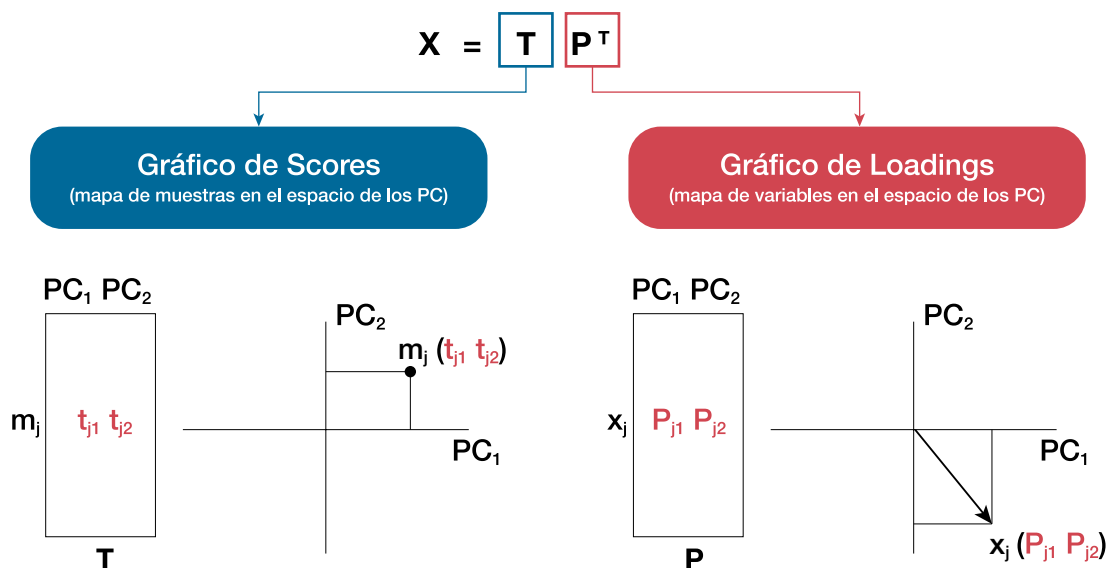
- **Centrado (Mean centering):** Consiste en restar a cada elemento el valor medio de su variable, para eliminar las diferencias entre las variables derivadas a la magnitud de la escala.



- **Autoescalado (scaling):** Consiste en restar a cada elemento el valor medio y dividirlo por la desviación estándar de su variable. De esta forma se eliminan las diferencias entre variables debidas a la magnitud y la amplitud de escala. Se utiliza para evitar la presencia de valores extremos en el escalado de los datos en algunas muestras de origen natural.
- **Normalización:** La magnitud de las variables medidas puede ser muy diferente de una muestra a otra. Los métodos de normalización intentan corregir este tipo de efecto mediante la identificación de algún aspecto de cada muestra, que debe ser constante de una muestra a otra, y realizar la corrección de la escala en todas las variables.

### 2.1.3.2. Análisis de componentes principales (PCA)

El PCA es una de las técnicas de análisis multivariante más utilizada. Su objetivo es reducir al mínimo la dimensionalidad de los datos originales sin perder información relevante. Los datos originales se transforman en una combinación lineal de variables no correlacionadas entre sí, llamadas componentes principales (PCs). No todos los componentes principales contienen la misma información, los primeros son los que describen la mayor variación de datos, que se asocia a la información más relevante, mientras que los últimos describen variaciones en los datos que pueden ser debidos al ruido o al error experimental. En la Figura 2.6 se muestra la ecuación que relaciona los datos al espacio de PCs y los datos originales (modelo PCA).



**Fig. 2.6.** Visualización de los datos en el modelo PCA.

En esta ecuación,  $T$  es una matriz de scores, con tantas filas como la matriz de datos originales  $X$ , y que contiene la información sobre las filas (los objetos) de la matriz original;  $P^T$  corresponde a la matriz transpuesta de la matriz de loadings, con tantas columnas como datos originales. El número de columnas de la matriz de score corresponde al número calculado de los componentes principales;  $PC_1$  describe la dirección de la máxima variación (varianza) de nuestros datos,  $PC_2$  es ortogonal al primer componente (no repiten información entre ellas) y abarca la mayor cantidad de la variación restante, y así sucesivamente, hasta que se explica el total de la variación útil de la matriz original  $X$ .  $E$  es una matriz de error, es decir, la variación residual de  $X$  que no es aplicable por el modelo con  $n$  componentes principales.

El diagrama de scores describe las muestras en forma de puntos en el espacio de los componentes principales, y de esta forma se puede decir que las muestras próximas entre si son semejantes. Por lo tanto, con este gráfico es posible detectar e interpretar las pautas presentadas por la muestras, como agrupaciones, similitudes, diferencias y muestras anómalas. En cambio, el gráfico de loadings describe las variables originales en forma de vectores en el espacio de los componentes principales. Este gráfico permite ver que correlación hay entre la variables en función del ángulo que forman entre ellos.

### 2.1.3.3. Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)

El método fue introducido por Wold, H. (1975) para ser aplicado en ciencias económicas y sociales, para luego extenderse a otras disciplinas, gracias a las contribuciones de su hijo Wold, S. (1983). Este método ha ganado popularidad en quimiometría, donde suelen darse casos en que se analizan datos caracterizados por muchas variables predictoras, con problemas de multicolinealidad y pocas unidades experimentales de estudio.

La regresión PLS es un método estadístico multivariante de aplicación actualmente generalizada. Combina y generaliza conceptos de Análisis de Componentes Principales y de análisis de Regresión Lineal Múltiple. Es particularmente útil cuando se desea predecir un conjunto de variables dependientes ( $Y$ ) desde un conjunto (relativamente grande y posiblemente correlacionadas) de variables predictoras ( $X$ ).

El modelo general de PLS multivariantes es:

$$\begin{aligned} X &= TP^T + E \\ Y &= UQ_T + F \end{aligned}$$

Donde  $X$  es una matriz de  $n \times m$  predictores,  $Y$  es una matriz de  $n \times p$  respuestas;  $T$  y  $U$  son matrices que son, respectivamente, proyecciones de  $X$  ( $X$  score, component o factor matrix)

y proyecciones de Y (Y scores); P y Q son, respectivamente,  $m \times l$  y  $p \times l$  matrices de rango ortogonales; y matrices E y F son los términos de error. Las descomposiciones de X e Y se hacen con el fin de maximizar la covarianza de T y U.

La regresión de mínimos cuadrados parciales se utiliza para encontrar las relaciones fundamentales entre dos matrices (X e Y), es decir, un enfoque de variable latente para modelar la estructura de covarianza en estos dos espacios. Un modelo de PLS trata de encontrar el sentido multidimensional en el espacio de X que explica la dirección de la máxima varianza multidimensional en el espacio Y.

Aplicar la regresión de mínimos cuadrados parciales es especialmente adecuado cuando la matriz de predictores tiene más variables que observaciones, y cuando hay multicolinealidad entre los valores de X.

#### **2.1.3.4. Análisis discriminante por regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA)**

Un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) es una variante del enfoque de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS). Proporciona la capacidad de construir un modelo multidimensional para la predicción de las características, implementado en la variable dependiente Y, utilizando variables independientes X. La base de PLS-DA es reducir el tamaño de los datos originales X y reemplazarlo con la matriz de scores y loadings maximizando la covarianza entre X e Y. El nivel de reducción se describe por el número de las llamadas variables latentes (LV) significativas. Un modelo de mínimos cuadrados parciales simplificado con f variables latentes puede presentarse como:

$$\begin{aligned} X &= TP^T + E \\ Y &= UH^T + G \end{aligned}$$

Donde T, P y E son matrices de scores, loadings y matrices residuales para X, respectivamente, mientras que U, H y G son matrices de scores, loading y matrices residuales para Y, respectivamente.

El procedimiento PLS-DA (como PLS) pertenece al grupo de los métodos de aprendizaje supervisados. Significa que ambas matrices X e Y se utilizan en el cálculo del modelo. De ese modo, el modelo multidimensional descubre la relación entre los datos (por ejemplo, la relación entre las señales y las concentraciones correspondientes o la relación entre las señales y la afiliación del objeto considerado a uno de los grupos discriminantes) [146].

## 2.2. Artículos científicos

En esta tesis doctoral se han desarrollado métodos dirigidos y no dirigidos, utilizando LC-HRMS en combinación con métodos quimiométricos multivariantes (análisis de componentes principales, análisis por regresión de mínimos cuadrados parciales y análisis discriminante por regresión de mínimos cuadrados parciales) para la caracterización, clasificación y autenticación de productos naturales y productos farmacéuticos a base de arándanos rojos Americanos. Estos estudios han dado lugar a dos publicaciones, las cuales se incluyen en las siguientes secciones.

Publicación II: Artículo científico

Detection and quantitation of frauds in the authentication of cranberry-based extracts by UHPLC-HRMS (orbitrap) polyphenolic profiling and multivariate calibration methods.

S. Barbosa; N. Pardo-Mates; M. Hidalgo-Serrano; J. Saurina; L. Puignou; O. Núñez  
*J. Agric. Food Chem.*, 2018, vol. 66, núm. 35, pp. 9353-9365.

Publicación III: Artículo científico

UHPLC-HRMS (orbitrap) fingerprinting in the classification and authentication of cranberrybased natural products and pharmaceuticals using multivariate calibration methods.

S. Barbosa; N. Pardo-Mates; M. Hidalgo-Serrano; J. Saurina; L. Puignou; O. Núñez  
*Anal. Methods*, 2019, vol. 11, pp. 3341-3349.

### 2.2.1. Publicación II: Artículo científico

*Detection and quantitation of frauds in the authentication of cranberry-based extracts by UHPLC-HRMS (orbitrap) polyphenolic profiling and multivariate calibration methods.*

S. Barbosa; N. Pardo-Mates; M. Hidalgo-Serrano;

J. Saurina; L. Puignou; O. Núñez

*J. Agric. Food Chem.*, 2018, vol. 66, núm. 35, pp. 9353-9365.



# Detection and Quantitation of Frauds in the Authentication of Cranberry-Based Extracts by UHPLC-HRMS (Orbitrap) Polyphenolic Profiling and Multivariate Calibration Methods

Sergio Barbosa,<sup>†</sup> Naiara Pardo-Mates,<sup>†</sup> Miriam Hidalgo-Serrano,<sup>†</sup> Javier Saurina,<sup>†,‡</sup> Lluís Puignou,<sup>†,‡</sup> and Oscar Núñez<sup>\*,†,‡,§</sup>

<sup>†</sup>Department of Chemical Engineering and Analytical Chemistry, University of Barcelona, Martí i Franquès 1-11, E08028 Barcelona, Spain

<sup>‡</sup>Research Institute in Food Nutrition and Food Safety, University of Barcelona, Avenida Prat de la Riba 171, Edifici Recerca (Gaudí), E-08901 Barcelona, Santa Coloma de Gramanet, Spain

## Supporting Information

**ABSTRACT:** UHPLC-HRMS (Orbitrap) polyphenolic profiling was applied to the characterization, classification, and authentication of cranberry-based natural and pharmaceutical products. Fifty three polyphenolic standards were characterized to build a user-accurate mass database which was then proposed to obtain UHPLC-HRMS polyphenolic profiles by means of ExactFinder software. Principal component analysis results showed a good sample discrimination according to the fruit employed. Regarding cranberry-based pharmaceuticals, discrimination according to the presentation format (syrup, sachets, capsules, etc.) was also observed due to the enhancement of some polyphenols by purification and preconcentration procedures. Procyanidin A2 and homogentisic, sinapic, veratric, cryptochlorogenic, and caffeic acids showed to be important polyphenols to achieve cranberry-based products discrimination against the other studied fruits. Partial least-squares regression allowed the determination of adulterant percentages in cranberry-fruit samples. Very satisfactory results with adulteration quantification errors lower than 6.0% were obtained even at low adulteration levels.

**KEYWORDS:** polyphenols, cranberry, food characterization, food authentication, UHPLC, high-resolution mass spectrometry, Orbitrap

## ■ INTRODUCTION

Food manufacturers and society are concerned about food product quality. Foodstuffs are complex products including, mainly, naturally occurring substances, but other compounds such as those migrating from packaging materials or those coming from technological and agrochemical processes can also be present. Typically, organoleptic and socioeconomic factors influence foodstuff consumer preferences. However, nowadays the presence of bioactive substances with healthy effects is gaining interest in the society. Unfortunately, fraudulent practices derived from food product adulterations by substitution, for instance, of the most valued components for others of lower commercial value and lower health beneficial properties are being employed to reduce food production costs.<sup>1</sup> For example, the addition of a cofruit (a more economic and accessible fruit) to the final fruit-based processed foodstuffs such as juices is among the most common fraudulent practices that can be found in the fruit industry.<sup>2</sup> Fruit-based pharmaceutical preparations are also susceptible of fraudulent practices.

Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) and its derivatives have shown several health beneficial effects based on their ability to prevent urinary tract infections by hindering the adhesion of pathogenic bacteria to the urinary tract uroepithelial cells. This bioactivity is attributed to the presence of some specific flavan-3-ol polyphenols such as proanthocyanidins (PACs). These substances are classified into A-type and B-type PACs

depending on the interflavan linkage between their monomeric units. When they are linked between the C6 or C8 position of the lower monomeric unit and the C4 position of the upper monomeric unit they are considered B-type PACs. When an additional interflavan linkage through an ether-type bond between the C7 or C5 position of the lower monomeric unit and the C2 position of the upper monomeric unit is present, the compounds are classified as A-type PACs.<sup>3</sup> However, only A-type PACs, which accounts for more than 65% of the PAC content in cranberries, exhibit bioactive activity to prevent urinary tract infections.<sup>4–7</sup> In contrast, B-type PACs, which are found in other fruits such as blueberry, raspberry, and grapes, do not show this activity. Recently, some commercial pharmaceutical preparations supposedly produced only from cranberry extracts (and commercialized to prevent urinary tract infections) are adulterated with other less expensive fruit-based extracts (obtained from grapes or blueberries) poor in the desired bioactive polyphenols. This is because the overall contents of PACs are roughly assessed in pharmaceutical laboratories by a simple colorimetric analysis based on the reaction of PACs with 4-dimethylaminocinnamaldehyde (DMAC)<sup>8,9</sup> unable to differentiate among A- and B-type

**Received:** May 31, 2018

**Revised:** August 18, 2018

**Accepted:** August 21, 2018

**Published:** August 21, 2018

Table 1. Chemical Structures and Classification of the Studied Polyphenols

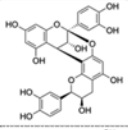
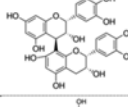
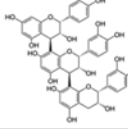
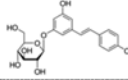
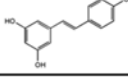






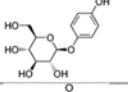
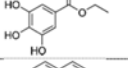
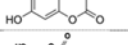
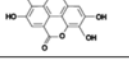
Compounds	Formula	CAS number	Structure
<i>Phenolic acids</i>			
4-Hydroxybenzoic acid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	99-96-7	
p-Coumaric acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	501-98-4	
Sinapic acid	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	530-59-6	
Vanillic acid	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	121-34-6	
Homovanillic acid	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	306-08-1	
Homogentisic acid	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	451-13-8	
Chlorogenic acid	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	327-97-9	
Cryptochlorogenic acid	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	905-99-7	
Gallic acid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	149-91-7	
Ferulic acid	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	537-98-4	
Gentisic acid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	490-79-9	
Caffeic acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	331-39-5	
Syringic acid	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	530-57-4	
Rosmarinic acid	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	20283-92-5	
<i>Flavones</i>			
Fisetin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	528-48-3	
Taxifolin	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	480-18-2	
Rutin	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	207671-50-9	
Quercetin	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>	6151-25-3	
Quercitrin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	522-12-3	
Nepetin-7-glucoside	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	569-90-4	
Hesperidin	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	520-26-3	



Table 1. continued

Compounds	Formula	CAS number	Structure
Cirsimaritin	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	6601-62-3	
Myricetin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub>	529-44-2	
Luteolin-7-O-β-d-glucuronide	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>12</sub>	38934-20-2	
Genkwanin	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	437-64-9	
Morin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	654055-01-3	
Kaempferol	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	520-18-3	
Quercetin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	117-39-5	
Homoplantagin	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	17680-84-1	
<b>Flavanols</b>			
(+)-Catechin	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	7295-85-4	
(-)-Epicatechin	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	490-46-0	
(-)-Epigallocatechin gallate	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	989-51-5	
<b>Phenolic terpenes</b>			
Carnosic acid	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	3650-09-07	
Anemosapogenin	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	85999-40-2	
Rosmanol	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	80225-53-2	
Betulinic acid	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>	472-15-1	
Asiatic acid	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>5</sub>	464-92-6	
Carnosol	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	5957-80-2	
12-methoxycarnosic acid	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	3650-09-07	

Table 1. continued

Compounds	Formula	CAS number	Structure
<b>Proanthocyanidins</b>			
Procyanidin A2	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	41743-41-3	
Procyanidin B2	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	29106-49-8	
Procyanidin C1	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>	37064-30-5	
<b>Stilbenes</b>			
Polydatin	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	65914-17-2	
Resveratrol	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	501-36-0	
<b>Phenolic aldehydes</b>			
3,4-dihydroxybenzaldehyde	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	139-85-5	
Syringaldehyde	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	134-96-3	
Vanillin	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	121-33-5	
<b>Benzoic acids</b>			
Veratric acid	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	93-07-2	
<b>Cinnamic acids</b>			
trans-Cinnamic acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	140-10-3	
<b>Other Phenolics</b>			
Tyrosol	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	501-94-0	
Arbutin	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	497-76-7	
Ethyl gallate	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	831-61-8	
Umbelliferon	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	93-35-6	
Ellagic acid	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	746-66-4	

PACs. Thus, quality control of raw fruit extract materials (cranberry, blueberry, raspberry, and grapes) as well as food-processed products require reliable, selective, and effective methods for food authentication and for the prevention of frauds.

Nowadays, society is increasingly interested in polyphenols (aromatic secondary metabolites widely distributed into the plant kingdom) because of their great abundance in our diet but mainly due to their role in the prevention of some diseases based on their antioxidant properties.<sup>10–12</sup> Furthermore, apart

from their contribution to sensorial attributes such as the flavor and color properties of food products,<sup>13,14</sup> polyphenols have been recognized as relevant food descriptors. Polyphenolic content can be influenced by multiple parameters: environment climatic conditions, water availability sources, growing and cultivation techniques, soil management practices, degree of fruit maturation, etc. Thus, polyphenolic distribution and content can be used as analytical data to establish food authentication for correct product designations of origin (PDO) assignments and for the prevention of frauds. For

instance, some fruit characteristic polyphenolic compounds have been successfully employed to detect frauds in nectars, fruit juices, and jams adulterated with cheaper fruits.<sup>2,15,16</sup> Thus, polyphenolic profiling and fingerprinting are very promising tools for the determination of food authenticity due to their taxonomic specificity in fruits.<sup>16,17</sup> For example, phlorizin and phloretin in the case of apples, arbutin in pears, naringenin derivatives in the case of citric fruits, and punicalagins (ellagic acid derivatives) for pomegranate are specific polyphenols characteristic of the commented fruits.<sup>2,15,18–20</sup> Among polyphenols, anthocyanins are abundant in berries and grapes, and they have a strong influence in both flavor and color attributes. They have also been exploited by some authors as potential markers of grape varieties,<sup>21–23</sup> cherries,<sup>24,25</sup> blueberries,<sup>26</sup> and other berries.<sup>27</sup> However, in some cases, the reported anthocyanin content on some berry fruits is inconsistent, a fact that is unlikely ascribed only to the geographical location and environment differences. Other factors such as the sample extraction methods employed and postharvest actions including the storage conditions are more likely to explain these differences.<sup>28,29</sup>

The determination of polyphenolic compounds in foodstuff is complex not only because of the food matrix but also due to the diversity of polyphenols, with a great variability of chemical structures, that may be present. In addition, polyphenols have a wide range of polarities and sizes (simple phenolic acids, tannins, etc.), and they can be found in a wide range of concentration levels.<sup>30</sup> Thus, polyphenolic separation, determination, and identification, as well as their sample extraction, are hindered by the chemical diversity within this family of compounds. The determination of polyphenols in fruit-based products is mainly addressed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry or tandem mass spectrometry (LC-MS(/MS)) techniques. Electrospray as ionization source and triple quadrupole, ion-trap, and linear ion-trap as MS analyzers are typically employed.<sup>15,30–33</sup> Recently, atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and atmospheric pressure photoionization (APPI) have also been described for the mass spectrometric ionization and determination of polyphenols.<sup>34–36</sup> Today, high-resolution mass spectrometry (HRMS) techniques and the accurate mass measurements achieved with time-of-flight (TOF) and Orbitrap analyzers have also gained popularity in the characterization, identification, and determination of polyphenols in foodstuffs.<sup>30,37,38</sup>

Recently, the use of polyphenolic compositional fingerprints and profiles as a source of information to achieve the classification of samples and their authentication in the prevention of frauds by means of chemometric methods is emerging.<sup>17,30,39,40</sup> The profiling approach employs the concentrations of targeted polyphenols as data, while in the fingerprinting approach data consists of instrumental signals such as intensity counts registered as a function of retention time and  $m/z$  values. The extraction of relevant information on descriptive and functional foodstuff characteristics to address the characterization and classification of products and for authentication purposes is achieved by further chemometric analysis of these data.<sup>30</sup>

This work aims at developing a UHPLC-HRMS (Orbitrap) method for the detection and quantitation of frauds in the authentication of fruit-based extracts by means of a targeted polyphenolic profiling and multivariate calibration. For that purpose, the 53-targeted polyphenols belonging to different families were fully characterized in terms of HRMS and

product ion scan spectra with stepped normalized collision energies with accurate mass measurements as well as retention time under reversed-phase separation conditions. An accurate mass database was built from such spectral and chromatographic data. Then different classes of fruit-based (cranberry, blueberry, raspberry, and grape) products including the raw fruit extracts, fruit juices, and raisins as well as commercially available cranberry-based pharmaceuticals including raw extracts, powder capsules, syrup, and sachets were analyzed after a simple sample extraction with acetone/water/hydrochloric acid (70:29.9:0.1 v/v/v). Data corresponding to the 53-targeted polyphenolic compounds was employed as chemical descriptors to achieve the classification of the analyzed samples by principal components analysis (PCA). Partial least-squared (PLS) regression was then applied to quantify fruit adulteration levels (grape, blueberry, and raspberry) in cranberry samples.

## MATERIALS AND METHODS

**Reagents and Solutions.** Unless otherwise indicated, all standards and chemicals used in this work were of analytical grade. Fifty-three polyphenolic standards belonging to different families (phenolic acids, benzoic acids, cinnamic acids, phenolic aldehydes, phenolic terpenes, flavones, flavanols, proanthocyanidins, and stilbenes) were employed, and their chemical formula, CAS number, and structure are given in Table 1. All of the studied polyphenols were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

LC-MS grade water, methanol, acetonitrile, formic acid (98–100%), and acetone were also purchased from Sigma-Aldrich, and hydrochloric acid (98%) was from Merck (Seelze, Germany).

Stock standard solutions of all polyphenols (~1000 mg/L) were prepared in LC-MS-grade methanol in amber-glass vials. Intermediate working solutions were prepared weekly from these stock standard solutions by appropriate dilution with LC-MS-grade water. All stock solutions were stored at 4 °C for not more than 1 month.

**Instrumentation.** Chromatographic separation was carried out on an Accela UHPLC system (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA) equipped with a quaternary pump, an autosampler, and a column oven. A porous-shell Ascentis Express C18 reversed-phase column (150 × 2.1 mm, 2.7 μm partially porous particle size) provided by Supelco (Bellefonte, PA, USA) was used for the proposed method. Separation under gradient elution based on 0.1% formic acid aqueous solution (solvent A) and acetonitrile also containing 0.1% formic acid (solvent B) was as follows: 0–1 min, isocratic conditions at 10% B; 1–20 min, linear gradient from 10% to 95% B; 20–23 min, isocratic step at 95% B; 23–24 min back to initial conditions at 10% B; and from 24 to 30 min, isocratic conditions at 10% B to re-equilibrate the column. The mobile phase flow rate was 300 μL/min, and the injection volume employed (in full loop mode) was 10 μL.

The UHPLC system was coupled to a Q-Exactive Orbitrap HRMS system (Thermo Fisher Scientific) equipped with a heated electrospray ionization source (HESI-II) operated in negative ionization mode. Nitrogen was used as a sheath gas, sweep gas, and auxiliary gas at flow rates of 60, 0, and 10 au (arbitrary units), respectively. HESI-II heater temperature at 350 °C and capillary voltage at –2.5 kV were applied. Instrument capillary temperature was set at 320 °C, and an S-Lens RF level of 50 V was used. The Q-Exactive Orbitrap HRMS system was tuned and calibrated using commercially available Thermo Fisher calibration solution every 3 days. The HRMS instrument was operated in full MS scan mode with a  $m/z$  range from 100 to 1500 at a mass resolution of 70 000 full width at half-maximum (fwhm) at  $m/z$  200, with an automatic gain control (AGC) target (the number of ions to fill the C-Trap) of 1.0E6 with a maximum injection time (IT) of 200 ms. Full MS scan mode was followed by a data-dependent scan operated product ion scan mode and applying for the fragmentation-stepped normalized collision energies (NCE) of 17.5, 35, and 52.5 eV. Product ion spectra with an isolation window of 0.5  $m/z$  and a fixed first mass of  $m/z$  50 were registered. At this stage, a mass resolution of

Table 2. HRMS and MS/HRMS (Product Ion Spectra) of the Studied Polyphenolic Compounds

compounds	RT (min)	chemical formula	HRMS spectrum			MS/HRMS spectrum		
			[M - H] <sup>-</sup> m/z calcd value	[M - H] <sup>-</sup> m/z experimental value	accurate mass error (ppm)	fragment ions (m/z)	assignment	accurate mass error (ppm)
phenolic acids								
4-hydroxybenzoic acid	4.1	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	137.02442	137.02428	-1.022	93.03453	[M - H - COO] <sup>-</sup>	-0.626
<i>p</i> -coumaric acid	5.8	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	163.04007	163.04005	-0.123	119.05017	[M - H - COO] <sup>-</sup>	-0.573
sinapic acid	6.2	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	223.0612	223.06089	-1.390	208.03748	[M - H - CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	-1.161
vanillic acid	4.6	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	167.03498	167.03487	-0.659	193.01442	[M - H - C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> ] <sup>-</sup>	0.898
						152.01118	[M - H - CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	-2.150
						123.04528	[M - H - COO] <sup>-</sup>	1.034
						108.02161	[M - H - C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	-0.627
homovanillic acid	4.9	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	181.05063	181.05076	0.718			
homogentisic acid	2.1	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	167.03498	167.03485	-0.778	123.04506	[M - H - COO] <sup>-</sup>	-0.754
chlorogenic acid	3.8	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	353.08781	353.08782	0.028			
cryptochlorogenic acid	4.2	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	353.08781	353.08795	0.397	191.05617	[M - H - C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	0.307
						179.03503	[M - H - C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	0.268
						173.04546	[M - H - C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	-0.501
						135.04512	[M - H - C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub> ] <sup>-</sup>	-0.243
gallic acid	1.5	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	169.01425	169.01428	0.177	125.02431	[M - H - COO] <sup>-</sup>	-0.858
ferulic acid	6.3	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	193.05063	193.05073	0.518	134.03723	[M - H - C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	-0.730
gentisic acid	4.3	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	153.01933	153.01919	-0.915	109.02942	[M - H - COO] <sup>-</sup>	-0.759
caffeic acid	4.7	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	179.03498	179.03474	-1.341			
syringic acid	4.8	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	197.04555	197.04568	0.660			
rosmarinic acid	7.2	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	359.07724	359.07722	-0.058	197.04576	[M - H - C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	1.082
						179.03477	[M - H - C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	-1.184
						161.02420	[M - H - C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	-1.350
						135.04501	[M - H - C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> ] <sup>-</sup>	-1.057
						123.04506	[M - H - C <sub>11</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> ] <sup>-</sup>	-0.133
						72.99301	[M - H - C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	-1.469
flavones								
fisetin	7.4	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	285.04046	285.0463	0.596	229.05011	[M - H - C <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	-2.279
						163.00324	[M - H - C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	-2.711
taxifolin	6.5	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	303.05103	303.05120	0.561			
rutin	5.8	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	609.14611	609.14665	0.886	301.03543	[M - H - C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub> ] <sup>-</sup>	0.180
						300.02759	[M - H - C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub> ] <sup>-</sup>	0.131
						271.02469	[M - H - C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub> ] <sup>-</sup>	-0.447
						255.02975	[M - H - C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> ] <sup>-</sup>	-0.575
						243.02921	[M - H - C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> ] <sup>-</sup>	-2.825
quercitrin	6.7	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	447.09328	447.09338	0.224	301.03551	[M - H - C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	0.445
						300.02746	[M - H - C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	-0.303
						271.02432	[M - H - C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	-1.812
						255.02910	[M - H - C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>10</sub> ] <sup>-</sup>	-3.124
						151.00333	[M - H - C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub> ] <sup>-</sup>	-2.330
nepetin-7-glucoside	6.3	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	477.10385	477.10381	-0.084	327.05170	[M - H - C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	2.061
						299.01971	[M - H - C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	-0.053
hesperidin	6.8	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	609.18249	609.18272	0.378	301.07175	[M - H - C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub> ] <sup>-</sup>	3.605
circsimarinin	11.2	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	313.07176	313.07191	0.479	283.02478	[M - H - C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> ] <sup>-</sup>	-0.110
myricetin	4.7	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub>	317.03029	317.03037	0.252			
luteolin-7-O-β-D-glucuronide	6.2	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>12</sub>	461.07255	461.07282	0.586	285.04047	[M - H - C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> ] <sup>-</sup>	0.031
genkwanin	12.5	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	283.06120	283.06119	-0.035	268.03782	[M - H - CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	0.367
morin	8.0	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	301.03528	301.03530	-0.266	151.00340	[M - H - C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	-1.867
						148.01627	[M - H - C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	-2.177
						125.02435	[M - H - C <sub>9</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	-0.538
						107.01381	[M - H - C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	-0.399
						83.01386	[M - H - C <sub>11</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	0.088
kaempferol	9.9	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	285.04046	285.04047	0.035			
quercetin	6.5	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	301.03538	301.03534	-0.133			
homoplantagin	6.9	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	461.10893	461.10912	0.402	283.02475	[M - H - C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	-0.216
flavones								
(+)-catechin	4.0	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	289.07176	289.07181	0.173	245.08175	[M - H - COO] <sup>-</sup>	3.732
						203.07145	[M - H - C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	0.406

Table 2. continued

compounds	RT (min)	chemical formula	HRMS spectrum			MS/HRMS spectrum		
			[M - H] <sup>-</sup> m/z calcd value	[M - H] <sup>-</sup> m/z experimental value	accurate mass error (ppm)	fragment ions (m/z)	assignment	accurate mass error (ppm)
flavones								
(-)-epicatechin	4.9	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	289.07176	289.07181	0.173	123.04513	[M - H - C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	-0.185
						109.02938	[M - H - C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	-1.125
						245.08160	[M - H - COO] <sup>-</sup>	-1.355
						203.07156	[M - H - C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	0.948
						123.04504	[M - H - C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	-0.917
						109.02942	[M - H - C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	-0.759
(-)-epigallocatechin gallate	5.5	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	457.07763	457.07729	-0.744			
phenolic terpenes								
carosolic acid	17.1	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	331.19148	331.19145	-0.091	287.20172	[M - H - COO] <sup>-</sup>	0.232
anemosapogenin	15.5	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	471.34798	471.34788	-0.212			
rosmanol	11.8	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	345.17075	345.17062	-0.377			
betulinic acid	20.0	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>	455.35307	455.35318	0.245			
asiatic acid	12.5	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>5</sub>	487.34290	487.34293	0.062			
carosol	15.2	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	329.17583	329.17599	0.486	285.18607	[M - H - COO] <sup>-</sup>	0.234
12-methoxycarnosic acid	18.2	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	345.20713	345.20695	-0.521	301.21722	[M - H - COO] <sup>-</sup>	-0.277
						286.19376	[M - H - C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	-0.239
proanthocyanidins								
procyanidin A2	6.5	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	575.11950	575.11996	0.800	285.04068	[M - H - C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> ] <sup>-</sup>	0.767
procyanidin B2	2.7	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	577.13515	577.13525	0.173			
procyanidin C1	5.1	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>	865.19854	865.19998	1.664			
stilbenes								
polydatin	7.0	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	389.12419	389.12450	0.797	227.07114	[M - H - C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	-1.002
resveratrol	8.9	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	227.07137	227.07140	0.132			
phenolic aldehydes								
3,4-dihydroxybenzaldehyde	3.9	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	137.02442	137.02413	-2.116			
syringaldehyde	6.0	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	181.05063	181.05073	0.552			
vanillin	5.8	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	151.04007	151.03984	-1.506			
benzoic acids								
veratric acid	7.6	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	181.05063	181.05065	0.110			
cinnamic acids								
trans-cinnamic acid	9.2	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	147.04515	147.04525	0.680			
other phenolics								
tyrosol	4.9	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	137.06080	137.06071	-0.657			
arbutin	1.3	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	271.08233	271.08229	-0.148	108.02164	[M - H - C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	-0.349
ethyl gallate	5.9	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	197.04555	197.04542	-0.660	169.01402	[M - H - C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	-1.341
						124.01646	[M - H - C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	-1.067
umbelliferon	6.3	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	161.02442	161.02438	-0.248			
ellagic acid	6.0	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	300.99899	300.99901	0.066			

17 500 fwhm at  $m/z$  200, with an AGC target at  $2.0 \times 10^5$ , and a maximum IT of 200 ms were employed. Data-dependent scan was triggered with an intensity threshold of 1.0E5.

**Samples and Sample Treatment.** One hundred six samples including cranberry-based natural products (21 juices, 4 fruits, and 8 raisins), grape-based natural products (17 juices, 4 fruits, and 8 raisins), blueberry-based natural products (6 juices and 6 fruits), raspberry-based natural products (10 fruits), and cranberry-based pharmaceutical preparations presented in different formats (5 raw extracts, 11 capsules, 4 sachets, and 2 syrups) were analyzed in this work. Natural fruit products were purchased from Barcelona markets. Juice products from different trademarks (Granini, El Corte Inglés, OceanSpray, Int-Salim and Lambda) were employed. Raisin samples were obtained from Barcelona markets and from several commercially available trademarks (Eroski and Hacendado). Cranberry-based pharmaceutical raw extracts (Cysticran 40, several lots) were obtained from Deiters S. L. (Barcelona, Spain). Other cranberry-based pharmaceutical products (several lots) in different formats were obtained from the next sources: raw extracts Cysticran 40 from Naturex-DBS (Sagamore, MA, USA); sachets Cysticlean from Vita

Green (Hong Kong, China) and sachets Urell from Pharmatoka (Rueil-Malmaison, France); capsules Cystop from Deiters, capsules Urell from Pharmatoka, capsules Cranberola Cis-control from Arkopharma (Madrid, Spain), capsules Urosens from Salvat (Barcelona, Spain), and capsules Monorelle from Zambon (Bresso, Italy); and syrup Urell from Pharmatoka.

An Ultra-Turrax machine from Ika (Staufen, Germany) was used to grind fruit and raisin samples. Raisin samples were mixed with water to help the crushing. Cranberry-based pharmaceutical syrups, fruits, and raisins were freeze dried to obtain completely lyophilized products (Telstar LyoQuest lyophilizer, Terrasa, Spain) following the method described by Pardo-Mates et al.<sup>3</sup> Briefly, a 24 h gradient temperature ramp from  $-80$  °C to room temperature, followed by 6.5 h at  $40$  °C, was employed for lyophilization.

Sample treatment was carried out following a previously described method with some modifications.<sup>30,32,36,41,42</sup> Briefly, 0.1 g of sample was extracted by sonication using 10 mL of an acetone:water:hydrochloric acid (70:29.9:0.1 v/v/v) solution, and the supernatant extracts obtained after centrifugation (3500 rpm, 15 min) were filtered (0.45  $\mu$ m nylon filters, Whatman, Clifton, NJ, USA) and kept

at  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  until their analysis. Besides, a quality control (QC) sample was prepared by mixing  $50\text{ }\mu\text{L}$  of each sample extract. The QC was employed to evaluate the repeatability of the proposed method and the robustness of the chemometric results. All samples were analyzed randomly, and QCs were introduced every 10 samples.

Cranberry extracts (pure samples) were adulterated with different quantities of other fruits to perform authentication studies by PLS regression. Standard and unknown samples used in the PLS calibration and prediction sets were prepared using fruit extracts obtained as previously indicated. Pure extracts and cranberry-fruit adulterated extracts (from 2% to 50% adulteration levels) were employed.

**Data Analysis.** HRMS raw data was processed by ExactFinder v2.0 software (Thermo Fisher Scientific) by applying a user target accurate mass database list comprising the 53 studied and characterized polyphenols. Parameters including chromatographic retention time, accurate mass errors, isotopic patterns, and product ion spectra with stepped normalized collision energies were used for identification and confirmation purposes.

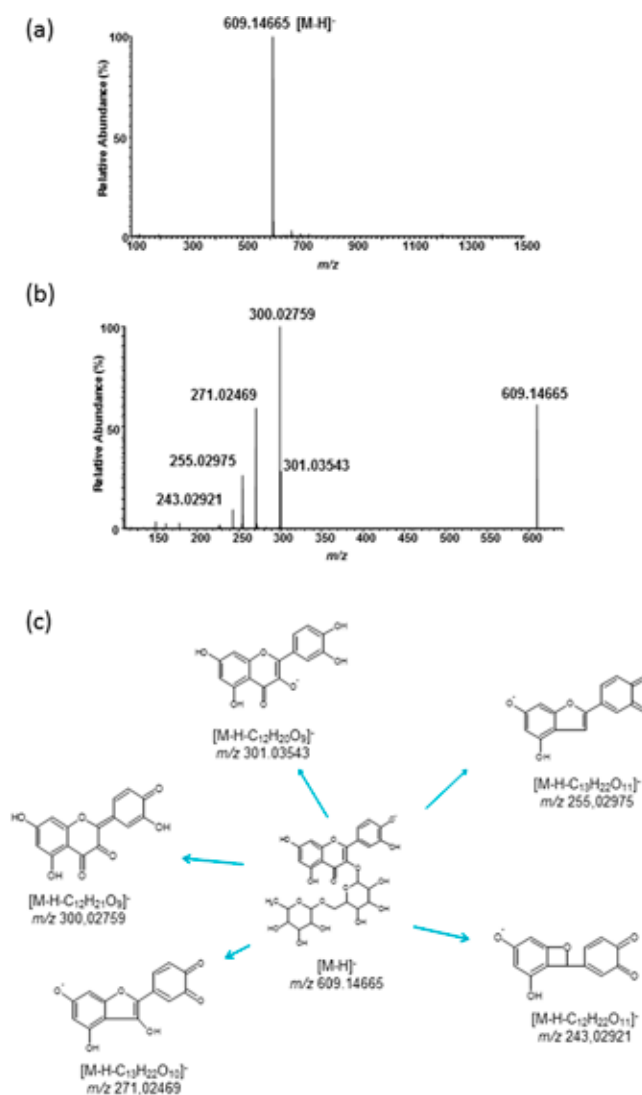
Stand Alone Chemometrics Software (SOLO) obtained from eigenvector Research was employed for the calculations using PCA and PLS regression.<sup>43</sup> A theoretical background description of these chemometric procedures is described elsewhere.<sup>44</sup>

Data matrices to be treated by PCA consisted of the peak area values of the 53 studied polyphenolic compounds found in the analyzed samples. The dimension of the matrix was  $106\text{ samples} \times 53\text{ analytes}$ . Normalization pretreatment with respect to the overall polyphenolic concentration was applied to provide similar weights to all of the samples. The structure of the maps of samples and variables was investigated using the principal components (PCs) scatter plots of scores and loadings, respectively. The distribution of samples on the PCs (plot of scores) showed patterns that may be correlated to sample properties such as the type of fruit. In contrast, the distribution of variables on the PCs (plot of loadings) showed information regarding correlations and dependences of the studied polyphenols with the fruit products.

The percentage of fruit-extract adulterants (grape, blueberry, or raspberry extracts) in the cranberry-based extracts was quantified by PLS. Samples available were distributed among training (calibration) and test (validation and prediction) sets (Table 1S, Supporting Information). For both training and test steps, X-data matrices consisted of the polyphenol peak area signals of the corresponding samples, and the Y-data matrices contained the adulteration fruit-extract percentages.

## RESULTS AND DISCUSSION

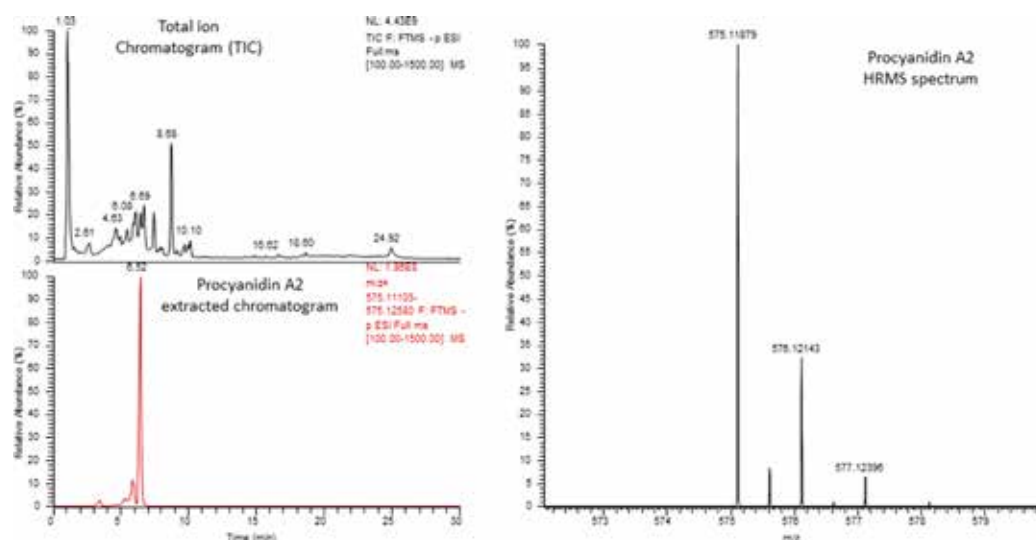
**HRMS Characterization of Targeted Polyphenolic Compounds.** In the present work, a total of 53 polyphenolic standards belonging to different families (phenolic acids, benzoic acids, cinnamic acids, phenolic aldehydes, phenolic terpenes, flavones, flavanols, proanthocyanidins, and stilbenes) were analyzed by reversed-phase chromatography using a C18 fused-core UHPLC column under universal gradient elution conditions with water and acetonitrile (both 0.1% formic acid) as mobile phase components. Before sample analysis, HRMS characterization of targeted polyphenolic compounds was performed. For that purpose, targeted polyphenols were grouped in six standard solutions (preventing isobaric compounds) and analyzed with the proposed UHPLC-HRMS method (see Materials and Methods) in negative ESI mode. Several parameters such as chromatographic retention times, HRMS spectra (at a resolution of 70 000 fwhm), and MS/HRMS product ion scan spectra (at a resolution of 17 500 fwhm) were established, and the data is summarized in Table 2. Although several coelutions were obtained within the analyzed polyphenols, these were clearly resolved by the high-resolution power of the Q-Exactive Orbitrap HRMS instru-



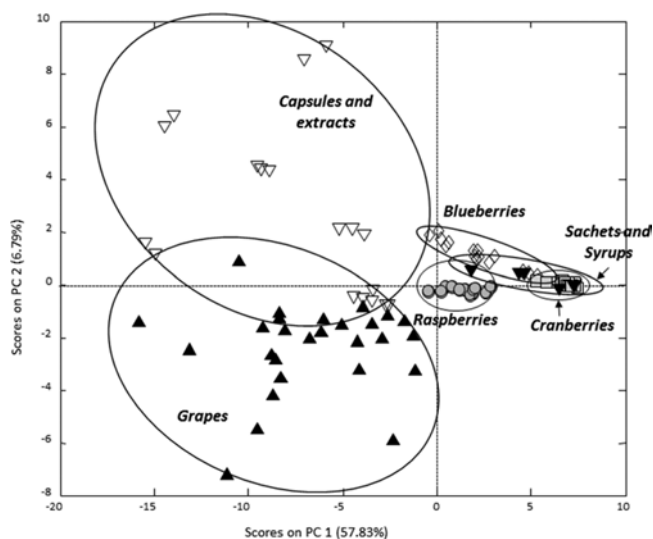
**Figure 1.** (a) HRMS spectrum, (b) MS/HRMS spectrum, and (c) fragmentation pathway of rutin.

ment. Regarding HRMS spectra, in general, all studied polyphenols provided as base peak the deprotonated molecule,  $[\text{M} - \text{H}]^-$ , which was then selected as the precursor ion for the MS/HRMS spectra (see as an example the HRMS spectrum of rutin in Figure 1a). As can be seen in Table 2, accurate mass measurements with errors below 1 ppm were obtained for almost all of the analyzed compounds (49 of 53), and only 4 polyphenols (sinapic acid, epigallocatechin gallate, procyanidin C1, and protocatechuic aldehyde) showed slightly higher mass errors, although always below 5 ppm. It should be pointed out that generally no in-source fragmentation was observed during the HRMS experiments, and for those cases where a slight in-source fragmentation was present the resulted signals were lower than 20% (relative abundance); hence, they were not considered relevant for the intended study (see as an example the MS/HRMS spectrum of rutin in Figure 1b).

Because of the great variety of chemical structures among the studied polyphenols (see Table 1), MS/HRMS spectra were obtained by a data-dependent acquisition mode based on product ion scan applying for the fragmentation stepped normalized collision energies (NCE) of 17.5, 35, and 52.5 eV. Thus, the product ion scan spectra were obtained as the



**Figure 2.** UHPLC-HRMS total ion chromatogram (TIC) for cranberry pharmaceutical raw extract sample E3, and extracted ion chromatogram and HRMS spectrum of procyanidin A2 in the same sample.



**Figure 3.** PCA score plot of PC1 vs PC2 obtained using UHPLC-HRMS polyphenolic profiles of all of the analyzed samples.

average spectrum of the three collision energies. The observed fragment ions, assignments, and accurate mass errors obtained are also summarized in Table 2. It should be mentioned that as the main objective of this work is to establish a fast targeted screening method to obtain discriminant polyphenolic profiles among the analyzed samples, optimal MS/HRMS conditions were not established for each compound, and data-dependent scan mode was triggered only if the obtained signal for the targeted polyphenols was higher than  $1.0E5$ . This would explain the fact that for some compounds no fragmentation was observed under the established acquisition conditions. As an example, Figure 1c shows the fragmentation pathway of rutin, one of the studied polyphenols, among others, that showed higher fragmentation under the applied conditions. Accurate mass measurements for all observed fragment ions with errors below 3.732 ppm were obtained.

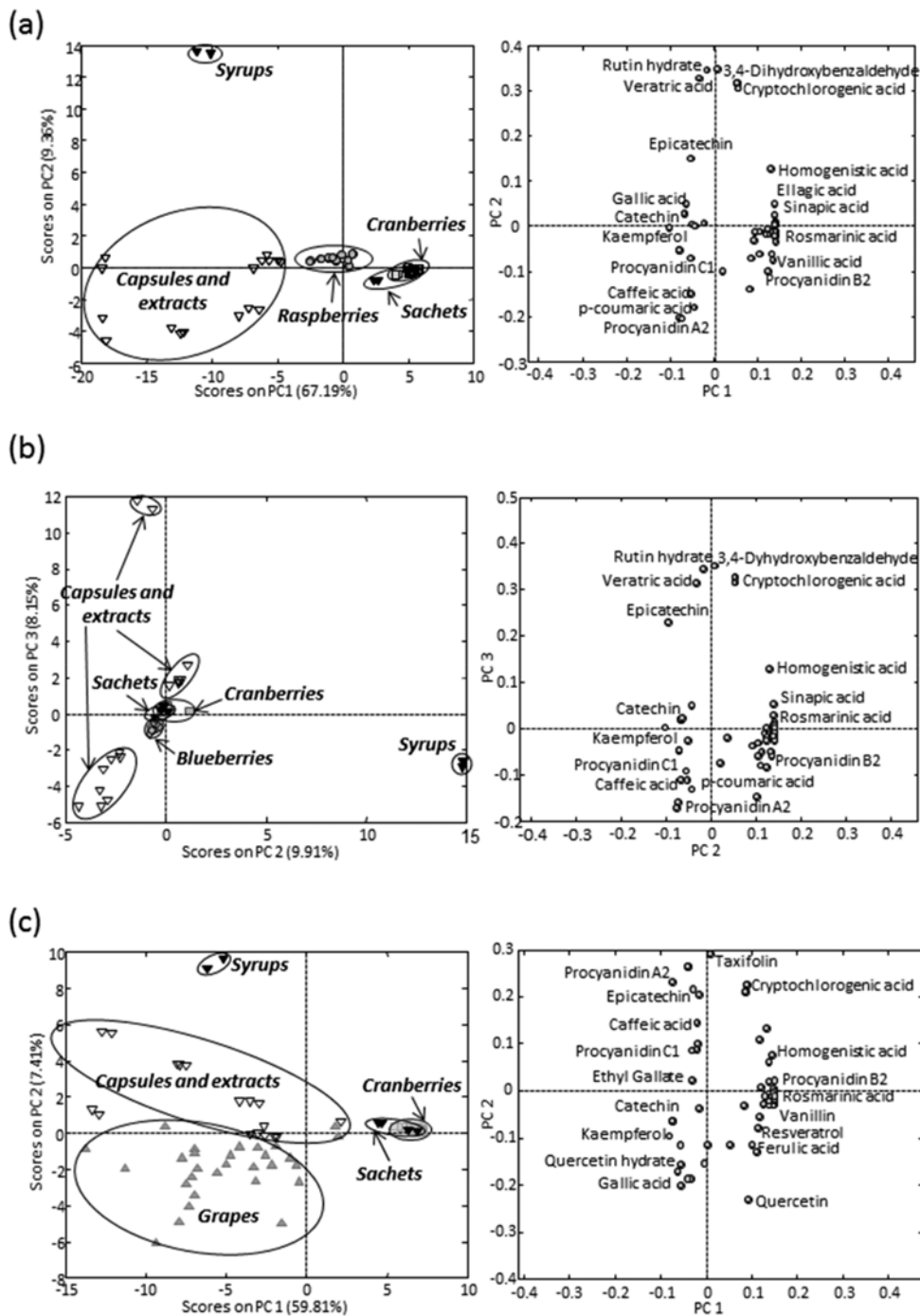
Spectral data was employed to build a user-accurate mass database of polyphenolic compounds for screening purposes with the ExactFinder software.

**UHPLC-HRMS Polyphenolic Profiling.** UHPLC-HRMS polyphenolic profiles of fruit-based products and cranberry-based pharmaceuticals were studied in order to see if polyphenolic profiles resulted in proper chemical data to achieve sample classification and authentication. For that purpose, a total of 106 samples were processed with a simple sample extraction method and the obtained extracts were analyzed with a C18 reversed-phase UHPLC-HRMS method using a fused-core column and a universal gradient elution profile (see Materials and Methods). Data was registered in HRMS full scan mode ( $m/z$  100–1500) and a data-dependent scan mode based on product ion scan with stepped normalized collision energies. As an example, Figure 2 shows the total ion chromatogram (TIC) obtained for the cranberry pharmaceutical raw extract sample E3. Extracted ion chromatogram and HRMS spectrum are also depicted in the figure.

Once all of the fruit-based and pharmaceutical sample extracts were analyzed, polyphenolic profiles were obtained by submitting the HRMS raw data to ExactFinder screening software and employing the user target accurate mass database list of the 53 characterized polyphenols previously commented. To simplify the obtained data, a threshold signal of  $1.0E5$  was set in the screening software to consider that a compound could be present in the sample. Moreover, several confirmation parameters such as accurate mass measurements (mass errors lower than 5 ppm), isotopic pattern matches (higher than 85%), product ion scan spectra, and chromatographic retention times were established. After raw data processing with ExactFinder software a report is provided for each sample depicting the peak areas of all of the targeted polyphenols found in agreement with the established confirmation criteria (Table 2S, Supporting Information shows the ExactFinder report obtained for the cranberry pharmaceutical raw extract sample E3).

UHPLC-HRMS polyphenolic profiles consisting of peak areas extracted by ExactFinder software in the fruit-based, pharmaceutical samples and QCs were then obtained.

**Exploratory Principal Component Analysis.** A data matrix containing the peak area information on the UHPLC-HRMS polyphenols of all analyzed samples was built to PCA exploration. The dimension of this polyphenolic matrix was



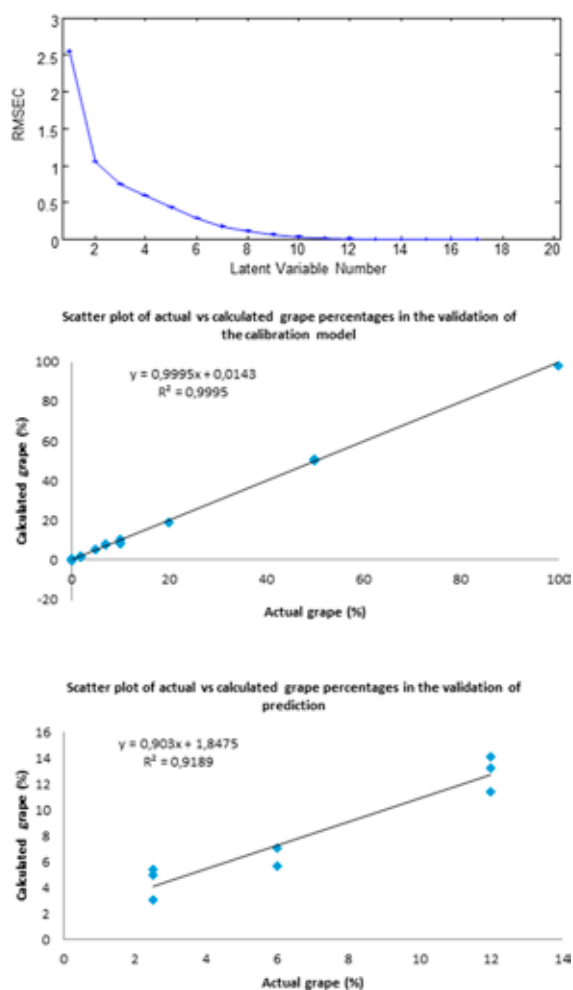
**Figure 4.** PCA score and loading plots of (a) PC1 vs PC2 for cranberry- and raspberry-based samples, (b) PC2 vs PC3 for cranberry- and blueberry-based samples, and (c) PC1 vs PC2 for cranberry- and grape-based samples.

106 samples  $\times$  53 variables. Data was autoscaled with respect to the overall polyphenolic signal to provide similar weights to all of the samples. Figure 3 shows the score plot of PC1 vs PC2. It should be commented that QCs (not shown in the figure) appeared grouped, showing a good repeatability and robustness of the proposed method. As can be seen, PC1 and PC2 roughly explained 65% of the data variance and a very acceptable discrimination among sample groups depending on the fruit of origin was achieved. For example, grape-based samples are grouped at the bottom of the score plot clearly separated from the other types of samples by PC2. Among the other samples, classification seems to be more related with

PC1. In general, clear groups can be distinguished among them with the exception of some blueberry-based samples that are clustered together with some of the cranberry-based samples. Anyway, cranberry fruit samples are clearly discriminated from the raspberry ones. An interesting behavior was observed with the analyzed cranberry pharmaceutical samples. Those manufactured as sachets and syrups were grouped together with cranberry-fruit samples, while raw cranberry pharmaceutical extracts and capsules were completely discriminated and perfectly separated.

To better study this behavior and taking into consideration that the raspberry, blueberry, and grape extracts are expected





**Figure 5.** PLS model applied to the quantitation of the grape percentage on cranberry-fruit extracts adulterated when using UHPLC-HRMS polyphenolic profiles.

**Table 3. Prediction Errors by PLS Regression in the Quantification of Cranberry-fruit Extracts Adulterated with Raspberry-, Blueberry-, and Grape-fruit Extracts**

adulterant	no. of latent variables	calibration error	prediction error
grape	3	<0.01%	2.86%
blueberry	3	<0.01%	2.71%
raspberry	3	<0.01%	5.96%

to be used as adulterants of cranberry extracts, as previously commented in the introduction section, independent PCA models between cranberry-based samples and the other three fruit families studied were evaluated. Figure 4 shows the score and loading plots of (a) PC1 vs PC2 for cranberry- and raspberry-based samples, (b) PC2 vs PC3 for cranberry- and blueberry-based samples, and (c) PC1 vs PC2 for cranberry- and grape-based samples. As can be seen, cranberry-based samples can be clearly differentiated, in general, from the other types of fruits, showing that the UHPLC-HRMS profiling approach can be proposed as a useful method to achieve the characterization and classification of the analyzed samples as well as for the authentication of fruit extracts regarding the type of fruit employed. By analyzing the fruit extracts in pairs, the three PCA models showed that cranberry-based pharmaceuticals can be clearly distinguished in three groups:

capsules and extracts, syrups, and sachets, with the latest being those that are in the three cases grouped close to the cranberry-based fruit samples. It should be mentioned that when the study was performed against blueberry-based samples (Figure 4b), capsules and extracts were differentiated into three groups, although none of them can be attributed only to either capsule or sachet presentation formats. The great differences between the cranberry-based fruit samples with some of the cranberry-based pharmaceuticals (mainly syrups, capsules, and extracts) are clearly attributed to compositional differences associated with the technological treatment to produce such products. It has been found that concentration levels of the studied polyphenols are much higher in the pharmaceuticals since raw materials are subjected to purification and preconcentration processes. Hence, quantitative differences are partly compensated by data autoscaling, although qualitative differences due to the enrichment in active components occurring in the pharmaceuticals are displayed in the PCA model. This finding was attributed to the fact that the purification and preconcentration procedures followed by pharmaceutical companies in the preparation of raw extracts from cranberry-fruits enhanced the presence of some polyphenols in comparison to nontreated cranberry-fruit samples.

Loading plots revealed those polyphenols contributing more to the discrimination of the samples. In general terms, it can be said that polyphenols such as procyanidin A2, with A-type bonds, are clearly enhanced in some cranberry pharmaceuticals such as capsules, extracts, and syrups, a fact which was reasonably expected as the extract purification and enrichment was focused on increasing the proportion of oligomeric PACs with respect to more simple compounds (for the same reason, procyanidin C1 and B2 were also in this part of the loading plot). Caffeic and coumaric acids were other components displaying higher proportions in the nutraceuticals. On the contrary, in the untreated cranberry-based samples comprising fresh fruits and raisins, homogentisic, sinapic, and vanillic acids seemed to be abundant. Differences in the composition among raspberry and cranberry, and among blueberry and cranberry fruits were not so noticeable. More remarkable seemed to be the differences in the polyphenolics of cranberry with respect to grape, with the last class being richer in gallic acid and quercetin.

**Adulteration Prediction by Partial Least-Squares Regression.** The applicability of UHPLC-HRMS polyphenolic profiles for the authentication and quantitation of fraud levels of adulterant fruit extracts by PLS was also evaluated. For that purpose, cranberry-fruit extracts were adulterated with extracts of the other three fruits (blueberry, raspberry, and grapes) at different concentration levels (2%, 2.5%, 5%, 6%, 7%, 12%, 20%, and 50%). Triplicates of all of the adulterations as well as of 100% pure fruit extracts were prepared. Fifty percent adulteration was prepared in quintuplicate to evaluate data reproducibility. All sample extracts were then processed with the proposed sample treatment procedure and extract solutions analyzed with the UHPLC-HRMS method to obtain the polyphenolic profiles as previously explained. The calibration set (Table 1S, Supporting Information) was first employed to establish the PLS model as indicated in the experimental section. Venetian blinds cross validation method, considering 3 data splits, was used to estimate the number of latent variables (LV) used for the method assessment. The performance of both calibration and prediction steps to predict

adulterant percentages was studied under the selected model conditions. Figure 5 shows, as an example, the results obtained after applying the established PLS model for the prediction of grape adulterant levels in a cranberry-fruit extract. Calibration and prediction errors obtained in all of the adulteration cases studied are given in Table 3. As can be seen, very good quantitation of adulterant contents was obtained, with calibration errors in all cases below 0.01% and prediction errors in the range of 2.71–5.96%. It should be considered that the proposed PLS models were evaluated for predicting values of low adulteration levels (2.5%, 6%, and 12%), demonstrating the appropriate performance of the developed method.

The results obtained in this work demonstrate that UHPLC-HRMS polyphenolic profiles by a simple screening of a homemade accurate mass database can be employed to achieve the characterization, classification, and authentication of cranberry-based products and pharmaceuticals adulterated with more economic fruit-based extracts. HRMS provided, moreover, high selectivity and confirmation power to identify polyphenolic bioactive compounds that can be proposed as future biomarkers to address authentication issues of natural food-based products.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### 5 Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jafc.8b02855.

Samples employed in the training (calibration) and test (prediction and validation) sets for partial least squares regression; ExactFinder™ report for the cranberry pharmaceutical raw extract sample E3 (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Phone: 34-93-403-3706, Fax: 34-93-402-1233, E-mail: oscar.nunez@ub.edu.

### ORCID

Oscar Núñez: 0000-0001-5850-8972

### Funding

The authors are thankful for the financial support received from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness under the projects CTQ2014-56324-C2-1-P and CTQ2015-63968-C2-1-P and from the Agency for Administration of University and Research Grants (Generalitat de Catalunya, Spain) under the projects 2017SGR-171 and 2017SGR-310.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

§Serra Hunter Fellow, Generalitat de Catalunya, Spain.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Deiters S. L. Co. for providing some cranberry-based raw material extracts and several commercial cranberry-based pharmaceutical preparations.

## ■ REFERENCES

(1) Moore, J. C.; Spink, J.; Lipp, M. Development and Application of a Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration from 1980 to 2010. *J. Food Sci.* **2012**, *77* (4), R118–R126.

(2) Abad-García, B.; Garmón-Lobato, S.; Sánchez-Ilárduya, M. B.; Berrueta, L. A.; Gallo, B.; Vicente, F.; Alonso-Salces, R. M.

Polyphenolic contents in Citrus fruit juices: Authenticity assessment. *Eur. Food Res. Technol.* **2014**, *238* (5), 803–818.

(3) Pardo-Mates, N.; Vera, A.; Barbosa, S.; Hidalgo-Serrano, M.; Núñez, O.; Saurina, J.; Hernández-Cassou, S.; Puignou, L. Characterization, classification and authentication of fruit-based extracts by means of HPLC-UV chromatographic fingerprints, polyphenolic profiles and chemometric methods. *Food Chem.* **2017**, *221*, 29–38.

(4) Foo, L. Y.; Lu, Y.; Howell, A. B.; Vorsa, N. The structure of cranberry proanthocyanidins which inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli* in vitro. *Phytochemistry* **2000**, *54* (2), 173–181.

(5) Krueger, C. G.; Reed, J. D.; Feliciano, R. P.; Howell, A. B. Quantifying and characterizing proanthocyanidins in cranberries in relation to urinary tract health. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405* (13), 4385–4395.

(6) Gu, L.; Kelm, M. A.; Hammerstone, J. F.; Beecher, G.; Holden, J.; Haytowitz, D.; Gebhardt, S.; Prior, R. L. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *J. Nutr.* **2004**, *134* (3), 613–617.

(7) Howell, A. B.; Reed, J. D.; Krueger, C. G.; Winterbottom, R.; Cunningham, D. G.; Leahy, M. A-type cranberry proanthocyanidins and uropathogenic bacterial anti-adhesion activity. *Phytochemistry* **2005**, *66* (18), 2281–2291.

(8) Feliciano, R. P.; Shea, M. P.; Shanmuganayagam, D.; Krueger, C. G.; Howell, A. B.; Reed, J. D. Comparison of isolated cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) proanthocyanidins to catechin and procyanidins A2 and B2 for use as standards in the 4-(dimethylamino)cinnamaldehyde assay. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60* (18), 4578–4585.

(9) Prior, R. L.; Fan, E.; Ji, H.; Howell, A.; Nio, C.; Payne, M. J.; Reed, J. Multi-laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders. *J. Sci. Food Agric.* **2010**, *90* (9), 1473–1478.

(10) Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, 727–747.

(11) Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2005**, *45* (4), 287–306.

(12) Bach-Faig, A.; Berry, E. M.; Lairon, D.; Reguant, J.; Trichopoulos, A.; Dernini, S.; Medina, F. X.; Battino, M.; Belahsen, R.; Miranda, G.; et al. Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates. *Public Health Nutr* **2011**, *14*, 2274–2284.

(13) Lesschaeve, I.; Noble, A. C. Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 330S–335S.

(14) Boulton, R. B. The Copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine: Comments on a Critical Review. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, *52* (2), 67–87.

(15) Abad-García, B.; Garmón-Lobato, S.; Berrueta, L. A.; Gallo, B.; Vicente, F. On line characterization of 58 phenolic compounds in Citrus fruit juices from Spanish cultivars by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection coupled to electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry. *Talanta* **2012**, *99*, 213–224.

(16) Fügél, R.; Carle, R.; Schieber, A. Quality and authenticity control of fruit purées, fruit preparations and jams - A review. *Trends Food Sci. Technol.* **2005**, *16* (10), 433–441.

(17) Barbosa, S.; Pardo-Mates, N.; Puignou, L.; Núñez, O. The Role of Polyphenols and Polyphenolic Fingerprinting Profiles in the Characterization and Authentication of Natural Food Products. In *Advances in Chemistry Research*; Taylor, J. C., Ed.; Nova Science Publishers, Inc.: New York, 2017; Vol. 40, pp 1–58.

(18) Alonso-Salces, R. M.; Ndjoko, K.; Queiroz, E. F.; Ioset, J. R.; Hostettmann, K.; Berrueta, L. A.; Gallo, B.; Vicente, F. On-line characterisation of apple polyphenols by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and ultraviolet absorbance detection. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1046*, 89–100.

- (19) Qu, W. J.; Breksa, A. P., III; Pan, Z. L.; Ma, H. L. Quantitative determination of major polyphenol constituents in pomegranate products. *Food Chem.* **2012**, *132*, 1585–1591.
- (20) Raja, M.; Hernandez-Revelles, J.; Hernandez-Cassou, S.; Saurina, J. Determination of polyphenols in the pear pulp matrix by solvent extraction and liquid chromatography with UV-Vis detection. *Anal. Methods* **2014**, *6* (24), 9769–9776.
- (21) Garcia-Beneytez, E.; Cabello, F.; Revilla, E. Analysis of grape and wine anthocyanins by HPLC-MS. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5622–5629.
- (22) Ortega-Regules, A.; Romero-Cascales, I.; Lopez-Roca, J. M.; Ros-Garcia, J. M.; Gomez-Plaza, E. Anthocyanin fingerprint of grapes: environmental and genetic variations. *J. Sci. Food Agric.* **2006**, *86* (10), 1460–1467.
- (23) Mazzuca, P.; Ferranti, P.; Picariello, G.; Chianese, L.; Addeo, F. Mass spectrometry in the study of anthocyanins and their derivatives: differentiation of *Vitis vinifera* and hybrid grapes by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2005**, *40*, 83–90.
- (24) Ballistreri, G.; Continella, A.; Gentile, A.; Amenta, M.; Fabroni, S.; Rapisarda, P. Fruit quality and bioactive compounds relevant to human health of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars grown in Italy. *Food Chem.* **2013**, *140*, 630–638.
- (25) Liu, Y.; Liu, X. Y.; Zhong, F.; Tian, R. R.; Zhang, K. C.; Zhang, X. M.; Li, T. H. Comparative Study of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Different Species of Cherries. *J. Food Sci.* **2011**, *76*, C633–C638.
- (26) Rodriguez-Mateos, A.; Cifuentes-Gomez, T.; Tabatabaee, S.; Lecras, C.; Spencer, J. P. E. Procyanidin, Anthocyanin, and Chlorogenic Acid Contents of Highbush and Lowbush Blueberries. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 5772–5778.
- (27) Johnson, M. C.; Dela Libera Tres, M.; Thomas, A. L.; Rottinghaus, G. E.; Greenleaf, C. M. Discriminant Analyses of the Polyphenol Content of American Elderberry Juice from Multiple Environments Provide Genotype Fingerprint. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 4044–4050.
- (28) Blackhall, M. L.; Berry, R.; Davies, N. W.; Walls, J. T. Optimized extraction of anthocyanins from Reid Fruits' *Prunus avium* 'Lapins' cherries. *Food Chem.* **2018**, *256*, 280–285.
- (29) Ongkowijoyo, P.; Luna-Vital, D. A.; Gonzalez de Mejia, E. Extraction techniques and analysis of anthocyanins from food sources by mass spectrometry: An update. *Food Chem.* **2018**, *250*, 113–126.
- (30) Lucci, P.; Saurina, J.; Núñez, O. Trends in LC-MS and LC-HRMS analysis and characterization of polyphenols in food. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2017**, *88*, 1–24.
- (31) Ignat, I.; Volf, I.; Popa, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* **2011**, *126*, 1821–1835.
- (32) Puigventós, L.; Navarro, M.; Alechaga, É.; Núñez, O.; Saurina, J.; Hernández-Cassou, S.; Puignou, L. Determination of polyphenolic profiles by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry for the authentication of fruit extracts. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407* (2), 597–608.
- (33) Hamed, A. I.; Al-Ayed, A. S.; Moldoch, J.; Piacente, S.; Oleszek, W.; Stochmal, A. Profiles analysis of proanthocyanidins in the argon nut (*Medemia argun* - An ancient Egyptian palm) by LC-ESI-MS/MS. *J. Mass Spectrom.* **2014**, *49* (4), 306–315.
- (34) Rauha, J. P.; Vuorela, H.; Kostianen, R. Effect of eluent on the ionization efficiency of flavonoids by ion spray, atmospheric pressure chemical ionization, and atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2001**, *36* (12), 1269–1280.
- (35) Riffault, L.; Colas, C.; Destandau, E.; Pasquier, L.; André, P.; Elfakir, C. Non-targeted molecular characterisation of a rose flower ethyl acetate extract using ultra-HPLC with atmospheric pressure photoionisation and quadrupole time-of-flight MS/MS. *Phytochem. Anal.* **2015**, *26* (3), 189–201.
- (36) Parets, L.; Alechaga, É.; Núñez, O.; Saurina, J.; Hernández-Cassou, S.; Puignou, L. Ultrahigh pressure liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometry for the determination of polyphenolic profiles in the characterization and classification of cranberry-based pharmaceutical preparations and natural ext. *Anal. Methods* **2016**, *8*, 4363–4378.
- (37) Iswaldi, I.; Gómez-Caravaca, A. M.; Arráez-Román, D.; Uberos, J.; Lardón, M.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. Characterization by high-performance liquid chromatography with diode-array detection coupled to time-of-flight mass spectrometry of the phenolic fraction in a cranberry syrup used to prevent urinary tract diseases, together with a study of its antibacter. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, *58* (1), 34–41.
- (38) Vallverdú-Queralt, A.; Jáuregui, O.; Medina-Remón, A.; Andrés-Lacueva, C.; Lamuela-Raventos, R. M. Improved characterization of tomato polyphenols using liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap quadrupole Orbitrap mass spectrometry and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 2986–2992.
- (39) Hu, C.; Xu, G. Mass-spectrometry-based metabolomics analysis for foodomics. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2013**, *52*, 36–46.
- (40) Ibáñez, C.; García-Cañas, V.; Valdés, A.; Simó, C. Novel MS-based approaches and applications in food metabolomics. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2013**, *52*, 100–111.
- (41) Wallace, T. C.; Giusti, M. M. Extraction and normal-phase HPLC-fluorescence-electrospray MS characterization and quantification of procyanidins in cranberry extracts. *J. Food Sci.* **2010**, *75* (8), C690–C696.
- (42) Puigventós, L.; Núñez, O.; Saurina, J. HPLC Fingerprints for the Authentication of Cranberry-Based Products Based on Multivariate Calibration Approaches. *Curr. Anal. Chem.* **2017**, *13* (3), 256–261.
- (43) SOLO software; Eigenvecto Research; <http://www.eigenvecto.com/software/solo.htm> (Accessed on Nov 6, 2017).
- (44) Massart, J.; Vandeginste, D. L.; Buydens, B. G. M.; de Jong, L. M. C.; Lewi, S.; Smeyers-Verbeke, P. J. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1997**.

## Supporting Information

**Table 1S.** Samples Employed in the Training (Calibration) and Test (Prediction and Validation) Sets for Partial Least Squares Regression.

% adulteration	Number of samples	Set
100	3	Calibration
50	5	Calibration
20	3	Calibration
12	3	Prediction and validation
7	3	Calibration
6	3	Prediction and validation
5	3	Calibration
2.5	3	Prediction and validation
2	3	Calibration
0	3	Calibration

**Figure 2S.** ExactFinder™ Report for the Cranberry Pharmaceutical Raw Extract Sample E3.

Found	Confirmed	Target Name	+/-	Area	RT (min)	Formula	Expected m/z	Measured m/z	Delta m/z (ppm)	Isotopic Pattern Score (%)	Num Isotopes Matched
●	1 of 1	D-(-)-Quinic acid	-	107E+0	101	C7H12O6	105.61	105.54	-3.54	90	4 of 4
●	1 of 1	Gallic acid	-	5.68E+08	155	C7H6O5	162.042	162.040	-151	100	4 of 4
●	1 of 1	Gentisic acid	-	4.74E+07	4.30	C7H6O4	153.093	153.091	-179	100	2 of 3
●	1 of 1	Chlorogenic acid	-	5.59E+08	3.85	C16H18O9	353.0878	353.0873	-149	100	5 of 5
●	1 of 1	Procyanidin B2	-	147E+08	2.61	C30H28O12	577.151	577.146	-0.88	100	5 of 5
●	1 of 1	Homogentisic acid	-	7.99E+06	2.09	C8H8O4	167.0350	167.0347	-170	100	2 of 3
●	1 of 1	Vanillic acid	-	5.4E+07	4.64	C8H8O4	167.0350	167.0346	-2.06	100	2 of 3
●	1 of 1	Caffeic acid	-	1.39E+09	4.66	C9H8O4	179.0350	179.0348	-0.82	100	5 of 5
●	1 of 1	(+)-catechin	-	5.53E+08	4.05	C15H14O6	289.078	289.073	-153	100	4 of 4
●	1 of 1	(-)-Epicatechin	-	2.22E+09	4.90	C15H14O6	289.078	289.074	-121	100	4 of 5
●	1 of 1	Procyanidin C1	-	7.1E+07	5.8	C45H38O18	865.985	865.970	-182	100	4 of 5
●	1 of 1	Vanillin	-	1.85E+07	5.86	C8H8O3	151.0401	151.0399	-0.80	100	2 of 2
●	1 of 1	p-coumaric acid	-	9.49E+08	5.87	C9H8O3	163.0401	163.0398	-186	100	4 of 5
●	1 of 1	Ellagic acid	-	2.65E+08	6.07	C14H6O8	300.9990	300.9984	-192	100	4 of 4
●	1 of 1	Ferulic acid	-	1.30E+09	6.32	C18H16O4	330.0506	330.0504	-136	100	2 of 2
●	1 of 1	Procyanidin A2	-	1.94E+09	6.40	C30H24O12	575.185	575.188	-126	100	5 of 6
●	1 of 1	Taxifolin	-	1.9E+08	6.38	C15H12O7	303.0510	303.0504	-2.2	100	3 of 4
●	1 of 1	Homoplantagin	-	4.7E+07	7.37	C22H22O11	461.089	461.082	-156	100	3 of 3
●	1 of 1	Quercitrin hydrate	-	1.82E+09	6.72	C21H20O11	447.0933	447.0925	-169	100	5 of 5
●	0 of 1	Polydatin	-	2.4E+06	7.03	C20H22O8	389.1242	389.1236	-145	82	2 of 3
●	1 of 1	Myricetin	-	6.63E+06	4.8	C15H10O8	317.0303	317.0296	-2.7	93	2 of 2
●	1 of 1	Nepetin-7-glucoside	-	1.25E+07	6.9	C22H22O12	477.138	477.133	-15	100	3 of 3
●	1 of 1	Syringaldehyde	-	4.1E+06	6.03	C9H10O4	181.0506	181.0504	-154	100	2 of 2
●	0 of 1	Homovanillic acid	-	8.96E+05	4.78	C9H10O4	181.0506	181.0504	-128	100	1 of 1
●	1 of 1	Veratric acid	-	2.6E+07	7.67	C9H10O4	181.0506	181.0505	-0.95	100	3 of 3
●	1 of 1	3,4-Dihydroxybenzaldehyd	-	1.9E+08	3.92	C7H6O3	137.0244	137.0240	-3.25	95	4 of 4
●	0 of 1	Rosmarinic acid	-	1.23E+06	6.90	C18H16O8	359.0772	359.0766	-179	100	1 of 1
●	1 of 1	Morin	-	3.1E+06	7.54	C15H10O7	301.0354	301.0351	-0.93	100	2 of 2
●	1 of 1	Kaempferol	-	3.39E+08	9.92	C15H10O6	285.0405	285.0399	-180	100	4 of 4
●	1 of 1	Fisetin	-	3.8E+06	7.4	C15H10O6	285.0405	285.0397	-2.77	94	2 of 2
●	1 of 1	Asiatic acid	-	6.27E+06	12.56	C30H48O5	487.3429	487.3422	-145	100	3 of 3





### 2.2.2. Publicación III: Artículo científico

*UHPLC-HRMS (orbitrap) fingerprinting in the classification and authentication of cranberrybased natural products and pharmaceuticals using multivariate calibration methods.*

S. Barbosa; N. Pardo-Mates; M. Hidalgo-Serrano;  
J. Saurina; L. Puignou; O. Núñez  
*Anal. Methods*, 2019, vol. 11, pp. 3341-3349.





Cite this: *Anal. Methods*, 2019, 11, 3341

## UHPLC-HRMS (orbitrap) fingerprinting in the classification and authentication of cranberry-based natural products and pharmaceuticals using multivariate calibration methods†

Sergio Barbosa,<sup>a</sup> Naiara Pardo-Mates,<sup>a</sup> Miriam Hidalgo-Serrano,<sup>a</sup> Javier Saurina,<sup>ab</sup> Lluís Puignou<sup>ab</sup> and Oscar Núñez <sup>\*abc</sup>

UHPLC-HRMS (orbitrap) fingerprinting in negative and positive H-ESI modes was applied to the characterization, classification and authentication of cranberry-based natural and pharmaceutical products. HRMS data in full scan mode ( $m/z$  100–1500) at a resolution of 70 000 full-width at half maximum were recorded and processed with MSConvert software to obtain a profile of peak intensities as a function of  $m/z$  values and retention times. A threshold peak filter of absolute intensity ( $10^5$  counts) was applied to reduce data complexity. Principal component analysis (PCA) and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) revealed patterns able to discriminate the analyzed samples according to the fruit of origin (cranberry, grape, blueberry and raspberry). Discrimination among cranberry-based natural and cranberry-based pharmaceutical preparations was also achieved. Both UHPLC-HRMS fingerprints in negative and positive H-ESI modes and the data fusion of both acquisition modes proved to be good chemical descriptors to perform cranberry extract authentication. Validation of the proposed methodology showed a prediction rate of 100% of the samples. Obtained data were further treated by partial least squares (PLS) regression to identify frauds and quantify the percentage of adulterant fruits in cranberry-fruit extracts, achieving prediction errors in the range 0.17–3.86%.

Received 27th March 2019  
Accepted 2nd June 2019

DOI: 10.1039/c9ay00636b

rsc.li/methods

### 1. Introduction

Nowadays, the prevention of several chronic diseases by employing, together or not with the use of regulated medicines, plant-based and/or fruit-based pharmaceutical extracts is a common practice worldwide. This is the case of American red cranberry (*Vaccinium macrocarpon*), a small evergreen shrub from the Ericaceae family that grows in acid swamps in humid forests. American cranberry fruits are composed mostly of water (>80%) and are a rich source of vitamin C and dietary polyphenols, such as flavonols, anthocyanins, organic acids and proanthocyanidins (PACs). Cranberries have been used for centuries as a flavoring agent and by sailors to prevent scurvy due to their high vitamin C content. Moreover, their consumption may be associated with reduced risk of chronic

diseases such as cancer, although strong evidence has not been yet established in humans, and several berry-based extracts have shown antitumor activities. Cranberry extracts enriched in polyphenolic contents have also shown enhanced anti-proliferative activity. These extracts may also play an important role in the treatment of oral infections by reducing the pathogenesis of dental caries, the protection against cardiovascular diseases, and the prevention of oxidation of low density lipoproteins and platelet aggregation.<sup>1–5</sup>

Recently cranberries have attracted much attention due to their high content of PACs and the capacity of some of them to prevent urinary tract infections (UTIs). This activity is attributed to the inhibition of the adhesion of pathogenic bacteria, such as *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori*, to the cells of the urinary tract tissues, thus preventing bacterial colonization and the proliferation of infections.<sup>6–9</sup> PACs, also known as condensed tannins, are flavan-3-ol polymeric structures mainly based on (epi)catechin oligomers, called procyanidins, but other forms can have (epi)gallocatechin units (*i.e.* prodelfinidins) or (epi)afzelechin (*i.e.* propelargonidins) units.<sup>10</sup>

PACs can be classified according to the linkage between their units. PACs linked through C4–C8 or C4–C6 bonds are known as B-type PACs. If these structures have an additional ether linkage between C2–C5 or C2–C7 they are known as A-

<sup>a</sup>Department of Chemical Engineering and Analytical Chemistry, University of Barcelona, Martí i Franquès 1-11, E08028 Barcelona, Spain. E-mail: oscar.nunez@ub.edu; Fax: +34-93-402-1233; Tel: +34-93-403-3706

<sup>b</sup>Research Institute in Food Nutrition and Food Safety, University of Barcelona, Av. Prat de la Riba 171, Edifici Recerca (Gaudí), E-08901 Santa Coloma de Gramanet, Barcelona, Spain

<sup>c</sup>Serra Hunter Fellow, Generalitat de Catalunya, Spain

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c9ay00636b

type PACs.<sup>11</sup> As an example, Fig. S1† (ESI†) shows the structure of a trimeric PAC with A-type and B-type linkages. Nevertheless, only A-type PACs, very abundant in American red cranberries, exhibit the bioactive activity to prevent UTIs, while B-type PACs, which are found in other fruits such as grapes and blueberries, do not show this activity.<sup>12–14</sup> Many cranberry-based pharmaceutical preparations have recently appeared in the market to prevent UTIs, and there is a suspicion that some of them do not contain the necessary bioactive PACs. The fact that only A-type PACs have the required bioactive capacity and that pharmaceutical laboratories frequently assess the total content of PACs by non-selective colorimetric methods,<sup>15,16</sup> unable to differentiate between A- and B-type PACs, demonstrates the importance of developing analytical methods to characterize cranberry fruit-based extracts and pharmaceutical preparations to authenticate the fruit of origin employed in these processed extracts and to prevent frauds. Moreover, due to food trade globalization and the increased complexity of supply chains, the need for effective systems to protect consumers from impure, contaminated and fraudulently presented food-processed products has increased. Current food labeling and traceability systems cannot strictly guarantee that the food is authentic, of good quality and safe. As a result, consumers are demanding verifiable traceability evidence as an important criterion of food quality and safety.<sup>17</sup>

Liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS), tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and high resolution mass spectrometry (LC-HRMS), in combination with chemometric methods, emerge today as the best analytical tools to characterize, classify and authenticate food products.<sup>18–23</sup> These platforms result in one of the best ways to detect fraudulent practices derived from the substitution of the most valued components in fruit-processed extracts by others of lower commercial value, with worse organoleptic characteristics, or without the intended beneficial properties for human health. Food fingerprinting, the non-targeted chemical analysis of food products with multivariate data analysis, emerges as an innovative approach for food authentication.<sup>24–26</sup> This approach is based on the principle of metabolomics, which describes the scientific study of metabolites (small molecules below 1500 Da), present in a biological system with the aim to detect as many components as possible. Although the main focus of metabolomics is in the field of pharmacology and toxicology, the use of these approaches in food science is gaining acceptance. However, in the food field, an important distinction is made between the concepts of food fingerprinting and food profiling in accordance with the corresponding definitions of metabolomics.<sup>24,27</sup> Researchers in the metabolomic field use “profiling” and “fingerprinting” in a different way to researchers who are devoted to food science. The arrival of a “foodomics” discipline was not enough to allay this terminological problem, since authors keep on using the terms with both meanings.<sup>26</sup> Food profiling focuses on the analysis of a group of known selected metabolic chemicals or a group of chemicals belonging to the same family or with a similar structural feature. The concentrations (or peak signals) of these targeted compounds

are then used as food features (markers) to perform food authentication. In contrast, food fingerprinting does not deal with the identification of metabolites, but with the recognition of patterns, the so-called “fingerprints” of foodstuff.<sup>28</sup> After identification and mapping of the patterns of individual food matrices, the objective is usually to differentiate between various food fingerprints in terms of food features such as botanical species and geographical origin, or with respect to possible food adulterations.<sup>24</sup>

The fact that similar fruit extracts but with different properties are used as the ingredients in the preparation of food processed products and pharmaceutical preparations increases the difficulty of using targeted methods and may bring about the need to employ non-targeted approaches in order to obtain specific fingerprints of the original products. These so-called food fingerprinting approaches aim to capture as many compounds or features as technically possible to gain a comprehensive insight into the composition of the sample.<sup>25</sup> However, a large amount of chemical data is obtained making difficult its treatment. In this regard, several chemometric data processing software packages with different characteristics and algorithms have been introduced for MS users.<sup>29</sup> After data acquisition and processing, chemometric univariate and multivariate statistical methods are then used for sample characterization, classification and authentication.<sup>30,31</sup>

The aim of this work was to develop a suitable method to characterize, classify and authenticate natural and pharmaceutical cranberry-based products, employing ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS) using a non-targeted fingerprinting approach with a Q-Exactive Orbitrap analyzer. Different classes of fruit-based (cranberry, blueberry, raspberry and grape) products including raw fruit extracts, fruit juices and raisins, as well as commercial cranberry-based pharmaceutical preparations including raw extracts, powder capsules, syrups and sachets were analyzed after a simple sample extraction procedure. The hypothesis established in this work is that UHPLC-HRMS fingerprinting data, obtained in both positive and negative ESI modes, exploring also the possibility of data-fusion, can be considered as a source of potential chemical descriptors to be exploited for the characterization and classification of fruit-based natural products and pharmaceuticals by unsupervised principal component analysis (PCA) and supervised partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA). Data were further treated by partial least squares (PLS) regression to quantify the percentages of fruit extracts (grape, blueberry and raspberry) used for adulteration in cranberry extracts.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals

Unless otherwise specified, the reagents and chemicals used were always of analytical grade. LC-MS grade water, methanol, acetonitrile, formic acid (98–100%) and acetone were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), and hydrochloric acid (98%) from Merck (Seelze, Germany).

## 2.2. Instrumentation and methods

The chromatographic fingerprints were obtained with an Accela UHPLC system (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA) consisting of a quaternary pump and an Accela AS autosampler, coupled to a Q-Exactive Orbitrap HRMS system (Thermo Fisher Scientific) mass spectrometer equipped with a heated electrospray ionization source (HESI-II) operated in positive and negative ionization modes by means of two runs, respectively. Nitrogen (purity > 99.98%) was used as the nebulizer and desolvation gas. Specific parameters were as follows: sheath gas, 60 a.u. (arbitrary units); sweep gas, 0 a.u.; auxiliary gas, 10 a.u.; capillary temperature, 320 °C; HESI-II probe temperature, 350 °C; electrospray voltage, 2.5 kV; S-lens RF level, 50 V. The Q-Exactive Orbitrap HRMS system was tuned and calibrated using Thermo Fisher calibration solutions every three days in both negative and positive modes to ensure a working mass accuracy error lower than 5 ppm. Mass spectra were acquired in full MS scan mode employing two runs, in both positive and negative modes, respectively, at a resolution of 70 000 full-width at half maximum (FWHM) at  $m/z$  200 with a scan range of 100–1500  $m/z$ . The automatic gain control (AGC) target was set at  $10^6$  and the maximum injection time (IT) was 200 ms.

A porous-shell Ascentis® Express C18 reversed-phase column (150 × 2.1 mm, 2.7 μm particle size) provided by Supelco (Bellefonte, PA, USA) was used for the separation. Gradient elution was performed with 0.1% formic acid aqueous solution (solvent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (solvent B) at a constant flow rate of 0.3 mL min<sup>-1</sup> with the following

gradient program: 0–1 min at 10% B; 1–20 min from 10 to 95% B; 20–23 min at 95% B; 23–24 min back to the initial conditions at 10% B; and column re-equilibration for 6 min under the initial conditions. Injection volume was 10 μL.

## 2.3. Sample treatment

A total of 106 natural and pharmaceutical products were analyzed in this work. Natural products from different brands were purchased from Barcelona markets and pharmaceutical preparations and raw extracts were provided by Deiters S.L. Company (Barcelona, Spain). The samples included 22 commercial pharmaceutical berry-based products (11 capsules, 2 syrups, 4 sachets and 5 extracts), 33 cranberry-based products (4 fruit samples, 8 raisin samples and 21 juice samples), 29 grape-based products (4 fruit samples, 8 raisin samples and 17 juice samples), 12 blueberry-based products (6 fruit samples and 6 juice samples) and 10 raspberry-based fruit samples. All fruits and raisins were ground using an Ika Ultra-Turrax machine (Staufen, Germany) with different applicators. Water, in a 1 : 1 sample : water ratio, was added to raisins to improve the crushing. Then, all analyzed samples (10 g for solid samples and 25 mL for juices and syrups) were freeze-dried to achieve fully lyophilized products. For this purpose, samples were kept for 24 h inside a lyophilizer (Telstar LyoQuest, Terrasa, Spain) with a gradient temperature ramp from –80 °C to room temperature and then were kept for 6.5 h at 40 °C. Once lyophilized extracts were obtained, and sample treatment was carried out using a method previously described.<sup>18,19</sup> Briefly,

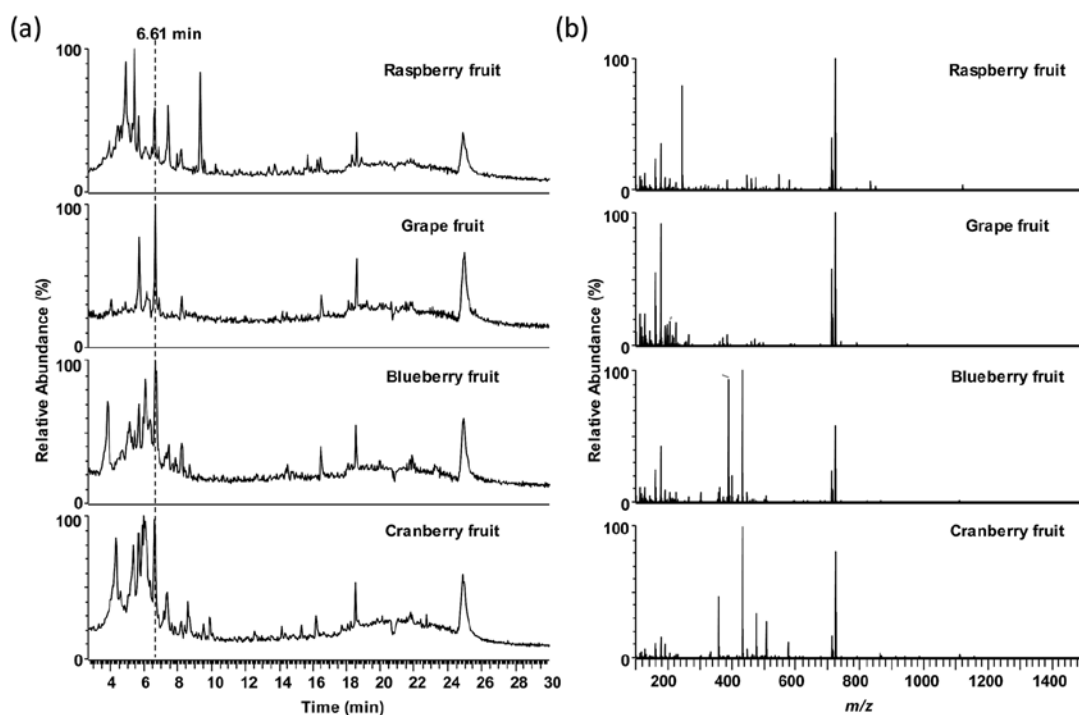


Fig. 1 (a) UHPLC-HRMS total ion chromatograms of the four fruit sample types analyzed in negative ionization mode. (b) HRMS full scan spectra ( $m/z$  100–1500) obtained for the four fruit sample types obtained at a retention time of 6.61 min.

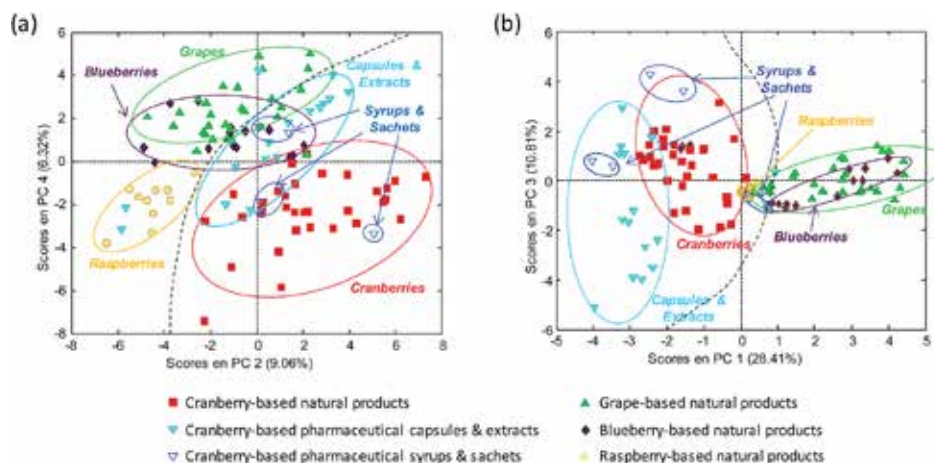


Fig. 2 PCA scores plots of (a) PC2 vs. PC4 when using UHPLC-HRMS fingerprints of all the analyzed samples (fruit-based products and pharmaceutical preparations) in positive H-ESI mode, and (b) PC1 vs. PC3 when data were acquired in negative H-ESI mode.

0.1 g of lyophilized sample was dispersed in 10 mL of an acetone : water : hydrochloric acid (70 : 29.9 : 0.1 v/v/v) solution by sonication for 10 min. Then, the samples were centrifuged for 15 min at 3500 rpm, and the supernatant extracts were separated from the solid and stored at  $-4$  °C until analyzed. Before injection, extracts were filtered through 0.45  $\mu$ m nylon filters (Whatman, Clifton, NJ, USA). Besides, a quality control (QC) consisting of a mixture of 50  $\mu$ L of each sample extract was prepared and injected every 10 samples to evaluate the repeatability of the method and the robustness of the chemometric results.

For authentication studies by PLS regression, three cases were evaluated in which cranberry extracts were adulterated with different amounts of grape, blueberry or raspberry, respectively. For such a purpose, 3 cranberry, 3 grape, 3 blueberry- and 3 raspberry-fruit sample extracts were processed as indicated above. These series of extracts were used to prepare standard and unknown samples to be used for calibration and prediction sets. Hence, apart from those pure extracts, mixtures of cranberry and adulterant fruits were prepared as follows: 50% adulterant (5 samples), 20% adulterant (3 samples), 12% adulterant (3 samples), 10% adulterant (3 samples), 7% adulterant (3 samples), 6% adulterant (3 samples), 5% adulterant (3 samples), 2.5% adulterant (3 samples), and 2% adulterant (3 samples), for each adulterant fruit. 2% adulterant was established as the minimum adulterant level that can be quantified with the proposed methodology.

#### 2.4. Data analysis

The data treatment for the untargeted analysis was carried out with R software (R Foundation, Vienna, Austria). Data chemometric analyses with PCA, PLS-DA and PLS regression were carried out with Stand Alone Chemometrics Software (Solo), provided by Eigenvector Research Inc. (Manson, WA, USA).<sup>32</sup> A detailed description of the theoretical background of these chemometric methods is given elsewhere.<sup>33</sup>

The X-data matrices to be treated by PCA and PLS-DA consisted of the UHPLC-ESI-q-orbitrap fingerprints (peak intensities as a function of retention times and  $m/z$  values) obtained in both H-ESI(+) and H-ESI(-) modes, as well as the data-fusion combination of the two ionization modes. The Y-data matrix in the PLS-DA models consisted of the sample classes. Scatter plots of scores and loadings of the principal components (PCs), in PCA, and of the latent variables (LVs), in PLS-DA, were used to investigate the structure of maps of samples and variables, respectively. The quantification of the percentage of the fruit-extract used for adulteration (grape, blueberry or raspberry extracts) in the adulterated cranberry-based extracts analyzed was based on PLS regression. Samples available were distributed among training and test sets as follows: training set: 100% adulterant (3 samples), 50% adulterant (5 samples), 20% adulterant (3 samples), 10% adulterant (3 samples), 7% adulterant (3 samples), 5% adulterant (3 samples), 2% adulterant (3 samples), and 100% cranberry-fruit (3 samples). The remaining samples considered as unknown (12% adulterant, 6% adulterant, and 2.5% adulterant, 3 samples each) were used for validation and prediction purposes.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. UHPLC-HRMS fingerprinting

In this work, a non-supervised UHPLC-HRMS fingerprinting analysis of fruit-based products and cranberry-based pharmaceuticals was performed in order to obtain appropriate chemical descriptors for sample classification and authentication. For that purpose, 106 samples were processed with a simple sample extraction method and the obtained extracts were analyzed with a C18 reversed-phase UHPLC-HRMS method (see the Experimental section). The fingerprint of a fruit-based product will depend on both the fruit variety genotype and the product phenotype (food attributes determined by ambient conditions, agricultural practices, food-processing procedures, etc.). Thus, it is expected that these

fingerprints will provide good chemical descriptors to achieve sample characterization and classification by means of chemometric methods. Accordingly, an untargeted strategy relied on UHPLC-HRMS fingerprints consisting of intensity peaks recorded as a function of  $m/z$  and retention time. Data were then registered in both negative and positive HRMS full scan modes ( $m/z$  100–1500). As an example, Fig. 1 shows the total ion chromatograms (TIC) obtained in negative H-ESI mode for the four types of fruits analyzed (raspberry (a), grape (b), blueberry (c), and cranberry (d)). The figure also shows, as an arbitrary example, the full scan HRMS spectra obtained for each fruit extract at a retention time of 6.61 min. As can be seen, important differences in peak signals and abundances in both total ion chromatograms and HRMS spectra were obtained. Cranberry- and blueberry-based samples seemed to provide richer fingerprints (more signals), while those belonging to grape-based products were simpler.

### 3.2. Exploratory principal component analysis study

The obtained UHPLC-HRMS fingerprint raw data were processed with MSConvert software to obtain a profile of peak intensities as a function of  $m/z$  values and retention times. In order to reduce the data complexity, a threshold peak filter of absolute intensity  $10^5$  was applied. The converted data were then processed with R software to obtain a data matrix including the UHPLC-HRMS fingerprints of the 106 samples analyzed and the QCs. The dimensions of the obtained data matrices were  $118 \times 469$  for positive H-ESI mode and  $118 \times 641$  for negative H-ESI mode. PCA required 5 and 6 principal components (PCs), for negative and positive H-ESI, respectively, to explain most of the variance observed within the analyzed samples. As an example, Fig. 2 shows the scores plots that provided the best sample differentiation: (a) PC2 vs. PC4 when using UHPLC-HRMS fingerprints in positive H-ESI mode and (b) PC1 vs. PC3 when using UHPLC-HRMS fingerprints in negative H-ESI mode. As can be seen, complete discrimination between all the analyzed types of samples was

not obtained. Nevertheless, samples tend to be grouped according to the fruit of origin. In general, UHPLC-HRMS fingerprinting in negative ionization mode seems to provide more discriminant chemical descriptors among samples which allow concentrating the samples in smaller regions within the scores plot (see for instance the distribution of cranberry-based and, especially, raspberry-based natural products). Although at this point complete discrimination among the four fruit types was not achieved, for example blueberry- and grape-based natural products tend to be overlapped in both scores plots, cranberry-based natural products were completely separated from the other three types of fruits when using both positive and negative UHPLC-HRMS fingerprints. This is an interesting result because cranberry natural products should be the specific source of the raw extracts employed in the preparation of pharmaceuticals, and thus are susceptible to adulteration with other fruit extracts as commented in the Introduction.

Finally, in Fig. 2 it can also be observed that cranberry-based samples (both natural products and pharmaceutical preparations) tend to be grouped, more or less, in the same region of the scores plots, although with certain discrimination depending on the pharmaceutical form (raw extracts, capsules, syrups and sachets), and in some cases they are clearly differentiated from cranberry-based natural products. This is probably due to the purification and preconcentration procedures followed by pharmaceutical companies in the preparation of raw extracts from cranberry fruits enriched with bioactive compounds in comparison to non-treated cranberry-fruit natural products, thus providing different patterns even though the fruit of origin is the same.

Taking into account that raspberry, blueberry and grape extracts are expected to be used as potential adulterants of cranberry extracts, independent PCA among cranberry-based natural products and the other three fruit families was also performed. In this case, the dimensions of the obtained data matrices were  $84 \times 469$  for positive H-ESI mode and  $84 \times 641$

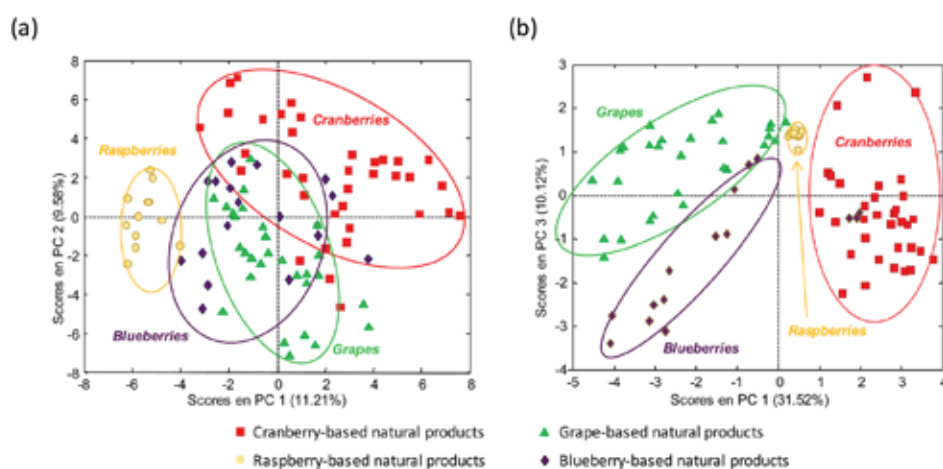


Fig. 3 PCA scores plots of (a) PC1 vs. PC2 when using UHPLC-HRMS fingerprints of natural fruit-based products in positive H-ESI mode, and (b) PC1 vs. PC3 when data were acquired in negative H-ESI mode.

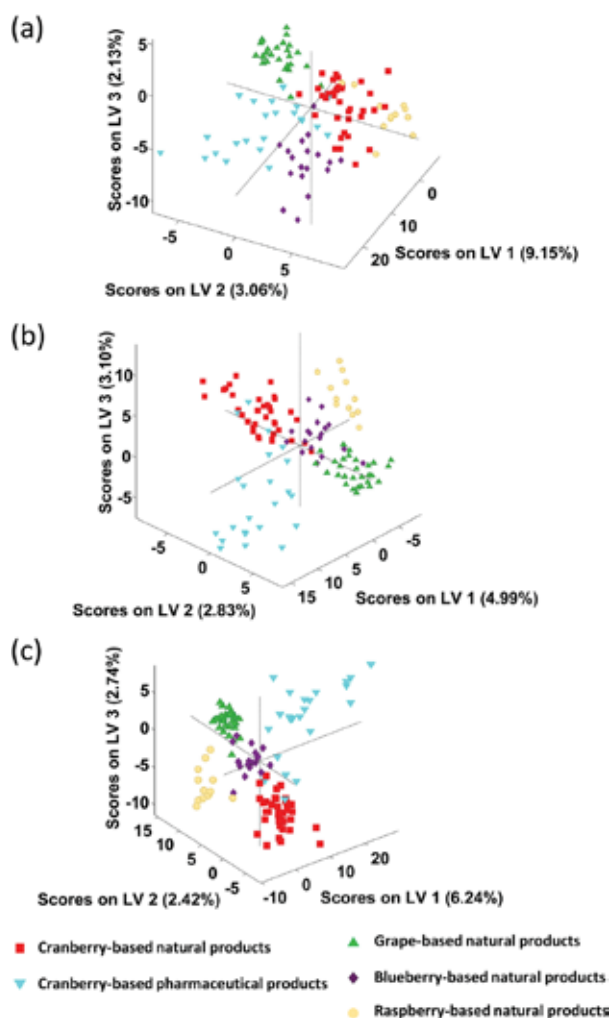


Fig. 4 3D-scatter plots of scores of LV1 vs. LV2 vs. LV3 for the analyzed samples when using UHPLC-HRMS fingerprints in (a) H-ESI negative acquisition mode and (b) H-ESI positive acquisition mode, and (c) data fusion of both H-ESI negative and positive acquisition modes as sample chemical descriptors.

for negative H-ESI mode. As an example, Fig. 3 shows the scores plots that provided the best sample differentiation: (a) PC1 vs. PC2 in positive H-ESI mode and (b) PC1 vs. PC3 in negative H-ESI mode. It can be observed that, except for some outliers that are expected when working with natural products, samples tend to be grouped in both cases according to the fruit of origin, although more overlapping between groups was observed in positive ionization mode. Up to this point, it seems that UHPLC-HRMS fingerprinting in negative ionization mode provided better discrimination among cranberry-fruit products and other adulterant fruits, as can be seen in Fig. 3b. PC1 clearly differentiated cranberry-based fruit products (clustered to the right of the plot) from those obtained with other fruits (distributed to the left of the plot). It was thus concluded from PCA that samples were reasonably distinguished as a function of fruits of origin. Hence, data were expected to be of interest to perform further classification studies by PLS-DA.

### 3.3. Supervised partial least squares-discriminant analysis study

UHPLC-HRMS fingerprints obtained in both H-ESI negative and positive acquisition modes were here evaluated as chemical descriptors to perform sample classification by PLS-DA. For that purpose, no further data treatment from the employed PCA data matrices was required. Therefore, the same X-data matrix employed in PCA was submitted in PLS-DA, while the Y-data matrix coded the belonging of the samples to their corresponding classes (*i.e.*, cranberry products, cranberry-based nutraceuticals, and grape, blueberry and raspberry products). Fig. 4 shows the 3D-scatter plots of scores of LV1 vs. LV2 vs. LV3 from UHPLC-HRMS fingerprints in negative H-ESI (Fig. 4a) and in positive H-ESI (Fig. 4b) mode. In addition, data fusion of both negative and positive fingerprints was also evaluated as a chemical descriptor for PLS-DA, and the obtained 3D-scatter plot of scores of LV1 vs. LV2 vs. LV3 is depicted in Fig. 4c. As seen in the figures, in general very acceptable discrimination among the analyzed sample groups (samples tend to be grouped according to the fruit of origin) was obtained independently of the H-ESI acquisition mode employed, as well as when data fusion of both ionization modes was considered. In addition, cranberry-based products are differentiated into two groups, namely: fruit-based and pharmaceutical-based products, in agreement with purification and preconcentration procedures applied to nutraceuticals, as previously commented. Nevertheless, both sample groups tend to be distributed in the same area of the 3D-scatter plots of scores and opposed to the grape-, blueberry- and raspberry-fruit based samples. Therefore, either individual data sets obtained in negative or positive H-ESI mode or the data fusion set of both fingerprints is adequate, a priori, for the characterization and authentication of cranberry-based natural products and pharmaceutical preparations.

In order to validate the proposed methodology and taking into consideration that raspberry, blueberry and grape extracts are expected to be used as potential adulterants of cranberry extracts, PLS-DA models using UHPLC-HRMS fingerprints in negative H-ESI mode were built by pairs (cranberry vs. grape, cranberry vs. blueberry and cranberry vs. raspberry). The optimum number of latent variables of each PLS-DA model was established cross validation classification error average, the first minimum point being approximately the most appropriate one (Fig. S2, ESI<sup>†</sup>). A good classification was obtained for the three studied pairs. Models were built by using 70% of each group of samples as the calibration set and were validated with the remaining 30% of the samples. Fig. 5 depicts the obtained PLS-DA plots of scores projected on LV1 vs. LV2 as well as the classification plot of cranberry vs. raspberry (a), blueberry (b) and grape (c), respectively. As seen in the figures, all samples were correctly assigned to their corresponding class, thus reaching a prediction rate of 100% in each studied case.

### 3.4. Adulteration studies by partial least squares regression

UHPLC-HRMS fingerprints in negative H-ESI acquisition mode were also here considered for the authentication and

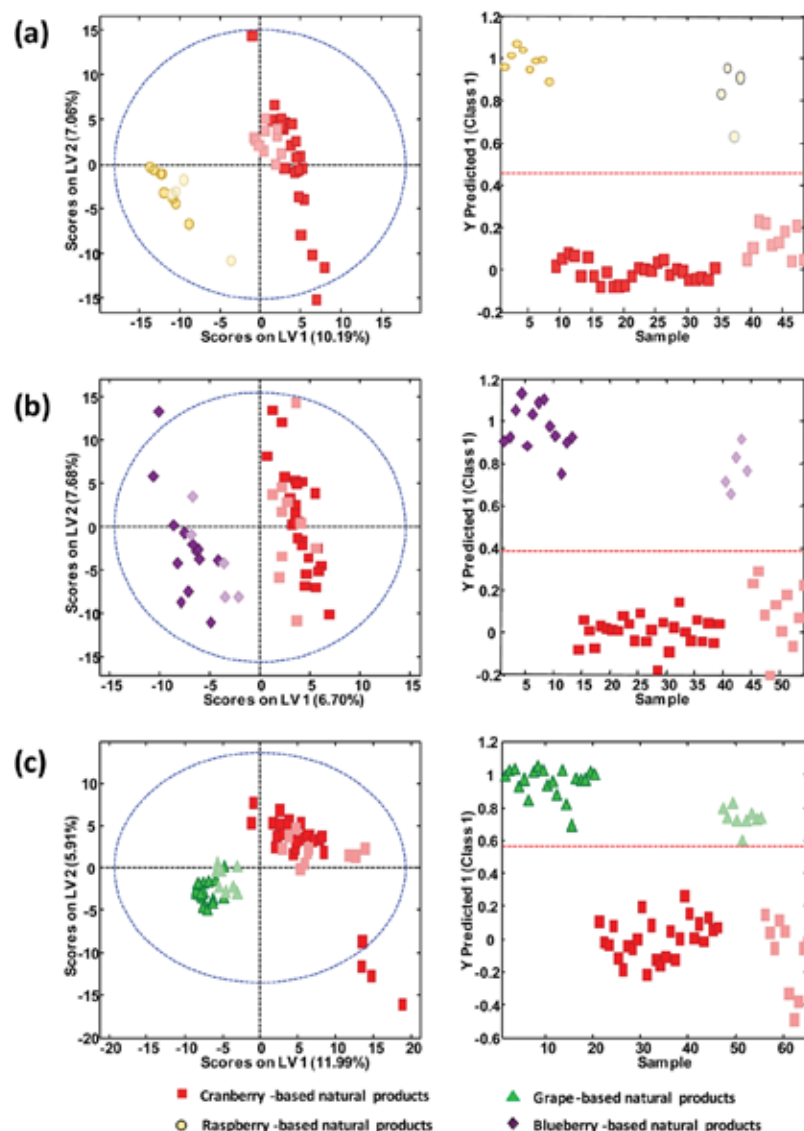


Fig. 5 PLS-DA plots of scores projected on LV1 vs. LV2 as well as classification plots for cranberry vs. (a) raspberry, (b) blueberry, and (c) grape, respectively. Dark and clear symbols correspond to calibration and validation sets, respectively. Dashed lines indicated the classification thresholds separating the classes.

quantitation of fraud levels of fruit extract adulterants in cranberry-based extracts. Thus, a cranberry fruit-extract was adulterated at different levels (from 2 to 50%) of the other three fruits studied (blueberry, raspberry and grapes). Adulterated samples were then processed with the proposed sample treatment procedure and the obtained extract solutions were analyzed by UHPLC-HRMS to obtain the corresponding fingerprints as chemical data for partial least squares regression. A data set of calibration as indicated in the Experimental section was first employed in order to establish the PLS model. The number of latent variables (LV) used for the assessment of the PLS model was estimated by venetian blinds cross validation considering 2 data splits. The PLS model was further applied to quantify the percentage of

adulteration in the samples belonging to the test set. Fig. 6 shows the obtained PLS results when grape (a), blueberry (b), and raspberry (c) were the adulterants, showing the good performance of the obtained PLS models. Calibration errors were in all cases below 0.01% and, in general, small prediction errors were also obtained in the validation study, with values of 0.17% and 0.47% when grape and blueberry were used as adulterants, respectively, except when raspberry was used as the adulterant where the prediction error increased up to 3.86%. However, taking into consideration that adulteration levels in nutraceuticals are expected to be high if an economical profit is intended, the proposed methodology showed a good performance for the authentication and quantitation of frauds, even at low adulteration levels.

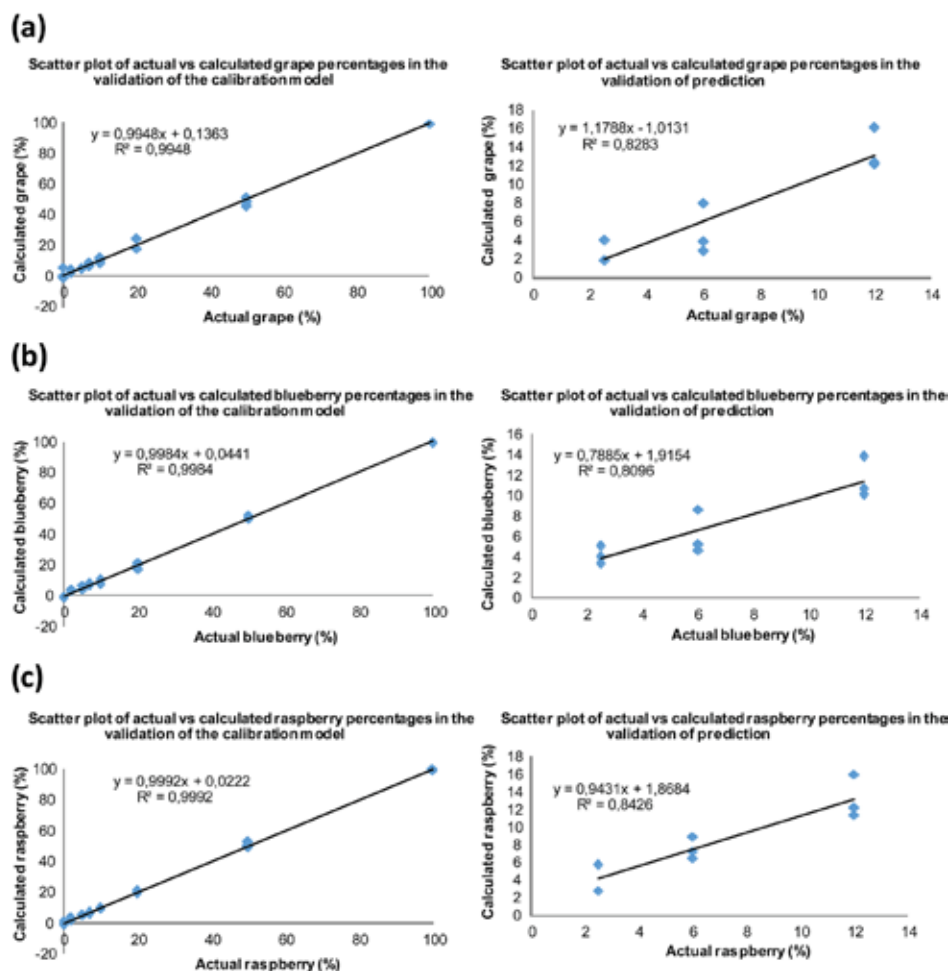


Fig. 6 Quantitation of (a) grape-, (b) blueberry-, and (c) raspberry-fruit percentages in cranberry-fruit extracts adulterated when using UHPLC-HRMS fingerprints in negative H-ESI mode by PLS.

## 4. Conclusions

A non-targeted UHPLC-HRMS fingerprinting method was employed for the characterization and classification of fruit-based natural products and cranberry-based pharmaceutical preparations. PCA results obtained using both UHPLC-HRMS fingerprints in negative and positive H-ESI modes provided a reasonable discrimination among cranberry-based natural products and pharmaceuticals when compared to those obtained from other fruit extracts. Results improved when using PLS-DA, achieving an acceptable discrimination between the groups of samples analyzed both when using UHPLC-HRMS fingerprints in negative and in positive acquisition modes and when combining both acquisition modes in a data fusion matrix. The proposed methods were also able to distinguish among pharmaceutical preparations against cranberry-fruit based samples, probably due to the enhancement or reduction in bioactive compounds because of different extraction and purification steps used by the pharmaceutical companies when preparing their raw extracts.

PLS-DA models using UHPLC-HRMS fingerprints in H-ESI negative mode as chemical descriptors of cranberry-fruit based products against possible adulterant fruit extracts (grape, blueberry and raspberry) showed good discrimination among samples depending on the fruit of origin, with a prediction rate of 100% in each case study when 30% of the samples were employed as the validation set. Moreover, the proposed chemical descriptors were also useful to achieve adulterant level quantification by PLS regression, showing calibration errors below 0.01% and prediction errors in the range of 0.17–3.86%.

As hypothesized in the Introduction section, the results obtained in this work demonstrate that the non-targeted UHPLC-HRMS fingerprinting methodology can be applied to the characterization, classification and authentication of cranberry-based products and pharmaceuticals adulterated with more economic fruit-based products such as grape, blueberry and raspberry extracts. Moreover, PLS results showed that adulterant levels below 2.5% can be quantified successfully with low enough calibration and validation errors.



Finally, the proposed methodology will allow obtaining in a fast way fingerprint chemical descriptors with lower data processing in comparison to targeted UHPLC-HRMS profiling approaches in which a known family of bioactive compounds needs to be characterized and detected with their signal confirmed and quantified by employing standards. This will make non-targeted UHPLC-HRMS fingerprinting methods cheaper than targeted approaches as chemical standards are not required to perfectly achieve sample classification.

## Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

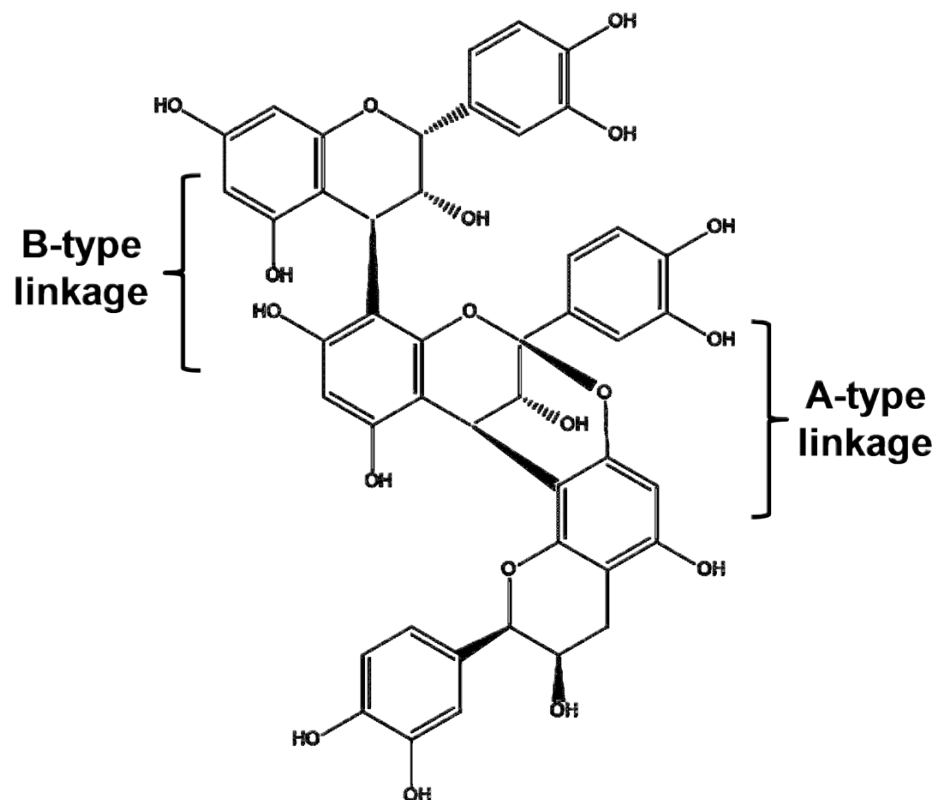
## Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support received from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness under the projects CTQ2014-56324-C2-1-P and CTQ2015-63968-C2-1-P and from the Agency for Administration of University and Research Grants (Generalitat de Catalunya, Spain) under the projects 2017SGR-171 and 2017SGR-310. The authors wished to thank Deiters S.L. Company for providing some cranberry-based raw material extracts and several commercial cranberry-based pharmaceutical preparations.

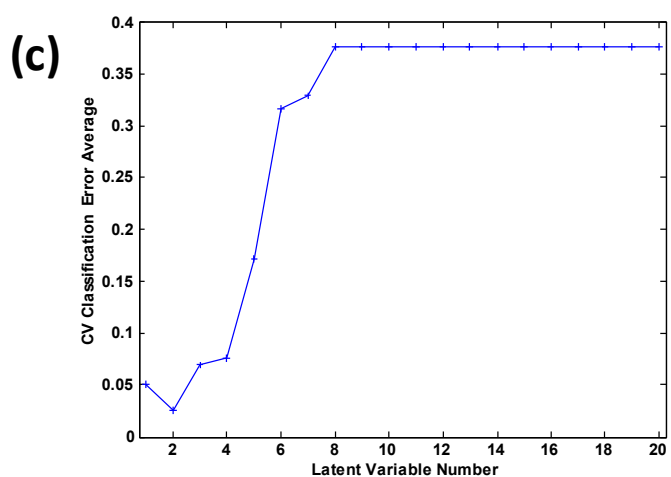
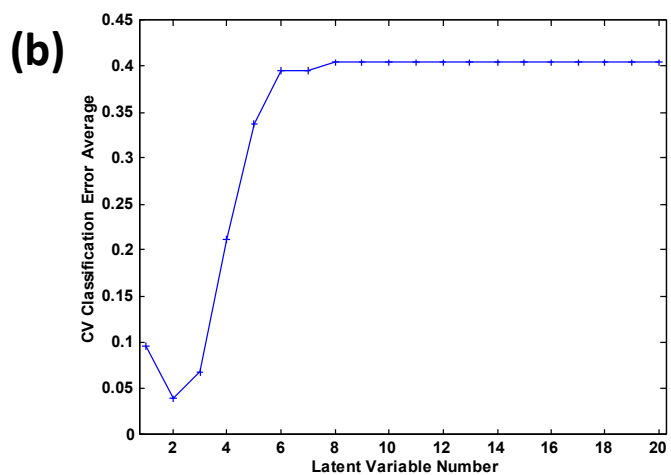
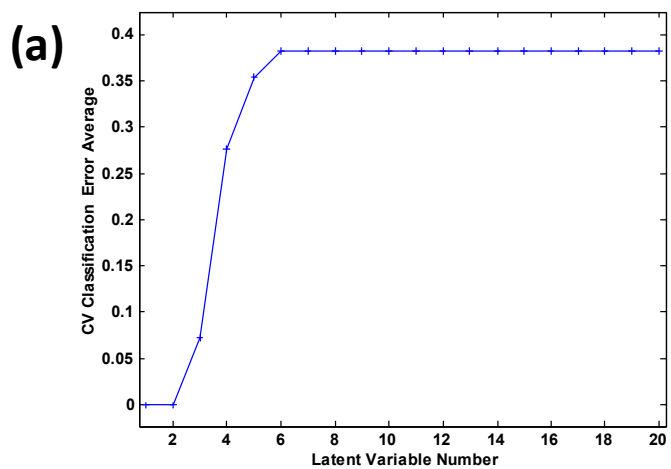
## References

- K. Feghali, M. Feldman, V. D. La, J. Santos and D. Grenier, *J. Agric. Food Chem.*, 2012, **60**, 5728–5735.
- I. Tarascou, J. P. Mazauric, E. Meudec, J. M. Souquet, D. Cunningham, S. Nojeim, V. Cheynier and H. Fulcrand, *Food Chem.*, 2011, **128**, 802–810.
- N. P. Seeram, L. S. Adams, M. L. Hardy and D. Heber, *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 2512–2517.
- H. El Gharras, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2009, **44**, 2512–2518.
- J. Côté, S. Caillet, G. Doyon, J. F. Sylvain and M. Lacroix, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2010, **50**, 666–679.
- I. Iswaldi, A. M. Gómez-Caravaca, D. Arráez-Román, J. Uberos, M. Lardón, A. Segura-Carretero and A. Fernández-Gutiérrez, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2012, **58**, 34–41.
- F. Sánchez-Patán, B. Bartolomé, P. J. Martín-Alvarez, M. Anderson, A. Howell and M. Monagas, *J. Agric. Food Chem.*, 2012, **60**, 3396–3408.
- E. Jungfer, B. F. Zimmermann, A. Ruttkat and R. Galensa, *J. Agric. Food Chem.*, 2012, **60**, 9688–9696.
- Á. Luís, F. Domingues, L. Pereira and Á. Luís, *J. Urol.*, 2017, **198**, 614–621.
- H. Parastar, M. Jalali-Heravi, H. Sereshti and A. Mani-Varnosfaderani, *J. Chromatogr. A*, 2012, **1251**, 176–187.
- L. Z. Lin, J. Sun, P. Chen, M. J. Monagas and J. M. Harnly, *J. Agric. Food Chem.*, 2014, **62**, 9387–9400.
- L. Y. Foo, Y. Lu, A. B. Howell and N. Vorsa, *Phytochemistry*, 2000, **54**, 173–181.
- C. G. Krueger, J. D. Reed, R. P. Feliciano and A. B. Howell, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2013, **405**, 4385–4395.
- A. B. Howell, J. D. Reed, C. G. Krueger, R. Winterbottom, D. G. Cunningham and M. Leahy, *Phytochemistry*, 2005, **66**, 2281–2291.
- R. P. Feliciano, C. G. Krueger, D. Shanmuganayagam, M. M. Vestling and J. D. Reed, *Food Chem.*, 2012, **135**, 1485–1493.
- R. L. Prior, E. Fan, H. Ji, A. Howell, C. Nio, M. J. Payne and J. Reed, *J. Sci. Food Agric.*, 2010, **90**, 1473–1478.
- M. M. Aung and Y. S. Chang, *Food Control*, 2014, **39**, 172–184.
- L. Puigventós, M. Navarro, É. Alechaga, O. Núñez, J. Saurina, S. Hernández-Cassou and L. Puignou, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2015, **407**, 597–608.
- L. Parets, É. Alechaga, O. Núñez, J. Saurina, S. Hernández and L. Puignou, *Anal. Methods*, 2016, **8**, 4363–4378.
- P. Lucci, J. Saurina and O. Núñez, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2016, **88**, 1–24.
- N. P. Kalogiouri, R. Aalizadeh and N. S. Thomaidis, *Food Chem.*, 2018, **256**, 53–61.
- A. M. Knolhoff, J. A. Zweigenbaum and T. R. Croley, *Anal. Chem.*, 2016, **88**, 3617–3623.
- S. Barbosa, N. Pardo-Mates, M. Hidalgo-Serrano, J. Saurina, L. Puignou and O. Nuñez, *J. Agric. Food Chem.*, 2018, **66**, 9353–9365.
- S. Esslinger, J. Riedl and C. Faul-Hassek, *Food Res. Int.*, 2014, **60**, 189–204.
- J. Riedl, S. Esslinger and C. Faul-Hassek, *Anal. Chim. Acta*, 2015, **885**, 17–32.
- L. Cuadros-Rodríguez, C. Ruiz-Samblás, L. Valverde-Som, E. Pérez-Castaño and A. González-Casado, *Anal. Chim. Acta*, 2016, **909**, 9–23.
- M. M. Koek, R. H. Jellema, J. van der Greef, A. C. Tas and T. Hankemeier, *Metabolomics*, 2011, **7**, 307–328.
- J. P. Antignac, F. Courant, G. Pinel, E. Bichon, F. Monteau, C. Elliott and B. Le Bizec, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2011, **30**, 292–301.
- A. Alonso, S. Marsal and A. Julià, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2015, **3**, 1–20.
- L. Yi, N. Dong, Y. Yun, B. Deng, D. Ren, S. Liu and Y. Liang, *Anal. Chim. Acta*, 2016, **914**, 17–34.
- S. Liu, Y. Z. Liang and H. Tao Liu, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2016, **1015–1016**, 82–91.
- SOLO Software, *Eigenvector Research*, <http://eigenvector.com/software/solo.htm>, accessed on 10th March 2019.
- D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, L. M. C. Buydens, S. de Jong, P. J. Lewi and J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1997.

**Fig. S1.** Structure of a trimeric proanthocyanidin with A-type and B-type linkages.



**Fig. S2.** Latent variable number vs CV classification error average plots for the built PLS-DA models of: (a) cranberry vs raspberry, (b) cranberry vs blueberry, and (c) cranberry vs grape.





## 2.3. Discusión de resultados

En esta sección se llevará a cabo una discusión conjunta de las dos publicaciones científicas incluidas en la sección 2.2. El objetivo principal en ambos trabajos fue obtener métodos rápidos y sencillos para la caracterización, clasificación y autenticación de productos naturales y productos farmacéuticos a base de arándanos rojos. Si bien en ambos casos se utiliza la misma instrumentación, UHPLC-HRMS, la estrategia metodológica utilizada es diferente. El primer trabajo (Publicación II) se basa en un método dirigido que consiste en la evaluación del perfil polifenólico de las muestras (basado en 53 polifenoles perfectamente caracterizados a partir de estándares comerciales) y su utilización como descriptores químicos de las muestras. El segundo trabajo (Publicación III) se basa, en cambio, en un método no dirigido que utiliza todas las señales (relaciones  $m/z$ ) obtenidas en el intervalo de 100 a 1500 Da, dando lugar a una huella dactilar (*fingerprint* metabolómico) de las muestras, los cuales son utilizados como descriptores químicos de las mismas. Los descriptores químicos obtenidos en ambos casos se utilizaron para estudiar la clasificación y autenticación de los productos naturales y los productos farmacéuticos a base de arándanos rojos analizados mediante técnicas quimiométricas. A continuación se resumirán y discutirán diversos aspectos claves en el desarrollo de las metodologías llevadas a cabo.

### 2.3.1. Tratamiento de muestra

El tratamiento de muestra es una etapa clave del proceso analítico y del que puede depender la calidad de los resultados obtenidos. Las muestras analizadas fueron las mismas en ambos trabajos. Así, se estudiaron un total de 106 muestras entre productos naturales y farmacéuticos. Se compraron productos naturales de diferentes marcas, en los mercados de Barcelona, mientras las preparaciones farmacéuticas y extractos crudos fueron proporcionados por la empresa Deiters S.L. (Barcelona, España). Las muestras incluyeron 22 productos farmacéuticos comerciales a base de arándanos rojos en diferentes formatos (11 cápsulas, 2 jarabes, 4 sobres y 5 extractos), 33 productos a base de arándano rojo (4 muestras de fruta, 8 muestras de pasas y 21 muestras de zumo), 29 productos a base de uva (4 muestras de fruta, 8 muestras de pasas y 17 muestras de zumo), 12 productos a base de arándano azul (6 muestras de fruta y 6 muestras de zumo) y 10 muestras de fruta a base de frambuesa.

Todas las frutas y pasas se molieron usando un aparato Ika Ultra-Turrax (Staufen, Alemania) con diferentes aplicadores. Para facilitar la trituración y homogenización de las pasas fue necesario la adición de agua, en una proporción 1:1 de muestra:agua. Este paso no supuso ningún tipo de alteración a la muestra debido que éstas serían posteriormente liofilizadas. Así, todas las muestras analizadas (10g en el caso de muestras sólidas y 25mL en el caso de zumos y jarabes) se liofilizaron. Para este propósito, las muestras se mantuvieron

durante 24h dentro de un liofilizador (Telstar LyoQuest, Terrasa, España) con una rampa de temperatura de -80°C a temperatura ambiente, seguido por 6,5h a 40°C.

Una vez que se obtuvieron los extractos liofilizados, el tratamiento de muestra se llevó a cabo utilizando un método descrito previamente por L. Puigventós y col. [58], quien evaluó la cuantificación de polifenoles en muestras de uva y arándano rojo, y que se encuentra descrito en la sección experimental de ambas publicaciones. Brevemente, incluye una extracción mediante sonicación de las muestras liofilizadas con acetona: agua: ácido clorhídrico (70:29.9:0.1 v/v/v). y filtración de los extractos analizados antes de su análisis mediante UHPLC-HRMS.

Con la idea de aplicar tanto métodos dirigidos (centrados en la determinación de polifenoles) como no-dirigidos se decidió utilizar un método de tratamiento de muestra que cumpliera dos condiciones, principalmente. La primera es que fuese lo más simple posible y fácil de aplicar, ya que de esta forma se puede conseguir que el método sea rápido y se pueda aplicar a un grupo elevado de muestras. La segunda condición es que permitiese, a su vez, la extracción y la cuantificación de compuestos fenólicos y polifenólicos (necesario para la publicación II, método dirigido), pero a su vez que no fuese altamente selectivo, con el fin de extraer la mayor variedad posible de compuestos bioactivos de las muestras analizadas (necesario para la publicación III, método no dirigido). Con esta finalidad, se utilizó la mezcla de disolventes anteriormente descrita (acetona, agua y ácido clorhídrico), al haber sido descrita anteriormente, y utilizada en el grupo de investigación, para la extracción de compuestos polifenólicos pertenecientes a diferentes familias [47,58,134,147,148], pero que a su vez permitiese la extracción de otros compuestos bioactivos de las muestras. Por supuesto, no se trata de un método de extracción universal, con lo que tan solo aquellos compuestos bioactivos que sean solubles bajo las condiciones de trabajo serán extraídos, con lo que, al final, hay cierta selectividad de extracción durante el tratamiento de muestra llevado a cabo. Sin embargo, hoy en día es imposible tener un método de extracción universal para todo tipo de compuestos, polares y no-polares. Además, es importante tener en cuenta que cuando se pretenden llevar a cabo métodos tanto dirigidos como no dirigidos con el fin de obtener descriptores químicos para la caracterización y clasificación de muestras mediante métodos quimiométricos, el conjunto final de variables (posibles sustancias bioactivas) que resulten ser marcadores discriminantes de las muestras dependerá de múltiples factores, no tan solo del tratamiento de muestras. Así, incluso utilizando el mismo tratamiento de muestra, en función de la instrumentación utilizada se podrían obtener marcadores químicos muy diferentes como ya fue demostrado en un trabajo realizado en el grupo de investigación [68].

Además, se preparó también un control de calidad (QC), que consistía en extracto formado mezclando 50µL de cada uno de los extractos de las muestras analizadas. Esta disolución de control de calidad tiene la función de verificar la reproducibilidad de los métodos propuestos, así como la solidez de los resultados quimiométricos obtenidos. Con este fin,

la disolución de control de calidad se analiza después de cada 10 muestras (las cuales son analizadas siempre aleatoriamente para no introducir ninguna tendencia a lo largo de la secuencia de análisis). Al tratarse de la misma disolución, después de aplicar un método quimiométrico, los diferentes controles de calidad deben de aparecer agrupados. No es necesario que esta agrupación tenga lugar en el centro de los diagramas de scores, ya que en función del número y de la tipología de las muestras analizadas, el control de calidad puede estar enriquecido en componentes pertenecientes a un grupo de muestras determinado (normalmente el más abundante en cuando a número de muestras). Si los controles de calidad no aparecen agrupados, los resultados obtenidos no pueden tenerse en cuenta ya que llevarían a conclusiones erróneas. Sin embargo, en el caso de que esto ocurra, una gran ventaja de utilizar estos controles de calidad, es que un estudio detallado de su distribución a lo largo de los diagramas de scores es que permite ver si ha habido algún factor externo que haya afectado a los perfiles o *fingerprints* obtenidos. Por ejemplo, cuando se utilizan metodologías de tipo UHPLC-HRMS y se analizan un elevado número de muestras complejas (como productos naturales o alimentos) es muy común que la fuente de ionización (electrospray) del instrumento se vaya ensuciando, lo que conlleva una disminución en la intensidad de señal registrada. Esto es fácil de observar siguiendo la distribución de los controles de calidad, los cuales seguirían una distribución ordenada a lo largo del diagrama de scores. Como los controles de calidad analizados a lo largo de la secuencia de las muestras son siempre el mismo extracto, éstos pueden ser utilizados para corregir las señales de las muestras próximas a cada control de calidad, lo que llevaría a un correcto análisis de los resultados quimiométricos de las muestras analizadas.

### 2.3.2. Instrumentación

En ambos trabajos, la separación cromatográfica se realizó con un sistema Accela UHPLC (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, EE. UU.) equipado con una bomba cuaternaria, un automuestreador y un horno de columna, y utilizando una columna de fase invertida Ascentis Express C18 parcialmente porosa (150×2,1mm, tamaño de partícula parcialmente porosa de 2,7µm) proporcionada por Supelco (Bellefonte, PA, EE. UU.).

La separación se realizó utilizando un gradiente de elución utilizando una solución acuosa de ácido fórmico al 0,1% (disolvente A) y acetonitrilo también con ácido fórmico al 0,1% (disolvente B) como componentes de la fase móvil. Las condiciones de elución se describen en la parte experimental de ambas publicaciones. La fase móvil utilizado es típica para la determinación de compuestos polifenólicos, pero también permite la separación de otras sustancias bioactivas [1,143,149]. Cabe decir que con el objetivo de utilizar la metodología propuesta para el análisis no dirigido de las muestras, se utilizó un gradiente de elución universal (que consiste en aumentar progresivamente el componente orgánico de la fase móvil), sin pensar en la separación específica de compuestos, al desconocer qué sustancias

bioactivas se estarán extrayendo con el tratamiento de muestra utilizado. En el caso del método dirigido, se aprovecha la mayor selectividad y resolución proporcionada por el Orbitrap para resolver la separación de los compuestos polifenólicos estudiados.

Así, el sistema UHPLC se acopló a un instrumento Q-Exactive Orbitrap HRMS (Thermo Fisher Scientific) equipado con una fuente de ionización electrospray de elevada temperatura (HESI-II). El nitrógeno se utilizó como gas envolvente, gas de barrido y gas auxiliar a caudales de 60, 0 y 10 au (unidades arbitrarias), respectivamente. Se aplicó la temperatura de vaporización HESI-II a 350°C y el voltaje capilar a -2,5 kV. La temperatura del capilar se ajustó a 320°C y se usó un nivel de RF SLens de 50 V. El sistema Q-Exactive Orbitrap HRMS se ajustó y calibró utilizando la disolución de calibración Thermo Fisher cada 3 días. El instrumento HRMS funcionó en modo de Full scan con un intervalo de 100 a 1500  $m/z$  a una resolución de masa de 70 000 FWHM a 200  $m/z$ .

Sin embargo, tal como se han comentado en el Capítulo 1, cuando se utilizan métodos dirigidos se hace necesaria la utilización de estándares comerciales para llevar a cabo la confirmación de los compuestos de interés (independientemente de que se lleve a cabo su cuantificación o no). Es por ello, que para el desarrollo del método dirigido de la Publicación II, se utilizó un método de adquisición de “*data-dependent scan*”. Por tanto, el modo Full scan fue seguido por un “*data-dependent scan*” operando en modo “*product ion scan*” y obteniendo espectros promedio aplicando una fragmentación escalonada con energías de colisión normalizadas (NCE) de 17.5, 35 y 52.5 eV. Se registraron espectros de iones del producto con una ventana de aislamiento de 0,5  $m/z$  y una primera masa fija de 50  $m/z$ . En esta etapa, se empleó una resolución de 17 500 FWHM a 200  $m/z$ . Se estableció que el modo de “*data-dependent scan*” se activara con un umbral de intensidad de  $1.0E^5$ . Lógicamente, para poder llevar a cabo la identificación inequívoca de los compuestos polifenólicos determinados en las muestras analizadas fue necesaria su caracterización previa mediante la utilización de estándares comerciales.

Finalmente, cabe comentar que una diferencia importante entre ambos métodos utilizados, fue el modo de ionización (positivo o negativo) utilizado. Mientras que en el método dirigido era previsible obtener los mejores resultados en modo negativo, debido a que los compuestos polifenólicos estudiados se ionizan preferentemente en este modo, en el método no dirigido, con el fin de abarcar el máximo número posible de compuestos bioactivos, se utilizó tanto el modo de ionización positivo como negativo.

### 2.3.3. Análisis de datos

El software utilizado para el procesamiento de datos en la publicación II (método dirigido) es el software ExactFinder v2.0 (Thermo Fisher Scientific), mientras que en la publicación



III (método no dirigido) se utiliza el software R (Fundación R, Viena, Austria). Esta diferencia en el software utilizado para el procesamiento de datos reside en el hecho de que en el método no dirigido se deben tener en cuenta todos los compuestos que se pueden obtener, mientras que en el método dirigido se evalúan 53 compuestos polifenólicos previamente seleccionados. Por lo que es necesario aplicar softwares que sean adecuados para cada método. Así mismo, en el método dirigido, el software, consideran parámetros como el tiempo de retención cromatográfico, los errores en la determinación de la masa (relación  $m/z$ ), así como la concordancia del *cluster* y *pattern* isotópico y de los espectros de iones MS/MS con los obtenidos para los estándares comerciales para fines de identificación y confirmación. Mientras, en el método no dirigido, el Software R extrae las señales obtenidas para cada masa (relación  $m/z$ ) en cada tiempo de retención y alinea estas señales entre las diferentes inyecciones para obtener la matriz de trabajo.

Por otro lado, una diferencia importante entre ambos métodos fue la aplicación del pretratamiento de datos. En el método no dirigido se aplicó un umbral de intensidad de  $10^5$ , mientras que en el método dirigido se realizó una normalización con respecto a la concentración polifenólica general con el fin de obtener pesos similares en todas las muestras y de esta forma corregir la variabilidad de las señales debidas al instrumento utilizado.

El tratamiento quimiométrico de los datos obtenidos y utilizados como descriptores químicos de las muestras se realiza con el software SOLO. Sin embargo, en el método dirigido se aplicaron tan solo los métodos quimiométricos de PCA y PLS, mientras que en el método no dirigido además se utilizó PLS-DA, método que mejoró los resultados de forma significativa.

La matriz de datos X, a partir de la que se realizan los cálculos quimiométricos, se obtiene a partir del número de muestras por el número de señales evaluadas en función de las intensidades de pico. Así, en el método dirigido se obtiene una matriz de 106 (muestras y controles de calidad) x 53 (polifenoles), mientras que en el método no dirigido las señales se obtienen en función de la masa y de su intensidad, y el número varía en función de si se ha trabajado en modo negativo, positivo o se han combinado las señales obtenidas en ambos modos de ionización, estrategia conocida como "*data fusion*". Además, en PLS-DA es necesario aplicar una segunda matriz Y que considera el tipo de muestra (pertenencia a un grupo), es decir, si es un producto farmacéutico, una muestra de uva, una de arándano rojo, de frambuesa o de arándano azul.

#### **2.3.4. Caracterización de polifenoles**

La determinación de 53 polifenoles en las 106 muestras analizadas de forma tradicional es un trabajo lento y laborioso. Sin embargo, este proceso se puede realizar de una forma mucho más rápida con los medios actuales de los que disponemos.

Para poder aplicar el método dirigido de forma rápida es necesario previamente caracterizar los polifenoles que se van a determinar, obteniendo los tiempos de retención, los espectros MS y los espectros MS/MS. En la tabla 2 de la publicación II se muestran los datos obtenidos para los 53 polifenoles estudiados. Con respecto a los espectros MS, en general, todos los polifenoles estudiados proporcionaron como pico base la molécula desprotonada,  $[M-H]^-$ , que luego se seleccionó como el ion precursor para los espectros MS/MS. Para casi todos los polifenoles se obtuvieron errores de masa por debajo de 1, y siempre por debajo de 5ppm.

A partir de los datos espectrales obtenidos se construyó una base de datos personalizada de masa exacta con los 53 polifenoles en el software ExactFinder.

Una vez creada esta base de datos resulta mucho más fácil obtener la señal (área del pico cromatográfico) de cada polifenol en cada una de las muestras, ya que al aplicar el software se obtiene un informe, para cada muestra, que indica los polifenoles encontrados (y su correspondiente señal), y confirmados según los criterios de confirmación previamente comentados.

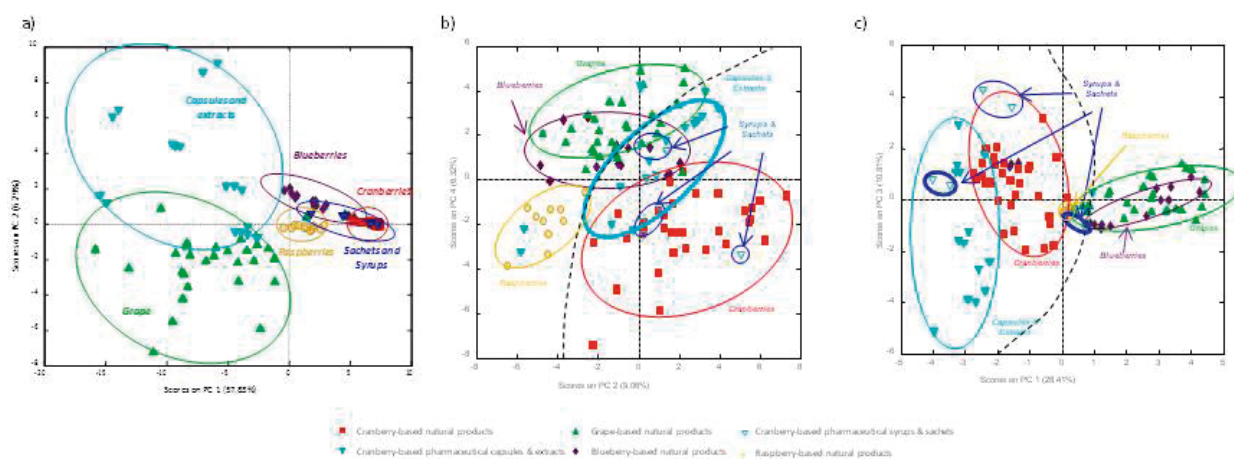
### **2.3.5. Resultados**

Como se ha mencionado anteriormente el objetivo principal de este trabajo es desarrollar métodos rápidos y sencillos para la caracterización, clasificación y autenticación de productos naturales y productos farmacéuticos a base de arándanos rojos. Para ello, después del procesamiento de datos y una vez obtenidas las matrices con los descriptores químicos de las muestras, los datos son tratados con el software SOLO obteniendo finalmente diferentes diagramas de scores que nos permiten clasificar las muestras. En este apartado se comparan y discuten los resultados obtenidos por cada método.

#### **2.3.5.1. Análisis de componentes principales (PCA)**

Uno de los métodos quimiométricos aplicado en estos trabajos es el análisis de componentes principales (PCA). Este método quimiométrico es un método no supervisado cuyo propósito es identificar grupos o relaciones entre muestras, sin ningún conocimiento previo de clases o grupos.

La Figura 2.7 muestra el diagrama de scores obtenido a partir del a) el perfil polifenólico, b) a partir del perfil metabolómico en modo positivo y c) a partir del perfil metabolómico en modo negativo, para todas las muestras analizadas.



**Fig. 2.7.** Gráfico de scores (PCA) obtenido a partir de a) el perfil polifenólico, b) el perfil metabolómico en modo positivo y c) el perfil metabolómico en modo negativo de todas las muestras analizadas.

Como puede observarse en la Figura 2.7 según el tipo de descriptores químicos utilizados se obtienen resultados diferentes en los diagramas de scores en cuanto a la distribución y agrupación de las muestras, si bien las muestras tienen tendencia a agruparse, principalmente, en función del tipo de fruta (arándano rojo, uva, arándano azul o frambuesa) utilizado.

Lo primero que puede observarse en todas las condiciones obtenidas es la discriminación clara entre las muestras de arándano rojo americano en relación a si se tratan de productos naturales o productos farmacéuticos. Dependiendo del método utilizado, esta discriminación es mayor o menor. Tal como se ha comentado en las publicaciones correspondientes, esto probablemente se deba a los procedimientos de purificación y preconcentración seguidos por las compañías farmacéuticas en la preparación de extractos crudos de frutas de arándano rojo enriquecidos con compuestos bioactivos, en comparación con productos naturales de fruta de arándano rojo no tratados, proporcionando así diferentes patrones a pesar de que la fruta de origen es la misma. Siguiendo el método dirigido, la distribución obtenida en el gráfico de scores, a partir del perfil polifenólico (Figura 2.7a) permite agrupar las muestras en función de la fruta de origen, así como agrupar los productos farmacéuticos en cápsulas y extractos. Las muestras de una misma clase se encuentran agrupadas mayoritariamente en la misma zona. Además, para cada tipología de muestras naturales (frambuesa, uva, arándano azul y arándano rojo) éstas se encuentran agrupadas en la misma zona específica tanto si son de pasas como de zumos o fruta, lo que hace pensar que en este tipo de análisis la tipología de la muestra no es tan importante. Sin embargo, las muestras procedentes de preparaciones farmacéuticas a base de arándano rojo se encuentran en una región distinta a los productos naturales a base de arándano rojo.

Por otro lado, en el método no dirigido no se obtuvo una discriminación completa entre todos los tipos de muestras analizadas. Sin embargo, las muestras tienden a agruparse también según el fruto de origen. En general, el perfil metabolómico, obtenido por UHPLC-

HRMS en modo de ionización negativa, parece proporcionar descriptores químicos más discriminantes, ya que permite concentrar las muestras en regiones más pequeñas dentro del gráfico de scores (ver, por ejemplo, la distribución de arándano rojo y, especialmente, de frambuesa, Figure 2.7c). Sin embargo, en este punto no se logró una discriminación completa entre los cuatro tipos de frutas, por ejemplo, las muestras de arándano azul y uva tienden a superponerse. No obstante, al igual que en el método dirigido, los productos naturales a base de arándano rojo se separaron por completo del resto de muestras, tanto en modo positivo como en negativo.

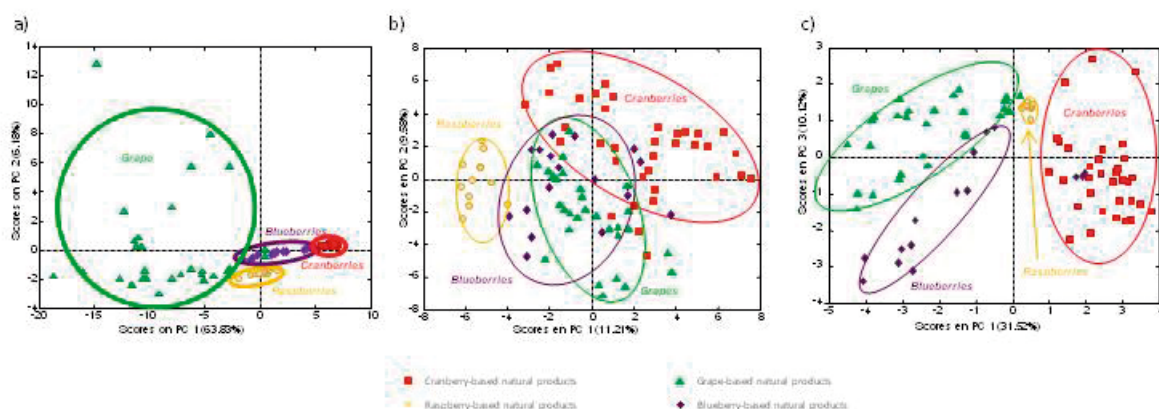
Al comparar los resultados de PCA obtenidos con ambos métodos se puede también observar que en el caso del método no-dirigido, tanto en modo positivo como en modo negativo, todas las muestras de base arándano rojo tienden a estar distribuidas en la zona opuesta al resto de muestras (basadas en otras frutas). Esto no ocurre, sin embargo, con el método dirigido, donde las muestras de base uva, frambuesa y arándano azul están en una zona intermedia separando el conjunto total de muestras de base arándano rojo.

Sin embargo, tal como se ha comentado anteriormente, en todos los casos las muestras de arándanos rojos (productos naturales) tienden, en todos los casos, a estar separadas del resto de muestras. Este resultado es interesante porque los productos naturales de arándano rojo deben ser la fuente específica de los extractos crudos empleados en la preparación de productos farmacéuticos y son susceptibles de adulteración con otros extractos de frutas. Sin embargo, en el método no dirigido podemos observar que las muestras a base de arándano rojo (tanto productos naturales como preparaciones farmacéuticas) tienden a agruparse, más o menos, en la misma región del diagrama de scores, aunque con cierta discriminación dependiendo de la tipología del producto farmacéutico (extractos crudos, cápsulas, jarabes y sobres), y en algunos casos se diferencian claramente de los productos naturales a base de arándano rojo.

Con la finalidad de poder observar mejor estos resultados y teniendo en cuenta que se espera que los extractos de frambuesa, arándano azul y uva se utilicen como posibles adulterantes de los extractos de arándano rojo, se realizó un PCA independiente entre los productos naturales a base de arándano y las otras tres familias de frutas (Figura 2.8), sin tener en cuenta los productos farmacéuticos.

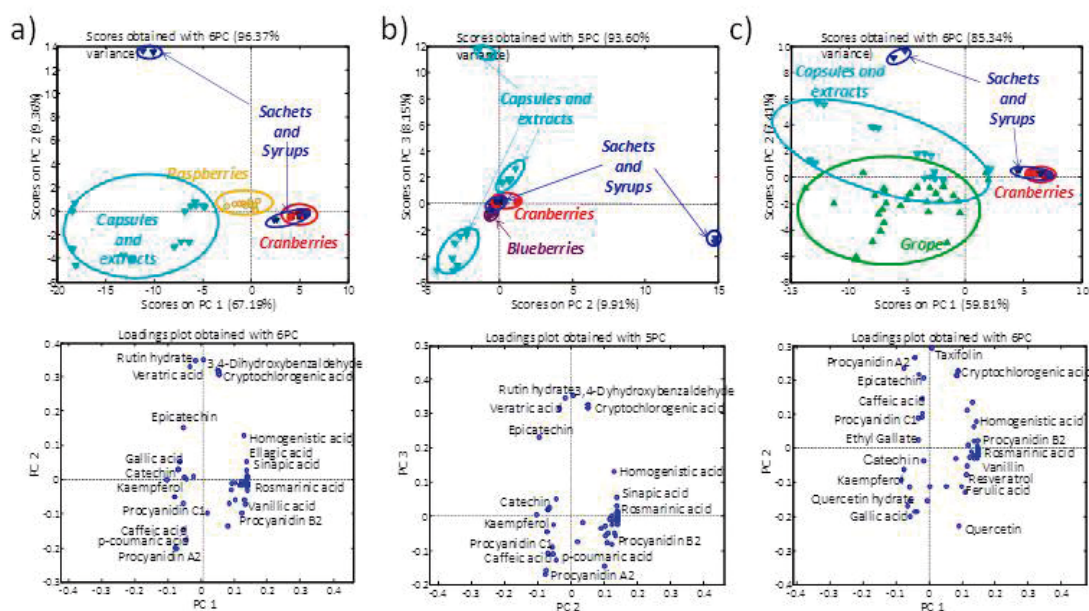
Como se puede observar en la figura, a excepción de algunos valores atípicos que se esperan cuando se trabaja con productos naturales, las muestras tienden a agruparse en todos los casos según la fruta de origen, aunque se observó una mayor superposición entre las muestras utilizando el perfil metabolómico en el modo de ionización positivo. Por tanto, tanto el perfil metabolómico en modo de ionización negativa como el perfil polifenólico proporcionan una mejor discriminación entre los productos naturales a base de arándano rojo y de otras frutas adulterantes. Esto hace pensar que, probablemente, sean también

compuestos polifenólicos los que contribuyan a la discriminación de las muestras al utilizar el perfil metabolómico en modo de ionización negativo.



**Fig. 2.8.** Gráfico de scores mediante PCA obtenido a partir de a) el perfil polifenólico, b) el perfil metabolómico en modo positivo y c) el perfil metabolómico en modo negativo, de todos los productos naturales analizados, sin considerar los productos farmacéuticos.

Por otro lado, para observar mejor las diferencias entre los productos naturales de arándano rojo y los correspondientes a las demás frutas, se construyen tres modelos quimiométricos en los que solo se representan las muestras de arándanos rojo, productos farmacéuticos y muestras procedentes de una misma fruta, a partir del perfil polifenólico (Figura 2.9).



**Fig. 2.9.** Gráficos de scores y loadings obtenidos por PCA representando a) PC1 vs. PC2 para las muestras de arándano rojo frente a las de frambuesa, b) PC2 vs. PC3 para las muestras de arándano rojo frente a las de arándano azul, y c) PC1 vs. PC2 para las muestras de arándano rojo frente a las de uva, utilizando los perfiles polifenólicos como descriptores químicos.

Los arándanos rojos presentan una buena separación respecto al resto de frutas cuando se estudia la distribución de los resultados individualmente, tal y como se observa en la Figura 2.9. Si observamos la Figura 2.9b en la que se representan el arándano rojo y el arándano azul, se obtiene una separación satisfactoria entre ambas, aun siendo frutas muy similares. En cuanto al arándano rojo frente a uva o frambuesa, figuras 2.9a y 2.9c, respectivamente, vemos que se pueden separar claramente, ya que las muestras de arándano rojo están situadas a la derecha, mientras que para la frambuesa están en el centro y para la uva en la parte inferior izquierda.

Las muestras farmacológicas en cambio, presentan una separación similar en la Figura 2.9 y en la Figura 2.7. Mientras que los resultados para algunos jarabes y sobres se encuentran cerca del arándano rojo, los de capsulas y extractos se encuentran más alejados en las tres gráficas de la Figura 2.9. Además, en la figura 2.9c se puede observar que la distribución de un grupo de muestras farmacológicas se encuentra cercana a la distribución de las muestras de uva, lo que podría significar que la composición polifenólica, tanto en estos productos farmacéuticos como en la uva, podría ser similar. Hay que destacar también los gráficos de loadings mostrados en la Figura 2.9. Estos gráficos nos indican qué polifenoles son más discriminantes teniendo en cuenta la región donde aparecen cada tipo de muestras. Como podemos observar, el ácido homogénico, la procianidina B2, ácido rosmarínico y el ácido sináptico se encuentran en la zona de las muestras de arándano rojo y, por lo tanto, se podrían considerar comopolifenoles característicos y discriminantes de este tipo de fruta.

A partir de los resultados obtenidos, podemos concluir que utilizando ambos métodos analíticos (UHPLC-HRMS dirigido y no-dirigido), el análisis quimiométrico no supervisado por componentes principales permite una discriminación de las muestras bastante aceptable en función de la fruta de origen.

### **2.3.5.2. Análisis discriminante por regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA)**

Este procedimiento quimiométrico se aplicó tan sólo al utilizar el método no dirigido (publicación III) y, a diferencia de PCA, el método quimiométrico de PLS-DA es un método supervisado y por lo tanto, se guía por información preliminar que servirá de referencia para los resultados finales objeto de estudio.

Para ese propósito, no se requirió tratamiento adicional de los datos de las matrices de datos empleadas en los estudios de PCA. Por lo tanto, la misma matriz de datos X empleada en PCA se evaluó por PLS-DA, mientras que la matriz de datos Y codificó la pertenencia de las muestras a sus clases correspondientes, es decir, productos farmacéuticos a base

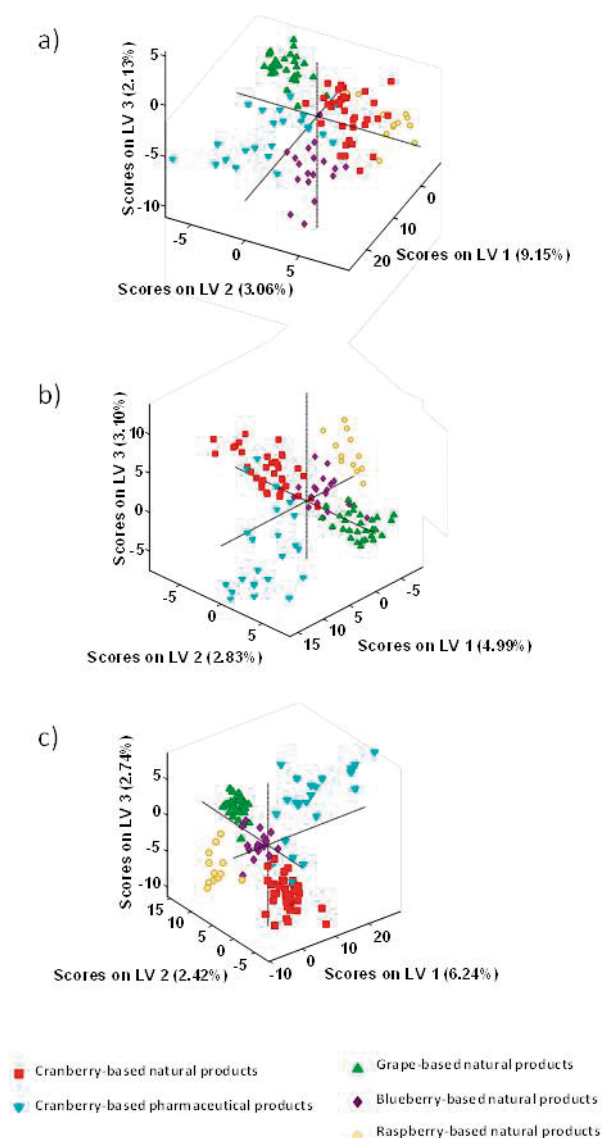
de arándano rojo, y productos naturales a base de arándano rojo, uva, arándano azul y frambuesa, respectivamente.

En la Figura 2.10 podemos observar los gráficos de scores en 3D obtenidos a partir de los datos en modo negativo, positivo y la fusión de ambos modos de adquisición. Como se ve en las gráficas, en general se obtuvo una discriminación muy aceptable entre los grupos de muestras analizadas, ya que las muestras tienden a agruparse de acuerdo con el fruto de origen, independientemente del modo de adquisición de datos empleado. Además, al igual que por PCA, los productos a base de arándano rojo se diferencian en dos grupos: productos naturales a base de fruta y productos farmacéuticos, de acuerdo con los procedimientos de purificación y preconcentración aplicados al obtener los productos farmacéuticos, como se comentó anteriormente.

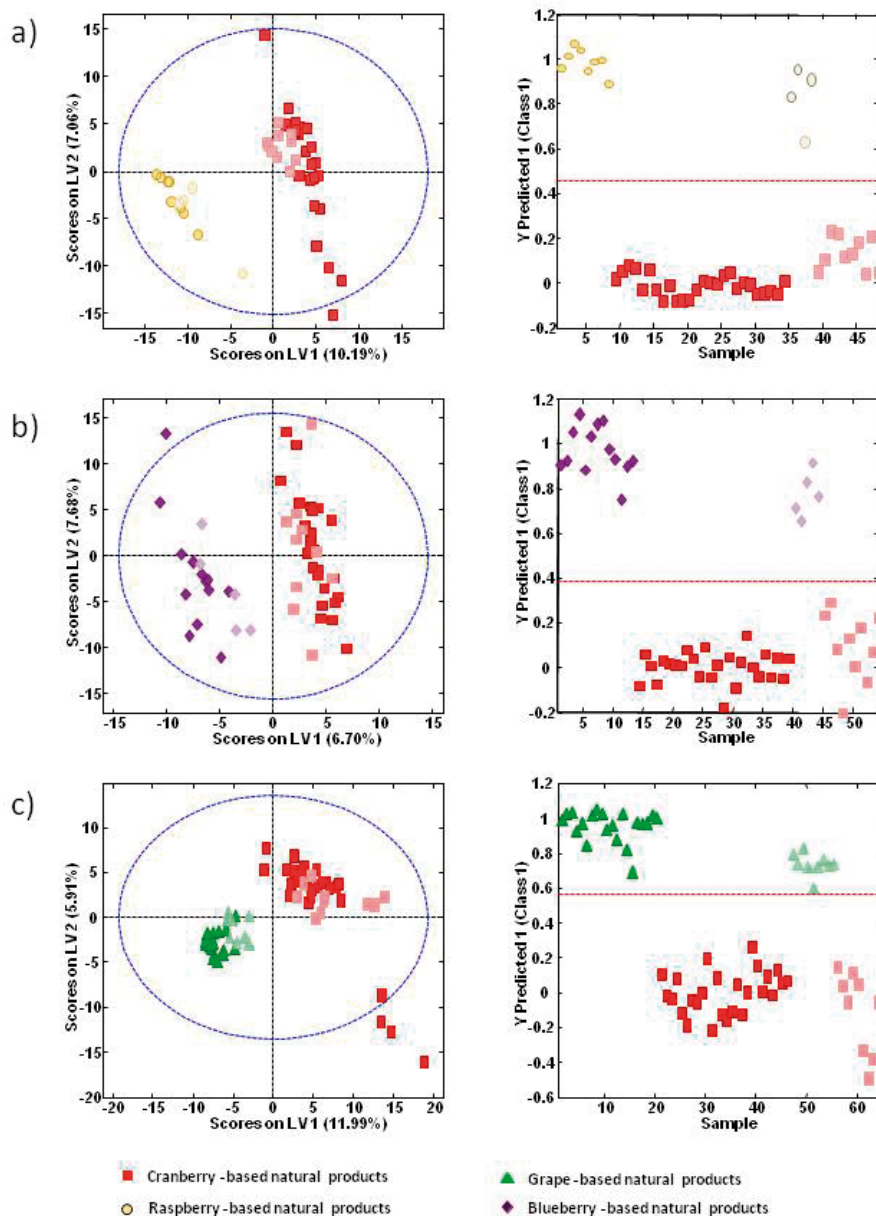
**Fig. 2.10.** Gráfico de scores en 3D de LV1 vs. LV2 vs. LV3 para las muestras analizadas usando el perfil metabolómico a) en modo de adquisición negativo, b) en modo de adquisición positivo, y c) combinando ambos modos de adquisición (data fusión).

Sin embargo, al igual que con los datos obtenidos por PCA, las muestras a base de arándano rojo, naturales o farmacéuticas, tienden a distribuirse en la misma zona del gráfico de scores, y además, es opuesta a las zonas en las que están situadas las muestras basadas en uva, arándano azul y frambuesa. Por lo tanto, los conjuntos de datos individuales obtenidos en modo negativo o positivo o mediante el conjunto de fusión de datos de ambos perfiles metabolómicos, son adecuados, a priori, para la caracterización y autenticación de productos naturales a base de arándano rojo y preparaciones farmacéuticas.

Con la finalidad de validar la metodología propuesta y teniendo en cuenta que se espera que los extractos de frambuesa, arándano azul y uva se utilicen como posibles adulterantes de los extractos de



arándano, se construyeron tres modelos de PLS-DA (arándano rojo vs. uva, arándano rojo vs. arándano azul y arándano rojo vs. frambuesa), utilizando el perfil metabolómico en modo negativo, ya que este modo de adquisición obtuvo mejores resultados que el modo positivo y es más sencillo de aplicar que la fusión de ambos modos de adquisición. Estos modelos se construyeron utilizando el 70% de cada grupo de muestras como el conjunto de calibración y se validaron con el 30% restante de las muestras.



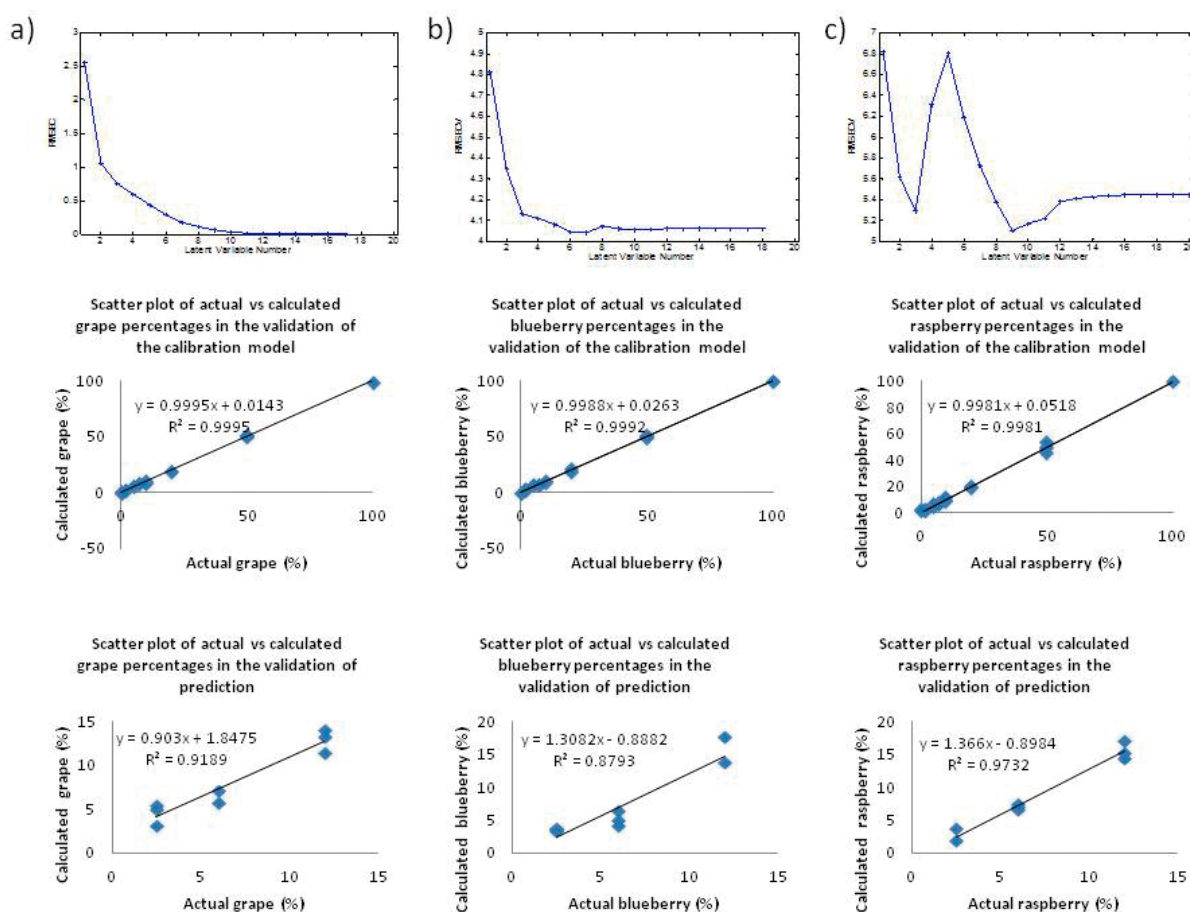
**Fig. 2.11.** Gráfico de scores obtenido mediante PLS-DA representando LV1 vs. LV2, así como parcelas de clasificación para arándano rojo vs. (a) frambuesa, (b) arándano azul y (c) uva, respectivamente. Los símbolos oscuros y claros corresponden a los conjuntos de calibración y validación, respectivamente. Las líneas discontinuas indican los umbrales de clasificación que separan las clases.



La Figura 2.11 representa los gráficos de scores PLS-DA obtenidos, proyectando LV1 frente a LV2, así como el gráfico de clasificación de arándano rojo vs. frambuesa a), arándano azul b) y uva c), respectivamente. Como se ve en la figura, todas las muestras se asignaron correctamente a su clase correspondiente, alcanzando así una tasa de clasificación del 100% en cada caso estudiado.

### 2.3.5.3. Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)

Finalmente, se evaluaron ambos métodos, el dirigido (perfil polifenólico) y el no-dirigido (utilizando el perfil metabolómico en modo negativo) para la autenticación y cuantificación de los niveles de fraude en extractos de arándano rojo adulterados, utilizando PLS como método de calibración multivariante. Para ese propósito, extractos de arándano rojo se adulteraron con extractos de las otras tres frutas (arándano azul, frambuesa y uvas) en diferentes niveles de concentración (2%, 2.5%, 5%, 6%, 7%, 12%, 20% y 50%). Se



**Fig. 2.12.** Modelo PLS aplicado a la cuantificación del porcentaje de a) uva, b) arándano azul y c) frambuesa en extractos de arándanos rojos adulterados cuando se utilizan perfiles polifenólicos UHPLC-HRMS (método dirigido).

prepararon triplicados de todas las adulteraciones, así como de extractos de fruta 100% puros. El 50% de adulteración se preparó por quintuplicado para evaluar la reproducibilidad de los datos obtenidos y como control de calidad. Todas las muestras adulteradas se analizaron y procesaron aplicando ambos métodos tal como se ha descrito anteriormente. Para la calibración del modelo PLS se utilizaron los niveles de adulteración del 2%, 5%, 7%, 20% y 50%, así como las muestras no adulteradas (100%), y posteriormente, se cuantificó el porcentaje de adulteración en las muestras adulteradas a los niveles de 2.5%, 6% y 12%, las cuales se utilizaron para validar el método. Se utilizó el método de validación “*Venetian blinds cross*” para estimar el número de variables latentes (LV) utilizadas para la evaluación del método, considerando 3 divisiones de datos para el perfil polifenólico y 2 para el perfil metabolómico en modo de adquisición negativo. La Figura 2.12 muestra, como ejemplo, los resultados obtenidos utilizando el perfil polifenólico, después de aplicar el modelo PLS establecido para la predicción de los niveles de adulterante de la uva, frambuesa o arándano azul en un extracto de arándano rojo. Los correspondientes al método no-dirigido en modo de adquisición negativo se pueden consultar en la Publicación III (sección 2.3).

Además, en la Tabla 2.3 se muestran los resultados (errores de calibración y de predicción) obtenidos mediante PLS cuando se utiliza la uva, el arándano azul y la frambuesa como adulterantes en extractos de arándano rojo, obteniendo buenos resultados tanto al aplicar el perfil metabolómico en modo de adquisición negativo (método no-dirigido) como el perfil polifenólico (método dirigido).

	<b>Adulterante</b>	<b>Número de variables latentes</b>	<b>Error de calibración</b>	<b>Error de predicción</b>
Perfil polifenólico	Uva	3	<0,01 %	2,86 %
	Arándano azul	3	<0,01 %	2,71 %
	Frambuesa	3	<0,01 %	5,96 %
Perfil metabolómico	Uva	2	<0,01 %	0,17 %
	Arándano azul	2	<0,01 %	0,47 %
	Frambuesa	2	<0,01 %	3,86 %

**Tabla 2.3.** Errores de predicción por PLS en la cuantificación de extractos de arándanos rojos adulterados con extractos de frambuesa, arándano azul y uva, utilizando el perfil polifenólico y el perfil metabolómico en modo negativo.

Los errores de calibración fueron en todos los casos inferiores al 0.01% y, en general, también se obtuvieron pequeños errores de predicción en el estudio de validación, con

valores entre 0.17% y 5.96%. Sin embargo, se puede observar que el método no-dirigido utilizando perfiles metabolómicos en modo de adquisición negativo proporcionó, en todos los estudios de adulteración llevados a cabo, mejores errores de predicción que el método dirigido utilizando los perfiles polifenólicos, lo cual tiene cierta lógica ya que el perfil metabolómico permite trabajar con un mayor número de variables (compuestos bioactivos).

A partir de los resultados obtenidos, y teniendo en cuenta que se espera que los niveles de adulteración sean altos si se pretende un beneficio económico, las metodologías propuestas en esta investigación mostraron un buen desempeño para la autenticación y cuantificación de fraudes, incluso a niveles bajos de adulteración.



# CAPÍTULO 3

## PIMENTÓN

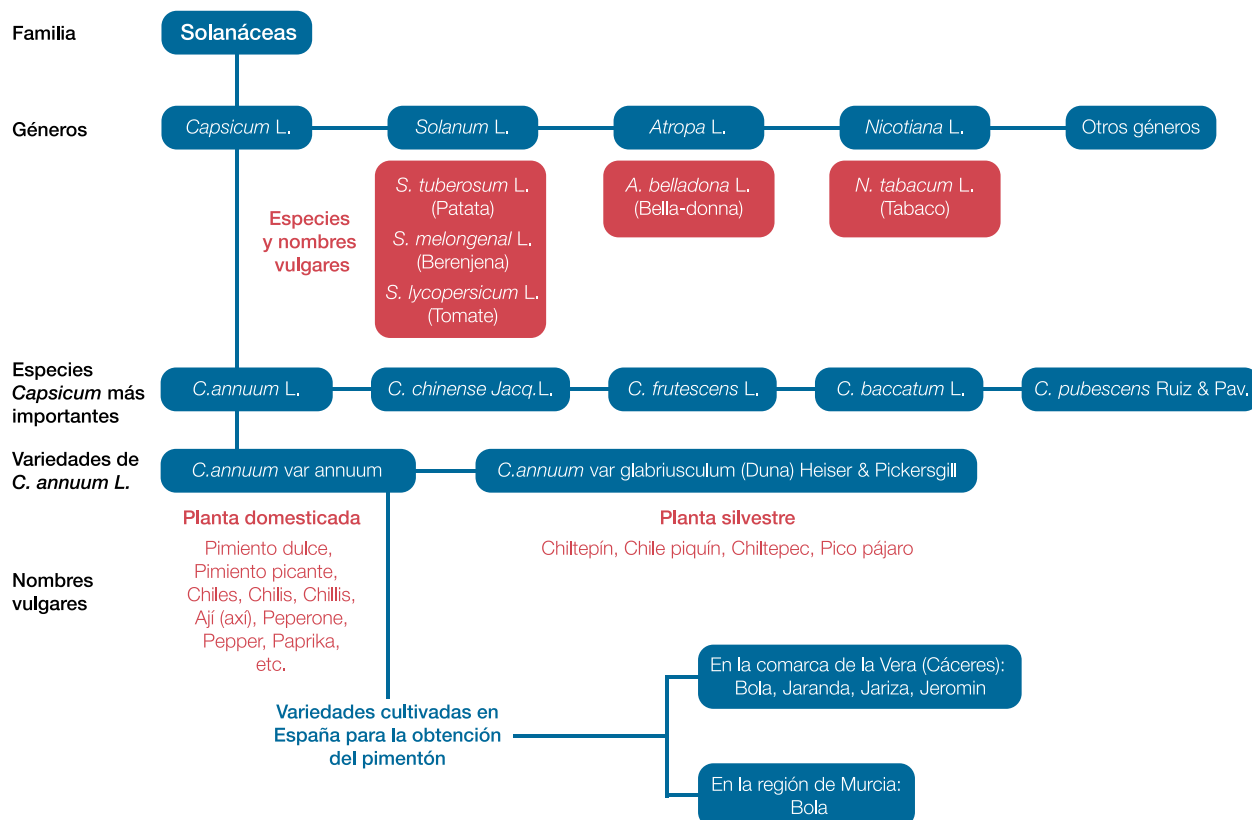


# PIMENTÓN

Los estudios realizados en este trabajo se centran en varias variedades cultivadas de *Capsicum annuum* L. var. *annuum* que es la planta más conocida, cultivada y extendida de su género.

## 3.1. El género *Capsicum* L.

*Capsicum* L. es el nombre del género de una planta con flores (Angiospermas), de la amplia familia de las Solanáceas, que recibe diferentes nombres populares según las especies y variedades (Figura 3.1). La familia de las Solanáceas abarca también a otros géneros con especies de notable interés económico, ya sea como plantas ornamentales, medicinales o cultivadas para la alimentación humana, como es el caso del género *Solanum* L. [*S. tuberosum* L. (patata); *S. melongena* L. (berenjena); *S. lycopersicum* L. (tomate)].



**Fig. 3.1.** Esquema taxonómico de *Capsicum annuum* L.

En 1493 Pedro Mártir de Anglería publicó que Cristóbal Colón descubrió que los nativos del Nuevo Mundo tenían ciertas plantas más picantes que la pimienta del Cáucaso. Estas plantas fueron más tarde denominadas por los naturalistas con el término latino de *Capsicum*, término que fue adoptado por Tournefort (1719), el primero en definir el género, y posteriormente establecido por Linné en 1753, en su publicación *Species Plantarum* que se considera el punto de partida de la nomenclatura botánica actual. El nombre de *Capsicum* deriva de la palabra latina capsae = caja o cofre, en referencia a la forma del fruto, aunque otros autores proponen su origen del griego *kaio* = mordiente, “que parece morder los labios”, alusivo a su sabor picante.

El género *Capsicum*, que comprende aproximadamente 39 especies, es nativo de las regiones tropicales y templadas de América y se distribuye desde México hasta Brasil, Paraguay, centro de Argentina y bosques montañosos de los Andes [150,151].

Las cinco principales especies cultivadas y económicamente más importantes pertenecientes al género *Capsicum* son *Capsicum annuum* L., *C. chinense* Jacq. y *C. frutescens* L., ahora ampliamente cultivadas en toda Europa, el sur de los Estados Unidos, África, India y China, y las especies *C. baccatum* L. y *C. pubescens* Ruiz & Pav., que se cultivan predominantemente en Sudamérica [151].

Desde el punto de vista taxonómico, en la especie *Capsicum annuum* L. se distinguen dos variedades: *C. annuum* L. var. *annuum* y *C. annuum* var. *glabriusculum* (Dunal) Heiser & Pickersgill (Figura 3.1).

*Capsicum annuum* var. *glabriusculum* es una planta silvestre que se extiende desde el norte de Sudamérica hasta el sur de Norteamérica [1]. Es conocida con los nombres populares de chiltepín, chile piquín, chiltepec o pico pájaro, entre otros nombres vernáculos. Esta planta es muy popular en México tanto por su picor, como por su sabor y aroma, y muy apreciada en su gastronomía. Aunque se han realizado algunos esfuerzos para cultivar y propagar esta planta, todavía no ha podido ser domesticada. El chiltepín requiere de cierto tipo de suelo, humedad y sombra, condiciones que solo se las brinda el medio ambiente natural [152].

*Capsicum annuum* var. *annuum* es la planta más cultivada, y se extiende por todo el mundo e incluye todos los cultivares de la especie. Es conocida con los nombres vernáculos de pimiento dulce, pimiento picante, chiles, chilis, ajís, etc. (Figura 3.1). Quizás el que este taxón sea el más extendido en el mundo se deba a que fue el primero que Cristóbal Colón y otros exploradores trajeron a Europa, y desde ahí, se extendió rápidamente a otros países. El uso de las formas no picantes, tanto las utilizadas como hortaliza como las empleadas para pimentón, está ampliamente extendido. Asimismo, las formas picantes constituyen la primera especia alimenticia tanto en latinoamérica como en el resto del mundo [153-155].



Los nombres populares con el que se conoce, de manera genérica, a los frutos que pertenecen al género *Capsicum* tienen un origen distinto, siendo unos de origen americano, como ají (axí), chili, chilli o chile (modificación española de chilli), mientras que otros son de origen europeo y, según el idioma, llevan un nombre relacionado con la pimienta como pimienta, pepper, peperone, paprika, o piment, entre otros. Además, dependiendo de las especies o de las variedades cultivadas de una misma especie se utilizan otros nombres populares más específicos como tabasco, cayena, ñora, guindilla, etc.

### 3.2. El género *Capsicum* en Europa y su posterior difusión

El género *Capsicum* ha sido conocido desde el inicio de las civilizaciones en América y ha formado parte de la dieta humana desde 6000-7500 a.C. Después de que Colón introdujera las semillas de *Capsicum* en España, su cultivo se extendió por todo el mundo. Actualmente, las cinco especies domesticadas, ya indicadas (Figura 3.1), se cultivan en muchos países por su gran valor económico, ya sea como hortalizas, aditivos alimentarios picantes o no, colorantes, productos farmacéuticos e incluso como medicamentos populares.

Se ha de tener en cuenta sobre la introducción del pimienta en Europa desde América y su posterior difusión por el resto del mundo que la mayoría de los autores no se refieren a una variedad en particular sino que se refieren en general al género *Capsicum* como Andrews, Long-Solís y González Bueno [156-158].

La expansión del pimienta se ha hecho universal, quizás debido, al menos en parte, a su uso como especia análoga a la pimienta (*Piper nigrum* L.). En la Europa del siglo XV las especias tenían gran valor económico y su control era un mecanismo de poder. La pimienta, importante objeto de transacciones mercantiles, era empleada frecuentemente como valor de cambio al ser considerada en Europa como la más estimada y cara de las especias. Uno de los motivos principales del viaje de Cristóbal Colón a América fue la búsqueda de una ruta más corta a las “Indias” (sudeste de Asia), que facilitara la traída a Europa de especias como la pimienta [153].

Cuando Cristóbal Colón llegó al Nuevo Mundo, el ají (Figura 3.1) era habitualmente consumido por sus habitantes. La primera mención del ají se halla en el Diario de Navegación de Cristóbal Colón cuyo manuscrito original está perdido, y que conocemos por el fraile Bartolomé de las Casas que hizo un abstracto del diario. El 15 de enero de 1493 anotó en su diario:

*“también ay mucho axí, qu’es su pimienta, d’ella que vale más que pimienta, y toda la gente no come sin ella, que la halla muy sana, puédense cargar cincuenta caravelas cada año en aquella Española”* [159].

El ají es un nombre taíno empleado para la misma especia que en náhuatl se denomina chilli (Figura 3.1). La Española, la isla del Caribe que hoy se corresponde con dos estados, la República Dominicana y Haití, estaba habitada por los taínos. De estos habitantes procede la palabra axí (ají), mientras que la palabra chilli, empleada para la misma especia procede del náhuatl, que es una lengua indígena de México, de donde deriva la palabra chilli, españolizada como chile.

Existen muchas referencias sobre el axí o ají en los textos colombinos, donde se indica la existencia de una especia llamada ají, utilizada por los indios para adobar sus alimentos y la similitud de ésta con la pimienta, como las de Diego Álvarez Chanca (1494) y Michele da Cuneo (1495) [160].

Pedro Mártir de Anglería (1457-1526), miembro del Consejo Real y del Consejo de las Indias, autor de *“Décadas del Nuevo Mundo”* (*De Orbe Novo Decades*, 1530), una crónica del descubrimiento, escrita en latín, contribuyó a la difusión del pimiento en Europa [158]. En la primera “Década” informó que en el primer viaje de Cristóbal Colón habían traído *“ciertos granos rugosos de diversos colores, más picantes que la pimienta del Cáucaso”*. Al referirse al segundo viaje, dice que las había enviado al cardenal Ascanio Sforza (Italia) para que las hiciera examinar por los especieros, advirtiéndole que las *“pepitillas...por el demasiado calor son fuertes y pican a la lengua”*. En la quinta “Década” vuelve a ocuparse del ají, pero esta vez menciona la existencia de tres tipos de pimientos: dos picantes (uno largo y otro redondo) y uno dulce. Además, señala la similitud que los primeros europeos, que conocieron el ají, vieron entre éste y la pimienta, lo que finalmente dio lugar a la denominación de pimiento [159].

Gonzálo Fernández de Oviedo (1478-1557), con el reconocimiento oficial de Carlos V desde 1532 para escribir las cosas de las Indias, menciona en su *“Historia general y natural de la Indias”* un centenar de plantas americanas, la mayoría de ellas comestibles, pero también un buen número de plantas medicinales, maderables y tintóreas. Con respecto al pimiento escribe lo siguiente:

*Axí es una planta muy conocida en todas las partes destas islas e Tierra Firme e muy ordinaria e necesaria. Esta es la pimienta de los indios y en todas sus labranças e huertos la ponen...y no es menos agradable a los cristianos ni hacen menos por ella que los indios. Esta es una planta tan alta como hasta la cinta de un hombre...e hace un pie copado e de muchas ramas. La flor desde axí es blanca e pequeña e no huele, pero es fruto es a la vista en diferentes maneras e proporción. Pero en efecto todo axí quema mucho según la pimienta e alguno de lo más; echa unos granos o vainas (mejor diciendo) huecas e coloradas de muy fino color e alguna dellas tan grandes como un dedo luengo e grueso. Otro axí que hay echa estos granos colorados e redondos e tan gruesos como guindas o menores. Otro axí que lleva estos granos verdes pero menores que los susodichos...Otro*

*axí hay que echa los granillos verdes e muy pequeños. Otro los echa pintados a un cabo de negro que tira a azul oscuro. Hay algún axí de generación que se puede comer crudo e no quema. De las hojas del axí se hace tan buena o mejor salsa al gusto que la del perejil desliéndole con el caldo de la olla de carne. Y en la verdad el axí es mejor con la carne e con el pescado que la muy buena pimienta. E ya llevan dello a España por muy buena especiería; y es cosa muy sana...y desde Europa envían mercaderes e otras personas por ello y lo buscan con diligencia.*

Como vemos, Gonzalo Fernandez de Oviedo señaló la importancia del ají en la dieta de los indios, a la que llamó “pimienta de los indios”, pero además destacó que también había pasado a formar parte de la alimentación de los europeos que vivían allí. Por otro lado, hizo una minuciosa descripción de los innumerables tipos de ají, señalando que casi todos tenían un efecto picante muy similar al de la pimienta, aunque había uno que “*se puede comer crudo y no quema*”. Además, en consonancia con los datos de Anglería, Oviedo recoge el hecho que desde muy pronto se habían establecido redes comerciales para llevar este producto a Europa, donde se había convertido en un condimento muy apreciado: “*E ya llevan dello a España por muy buena especiería; y es cosa muy sana, y hallanse bien en darse a ello. Y desde Europa embían mercaderes y otras personas por ello y lo buscan con diligencia.*” [158-163].

El conocimiento en Europa de las plantas americanas cambió radicalmente tras la publicación del libro de “*La historia medicinal de las cosas que traen de nuestras Indias Occidentales*” de Nicolás Monardes (ca.1608-1588), considerado como el primer tratado sobre la materia médica americana [164]. El gran mérito de este médico sevillano fue estudiar las plantas americanas desde el punto de vista de la farmacognosia y la terapéutica, debido a ello se detuvo en la descripción de las sustancias medicamentosas, en los métodos de preparación, en las indicaciones terapéuticas y en los modos de administración [164]. Monardes se ocupó de un centenar de “nuevas medicinas” vegetales americanas tales como resinas, oleoresinas, purgantes, bálsamo e incluso dedicó un capítulo a la planta del tabaco comentando sus beneficios.

Sobre el pimiento dice:

*“No quiero dejar de decir de la pimienta que traen de Indias que no sólo sirve a medicina, pero es excelentísima, la cual es conocida en toda España, porque no hay jardín ni huerta, ni macetón que no la tenga sembrada por la hermosura del fruto que lleva.”. Y añade: “Usan de ellos en todos los guisados y potajes porque hacen mejor gusto que la pimienta común. Hecho tajadas, y echados en caldo, es salsa excelentísima. Usan de ellos en todo aquello que sirven las especias aromáticas que traen de Maluco y Calicut. Difieren en que las de oriente cuestan muchos ducados, estotras no cuesta más que sembrarla, porque en una planta hay especias para todo el año con menos daño y más provecho nuestro. Y*

sobre sus propiedades medicinales indica: “Confortan mucho, resuelven ventosidades, son buenas para el pecho y para los fríos de complexión, calientan y confortan, corroborando los miembros principales [165-167].

Charles de l'Écluse (1526-1609), también conocido como Carolo Clusio, realiza la traducción al latín de la obra de Monardes bajo el título de “*De Simplicibus Medicamentis Ex Occidentali India Delatis, quorum in Medicina usus est ...*”. En esta obra, bajo el título de “Piper”, agrupa los capítulos de Monardes sobre la “pimienta luenga” (*Piper angustifolium* Ruiz et Pavon) y sobre “la pimienta de Indias”, e incluye una reproducción del grabado de la “pimienta luenga” que figura en el original castellano de Monardes, y añade uno del “*Capsicum*” y otro del “*Capsicum Brasilianum*” observado en Lisboa (Figura 3.2).

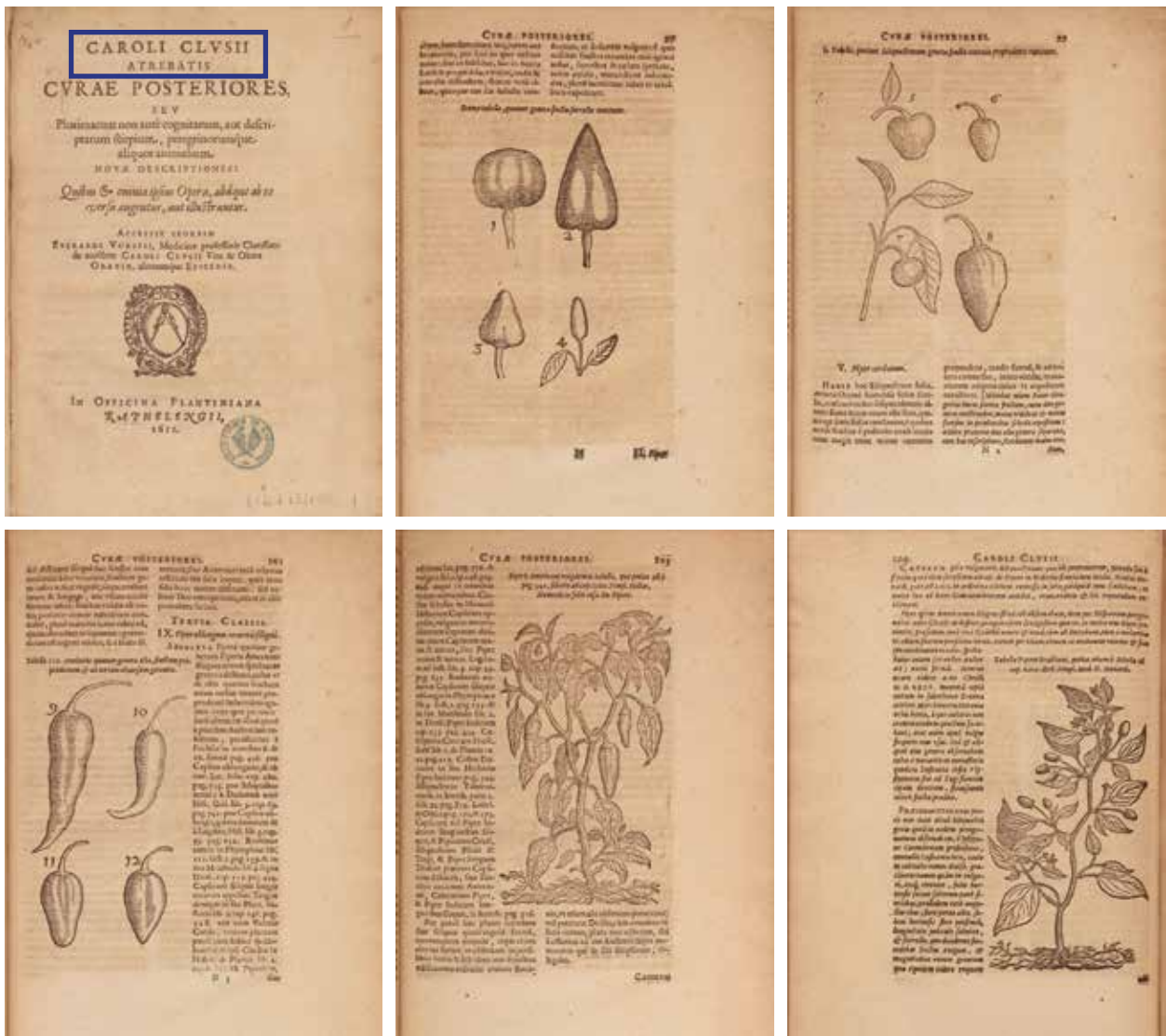


**Fig. 3.2.** A: Portada del libro “*De Simplicibus Medicamentis Ex Occidentali India [17]. Delatis, quorum in Medicina usus est ..*”, (1574). Traducción al latín de Monardes realizado por Charles de l'Écluse; B: Capsicum; C: Capsicum Brasilianum.

Más tarde, Charles de l'Écluse publicaría “*Exortorum libri decem*” (1605) donde explicaría la frecuencia del cultivo del pimiento en Castilla, así como en Centroeuropa, además de añadir que se han visto extensos cultivos en Moravia (1585). Asimismo, las novedades de plantas americanas llegaron, por una u otra vía, a los jardines renacentistas.

Dos años después de la muerte de Charles de l'Écluse, se publica, en 1611, la obra “*Curae posteriores, seu Plurimarum non ante cognitarum, aut descriptarum stirpium, peregrinorumque aliquot animalium Novae Descriptiones...*”. En esta publicación se

reproduce un texto que el capuchino Gregorio de regio envía a Charles de l'Écluse desde Bolonia en 1607. Este texto se considera el primer estudio monográfico que describe minuciosamente las variedades cultivadas en Italia en la transición del siglo XVI al XVII (Figura 3.3) [168].



**Fig. 3.3.** Charles de l'Écluse, *Curae posteriores* (1611). Variedades cultivadas en Italia en los siglos XVI y XVII.

Felipe II organizó en 1569 lo que se considera la primera expedición científica moderna a América. Al frente de esa expedición puso a Francisco Hernández (1515-1587) con la orden de “que va a las Indias por protomédico general dellas y a hacer las cosas naturales..... durante el tiempo de los cinco años que en ellos se va a ocupar” [168]. Francisco Hernández ejerció la medicina en los hospitales del Monasterio de Guadalupe (Extremadura), considerado un importante centro asistencial, puesto directamente bajo el patrocinio de la corona castellana, y principal vivero de cirujanos y médicos reales [162].

Desde 1571 hasta 1577 recorrió la casi totalidad de los territorios descubiertos de Nueva España y se dedicó a recolectar material, experimentar los efectos terapéuticos de las drogas locales y a escribir su obra de dieciséis volúmenes que incluía el denominado “*Index alphabeticus plantarum Novae Hispaniae*”, que permite conocer las casi 3000 plantas descritas en la parte de la botánica, entre las que figuran varias plantas del pimiento [168]

El ají o pimienta de las Indias, después de su llegada a España desde América, se difundió rápidamente por Europa: Italia (Scorza, 1535), Alemania (Fuchs, 1542), en Moravia (1585) y posteriormente por el resto del mundo. Así, los portugueses, que controlaban el monopolio de la pimienta (*Piper nigrum*), vieron en el pimiento un competidor barato, por lo que trataron al principio de impedir su expansión, pero a pesar de sus primeras reticencias, contribuyeron a su difusión, junto con otras plantas americanas, tanto en África como en la India. Se supone que lo adquirieron de los españoles poco después del descubrimiento y lo introdujeron en sus colonias africanas e islas atlánticas y fue transportado desde esos lugares a Lisboa para su envío a la India a través de la ruta comercial portuguesa. Gracias a esta ruta a través del Cabo de Buena Esperanza, establecida por Vasco de Gama en 1498, rompieron el monopolio que tenían los venecianos con la pimienta negra. Algo más tarde, los portugueses, al colonizar Brasil, contribuyen más a la dispersión del pimiento al que llamaron “pimienta de Pernambuco” [156,157].

También el imperio otomano contribuyó de forma decisiva a la difusión del pimiento. En el siglo XVI los turcos controlaban una extensa red comercial y difundieron este cultivo desde el mar Mediterráneo (Norte de África, Próximo Oriente) hacia los Balcanes y Europa Oriental por un lado y hacia el golfo Pérsico por otro. En los Balcanes, los eslavos llamaron a los pimientos peperke, piperke, o paparka (posiblemente una deformación de la denominación latina de la pimienta “piper”), y hacia 1569 los húngaros cambiaron el nombre a paprika. Este ingrediente influyó mucho en la cultura magiar y la gastronomía dando origen a leyendas históricas asociadas a su cultivo y su uso, así como a una importante figura folclórica, de la que existen datos desde el siglo XVII, denominada Jancsi Papikra [153,156,159].

### 3.3. El pimiento para pimentón

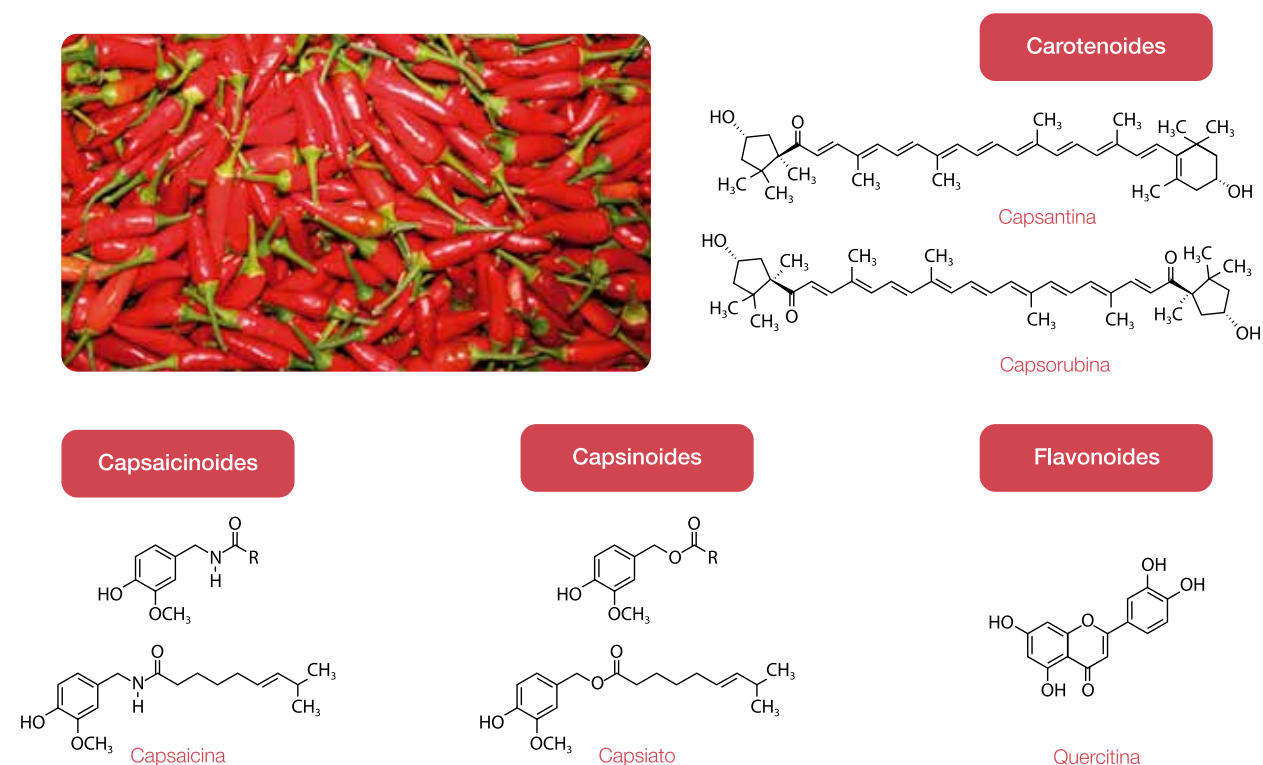
El pimentón es una especia (aditivo) que se obtiene tras el secado y la molienda del pimiento. Se usa comúnmente para agregar sabor y color a muchos alimentos, como productos horneados, bebidas, carne, sopa, helado, dulces y mezclas de condimentos, para proporcionar sabor y coloración roja [169], pero también se utiliza en medicina, en cosmética, en aerosoles de protección personal o incluso como adsorbentes para eliminar contaminantes [170-174].

El pimentón contiene cantidades significativas de una gran variedad de principios activos como vitaminas, carotenoides, minerales, proteínas, carbohidratos, grasas y fibra, además de compuestos pungentes como la capsaicina y dihidrocapsaicina, que se acumulan en la epidermis secretora del septo del fruto [175].

### Capsaicinoides y Capsinoides

Dentro del abanico de compuestos orgánicos que contienen los frutos del pimiento (*Capsicum* spp.) resaltan los flavonoides, carotenoides y los capsaicinoides junto con los capsinoides. Los dos primeros son responsables de su color, mientras que los capsaicinoides y, en menor medida los capsinoides, son responsables de su pungencia o sabor picante (Figura 3.4) [176].

#### Principales metabolitos secundarios del género *Capsicum*



**Fig. 3.4.** Principales metabolitos secundarios del género *Capsicum*.

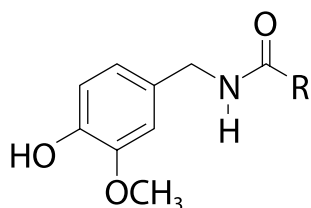
Las familias de los capsaicinoides y de los capsinoides son alcaloides procedentes del metabolismo secundario producidos exclusivamente por los frutos del género *Capsicum*. Sin embargo, aunque los capsinoides también contribuyen al efecto pungente, son mil veces menos potentes que los capsaicinoides [177, 178].

Es importante resaltar que ambas familias de compuestos tienen las mismas propiedades beneficiosas para la salud por sus efectos antioxidante, antiinflamatorio, analgésico, anticancerígeno y antiobesidad [179].

La estructura química afecta a la intensidad del picor de estos compuestos, de esta manera, los humanos somos capaces de percibir los capsaicinoides por separado; así la capsaicina y la dihidrocapsaicina son los más irritantes, la homodihidrocapsaicina es muy irritante pero también penetrante y punzante y la nordihidrocapsaicina es la menos irritante. A su vez, el picor de los capsaicinoides es aproximadamente 1000 veces mayor que el de los capsinoides. Paralelamente, las diferentes combinaciones de capsaicinoides confieren unas características determinadas al picor de cada una de las variedades del pimiento [177].

### Capsaicinoides

Los capsaicinoides han sido identificados en diferentes especies de pimiento, siendo todas ellas amidas ácidas formadas a partir de la vanillilamina y ácidos grasos de 8 a 13 átomos de carbono y cuya estructura molecular general se indica en la Figura 3.5 [176,180].



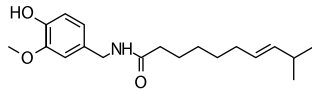
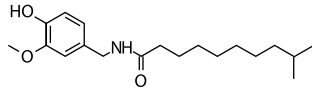
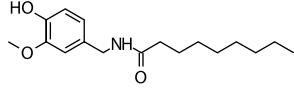
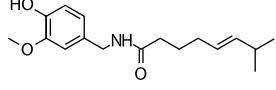
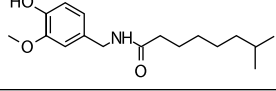
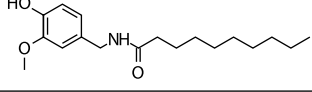
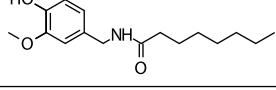
**Fig. 3.5.** Estructura molecular general de un capsaicinoide.

Su diversidad molecular depende de la cadena lateral (R) que puede presentarse como: 1, insaturada y ramificada, como en la capsaicina; 2, saturada y ramificada, como en la dihidrocapsaicina; 3, saturada y lineal, como en la nonivamida. Si bien la mayoría de los capsaicinoides producen un efecto picante, también los hay que no producen este efecto como la  $\omega$ -hydroxycapsaicin (Tabla 3.1) [176,181].

**Tabla 3.1.** Estructuras químicas y clasificación de los capsaicinoides estudiados.

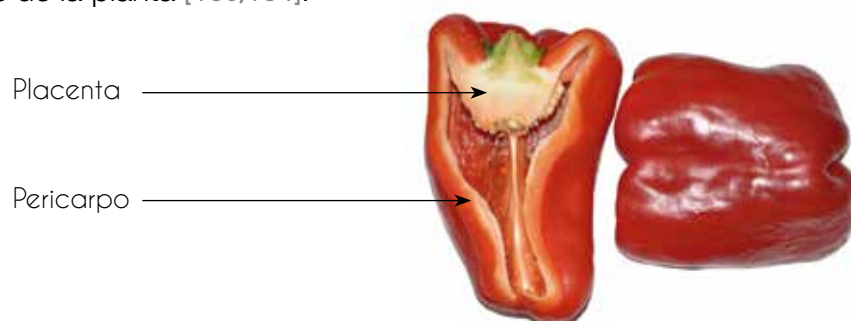
Compuestos	Fórmula	Número CAS	Estructura
Capsaicina	$C_{18}H_{27}NO_3$	404-86-4	
Dihidrocapsaicina	$C_{18}H_{29}NO_3$	19408-84-5	



Compuestos	Fórmula	Número CAS	Estructura
Homocapsaicina	$C_{19}H_{29}NO_3$	58493-48-4	
Homodihidrocapsaicina	$C_{19}H_{31}NO_3$	20279-06-5	
Nonivamida	$C_{17}H_{27}NO_3$	2444-46-4	
Norcapsaicina	$C_{17}H_{25}NO_3$	61229-08-1	
Nordihidrocapsaicina	$C_{17}H_{27}NO_3$	28789-35-7	
N-vanillil decanamida	$C_{18}H_{29}NO_3$	31078-36-1	
N-vanillil octanamida	$C_{16}H_{25}NO_3$	58493-47-3	

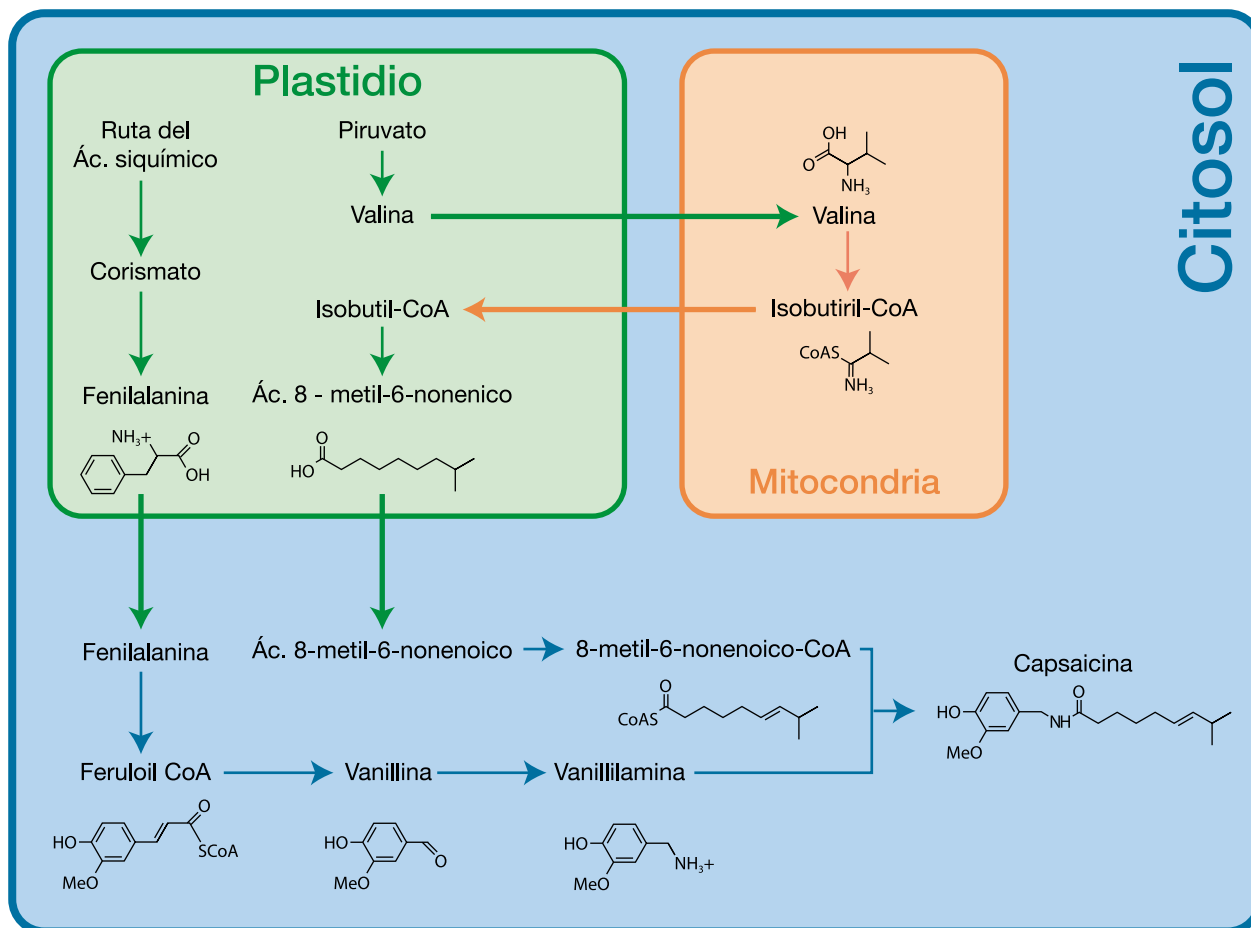
Entre los compuestos que constituyen la clase de los capsaicinoides son mayoritarios la capsaicina y la dihidrocapsaicina que representan alrededor del 80-90% del total de los capsaicinoides. Los siguientes capsaicinoides en importancia son nordihidrocapsaicina, homocapsaicina, homodihidrocapsaicina, y nonivamida [182].

La biosíntesis de estos compuestos tiene lugar en las células epidérmicas de la placenta(1 en Figura 3.6) del fruto y eventualmente se translocan a las semillas y pericarpo (2 en Figura 3.6), incluso en algunos cultivares se han encontrado pequeñas cantidades en las hojas y en los tallos de la planta [183,184].



**Fig. 3.6.** Corte longitudinal de un fruto del género *Capsicum*. 1, Placenta: en el fruto, zona donde se insertan las semillas; 2, Pericarpo: pared del fruto.

Esta biosíntesis tiene lugar en diferentes compartimentos celulares, como el citosol, plastidios y mitocondrias e intervienen dos rutas metabólicas. Así, mientras que la vanillilamina se origina a partir de la fenilalanina a través de la ruta del ácido siquímico, los ácidos grasos se forman a partir de aminoácidos como la valina, leucina e isoleucina por la ruta biosintética de los ácidos grasos (Figura 3.7) [184-188].

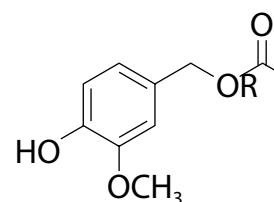


**Fig. 3.7.** Biosíntesis de la capsaicina.

Es destacable también que como agente de represión de disturbios se utiliza la oleorresina de *Capsicum* (spray de pimienta) que es una mezcla que contiene capsaicina como principal componente picante, y que se emplea cada vez más para la represión de disturbios y el mantenimiento del orden público. La oleorresina de *Capsicum* contiene del 0,01 al 1,0% de capsaicinoides, en materia seca. Los aerosoles de pimienta disponibles en el mercado contienen del 1 al 15% de capsaicinoides, principalmente capsaicina pero también nonivamida (PAVA). El aerosol de pimienta está disponible actualmente para la protección personal y en Estados Unidos lo emplean los servicios de reparto postal para repeler animales y los aficionados al camping para ahuyentar a los osos [189].

## Capsinoides

Mientras que los capsaicinoides fueron descubiertos a finales del siglo XIX y la estructura de la capsaicina establecida por Nelson en 1919, el descubrimiento de los capsinoides fue posterior. Yazawa y colaboradores (1989) descubrieron en los frutos de un cultivar dulce de *Capsicum annuum*, al que llamaron “CH 19-Sweet”, pequeñas cantidades de capsaicinoides y cantidades considerables de un grupo de compuestos a los que llamaron “capsaicinoid-like substances” por su semejanza con los capsaicinoides. Años más tarde Kobata y colaboradores (1998) establecieron su estructura química y los renombraron como capsinoides [177,190].



**Fig. 3.8.** Estructura molecular general de los capsinoides.

Los capsinoides se forman por condensación mediante el enlace éster del alcohol vainílico, común a todos ellos, con cadenas de ácidos grasos similares a los capsaicinoides [177]. Así, los capsinoides son estructuralmente semejantes a los capsaicinoides excepto por el tipo de enlace que presenta el anillo aromático con la cadena carbonada. En los capsaicinoides es de tipo amida mientras que en los capsinoides es de tipo éster (Figura 3.8) [177,180]. Parece ser que esta diferencia en su estructura es responsable de su menor pungencia, siendo 1000 veces menor que la correspondiente a los capsaicinoides, como se ha comentado anteriormente [179].

Hasta la fecha se han descrito tres capsinoides naturales: capsiato, que es el más abundante; dihidrocapsiato y nordihidrocapsiato (Tabla 3.2).

Los residuos acilo (R) de capsiato, dihidrocapsiato y nordihidrocapsiato son los mismos que para los capsaicinoides capsaicina, dihidrocapsaicina y nordihidrocapsaicina, respectivamente [176,177,180].

**Tabla. 3.2.** Estructuras químicas y clasificación de los capsinoides estudiados.

Compuestos	Fórmula	Número CAS	Estructura
Dihidrocapsiato	$C_{18}H_{28}O_4$	205687-03-2	
Capsiato	$C_{18}H_{26}O_4$	205687-01-0	
Nordihidrocapsiato	$C_{17}H_{26}O_4$	220012-53-3	

Los capsinoides presentan propiedades biológicas similares a los capsaicinoides, entre las que destacan su actividad antioxidante, antiinflamatoria, analgésica, anticáncer y antiobesidad, entre otras. El hecho de que los capsinoides exhiban propiedades biológicas similares a los capsaicinoides, unido a su falta de propiedades pungentes, los hace muy importantes para su aplicación tanto en preparados alimenticios como farmacológicos al no estar tan limitadas sus aplicaciones como los capsaicinoides debido a su pungencia [179,180].

Como ya se ha indicado, el pimiento llegó a España a través de Cristóbal Colón, en 1493. La posibilidad de substituir a la carísima pimienta (*Piper nigrum* L.), procedente de oriente, y la facilidad de su cultivo en nuestras condiciones ambientales, fueron las causas de su rápida expansión en España y posteriormente por el resto del mundo conocido, a lo largo de los siglos XVI y XVII. En uno de los trabajos consultados sobre el pimentón de la Vera se indica que probablemente fueron los monjes Jerónimos del Monasterio de Guadalupe los que extendieron el cultivo del pimiento por cada uno de sus conventos, llegando así al monasterio de Yuste, en la comarca de La Vera (Cáceres), desde donde pasó, entre otros, al monasterio de esta Orden en La Ñora (Murcia). Esto dio lugar con el paso de los años, a que en España hubiesen dos zonas importantes productoras de pimentón: la comarca de La Vera y la Región de Murcia [191].

De acuerdo con esta hipótesis, estaría el hecho de que Cristóbal Colón tuviese su primer contacto con los Reyes Católicos, tras la vuelta de su primer viaje a América, en Barcelona durante el mes de abril de 1493. Encuentro en el que seguramente pudieron estar implicados los monjes jerónimos del Monasterio de San Jerónimo de la Murtra de Badalona. Estos monjes recibieron las muestras de pimiento (ají) y, convencidos de su utilidad como alimento y medicina, las multiplicaron y extendieron por otros monasterios de la Orden [167], siendo el principal de ellos el monasterio de Guadalupe que con sus hospitales y su huerto de plantas medicinales, constituía un importante centro asistencial. Desde este monasterio de Guadalupe se expandiría su cultivo por los demás conventos regentados por monjes jerónimos.

Este puede ser el origen de que en España destaquen dos zonas productoras de pimiento para pimentón, la Región Murciana y la Comarca de la Vera (Cáceres), aunque se obtienen producciones menores en otras comunidades. En estas dos regiones se obtienen el valorado pimentón de las denominaciones de origen: Pimentón de la Vera y Pimentón de Murcia. Cabe mencionar que, desde el 2020, el Pimentón de Mallorca ha sido reconocido también con denominación de origen protegida, pero no será tratado en esta tesis doctoral.

Los fabricantes de alimentos, así como el público en general, están cada vez más preocupados por la calidad y como consecuencia aumenta la demanda de productos alimenticios de un origen geográfico determinado. En este contexto la designación de Denominación de Origen Protegida (DOP) es una herramienta eficaz para garantizar la

calidad y el origen geográfico de un producto. Según el Reglamento (CE) N° 510/2006 se entiende por Denominación de Origen, el nombre de una región, de un lugar determinado o, en casos excepcionales, de un país, que sirve para designar un producto agrícola o un producto alimenticio, que debe ser originario de dicha región, de dicho lugar determinado o de dicho país, y su calidad o características se deban fundamental o exclusivamente al medio geográfico con sus factores naturales y humanos, y cuya producción, transformación y elaboración se realicen en la zona geográfica delimitada [5].

En Europa existen 6 Denominaciones de Origen Protegidas de pimentón: Piment d'Espelette (Francia), Paprika Szeged (Hungría), Paprika Žitava (Eslovaquia Žitavská paprika), Pimentón de la Vera (Extremadura, España) y Pimentón de Murcia (Murcia, España), y desde el año 2020, Pimentón de Mallorca (Mallorca, España).

### 3.3.1. Pimentón de la Vera

El reglamento de la Denominación de Origen Protegida “Pimentón de la Vera” fue aprobado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación mediante la Orden APA/4178/2005, de 22 de diciembre en el BOE núm. 4, 05-01-2006 y por la Unión Europea en el Reglamento CE n° 987/2007 de la Comisión de 21 de agosto de 2007 [192,193].

En este reglamento, al definir las características del Pimentón de la Vera se indica que: “Se entiende por pimentón con Denominación de Origen Protegida “Pimentón de la Vera”, al producto obtenido de la molienda de frutos totalmente rojos de la especie *Capsicum annum* L., de las variedades del grupo de las “Ocales”: Jaranda, Jariza y Jeromín, y de la variedad Bola (Figura 3.1), recolectados maduros, sanos, limpios, con el color característico de la variedad, libres de ataques de plagas o enfermedades, secados con leña de encina o roble, por el sistema tradicional de la Vera, y que proceda de la zona de producción que se limita a dicho reglamento” [193].

En este mismo reglamento se definen las características organolépticas y según su sabor se establecen tres grupos de pimentones:

- Pimentón dulce: de sabor suave, totalmente dulce. Elaborado principalmente con las variedades Bola y Jaranda.
- Pimentón ocal o agridulce: suavemente picante al paladar. Elaborado principalmente con las variedades Jaranda y Jariza.
- Pimentón picante: de pronunciado picor al paladar. Elaborado principalmente con las variedades Jeromín, Jariza y Jaranda (Figura 3.9).



**Fig. 3.9.** Variedades de pimiento utilizadas en la elaboración del pimentón de la Vera [194].

Asimismo, en dicho reglamento se establece el ámbito geográfico de producción, que comprende 50 términos municipales distribuidos en las comarcas naturales de la Vera, Campo Arañuelo, Valle del Ambroz y Valle del Alagón, en el Norte de la provincia de Cáceres.

Por último, en el reglamento de DOP del “pimentón de la Vera”, se indica que el Consejo Regulador adoptará y registrará un anagrama como símbolo de la Denominación de Origen Protegida, tal y como se observa en la Figura 3.10.

**Fig. 3.10.** Anagrama de la Denominación de Origen “Pimentón de la Vera”.



### 3.3.2. Pimentón de Murcia

En 1998 organizaciones profesionales agrarias, federaciones de cooperativas y el sector industrial de la Región de Murcia, solicitaron a la Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente la protección del Pimentón de Murcia mediante una Denominación de Origen, logrando su reconocimiento el 20 de abril de 2001, lo que dio lugar a la publicación del reglamento correspondiente el 17 de diciembre de 2001 [195,196].

En el pliego de condiciones de este reglamento se indica que la denominación de origen protegida es “Pimentón de Murcia”. En cuanto a la descripción del producto se indica que es el producto resultante de la molienda de pimientos totalmente rojos de *Capsicum annuum* L. variedad “Bola”, recolectados maduros, sanos, limpios y secos, totalmente libres de ataques de plagas o enfermedades, que reúnan las características que a continuación se indican y que proceda de la zona de producción.

En cuanto a la variedad “Bola” o “Americano” se señala, entre otras indicaciones, que es un tipo de pimiento dulce, de poco peso y de forma subesférica, que la relación peso fresco a peso seco será como máximo 5/1 y que el color del pimentón se debe a los pigmentos carotenoides que contiene, siendo los mayoritarios el Capsantino (en torno al 50%) y el Capsorrubeno (en torno a un 12%), lo que la distingue de otras variedades.

La zona de producción de los pimientos, destinados a la elaboración del pimentón amparado por la Denominación de Origen, “Pimentón de Murcia”, está constituida por los terrenos ubicados en los términos municipales de la provincia de Murcia: Alhama de Murcia, Beniel, Cartagena, Fortuna, Fuente Álamo, Librilla, Lorca, Molina de Segura, Murcia, Puerto Lumbreras, San Javier, Santomera, Torre Pacheco y Tortana. La superficie total de esta zona es de 484.450Ha, de las que 277.204Ha corresponden a plantaciones [195]. En este mismo reglamento se indican las cualidades organolépticas, las características físico-químicas, cultivo, secado, clima, etc, y también se adjunta un apartado histórico.

De acuerdo con lo indicado en esta memoria, se recoge en este apartado histórico que las primeras noticias que se tienen sobre el cultivo del pimiento en la región de Murcia se sitúan a principios del siglo XVI y responsabilizan a los frailes jerónimos de su introducción, al cultivarlos en unas parcelas que poseían cerca de la “Rueda” y de la “Acequia Mayor” de La Ñora. Precisamente el nombre de “ñora” ha sido tradicionalmente aplicado, en la región de Murcia, al pimiento rojo y dulce, probablemente debido a su primer lugar de producción, la pedanía de La Ñora en el término municipal de Murcia [195].

Por último, en la Figura 3.11 se muestra el anagrama elegido para la Denominación de Origen Protegido del Pimentón de Murcia.



**Fig. 3.11.** Anagrama de la DOP del pimentón de Murcia.

### 3.4. Artículos científicos

En nuestro estudio se han desarrollado métodos dirigidos y no dirigidos, utilizando LC-HRMS y LC-LRMS en combinación con métodos quimiométricos multivariados (análisis de componentes principales y análisis discriminante por regresión de mínimos cuadrados parciales) para la caracterización, clasificación y autenticación de pimentones. Estos estudios han dado lugar a tres publicaciones, las cuales se incluyen en las siguientes secciones.

#### **Publicación IV:** Artículo científico

Determination of Phenolic Compounds in Paprika by Ultrahigh Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry: Application to Product Designation of Origin Authentication by Chemometrics.

S. Barbosa; G. Campmajó; J. Saurina; L. Puignou; O. Núñez  
*J. Agric. Food Chem.*, 2020, vol. 68, pp. 591-602.

#### **Publicación V:** Artículo científico

Targeted UHPLC-HRMS (Orbitrap) Polyphenolic and Capsaicinoid Profiling for the Chemometric Characterization and Classification of Paprika with Protected Designation of Origin (PDO) Attributes.

S. Barbosa; J. Saurina; L. Puignou; O. Núñez  
*Molecules*, 2020, vol. 25, 1623.

#### **Publicación VI:** Artículo científico

Classification and Authentication of Paprika by UHPLC-HRMS Fingerprinting and Multivariate Calibration Methods (PCA and PLS-DA).

S. Barbosa; J. Saurina; L. Puignou; O. Núñez  
*Foods*, 2020, vol. 9, 486.



**3.4.1. Publicación IV: Artículo científico**

*Determination of Phenolic Compounds in Paprika by Ultrahigh Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry: Application to Product Designation of Origin Authentication by Chemometrics.*

S. Barbosa; G. Campmajó; J. Saurina; L. Puignou; O. Núñez  
*J. Agric. Food Chem.*, 2020, vol. 68, pp. 591-602



# Determination of Phenolic Compounds in Paprika by Ultrahigh Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry: Application to Product Designation of Origin Authentication by Chemometrics

Sergio Barbosa,<sup>#</sup> Guillem Campmajó,<sup>#</sup> Javier Saurina, Lluís Puignou, and Oscar Núñez\*

 Cite This: *J. Agric. Food Chem.* 2020, 68, 591–602

 Read Online

ACCESS |

 Metrics & More

 Article Recommendations

 Supporting Information

**ABSTRACT:** An ultrahigh performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry method was developed for the determination of 36 phenolic compounds in paprika. The proposed method showed good method performance with limits of quantitation between 0.03 and 50  $\mu\text{g/L}$  for 16 compounds and between 50  $\mu\text{g/L}$  and 1 mg/L for 12 compounds. Good linearity ( $R^2 > 0.995$ ), run-to-run and day-to-day precisions (%RSD values  $< 12.3$  and  $< 19.2\%$ , respectively), and trueness (relative errors  $< 15.0\%$ ) were obtained. The proposed method was applied to the analysis of 111 paprika samples from different production regions: Spain (La Vera PDO and Murcia PDO) and Czech Republic, each one including different flavor varieties (sweet, bittersweet, and spicy). Phenolic profiles and concentration levels showed to be good chemical descriptors to achieve paprika classification and authentication according to the production region by principal component analysis and partial least squares regression–discriminant analysis. In addition, perfect classification among flavor varieties for Murcia PDO and Czech Republic samples was also obtained.

**KEYWORDS:** *Paprika, UHPLC-ESI-MS/MS, Phenolic compounds, Food classification, Principal component analysis (PCA), Partial least squares regression–discriminant analysis (PLS-DA), Food authentication*

## ■ INTRODUCTION

Paprika is a spice obtained after drying and grinding fruits of the genus *Capsicum* that belongs to the Solanaceae family.<sup>1</sup> Within this genus there are approximately 39 species, including wild, semidomestic, and domestic ones, such as *Capsicum annuum*, *C. chinense*, *C. baccatum*, *C. frutescens*, and *C. pubescens*, growing in different parts of the world, with *C. annuum* being the most usual.<sup>2,3</sup> Paprika is commonly used to add flavor and color to many foods such as baked goods, beverages, meat, soup, ice cream, candy, and seasoning mixes<sup>4</sup> but is also used in medicine, cosmetics, protective sprays, or even as adsorbents to remove contaminants.<sup>5–9</sup> Paprika contains a large number of bioactive compounds with great health-promoting properties such as carotenoids (provitamin A), ascorbic acid (vitamin C), tocopherols (vitamin E), capsaicinoids, and phenolic compounds.<sup>10</sup> Among them, it is worth noting the importance of phenolic compounds that are widely distributed in plants, many of which are essential secondary metabolites that contribute to the sensory properties of foods such as color and aroma.<sup>11</sup> These phenolic and polyphenolic compounds have a high antioxidant activity and show potential health benefits such as vascular protection, antihepatotoxic, antiallergic, antiproliferative, antiosteoporotic, anti-inflammatory, antitumor, antidiabetic, and antiobesity.<sup>12–14</sup>

Current methods for the determination of polyphenols include global tests for the total polyphenolic content based on colorimetric or fluorimetric methodologies or more specific ones employing capillary electrophoresis, liquid chromatography, or gas chromatography techniques.<sup>1,14–16</sup> By far, liquid

chromatography with either UV detection or coupled to mass spectrometry is the most widely used technique for the determination of polyphenols.<sup>13,17</sup> Nevertheless, the great chemical diversity of these compounds and the low concentration levels in which they are found make liquid chromatography coupled to mass spectrometry or tandem mass spectrometry (LC–MS(/MS)) the most effective method for the characterization, identification, and determination of polyphenols in paprika samples.<sup>11,18,19</sup> Previous studies have reported that the main phenolic compounds found in paprika are vanillic, caffeic, ferulic, *p*-coumaric, and *p*-hydroxybenzoic acids.<sup>20</sup>

Food manufacturers, as well as the public in general, are increasingly concerned about food quality attributes, and therefore, the demand for food products of a specific geographical origin grows. Within this context and with the aim of preserving the reputation of the products and supporting good practices in rural and agricultural activities, the European legislation has established several quality parameters related to the protection of geographical indications and appellations of origin of agricultural and food products (Council Regulation, EEC No. 510/2006<sup>21</sup>): Protected Designation of Origin (PDO) that links the products with the defined geographical area where

**Received:** September 25, 2019

**Revised:** December 19, 2019

**Accepted:** December 20, 2019

**Published:** December 20, 2019

they are produced; Protected Geographical Indication (PGI) that links products to a geographical area where at least one step of production occurred; and Traditional Specialties Guaranteed (TSG) that protects traditional production methods.<sup>22</sup>

In Spain, there are two production areas of paprika with PDO recognized by the European Union: La Vera, from the north of the province of Cáceres (Extremadura), and the province of Murcia. Despite having a common origin and practically parallel development, the production process is different in each of these areas.<sup>23</sup> In both cases, the product is the result of drying and grinding the fruits of *Capsicum* species, but differences in fruit varieties and drying processes provide different organoleptic characteristics. The red fruits used for the production of La Vera paprika are dried with oak or holm oak firewood, by the traditional Vera system, and belong to the *C. annuum* varieties of the Ocales group (Jaranda, Jariza, and Jeromín) and Bola. In contrast, red fruits of *C. annuum* from the Bola variety are used for the production of Murcia Paprika PDO, of sweet flavor and with little weight, dried under sun conditions.<sup>1,21,24–26</sup>

Paprika is a spice consumed worldwide that is susceptible of adulteration practices to attain economic benefits. The substitution of ingredients, the addition of (illegal) substances, and false declarations of origin are important and challenging issues facing the authorities of the food industry.<sup>27</sup> Moreover, the characteristics of paprika, as well as the content of phenolic compounds, may differ due to multiple factors such as the varieties, climatic conditions, growing areas, water resources, ripening stage, agronomy conditions, and pre- and postharvest treatments.<sup>11</sup> As a result, the content of phenolic and polyphenolic compounds in paprika products can be exploited as a source of analytical data to establish the product classification and authentication, both in the prevention of fraudulent adulterations and in the correct assignment of the PDO declarations.

In this work, an ultrahigh performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry (UHPLC-ESI-MS/MS) method using a triple quadrupole (QqQ) analyzer has been developed for the determination and quantification of 36 phenolic and polyphenolic compounds in paprika and subsequent characterization, classification, and authentication of paprika samples by multivariate chemometric methodologies. Chromatographic and electrospray ion source conditions were optimized, and the method performance was established by determining quality parameters such as linearity, limits of detection, limits of quantitation, run-to-run and day-to-day precisions, and trueness. 111 paprika samples belonging to La Vera PDO and Murcia PDO (Spain) and to Czech Republic were analyzed with the proposed methodology after applying a simple extraction method using acetonitrile/water (80:20 v/v) solution as the extracting agent. Then the contents of the 36 phenolic and polyphenolic compounds were employed as chemical descriptors of the analyzed paprika samples to their classification and authentication by principal component analysis (PCA) and partial least squares regression-discriminant analysis (PLS-DA).

## MATERIALS AND METHODS

**Reagents and Solutions.** All standards and chemicals used in this work were of analytical grade, unless otherwise indicated. Structures, family groups, CAS numbers, and suppliers of the 36 phenolic and polyphenolic compounds under study are indicated in Table S1 (Supporting Information). Individual stock standard solutions (ca. 1000 mg/L) were prepared in methanol in amber glass vials.

Intermediate standard working solutions were prepared weekly from these individual stock standard solutions by appropriate dilution with water. All stock and intermediate working solutions were stored at 4 °C for no more than 1 month. LC–MS quality water, methanol, and acetonitrile (Chromasolv quality) were purchased from Honeywell (Riedel-de-Haën, Seelze, Germany). Formic acid (≥98%) was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

**Instrumentation.** The determination of polyphenols and phenolic acids was carried out on an Open Accela UHPLC instrument (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA), equipped with a quaternary pump and a CTC autosampler. The separation was performed by reversed-phase chromatography using an Ascentis Express C18 fused-core (100 × 2.1 mm, 2.7 μm partially porous particle size) column from Supelco (Bellefonte, PA, USA) and gradient elution using 0.1% formic acid in water (solvent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (solvent B) as mobile phase components, with a mobile phase flow rate of 300 μL/min. The elution gradient program was as follows: 0–5.5 min, isocratic elution at 5% solvent B; 5.5–6.5 min, linear gradient up to 10% solvent B; 6.5–12 min, isocratic elution at 10% followed by a 1 min increase to 20% solvent B; 13–18 min, isocratic elution at 20% solvent B; 18–19 min, linear gradient raising up to 50% solvent B and then 2 min elution at this percentage; 21–22 min, linear gradient to 95% solvent B and 3 min keeping this composition of the mobile phase. Afterward, initial conditions for a 5 min column re-equilibration were returned, completing a total elution program time of 30 min. The chromatographic column was kept at room temperature, and an injection volume of 10 μL, full loop mode, was employed.

The UHPLC instrument was coupled to a TSQ Quantum Ultra AM triple quadrupole (QqQ) mass analyzer (Thermo Fisher Scientific), equipped with hyperbolic quadrupoles and a heated-electrospray ionization (H-ESI) source. Nitrogen with a purity of 99.98% was employed for the ESI sheath gas, ion sweep gas, and auxiliary gas at flow rates of 60, 0, and 20 a.u. (arbitrary units), respectively. Other H-ESI parameters were as follows: capillary voltage in negative ion mode, –2.5 kV; H-ESI vaporizer temperature, 350 °C; ion transfer tube temperature, 350 °C. For compound quantitation and confirmation, multiple reaction monitoring (MRM) acquisition mode by recording two selected reaction monitoring (SRM) transitions (quantifier and qualifier transitions) was employed for all studied compounds except betulinic acid that showed no fragmentation under working conditions. A mass resolution of 0.7 *m/z* full width at half-maximum (FWHM) on both quadrupoles (Q1 and Q3) and a scan width of 0.5 *m/z* were used. Fragmentation was carried out by using argon as collision gas at a pressure of 1.5 mtorr, and the optimal normalized collision energies (NCEs) for each SRM transition monitored (quantifier and qualifier) are shown in Table 1. The precursor ion selected, precursor and product ion assignments, quantifier/qualifier ion ratios, and the tube lens offset voltage for each compound under study are also summarized in Table 1. To improve sensitivity, the acquired chromatogram was segmented into four windows (Table 1), and a dwell time of 50 ms and 1 microscan were employed. The control of the UHPLC-ESI-MS/MS system and the data processing were performed by using Xcalibur software version 2.1 (Thermo Fisher Scientific).

**Samples and Sample Treatment.** Paprika samples (total of 111), purchased from local markets in Spain and Czech Republic, were analyzed. The set included 72 La Vera PDO paprika samples (26 sweet, 23 bittersweet, and 23 spicy flavors), 24 Murcia PDO paprika samples (12 sweet and 12 spicy flavors), and 15 Czech Republic paprika samples (5 sweet, 5 smoked-sweet, and 5 spicy flavors).

Sample treatment was performed following a previously described method.<sup>1,28</sup> Briefly, 0.3 g of paprika was extracted with 3 mL of water:acetonitrile (20:80 v/v) solution in a 15 mL PTFE tube. Extraction was performed by stirring in a vortex mixer for 1 min (Stuart, Stone, United Kingdom) followed by sonication for 15 min (2510 Branson ultrasonic bath, Hampton, NH, USA). Then sample extracts were centrifuged for 30 min at 4500 rpm (Rotana 460 HR centrifuge, Hettich, Germany), and the supernatant extract was filtered through 0.45 μm nylon filters (Whatman, Clifton, NJ, USA) and stored at –18 °C in 2 mL glass injection vials until analysis.

Table 1. Instrumental MRM Acquisition Parameters

segment	time (min)	number	compound	tube lens offset voltage (V)		precursor ion		quantifier product ion			qualifier product ion			quantifier/qualifier ion ratio
						m/z	assignment	m/z	assignment	NCE (eV)	m/z	assignment	NCE (eV)	
1	0.7	1	D-(-)-quinic acid	-50	190.9	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	85.2	[M-H-C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	20	[M-H-C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	93.2	[M-H-C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub> ] <sup>-</sup>	2.6
1	1.0	2	arbutin	-124	271.0	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	161.3	[M-H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	10	[M-H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	108.7	[M-H-C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	10.0
1	1.4	3	gallic acid	-95	169.0	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	125.1	[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	15	[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	79.0	[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	17.5
1	2.3	4	homogentisic acid	-94	167.2	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	123.0	[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	13	[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	121.9	[M-H-CHO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	2.0
1	4.9	5	protocatechuic aldehyde	-72	137.0	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	135.9	[M-H-H] <sup>-</sup>	20	[M-H-H] <sup>-</sup>	92.1	[M-H-CHO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	3.9
1	5.3	6	4-hydroxybenzoic acid	-90	136.9	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	93.2	[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	20	[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	65.0	[M-H-C <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	20.2
1	5.7	7	gentisic acid	-87	153.0	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	109.0	[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	20	[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	81.4	[M-H-C <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	15.6
1-2	8.4	8	chlorogenic acid	-148	353.0	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	190.9	[M-H-C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	21	[M-H-C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	85.1	[M-H-C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub> ] <sup>-</sup>	23.7
2	8.5	9	(+)-catechin	-73	288.9	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	244.8	[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O] <sup>-</sup>	15	[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O] <sup>-</sup>	203.2	[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	2.0
2	8.8	10	caffeic acid	-63	179.0	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	134.9	[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	16	[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	133.8	[M-H-CHO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	6.2
2	9.2	11	homovanillic acid	-97	181.1	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	137.2	[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	10	[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	122.0	[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	6.3
2	9.4	12	syringic acid	-83	196.9	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	182.0	[M-H-CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	14	[M-H-CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	123.1	[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	2.8
2	10.3	13	vanillin	-77	151.2	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	136.0	[M-H-CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	15	[M-H-CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	91.9	[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	7.4
2-3	11.6	14	(-)-epicatechin	-95	289.1	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	244.9	[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O] <sup>-</sup>	16	[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O] <sup>-</sup>	203.0	[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	1.9
2-3	11.9	15	ethyl gallate	-97	197.2	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	123.9	[M-H-C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	22	[M-H-C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	169.0	[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O] <sup>-</sup>	1.6
2-3	12.2	16	p-coumaric acid	-85	163.1	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	118.8	[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	17	[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	93.1	[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	14.8
2-3	12.3	17	(-)-epigallocatechin gallate	-125	457.0	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	169.0	[M-H-C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub> ] <sup>-</sup>	19	[M-H-C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub> ] <sup>-</sup>	125.2	[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	3.1
3	12.5	18	syraldehyde	-57	181.1	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	166.2	[M-H-CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	13	[M-H-CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	150.9	[M-H-CH <sub>3</sub> O] <sup>-</sup>	1.3
3	12.9	19	umbelliferone	-94	160.9	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	133.1	[M-H-CO] <sup>-</sup>	20	[M-H-CO] <sup>-</sup>	105.1	[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O] <sup>-</sup>	2.9
3	14.2	20	procyanidin C1	-151	864.8	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	407.0	[M-H-C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>10</sub> ] <sup>-</sup>	40	[M-H-C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>10</sub> ] <sup>-</sup>	286.9	[M-H-C <sub>30</sub> H <sub>36</sub> O <sub>12</sub> ] <sup>-</sup>	1.4
3	14.4	21	veratric acid	-86	181.0	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	136.9	[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	15	[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	107.0	[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	5.9
3	14.4	22	ferulic acid	-91	193.2	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	134.1	[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	18	[M-H-CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	178.1	[M-H-CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	1.3
3	14.7	23	sinapic acid	-91	223.0	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	207.9	[M-H-CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	15	[M-H-CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	163.8	[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	1.9
3	14.9	24	polydatin	-144	389.1	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	227.0	[M-H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	20	[M-H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	185.2	[M-H-C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> ] <sup>-</sup>	9.8
3	15.0	25	rutin	-139	609.0	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	300.1	[M-H-C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub> ] <sup>-</sup>	35	[M-H-C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub> ] <sup>-</sup>	270.9	[M-H-C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub> ] <sup>-</sup>	1.8
3	15.7	26	procyanidin A2	-155	575.1	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	284.9	[M-H-C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> ] <sup>-</sup>	22	[M-H-C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> ] <sup>-</sup>	449.0	[M-H-C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	1.3
3-4	15.7	27	nepetin-7-glucoside	-135	477.1	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	315.2	[M-H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	25	[M-H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	299.7	[M-H-C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	1.4
3-4	16.8	28	hesperidin	-139	608.8	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	301.0	[M-H-C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub> ] <sup>-</sup>	20	[M-H-C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub> ] <sup>-</sup>	325.1	[M-H-C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub> ] <sup>-</sup>	21.8
3-4	17.2	29	homoplantagin	-163	461.0	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	283.1	[M-H-C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	34	[M-H-C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	297.1	[M-H-C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	4.2
3-4	17.7	30	fisetin	-108	285.1	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	135.1	[M-H-C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	23	[M-H-C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	120.9	[M-H-C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	1.9
3-4	17.8	31	rosmarinic acid	-115	358.7	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	161.0	[M-H-C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	18	[M-H-C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	133.2	[M-H-C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub> ] <sup>-</sup>	4.3
4	19.8	32	morin	-91	301.0	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	151.1	[M-H-C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	21	[M-H-C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	148.9	[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	1.8
4	20.2	33	quercetin	-121	300.9	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	151.1	[M-H-C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	25	[M-H-C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	179.1	[M-H-C <sub>6</sub> H <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	1.8
4	20.5	34	kaempferol	-107	285.0	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	185.2	[M-H-C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	25	[M-H-C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	117.2	[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	1.1
4	21.6	35	asiatic acid	-126	487.3	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	409.1	[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	35	[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	379.4	[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	1.3

Table 1. continued

segment	time (min)	number	compound	tube lens offset voltage (V)	precursor ion		quantifier product ion			quantifier/qualifier ion ratio
					m/z	assignment	m/z	NCE (eV)	assignment	
4	24.2	36	betulinic acid	-123	455.0	[M-H] <sup>-</sup>				

A quality control (QC) solution was prepared by mixing 50  $\mu\text{L}$  of each sample extract. This QC was employed to evaluate the repeatability of the method and the robustness of the chemometric results.

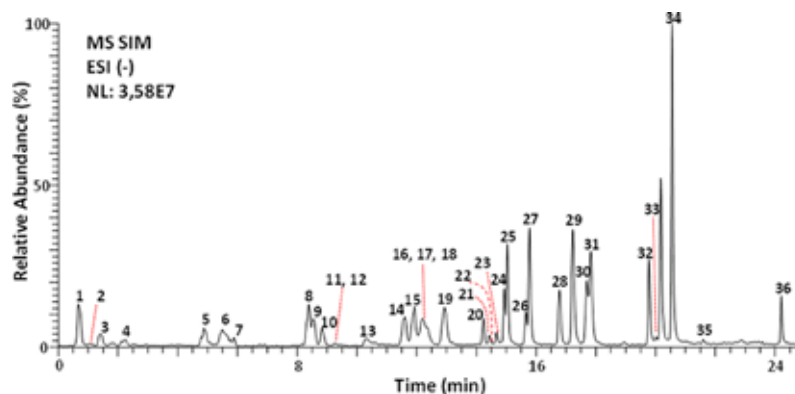
Samples were randomly analyzed with the proposed UHPLC-ESI-MS/MS method. Moreover, a QC and an instrumental chromatographic blank of acetonitrile were also injected every 10 analyzed samples.

**Data Analysis.** Principal component analysis (PCA) and partial least squares regression-discriminant analysis (PLS-DA) calculations were performed using Stand Alone Chemometrics Software (SOLO) from Eigenvector Research.<sup>29</sup> A detailed description about the theoretical background of these methods can be found elsewhere.<sup>30</sup>

X-data matrices in both PCA and PLS-DA consisted of the concentration levels of the 36 phenolic and polyphenolic compounds quantified in the set of paprika samples and QCs, whereas the Y-data matrix in PLS-DA defined the membership of each sample in the corresponding class. Data was autoscaled to equalize the influence of major and minor compounds on the descriptive models. Scatter plots of scores and loadings from principal components (PCs), in PCA, and from latent variables (LVs), in PLS-DA, were employed to study the distribution of samples and variables (quantified compounds), revealing patterns that could be correlated with their characteristics.

## RESULTS AND DISCUSSION

**UHPLC Chromatographic Separation.** As commented in the Introduction section, one of the objectives of the present work is the development of an LC-MS/MS method for the determination of a total of 36 phenolic and polyphenolic compounds, which belong to different phenolic classes, in paprika samples. The separation of polyphenols and phenolic acids in food products by LC-MS techniques is normally addressed by reversed-phase chromatography under gradient elution conditions using acidified water and methanol or acetonitrile as mobile phase components.<sup>18</sup> For that purpose, as a first attempt in this work, the separation was carried out with an Ascentis Express C18 fused-core (100  $\times$  2.1 mm, 2.7  $\mu\text{m}$  partially porous particle size) column, using water and acetonitrile, both acidified with 0.1% formic acid, as mobile phase components, and applying a universal gradient elution profile from 0 to 90% acetonitrile in 25 min. Under these conditions, multiple co-elutions were observed, and almost all the analyzed compounds eluted within the first 5 min, showing that, when acetonitrile was used as the organic mobile phase modifier, low elutropic strength was needed for the elution of this family of compounds by reversed-phase chromatography. Therefore, the separation of the studied compounds was optimized by combining isocratic and linear gradient elution steps at low acetonitrile contents (5 to 50%) to improve separation among the more polar phenolic acids, increasing then the acetonitrile content to elute all the compounds. It should be noted that, due to the high number of compounds under study, a compromise between chromatographic resolution and analysis time was considered. Figure 1 shows the proposed UHPLC chromatographic separation for the 36 studied phenolic and polyphenolic compounds (see the elution program in the Instrumentation section). As can be seen, an acceptable chromatographic separation was obtained in less than 26 min, although still some partial and total co-elutions were found for some compounds, such as for homovanillic and syringic acids (peaks 11 and 12), *p*-coumaric acid, (-)-epigallocatechin gallate, and syringaldehyde (peaks 16, 17, and 18), and veratric and ferulic acids (peaks 21 and 22). However, the use of MS detection under MRM acquisition mode allowed us to overcome problems dealing with partial and total co-elutions for the



**Figure 1.** UHPLC-ESI-MS chromatographic separation of the 36 studied compounds (standard of 500  $\mu\text{g/L}$  in water) under the proposed elution program (see [Instrumentation](#)). MS acquisition was performed in secondary ion monitoring (SIM) mode by following the  $[\text{M}-\text{H}]^-$  ion for each compound. Peak identification: 1, D-(−)-quinic acid; 2, arbutin; 3, gallic acid; 4, homogentisic acid; 5, protocatechuic aldehyde; 6, 4-hydroxybenzoic acid; 7, gentisic acid; 8, chlorogenic acid; 9, (+)-catechin; 10, caffeic acid; 11, homovanillic acid; 12, syringic acid; 13, vanillin; 14, (−)-epicatechin; 15, ethyl gallate; 16, *p*-coumaric acid; 17, (−)-epigallocatechin gallate; 18, syringaldehyde; 19, umbelliferone; 20, procyanidin C1; 21, veratric acid; 22, ferulic acid; 23, sinapic acid; 24, polydatin; 25, rutin; 26, procyanidin A2; 27, nepetin-7-glucoside; 28, hesperidin; 29, homoplantagin; 30, fisetin; 31, rosmarinic acid; 32, morin; 33, quercetin; 34, kaempferol; 35, asiatic acid; 36, betulinic acid.

correct determination of the studied compounds. In this regard, different SRM transitions were monitored for the co-eluting compounds, and no ion-suppression effects within ESI were present (that will be addressed in the next section).

**UHPLC-ESI-MS/MS Acquisition Conditions.** The ionization of the studied compounds under H-ESI conditions was thoroughly investigated. First, ion source parameters were tuned to generate the highest number of ions and to improve the obtained signal. For that purpose, these parameters were optimized by infusion of 100 mg/L standard solutions of each one of the studied compounds at a flow rate of 15  $\mu\text{L}/\text{min}$  and using the syringe pump integrated in the TSQ QqQ instrument, mixed with 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  of a 0.1% formic acid acidified water/ acetonitrile (1:1 v/v) solution by means of a Valco zero dead volume tee piece from Supelco. Then, for each one of the indicated ion source parameters, the optimal value was selected as the one providing the highest signal for most of the studied compounds (see the [Instrumentation](#) section). In contrast, a specific ESI tube lens offset voltage was selected for each compound, and the optimal values obtained are summarized in [Table 1](#).

Full-scan MS spectra ( $m/z$  50–1000) of individual solutions of all the studied compounds in negative ionization mode were also registered. As an example, [Figure S1a](#) (Supporting Information) shows the obtained MS spectra of syringaldehyde and ethyl gallate. As can be seen, the most abundant ion (base peak) in both spectra is the deprotonated molecule,  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , at  $m/z$  181.1 and 197.2 for syringaldehyde and ethyl gallate, respectively. Similar results were obtained for most of the studied phenolic and polyphenolic compounds, with the deprotonated molecule being the spectrum base peak. Moreover, adduct formation with the mobile phase components was not observed. In general, no ion in-source fragmentation was obtained, except some particular compounds. For instance, in the case of polydatin, the spectrum base peak was not the deprotonated molecule but the  $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^-$  ion at  $m/z$  227.0, although the  $[\text{M}-\text{H}]^-$  was also very abundant. In the case of syringaldehyde ([Figure S1a](#)) and gentisic and 4-hydroxybenzoic acids, ion source fragmentations with relative intensities lower than 40 and 60%, respectively, were observed. Finally, it should be mentioned that, in most of the MS spectra

obtained, a signal at  $m/z$  91.2 was also observed due to the dimer formation of the formic acid present in the mobile phase ( $[\text{HCOOH}-\text{HCOO}]^-$ ). After the study of the MS spectra, the deprotonated ion was then proposed as the precursor ion for further fragmentation studies ([Table 1](#)).

Fragmentation of the phenolic and polyphenolic compounds under study in the QqQ mass analyzer was also evaluated under tandem MS conditions. As an example, [Figure S1b,c](#) (Supporting Information) shows the normalized collision energy curves and the product ion scan spectra, respectively, for syringaldehyde and ethyl gallate. The two most intense and characteristic product ions of each compound were selected for the quantifier and qualifier SRM transitions, and they are summarized in [Table S1](#), together with the optimal NCE for each SRM transition and the quantifier/qualifier ion ratio. As can be seen in the table, all the compounds with partial or total co-elution in the chromatographic separation previously commented ([Figure 1](#)) showed different precursor-product ion transitions for both quantifier and qualifier ions.

In addition, the ion-suppression effect in the ESI source for those co-eluting compounds was evaluated by comparing their signal when analyzed individually and under co-elution conditions at the same concentration level. In all cases, ion suppression was lower than 10%, in agreement with previous reported studies.<sup>31</sup> Therefore, baseline chromatographic separation is not mandatory because these co-elutions can be selectively resolved by tandem MS using the appropriate SRM transitions.

**Instrumental Method Performance.** Method performance was evaluated from instrumental quality parameters such as limits of detection, limits of quantitation, linearity, run-to-run and day-to-day precisions, and trueness. The obtained results for the 36 phenolic and polyphenolic compounds determined are summarized in [Table 2](#).

Limits of detection (LODs), based on a signal-to-noise ratio of 3:1, were assessed by analyzing standard solutions at low concentration levels, obtaining values in a wide range depending on the compound (from 0.01  $\mu\text{g/L}$  for D-(−)-quinic acid to 1.4 mg/L for kaempferol). Limits of quantitation (LOQs), based on a signal-to-noise ratio of 10:1, in the range of 0.03  $\mu\text{g/L}$ –4.5 mg/L were then established. Of those, 7 compounds showed

Table 2. Method Performance: Instrumental Quality Parameters

number	compound	LOD ( $\mu\text{g/L}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/L}$ )	linearity ( $R^2$ )	run-to-run precision (RSD, %)			day-to-day precision (RSD, %)			trueness (relative error, %)					
					5 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	500 $\mu\text{g/L}$	10 mg/L	5 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	500 $\mu\text{g/L}$	10 mg/L	5 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	500 $\mu\text{g/L}$	10 mg/L
1	D-(−)-quinic acid	0.01	0.03	0.998	7.0	4.9	4.7	2.2	14.6	6.3	6.0	4.2	5.0	0.1	5.2	3.6
2	arbutin	0.22	0.73	0.996	9.5	8.2	4.5	1.9	16.5	9.7	5.2	4.9	4.6	0.9	2.3	2.1
3	gallic acid	964	3214	0.995			3.0									4.1
4	homogentisic acid	770	2566	0.996			2.5									3.8
5	protocatechuic aldehyde	2	7	0.995	6.4	5.3	3.2	2.8	8.9	6.1	5.6	4.4	5.6	2.7	1.5	3.0
6	4-hydroxybenzoic acid	21	71	0.999			1.4									3.1
7	gentisic acid	11	35	0.998			0.2									3.3
8	chlorogenic acid	0.87	3	0.999	4.0	2.9	2.1	2.1	6.7	4.8	3.7	3.7	7.9	0.3	4.7	
9	(+)-catechin	161	537	0.999			2.2									1.2
10	caffeic acid	18	60	0.995	5.1	2.6	2.5	2.5	8.9	6.1	6.1	2.9	9.7	6.0	3.1	3.1
11	homovanillic acid	425	1417	0.995			2.3									1.5
12	syringic acid	18	59	0.998	7.9	4.0	1.9	3.3	15.9	8.6	8.6	3.3	14.0	12.6	0.8	
13	vanillin	10	33	0.998	5.4	1.5	1.1	1.1	6.6	2.3	1.7	1.7	3.4	4.5	1.7	1.7
14	(−)-epicatechin	1282	4272	0.999			2.8									3.6
15	ethyl gallate	262	872	0.998			3.1									6.9
16	p-coumaric acid	4	12	0.995	5.8	2.9	2.0	2.0	14.1	4.3	4.1	4.1	13.7	5.5	8.2	
17	(−)-epigallocatechin gallate	770	2565	0.999			1.1									0.9
18	syringaldehyde	2	8	0.999			0.7									1.5
19	umbelliferone	0.37	1	0.998	12.3	6.4	3.4	2.3	15.4	8.3	5.6	5.4	9.4	5.3	3.4	4.0
20	procyanidin C1	359	1196	0.998			1.0									3.9
21	veratric acid	281	936	0.999			3.9									1.4
22	ferulic acid	2	6	0.997	6.2	4.4	5.5	4.0	18.5	9.3	7.8	6.0	13.3	0.2	0.9	0.4
23	sinapic acid	25	84	0.995			2.5									0.7
24	polydatin	0.14	0.48	0.999	5.9	2.3	2.6	2.2	19.2	13.6	5.8	2.8	11.1	4.4	2.1	4.3
25	rutin	3	9	0.996			4.8									4.4
26	procyanidin A2	170	566	0.998			1.1									2.1
27	nepetin-7-glucoside	0.06	0.21	0.998	6.2	5.0	3.0	1.9	12.6	7.7	5.8	5.1	12.3	8.0	4.0	3.8
28	hesperidin	0.31	1	0.999	7.9	4.1	2.7	2.1	16.3	5.3	5.2	3.8	10.5	0.7	2.3	1.6
29	homoplantagin	0.19	0.63	0.998	9.1	3.5	1.9	1.3	11.4	4.7	5.7	3.3	11.8	1.2	4.0	1.9
30	fisetin	759	2529	0.995			1.0									4.4
31	rosmarinic acid	12	41	0.999			0.8									1.9
32	morin	209	696	0.999	4.5	2.1	1.2	1.2	9.6	6.2	3.5	2.0	8.6	2.6	2.2	2.2
33	quercetin	89	296	0.996			1.8									1.4
34	kaempferol	1357	4522	0.998			1.6									3.4
35	asiatic acid	210	700	0.995			6.7									0.9
36	betulinic acid	265	885	0.998			7.3									5.6



Table 3. Concentrations of Studied Compounds in the Analyzed Paprika Samples<sup>a</sup>

number	compound	La Vera PDO paprika (mg/L)						Murcia PDO paprika (mg/L)						Czech Republic paprika (mg/L)					
		spicy		bittersweet		sweet		spicy		sweet		spicy		sweet-smoked		sweet			
		range	mean ± SD	range	mean ± SD	range	mean ± SD	range	mean ± SD	range	mean ± SD	range	mean ± SD	range	mean ± SD	range	mean ± SD		
3	gallic acid	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ		
4	homogentisic acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
5	protocatechuic aldehyde	0.1–0.6	0.3 ± 0.1	0.1–0.6	0.3 ± 0.1	0.1–0.5	0.4 ± 0.1	0.4–0.8	0.7 ± 0.1	0.6–0.8	0.7 ± 0.1	0.5–0.6	0.5 ± 0.1	0.6–0.8	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1		
8	chlorogenic acid	5.0–10.1	7.4 ± 1.5	5.3–10.4	6.9 ± 1.9	5.1–9.7	6.8 ± 1.2	5.2–6.8	6.0 ± 0.6	7.1–12.4	10.4 ± 1.5	6.6–7.5	7.1 ± 0.4	5.6–8.3	7.0 ± 1.0	5.8–8.4	7.0 ± 1.0		
10	caffeic acid	1.4–2.8	1.8 ± 0.3	1.2–2.0	1.7 ± 0.2	1.0–2.4	1.6 ± 0.3	1.8–2.6	2.2 ± 0.3	1.6–2.0	1.8 ± 0.1	2.3–5.2	3.2 ± 1.2	2.3–7.4	4.0 ± 2.2	1.9–5.5	3.0 ± 1.5		
11	homovanillic acid	2.8–8.9	6.1 ± 1.7	1.6–10.3	5.6 ± 2.3	0.5–12.9	5.9 ± 2.8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4.23–5.0	4.6 ± 0.3	n.d.	n.d.		
13	vanillin	1.9–11.2	3.9 ± 2.0	0.9–6.4	3.3 ± 1.4	1.4–7.2	3.5 ± 1.5	3.2–4.4	3.7 ± 0.3	2.3–3.3	2.7 ± 0.3	2.1–3.3	2.7 ± 0.5	1.9–2.7	2.3 ± 0.3	1.7–2.8	2.2 ± 0.5		
16	p-coumaric acid	1.6–5.6	3.3 ± 1.0	2.1–4.5	3.3 ± 0.7	1.4–5.0	3.1 ± 0.9	3.9–10.3	8.2 ± 1.8	1.3–3.7	2.8 ± 0.8	9.7–10.7	10.1 ± 0.4	7.4–8.7	8.0 ± 0.6	6.2–8.6	7.3 ± 1.0		
18	syringaldehyde	4.5–10.8	7.7 ± 1.7	4.0–14.3	8.5 ± 2.9	1.2–14.8	8.0 ± 3.0	0.8–1.8	1.2 ± 0.4	0.8–1.8	1.2 ± 0.4	1.4–1.8	1.6 ± 0.2	3.0–4.1	3.6 ± 0.5	1.6–1.9	1.7 ± 0.1		
19	umbelliferone	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.1–0.2	0.1 ± 0.1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
22	ferulic acid	1.4–16.3	7.1 ± 3.4	2.6–8.1	5.2 ± 1.6	1.3–9.9	5.7 ± 2.4	2.8–19.1	10.3 ± 5.2	4.7–16.1	9.6 ± 3.6	11.8–18.4	14.9 ± 2.7	12.8–19.2	15.2 ± 2.8	5.4–12.1	9.5 ± 3.2		
23	sinapic acid	2.0–5.7	3.4 ± 1.0	1.9–5.0	3.2 ± 1.0	1.6–4.8	3.1 ± 1.0	1.2–6.8	2.6 ± 1.5	1.7–4.5	3.2 ± 0.9	1.9–4.6	3.7 ± 1.1	2.1–5.5	3.6 ± 1.4	3.1–4.5	4.1 ± 0.6		
25	rutin	1.3–6.1	3.0 ± 1.2	1.4–5.0	2.9 ± 0.8	1.3–4.5	2.8 ± 0.9	1.0–1.8	1.4 ± 0.3	3.8–5.4	4.5 ± 0.5	3.4–3.8	3.6 ± 0.2	2.8–3.3	3.0 ± 0.2	2.5–3.0	2.6 ± 0.2		
27	nepetin-7-glucoside	n.d. – 0.2	0.1 ± 0.1	n.d.–0.2	0.1 ± 0.1	n.d.–0.1	0.1 ± 0.0	0.1–0.2	0.2 ± 0.0	0.1–0.2	0.1 ± 0.0	0.3–0.4	0.3 ± 0.0	0.2–0.2	0.2 ± 0.0	0.6–0.7	0.6 ± 0.0		
28	hesperidin	<LOQ–0.4	0.4 ± 0.0	<LOQ–5.1	2.6 ± 3.6	<LOQ–5.8	5.8 ± 0.0	0.1–0.5	0.2 ± 0.1	3.8–6.1	4.6 ± 0.7	7.1–9.2	7.9 ± 1.0	1.2–2.4	1.9 ± 0.5	<LOQ–0.2	0.1 ± 0.10		
29	homoplantagin	0.001–0.008	0.004 ± 0.002	0.002–0.009	0.005 ± 0.002	0.001–0.008	0.004 ± 0.002	0.004–0.011	0.008 ± 0.002	0.008–0.017	0.011 ± 0.003	0.011–0.040	0.031 ± 0.012	0.004–0.024	0.012 ± 0.010	0.011–0.038	0.027 ± 0.012		
31	rosmarinic acid	1.1–5.5	2.3 ± 1.8	1.4–8.3	3.8 ± 2.5	1.1–5.6	2.5 ± 1.6	1.5–2.1	1.7 ± 0.2	1.2–4.4	3.6 ± 0.9	5.7–10.4	7.4 ± 1.8	3.7–7.5	4.7 ± 1.6	2.9–4.8	3.7 ± 0.7		
33	quercetin	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ		
34	kaempferol	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ		
36	betulinic acid	1.2–6.4	3.2 ± 1.6	1.4–9.1	3.6 ± 1.5	1.0–8.3	3.0 ± 1.6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		

<sup>a</sup>n.d.: not detected; SD: standard deviation.

LOQ values equal to or below 1  $\mu\text{g/L}$ , 9 compounds were in the range of 1–50  $\mu\text{g/L}$ , 12 compounds were in the range 50  $\mu\text{g/L}$ –1 mg/L, and only 8 compounds provided LOQ values higher than 1 mg/L. Taking into account that these compounds are naturally occurring secondary metabolites in plant-based products and the huge variety of compounds and concentration levels that can be found (usually at the relatively low to high mg/L level), these values are acceptable for the quantitation of this family of compounds in paprika samples.

External calibration curves using phenolic and polyphenolic standards prepared in water and based on peak area at concentrations above LOQ to 15 mg/L were established. Very good linearities with correlation coefficients ( $R^2$ ) higher than 0.995 were obtained.

Run-to-run and day-to-day precisions for compound quantification were also calculated at four concentration levels (5  $\mu\text{g/L}$ , 50  $\mu\text{g/L}$ , 500  $\mu\text{g/L}$ , and 10 mg/L), and the results are also given in Table 2. In the case of run-to-run precision, five replicate determinations for each concentration level were performed within the same day. For day-to-day precision, 15 replicate determinations at each concentration level were carried out within three nonconsecutive days (five replicate determinations each day). In general, run-to-run precisions below 12.3%, expressed as percent relative standard deviations (% RSD), were obtained in all cases. As expected, better precisions were achieved at the highest concentration level evaluated (10 mg/L), with RSD values in the range of 0.2–4.4% (for 33 compounds), and only asiatic and betulinic acids showed higher RSD values (6.7 and 7.3%, respectively). Precision slightly worsened at lower concentrations for those compounds that were still detected under the selected conditions, but the figures of merit were very acceptable, with values below 5.9, 9.9, and 12.3% for the 500, 50, and 5  $\mu\text{g/L}$  concentration levels, respectively. RSD values slightly increased when calculating day-to-day precisions, as expected. Nevertheless, RSD values below 13.2, 8.6, 15.9, and 19.2% for the 10 mg/L, 500  $\mu\text{g/L}$ , 50  $\mu\text{g/L}$ , and 5  $\mu\text{g/L}$  concentration levels, respectively, were quite acceptable, taking into consideration the evaluated concentration levels and the methodology employed.

Method trueness was also evaluated at the four concentration levels by comparing the spiked concentrations with those calculated by external calibration using standards prepared in water. Relative errors (%) lower than 8.2, 12.6, 15.0, and 13.3% for the 10 mg/L, 500  $\mu\text{g/L}$ , 50  $\mu\text{g/L}$ , and 5  $\mu\text{g/L}$  concentration levels, respectively, were obtained.

The results showed that the proposed UHPLC-ESI-MS/MS method was very satisfactory in terms of sensitivity, precision, and trueness for the determination of the 36 studied phenolic and polyphenolic compounds at the expected concentration levels.

**Sample Analysis.** The applicability of the proposed UHPLC-ESI-MS/MS method for the determination of the 36 studied compounds in paprika was evaluated. Paprika samples were extracted by solid–liquid extraction with water:acetonitrile (20:80 v/v) as described in the Materials and Methods. The obtained extracts were then analyzed in triplicate with the proposed analytical method, and targeted compounds were quantified by external calibration. Quantitation results for all the 111 paprika samples analyzed are provided in the Supporting Information. As an overview, Table 3 shows, for each compound, the concentration ranges and the mean values  $\pm$  standard deviations found in the analyzed paprika samples depending on the production region (La Vera PDO, Murcia

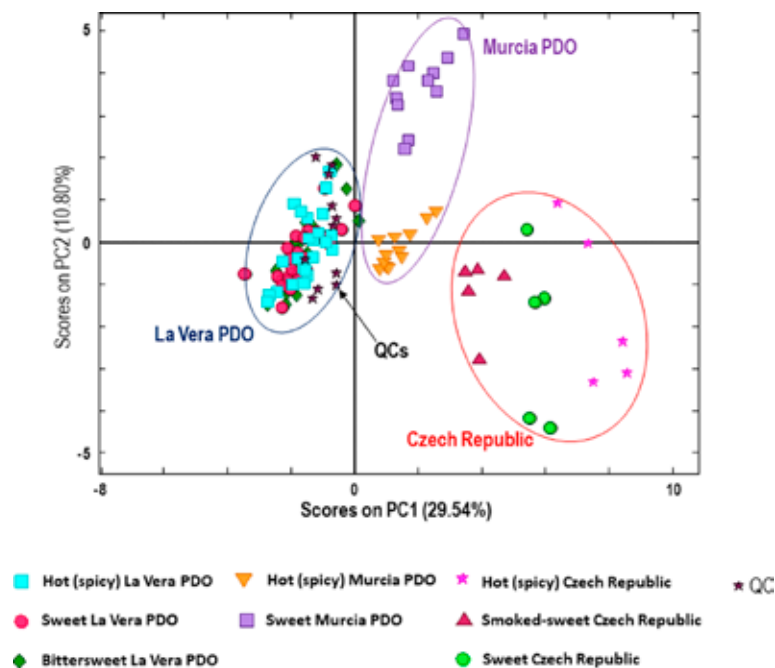
PDO, and Czech Republic) and the paprika flavors. Gallic acid, quercetin, and kaempferol were always detected below the LOQ value. 16 of the studied compounds (D-(–)-quinic acid, arbutin, 4-hydroxybenzoic acid, gentisic acid, (+)-catechin, syringic acid, (–)-epicatechin, ethyl gallate, (–)-epigallocatechin gallate, procyanidin C1, veratric acid, polydatin, procyanidin A2, fisetin, morin, and asiatic acid) were not detected in any of the 111 paprika samples (these compounds were not included in Table 3). Anyway, these compounds were preliminarily selected for this study because of their presence in other similar matrices such as Serbian red spice paprika, Italian red sweet pepper, or in red pepper fruits and seed oils.<sup>11,32–34</sup>

Data was first analyzed with univariate methods trying to recognize some tentative biomarkers of the different paprika types. The average concentrations and boxplots comparing the three geographical origins and/or the flavor varieties suggested that some compounds were up- or down-expressed depending on the classes. Some representative examples are given in the boxplots with whiskers of Figure S2 (Supporting Information) including model compounds much more abundant in one of the classes and others quite homogeneously distributed.

In more details, some compounds were only found in some specific paprika samples depending on the production region, so they could be considered as putative markers with high selectivity with respect to origins. For example, homogentisic acid was only detected in Czech Republic samples, although always below the LOQ. Umbelliferone was only found, at low concentrations, in the spicy flavor paprika from Czech Republic, while betulinic acid was only found in La Vera PDO samples.

Other general patterns were extracted concerning non-selective compounds. For instance, homoplantagin, rosmarinic acid, and nepetin-7-glucoside exhibited concentrations 3- to 10-fold higher in Czech Republic samples than in the other origins. A similar trend was found with hydroxycinnamic acids, also more abundant in Czech Republic paprika. For La Vera PDO, homovanillic acid and, especially, syringaldehyde, were quite characteristic. In contrast, no unique or featured molecules were encountered for Murcia samples, which displayed, in general, intermediate concentration values between La Vera and Czech Republic. As an example, Figure S3 (Supporting Information) depicts bar plots showing the distribution of three selected compounds (syringaldehyde, rutin, and nepetin-7-glucoside) in the analyzed paprika samples. It can be seen that rutin shows quite similar levels within all the paprika samples. In contrast, as commented above, syringaldehyde and nepetin-7-glucoside are more characteristic of La Vera PDO and Czech Republic samples, respectively. These clear differences in phenolic and polyphenolic distributions and concentrations depending on the region and flavor varieties may allow us to propose polyphenols as good chemical descriptors to address paprika authentication.

The significance of the differences in the concentration values among classes was evaluated using statistical tests. As a result, most of the previous considerations regarding the occurrence of quite featured compounds of different classes could be confirmed. Results commented here have been limited to various illustrative cases since a comprehensive analysis dealing with all variables seems to be excessive. Data given as follows corresponds to the probability ( $p$  values) of Student's  $t$  test for the comparison of means of two classes before a Fisher test of variances. We assume a confidence level of 0.99, so when  $p < 0.01$ , differences in the analyte concentrations among the classes are significant. Results reveal the existence of several compounds



**Figure 2.** PCA score plot of PC1 vs PC2 when using the 36 compound concentrations found in the analyzed paprika samples as chemical descriptors.

such as syringaldehyde (at least,  $p < 0.0006$ ), caffeic acid (at least,  $p < 0.0042$ ), and homoplantagin (at least,  $p < 0.0016$ ) with statistically relevant differences in the concentration levels depending on the origin. Other species such as ferulic acid and nepetin-7-glucoside show no significant differences among Murcia and Czech Republic ( $p = 0.02$  and  $0.048$ , respectively). Finally, compounds such as chlorogenic acid are unspecific, so their role in class description and discrimination is quite irrelevant ( $p = 0.04$ ,  $0.04$ , and  $0.91$  for La Vera/Murcia, Murcia/Czech Republic, and La Vera/Czech Republic, respectively).

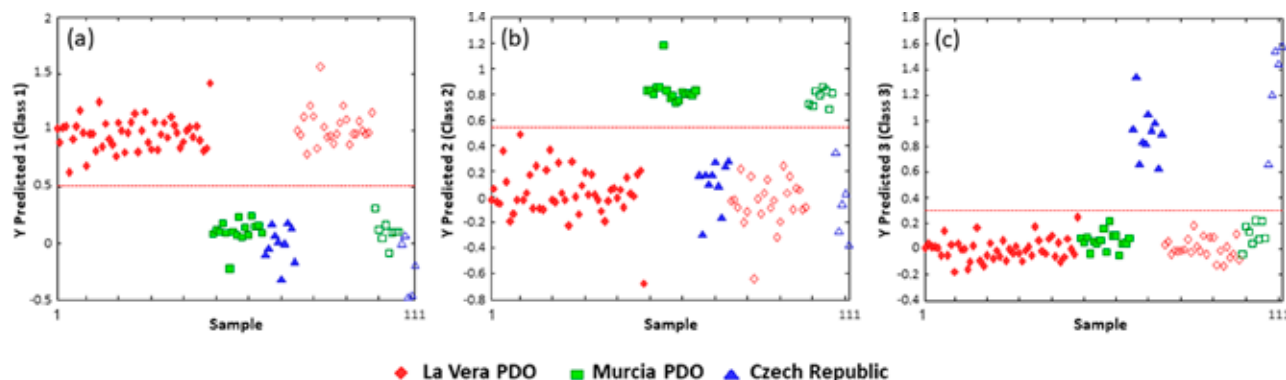
**PDO Authentication.** Phenolic and polyphenolic concentration levels found in the analyzed paprika samples were evaluated as potential chemical descriptors to address sample classification and authentication. As a first approach, a nonsupervised exploratory PCA strategy was employed with the aim of studying the grouping trends among the analyzed samples. A matrix data was built including the 36 compound concentrations found in the 111 paprika samples and the QCs and was subjected to PCA. Figure 2 shows the score plot of PC1 versus PC2 obtained. As can be seen, QCs appeared grouped and located close to the center area of the plot, showing the good performance and robustness of the proposed method and the chemometric results. QCs appeared distributed in the same area than La Vera Paprika PDO samples because QC composition is enhanced on La Vera Paprika due to the high number of samples belonging to this group (72 out of 111 paprika samples). Paprika samples were perfectly discriminated by PC1 in three separate groups: La Vera PDO at the left of the score plot, Murcia PDO at the top-right area, and Czech Republic samples at the bottom-right area of the plot. Therefore, concentration levels found with the proposed UHPLC-ESI-MS/MS method are excellent chemical descriptors to achieve sample discrimination regarding the paprika production region. In addition, paprika flavors from Murcia PDO (sweet vs spicy) and from Czech Republic (sweet vs smoked-sweet vs spicy) samples are also perfectly separated, being discriminated by PC2 and by PC1 in the case of Murcia

PDO and Czech Republic samples, respectively. In contrast, no discrimination was observed among La Vera PDO paprika flavors (sweet, bittersweet, and spicy), and all the samples appeared to be mixed. As previously commented in the Introduction, phenolic and polyphenolic distribution and content in plant-based products may be related to multiple parameters such as climatic conditions, growing areas, water resources, and agronomy conditions.

The study of the PCA loading plot allows us to see which variables (concentration) are defining the separation observed in the score plot. Figure S4 (Supporting Information) shows the obtained PCA loading plot of PC1 versus PC2. Thus, the separation of Czech Republic samples is achieved mainly by the presence of homoplantagin, nepetin-7-glucoside, *p*-coumaric acid, and kaempferol among other compounds. Chlorogenic acid, rutin, and hesperidin are more discriminating compounds for the Murcia PDO samples. In contrast, vanillin, homovanillic acid, syringaldehyde, and quercetin seem to be the more characteristic compounds to separate La Vera PDO samples from the other two groups. Although more studies will be necessary, a priori, these compounds would be good candidates as potential biomarkers for the authentication of paprika.

A supervised pattern recognition technique such as PLS-DA was used to discriminate paprika according to their geographical and/or botanical origins for authentication purposes. In this case, the X-data matrix was again the concentration of the compounds determined in the studied samples, while the Y-data matrix was the sample class.

The first study was focused on the classification of paprika samples according to geographical origin into La Vera, Murcia, and Czech Republic types. In this case, the calibration set was composed of 48 La Vera, 16 Murcia, and 10 Czech Republic samples randomly selected, which approximately corresponded to 70% of the analyzed samples. The other ~30% of the samples were used as the test set for prediction purposes. The optimum number of LVs established by cross validation using Venetian



**Figure 3.** PLS-DA classification plots according to the production region. (a) La Vera versus other classes; (b) Murcia versus other classes; (c) Czech Republic versus other classes. Sample assignment: rhombus = La Vera PDO, square = Murcia, triangle = Czech Republic. The dashed line means the classification boundary.

blinds was 4, providing the minimum of the root mean square error of cross validation (RMSECV) function. The analysis of scores and loadings of LV1 versus LV2 (not shown here) revealed that the three classes were perfectly separated, and relevant compounds for their discrimination were similar to those annotated for PCA.

Figure S5 (Supporting Information) shows the plots of the qualitative parameters (regression vector, variable importance in projection (VIP), and selectivity ratio) for the previously obtained PLS-DA model. These parameters allow us to predict which variables (compounds) are more discriminant to achieve the obtained PLS-DA distribution. As can be seen, homovanillic acid and syringaldehyde are the compounds appearing as the most important variables in the three qualitative parameters, therefore being the two most relevant compounds for the PLS-DA classification when dealing with the paprika production region.

Figure 3 shows the classification plots corresponding to (a) La Vera (rhombus symbols) versus the other samples, (b) Murcia (square symbols) versus the other samples, and (c) Czech Republic (triangle symbols) versus the other samples. The dashed line indicates the classification boundary, so samples belonging to the targeted class were located to the top while those belonging to the other types were to the bottom. Samples to be used for calibration were on the left, and those for prediction were on the right side. Results indicated that the classification rate was 100%, so all the samples were correctly assigned to the corresponding classes in both calibration and prediction steps (confusion matrix was [24, 0, 0; 0, 8, 0; 0, 0, 5] for La Vera, Murcia, and Czech Republic, respectively).

Table S2 (Supporting Information) shows the validation results for both calibration and prediction. The obtained validation results are satisfactory. Calibration sensitivity and specificity are 1, and the RMSECV and the bias showed values tending to zero, ensuring a good calibration model.

PLS-DA models were also applied to each paprika production region in order to study the classification of samples according to the flavor variety, and the obtained results are shown in Figure S6 (Supporting Information). In order to build them, 4, 2, and 2 LVs were needed for La Vera, Murcia, and Czech Republic sample classifications, respectively. As can be seen, again, no discrimination was observed among the different La Vera PDO paprika samples, showing that the distribution and content of the targeted compounds found in La Vera samples are not enough to allow discrimination between sweet, bittersweet, and

spicy samples. In contrast, perfect discrimination among flavor varieties was obtained for both Murcia PDO and Czech Republic paprika samples. Based on the qualitative parameters (regression vector, VIP, and selectivity ratio) for the PLS-DA models applied to Murcia PDO and Czech Republic samples (Figure S7 in the Supporting Information), compounds such as vanillin, kaempferol, and *p*-coumaric acid seem to be important for the discrimination of Murcia DOP flavor varieties, and others such as rutin, hesperidin, and chlorogenic acid play also an important role. In the case of Czech Republic samples, nepetin-7-glucoside seems to be the most important compound to discriminate among the three flavor varieties under study, together with other compounds such as rutin, hesperidin, and *p*-coumaric acid, among others.

In this work and for the first time, an important number of phenolic and polyphenolic compounds belonging to different families were determined in a high number of Spanish paprika samples with PDO attributes. This is very important to know the distribution and levels of these chemicals, with antioxidant properties, in paprika samples with PDO, giving additional benefits and attributes to the agricultural practices and regions producing paprika. In addition, the results obtained in this work demonstrate that the phenolic and polyphenolic profiles and contents obtained by the proposed UHPLC-ESI-MS/MS method after a very simple sample extraction can be employed as good chemical descriptors for the characterization and classification of paprika samples. These compounds proved to be very useful also for the discrimination of flavor varieties in the case of Murcia PDO and Czech Republic paprika samples. Finally, several compounds proved to be important factors to address sample classification by PCA and PLS-DA and could be considered as potential biomarkers for paprika authentication.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### SI Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.9b06054>.

Structures, family groups, CAS numbers, and suppliers of the 36 polyphenolic compounds under study; quality indicators for the calibration and prediction of the proposed PLS-DA model when dealing with the classification of paprika samples regarding the production region; full-scan spectra, collision energy curves, and production spectra for syringaldehyde and ethyl gallate; boxplots with whiskers representing the concentrations of

selected compounds in samples; bar plots showing concentration levels found in the analyzed paprika samples for syringaldehyde, rutin, and nepetin-7-glucoside; PCA loading plot of PC1 versus PC2; plots of La Vera PDO class qualitative parameters for the PLS-DA model; PLS-DA score plot of LV1 versus LV2 for the classification of each production region according to flavor varieties; plots of hot Murcia PDO and sweet Czech Republic paprika qualitative parameters for the PLS-DA models (PDF)

Concentration levels (mg/L) of the 36 determined compounds in the 111 paprika samples analyzed (XLSX)

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

Oscar Núñez – University of Barcelona, Barcelona, Spain;  
orcid.org/0000-0001-5850-8972; Phone: 34-93-403-3706; Email: oscar.nunez@ub.edu; Fax: 34-93-402-1233

### Other Authors

Sergio Barbosa – University of Barcelona, Barcelona, Spain  
Guillem Campmajó – University of Barcelona, Barcelona, Spain  
Javier Saurina – University of Barcelona, Barcelona, Spain  
Lluís Puignou – University of Barcelona, Barcelona, Spain

Complete contact information is available at:  
<https://pubs.acs.org/10.1021/acs.jafc.9b06054>

### Author Contributions

#S.B. and G.C. contributed equally in the research of this work.

### Funding

The authors thank the financial support received from the Spanish Ministry of Science and Innovation (project PGC2018-095013-B-I00) and from the Agency for Administration of University and Research Grants (Generalitat de Catalunya) (projects 2017SGR-171 and 2017SGR-310).

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

O.N. is a Serra Hunter Fellow. G.C. thanks the University of Barcelona for the APIF grant.

## REFERENCES

- (1) Serrano, N.; Cetó, X.; Núñez, O.; Aragón, M.; Gámez, A.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J. M. Characterization and Classification of Spanish Paprika (*Capsicum Annuum* L.) by Liquid Chromatography Coupled to Electrochemical Detection with Screen-Printed Carbon-Based Nanomaterials Electrodes. *Talanta* **2018**, *189*, 296–301.
- (2) Barboza, G. E.; García, C. C.; González, S. L.; Scaldaferrro, M.; Reyes, X. Four New Species of *Capsicum* (Solanaceae) from the Tropical Andes and an Update on the Phylogeny of the Genus. *PLoS One* **2019**, *14*, No. e0209792.
- (3) Carrizo García, C.; Barfuss, M. H. J.; Sehr, E. M.; Barboza, G. E.; Samuel, R.; Moscone, E. A.; Ehrendorfer, F. Phylogenetic Relationships, Diversification and Expansion of Chili Peppers (*Capsicum*, Solanaceae). *Ann. Bot.* **2016**, *118*, 35–51.
- (4) Bata-Vidács, I.; Baka, E.; Tóth, A.; Csernus, O.; Luzics, S.; Adányi, N.; Székács, A.; Kukolya, J. Investigation of Regional Differences of the Dominant Microflora of Spice Paprika by Molecular Methods. *Food Control* **2018**, *83*, 109–117.
- (5) Martín, A.; Hernández, A.; Aranda, E.; Casquete, R.; Velázquez, R.; Bartolomé, T.; Córdoba, M. G. Impact of Volatile Composition on the Sensorial Attributes of Dried Paprikas. *Food Res. Int.* **2017**, *100*, 691–697.
- (6) Wu, N.; Gao, W.; Lian, Y.; Du, J.; Tie, X. The Transfer of Natural Rhodamine B Contamination from Raw Paprika Fruit to Capsicum Oleoresin during the Extraction Process. *Food Chem.* **2017**, *237*, 786–792.
- (7) Topuz, A.; Dincer, C.; Özdemir, K. S.; Feng, H.; Kushad, M. Influence of Different Drying Methods on Carotenoids and Capsaicinoids of Paprika (Cv.; Jalapeno). *Food Chem.* **2011**, *129*, 860–865.
- (8) Jackson, S.; Swiner, D. J.; Capone, P. C.; Badu-Tawiah, A. K. Thread Spray Mass Spectrometry for Direct Analysis of Capsaicinoids in Pepper Products. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1023*, 81–88.
- (9) Tunali Akar, S.; Gorgulu, A.; Akar, T.; Celik, S. Decolorization of Reactive Blue 49 Contaminated Solutions by *Capsicum Annuum* Seeds: Batch and Continuous Mode Biosorption Applications. *Chem. Eng. J.* **2011**, *168*, 125–133.
- (10) Wahyuni, Y.; Ballester, A. R.; Sudarmonowati, E.; Bino, R. J.; Bovy, A. G. Metabolite Biodiversity in Pepper (*Capsicum*) Fruits of Thirty-Two Diverse Accessions: Variation in Health-Related Compounds and Implications for Breeding. *Phytochemistry* **2011**, *72*, 1358–1370.
- (11) Mudrić, S. Ž.; Gašić, U. M.; Dramićanin, A. M.; Ćirić, I. Ž.; Milojković-Opsenica, D. M.; Popović-Đorđević, J. B.; Momirović, N. M.; Tešić, Ž. L. The Polyphenolics and Carbohydrates as Indicators of Botanical and Geographical Origin of Serbian Autochthonous Clones of Red Spice Paprika. *Food Chem.* **2017**, *217*, 705–715.
- (12) Han, X.; Shen, T.; Lou, H. Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *Int. J. Mol. Sci.* **2007**, *8*, 950–988.
- (13) Monago-Maraña, O.; Muñoz De La Peña, A.; Galeano-Díaz, T. Isocratic LC-DAD-FLD Method for the Determination of Flavonoids in Paprika Samples by Using a Rapid Resolution Column and Post-Column PH Change. *Talanta* **2016**, *152*, 15–22.
- (14) Monago-Maraña, O.; Durán-Merás, I.; Galeano-Díaz, T.; Muñoz De La Peña, A. Fluorescence Properties of Flavonoid Compounds. Quantification in Paprika Samples Using Spectrofluorimetry Coupled to Second Order Chemometric Tools. *Food Chem.* **2016**, *196*, 1058–1065.
- (15) Vallejos, S.; Moreno, D.; Ibeas, S.; Muñoz, A.; García, F. C.; García, J. M. Polymeric Chemosensor for the Colorimetric Determination of the Total Polyphenol Index (TPI) in Wines. *Food Control* **2019**, *106*, 106684.
- (16) Fernández de Córdoba, M. L.; Ruiz Medina, M. Chapter 29 - Analytical Methods for Determination of Polyphenols in Beer. In *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*; 2014; p Pages 289–299.
- (17) Pardo-Mates, N.; Vera, A.; Barbosa, S.; Hidalgo-Serrano, M.; Núñez, O.; Saurina, J.; Hernández-Cassou, S.; Puignou, L. Characterization, Classification and Authentication of Fruit-Based Extracts by Means of HPLC-UV Chromatographic Fingerprints, Polyphenolic Profiles and Chemometric Methods. *Food Chem.* **2017**, *221*, 29.
- (18) Lucci, P.; Saurina, J.; Núñez, O. Trends in LC-MS and LC-HRMS Analysis and Characterization of Polyphenols in Food. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2017**, *88*, 1–24.
- (19) Morales-Soto, A.; Gómez-Caravaca, A. M.; García-Salas, P.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Diode Array and Electrospray Time-of-Flight Mass Spectrometry Detectors for a Comprehensive Characterization of Phenolic and Other Polar Compounds in Three Pepper (*Capsicum Annuum* L.) Samples. *Food Res. Int.* **2013**, *51*, 977–984.
- (20) Chen, L.; Kang, Y. H. Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of Red Pepper (*Capsicum Annuum* L.) Stalk Extracts: Comparison of Pericarp and Placenta Extracts. *J. Funct. Foods* **2013**, *5*, 1724–1731.
- (21) Consejo de la union europea. RCOUNCIL REGULATION (EC) No 510/2006 of 20 March 2006 on the Protection of

Geographical Indications and Designations of Origin for Agricultural Products and Foodstuffs, Off. J. European Union L93 12–25, 2006.

(22) Kamiloglu, S. Authenticity and Traceability in Beverages. *Food Chem.* **2019**, *277*, 12–24.

(23) Zapata, M.; Bañon, S.; Cabrera, P.; Zapata, M.; Bañon, S.; Cabrera, P. *El Pimiento Para Pimentón*, Mundi Prensa Libros, S.A., Madrid, Spain. 1992. ISBN: 978–8–47114-372-3, 1992.

(24) COMMISSION REGULATION (EC) No 982/e Registering Certain Names in the Register of Protected Designations of Origin and Protected Geographical Indications (Pimentón de La Vera (PDO) — Karlovarský Suchar (PGI) — Riso Di Baraggia Biellese.

(25) Palacios-Morillo, A.; Jurado, J. M.; Alcázar, A.; De Pablos, F. Geographical Characterization of Spanish PDO Paprika by Multivariate Analysis of Multielemental Content. *Talanta* **2014**, *128*, 15–22.

(26) COUNCIL REGULATION (EEC) No 2081/92 of 14 July 1992 on the Protection of Geographical Indications and Designations of Origin for Agricultural Products and Foodstuffs, Off. J. European Communities L208 1–8.

(27) Horn, B.; Esslinger, S.; Pfister, M.; Faul-Hassek, C.; Riedl, J. Non-Targeted Detection of Paprika Adulteration Using Mid-Infrared Spectroscopy and One-Class Classification – Is It Data Preprocessing That Makes the Performance? *Food Chem.* **2018**, *257*, 112–119.

(28) Cetó, X.; Serrano, N.; Aragón, M.; Gámez, A.; Esteban, M.; Díaz-Cruz, J.; Núñez, O. Determination of HPLC-UV Fingerprints of Spanish Paprika (*Capsicum Annuum* L.) for Its Classification by Linear Discriminant Analysis. *Sensors* **2018**, *18*, 4479.

(29) SOLO Software, *Eigenvecto Research*, [Http://www.Eigenvector.Com/Software/Solo.Htm](http://www.eigenvector.com/software/solo.htm) (Accessed on 12th December 2019).

(30) Massart, J.; Vandeginste, D. L.; Buydens, B. G. M.; de Jong, L. M. C.; Lewi, S.; Smeyers-Verbeke, P. J. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics. J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1997**.

(31) Puigventós, L.; Navarro, M.; Alechaga, É.; Núñez, O.; Saurina, J.; Hernández-Cassou, S.; Puignou, L. Determination of Polyphenolic Profiles by Liquid Chromatography-Electrospray-Tandem Mass Spectrometry for the Authentication of Fruit Extracts. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 597–608.

(32) Liu, Y.; Lv, J.; Liu, Z.; Wang, J.; Yang, B.; Chen, W.; Ou, L.; Dai, X.; Zhang, Z.; Zou, X. Integrative Analysis of Metabolome and Transcriptome Reveals the Mechanism of Color Formation in Pepper Fruit (*Capsicum Annuum* L.). *Food Chem.* **2020**, *306*, 125629.

(33) Sobolev, A. P.; Mannina, L.; Capitani, D.; Sanzò, G.; Ingallina, C.; Botta, B.; Fornarini, S.; Crestoni, M. E.; Chiavarino, B.; Carradori, S.; et al. A Multi-Methodological Approach in the Study of Italian PDO “Cornetto Di Pontecorvo” Red Sweet Pepper. *Food Chem.* **2018**, *255*, 120–131.

(34) Chouaibi, M.; Rezig, L.; Hamdi, S.; Ferrari, G. Chemical Characteristics and Compositions of Red Pepper Seed Oils Extracted by Different Methods. *Ind. Crops Prod.* **2019**, *128*, 363–370.

**Supporting Information for:**

**Determination of Phenolic Compounds in Paprika by Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Application to Product Designation of Origin Authentication by Chemometrics.**

Sergio Barbosa<sup>a,#</sup>, Guillem Campmajó<sup>a,b,#</sup>, Javier Saurina<sup>a,b</sup>, Lluís Puignou<sup>a,b</sup> and Oscar Núñez<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemical Engineering and Analytical Chemistry, University of Barcelona. Martí i Franquès 1-11, E08028 Barcelona, Spain.

<sup>b</sup> Research Institute in Food Nutrition and Food Safety, University of Barcelona. Av. Prat de la Riba 171, Edifici Recerca (Gaudí), E-08901 Santa Coloma de Gramanet, Barcelona, Spain.


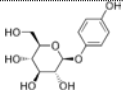





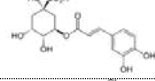
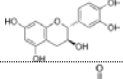
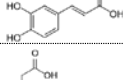



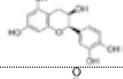
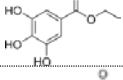
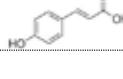
<sup>c</sup> Serra Hunter Fellow. Generalitat de Catalunya (Spain).

\* Corresponding author: Oscar Núñez

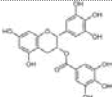
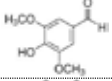
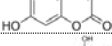
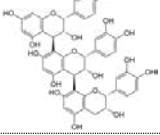
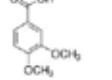
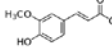
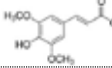
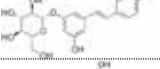
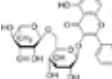
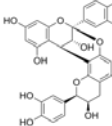
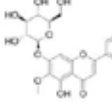
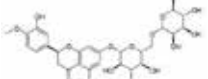
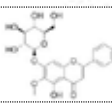
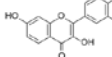
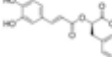
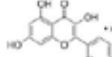
(Phone: 34-93-403-3706, Fax: 34-93-402-1233, e-mail: oscar.nunez@ub.edu)

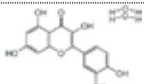
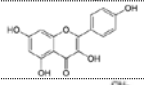
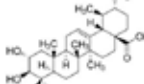
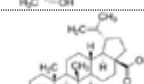
# These authors contributed equally in the research of this work.

**Table S1. Structures, family group, CAS number and supplier of the 36 polyphenolic compounds under study.**

Compound	Family	Structure	CAS number	Supplier
1 D-(-)-Quinic acid	Phenolic acid		77-95-2	Sigma-Aldrich
2 Arbutin	Other phenolics		497-76-7	Sigma-Aldrich
3 Gallic acid	Phenolic acid		149-91-7	Fluka
4 Homogentisic acid	Phenolic acid		451-13-8	Fluka
5 Protocatechuic aldehyde	Phenolic aldehyde		139-85-5	Sigma-Aldrich
6 4-Hydroxybenzoic acid	Phenolic acid		99-96-7	Sigma-Aldrich
7 Gentisic acid	Phenolic acid		490-79-9	Sigma-Aldrich
8 Chlorogenic acid	Phenolic acid		327-97-9	HWI Analytik GMBH
9 (+)-Catechin	Flavonoid		154-23-4	Fluka
10 Caffeic acid	Phenolic acid		331-39-5	Sigma-Aldrich
11 Homovanillic acid	Phenolic acid		306-08-1	Sigma-Aldrich
12 Syringic acid	Phenolic acid		530-57-4	Fluka
13 Vanillin	Phenolic aldehyde		121-33-5	Fluka
14 (-)-Epicatechin	Flavonoid		490-46-0	Sigma-Aldrich
15 Ethyl gallate	Other phenolics		831-61-8	Sigma-Aldrich
16 p-Coumaric acid	Phenolic acid		501-98-4	Sigma-Aldrich



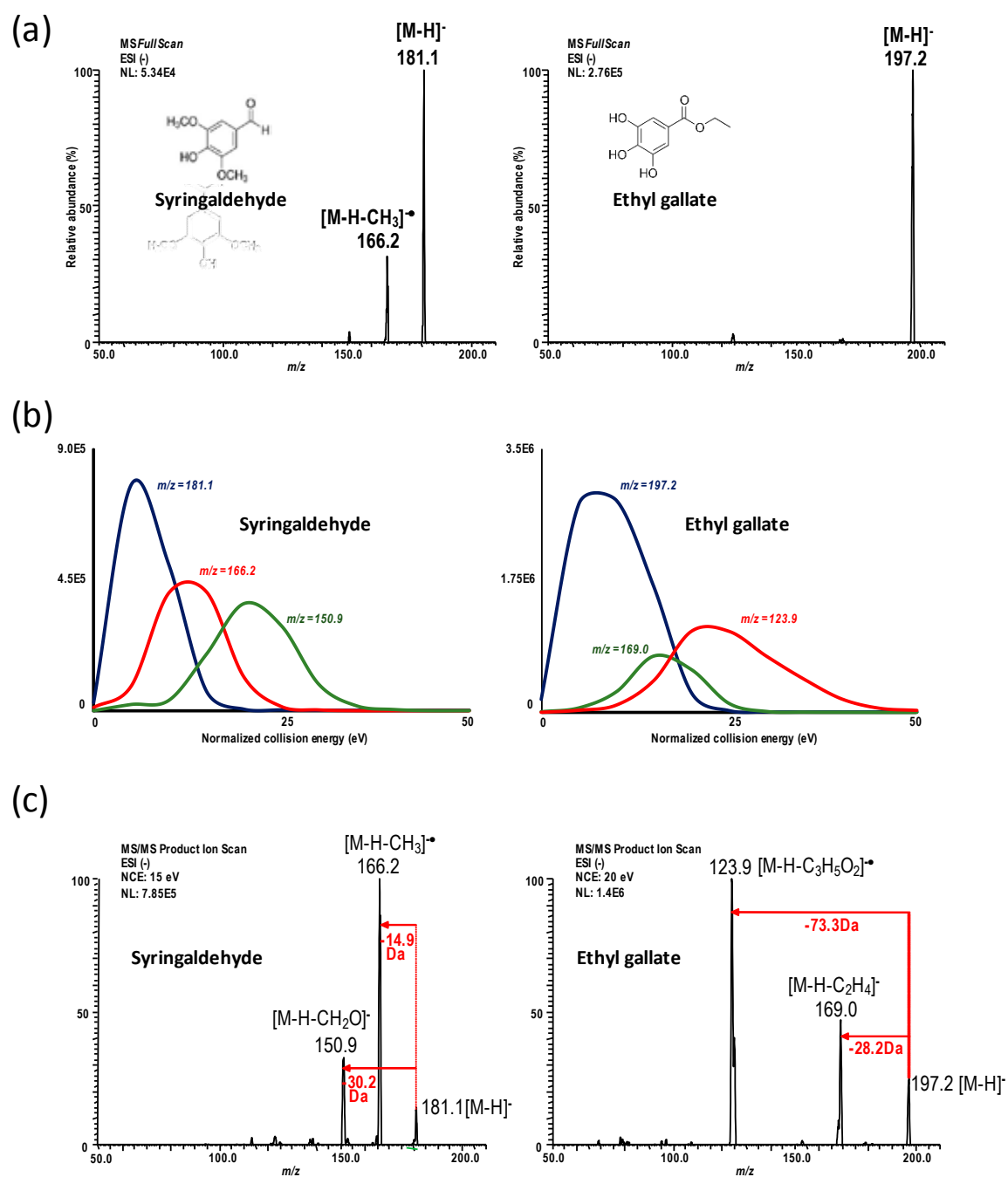
17	(-)-Epigallocatechin gallate	Flavonoid		989-51-5	Sigma-Aldrich
18	Syringaldehyde	Phenolic aldehyde		134-96-3	Sigma-Aldrich
19	Umbelliferon	Other phenolics		93-35-6	Sigma-Aldrich
20	Procyanidin C1	Flavonoid		37064-30-5	Fluka
21	Veratric acid	Phenolic acid		93-07-2	Fluka
22	Ferulic acid	Phenolic acid		1135-24-6	Fluka
23	Sinapic acid	Phenolic acid		530-59-6	Sigma-Aldrich
24	Polydatin	Estilben		65914-17-2	Sigma-Aldrich
25	Rutin	Flavonoid		207671-50-9	Sigma-Aldrich
26	Procyanidin A2	Flavonoid		41743-41-3	Fluka
27	Nepetin-7-glucoside	Flavonoid		569-90-4	PhytoLab
28	Hesperidin	Flavonoid		520-26-3	Sigma-Aldrich
29	Homoplantagin	Flavonoid		17680-84-1	PhytoLab
30	Fisetin	Flavonoid		345909-34-4	Sigma-Aldrich
31	Rosmarinic acid	Phenolic acid		2083-92-5	Sigma-Aldrich
32	Morin	Flavonoid		654055-01-3	Sigma-Aldrich

33	Quercetin	Flavonoid		6151-25-3	Riedel-de-Haën
34	Kaempferol	Flavonoid		520-18-3	Sigma-Aldrich
35	Asiatic acid	Phenolic acid		464-92-6	Sigma-Aldrich
36	Betulinic acid	Phenolic acid		472-15-1	Sigma-Aldrich

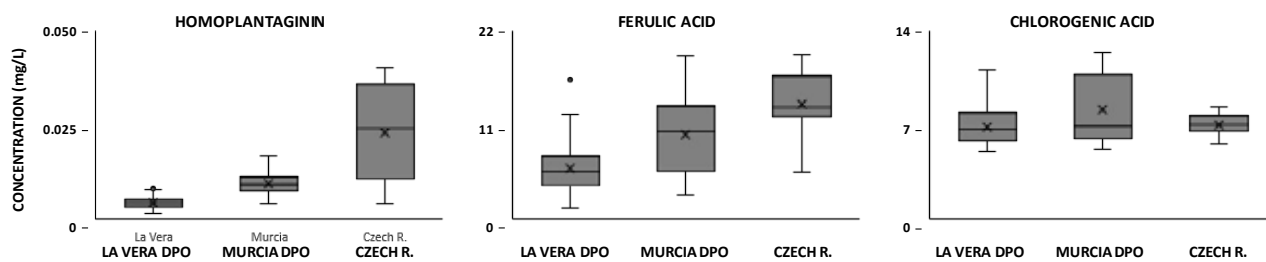
Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA); Fluka (Steinheim, Germany); HWI Analytic GMBH (Rülzheim, Germany); PhytoLab (Vestenbergsgreuth, Germany); Riedel-de-Haën (Seelze, Germany)

**Table S2. Quality indicators for the calibration and prediction of the proposed PLS-DA model when dealing with the classification of paprika samples regarding the production region.**

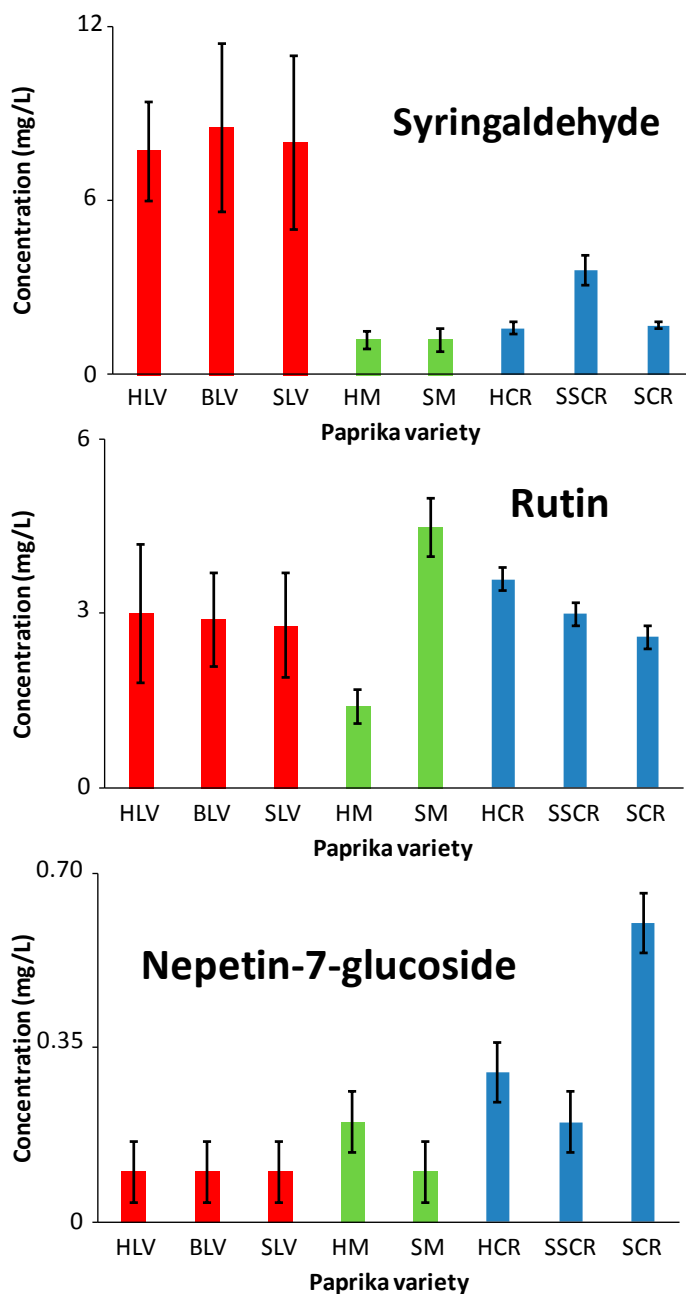
	Calibration model		
	La Vera PDO	Murcia PDO	Czech Republic
Calibration sensitivity	1	1	1
Calibration specificity	1	1	1
Calibration R <sup>2</sup>	0.907	0.786	0.892
RSMEC	0.145	0.190	0.113
Calibration Bias	-4·10 <sup>-16</sup>	-3·10 <sup>-17</sup>	0
	Prediction model		
	La Vera PDO	Murcia PDO	Czech Republic
Prediction sensitivity	1	1	1
Prediction specificity	1	1	1
Prediction R <sup>2</sup>	0.883	0.788	0.890
RMSEP	0.185	0.207	0.185
Prediction Bias	0.015	-0.082	0.067



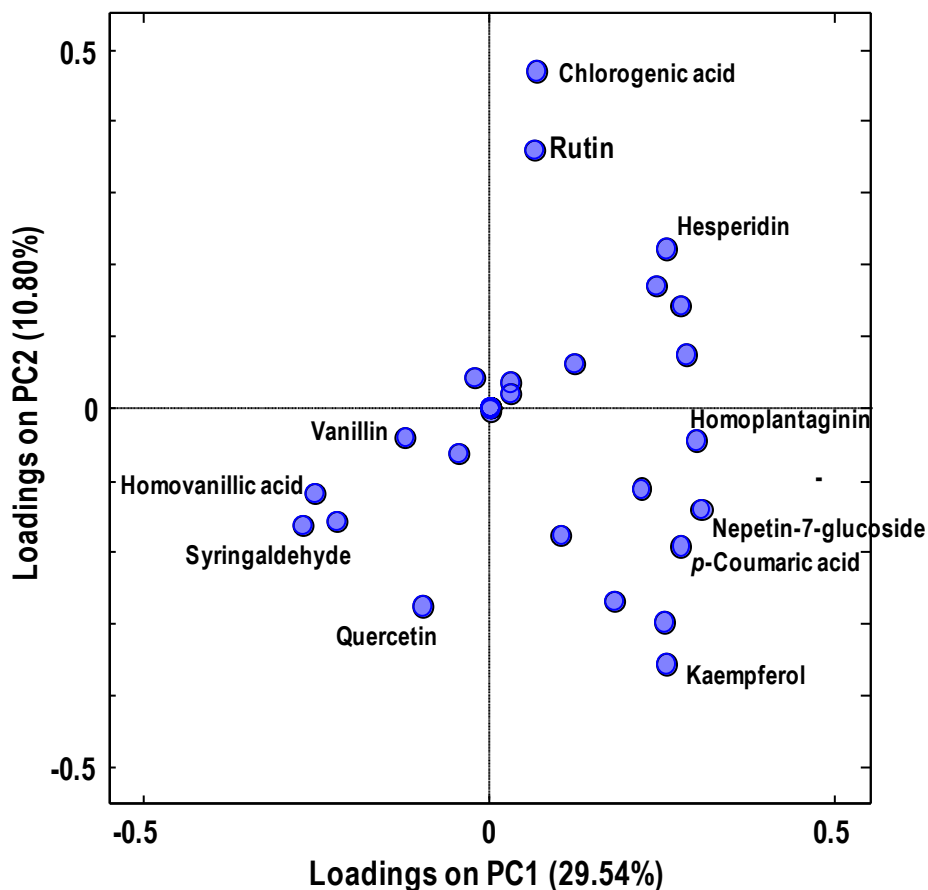
**Figure S1.** (a) MS full scan spectra, (b) collision energy curves, and (c) MS/MS product ion scan spectra for Syringaldehyde and Ethyl gallate.



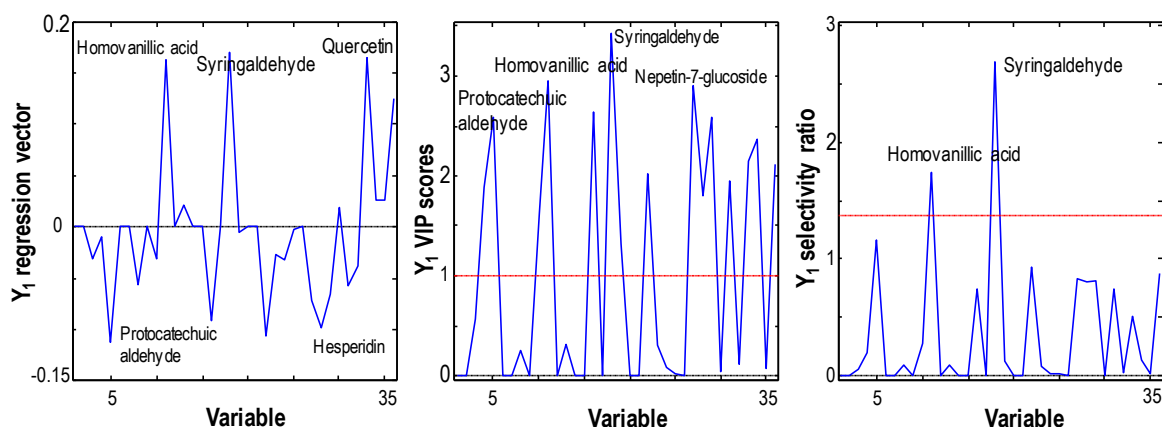
**Figure S2.** Boxplots with whiskers representing the concentration of selected compounds in the set of La Vera, Murcia and Czech Republic samples. From the left to the right: homoplantagin, ferulic acid and chlorogenic acid.



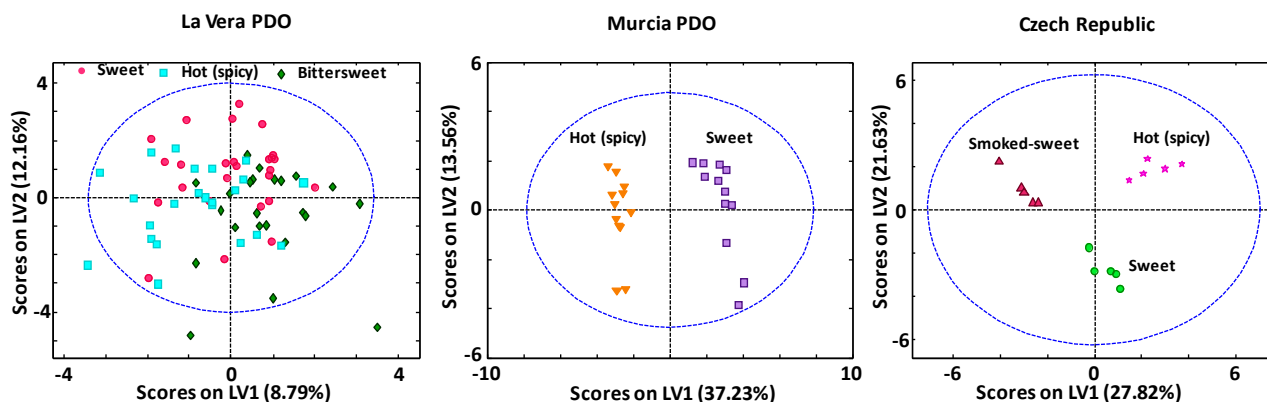
**Figure S3.** Bar plots showing concentration levels found in the analyzed paprika samples for syringaldehyde, rutin and nepetin-7-glucoside. HLV: hot (spicy) La Vera PDO; BLV: Bittersweet La Vera PDO; SLV: Sweet La Vera PDO; HM: Hot (spicy) Murcia PDO; SM: Sweet Murcia PDO; HCR: Hot (spicy) Czech Republic; SSCR: Smoked-sweet Czech Republic; SCR: Sweet Czech Republic.



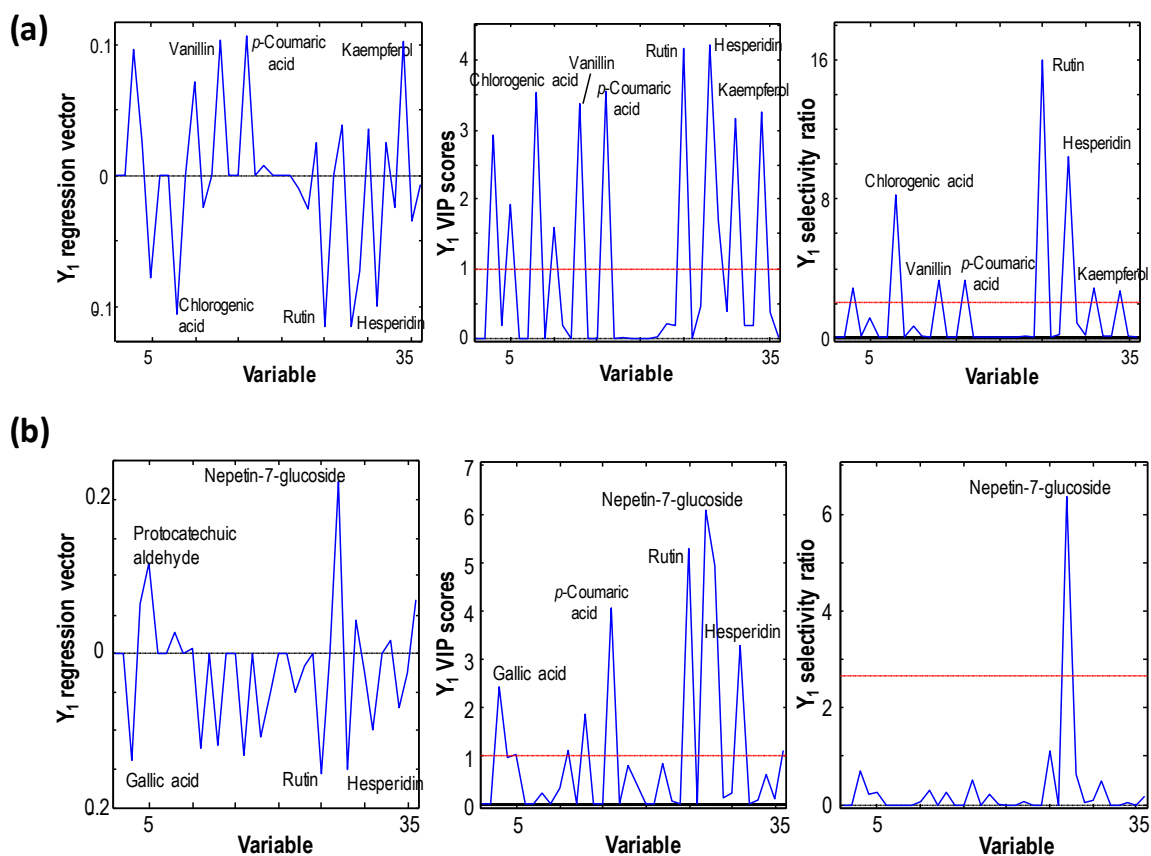
**Figure S4.** PCA loadings plot of PC1 vs PC2 when using the 36 compound concentrations found in the analysed paprika samples as chemical descriptors.



**Figure S5.** Plots of La Vera PDO class qualitative parameters (regression vector, the variable importance in projection (VIP) and the selectivity ratio) for the PLS-DA model obtained for the classification of paprika samples according to the production region (La Vera PDO, Murcia PDO and Czech Republic).



**Figure S6.** PLS-DA score plots of LV1 vs LV2 when using the 36 compound concentrations as chemical descriptors for the classification of each production regions (La Vera PDO, Murcia PDO and Czech Republic samples) according to their different flavor varieties.



**Figure S7.** Plots of a) hot Murcia PDO and b) sweet Czech Republic paprika qualitative parameters (regression vector, the variable importance in projection (VIP) and the selectivity ratio) for the PLS-DA models obtained for the classification according to the different flavor varieties.







#### **3.4.2. Publicación V: Artículo científico**

*Targeted UHPLC-HRMS (Orbitrap) Polyphenolic and Capsaicinoid Profiling for the Chemometric Characterization and Classification of Paprika with Protected Designation of Origin (PDO) Attributes.*

S. Barbosa; J. Saurina; L. Puignou; O. Núñez  
*Molecules*, 2020, vol. 25, 1623.



Article

# Targeted UHPLC–HRMS (Orbitrap) Polyphenolic and Capsaicinoid Profiling for the Chemometric Characterization and Classification of Paprika with Protected Designation of Origin (PDO) Attributes

Sergio Barbosa <sup>1</sup>, Javier Saurina <sup>1,2</sup> , Lluís Puignou <sup>1,2</sup> and Oscar Núñez <sup>1,2,3,\*</sup> 

<sup>1</sup> Department of Chemical Engineering and Analytical Chemistry, University of Barcelona, E08028 Barcelona, Spain; sergiobarbosabarbero@hotmail.com (S.B.); xavi.saurina@ub.edu (J.S.); lluis.puignou@ub.edu (L.P.)

<sup>2</sup> Research Institute in Food Nutrition and Food Safety, University of Barcelona, E08921 Barcelona, Spain

<sup>3</sup> Serra Húnter Fellow, Generalitat de Catalunya, E08007 Barcelona, Spain

\* Correspondence: oscar.nunez@ub.edu; Tel.: +34-93-403-3706

Received: 28 February 2020; Accepted: 30 March 2020; Published: 1 April 2020



**Abstract:** Society's interest in the quality of food products with certain attributes has increased, the attribute of a Protected Designation of Origin (PDO) being an effective tool to guarantee the quality and geographical origin of a given food product. In Spain, two paprika production areas with PDO (La Vera and Murcia) are recognized. In the present work, targeted UHPLC–HRMS polyphenolic and capsaicinoid profiling through the TraceFinder™ screening software, using homemade accurate mass databases, was proposed as a source of chemical descriptors, to address the characterization, classification, and authentication of paprika. A total of 126 paprika samples from different production regions—Spain (La Vera PDO and Murcia PDO) and the Czech Republic, each including different flavor varieties, were analyzed. UHPLC–HRMS polyphenolic profiles showed to be good chemical descriptors to achieve paprika classification and authentication, based on the production region, through principal component analysis and partial least squares regression-discriminant analysis, with classification rates of 82%, 86%, and 100% for La Vera PDO, Murcia PDO, and the Czech Republic, respectively. In addition, a perfect classification was also accomplished among the flavor varieties for the Murcia PDO and Czech Republic samples. By employing the UHPLC–HRMS polyphenolic and capsaicinoid profiles as chemical descriptors, acceptable discrimination among La Vera PDO flavor varieties was also achieved.

**Keywords:** targeted analysis; UHPLC; high-resolution mass spectrometry; paprika; protected designation of origin (PDO); polyphenols; capsaicinoids; food authentication; chemometrics

## 1. Introduction

Paprika is a red powder spice with a very characteristic flavor obtained after the drying and grinding of certain varieties of red peppers of the genus *Capsicum*, which belongs to the Solanaceae family [1]. Within this genus, there are approximately 39 species, such as *C. annuum*, *C. chinense*, *C. baccatum*, *C. frutescens*, and *C. pubescens*, grown in different parts of the world, including wild, semi-domestic, and domestic ones; *Capsicum annuum* is the most common among these [1,2]. Paprika spice is commonly used to add flavor and color to many foods, such as baked goods, beverages, meat, soups, ice creams, candies, and seasoning mixes, but other applications in medicine, cosmetics, personal protection sprays, or even as adsorbents for the removal of contaminants, are reported [3–6].

Nowadays, food manufacturers, as well as the general public, are increasingly concerned about the quality of food with certain attributes, and as a consequence, the demand for food products of a

specific geographical origin has increased. Within this context, the attribute of a Protected Designation of Origin (PDO) is an effective tool to guarantee the quality and geographical origin of a given food product. According to the European Union Council Regulation (EC) No. 510/2006 [7], PDO establishes the name of a region, of a specific place or, in exceptional cases, of a country that is used to designate an agricultural product or a food product; which must originate from an established region, a specific place, or a country; whose quality or characteristics are fundamentally or exclusively a result of the geographical environment, including its natural and human factors; and whose production, transformation, and elaboration are carried out in the defined geographical area.

In Spain, there are two paprika production areas with PDO attributes recognized by the European Union—the region of La Vera in Cáceres (Extremadura) and the region of Murcia [8–10]. Despite having a common origin and an almost parallel development, the production process is different in each of these areas [11]. In both cases, the product is the result of the drying and grinding of pepper fruits from the *Capsicum* genus, but the drying process and the fruit varieties change, which also provides specific organoleptic characteristics. Thereby, the red peppers used for the production of “Pimentón de la Vera” belong to the varieties of Ocales (Jaranda, Jariza, and Jeromín) and Bola. Three different flavor varieties are produced, depending on the type of red peppers employed—sweet, spicy, and bittersweet paprika. Additionally, La Vera paprika is characterized by its smoky aroma and taste achieved during the drying process using smoke produced with oak or holm oak wood. In contrast, pepper fruits used for the Murcia PDO paprika belong mainly to the Bola variety, which is sweet and lightweight, and is dried under the sun.

Paprika is characterized by containing a large number of bioactive compounds with great beneficial health properties, such as carotenoids (provitamins), ascorbic acid (vitamin C), tocopherols (vitamin E), capsaicinoids, and phenolic compounds [12]. Among them, the importance of polyphenolic and phenolic compounds that are widely distributed in plants is worth noting, many of which are essential metabolites that contribute to the sensory properties associated with the quality of foods, such as color and aroma [13]. These compounds have a strong antioxidant activity and have shown potential health benefits, such as vascular protection, antihepatotoxic, antiallergic, antiproliferative, antiosteoporotic, anti-inflammatory, antitumor, antidiabetic, antiobesity, etc. [13–18]. Previous studies have reported that the main phenolic compounds found in paprika are vanillic, caffeic, ferulic, *p*-coumaric, and *p*-hydroxybenzoic acids [18]. The presence of capsaicinoids is also very characteristic in paprika samples and is responsible for their pungency flavor [19–22]. In general, the pungency of the *Capsicum* species depends on the concentration of capsaicinoids, particularly capsaicin, in the pepper fruit. Usually, sweet paprika has very low capsaicinoid contents and their level increases in the spicy paprika.

At present, there are several methods for the determination of polyphenolic and phenolic compounds, such as global assays for the evaluation of the total content by colorimetric or fluorimetric methods, or more specific ones, based on separation by capillary electrophoresis, liquid chromatography, and gas chromatography. However, liquid chromatography with UV or electrochemical detection, or that coupled with mass spectrometry is nowadays the technique of choice [17,23–32]. However, the great chemical diversity among this family of compounds and the range of concentrations in which they can be found make liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS) the most effective technique. Among these, time-of-flight (TOF) and Orbitrap analyzers are the most frequently employed for the characterization, identification, and determination of polyphenolic and phenolic compounds in food, including paprika products [25,27,31]. Liquid chromatography with UV and mass spectrometric detection are also typically employed in the determination of capsaicinoid compounds in pepper and pepper-processed products [14,33–39].

It is worth noting that the content of paprika bioactive substances, such as polyphenols and capsaicinoids might differ due to multiple parameters, such as the pepper variety, the climate conditions, growing areas, water resources, ripening stage, agronomy conditions, pre- and postharvest treatments, etc. [13]. As a result, polyphenolic and capsaicinoid distribution and content profiling in a food product might be proposed as a source of analytical data to establish sample classification and

authentication, for both the correct assignment of the product PDO attributes and the prevention of fraud practices through product adulteration. Paprika is a worldwide consumed spice so its adulteration might offer high economic benefits. Within this context, the substitution of ingredients, the addition of (illegal) substances and false declaration of origin are important and challenging issues to the authorities and the food industry. Both targeted and non-targeted (fingerprinting) methodologies—some in combination with multivariate chemometric methods such as principal component analysis (PCA) and partial least squares regression-discriminant analysis (PLS-DA) have been proposed to address paprika classification and authentication issues [13,29,39–46]. As an example, we recently proposed a UHPLC-MS/MS method, using a triple quadrupole instrument for the determination of 36 polyphenols and phenolic compounds in paprika samples, which was applied to PDO authentication by PCA and PLS-DA [28]. Although in general a good sample discrimination regarding the production region was observed, the targeted monitoring of these 36 compounds was not good enough to achieve the discrimination of La Vera Paprika samples as a function of the flavor variety (sweet, bittersweet, and spicy).

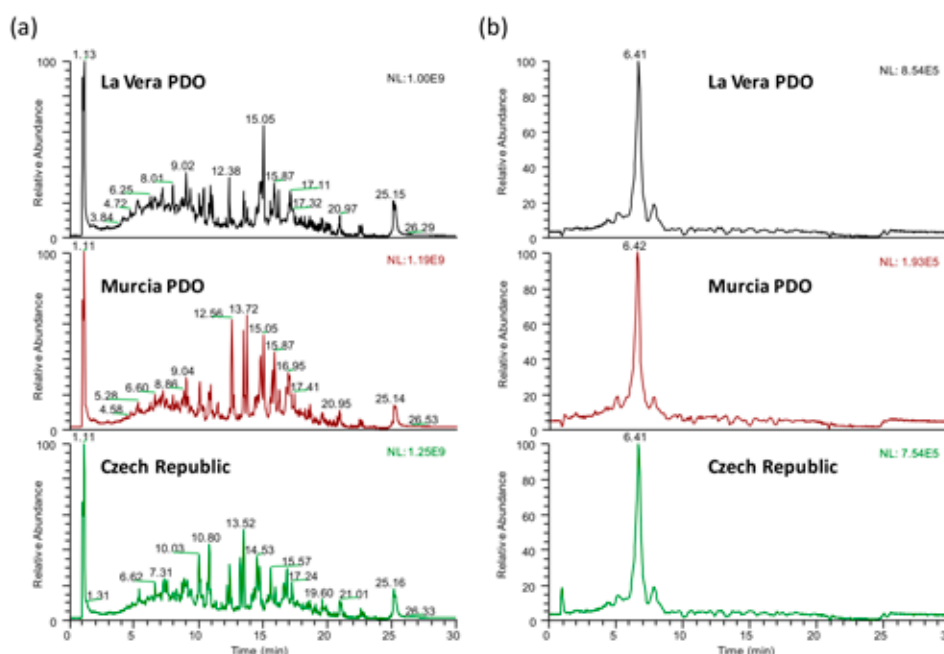
This work aims for the application of a targeted-UHPLC-HRMS method using an Orbitrap analyzer for polyphenolic and capsaicinoid profiling, and the use of the obtained profiles as sample chemical descriptors, to address the classification and authentication of paprika samples as a function of both production regions and flavor varieties. For this purpose, a total of 126 paprika samples belonging to La Vera PDO, Murcia PDO (Spain), and the Czech Republic were analyzed through the proposed methodology, after applying a simple sample extraction procedure utilizing water:acetonitrile 20:80 (*v/v*) as an extractant agent. As a first approach, 53 polyphenols and phenolic compounds were monitored using the TraceFinder™ software v3.3 (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA), employing a previously established accurate mass database [27], and the obtained peak signal profiles were used as sample chemical descriptors for PCA and PLS-DA. Then, to improve sample classification, especially for the La Vera paprika samples, capsaicinoid profiling by monitoring 12 compounds was also employed as sample chemical descriptors, together with the polyphenolic and phenolic acid profiles, for PCA and PLS-DA.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Targeted UHPLC–HRMS Polyphenolic Profiling

As previously commented, the present work aimed to develop a targeted-UHPLC-HRMS profiling method to obtain discriminant paprika chemical descriptors that able to address sample classification regarding both the paprika production region (and PDO) and the paprika flavor variety. For this purpose, the paprika samples were analyzed through reversed-phase chromatography using a C18 column under universal gradient elution, with water and acetonitrile (both with 0.1% formic acid) as the mobile phase components, after a simple sample extraction with water:acetonitrile 20:80 (*v/v*), as previously reported [28,29,46]. As an example, Figure 1 shows the UHPLC–HRMS total ion chromatograms and the selected ion chromatogram for the ferulic acid (*m/z* 193.0506) of three selected sweet paprika samples belonging to different production regions (La Vera PDO, Murcia PDO, and the Czech Republic). As can be seen, remarkable differences in both signal profile and relative abundances are obtained, depending on the origin of the samples. As a first approach, chromatographic sample raw data was then processed with the TraceFinder™ software (Thermo Fisher Scientific) to obtain the corresponding targeted-UHPLC-HRMS polyphenolic profiles, by using an accurate mass database of 53 polyphenols and phenolic compounds that were previously characterized [27]. A threshold signal of  $1.0 \times 10^5$  was established in the screening software to consider a positive match for a given polyphenolic compound in the analyzed samples. In addition, compound confirmation was only granted if all the above-mentioned confirmation criteria (retention time, accurate mass measurement errors lower than 5 ppm, isotopic pattern agreement higher than 85%, and product ion spectra) were accomplished. After raw data processing with the TraceFinder™ screening software (Thermo Fisher

Scientific), a report was provided for each analyzed sample, depicting the peak areas of all polyphenolic compounds detected and confirmed (as an example, Table 1 shows the TraceFinder™ (Thermo Fisher Scientific) report obtained for the La Vera PDO sweet paprika sample). UHPLC-HRMS polyphenolic profiles consisting of the peak areas extracted by the TraceFinder™ software (Thermo Fisher Scientific) in the analyzed paprika and quality control (QC) samples were then obtained.



**Figure 1.** Ultra-high performance liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS) total ion chromatograms (a) and the extracted ion chromatograms for ferulic acid ( $m/z$  193.0506) (b) of the three selected sweet La Vera Protected Designation of Origin (PDO), Murcia PDO, and Czech Republic paprika samples.

**Table 1.** TraceFinder™ polyphenolic profiling report obtained for a sweet La Vera PDO paprika.

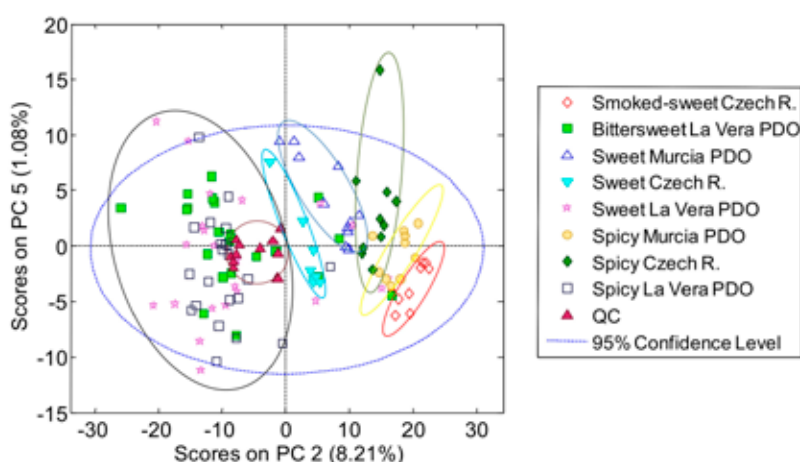
Target Name	+/-	Area	Formula	Expected $m/z$	Measured $m/z$	Delta $m/z$	Isotopic Pattern Score (%)
D-(-)-Quinic acid	-	$7.19 \times 10^8$	C7H12O6	191.0561	191.0558	-1.72	100
Ethyl gallate	-	$5.99 \times 10^6$	C9H10O5	197.0455	197.0452	-1.39	100
Polydatin	-	$4.15 \times 10^7$	C20H22O8	389.1242	389.1254	3.02	89
Syringic acid	-	$5.99 \times 10^6$	C9H10O5	197.0455	197.0452	-1.39	100
Gallic acid	-	$2.35 \times 10^7$	C7H6O5	169.0142	169.0137	-2.85	95
Arbutin	-	$1.58 \times 10^8$	C12H16O7	271.0823	271.0817	-2.23	100
3,4-Dihydroxybenzaldehyde	-	$7.75 \times 10^7$	C7H6O3	137.0244	137.0239	-3.68	80
4-Hydroxybenzoic acid	-	$7.75 \times 10^7$	C7H6O3	137.0244	137.0239	-3.68	80
Chlorogenic acid	-	$3.91 \times 10^7$	C16H18O9	353.0878	353.0870	-2.16	100
<i>p</i> -coumaric acid	-	$4.52 \times 10^7$	C9H8O3	163.0401	163.0395	-3.74	87
Caffeic acid	-	$7.57 \times 10^7$	C9H8O4	179.0350	179.0346	-2.28	100
Homovanillic acid	-	$4.39 \times 10^8$	C9H10O4	181.0506	181.0504	-1.36	100
Syringaldehyde	-	$4.39 \times 10^8$	C9H10O4	181.0506	181.0504	-1.36	100
Veratric acid	-	$4.39 \times 10^8$	C9H10O4	181.0506	181.0504	-1.36	100
Homogentisic acid	-	$3.73 \times 10^7$	C8H8O4	167.0350	167.0345	-2.87	94
Vanillic acid	-	$3.73 \times 10^7$	C8H8O4	167.0350	167.0345	-2.99	94
Trans-Cinnamic acid	-	$1.79 \times 10^7$	C9H8O2	147.0452	147.0446	-3.86	100
Umbelliferon	-	$1.17 \times 10^7$	C9H6O3	161.0244	161.0241	-1.90	99
Ferulic acid	-	$4.52 \times 10^7$	C10H10O4	193.0506	193.0504	-1.27	100
Rutin	-	$4.86 \times 10^7$	C27H30O16	609.1461	609.1454	-1.17	100

Table 1. Cont.

Target Name	+/-	Area	Formula	Expected <i>m/z</i>	Measured <i>m/z</i>	Delta <i>m/z</i>	Isotopic Pattern Score (%)
Taxifolin	–	$2.01 \times 10^6$	C15H12O7	303.0510	303.0505	–1.83	100
(+)-catechin	–	$9.48 \times 10^5$	C15H14O6	289.0718	289.0713	–1.63	91
Quercitrin hydrate	–	$1.19 \times 10^9$	C21H20O11	447.0933	447.0924	–2.07	100
Homoplantagin	–	$2.71 \times 10^7$	C22H22O11	461.1089	461.1081	–1.75	91
Fisetin	–	$1.41 \times 10^8$	C15H10O6	285.0405	285.0397	–2.55	100
Quercetin	–	$1.60 \times 10^7$	C15H10O7	301.0354	301.0346	–2.74	90
Resveratrol	–	$3.49 \times 10^6$	C14H12O3	227.0714	227.0705	–3.92	89
Rosmanol	–	$5.66 \times 10^6$	C20H26O5	345.1707	345.1700	–2.17	100
Asiatic acid	–	$2.59 \times 10^6$	C30H48O5	487.3429	487.3419	–2.08	100
Cirsimaritin	–	$1.95 \times 10^6$	C17H14O6	313.0718	313.0710	–2.51	91
Carnosol	–	$5.15 \times 10^6$	C20H26O4	329.1758	329.1750	–2.37	86
Carnosic acid	–	$2.41 \times 10^6$	C20H28O4	331.1915	331.1909	–1.85	100
Ursolic acid	–	$6.52 \times 10^5$	C30H46O3	453.3374	453.3362	–2.55	100

## 2.2. Sample Exploration by PCA

A data matrix containing the peak areas of the UHPLC-HRMS polyphenolic profiles of all analyzed paprika and QC samples was built to the non-supervised PCA exploration. The dimension of this data matrix was 140 samples and QCs  $\times$  53 variables. Data were normalized for each compound with respect to the overall analyte signal, to provide similar weights to all samples. Figure 2 depicts the best PCA score plot (PC2 vs. PC5) obtained. A total of 5 PCs were required for the construction of the PCA model.

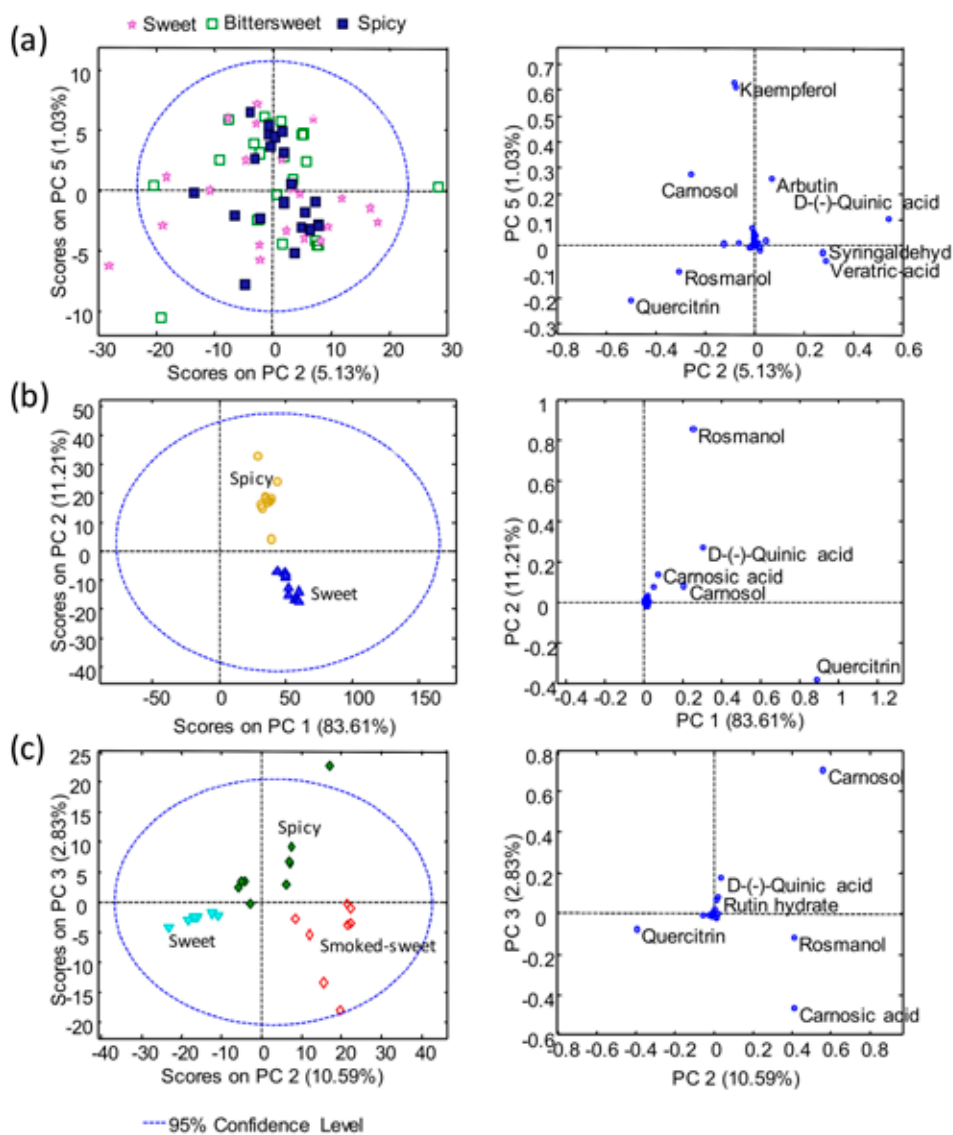


**Figure 2.** Principal component analysis (PCA) score plot of PC2 vs. PC5 when using the UHPLC-HRMS polyphenolic profiles as paprika sample chemical descriptors.

As can be seen in Figure 2, the QCs appeared grouped, showing a good performance of the proposed methodology and the robustness of the obtained PCA chemometric results. QCs were also grouped close to the center area of the plot, although within the region where the La Vera paprika samples were clustered, as the QCs were enriched on the La Vera paprika sample attributes and this was the group with the largest number of samples. Regarding paprika sample distribution, almost all La Vera PDO samples had negative scores on PC2 (being located at the left part of the plot), although no discrimination among flavor varieties (sweet, bittersweet, and spicy) was observed. In contrast, the Murcia PDO and the Czech Republic paprika samples had positive PC2 scores (all of them located in the right area of the score plot). In addition, the samples were more or less distinguished in terms of both the production region and the flavor varieties. The sweet Czech Republic samples were closest to

the La Vera samples, followed by the sweet Murcia PDO, spicy Czech Republic, spicy Murcia PDO, and finally the smoked-sweet Czech Republic samples, as the PC2 scores increased.

PCA models for each paprika production region were also independently evaluated, to study the distribution of samples according to each paprika flavor varieties, and the best score and loading plots obtained are depicted in Figure 3.



**Figure 3.** Principal component analysis (PCA) score and loading plots for (a) the La Vera PDO paprika samples, (b) the Murcia PDO paprika samples, and (c) the Czech Republic paprika samples.

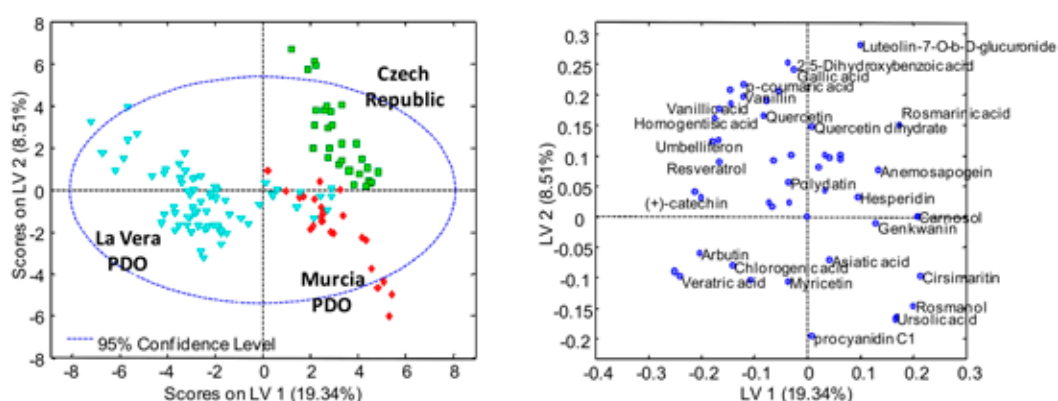
These models enhanced the fact that no discrimination was accomplished among the La Vera paprika samples, regarding their three different flavor varieties (sweet, bittersweet, and spicy), when using the UHPLC-HRMS polyphenolic profiling of the 53 studied compounds, as chemical descriptors for PCA (Figure 3a). In contrast, as expected, the flavor varieties were perfectly discriminated for both Murcia PDO and Czech Republic paprika samples. In the case of the Murcia PDO samples (Figure 3b), the spicy ones were located at the top of the PCA plot, with rosmanol being the most discriminant compound for this group of samples. Whereas, quercitrin was the most discriminant compound for the sweet flavor variety, which were clustered at the plot, exhibiting negative PC2 scores. For the Czech Republic samples, both PC2 and PC3 allowed a perfect separation of the three different flavor varieties



under study. The three groups were mainly separated by PC2, with the sweet samples exhibiting negative scores, the spicy samples being located in the middle, and the smoked-sweet samples showing positive PC2 scores. PC3 was related to the spicy attribute, being the only group exhibiting clearly positive PC3 score values. Regarding the polyphenolic compounds employed to achieve this sample discrimination, it seemed that quercitrin contributed to the sweet flavor variety, while carnosol and carnosic acid were clearly responsible for the discrimination of the spicy and smoked-sweet flavor varieties, respectively. It is well-known that the type of polyphenols and their content in plant products depends on multiple factors, such as the climatic conditions of the production region. One possible reason why the polyphenols analyzed in this work did not allow a discrimination between the different varieties of paprika from La Vera PDO was due to the fact that it is a very small region, with only 1282 hectares of production, compared to Murcia, for example, with more than 220,000 hectares of production, which meant that the climatic conditions in the La Vera region were very similar in the production of its three flavor varieties.

### 2.3. Sample Classification by PLS-DA

A supervised classificatory chemometric analysis of the paprika samples was done by employing PLS-DA. Thus, while the X-data matrix was similar to that used in the PCA without the QCs, the Y-data matrix indicated the membership of each paprika sample. A total of 4 LVs were required for the construction of the PLS-DA model. Figure 4 shows the PLS-DA score and the loading plots obtained when the UHPLC-HRMS polyphenolic profiles were used as chemical descriptors, to address the classification of the paprika samples through the PDO and production region. As can be seen, a good sample classification was obtained, with the La Vera PDO samples being located on the left-side of the plot, while the Murcia PDO and the Czech Republic samples were located on the right. These last two groups of samples were mainly discriminated by LV2, with the Murcia PDO samples displaying negative values of LV2, while the Czech Republic samples showed positive values. It should be mentioned that several La Vera PDO and Murcia PDO samples were mixed, although the Spanish paprika samples were completely discriminated from those produced in the Czech Republic. The proposed UHPLC-HRMS polyphenolic profiling method of monitoring 53 polyphenolic and phenolic acids seemed to be appropriate to address paprika classification and authentication, according to their PDO and production region.



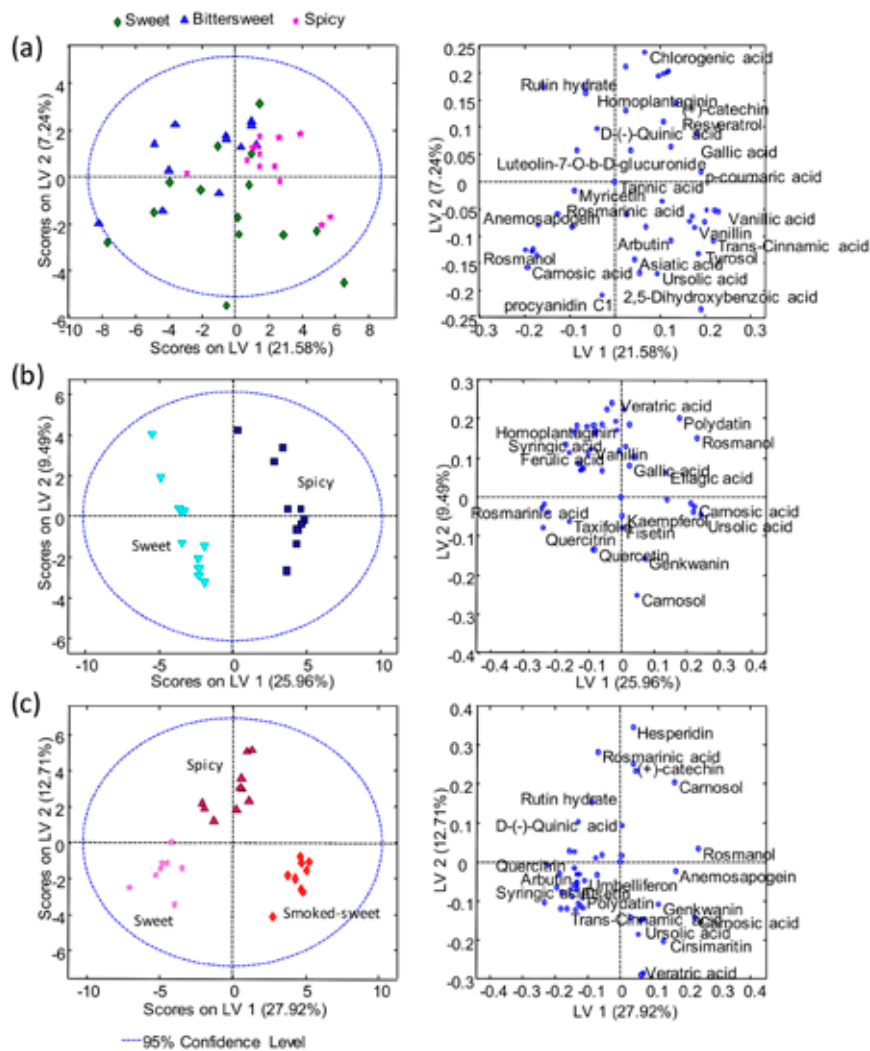
**Figure 4.** Partial least squares regression-discriminant analysis (PLS-DA) score and the loading plots of LV1 vs. LV2 for the classification of the analyzed paprika samples, according to their PDO and production region.

The study of the PLS-DA loading plot allowed several phenolic and polyphenolic compounds to be identified, such as vanillic acid, homogentisic acid, umbelliferon, resveratrol, (+)-catechin, arbutin, chlorogenic acid, and veratric acid, which contributed to the separation of the La Vera PDO

paprika samples from the other paprikas. Ursolic acid, rosmanol, and cirsimaritin seemed to be the most discriminant variables for the classification of the Murcia PDO samples, while the presence of luteolin-7-O- $\beta$ -D-glucuronide, 2,5-dihydroxybenzoic acid, gallic acid, and rosmarinic acid seemed to be enhanced in the Czech Republic samples.

A 3D PLS-DA model was also built to classify the analyzed samples, according to both production region and flavor variety; the obtained results are shown in Figure S1 (Supplementary Materials). This model showed that the discrimination of the three paprika production regions was fully accomplished and was able to observe a perfect separation of both Murcia PDO and La Vera PDO groups, in comparison to the plot in Figure 4. In addition, a perfect discrimination was also achieved for the different flavor varieties of both the Murcia PDO and the Czech Republic samples. In contrast, no separation was observed for the three La Vera PDO paprika flavor varieties.

PLS-DA models for each paprika production region were also independently evaluated, to study the distribution of samples according to each paprika flavor varieties, and the best score and loadings plots obtained are depicted in Figure 5.



**Figure 5.** Partial least squares regression-discriminant analysis (PLS-DA) score and loading plots for (a) La Vera PDO paprika samples, (b) Murcia PDO paprika samples, and (c) the Czech Republic paprika samples.

With regards to the La Vera PDO paprika samples, the PLS-DA results were slightly better than the ones obtained by PCA, as expected when using a classificatory chemometric method. Although not

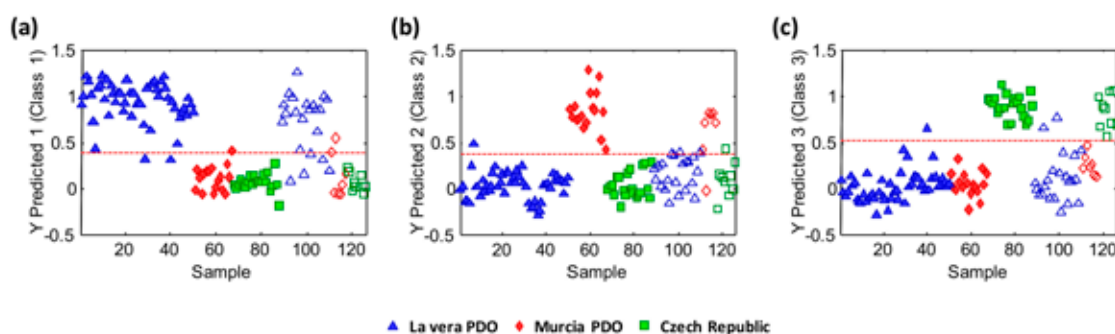
perfectly separated, a tendency in the distribution of the three flavor varieties was observed. The sweet variety tended to be distributed at the bottom of the plot, exhibiting negative LV2 values, while the bittersweet and spicy flavors tended to be distributed to the top-left and the top-right areas of the plot, respectively. Considering the loadings plot (Figure 5a), procyanidin C1, 2,5-dihydroxybenzoic, and carnosic and ursolic acids seemed to be the most discriminant compounds for the sweet La Vera PDO samples; resveratrol, gallic acid, and *p*-coumaric acid were the most discriminant for the spicy La Vera PDO samples; and rutin hydrate and luteolin-7-O- $\beta$ -D-glucuronide were the compounds that were more discriminant for the bittersweet La Vera PDO samples. In relation to the other two groups of paprika samples, sample classification by PLS-DA according to the flavor varieties was perfectly accomplished. Polydatin, rosmanol, ellagic acid, carnosic acid, ursolic acid, genkwanin, and carnosol were among the polyphenolic and phenolic compounds responsible for the discrimination of Murcia PDO spicy paprika (Figure 5b). While rosmarinic acid, quercitrin, homoplantagin, syringic acid, and ferulic acid were the ones responsible for the discrimination of the Murcia PDO sweet variety. In the case of the Czech Republic samples, hesperidin, rosmarinic acid, (+)-catechin, rutin, and carnosol explained the discrimination of the spicy variety; ursolic acid, cirsimaritin, carnosic acid, and veratric acid were among the polyphenolic compounds allowing the discrimination of the smoked-sweet variety; and finally, arbutin, syringic acid, and trans-cinnamic acid were among the ones allowing for the discrimination of the sweet variety.

Up to this point, it seemed that the proposed UHPLC-HRMS polyphenolic profiling was a good method to obtain discriminant sample chemical descriptors to address the classification of the analyzed paprika samples as a function of the PDO and production region, and also that of the flavor variety, with the exception of the La Vera PDO samples where only a tendency was observed.

#### 2.4. Supervised PLS-DA Method Validation

To demonstrate the applicability of the proposed methodology based on the UHPLC-HRMS polyphenolic profiling, the classification rate was studied for some paired PLS-DA models: (i) La Vera PDO vs. the other samples, (ii) Murcia PDO vs. the other samples, and (iii) the Czech Republic vs. the other samples. For this purpose, the PLS-DA model was built with a calibration set composed of 70% of the samples belonging to each class, while the other 30% of the samples were used as the test set for prediction purposes.

Figure 6 shows the classification plots obtained. The dashed line indicates the classification boundary, so the samples belonging to the targeted class were located at the top, while those belonging to the other types were located at the bottom. Samples to be used for calibration were on the left (with filled symbols) and those used for prediction were on the right side (with empty symbols).



**Figure 6.** Partial least squares regression-discriminant analysis (PLS-DA) classification plots according to the production region. (a) La Vera PDO vs. other classes; (b) Murcia PDO vs. other classes; (c) the Czech Republic vs. other classes. Sample assignment: triangle = La Vera, rhombus = Murcia, and square = Czech Republic. Filled symbols = calibration set, empty symbols = validation/prediction set. The dashed line means the classification boundary.

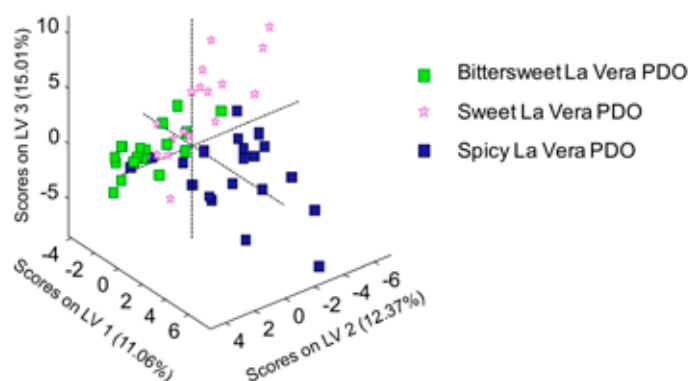
As can be seen, acceptable classification results were obtained. When targeting the La Vera PDO samples vs. all the other samples (Figure 6a), 82% of the samples were correctly predicted (only 4 samples of the 22 randomly selected for prediction were not correctly classified as belonging to the La Vera PDO samples). This was expected, as a complete discrimination between the La Vera PDO and the Murcia PDO was not fully achieved, as was described in Figure 4. Nevertheless, taking into account the type of samples and their variability, this classification rate could be considered to be very acceptable. The classification rates noticeably improved when addressing the classification of the Murcia PDO samples (Figure 6b) and the Czech Republic samples (Figure 6c), with respect to the other sample groups. Thus, only one Murcia PDO sample was not correctly classified out of the 7 samples that were randomly selected for prediction (classification rate of 86%), while all 9 Czech Republic samples were correctly classified (100% classification rate). The confusion matrix was [18, 2, 2; 1, 6, 0; 0, 0, 9] for La Vera PDO, Murcia PDO, and Czech Republic, respectively.

### 2.5. Targeted UHPLC-HRMS Polyphenolic and Capsaicinoid Profiling

As previously discussed, UHPLC-HRMS polyphenolic profiling resulted in good chemical descriptors to address the paprika sample classification and authentication regarding the paprika PDO and production region, and also according to the different flavor varieties commercialized, for both the Murcia PDO and Czech Republic paprika. However, only a slight tendency was achieved in the discrimination of the three La Vera PDO paprika varieties (Figure 5a). With the aim of improving this discrimination, the targeted profiling of other bioactive compounds that are typically present in paprika samples, such as capsaicinoids and capsinoids, was performed. For this purpose, twelve capsaicinoid and capsinoid compounds (Table S1) that are typically characteristic of spicy pepper were selected. As pure standards were not commercially available for all selected compounds, in the present work, the targeted screening for this family of chemicals was proposed based only on the HRMS spectra accurate mass measurements (Table S2), and with this information, a homemade accurate mass database was built using the TraceFinder™ software (Thermo Fisher Scientific).

Paprika UHPLC-HRMS raw data was then processed with the TraceFinder™ screening software (Thermo Fisher Scientific), with both polyphenolic and capsaicinoids accurate mass databases. Again, a threshold signal of  $1.0 \times 10^5$  was established in the screening software, to consider a positive match for a given targeted compound in the analyzed samples. Compound confirmation was only granted if all established confirmation criteria were established, i.e., accurate mass measurements lower than 5 ppm, and an isotopic pattern agreement higher than 85% for both profiled families of compounds. Retention times and product ion spectra agreement was also employed for the polyphenolic compounds, as characterization with commercially available standards was previously accomplished. UHPLC-HRMS polyphenolic and capsaicinoid profiles, consisting of peak areas extracted by the TraceFinder™ software (Thermo Fisher Scientific) in the analyzed paprika samples, were then obtained and subjected to PLS-DA.

Focusing only on the La Vera PDO paprika flavor varieties (sweet, bittersweet, and spicy), Figure 7 shows the 3D plot of the scores through PLS-DA (LV1 vs. LV2 vs. LV3), when the obtained UHPLC-HRMS polyphenolic and capsaicinoid profiles were employed as sample chemical descriptors to address the La Vera PDO paprika sample classification. As can be seen, the combination of both polyphenolic and capsaicinoid profiling, clearly improved the classification and discrimination of the three flavor varieties commercially available in the La Vera PDO. The spicy variety was clearly discriminated from the other two flavor varieties, exhibiting positive LV1 values, which was expected due to the high presence of capsaicinoid and capsinoid compounds in spicy paprika products. In addition, better sample discrimination was also observed between the sweet and bittersweet flavor varieties, based mainly on LV2.



**Figure 7.** 3D plot of scores of PLS-DA (LV1 vs. LV2 vs. LV3) when the UHPLC-HRMS polyphenolic and capsaicinoid profiles were employed as chemical descriptors for the La Vera PDO sample classification, according to the flavor variety.

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. Chemicals and Standard Solutions

Unless otherwise stated, all chemicals, standards, and reagents employed in this work were of analytical grade. Fifty-three polyphenolic and phenolic standards belonging to different families (phenolic acids, benzoic acids, cinnamic acids, phenolic aldehydes, phenolic terpenes, flavones, flavanols, proanthocyanidins, and stilbenes) characterized by HRMS in a previous work [27], were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

LC-MS grade water, methanol, acetonitrile, formic acid (98–100%), and acetone were also obtained from Sigma-Aldrich, and hydrochloric acid (37%) was obtained from Merck (Seelze, Germany).

Stock standard solutions of all compounds (~1000 mg/L) were prepared in methanol in amber glass vials. Intermediate working solutions were prepared weekly from these stock standard solutions through appropriate dilution with water. All stock solutions were kept in the refrigerator at 4 °C, for not more than 1 month.

#### 3.2. Instrumentation

Sample analyses were performed using a UHPLC system (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA) equipped with a quaternary pump, an autosampler, and a column oven. The UHPLC system was coupled to a Q-Exactive Orbitrap HRMS system (Thermo Fisher Scientific), with a heated electrospray ionization source (HESI-II) operating in a negative ionization mode. An Ascentis® Express C18 porous shell reversed-phase column (150 × 2.1 mm, 2.7 μm particle size) provided by Supelco (Bellefonte, PA, USA) was employed for the chromatographic separation. A binary system of solvents, based on a 0.1% formic acid aqueous solution (Solvent A) and a 0.1% formic acid in acetonitrile (Solvent B) was used to establish the elution gradient at a mobile phase flow rate of 0.3 mL/min. The elution gradient employed was as follows: 0–1 min, isocratic conditions at 10% B; 1–20 min, linear gradient from 10% to 95% B; 20–23 min, isocratic step at 95% B; 23–24 min back to initial conditions at 10% B; and from 24 to 30 min, isocratic elution at initial conditions for column re-equilibration. An injection volume of 10 μL (full-loop mode) was employed, and the column was kept at room temperature.

Nitrogen was employed as sheath gas, sweep gas, and auxiliary gas for the HESI-II ionization source at flow rates of 60, 0, and 10 a.u. (arbitrary units), respectively. HESI-II heater temperature and capillary voltage were set at 350 °C and −2.5 kV, respectively. The capillary instrument temperature was maintained at 320 °C, and an S-Lens RF level at 50 V was used. The Orbitrap analyzer was tuned and calibrated every 3 days, by employing a commercially available calibration solution for this purpose (Thermo Fisher Scientific). HRMS spectra were acquired in full MS scan mode with an  $m/z$  range from 100 to 1500 at a mass resolution of 70,000 full width at half-maximum (FWHM, at  $m/z$

200), an automatic gain control (AGC) target (number of ions to fill the C-Trap) of  $2.5 \times 10^5$ , and a maximum injection time (IT) of 200 ms. The full MS scan mode was followed by a data-dependent scan mode operating in a product ion scan, obtained by applying stepped normalized collision energies (NCE) of 17.5, 35, and 52.5 eV, with a fixed first  $m/z$  value of 50 Da for the registered  $m/z$  product ion range. This data-dependent scan mode was activated with an intensity threshold of  $1.0 \times 10^5$ , with a quadrupole isolation window of 0.5  $m/z$ . At this stage, a mass resolution of 17,500 FWHM (at  $m/z$  200), an AGC value of  $2.0 \times 10^5$ , and an IT value of 200 ms were employed.

### 3.3. Samples and Sample Treatment

A total of 126 paprika samples purchased from local markets in Spain and the Czech Republic were analyzed. Samples from the Czech Republic were also analyzed in order to demonstrate the applicability of the proposed methodology, to discern the different countries of origin among the samples. Among them, 72 samples were from La Vera PDO (26 sweet, 23 bittersweet, and 23 spicy flavors), 24 samples from the Murcia PDO (12 sweet and 12 spicy flavors), and 30 samples were from the Czech Republic (10 sweet, 10 smoked-sweet, and 10 spicy flavors).

Sample treatment was carried out, following a previously described method [28,29,46]. In brief, 0.3 mg of paprika powder was extracted with 3 mL of water:acetonitrile 20:80 (*v/v*) solution, by stirring in a vortex mixer (Stuart, Stone, United Kingdom) for 1 min, and by sonication (2510 Branson ultrasonic bath, Hampton, NH, USA) for 15 min. Then, centrifugation for 30 min at 4500 rpm (Rotana 460 HR centrifuge, Hettich, Germany) was performed, and the supernatant was transferred into a 2 mL glass injection vial, after filtration through 0.45  $\mu\text{m}$  nylon filters (Whatman, Clifton, NJ, USA). The extracts were kept in the freezer at  $-18\text{ }^\circ\text{C}$ , until analysis.

A quality control (QC) solution was prepared by mixing 50  $\mu\text{L}$  of each paprika sample extract. This QC solution was used to evaluate the repeatability of the proposed method and the robustness of the chemometric results.

All paprika samples were analyzed randomly with the proposed UHPLC-HRMS method to prevent the variations caused by the sequence duration. Moreover, a QC and an instrumental chromatographic blank of acetonitrile were also analyzed every 10 paprika samples.

### 3.4. Data Analysis

UHPLC-HRMS raw chromatographic data were processed by the TraceFinder<sup>TM</sup> v3.3 software (Thermo Fisher Scientific), by applying two user-targeted accurate mass database lists: (i) one list comprised the 53 previously characterized polyphenol and phenolic compounds [27], and (ii) another list comprised 12 capsaicinoid and capsinoids (see Tables S1 and S2 in the Supplementary Materials). Several confirmation criteria such as chromatographic retention times (for all studied polyphenol and phenolic compounds), accurate mass errors (values below 5 ppm), and isotopic pattern (matches higher than 85%) were employed with the TraceFinder<sup>TM</sup> software (Thermo Fisher Scientific) to assess the presence of the targeted compounds in the analyzed samples.

PCA and PLS-DA chemometric analysis were performed using the Stand Alone Chemometric Software (SOLO) obtained from Eigenvector Research [47]. A theoretical background description regarding these chemometric procedures is described elsewhere [48].

For polyphenolic profiling, X-data matrices to be treated by PCA and PLS-DA consisted of the peak area values of the 53 polyphenol and phenolic acids found and confirmed in the analyzed QCs and the paprika samples, using the TraceFinder<sup>TM</sup> software (Thermo Fisher Scientific). These polyphenolic profiles were then employed as sample chemical descriptors. The dimension of the data matrix was 126 (samples + QCs)  $\times$  53 analyte peak areas. When both, polyphenolic and capsaicinoid profiling was considered, the peak area values of the 12 studied capsaicinoids and capsinoids were also incorporated in the data matrix, providing a matrix dimension of 140 (samples + QCs)  $\times$  65 analyte peak areas. In all cases, normalization pretreatment concerning the overall analyte concentration was applied to provide similar weights to all samples. Y-data matrix in the PLS-DA models was defined by the membership of

each sample in the corresponding class. Scatter plots of scores and loadings from principal components (PCs), when PCA was used and from latent variables (LVs), for PLS-DA, were employed to study the distribution of samples and variables (analyte peak areas). Information regarding correlations and dependences for the targeted compounds with the paprika products analyzed was, thus, visualized. The most appropriate number of LVs was established by considering the first significant minimum point of the cross-validation (CV) error from a Venetian blind approach. Additionally, the applicability of the built chemometric models was proved by validating them on an independent prediction set. In particular, the validation of the PLS-DA models was carried out by using 70% of a sample group as the calibration set, while the remaining 30% constituted the prediction set.

#### 4. Conclusions

In the present work, targeted UHPLC-HRMS (Orbitrap) polyphenolic and capsaicinoid profiles proved to be adequate sample chemical descriptors for the characterization, classification, and authentication of paprika samples, according to both their PDO and production region and their flavor varieties. UHPLC-HRMS bioactive compound profiling using the TraceFinder<sup>TM</sup> screening software v3.3. (Thermo Fisher Scientific) without the requirement of target compound quantitation through commercially available standards, was proposed with the aim of obtaining a feasible, simple, and cheaper methodology. For this purpose, two homemade accurate mass databases consisting of 53 polyphenolic compounds, and 12 capsaicinoid and capsinoid compounds, were employed.

Exploratory analysis through PCA and a classification study through PLS-DA, using the obtained UHPLC-HRMS polyphenolic profiles, showed good discrimination capabilities among the different paprika PDO and production regions, in general, with acceptable PLS-DA classification ratios. Additionally, perfect discrimination and authentication capabilities were also accomplished for the Murcia PDO and the Czech Republic flavor varieties. In contrast, only a slight discrimination was achieved for the three commercially available La Vera PDO flavor varieties.

The capability of the proposed methodology to address the La Vera PDO flavor variety classification and authentication clearly improved when UHPLC-HRMS polyphenolic profiles were combined with the UHPLC-HRMS capsaicinoid and capsinoid profiles. A perfect separation of the spicy flavor variety from the other two groups, as expected by the high presence of capsaicinoid-based compounds in the spicy group of samples, and an acceptable discrimination between both sweet and bittersweet La Vera PDO varieties were accomplished.

Therefore, the proposed target-UHPLC-HRMS polyphenolic and capsaicinoid profiling methodology resulted in a feasible, simple, and relatively cheap alternative to address the characterization, classification, and authentication of paprika samples.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/1420-3049/25/7/1623/s1>, Table S1. Chemical structures of the studied capsaicinoids and capsinoids. Table S2. HRMS spectral data of the studied Capsaicinoids and Capsinoids. Figure S1. 3D plot of scores of PLS-DA model (LV1 vs. LV2 vs. LV3) when the UHPLC-HRMS polyphenolic profiles were employed as chemical descriptors of the analyzed paprika samples according to their production regions and flavor varieties.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.S. and O.N.; methodology, S.B.; software, S.B. and J.S.; validation, S.B.; investigation, S.B., J.S., and O.N.; writing—original draft preparation, S.B. and O.N.; writing—review and editing, S.B., J.S., L.P., and O.N.; supervision, L.P., and O.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation (project PGC2018-095013-B-I00), and by the Agency for Administration of University and Research Grants (Generalitat de Catalunya) under the projects 2017SGR-171 and 2017SGR-310.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. García, C.C.; Barfuss, M.H.J.; Sehr, E.M.; Barboza, G.E.; Samuel, M.R.; Moscone, E.A.; Ehrendorfer, F. Phylogenetic relationships, diversification and expansion of chili peppers (*Capsicum*, *Solanaceae*). *Ann. Bot.* **2016**, *118*, 35–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Kang, B.C.; Nahm, S.H.; Huh, J.H.; Yoo, H.S.; Yu, J.W.; Lee, M.H.; Kim, B.-D. An interspecific (*Capsicum annuum* × *C. chinense*) F2 linkage map in pepper using RFLP and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* **2001**, *102*, 531–539. [[CrossRef](#)]
3. Chinn, M.S.; Sharma-Shivappa, R.R.; Cotter, J.L. Solvent extraction and quantification of capsaicinoids from *Capsicum chinense*. *Food Bioprod. Process.* **2011**, *89*, 340–345. [[CrossRef](#)]
4. Topuz, A.; Dinçer, C.; Özdemir, K.S.; Feng, H.; Kushad, M. Influence of different drying methods on carotenoids and capsaicinoids of paprika (Cv., Jalapeno). *Food Chem.* **2011**, *129*, 860–865. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Jackson, S.; Swiner, D.J.; Capone, P.C.; Badu-Tawiah, A.K. Thread spray mass spectrometry for direct analysis of capsaicinoids in pepper products. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1023*, 81–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Akar, T.; Gorgulu, A.; Akar, T.; Celik, S. Decolorization of Reactive Blue 49 contaminated solutions by *Capsicum annuum* seeds: Batch and continuous mode biosorption applications. *Chem. Eng. J.* **2011**, *168*, 125–133. [[CrossRef](#)]
7. European Commission. Council Regulation (EC) No 510/2006 of 20 March 2006 on the protection of geographical indications and designations of origin for agricultural products and foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* **2006**, *50*, 12–25.
8. European Commission. Agricultural and Rural Development, European Union Agricultural Product Quality Policy, Specific EU Quality Schemes E Guaranteeing Quality. Available online: [https://ec.europa.eu/agriculture/quality\\_en](https://ec.europa.eu/agriculture/quality_en) (accessed on 2 February 2020).
9. European Commission. Commission Regulation (EC) No 982/2007 of 21 August 2007 registering certain names in the Register of protected designations of origin and protected geographical indications (Pimentón de la Vera (PDO)—Karlovarský suchar (PGI)—Riso di Baraggia biellese e vercellese (PDO)). *Off. J. Eur. Union* **2007**, *L217*, 22–23.
10. European Commission. Commission Regulation (EC) No 464/2001 of 7 March 2001 supplementing the Annex to Regulation (EC) No 2400/96 on the entry of certain names in the 'Register of protected designations of origin and protected geographical indications' provided for in Council Regulation (EEC) No 2081/92 on the protection of geographical indications and designations of origin for agricultural products and foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* **2001**, *L66*, 29–30.
11. Zapata, M.; Bañon, S.; Cabrera, P. *El pimiento para pimentón*; Mundi Prensa Libros, S.A.: Madrid, Spain, 1992.
12. Wahyuni, Y.; Ballester, A.R.; Sudarmonowati, E.; Bino, R.J.; Bovy, A.G. Metabolite biodiversity in pepper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions: Variation in health-related compounds and implications for breeding. *Phytochemistry* **2011**, *72*, 1358–1370. [[CrossRef](#)]
13. Mudrić, S.Ž.; Gašić, U.; Dramićanin, A.K.; Ćirić, I.; Milojković-Opsenica, D.; Popović-Dorđević, J.B.; Momirović, N.M.; Tešić, Ž. The polyphenolics and carbohydrates as indicators of botanical and geographical origin of Serbian autochthonous clones of red spice paprika. *Food Chem.* **2017**, *217*, 705–715.
14. Domínguez-Martínez, I.; Meza-Márquez, O.G.; Osorio-Revilla, G.; Proal-Nájera, J.B.; Gallardo-Velazquez, T. Determination of capsaicin, ascorbic acid, total phenolic compounds and antioxidant activity of *Capsicum annuum* L. var. *serrano* by mid infrared spectroscopy (Mid-FTIR) and chemometric analysis. *J. Korean Soc. Appl. Boil. Chem.* **2014**, *57*, 133–142. [[CrossRef](#)]
15. Quideau, S.; Deffieux, D.; Douat, C.; Pouységu, L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 586–621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Pandey, K.B.; Rizvi, S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2009**, *2*, 270–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Maraña, O.M.; Merás, I.D.; Galeano-Díaz, T.; De La Peña, A.M. Fluorescence properties of flavonoid compounds. Quantification in paprika samples using spectrofluorimetry coupled to second order chemometric tools. *Food Chem.* **2016**, *196*, 1058–1065. [[CrossRef](#)]
18. Chen, L.; Kang, Y.-H. Anti-inflammatory and antioxidant activities of red pepper (*Capsicum annuum* L.) stalk extracts: Comparison of pericarp and placenta extracts. *J. Funct. Foods* **2013**, *5*, 1724–1731. [[CrossRef](#)]



19. Zaki, N.; Hakmaoui, A.; Ouattmane, A.; Fernández-Trujillo, J.P. Quality characteristics of Moroccan sweet paprika (*Capsicum annuum* L.) at different sampling times. *Food Sci. Technol.* **2013**, *33*, 577–585. [[CrossRef](#)]
20. Kirschbaum-Titze, P.; Hiepler, C.; Mueller-Seitz, E.; Petz, M. Pungency in Paprika (*Capsicum annuum*). 1. Decrease of Capsaicinoid Content Following Cellular Disruption. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1260–1263. [[CrossRef](#)]
21. Musfiroh, I.D.A.; Mutakin, M.; Angelina, T.; Muchtaridi, M. Capsaicin level of various *Capsicum* fruits. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2013**, *5*, 248–251.
22. Govindarajan, V.S.; Sathyanarayana, M.N. *Capsicum*—production, technology, chemistry, and quality. Part V. Impact on physiology, pharmacology, nutrition, and metabolism; structure, pungency, pain, and desensitization sequences. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1991**, *29*, 435–474. [[CrossRef](#)]
23. Marañá, O.M.; De La Peña, A.M.; Galeano-Díaz, T. Isocratic LC–DAD–FLD method for the determination of flavonoids in paprika samples by using a rapid resolution column and post-column pH change. *Talanta* **2016**, *152*, 15–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. De Pascual-Teresa, S.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J.-C. Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 5331–5337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Lucci, P.; Saurina, J.; Núñez, O. Trends in LC-MS and LC-HRMS analysis and characterization of polyphenols in food. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2017**, *88*, 1–24. [[CrossRef](#)]
26. Pardo-Mates, N.; Vera, A.; Barbosa, S.; Hidalgo-Serrano, M.; Núñez, O.; Saurina, J.; Hernández-Cassou, S.; Puignou, L. Characterization, classification and authentication of fruit-based extracts by means of HPLC-UV chromatographic fingerprints, polyphenolic profiles and chemometric methods. *Food Chem.* **2017**, *221*, 29–38. [[CrossRef](#)]
27. Barbosa, S.; Pardo-Mates, N.; Hidalgo-Serrano, M.; Saurina, J.; Puignou, L.; Núñez, O. Detection and Quantitation of Frauds in the Authentication of Cranberry-Based Extracts by UHPLC-HRMS (Orbitrap) Polyphenolic Profiling and Multivariate Calibration Methods. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 9353–9365. [[CrossRef](#)]
28. Barbosa, S.; Campmajó, G.; Saurina, J.; Puignou, L.; Núñez, O. Determination of Phenolic Compounds in Paprika by Ultrahigh Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry: Application to Product Designation of Origin Authentication by Chemometrics. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *68*, 591–602. [[CrossRef](#)]
29. Serrano, N.; Cetó, X.; Núñez, O.; Aragón, M.; Gámez, A.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J. Characterization and classification of Spanish paprika (*Capsicum annuum* L.) by liquid chromatography coupled to electrochemical detection with screen-printed carbon-based nanomaterials electrodes. *Talanta* **2018**, *189*, 296–301. [[CrossRef](#)]
30. Puigventos, L.; Navarro, M.; Alechaga, E.; Núñez, O.; Saurina, J.; Hernández-Cassou, S.; Puignou, L. Determination of polyphenolic profiles by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry for the authentication of fruit extracts. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *407*, 597–608. [[CrossRef](#)]
31. Morales-Soto, A.; Caravaca, G.; García-Salas, P.; Segura-Carretero, A.; Gutierrez, A.F. High-performance liquid chromatography coupled to diode array and electrospray time-of-flight mass spectrometry detectors for a comprehensive characterization of phenolic and other polar compounds in three pepper (*Capsicum annuum* L.) samples. *Food Res. Int.* **2013**, *51*, 977–984. [[CrossRef](#)]
32. Navarro, M.; Núñez, O.; Saurina, J.; Hernández-Cassou, S.; Puignou, L. Characterization of Fruit Products by Capillary Zone Electrophoresis and Liquid Chromatography Using the Compositional Profiles of Polyphenols: Application to Authentication of Natural Extracts. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 1038–1046. [[CrossRef](#)]
33. Gnayfeed, M.H.; Daood, H.G.; Biacs, P.A.; Alcaraz, C.F. Content of bioactive compounds in pungent spice red pepper (paprika) as affected by ripening and genotype. *J. Sci. Food Agric.* **2001**, *81*, 1580–1585. [[CrossRef](#)]
34. Nagy, Z.; Daood, H.; Ambrózy, Z.; Helyes, L. Determination of Polyphenols, Capsaicinoids, and Vitamin C in New Hybrids of Chili Peppers. *J. Anal. Methods Chem.* **2015**, *2015*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Juangsamoot, J.; Ruangviriyachai, C.; Techawongstien, S.; Chanthai, S. Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in some hot chilli varieties by RP-HPLC-PDA after magnetic stirring extraction and clean up with C 18 cartridge. *Int. Food Res. J.* **2012**, *19*, 1217–1226.
36. Thompson, R.Q.; Phinney, K.W.; Welch, M.J.; White, E. Quantitative determination of capsaicinoids by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381*, 1441–1451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

37. Sganzerla, M.; Coutinho, J.P.; De Melo, A.M.T.; Godoy, H.T. Fast method for capsaicinoids analysis from *Capsicum chinense* fruits. *Food Res. Int.* **2014**, *64*, 718–725. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Kozukue, N.; Han, J.-S.; Kozukue, E.; Lee, S.-J.; Kim, J.-A.; Lee, K.-R.; Levin, C.; Friedman, M. Analysis of Eight Capsaicinoids in Peppers and Pepper-Containing Foods by High-Performance Liquid Chromatography and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 9172–9181. [[CrossRef](#)]
39. Ma, F.; Yang, Q.; Matthäus, B.; Li, P.; Zhang, Q.; Zhang, L. Simultaneous determination of capsaicin and dihydrocapsaicin for vegetable oil adulteration by immunoaffinity chromatography cleanup coupled with LC-MS/MS. *J. Chromatogr. B* **2016**, *1021*, 137–144. [[CrossRef](#)]
40. Hayashi, T.; Hayashi, K.; Fujita, J.; Ono, M.; Oka, H.; Ito, Y.; Matsumoto, H.; Ozeki, N.; Itakura, Y.; Nakazawa, H. An HPLC method for the analysis of paprika color in food using capsanthin as an indicator. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2001**, *24*, 2347–2361. [[CrossRef](#)]
41. Hernández, A.; Martín, A.; Aranda, E.; Bartolomé, T.; Cordoba, M.D.G. Application of temperature-induced phase partition of proteins for the detection of smoked paprika adulteration by free zone capillary electrophoresis (FZCE). *Food Chem.* **2007**, *105*, 1219–1227. [[CrossRef](#)]
42. Hernández, A.; Martín, A.; Aranda, E.; Bartolomé, T.; Cordoba, M.D.G. Detection of Smoked Paprika “Pimentón de La Vera” Adulteration by Free Zone Capillary Electrophoresis (FZCE). *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4141–4147. [[CrossRef](#)]
43. Palacios-Morillo, A.; Jurado, J.M.; Alcázar, Á.; Pons, F.D.P. Geographical characterization of Spanish PDO paprika by multivariate analysis of multielemental content. *Talanta* **2014**, *128*, 15–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Horn, B.; Esslinger, S.; Pfister, M.; Fahl-Hassek, C.; Riedl, J. Non-targeted detection of paprika adulteration using mid-infrared spectroscopy and one-class classification—Is it data preprocessing that makes the performance? *Food Chem.* **2018**, *257*, 112–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Osman, A.G.; Raman, V.; Haider, S.; Ali, Z.; Chittiboyina, A.; Khan, I.A. Overview of Analytical Tools for the Identification of Adulterants in Commonly Traded Herbs and Spices. *J. AOAC Int.* **2019**, *102*, 376–385. [[CrossRef](#)]
46. Cetó, X.; Serrano, N.; Aragón, M.; Gámez, A.; Esteban, M.; Díaz-Cruz, J.; Núñez, O. Determination of HPLC-UV Fingerprints of Spanish Paprika (*Capsicum annuum* L.) for Its Classification by Linear Discriminant Analysis. *Sensors* **2018**, *18*, 4479. [[CrossRef](#)]
47. SOLO software, Eigenvecto Research. Available online: <http://www.eigenvecto.com/software/solo.htm> (accessed on 10 February 2020).
48. Massart, D.L.; Vandeginste, B.G.M.; Buydens, L.M.C.; de Jong, S.; Lewi, P.J.; Smeyers-Verbeke, J. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1997.

**Sample Availability:** Samples of the polyphenolic and phenolic compounds (4-hydroxybenzoic acid, *p*-coumaric acid, sinapic acid, vanillic acid, homovanillic acid, homogentisic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, gallic acid, ferulic acid, gentisic acid, caffeic acid, syringic acid, rosmarinic acid, fisetin, taxifolin, rutin, quercetin, quercitrin, nepetin-7-glucoside, hesperidin, cirsimaritin, myricetin, luteolin-7-O- $\beta$ -D-glucuronide, genkwanin, morin, kaempferol, quercetin, homoplantagin, (+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin gallate, carnosic acid, anemosapogenin, rosmanol, betulinic acid, asiatic acid, carnosol, 12-methoxycarnosic acid, procyanidin A2, procyanidin B2, procyanidin C1, polydatin, resveratrol, 3,4-dihydroxybenzaldehyde, syringaldehyde, vanillin, veratric acid, *trans*-cinnamic acid, tyrosol, arbutin, ethyl gallate, umbelliferon, and ellagic acid) and of capsaicinoids (capsaicin, dihydrocapsaicin, N-vanillylnonanamide, nordihydrocapsiate, and nordihydrocapsaicin) are available from the authors.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### 3.4.3. Publicación VI: Artículo científico

*Classification and Authentication of Paprika by UHPLC-HRMS Fingerprinting and Multivariate Calibration Methods (PCA and PLS-DA).*

S. Barbosa; J. Saurina; L. Puignou; O. Núñez  
*Foods*, 2020, vol. 9, 486.  
*Anal. Methods*, 2019, vol. 11, pp. 3341-3349.



Article

# Classification and Authentication of Paprika by UHPLC-HRMS Fingerprinting and Multivariate Calibration Methods (PCA and PLS-DA)

Sergio Barbosa <sup>1</sup>, Javier Saurina <sup>1,2</sup> , Lluís Puignou <sup>1,2</sup> and Oscar Núñez <sup>1,2,3,\*</sup> 

<sup>1</sup> Department of Chemical Engineering and Analytical Chemistry, University of Barcelona, Martí i Franquès 1-11, E08028 Barcelona, Spain; sergiobarbosabarbero@hotmail.com (S.B.); xavi.saurina@ub.edu (J.S.); lluis.puignou@ub.edu (L.P.)

<sup>2</sup> Research Institute in Food Nutrition and Food Safety, University of Barcelona, Recinte Torribera, Av. Prat de la Riba 171, Edifici de Recerca (Gaudí), Santa Coloma de Gramenet, E08921 Barcelona, Spain

<sup>3</sup> Serra Húnter Fellow, Generalitat de Catalunya, Rambla de Catalunya 19-21, E08007 Barcelona, Spain

\* Correspondence: oscar.nunez@ub.edu; Tel.: +34-93-403-3706

Received: 18 March 2020; Accepted: 31 March 2020; Published: 13 April 2020



**Abstract:** In this study, the feasibility of non-targeted UHPLC-HRMS fingerprints as chemical descriptors to address the classification and authentication of paprika samples was evaluated. Non-targeted UHPLC-HRMS fingerprints were obtained after a simple sample extraction method and C18 reversed-phase separation. Fingerprinting data based on signal intensities as a function of  $m/z$  values and retention times were registered in negative ion mode using a q-Orbitrap high-resolution mass analyzer, and the obtained non-targeted UHPLC-HRMS fingerprints subjected to unsupervised principal component analysis (PCA) and supervised partial least squares regression-discriminant analysis (PLS-DA) to study sample discrimination and classification. A total of 105 paprika samples produced in three different regions, La Vera PDO and Murcia PDO, in Spain, and the Czech Republic, and all of them composed of samples of at least two different taste varieties, were analyzed. Non-targeted UHPLC-HRMS fingerprints demonstrated to be excellent sample chemical descriptors to achieve the authentication of paprika production regions with 100% sample classification rates by PLS-DA. Besides, the obtained fingerprints were also able to perfectly discriminate among the different paprika taste varieties in all the studied cases, even in the case of the different La Vera PDO paprika tastes (sweet, bittersweet, and spicy) which are produced in a very small region.

**Keywords:** UHPLC-HRMS fingerprinting; non-targeted analysis; food authentication; paprika; product designation of origin; principal component analysis; partial least squares regression-discriminant analysis

## 1. Introduction

Paprika is a red spice obtained after drying and grinding some varieties of peppers of the genus *Capsicum* belonging to the large family of Solanaceae [1]. The five main cultivated and economically important species of paprika are *Capsicum annuum* L., *C. chinense* Jacq. and *C. frutescens* L., now widely grown throughout Europe, the southern United States, Africa, India and China, and the species *C. baccatum* L. and *C. pubescens* Ruiz & Pav., which are grown predominantly in South America [2,3].

Paprika is often used in many foods such as soup, meat, ice cream, baked goods, and in seasoning blends to add color and taste [4], although it is also used in personal protection sprays, medicine, and cosmetics [5–9].

Today, both consumers and food manufacturers are increasingly concerned about quality standards and as a result, there is a growing demand for food traceability. In this context, the designation of

Protected Designation of Origin (PDO) is an effective tool to guarantee the quality and geographical origin of a product. In Europe, there are five Protected Designations of Origin for paprika: Piment d'Espelette (France), Paprika Szeged (Hungary), Paprika Žitava (Slovakia Žitava paprika), Pimentón de La Vera (Cáceres, Extremadura, Spain), and Pimentón de Murcia (Murcia, Spain).

To protect these products, the competent authorities carry out various checks, consisting mainly of inspections of production sites. During these inspections, records, raw materials, production systems, maturation, etc. are checked and various samples are taken to be analyzed by independent laboratories to ensure that the whole process complies with the regulations in force.

However, adulteration in natural products remains a widespread practice that mainly seeks economic benefit, either through increased sales or through reduced production costs. This practice is very difficult to combat, mainly due to the globalization of trade, the complexity of supply chains, the regulatory policy differences between each country and the fact that the main legal responsibility for the safety of marketed products is delegated by default to manufacturers [10]. Besides, the methods used for the adulteration of natural products are increasingly sophisticated, and, in some cases, are specially designed to mislead the methods of analysis applied by the competent authorities, which are limited to routine analyses that do not detect adulterations.

However, the high number of illegal compounds, as well as the different ways of adulterating a natural product, makes it sometimes difficult to identify those compounds that should be analyzed. In this context, non-targeted methods encompass the complexity of modern authentication of natural products [11–14]. The main focus of this type of strategy is to detect as many compounds as possible below 1.500 Da [15]. For this reason, liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS), such as TOF and Orbitrap, as well as their hybrid configurations, are the most suitable instruments to carry out this type of strategy, since they present a high sensitivity, have a high-resolution power (over 100,000 FWHM, full width at half maximum) and a very accurate mass/charge ratio determination (<5 ppm), able to distinguish between isobaric compounds. Furthermore, data acquisition in high-resolution full scan mode allows the simultaneous combination of targeted and non-targeted analysis, identification of new compounds, and retrospective data analysis [16]. Another important feature of this analytical strategy is that the authentication of a product can be approached from various perspectives in a single analysis. Depending on the selected approach to solve the problem of interest, the fingerprint allows not only detecting the origin or type of raw material used but also detects unlabeled compounds, unauthorized additives or the use of prohibited technological processes, among others [17].

In this type of analytical strategy, sample preparation must be as simple and non-specific as possible, to avoid losses of compounds, accompanied by loss of information [17]. Normally, the sample is extracted with a hydrophilic organic solvent-water mixture.

In non-targeted methods based on fingerprinting, it is not necessary to identify the compounds that are most relevant to product authentication. This type of strategy is often qualitative and based on a comparison between the samples under study and the authentic reference samples, which are used to build an appropriate database. This database is used to compare the fingerprints of the unknown samples with the fingerprints of the authentic reference samples, thus reducing the time and cost of analysis [12]. However, identification is important when regulatory action must be taken based on the results. In a court of law, the identification of the chemical structure of a primary or secondary marker is an important asset in the judicial process [11], although it should be kept in mind that different biomarkers can be obtained depending on the procedure used. The biomarkers obtained depend largely on the overall experimental approach used, including sample handling, separation, and detection, as well as the specific instrumentation used [18].

Analytical signals can be obtained in positive mode, in negative mode or by data fusion. In many cases, the most important aspect is to detect as many signals as possible, under both positive and negative modes and joining all the information in a single matrix, that is by data fusion, a complex authentication problem could be achieved. Another important feature of HRMS instruments such

as q-Orbitrap, is their ability to automatically isolate those signals that are more abundant, to be fragmented for future identification, if deemed appropriate.

Data pre-processing is one of the most relevant points to consider in methods based on fingerprinting. Once the data has been generated, it is important to have software that helps to obtain the working matrix. This matrix is constituted by the retention time, the  $m/z$  values and the area or signal of each detected peak. In this software, some parameters must be set, such as the mass tolerance for peak alignment, the total intensity threshold, the maximum peak displacement, and the S/N threshold. Sometimes, these parameters eliminate chemical interferences from the matrix, but they must be properly adjusted to prevent discarding signals that may be relevant [18]. Besides, depending on the type of study being conducted, it is necessary to reduce the number of signals to simplify the matrix obtained. In these cases, some actions can be taken such as removing signals that are not detected in a minimum percentage of the samples or remove signals that are not observed in the quality controls, which generally consist of a mixture of equal volumes of all the samples analyzed [18].

Once the data matrix has been obtained, it should be evaluated using multivariate statistical models, whether supervised or unsupervised, that finally allow the authentication of the product under study [13]. However, the great diversity of chemometric models, together with the fact that this type of strategy is in its beginnings in the food field, make that there is not yet a clear consensus as to which chemometric model is most suitable for routine use in quality control.

The main objective of this work was to develop a UHPLC-HRMS (Orbitrap) method for the characterization, classification, and authentication of paprika samples using a non-targeted fingerprint approach. Different samples of La Vera paprika, Murcia paprika, and Czech Republic paprika were analyzed using a simple sample extraction procedure. The hypothesis established in this work is that UHPLC-HRMS fingerprint data, obtained in ESI negative mode, can be considered as a source of potential chemical descriptors to be exploited for the characterization and classification of paprika samples by unsupervised and supervised methods such as principal components analysis (PCA) and partial least squares regression-discriminant analysis (PLS-DA).

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Chemicals and Standard Solutions

All the reagents, standards and chemicals employed in the present work were of analytical grade. Water, acetonitrile, and methanol (all of them LC-MS Chromasolv<sup>®</sup> quality), acetone, and formic acid (98–100%) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Hydrochloric acid (35%) was obtained from Merck (Seelze, Germany).

### 2.2. Instrumentation

An Accela UHPLC instrument from Thermo Fisher Scientific (San Jose, CA, USA), with a quaternary pump, and an autosampler, was employed for the sample chromatographic analysis. Reversed-phase separation in an Ascentis<sup>®</sup> Express C18 porous-shell (150 × 2.1 mm, 2.7 μm partially porous particle size) column obtained from Supelco (Bellefonte, PA, USA) under universal gradient elution mode using water (solvent A) and acetonitrile (solvent B), both of them containing 0.1% formic acid, was proposed for obtaining the chromatographic fingerprints. The elution gradient program employed begun with an isocratic elution step at 10% B for 1 min, followed by a linear gradient from 10 to 95% solvent B in 19 min. Then, 95% solvent B was kept for 3 min, and back to initial conditions at 10% solvent B in 1 min. A column re-equilibration time of 6 min at 10% solvent B was employed, giving place to a total chromatographic gradient program of 30 min. The mobile phase flow rate was 300 μL/min. The column was kept at room temperature, and an injection volume of 10 μL (at full-loop mode) was employed for sample analysis.

The UHPLC instrument was coupled to a Q-Exactive Orbitrap HRMS instrument (Thermo Fisher Scientific) by employing a heated electrospray ionization source (H-ESI II). Nitrogen (purity of 99.98%) was employed for the H-ESI sheath, sweep, and auxiliary gases at flow rates of 60, 0, and 10 a.u. (arbitrary units). H-ESI was operated in negative ionization mode by applying a capillary voltage of  $-2.5$  kV. H-ESI vaporizer temperature and capillary instrument temperature were kept at  $350$  °C and  $320$  °C, respectively. An S-Lens RF level of  $50$  V was used. Tuning and calibration of the Orbitrap analyzer were performed every 3 days by using the Thermo Fisher Scientific commercially available calibration solution for that purpose. Full scan HRMS spectra ( $m/z$  100–1500) at a mass resolution of  $70,000$  FWHM (full-width at half maximum, at  $m/z$  200) was employed to register the UHPLC-HRMS metabolomics fingerprints, with an automatic gain control (AGC) target (which is the number of ions to fill the instrument C-Trap) of  $2.5 \times 10^5$ , and a maximum injection time of  $200$  ms.

UHPLC-HRMS system control and data processing were performed using Xcalibur version 3.1 software (Thermo Fisher Scientific).

### 2.3. Samples and Sample Treatment

One hundred and five paprika samples obtained from local markets in Spain and the Czech Republic were analyzed. Samples belong to different PDO and production regions, as well as different taste varieties: 65 samples from La Vera PDO (including 23 sweet, 22 bittersweet, and 20 spicy), 17 samples from Murcia PDO (including 8 sweet, and 9 spicy), and 23 samples from Czech Republic (including 7 smoked-sweet, 8 sweet, and 8 spicy).

Samples were extracted following a previously proposed procedure [1,19]. Briefly, paprika samples ( $0.3$  mg) were extracted with water:acetonitrile  $20:80$  *v/v* solution ( $3$  mL) by stirring ( $1$  min) with a vortex mixer (Stuart, Sone, UK), and by sonication ( $15$  min) with an ultrasonic bath (2510 Branson, Hampton, NH, USA). Centrifugation was then carried out for  $15$  min at  $4500$  rpm (Rotana 460 HR centrifuge, Hettich, Germany). The obtained extract was then filtered with  $0.45$   $\mu\text{m}$  nylon filters (Whatman, Clifton, NJ, USA) and transferred into  $2$  mL injection vials, which were kept at  $-18$  °C until the UHPLC-HRMS analysis.

Besides, a quality control (QC) solution, employed for the evaluation of the method reproducibility and to ensure the robustness of the chemometric results, was employed. This QC was prepared by mixing  $50$   $\mu\text{L}$  of each one of the paprika sample extracts obtained.

To prevent signal tendencies attributed to the sample sequence analysis, all paprika samples were analyzed randomly with the proposed UHPLC-HRMS method. Besides, blanks of acetonitrile and QCs were injected every  $10$  randomly analyzed samples (representing  $12$  QC analyses).

### 2.4. Data Analysis

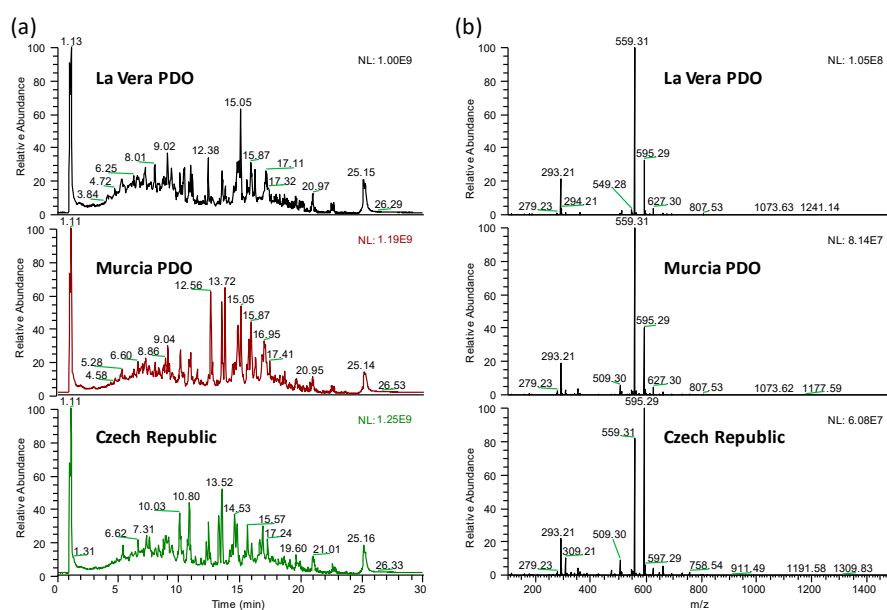
Data matrices for untargeted UHPLC-HRMS analysis were obtained with R software (R Foundation, Vienna, Austria). First, UHPLC-HRMS raw data was submitted to MSConvert software to obtain an Excel file with the profile of peak intensities as a function of  $m/z$  values and retention times for all the chemical features detected. An absolute intensity threshold peak filter of  $10^5$  was employed. PCA and PLS-DA chemometric calculations were made by using SOLO 8.6 chemometric software (Eigenvector Research [20], Manson, WA, USA). The theoretical background of these methods in a detailed way is addressed elsewhere [21]. X-data matrices for PCA and PLS-DA were based on the UHPLC-HRMS metabolomic fingerprints (peak intensities as a function of retention time and  $m/z$  values) obtained in H-ESI (-) mode. The PLS-DA Y-data matrix included the analyzed sample classes. Scatter plots of scores of the principal components (PCs) in PCA and the latent variables (LVs) in PLS-DA were used to study the distribution and classification of samples. The applicability of the proposed PLS-DA models for sample classification was assessed by employing 70% of the analyzed samples as the calibration sets ( $71$  samples), while the remaining 30% of samples were used for prediction and validation ( $31$  samples). Optimal number of LV in PLS-DA was determined by considering the first significant minimum point of the cross-validation (CV) error from a Venetian blind approach.



### 3. Results and Discussion

#### 3.1. UHPLC-HRMS Metabolomics Fingerprinting Approach

The main objective of the present work was to evaluate the feasibility of using non-targeted UHPLC-HRMS metabolomic fingerprints as sample chemical descriptors to address the characterization, classification, and authentication of paprika samples by multivariate chemometric methods. For that purpose, 105 paprika samples belonging to different PDO and production regions (La Vera PDO, Murcia PDO, and the Czech Republic), all of them including samples with different taste varieties, were analyzed. A simple and generic sample extraction method using water:acetonitrile 20:80 (*v/v*) as extracting solvent was proposed [1,19,22,23]. Reversed-phase UHPLC on a C18 column under universal gradient elution with water and acetonitrile (both of them with 0.1% formic acid) as mobile phase components were selected for the chromatographic separation. As a non-supervised fingerprinting methodology is intended, both sample treatment and chromatographic separation were kept as generic as possible with the aim of extracting as much sample chemical features as possible. Accordingly, an untargeted strategy based on UHPLC-HRMS fingerprints consisting of peak intensities registered as a function of both *m/z* and retention time values was employed. Negative H-ESI ionization mode was selected for the full scan (*m/z* 100–1500) data acquisition, taking into consideration that polyphenols and phenolic acids, typically ionized in that way, are among the most common bioactive substances in plant-based products [24]. As an example, Figure 1a shows the total ion chromatograms (TIC) registered in negative ionization mode for three selected sweet paprika samples belonging to different production regions (La Vera PDO, Murcia PDO, and the Czech Republic). Besides, the full scan HRMS corresponding to the signal registered at a retention time of 15.05 min for the same three sweet paprika samples is depicted in Figure 1b.

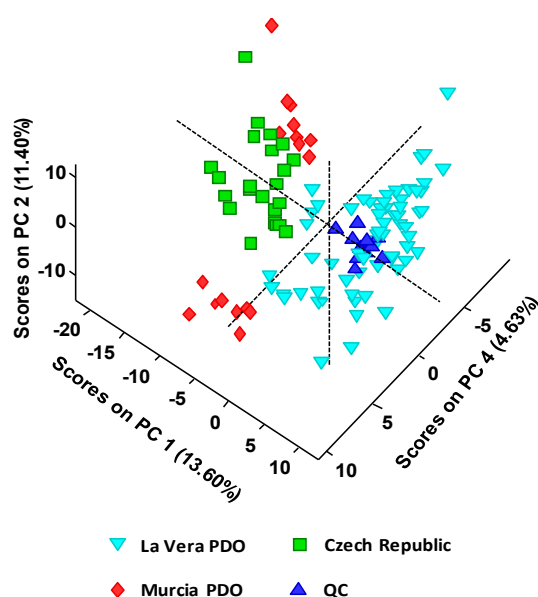


**Figure 1.** UHPLC-HRMS total ion chromatograms (a) and HRMS full scan spectra (*m/z* 100–1500) for the signal at retention time 15.05 min (b) of three selected sweet La Vera PDO, Murcia PDO, and Czech Republic paprika samples.

As can be seen, the proposed methodology provides rich fingerprints for the three types of samples from the point of view of the number of signals detected. However, important differences can be observed among sample types regarding the number of peak signals and their abundances, especially in the range from 5 to 20 min, in both the total ion chromatograms and the HRMS spectra.

### 3.2. Sample Exploration by PCA

As a first approach, a non-supervised exploratory PCA was performed with the obtained UHPLC-HRMS metabolomics fingerprints. For that purpose, sample UHPLC-HRMS raw data were first processed with MSConvert software to obtain an Excel file with the profile of peak intensities as a function of  $m/z$  values and retention times for all the chemical features detected. Obviously, the amount of ions registered that way is huge. Therefore, to reduce the data complexity and simplify the chemometric treatment, a threshold peak filter of an absolute intensity of  $10^5$  was applied, removing all the chemical features below this value (most of them considered to be chemical noise). Data was further processed with R software to obtain the final data matrix including the non-targeted UHPLC-HRMS metabolomics fingerprints of the 105 analyzed paprika samples and the QCs. This data matrix was then submitted to PCA. Figure 2 shows the obtained PCA 3D score plot of PC1 vs. PC2 vs. PC4 for the classification of the analyzed paprika samples.

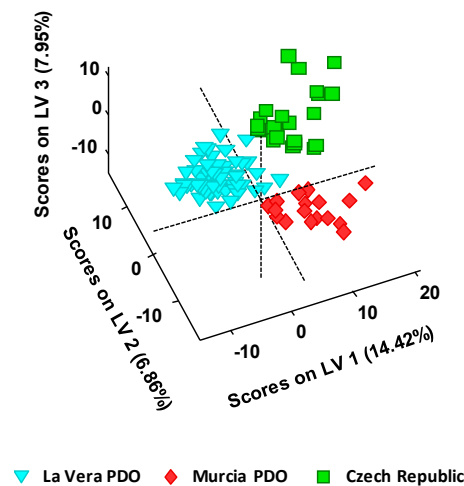


**Figure 2.** PCA 3D score plot of PC1 vs. PC2 vs. PC4 when UHPLC-HRMS fingerprints were employed as chemical descriptors for the classification of the analyzed paprika samples according to their PDO and production region.

As can be seen, QCs are well clustered, revealing the good performance of the proposed UHPLC-HRMS methodology as well as the feasibility of the obtained chemometric results. As expected, QCs are clustered in the same area of La Vera PDO samples due to the higher contribution of this group of samples to the QC composition (see QC preparation in Material and Methods section). Regarding the obtained sample distribution by PCA, La Vera PDO samples are completely separated from the other two groups of samples, exhibiting positive scores on PC1. Discrimination is also more or less observed for the other two groups of samples. Besides, Murcia PDO samples were also separated into two groups by PCA, according to their two taste varieties (sweet and spicy).

### 3.3. Sample Classification by PLS-DA

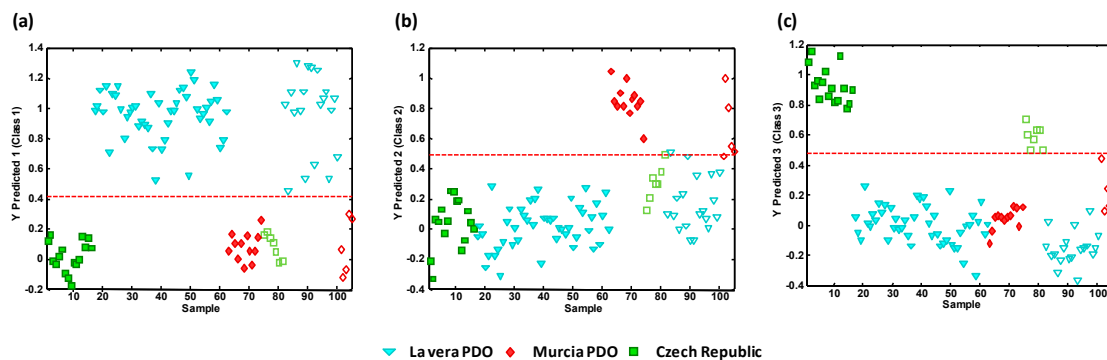
The obtained UHPLC-HRMS fingerprints were also submitted to PLS-DA to perform a supervised sample classification. For that purpose, the X-data matrix was the same as the one used for the PCA, without including QCs, and the Y-data matrix included the membership of each paprika sample. In this case, a total of four LVs were required for the optimal PLS-DA model. The obtained PLS-DA 3D score plot of LV1 vs. LV2 vs. LV3 is depicted in Figure 3.



**Figure 3.** PLS-DA 3D score plot of LV1 vs. LV2 vs. LV3 when UHPLC-HRMS fingerprints were employed as chemical descriptors for the classification of the analyzed paprika samples according to their PDO and production region.

As expected, results considerably improved when employing the classificatory PLS-DA in comparison to the exploratory PCA method. Not only the three groups of paprika samples are perfectly discriminated concerning their PDO and production regions, but more compacted groups are also obtained.

To demonstrate the applicability of the proposed UHPLC-HRMS metabolomics fingerprinting strategy for the classification and the authentication of the analyzed paprika samples according to their PDO and production regions, PLS-DA validation was performed by studying the classification rates for the PLS-DA models comparing one paprika group against the other two. For that purpose, the PLS-DA models were built by employing a calibration set composed of 70% of the samples belonging to each sample group, and then the other 30% of the samples (randomly selected) were employed as a test set for prediction purposes. Figure 4 shows the classification plots obtained for (a) La Vera PDO samples vs. all the other samples, (b) Murcia PDO samples vs. all the other samples, and (c) Czech Republic samples vs. all the other samples. The dashed line indicates the classification boundary, so all the samples belonging to the targeted paprika class were located to the top while samples belonging to the other two sample groups were located to the bottom. Besides, calibration samples were located to the left (with filled symbols), and those employed for prediction purposes were on the right of the plots (with empty symbols).

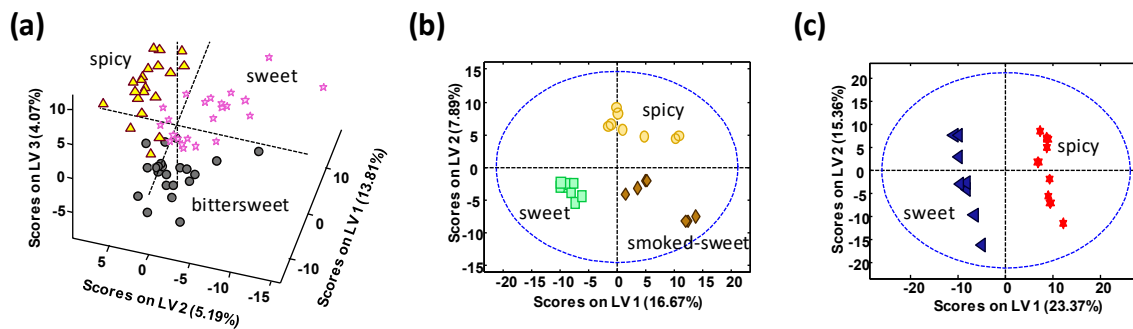


**Figure 4.** PLS-DA classification plots according to the paprika production region. (a) La Vera PDO vs. other classes; (b) Murcia PDO vs. other classes; (c) Czech Republic vs. other classes. Sample assignment: triangle = La Vera PDO, rhombus = Murcia PDO, square = Czech Republic. Filled symbols = calibration set, empty symbols = validation/prediction set. The dashed line means the classification boundary.

Excellent results were obtained with a 100% classification rate in the three PLS-DA models under study. These results demonstrate the feasibility of the proposed UHPLC-HRMS metabolomics fingerprinting strategy to obtain good sample chemical descriptors to authenticate the PDO and production region of paprika samples.

### 3.4. Sample Classification by PLS-DA According to Taste Varieties

UHPLC-HRMS metabolomics fingerprints were also evaluated as sample chemical descriptors to address sample classification according to the different taste varieties for each paprika PDO or production region, and the best PLS-DA models obtained are represented in Figure 5.



**Figure 5.** PLS-DA score plots when using UHPLC-HRMS metabolomics fingerprints as chemical descriptors for the classification of (a) La Vera PDO, (b) Murcia PDO, and (c) Czech Republic paprika samples according to their different taste varieties.

As can be seen, the proposed methodology is also able to discriminate among the different taste varieties for each paprika PDO or production region. In the case of La Vera PDO paprika (Figure 5a), bittersweet samples tend to be located depicting negative LV1 and LV2 values, while sweet paprika variety tends to be located with negative LV2 but positive LV1 values. LV3 seems to be responsible for the discrimination of the spicy taste. Although variety discrimination is not 100% perfect, these results are very acceptable taking into account that all these samples are produced in a very small region, in comparison to the other paprika groups analyzed. For the cases of Murcia PDO paprika (Figure 5b) and Czech Republic paprika (Figure 5c), perfect discrimination among their different flavor varieties was accomplished.

## 4. Conclusions

In the present work, the feasibility of non-targeted UHPLC-HRMS (Orbitrap) fingerprints as appropriate sample chemical descriptors for the characterization, classification, and authentication of paprika samples according to both their PDO and production region and their different taste varieties has been demonstrated.

The proposed characterization and classification method has the advantage that the identification of specific metabolite compounds is not required to deal with sample authentication, as non-targeted fingerprints based on HRMS signal intensities as a function of  $m/z$  values and retention times are treated by the chemometric approaches.

Unsupervised exploratory analysis performed by PCA and supervised classification carried out by PLS-DA by using the obtained non-targeted UHPLC-HRMS fingerprints showed excellent discrimination capabilities of the different paprika production regions under study (La Vera PDO, Murcia PDO, and the Czech Republic paprika). PLS-DA model validations resulted in 100% classification rates in both calibration and prediction steps.

Besides, the proposed methodology also exhibited perfect discrimination and authentication capabilities among the different paprika taste varieties of each of the production regions studied—even in the case of La Vera PDO samples, where three different taste varieties (sweet, bittersweet, and spicy)

are produced within a small geographical area in comparison to Murcia PDO and the Czech Republic samples.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.S. and O.N.; methodology, investigation, and validation, S.B.; writing—original draft preparation, S.B. and O.N.; writing—review and editing, S.B., J.S., L.P. and O.N.; supervision, L.P. and O.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation under the project PGC2018-095013-B-I00) and by the Agency for Administration of University and Research Grants (Generalitat de Catalunya, Spain) under the projects 2017SGR-171 and 2017SGR-310.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Serrano, N.; Cetó, X.; Núñez, O.; Aragón, M.; Gámez, A.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J.M. Characterization and classification of Spanish paprika (*Capsicum annuum* L.) by liquid chromatography coupled to electrochemical detection with screen-printed carbon-based nanomaterials electrodes. *Talanta* **2018**, *189*, 296–301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Carrizo García, C.; Barfuss, M.H.J.; Sehr, E.M.; Barboza, G.E.; Samuel, R.; Moscone, E.A.; Ehrendorfer, F. Phylogenetic relationships, diversification and expansion of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae). *Ann. Bot.* **2016**, *118*, 35–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Barboza, G.E.; García, C.C.; González, S.L.; Scaldaferrro, M.; Reyes, X. Four new species of *Capsicum* (Solanaceae) from the tropical Andes and an update on the phylogeny of the genus. *PLoS ONE* **2019**, *14*, 1–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bata-Vidács, I.; Baka, E.; Tóth, Á.; Csernus, O.; Luzics, S.; Adányi, N.; Székács, A.; Kukolya, J. Investigation of regional differences of the dominant microflora of spice paprika by molecular methods. *Food Control* **2018**, *83*, 109–117. [[CrossRef](#)]
- Martín, A.; Hernández, A.; Aranda, E.; Casquete, R.; Velázquez, R.; Bartolomé, T.; Córdoba, M.G. Impact of volatile composition on the sensorial attributes of dried paprikas. *Food Res. Int.* **2017**, *100*, 691–697. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wu, N.; Gao, W.; Lian, Y.; Du, J.; Tie, X. The transfer of natural Rhodamine B contamination from raw paprika fruit to capsicum oleoresin during the extraction process. *Food Chem.* **2017**, *237*, 786–792. [[CrossRef](#)]
- Topuz, A.; Dincer, C.; Özdemir, K.S.; Feng, H.; Kushad, M. Influence of different drying methods on carotenoids and capsaicinoids of paprika (Cv.; Jalapeno). *Food Chem.* **2011**, *129*, 860–865. [[CrossRef](#)]
- Jackson, S.; Swiner, D.J.; Capone, P.C.; Badu-Tawiah, A.K. Thread spray mass spectrometry for direct analysis of capsaicinoids in pepper products. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1023*, 81–88. [[CrossRef](#)]
- Tunali Akar, S.; Gorgulu, A.; Akar, T.; Celik, S. Decolorization of Reactive Blue 49 contaminated solutions by *Capsicum annuum* seeds: Batch and continuous mode biosorption applications. *Chem. Eng. J.* **2011**, *168*, 125–133. [[CrossRef](#)]
- Raclariu, A.C.; Țebrencu, C.E.; Ichim, M.C.; Ciupercă, O.T.; Brysting, A.K.; de Boer, H. What's in the box? Authentication of Echinacea herbal products using DNA metabarcoding and HPTLC. *Phytomedicine* **2018**, *44*, 32–38. [[CrossRef](#)]
- Ballin, N.Z.; Laursen, K.H. To target or not to target? Definitions and nomenclature for targeted versus non-targeted analytical food authentication. *Trends Food Sci. Technol.* **2019**, *86*, 537–543. [[CrossRef](#)]
- Esslinger, S.; Riedl, J.; Fauhl-Hassek, C. Potential and limitations of non-targeted fingerprinting for authentication of food in official control. *Food Res. Int.* **2014**, *60*, 189–204. [[CrossRef](#)]
- Riedl, J.; Esslinger, S.; Fauhl-Hassek, C. Review of validation and reporting of non-targeted fingerprinting approaches for food authentication. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *885*, 17–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cuadros-Rodríguez, L.; Ruiz-Samblás, C.; Valverde-Som, L.; Pérez-Castaño, E.; González-Casado, A. Chromatographic fingerprinting: An innovative approach for food “identification” and food authentication—A tutorial. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *909*, 9–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Barbosa, S.; Pardo-Mates, N.; Hidalgo-Serrano, M.; Saurina, J.; Puignou, L.; Núñez, O. UHPLC-HRMS (orbitrap) fingerprinting in the classification and authentication of cranberry-based natural products and pharmaceuticals using multivariate calibration methods. *Anal. Methods* **2019**, *11*, 3341–3349. [[CrossRef](#)]

16. McGrath, T.F.; Haughey, S.A.; Patterson, J.; Fauhl-Hassek, C.; Donarski, J.; Alewijn, M.; van Ruth, S.; Elliott, C.T. What are the scientific challenges in moving from targeted to non-targeted methods for food fraud testing and how can they be addressed? – Spectroscopy case study. *Trends Food Sci. Technol.* **2018**, *76*, 38–55. [CrossRef]
17. Esteki, M.; Simal-Gandara, J.; Shahsavari, Z.; Zandbaaf, S.; Dashtaki, E.; Vander Heyden, Y. A review on the application of chromatographic methods, coupled to chemometrics, for food authentication. *Food Control* **2018**, *93*, 165–182. [CrossRef]
18. Campmajó, G.; Núñez, N.; Núñez, O. The role of liquid chromatography-Mass spectrometry in food integrity and authenticity. In *Mass Spectrometry—Future Perceptions and Applications*; Kamble, G.S., Ed.; IntechOpen: London, UK, 2019; pp. 3–20. ISBN 978-953-51-7845-3.
19. Barbosa, S.; Campmajó, G.; Saurina, J.; Puignou, L.; Núñez, O. Determination of Phenolic Compounds in Paprika by Ultrahigh Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Application to Product Designation of Origin Authentication by Chemometrics. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 591–602. [CrossRef]
20. SOLO Software, Eigenvecto Research. Available online: <http://www.eigenvector.com/software/solo.htm> (accessed on 10 February 2020).
21. Massart, D.L.; Vandeginste, B.G.M.; Buydens, L.M.C.; de Jong, S.; Lewi, P.J.; Smeyers-Verbeke, J. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1997.
22. Cetó, X.; Serrano, N.; Aragón, M.; Gámez, A.; Esteban, M.; Díaz-Cruz, J.M.; Núñez, O. Determination of HPLC-UV fingerprints of spanish paprika (*Capsicum annuum* L.) for its classification by linear discriminant analysis. *Sensors* **2018**, *18*, 4479. [CrossRef]
23. Cetó, X.; Sánchez, C.; Serrano, N.; Díaz Cruz, J.M.; Núñez, O. Authentication of paprika using HPLC-UV fingerprints. *LWT Food Sci. Technol.* **2020**, *124*, 109153. [CrossRef]
24. Lucci, P.; Saurina, J.; Núñez, O. Trends in LC-MS and LC-HRMS analysis and characterization of polyphenols in food. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2017**, *88*, 1–24. [CrossRef]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### 3.5. Discusión de resultados

En esta sección se lleva a cabo una discusión conjunta de las publicaciones introducidas en la sección 3.5. El objetivo principal de los tres trabajos realizados fue obtener métodos rápidos y sencillos para la caracterización, clasificación y autenticación de muestras de pimentón de La Vera con DOP, pimentón de Murcia con DOP y muestras procedentes de la Republica Checa. No obstante, varía la instrumentación, así como la metodológica aplicada. Las publicaciones IV y V están basadas en métodos dirigidos mediante la obtención de perfiles polifenólicos que se utiliza como descriptores químicos. Sin embargo, en la publicación IV el espectrómetro de masas utilizado es de baja resolución (LC-LRMS) mientras que en la publicación V es de alta resolución (LC-HRMS). Por otro lado, la publicación VI está basada en un método no dirigido el cual evalúa la huella dactilar (*fingerprint* metabolómico) como descriptor químico y, por lo tanto, como se ha comentado anteriormente, el espectrómetro de masas utilizado es de alta resolución. En todos los trabajos, los descriptores químicos obtenidos se utilizaron para estudiar la clasificación y autenticación de las muestras de pimentón mediante técnicas quimiométricas. A continuación, se resumirán y discutirán diversos aspectos claves en el desarrollo de las metodologías llevadas a cabo.

#### 3.5.1. Tratamiento de muestra

El número de muestras analizadas varía ligeramente en cada trabajo debido a la variabilidad de las muestras disponibles en cada momento. No obstante, en todos los casos las muestras fueron compradas en mercados locales en España y la República Checa. En la publicación IV se analizaron un total de 111 muestras, de las cuales 72 muestras fueron de pimentón DOP La Vera (26 dulces, 23 agridulces y 23 sabores picantes), 24 muestras de pimentón DOP Murcia (12 dulces y 12 picantes) y 15 muestras de pimentón de República Checa (5 dulces, 5 dulces ahumados y 5 picantes). En la publicación V se analizaron un total un total de 126 muestras, de las cuales 72 muestras fueron de pimentón DOP La Vera (26 dulces, 23 agridulces y 23 sabores picantes), 24 muestras de pimentón DOP Murcia (12 dulces y 12 picantes) y 30 muestras de pimentón de República Checa (10 dulces, 10 dulces ahumados y 10 picantes). Por último, en la publicación VI, se analizaron un total un total de 105 muestras, de las cuales 65 muestras fueron de pimentón DOP La Vera (23 dulces, 22 agridulces y 20 sabores picantes), 17 muestras de pimentón DOP Murcia (8 dulces y 9 picantes) y 23 muestras de pimentón de República Checa (8 dulces, 7 dulces ahumados y 8 picantes).

El tratamiento de muestra fue idéntico en todos los trabajos y consistió en un método descrito previamente por N. Serrano [49] quién a partir del perfil polifenólico, caracterizó y clasificó muestras de pimentón español (*Capsicum annuum* L.) por cromatografía líquida mediante detección electroquímica con electrodos serigrafados con nanomateriales de carbono.

Brevemente, incluye una extracción mediante agitación y sonicación de las muestras con agua:acetonitrilo (20:80 v/v), centrifugación y filtración de los extractos antes de su análisis.

Este procedimiento cumple los requisitos mencionados con anterioridad en el apartado 2.3.1, es decir, es simple, extrae los compuestos polifenólicos, al haber sido descrito anteriormente y utilizado en el grupo de investigación, para la extracción de compuestos polifenólicos pertenecientes a diferentes familias, y a su vez es relativamente poco selectivo, lo que permite extraer un gran número de otros compuestos bioactivos [49,50].

Además, al igual que los trabajos mencionados anteriormente en el capítulo 2, con la finalidad de verificar la reproducibilidad de los datos obtenidos en los diferentes métodos propuestos, se preparó también un control de calidad (QC), que consistía en un extracto formado mezclando 50µL de cada uno de los extractos de las muestras analizadas.

### 3.5.2. Instrumentación

La instrumentación utilizada, así como las condiciones de elución, están descritos en las diferentes publicaciones. No obstante, cabe mencionar que en las publicaciones V y VI, se aplicaron las mismas condiciones y la misma instrumentación que en las publicaciones II y III, comentadas anteriormente en el capítulo 2.3.2. Esto es debido a que de esta forma se puede utilizar la base de datos personalizada de polifenoles desarrollada en los trabajos anteriores que solo puede ser aplicada si las condiciones de separación y adquisición son idénticas.

Sin embargo, en la publicación IV se desarrolló un método por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de baja resolución (LC-LRMS) para la obtención del perfil polifenólico de las muestras, con la finalidad de comparar los resultados con los obtenidos con un analizador de alta resolución (publicación V).

En la publicación IV, la determinación de polifenoles y ácidos fenólicos se realizó con un instrumento Open Accela UHPLC (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, EE. UU.), equipado con una bomba cuaternaria y un automuestreador CTC. La separación se realizó por cromatografía de fase inversa usando una columna de núcleo sólido Ascentis Express C18 (100x2,1mm, tamaño de partícula parcialmente poroso de 2,7µm) de Supelco (Bellefonte, PA, EE. UU.) y usando un gradiente de elución con ácido fórmico al 0,1% en agua (disolvente A) y ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo (disolvente B) como componentes de la fase móvil, con un caudal de fase móvil de 300 µL/min. El gradiente de elución está descrito en la publicación. No obstante, hay que mencionar que la composición de la fase móvil es la misma en todas las publicaciones, ya que se ha demostrado en varios trabajos que es útil para la separación cromatográfica de polifenoles y compuestos similares [51-54].



El gradiente de elución fue variando entre gradiente lineal e isocrático con la finalidad de conseguir la máxima separación posible de los 36 compuestos fenólicos estudiados, dado que al aplicar el gradiente universal coelúan varios polifenoles, llegando finalmente a un compromiso entre la separación cromatográfica de los diferentes compuestos y el tiempo de análisis. No obstante, los problemas de coelución que se observaron entre algunos polifenoles, fueron resueltos finalmente mediante la selectividad proporcionada por el uso del analizador de masas de triple cuadrupolo (QqQ).

Así, el instrumento UHPLC se acopló a un analizador TSQ Quantum ultra AM triple cuadrupolo (QqQ), equipado con cuadrupolos hiperbólicos y una fuente de ionización por electrospray (H-ESI). Los parámetros de la fuente de iones se establecieron de forma que se generaran el mayor número posible de iones y para mejorar las señales obtenidas. Sin embargo, como algunos de estos parámetros, como el voltaje del capilar, los caudales del gas envolvente, el gas de barrido y gas auxiliar, las temperaturas del tubo de transferencia de iones y del vaporizador H-ESI, dependen del compuesto, los valores óptimos que se establecieron fueron a modo de compromiso en cada uno de estos factores. Esto provocó, en algún caso en particular, que el pico base del espectro no fuera la molécula desprotonada, como en el caso de la Polidatina donde el ión  $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$  con  $m/z$  227,0 era más abundante que ión desprotonado con  $m/z$  389,1, aunque el ión  $[M-H]^-$  también era muy abundante.

Se utilizó nitrógeno con una pureza del 99,98% como gas envolvente, gas de barrido y gas auxiliar en caudales de 60, 0, 20a.u. (unidades arbitrarias), respectivamente. Otros parámetros de la fuente H-ESI fueron los siguientes: voltaje capilar en modo de iones negativos, -2.5kV; Temperatura del vaporizador H-ESI, 350°C; temperatura del tubo de transferencia de iones, 350°C.

Los problemas de coeluciones totales o parciales entre algunos polifenoles, que no se pudieron resolver mediante la separación cromatográfica, se resolvieron al aplicar el modo de adquisición de monitoreo de reacción múltiple (MRM) mediante el registro de dos transiciones de monitoreo de reacción seleccionadas (SRM) (transiciones cuantificadoras y calificadoras) dado que ninguno de ellos presentó supresión iónica. Se utilizó una resolución de masa de  $0.7m/z$  FWHM en ambos cuadrupolos (Q1 y Q3), y un ancho de exploración de  $0.5m/z$ . La fragmentación se llevó a cabo utilizando argón como gas de colisión a una presión de 1.5 mtorr, y las energías de colisión normalizadas (NCE) fueron optimizadas para cada uno de los compuestos fenólicos estudiados.

### 3.5.3. Análisis de datos

El procesamiento de los datos en la publicación IV se realizó mediante el software Xcalibur version 2.1 (Thermo Fisher Scientific), mientras que la publicación V se utilizó el software

TraceFinder™ 2.1 (Thermo Fisher Scientific) y en la publicación VI el software R (Fundación R, Viena, Austria).

La cuantificación mediante el uso del software Xcalibur se llevó a cabo de forma manual, es decir, buscando el área de cada uno de los polifenoles en cada muestra, lo que representó que el método fuese algo más lento que los otros dos empleados. Con este software Xcalibur se evaluaron 36 polifenoles en cada una de las 111 muestras analizadas a lo que hay que sumar los QC. Para identificar y confirmar la presencia de un compuesto, se tiene en cuenta el tiempo de retención, la presencia del pico en las dos transiciones y la ratio entre los iones correspondientes a estas dos transiciones.

Con el software TraceFinder y el software R los datos se obtienen de una forma mucho más rápida y simple. No obstante, para poder utilizar el software TraceFinder previamente se creó una base de datos personalizada con 53 compuestos fenólicos y polifenólicos previamente caracterizados [54], y una lista que comprende 12 capsaicinoides y capsinoides. Con este software se emplearon varios criterios de confirmación, como los tiempos de retención cromatográfica (para todos los compuestos fenólicos y polifenólicos estudiados), errores de masa precisos (valores inferiores a 2ppm) y pattern isotópico (coincidencias superiores al 85%). Por otro lado, el software R extrae las señales obtenidas para cada masa (relación  $m/z$ ) en cada tiempo de retención, aplicando un umbral de intensidad mínima de  $10^5$ , y alinea estas señales entre las diferentes inyecciones para obtener la matriz de trabajo.

Para el tratamiento de los datos quimiométricos de PCA y PLS-DA se utilizó el software quimiométrico independiente (SOLO) obtenido de Eigenvector Research. No obstante, el tamaño de la matriz de trabajo varió en cada publicación debido a la variabilidad del número de muestras y el número de señales (variables) utilizado en cada caso. Por ello, la matriz de trabajo en la publicación IV consistió en 111 muestras x 36 polifenoles, en la publicación V fueron 126 muestras x 53 polifenoles, o 65 cuando se tuvieron en cuenta capsinoides y capsaicinoides, y en la publicación VI 105 muestras x 373 señales.

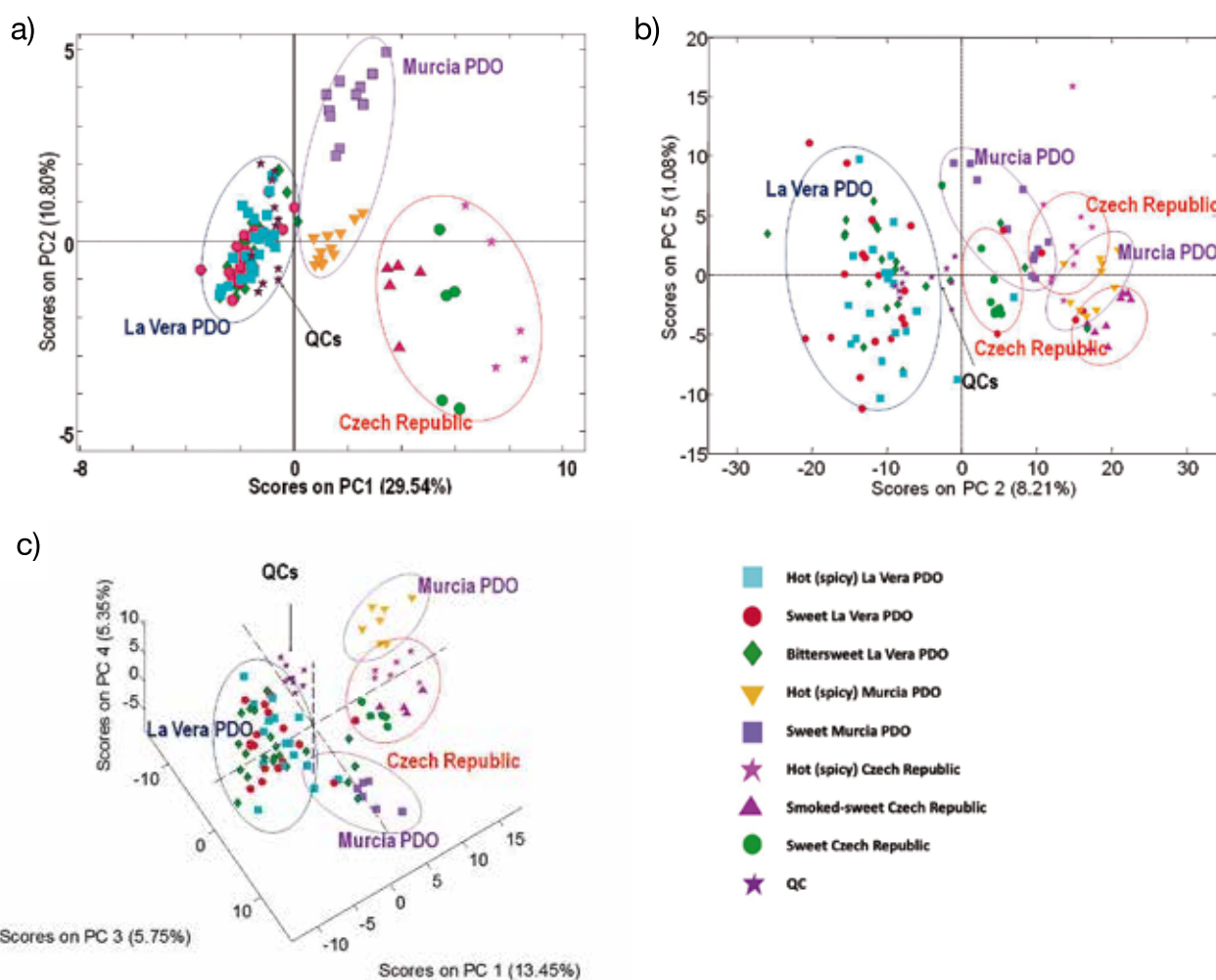
#### **3.5.4. Resultados**

El objetivo principal de nuestro trabajo es desarrollar métodos para la caracterización, clasificación y autenticación de muestras de Pimentón de La Vera, pimentón de Murcia y pimentón de la Republica Checa, mediante métodos quimiométricos como PCA y PLS-DA. Para ello, después del procesamiento de datos y una vez obtenidas las matrices con los descriptores químicos de las muestras, los datos son tratados con el software SOLO obteniendo finalmente diferentes diagramas de scores que nos permiten clasificar las muestras. En este apartado se comparan y discuten los resultados obtenidos por cada método.

### 3.5.4.1. Análisis de componentes principales (PCA)

En todos los trabajos los resultados fueron evaluados mediante el análisis de componentes principales (PCA), que como se ha comentado anteriormente, es un método no supervisado cuyo propósito es identificar grupos o relaciones entre muestras, sin ningún conocimiento previo de las clases o grupos implicados.

La Figura 3.12 muestra los diagramas de scores obtenidos a partir de a) el perfil polifenólico utilizando un analizador de triple cuadrupolo (QqQ), b) a partir del perfil polifenólico utilizando un analizador Orbitrap y c) a partir del perfil metabolómico utilizando un analizador Orbitrap.



**Fig. 3.12.** Gráfico de scores (PCA) obtenido a partir de a) el perfil polifenólico utilizando un analizador QqQ, b) el perfil polifenólico utilizando Orbitrap y c) perfil metabolómico utilizando Orbitrap, teniendo en cuenta su procedencia y tipología.

Como puede observarse en la Figura 3.12, se obtiene un resultado similar en todas las pruebas realizadas, independientemente del instrumento o de los descriptores químicos utilizados.

Todos los QC se encuentran agrupados, lo que verifica la reproducibilidad de los métodos propuestos, así como la solidez de los resultados quimiométricos obtenidos. Además, hay una discriminación clara entre las muestras procedentes de La Vera, Murcia y la República Checa, encontrándose las muestras procedentes de La Vera agrupadas a la izquierda del diagrama, en todos los casos, mientras que las muestras procedentes de Murcia y de la República Checa se encuentran agrupadas a la derecha del diagrama. No obstante, para estas últimas muestras se pueden distinguir las muestras también en función de su tipología. Con los tres métodos propuestos, se puede observar una clara discriminación entre las muestras de pimentón picante y dulce procedentes de Murcia y entre las muestras de pimentón picante, dulce y dulce ahumado, procedentes de la República Checa. Sin embargo, esta discriminación no es posible entre las muestras de pimentón picante, dulce y agridulce procedentes de La Vera. En los tres casos, las muestras procedentes de La Vera (independientemente de su tipología) se encuentran entrelazadas en la parte izquierda del diagrama de scores.

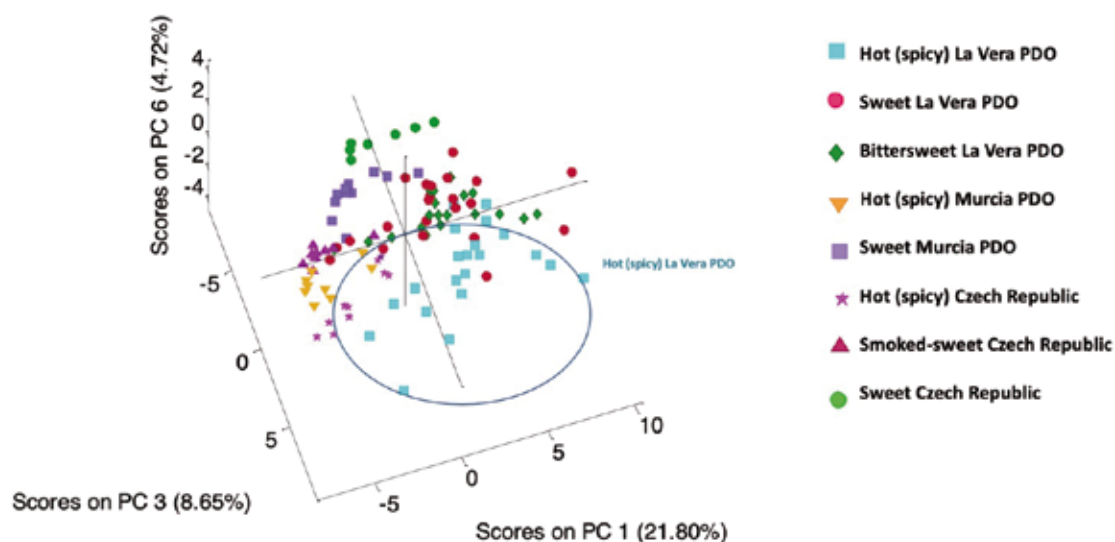
Con el objetivo de mejorar esta discriminación, se realizó el perfil dirigido de otros compuestos bioactivos que normalmente están presentes en muestras de pimentón. Tal como se ha comentado anteriormente, es bien conocido que el ardor del pimentón picante es debido a su contenido en capsinoides y capsacinoides, y además, como se ha comentado anteriormente, una de las ventajas de utilizar el analizador Orbitrap es que permite el análisis retrospectivo de los datos obtenidos. Por este motivo, se seleccionaron nueve compuestos capsacinoides y tres capsinoides que se muestran en la Tabla 3.3, y que son típicamente característicos del pimentón picante. Sin embargo, los estándares puros no estaban disponibles comercialmente para todos los compuestos seleccionados, por lo que para estos compuestos solo se tuvo en cuenta las mediciones con respecto a la masa exacta mostrada en la tabla.

Compuestos	RT (min)	Fórmula Química	Espectro HRMS		
			[M-H] <sup>-</sup> m/z Valor Calculado	[M-H] <sup>-</sup> m/z Valor experimental	Error masa Exacta (ppm)
<b>Capsacinoides</b>					
Capsaicin	13.08	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>3</sub>	304.1918	304.1912	-1.972
Dihidrocapsaicin	15.31	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub>	306.2075	306.2068	-2.286
Homocapsaicin	14.18	C <sub>19</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub>	318.2075	318.2069	-1.886
Homodihidrocapsaicin	15.18	C <sub>19</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>3</sub>	320.2231	320.2227	-1.249
Nonivamide	12.99	C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>3</sub>	292.1918	292.1913	-1.711
Norcapsaicin	12.13	C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>3</sub>	290.1762	290.1755	-2.412

Compuestos	RT (min)	Fórmula Química	Espectro HRMS		
			[M-H] <sup>-</sup> m/z Valor Calculado	[M-H] <sup>-</sup> m/z Valor experimental	Error masa Exacta (ppm)
Nordihidrocapsaicin	12.99	C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>3</sub>	292.1918	292.1913	-1.711
N-vanillil decanamida	15.31	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub>	306.2075	306.2068	-2.286
N-vanillil octanamida	11.86	C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>3</sub>	278.1762	278.1755	-2.516
<b>Capsinoides</b>					
Dihidrocapsiato	11.44	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	307.1915	307.1907	-2.6042
Capsiato	12.42	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	305.1758	305.1751	-2.2938
Nordihidrocapsiato	12.42	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	293.1758	293.175	-2.7287

**Tabla 3.3.** HRMS de los compuestos Capsinoides y Capsacinoides estudiados.

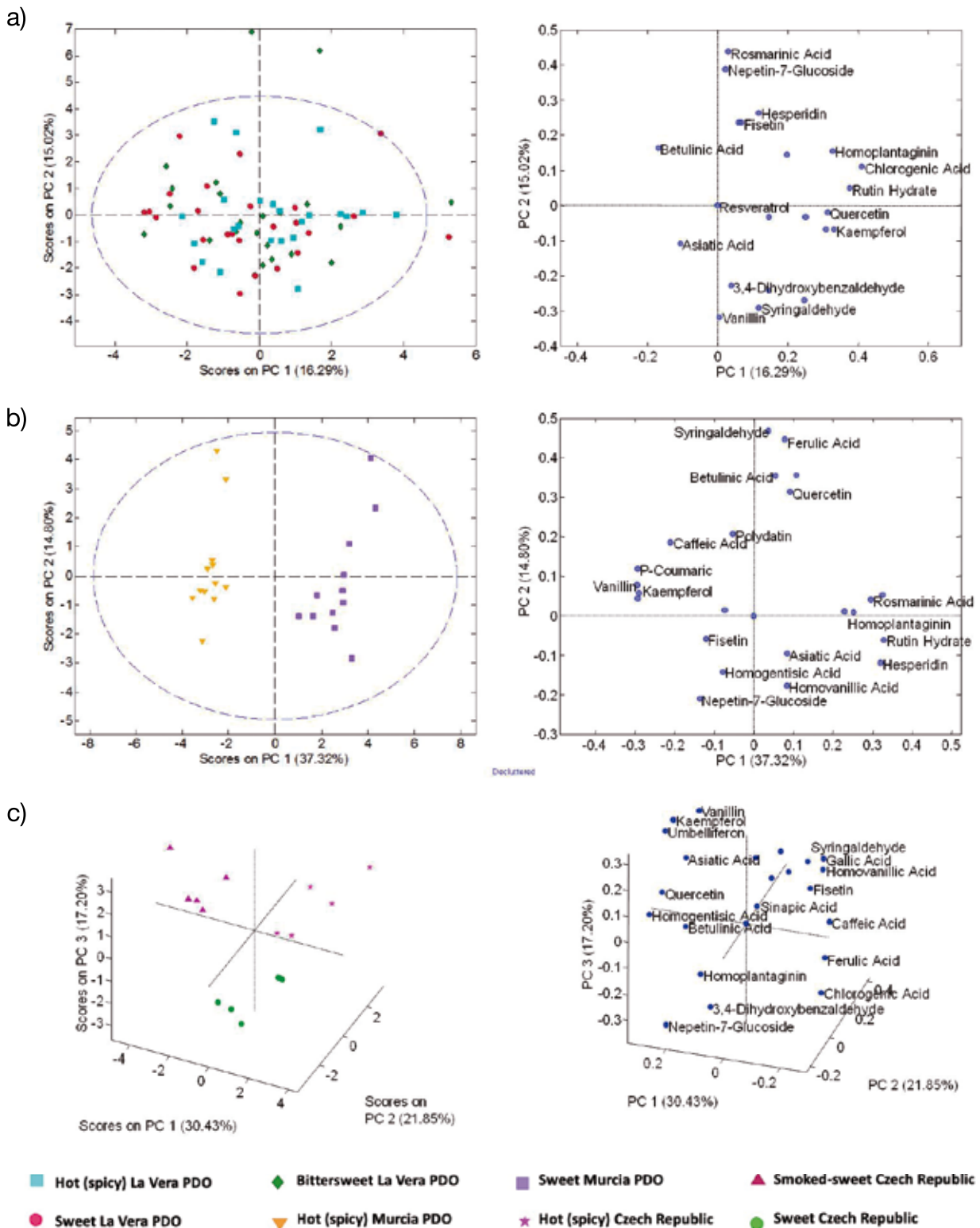
La Figura 3.13 muestra el diagrama de scores obtenido por PCA utilizando los capsacinoides, capsinoides y los polifenoles como descriptores químicos, y el método UHPLC-HRMS.



**Fig. 3.13.** Gráfico de scores (PCA) obtenido a partir del perfil polifenólico y capsaicínico utilizando el analizador Orbitrap

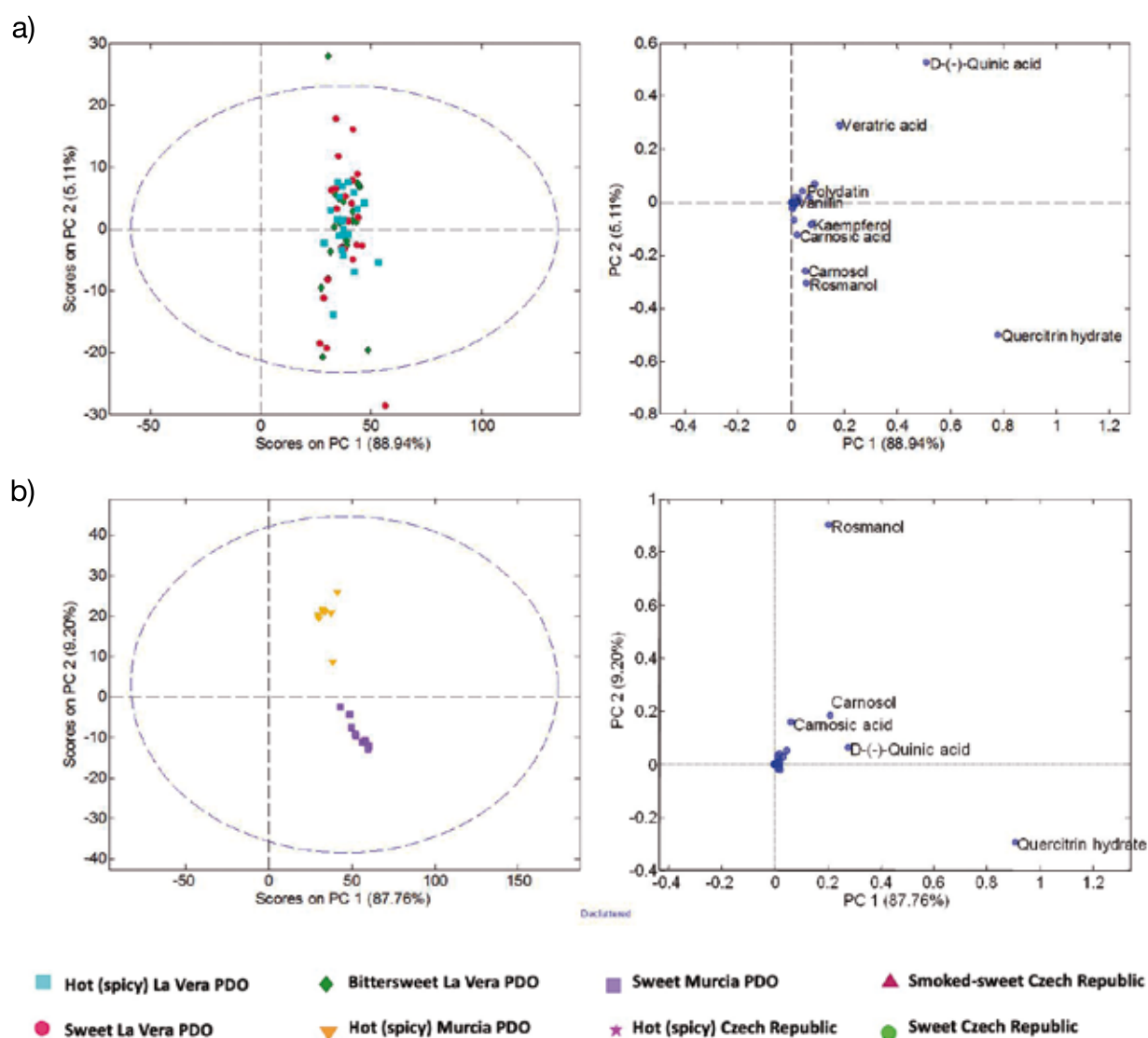
Como se puede observar en la figura, se aprecia una mejora de la clasificación y discriminación de las muestras de pimentón picantes procedentes de La Vera situadas en la parte superior con respecto a las variedades de pimentón dulce y agridulce. Esta discriminación era esperada debido al conocimiento de la presencia de estos compuestos en este tipo de muestras.

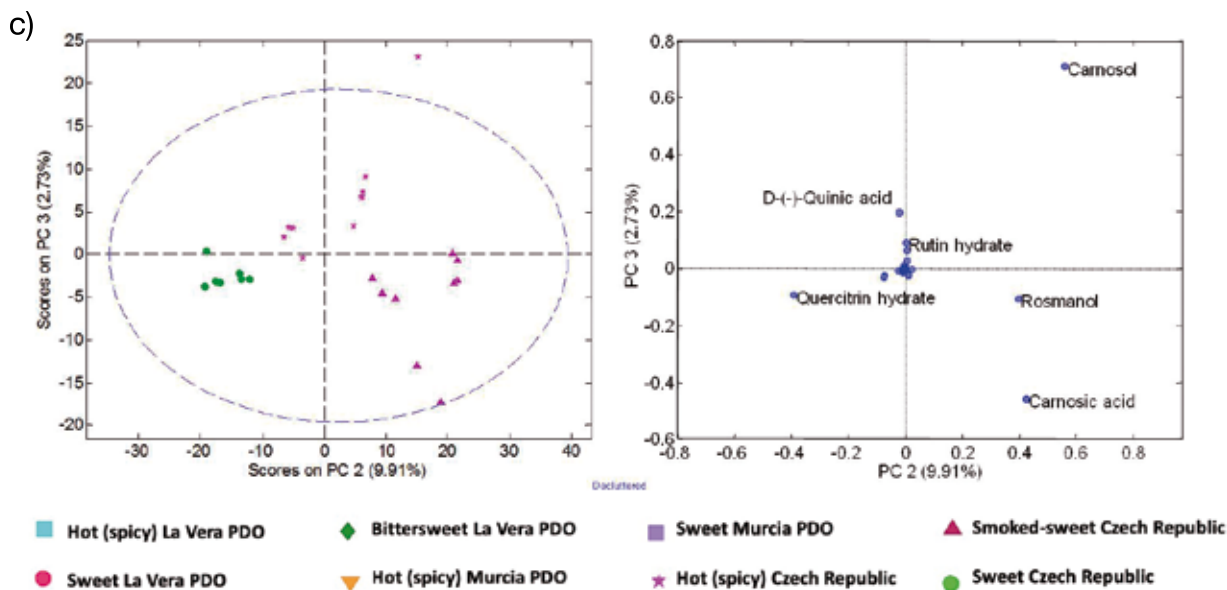
**Fig. 3.14.** Gráficos de scores y loadings obtenidos por PCA representando a) PC1 vs. PC2 para las muestras de pimentón procedentes de La Vera, b) PC1 vs. PC2 para las muestras de pimentón procedentes de Murcia, y c) PC1 vs. PC2 vs. PC3 para las muestras de pimentón procedentes de la República Checa, utilizando los perfiles polifenólicos como descriptores químicos obtenidos con el analizador de triple cuadrupolo.



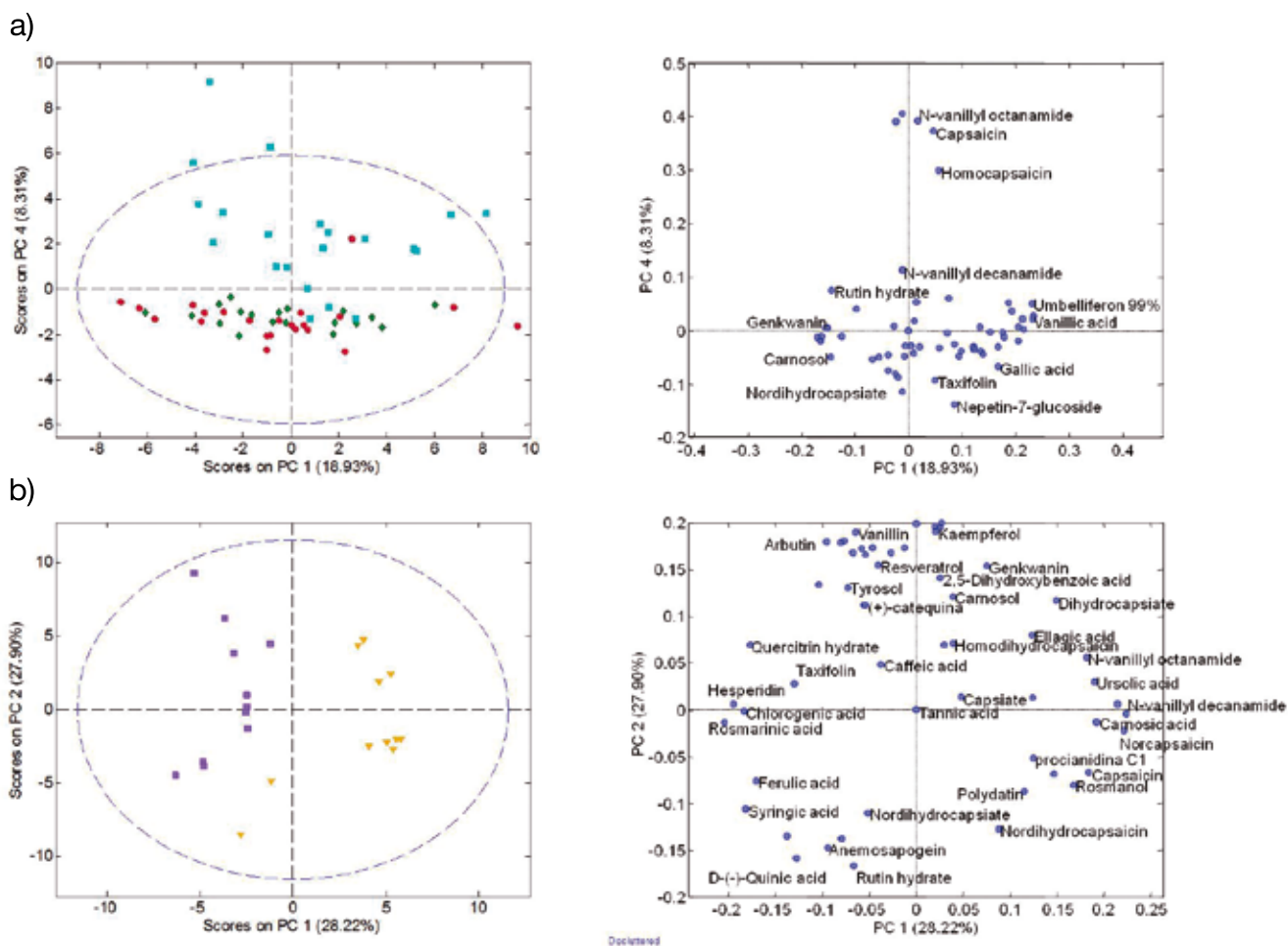
Para poder observar mejor la clasificación de las muestras, se construyeron modelos quimiométricos de PCA para cada uno de los tipos de muestras de forma independiente (La Vera, Murcia y República Checa), utilizando los cuatro métodos propuestos. Así, las Figuras 3.14, 3.15 y 3.16 muestran los diagramas PCA de scores y de loadings utilizando el perfil polifenólico obtenido con el analizador QqQ, el perfil polifenólico obtenido con el analizador Orbitrap, y la combinación de los perfiles polifenólico y capsaicínico obtenidos con el analizador Orbitrap, respectivamente, para cada grupo de muestras. La Figura 3.17 muestra, en cambio, los diagramas PCA de scores utilizando el fingerprinting metabolómico obtenido con el analizador Orbitrap.

**Fig. 3.15.** Gráficos de scores y loadings obtenidos por PCA representando a) PC1 vs. PC2 para las muestras de pimentón procedentes de La Vera, b) PC1 vs. PC2 para las muestras de pimentón procedentes de Murcia, y c) PC2 vs. PC3 para las muestras de pimentón procedentes de la República Checa, utilizando los perfiles polifenólicos como descriptores químicos obtenidos con el analizador Orbitrap.



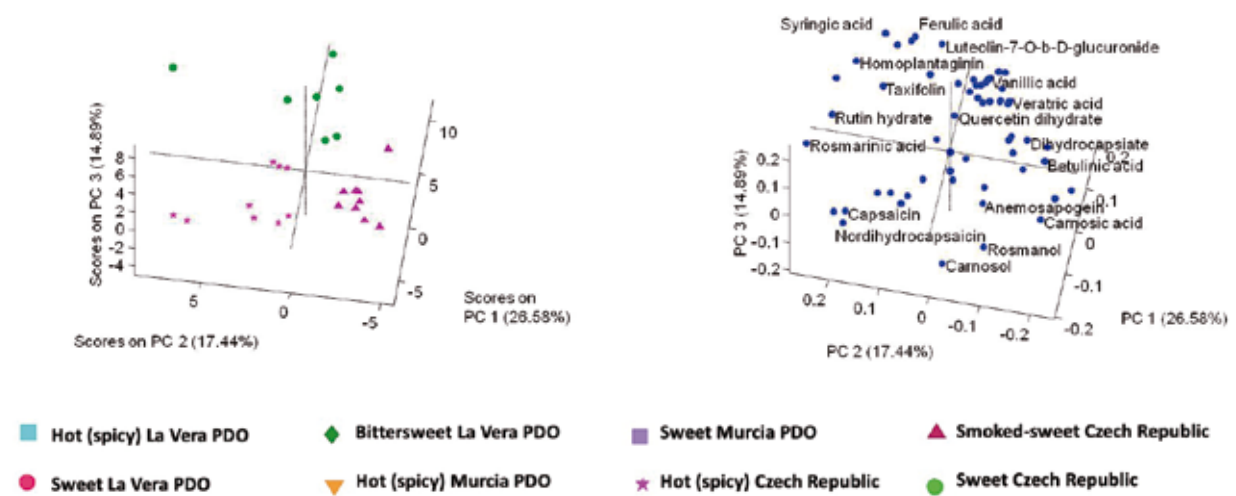


**Fig. 3.16.** Gráficos de scores y loadings obtenidos por PCA representando a) PC1 vs. PC4 para las muestras de pimentón procedentes de La Vera, b) PC1 vs. PC2 para las muestras de pimentón procedentes de Murcia, y c) PC1 vs. PC2 vs. PC3 para las muestras de pimentón procedentes de la República Checa, utilizando los perfiles polifenólicos y capsaicínicos como descriptores químicos obtenidos con el analizador Orbitrap.



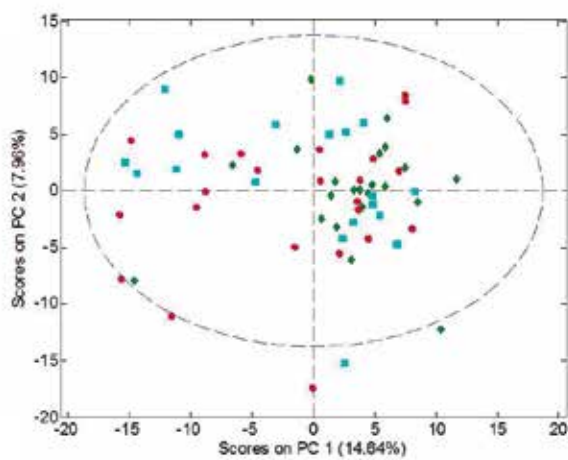


c)

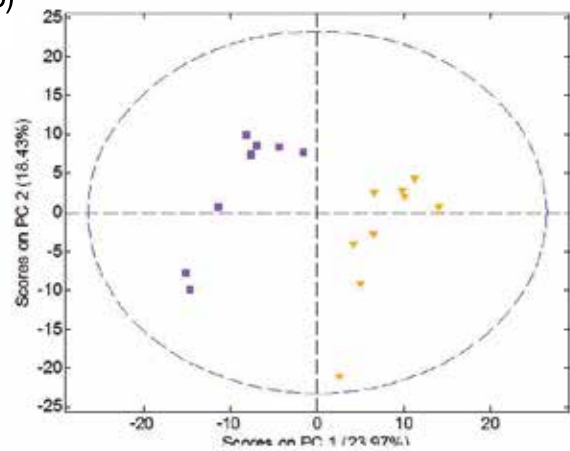


**Fig. 3.17.** Gráficos de scores obtenidos por PCA representando a) PC1 vs. PC2 para las muestras de pimentón procedentes de La Vera, b) PC1 vs. PC2 para las muestras de pimentón procedentes de Murcia, y c) PC2 vs. PC4 vs. PC5 para las muestras de pimentón procedentes de la República Checa, utilizando los perfiles metabolómicos como descriptores químicos obtenidos con el analizador Orbitrap.

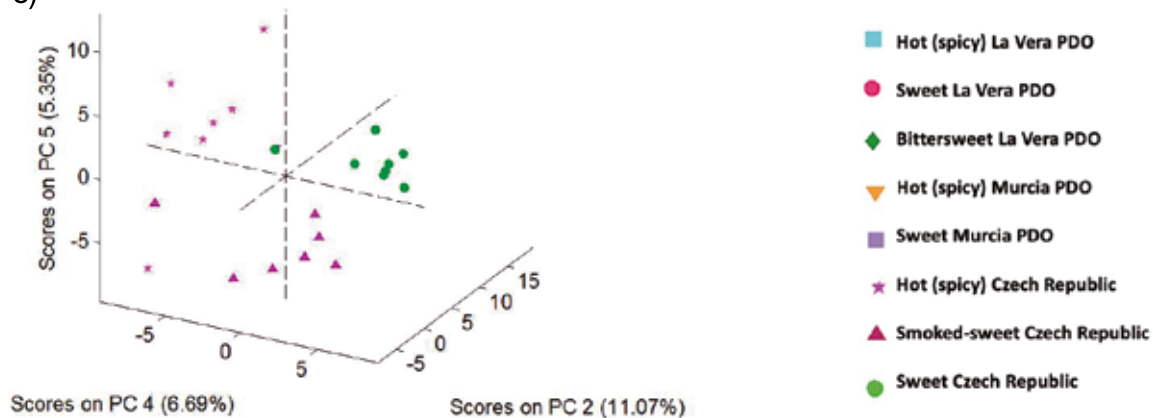
a)



b)



c)



Como se puede observar en los 4 modelos quimiométricos, las muestras procedentes de Murcia y la República Checa se discriminan claramente según su tipología. Sin embargo, según los tipos de descriptores químicos o el analizador utilizado, los compuestos polifenólicos o capsaicinicos discriminantes son diferentes, tal y como muestran los diagramas de loadings. Por ejemplo, en el caso de las muestras procedentes de Murcia podemos ver como al utilizar un analizador de triple cuadrupolo (Figura 3.14b), los polifenoles como el ácido Rosmarínico, Rutin y Hesperidin son los más determinantes en la separación de las muestras de pimentón dulce, mientras que en el caso de utilizar un analizador Orbitrap (Figura 3.15b) es el Quercitin el que muestra una mayor influencia. Por otro lado, al utilizar el perfil polifenólico y capsaicinico (Figura 3.16b) podemos observar como los capsacinodes predominan en la separación de las muestras picantes como por ejemplo la Norcapsaicina, capsaicina, N-Vanillin octanamida, N-Vanillin decanamida.

En el caso de las muestras procedentes de la República Checa, al utilizar un analizador de triple cuadrupolo (Figura 3.14c) los polifenoles predominantes en las muestras de pimentón dulce-ahumado son la Vanilina, el Kaempferol y el Umbelliferon, mientras que al utilizar el Orbitrap (Figura 3.15c) son el ácido Carnósico y el Rosmanol los más determinantes. Por otro lado, al igual que sucede en las muestras procedentes de Murcia, al utilizar el perfil polifenólico y capsaicinico (Figura 3.16c) observamos como los capsacinoides predominan en la separación de las muestras picantes, como por ejemplo la Nordihidrocapsaicina y la capsaicina.

En cuanto a las muestras procedentes de La Vera no se obtiene una separación entre los tres tipos de muestras al utilizar los perfiles metabólicomicos o polifenólicos por PCA. Sin embargo, sí se separan claramente las muestras de pimentón picantes al utilizar el perfil polifenólico y capsaicinico tal y como puede apreciarse en la Figura 3.16a. Los compuestos que más influyen en la discriminación de estas muestras son capsacinoides como el Homocapsaicin, la capsaicina y N-Vanillin octanamida.

A partir de los resultados obtenidos, podemos concluir que, aplicando los 4 métodos analíticos, tanto dirigidos como no dirigidos, el análisis quimiométrico no supervisado por componentes principales permite una discriminación de las muestras bastante aceptable en función de su procedencia y, en el caso de las muestras procedentes de Murcia y la República Checa, en función de su tipología. Además, la combinación de los perfiles polifenólicos y capsaicinicos obtenidos con un analizador de alta resolución ha permitido la discriminación de las muestras picantes procedentes de la Vera frente a las dulces y agridulces.

#### **3.5.4.2. Análisis discriminante por regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA)**

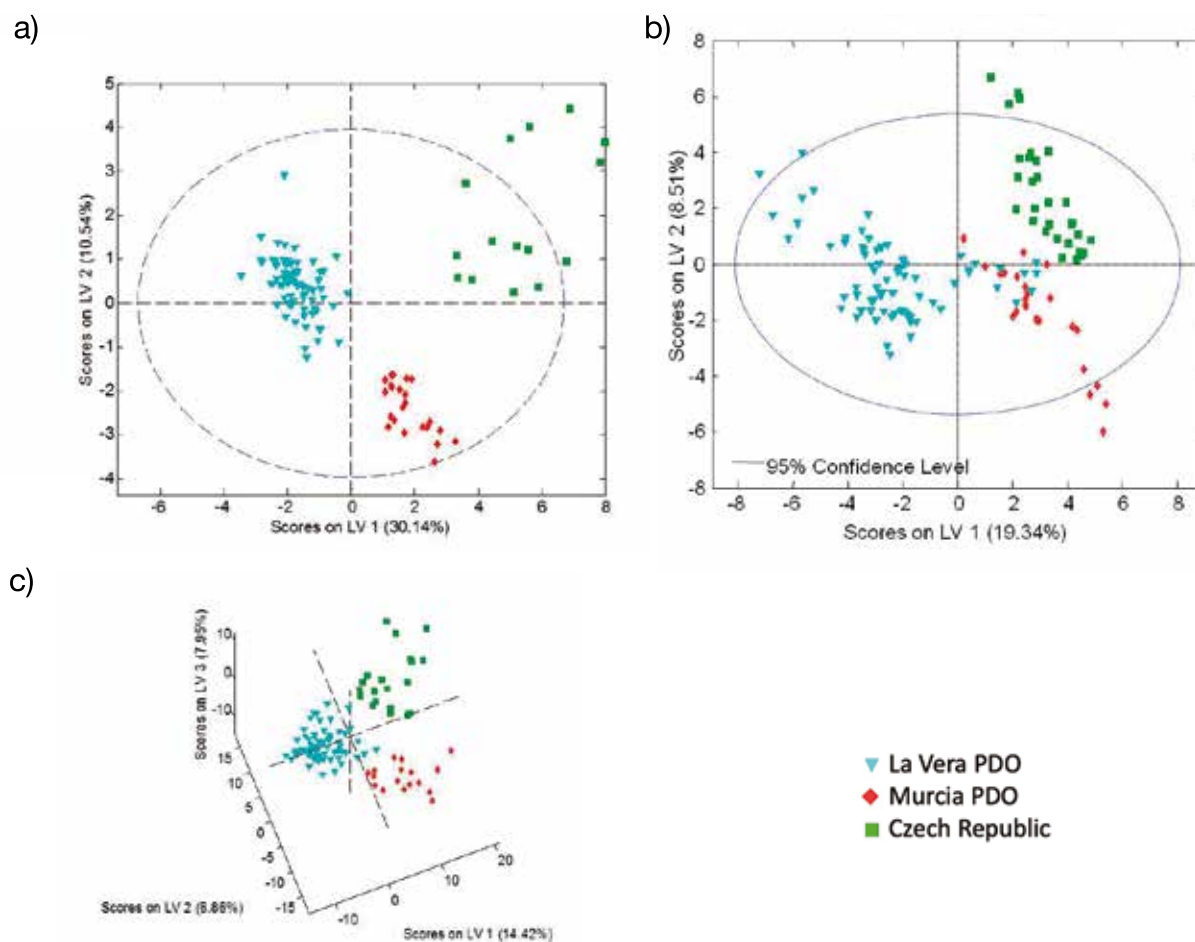
En todos los trabajos, los resultados fueron evaluados también mediante el análisis discriminante por regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), que como se ha

comentado anteriormente, es un método supervisado y, por lo tanto, se guía por información preliminar que servirá de referencia para los resultados finales objeto de estudio.

Para ese propósito, no se requirió tratamiento adicional de los datos de las matrices de datos empleadas en los estudios de PCA. Por lo tanto, la misma matriz de datos X empleada en PCA se evaluó por PLS-DA, mientras que la matriz de datos Y codificó la pertenencia de las muestras a sus clases correspondientes, es decir, productos procedentes de La Vera (dulce, agridulce y picante), procedentes de Murcia (dulce y picantes) y procedentes de la República Checa (dulce, dulce-ahumado y picante)

La Figura 3.18 muestra los diagramas de scores por PLS-DA obtenidos a partir de a) el perfil polifenólico utilizando un analizador de triple cuadrupolo (QqQ), b) a partir del perfil polifenólico utilizando un analizador Orbitrap y c) a partir del perfil metabolómico utilizando un analizador Orbitrap, teniendo en cuenta su procedencia.

**Fig. 3.18.** Gráfico de scores (PLS-DA) obtenido a partir de a) el perfil polifenólico utilizando QqQ, b) el perfil polifenólico utilizando Orbitrap y c) perfil metabolómico utilizando Orbitrap, teniendo en cuenta su procedencia.

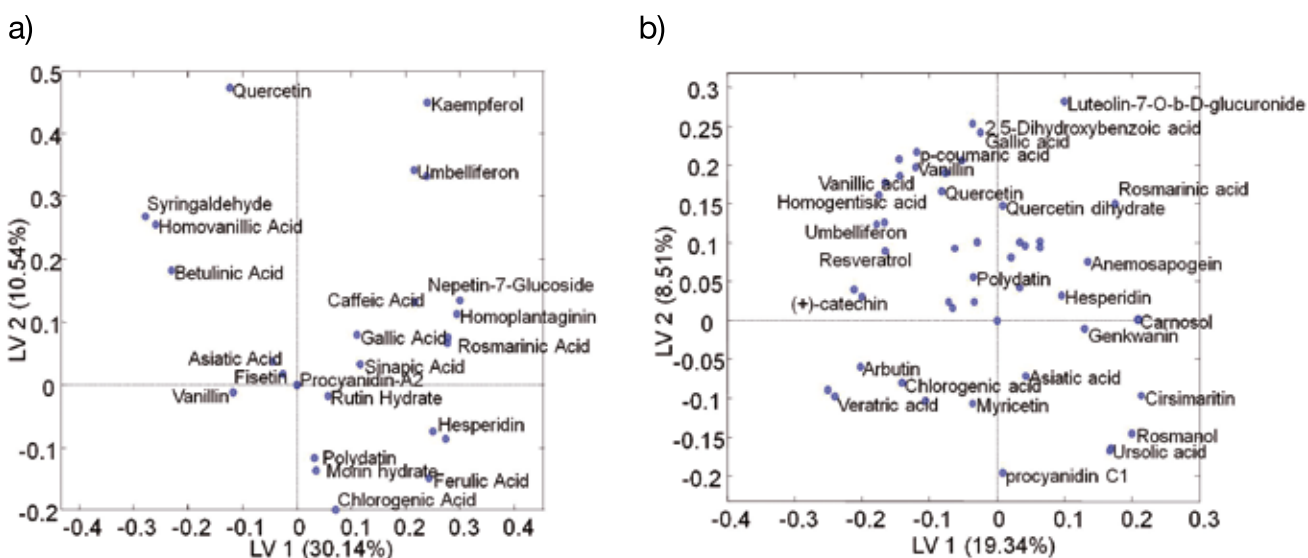


Como se puede observar en la Figura 3.18 en los tres diagramas de scores se obtiene una separación aceptable entre las muestras procedentes de La Vera, Murcia y la República Checa. En todos los casos, las muestras procedentes de La Vera se encuentran en la parte izquierda del diagrama, mientras que las de Murcia están situadas abajo a la derecha y las de la República Checa están situadas arriba a la derecha.

No obstante, cabe mencionar que en el gráfico de scores obtenido a partir del perfil polifenólico mediante QqQ, varias muestras de DOP La Vera y DOP de Murcia se mezclaron, aunque las muestras de pimentón español se discriminaron por completo de las producidas en la República Checa.

Por otro lado, la Figura 3.19 muestra los diagramas de loadings que permiten conocer, para los dos métodos dirigidos, qué polifenoles son los más relevantes en la separación de las muestras de pimentón según su procedencia.

**Fig. 3.19.** Gráfico de loadings (PLS-DA) obtenido a partir de a) el perfil polifenólico utilizando QqQ y b) el perfil polifenólico utilizando Orbitrap, teniendo en cuenta su procedencia.



Tal y como muestran los gráficos de la Figura 3.19, los compuestos polifenólicos discriminantes son diferentes según el analizador. Los polifenoles que más contribuyen a la separación de las muestras procedentes de La Vera utilizando un analizador de triple cuadrupolo son el ácido Homovanillico, ácido Betunílico y el Siringaldehido, mientras que al utilizar un analizador Orbitrap son el Resveratrol, la Catequina, Umberiferon o ácido homogenticico, entre otros. En el caso de las muestras procedentes de Murcia, al utilizar un analizador triple cuadrupolo los polifenoles que más contribuyen son el Polidatín, ácido ferulico, Morin o el ácido clorogénico, mientras que al utilizar un analizador Orbitrap

obtenemos que los polifenoles que más contribuyen a la separación son el ácido Ursólico y el Rosmanol. Por último, en el caso de las muestras procedentes de la República Checa, al utilizar un analizador de triple cuadrupolo los polifenoles que más contribuyen son el Kaemferol y Umberiferon, mientras que con el analizador Orbitrap son el ácido Gálico, Luteolin o el ácido Rosmámico, entre otros.

Según los gráficos de scores mostrados en la Figura 3.18, los tres métodos propuestos parecen ser apropiados para la clasificación y autenticación de las muestras de pimentón según su procedencia (La Vera, Murcia y República Checa). Es por este motivo que, para demostrar la aplicabilidad de cada metodología propuesta, se estudió la tasa de clasificación para algunos modelos PLS-DA emparejados:

- La Vera DOP vs. las otras muestras.
- DOP de Murcia vs. las otras muestras.
- República Checa vs. otras muestras.

Para este propósito, el modelo PLS-DA fue construido con un conjunto de calibración compuesto por el 70% de las muestras que pertenecen a cada clase, mientras que el otro 30% de las muestras se utilizaron como el conjunto de prueba para fines de predicción. Las gráficas obtenidas en cada una de las pruebas están recogidas en las publicaciones IV, V y VI.

Los resultados obtenidos en las tres metodologías propuestas se resumen en la Tabla 3.4.

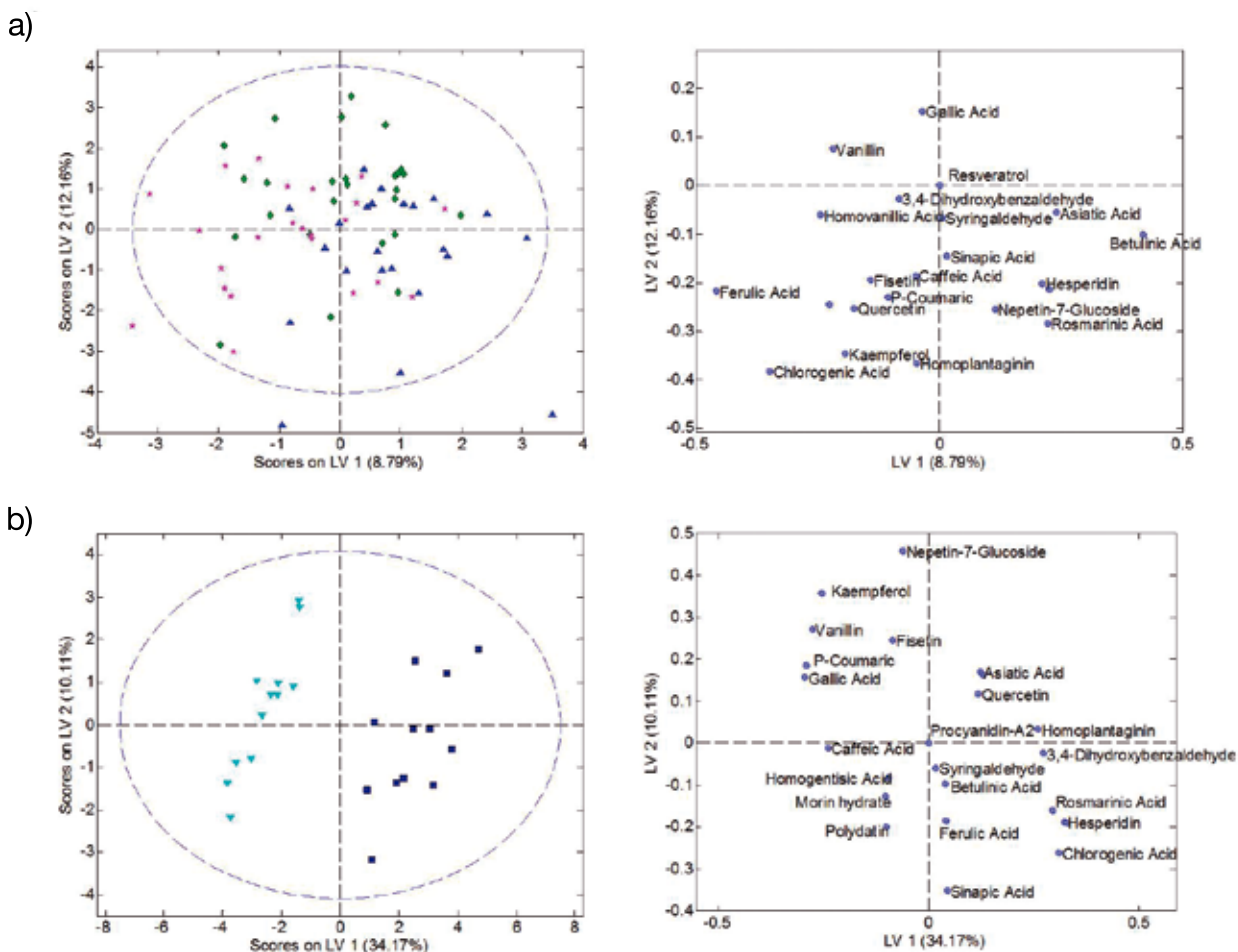
	<b>QqQ Polifenólico</b>	<b>Orbitrap Polifenólico</b>	<b>Orbitrap Metabolómico</b>
La Vera DOP vs. las otras muestras	100%	82%	100%
DOP de Murcia vs. las otras muestras	100%	86%	100%
República Checa vs. otras muestras	100%	100%	100%

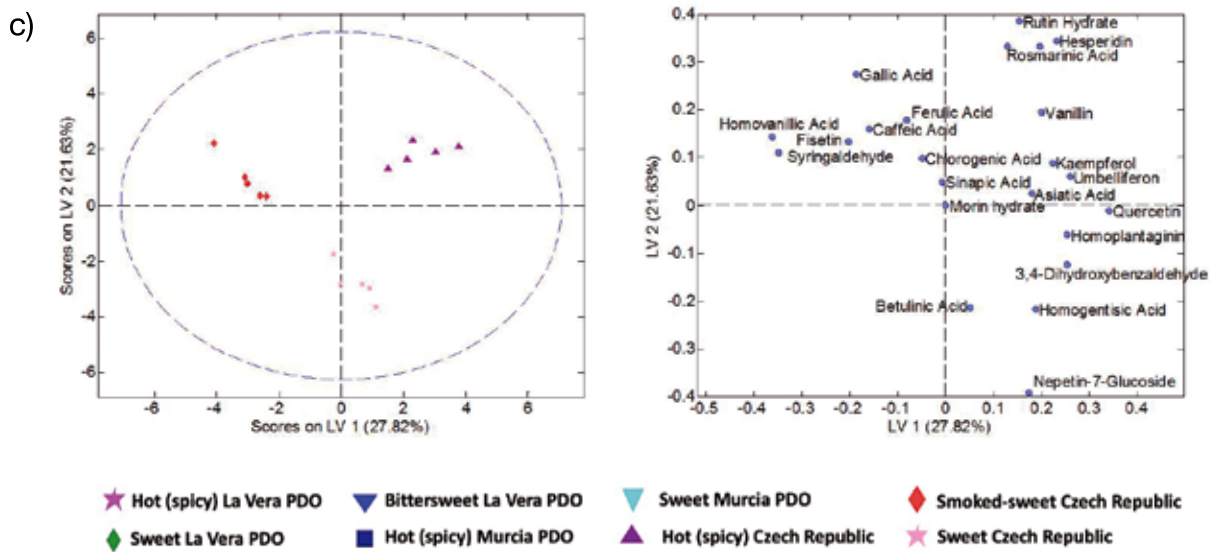
**Tabla 3.4.** Porcentajes de clasificación obtenidos en las tres metodologías propuestas.

Los resultados de la Tabla 3.4 indican que los tres métodos propuestos son adecuados para la clasificación y autenticación de las muestras de pimentón. El perfil polifenólico mediante triple cuadrupolo y el perfil metabolómico consiguen un 100% de clasificación de todas las muestras. Sin embargo, al aplicar el perfil polifenólico mediante Orbitrap, no se clasificaron correctamente el 100% de las muestras pertenecientes a La Vera o Murcia, frente al resto de muestras, respectivamente. Esto era de esperar, ya que no se consiguió una discriminación completa de estas muestras, tal y como se observa en el gráfico de scores de la Figura 3.20. Sin embargo, teniendo en cuenta el tipo de muestras y su variabilidad, esta tasa de clasificación se puede considerar aceptable.

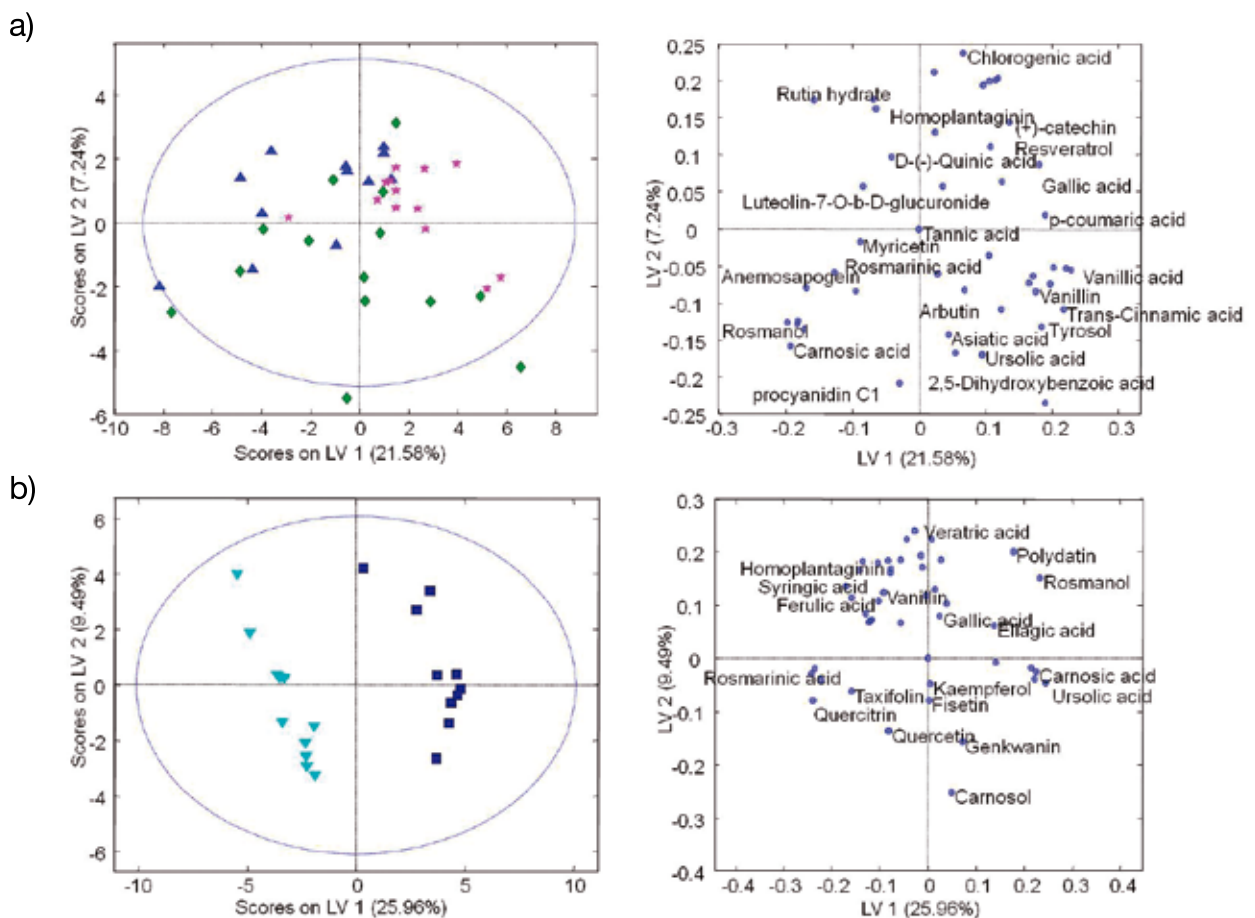
Por otro lado, y de manera similar a lo realizado con los modelos quimiométricos de PCA, se construyeron también 4 modelos quimiométricos específicos teniendo en cuenta la tipología de las muestras dentro de una misma procedencia (La Vera, Murcia y República Checa), para cada uno de los métodos utilizados, y algunos resultados se resumen en las siguientes figuras. Así, las Figuras 3.20 y 3.21 muestran los diagramas PLS-DA de scores y loadings utilizando los perfiles polifenólicos obtenidos con los analizadores QqQ y Orbitrap, respectivamente, para las muestras de pimentón en función de su tipología. La Figura 3.22 muestra el diagrama PLS-DA de scores para las muestras de Pimentón de la Vera combinando los perfiles polifenólicos y capsaicinoicos obtenidos con el analizador Orbitrap. Finalmente, la Figura 3.23 muestra los diagramas PLS-DA de scores para los tres grupos de muestra utilizando como descriptores químicos de las mismas los perfiles metabólicos obtenidos con el Orbitrap.

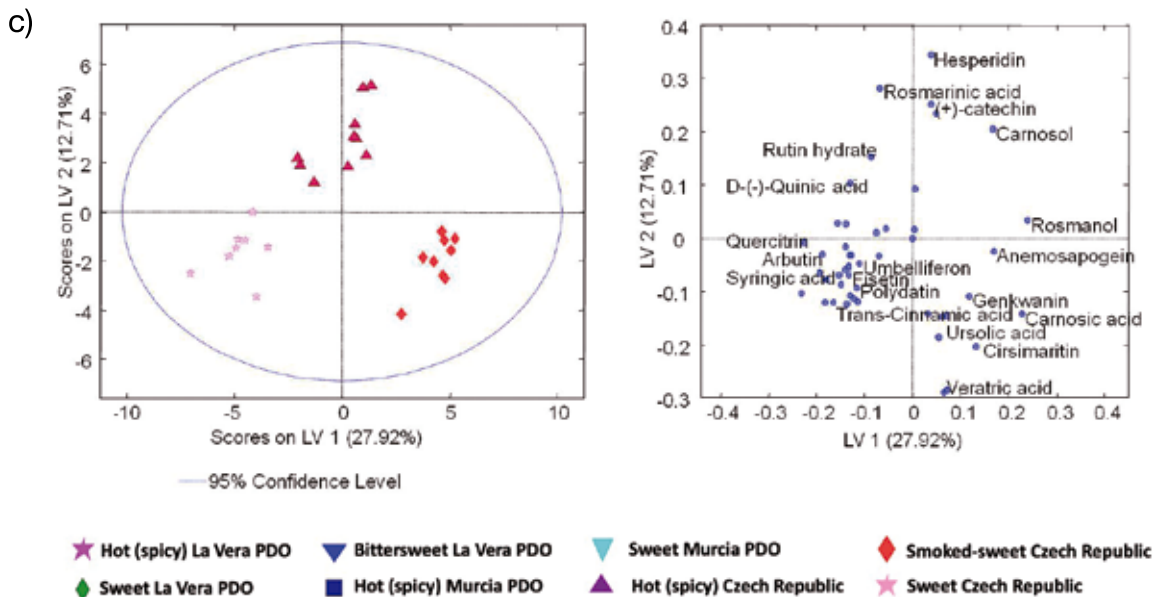
**Fig. 3.20.** Gráficos de scores y loadings obtenidos por PLS-DA representando a) LV1 vs. LV2 para las muestras de pimentón procedentes de La Vera, b) LV1 vs. LV2 para las muestras de pimentón procedentes de Murcia, y c) LV1 vs. LV2 para las muestras de pimentón procedentes de la República Checa, utilizando los perfiles polifenólicos como descriptores químicos obtenidos con el analizador de triple cuadrupolo.



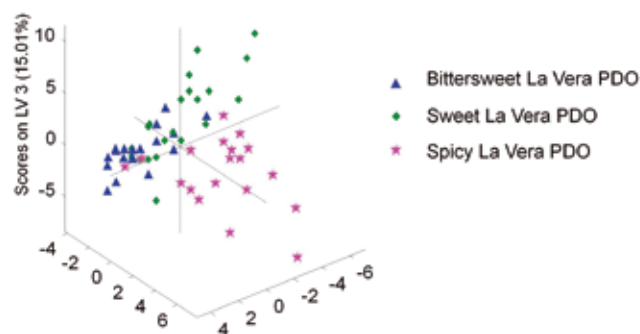


**Fig. 3.21.** Gráficos de scores y loadings obtenidos por PLS-DA representando a) LV1 vs. LV2 para las muestras de pimentón procedentes de La Vera, b) LV1 vs. LV2 para las muestras de pimentón procedentes de Murcia, y c) LV1 vs. LV2 para las muestras de pimentón procedentes de la República Checa, utilizando los perfiles polifenólicos como descriptores químicos obtenidos con el analizador Orbitrap.

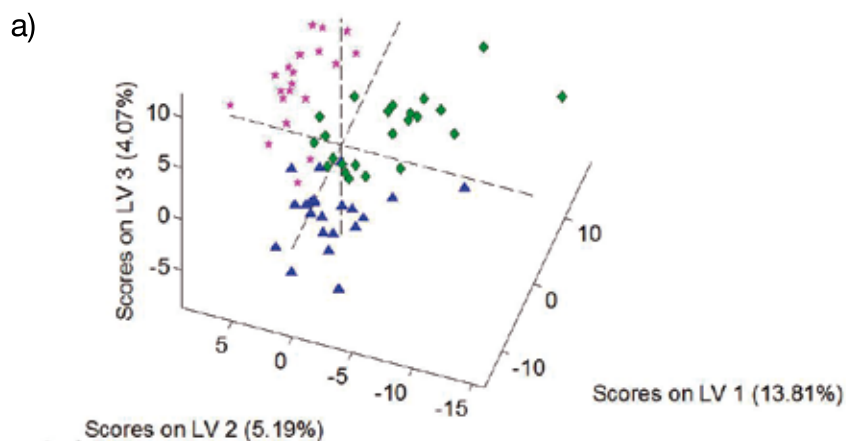




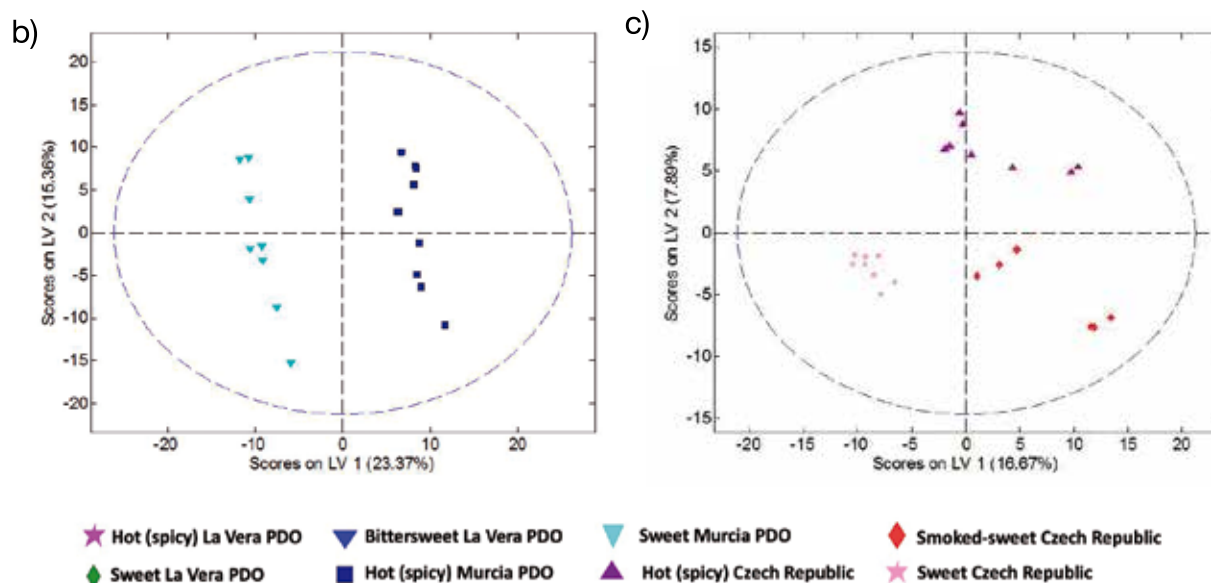
**Fig. 3.22.** Gráfico de scores (PLS-DA) obtenido a partir del perfil polifenólico y capsaicínico utilizando el analizador Orbitrap, para las muestras de La Vera.



**Fig. 3.23.** Gráficos de scores obtenidos por PLS-DA representando a) LV1 vs. LV2 vs. LV3 para las muestras de pimentón procedentes de La Vera, b) LV1 vs. LV2 para las muestras de pimentón procedentes de Murcia, y c) LV1 vs. LV2 para las muestras de pimentón procedentes de la República Checa, utilizando el perfil metabólico como descriptores químicos obtenidos con el analizador Orbitrap.







Los resultados mostrados en las Figuras 3.20, 3.21, 3.22 y 3.23 han sido ampliamente discutidos de manera individual en las publicaciones IV, V y VI.

Brevemente, las muestras procedentes de Murcia y de la República Checa se consiguen separar en todos los casos, tal y como muestran los gráficos b) y c) de las Figuras 3.20, 3.21 y 3.23.

No obstante, el punto más resaltable se tiene para las muestras procedentes de la Vera, ya a que según los descriptores químicos y el analizador utilizado se obtienen resultados diferentes. Al aplicar el perfil polifenólico no se obtiene ninguna discriminación entre las muestras dulces, agritudles o picantes, tal y como muestran las Figuras 3.20a y 3.21a. Por otro lado, la Figura 3.22 muestra que al aplicar el perfil polifenólico y capsaicinico, se pueden discriminar las muestras picantes, que como se ha comentado anteriormente era un resultado esperado. Sin embargo, no se obtiene una discriminación satisfactoria entre las muestras dulces y agritudles. Finalmente, al aplicar el perfil metabolómico obtenemos una muy buena discriminación entre los tres tipos de muestras, tal y como se observa en la Figura 3.23. Aunque estrictamente la discriminación no es al 100% perfecta, estos resultados son muy aceptables teniendo en cuenta que todas estas muestras se producen en una región muy pequeña, en comparación con los otros grupos de pimentón analizados.

Por tanto, a partir de los resultados obtenidos, podemos concluir que, aplicando los métodos analíticos evaluados, tanto dirigidos como no dirigidos, el análisis quimiométrico supervisado PLS-DA permite la clasificación y autenticación de las muestras en función de su procedencia. Por otro lado, también permite la discriminación en función de su tipología, en el caso de las muestras procedentes de Murcia y la República Checa. Por último, en el caso de las muestras procedentes de La Vera, el perfil polifenólico y capsaicinico permite la clasificación de las muestras picantes, mientras que el perfil metabolómico permite la clasificación, casi perfecta, de los tres tipos de muestras estudiados.



# CAPÍTULO 4

# CONCLUSIONES



# CONCLUSIONES

Las conclusiones de la presente tesis se han dividido en dos bloques. El primero dedicado a los métodos utilizados con las muestras de arándano rojo Americano y el segundo dedicado a los métodos empleados con las muestras de pimentón.

## 4.1. Arándano rojo Americano

### 4.1.1. Método dirigido por LC-HRMS

Se ha desarrollado un método analítico por cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC-HRMS) para el análisis simultáneo de 53 compuestos fenólicos (flavonoides y no flavonoides) con el fin de establecer un método rápido y fiable para la caracterización y autenticación de preparaciones farmacéuticas.

- Se ha creado una base de datos de polifenoles personalizada a partir de los tiempos de retención, errores de masa exacta, patterns isotópicos y espectros de masas (HRMS y MS/HRMS), utilizando patrones de los polifenoles estudiados.
- Se han analizado muestras de diversas frutas (arándano rojo Americano, arándano azul, uva y frambuesa), con diferente tipología (pasas de fruta, zumos), así como productos farmacéuticos comerciales, tales como extractos naturales, cápsulas, sobres y jarabes.
- La adquisición de datos del perfil polifenólico de las muestras analizadas se realizó en modo full scan ( $m/z$  100-1500), caracterizando los polifenoles estudiados y el perfil polifenólico de las muestras analizadas.

- Las muestras se clasificaron según el fruto de origen, mediante un análisis multivariante (PCA), para lograr la autenticación de los productos.
- Se han identificado los polifenoles más discriminantes para cada clase de muestra, que podrían ser propuestos como futuros biomarcadores.
- Se han adulterado muestras de arándano rojo con diferentes concentraciones de uva, arándano azul o frambuesa y se aplicó un método desarrollado por PLS para determinar su porcentaje de adulteración, obteniendo errores de predicción entre el 2.71 y 5.96% aplicado a concentraciones de adulteración del 2.5 ,6 y 12%.

#### **4.1.2. Método no dirigido por LC-HRMS**

Se ha desarrollado un método para caracterizar, clasificar y autenticar productos naturales y farmacéuticos con base de arándanos empleando cromatografía líquida-espectrometría de masas de alta resolución (LC-HRMS) aplicando métodos de análisis no dirigidos con un instrumento Q-Exactive Orbitrap (Thermo Fisher Scientific).

- Se ha obtenido el perfil de las huellas metabolómicas de las muestras analizadas a partir de los datos obtenidos en modo full scan con una resolución 70.000FWHM (anchura completa a media altura).
- Se utilizaron muestras de acetonitrilo como blanco y una mezcla de todas las muestras analizadas como control de calidad.
- Se han aplicado filtros específicos para corregir y mejorar la calidad de la señales de los espectros de masas.
- Se utilizaron los perfiles de huellas metabolómicas como descriptores químicos para lograr la caracterización y clasificación de las muestras mediante análisis de componentes principales (PCA), obteniendo una buena clasificación en función de la fruta de origen.
- Se han adulterado muestras de arándano rojo con diferentes concentraciones de uva, arándano azul o frambuesa. Los datos fueron tratados posteriormente por regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) para determinar los porcentajes de adulteración en extractos de arándano-fruta, obteniendo errores de predicción en un rango del 0.17 al 3.86%.

Como conclusión final de este estudio, se puede decir que las dos estrategias desarrolladas han permitido caracterizar y clasificar las muestras analizadas en función de la fruta de origen, así como cuantificar fraudes con unos errores de predicción y de cuantificación inferiores al 10%, incluso para niveles bajos de adulteración (2%).

## 4.2. Pimentón

### 4.2.1. Método dirigido por LC-LRMS

Se ha desarrollado un método analítico por cromatografía líquida de ultra elevada eficacia acoplada a la espectrometría de masas en tándem (UHPLC-ESI-MS/MS) utilizando un analizador QqQ para la determinación de 36 compuestos fenólicos (flavonoides y no flavonoides) con el fin de establecer un método rápido y fiable para la caracterización, clasificación y autenticación de muestras de pimentón basándonos en el perfil polifenólico.

- Se han obtenido las curvas de Señal vs Energía de colisión, lo que ha permitido evaluar la fragmentación de los polifenoles estudiados y, para cada polifenol, se ha escogido una transición de cuantificación y otra de confirmación para poder trabajar en modo MRM.
- Se han establecido los parámetros de calidad instrumentales del método UHPLC-ESI-MS/MS propuesto, obteniendo resultados satisfactorios de límites de detección ( $0,01-1357 \text{ mg L}^{-1}$ ), linealidad en el intervalo de trabajo ( $R^2 \geq 0,995$ ), repetibilidad (% RSD <15%), reproducibilidad (% RSD <20%) y veracidad (% error relativo inferior a 15%).
- Se han analizado un total de 111 muestras de pimentón con DOP, de diferente procedencia (La Vera, Murcia y República Checa) y diferente tipología (dulce, agridulce y picante). Para cada muestra, se han obtenido los perfiles polifenólicos correspondientes.
- Los perfiles polifenólicos obtenidos se han utilizado como descriptores químicos para conseguir la caracterización, clasificación y autenticación de las muestras analizadas mediante análisis de componentes principales (PCA) y análisis discriminante con regresión de mínimos cuadrados (PLS-DA), consiguiendo una buena discriminación entre las muestras en función de la DOP y la variedad.
- Para demostrar la aplicabilidad de la estrategia se validó el método aplicando el modelo PLS-DA y comparando entre sí las muestras en función de su procedencia,

obteniendo excelentes resultados con una tasa de clasificación del 100% con los tres modelos PLS-DA.

#### **4.2.2. Método dirigido por LC-HRMS**

Se ha desarrollado un método UHPLC-HRMS dirigido, utilizando un analizador Orbitrap, para abordar la clasificación y autenticación de muestras de pimentón en función de las regiones de producción y variedades de sabor, a partir del perfil polifenólico y capsaicinoico.

- Se analizaron un total de 126 muestras de pimentón, pertenecientes a la DOP La Vera, Murcia (España) y la República Checa, utilizando la metodología propuesta, después de aplicar un procedimiento de extracción de muestra simple con agua:acetonitrilo 20:80 (v/v) como agente extractante.
- Como primer enfoque, se monitorearon 53 polifenoles y compuestos fenólicos utilizando el software TraceFinder™ v3.3 (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, EE. UU.), empleando una base de datos de masa exacta previamente establecida.
- Los perfiles polifenólicos han sido utilizados como descriptores químicos para conseguir la caracterización, clasificación y autenticación de las muestras analizadas mediante PCA y PLS-DA obteniéndose una buena discriminación entre las muestras en función de su DOP.
- Para demostrar la aplicabilidad de la estrategia, se validó el método aplicando el modelo PLS-DA y comparando entre sí las muestras en función de su procedencia, obteniendo excelentes resultados con una tasa de clasificación del 82% con las muestras procedentes de La Vera, un 86% con las muestras procedentes de Murcia y de un 100% para las muestras procedentes de la República Checa.
- Para las muestras procedentes de Murcia y de la República Checa se obtuvo, además, una buena discriminación en función de su tipología.
- Para mejorar la clasificación de las muestras de pimentón de La Vera, se obtuvo el perfil capsaicinoico monitorizando 12 compuestos que posteriormente también se emplearon como descriptores químicos, junto con los perfiles polifenólicos, obteniéndose finalmente una buena discriminación de las muestras picantes de La Vera con respecto las muestras dulces y agridulces.



### 4.2.3. Método no dirigido por LC-HRMS

Se ha desarrollado un método UHPLC-HRMS (Orbitrap) para la caracterización, clasificación y autenticación de muestras de pimentón, utilizando un enfoque no dirigido, a partir del perfil metabolómico.

- Se han obtenido los perfiles metabolómicos de las muestras analizadas a partir de los datos en modo full scan con una resolución de 70000FWHM (anchura completa a media altura).
- Los datos de huellas digitales basados en las intensidades de la señal en función de los valores de  $m/z$  y los tiempos de retención, se registraron en modo negativo, utilizando un analizador de masas de alta resolución q-Orbitrap.
- El perfil metabolómico se ha utilizado como descriptor químico para conseguir la caracterización, clasificación y autenticación de las muestras analizadas aplicado métodos supervisados y no supervisados como PLS-DA y PCA, respectivamente.
- Los perfiles metabolómicos resultaron ser excelentes descriptores químicos de las muestras analizadas para lograr la autenticación de las regiones de procedencia de las muestras de pimentón, con tasas de clasificación de muestra del 100% por PLS-DA.
- El perfil metabolómico obtenido permitió discriminar perfectamente entre las diferentes tipologías del pimentón (dulce, agridulce y picante) en todos los casos estudiados, incluso en el caso de la DOP La Vera.

Aplicando los métodos analíticos desarrollados, tanto dirigidos como no dirigidos, el análisis quimiométrico supervisado PLS-DA permite la clasificación y autenticación de las muestras en función de su procedencia. Además, también permite la discriminación en función de su tipología, en el caso de las muestras procedentes de Murcia y la República Checa. En el caso de las muestras procedentes de La Vera, el perfil polifenólico y capsaicínico permite la clasificación de las muestras picantes y el perfil metabolómico permite la clasificación de los tres tipos de muestras estudiados.



# BIBLIOGRAFÍA



## BIBLIOGRAFÍA

- [1] P. Lucci, J. Saurina, O. Núñez, Trends in LC-MS and LC-HRMS analysis and characterization of polyphenols in food, *TrAC Trends Anal. Chem.* 88 (2017) 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.12.006>.
- [2] S. Barbosa, N. Pardo-Mates, L. Puignou, O. Núñez, The Role of Polyphenols and Polyphenolic Fingerprinting Profiles in the Characterization and Authentication of Natural Food Products, in: *Adv. Chem. Res. Vol. 40*, 2017: pp. 1–58.
- [3] A.C. Raclariu, C.E. Țebrencu, M.C. Ichim, O.T. Ciupercă, A.K. Brysting, H. de Boer, What's in the box? Authentication of Echinacea herbal products using DNA metabarcoding and HPTLC, *Phytomedicine.* 44 (2018) 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.03.058>.
- [4] Real Decreto 1345/2007, del 11 de octubre, por el que se regula el procedimiento de autorización, registro y condiciones de dispensación de los medicamentos de uso humano fabricados industrialmente., *BOE.* 265 (2007) 45626.
- [5] Consejo de la union europea, Reglamento (CE) N 510/2006 del consejo de 20 de marzo de 2006 sobre la proteccion de las indicaciones geograficas y de las denominaciones de origen en los productos agricolas y alimenticios, *D. Of. La Union Eur.* (2006) 12–25.
- [6] S. Kamiloglu, Authenticity and traceability in beverages, *Food Chem.* 277 (2019) 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.091>.
- [7] J.C. Moore, J. Spink, M. Lipp, Development and Application of a Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration from 1980 to 2010, *J. Food Sci.* 77 (2012). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02657.x>.

- [8] T. Rocha, J.S. Amaral, M.B.P.P. Oliveira, Adulteration of Dietary Supplements by the Illegal Addition of Synthetic Drugs: A Review, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 15 (2016) 43–62. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12173>.
- [9] DIRECTIVA 2002/46/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DE CONSEJO de 10 de junio de 2002 relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de complementos alimenticios., *D. Of. La Unión Eur.* 183 (2002) 51–57.
- [10] D. Granato, D. Bursać Kovačević, I. Žuntar, J. Kosić-Vukšić, A. Krivohlavek, P. Putnik, Pharmacological and toxicological health risk of food (herbal) supplements adulterated with erectile dysfunction medications, *Curr. Opin. Food Sci.* 24 (2018) 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.10.012>.
- [11] R. SHAH, A. KAUR, S. SINGH, B. PRASAD, V. GOHIL, A. SAVALIYA, Strategies for characterizing sildenafil, vardenafil, tadalafil and their analogues in herbal dietary supplements, and detecting counterfeit products containing these drugs, *TrAC Trends Anal. Chem.* 28 (2008) 13–28. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.09.004>.
- [12] L. Vaclavik, A.J. Krynitsky, J.I. Rader, Mass spectrometric analysis of pharmaceutical adulterants in products labeled as botanical dietary supplements or herbal remedies: A review, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 6767–6790. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8159-z>.
- [13] R. Johnson, Food fraud and “Economically motivated adulteration” of food and food ingredients, *Food Fraud Adulterated Ingredients Background, Issues, Fed. Action.* (2014) 1–56. <https://doi.org/10.1177/014860717700100306>.
- [14] I. Durán Merás, J. Domínguez Manzano, D. Airado Rodríguez, A. Muñoz de la Peña, Detection and quantification of extra virgin olive oil adulteration by means of autofluorescence excitation-emission profiles combined with multi-way classification, *Talanta.* 178 (2018) 751–762. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.095>.
- [15] L. Holmberg, Wine fraud, *Int. J. Wine Res.* 2 (2010) 105–113. <https://doi.org/10.2147/IJWR.S14102>.
- [16] M. Lees, *Food Authenticity and Traceability*, Eurofins S, Nantes, France, n.d.
- [17] I.A. Khan, A.G. Osman, S. Haider, Z. Ali, V. Raman, A.G. Chittiboyina, Overview of Analytical Tools for the Identification of Adulterants in Commonly Traded Herbs and Spices, *J. AOAC Int.* (2019). <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0389>.

- [18] P. Galvin-King, S.A. Haughey, C.T. Elliott, Herb and spice fraud; the drivers, challenges and detection, *Food Control*. 88 (2018) 85–97.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.12.031>.
- [19] T.K.T. Do, F. Hadji-Minaglou, S. Antoniotti, X. Fernandez, Authenticity of essential oils, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 66 (2015) 146–157.  
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.10.007>.
- [20] M. Cocchi, E. Salvatore, F. Marini, A. Marchetti, A. de Juan, Determination of phenolic compounds and authentication of PDO Lambrusco wines by HPLC-DAD and chemometric techniques, *Anal. Chim. Acta.* 761 (2012) 34–45.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.015>.
- [21] D.I. Ellis, H. Muhamadali, S.A. Haughey, C.T. Elliott, R. Goodacre, Point-and-shoot: Rapid quantitative detection methods for on-site food fraud analysis-moving out of the laboratory and into the food supply chain, *Anal. Methods*. 7 (2015) 9401–9414.  
<https://doi.org/10.1039/c5ay02048d>.
- [22] R. Rocchi, M. Mascini, M. Sergi, D. Compagnone, D. Mastrocola, P. Pittia, Crocins pattern in saffron detected by UHPLC-MS/MS as marker of quality, process and traceability, *Food Chem.* 264 (2018) 241–249.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.111>.
- [23] N.Z. Ballin, K.H. Laursen, To target or not to target? Definitions and nomenclature for targeted versus non-targeted analytical food authentication, *Trends Food Sci. Technol.* 86 (2018) 537–543. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.025>.
- [24] C. Guillem, N. Nerea, N. Oscar, The role of liquid chromatography-Mass spectrometry in food integrity and authenticity, in: 2019.
- [25] Y. Chen, Z. Zhao, H. Chen, T. Yi, M. Qin, Z. Liang, Chemical differentiation and quality evaluation of commercial Asian and American ginsengs based on a UHPLC-QTOF/MS/MS metabolomics approach, *Phytochem. Anal.* 26 (2015) 145–160.  
<https://doi.org/10.1002/pca.2546>.
- [26] N.Z. Ballin, K.H. Laursen, To target or not to target? Definitions and nomenclature for targeted versus non-targeted analytical food authentication, *Trends Food Sci. Technol.* 86 (2019) 537–543. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.025>.
- [27] Y. Liu, E.E.D. Todd, Q. Zhang, J. Shi, X. Liu, Recent developments in the detection of melamine, *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 13 (2012) 525–532.  
<https://doi.org/10.1631/jzus.b1100389>.

- [28] C. Xiu, K.K. Klein, Melamine in milk products in China: Examining the factors that led to deliberate use of the contaminant, *Food Policy*. 35 (2010) 463–470. <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2010.05.001>.
- [29] S. Turnipseed, C. Casey, C. Nochetto, D.N. Heller, Determination of Melamine and Cyanuric Acid Residues in Infant Formula using LC-MS/MS, *FDA Lab. Inf. Bull. LIB No. 4421*. 24 (2008) online.
- [30] G.P. Danezis, A.S. Tsagkaris, F. Camin, V. Brusic, C.A. Georgiou, Food authentication: Techniques, trends & emerging approaches, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 85 (2016) 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.026>.
- [31] S. Barbosa, N. Pardo-Mates, M. Hidalgo-Serrano, J. Saurina, L. Puignou, O. Núñez, UHPLC-HRMS (orbitrap) fingerprinting in the classification and authentication of cranberry-based natural products and pharmaceuticals using multivariate calibration methods, *Anal. Methods*. (2019). <https://doi.org/10.1039/C9AY00636B>.
- [32] J.P. Antignac, F. Courant, G. Pinel, E. Bichon, F. Monteau, C. Elliott, B. Le Bizec, Mass spectrometry-based metabolomics applied to the chemical safety of food, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 292–301. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.11.003>.
- [33] E.M. Sánchez-Salcedo, M. Tassotti, D. Del Rio, F. Hernández, J.J. Martínez, P. Mena, (Poly)phenolic fingerprint and chemometric analysis of white (*Morus alba* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry leaves by using a non-targeted UHPLC-MS approach, *Food Chem.* 212 (2016) 250–255. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.121>.
- [34] M.D. Gallidabino, R.C. Irlam, M.C. Salt, M. O'Donnell, M.S. Beardah, L.P. Barron, Targeted and non-targeted forensic profiling of black powder substitutes and gunshot residue using gradient ion chromatography – high resolution mass spectrometry (IC-HRMS), *Anal. Chim. Acta.* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.04.048>.
- [35] L. Cuadros-Rodríguez, C. Ruiz-Samblás, L. Valverde-Som, E. Pérez-Castaño, A. González-Casado, Chromatographic fingerprinting: An innovative approach for food “identification” and food authentication - A tutorial, *Anal. Chim. Acta.* 909 (2016) 9–23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.12.042>.



- [36] S. Esslinger, J. Riedl, C. Fauhl-Hassek, Potential and limitations of non-targeted fingerprinting for authentication of food in official control, *Food Res. Int.* 60 (2014) 189–204. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.015>.
- [37] M.M. Koek, R.H. Jellema, J. van der Greef, A.C. Tas, T. Hankemeier, Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: Status and perspectives, *Metabolomics*. 7 (2011) 307–328. <https://doi.org/10.1007/s11306-010-0254-3>.
- [38] J. Riedl, S. Esslinger, C. Fauhl-Hassek, Review of validation and reporting of non-targeted fingerprinting approaches for food authentication, *Anal. Chim. Acta.* 885 (2015) 17–32. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.06.003>.
- [39] G. Oms-Oliu, I. Odriozola-Serrano, O. Martín-Belloso, Metabolomics for assessing safety and quality of plant-derived food, *Food Res. Int.* 54 (2013) 1172–1183. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.04.005>.
- [40] J.-L. Wolfender, S. Rudaz, Y.H. Choi, H.K. Kim, Plant metabolomics: from holistic data to relevant biomarkers., *Curr. Med. Chem.* 20 (2013) 1056–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23210790>.
- [41] J.H. Knox, Practical Aspects of LC Theory, *J. Chromatogr. Sci.* 15 (1977) 352–364.
- [42] D. Guillarme, J.-L. Veuthey, Theory and Practice of UHPLC and UHPLC–MS, Elsevier Inc., 2017. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811732-3.00001-7>.
- [43] S. Fekete, J. Schappler, J.L. Veuthey, D. Guillarme, Current and future trends in UHPLC, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 63 (2014) 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.08.007>.
- [44] S. Fekete, G. Davy, M.W. Dong, Superficially Porous Particles: Perspectives, Practices, and Trends, *LCGC North Am.* 32 (2014) 420–433.
- [45] E. De hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry. Principles and applications.*, 2007.
- [46] M.K. Parr, B. Wüst, J. Teubel, J.F. Joseph, Splitless hyphenation of SFC with MS by APCI, APPI, and ESI exemplified by steroids as model compounds, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1091 (2018) 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.05.017>.

- [47] L. Parets, É. Alechaga, O. Núñez, J. Saurina, S. Hernández-Cassou, L. Puignou, Ultrahigh pressure liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometry for the determination of polyphenolic profiles in the characterization and classification of cranberry-based pharmaceutical preparations and natural ext, *Anal. Methods*. 8 (2016) 4363–4378. <https://doi.org/10.1039/C6AY00929H>.
- [48] K.J. Siebert, Chemometrics in Brewing, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 59 (2001) 147–156.
- [49] M. Esteki, J. Simal-Gandara, Z. Shahsavari, S. Zandbaaf, E. Dashtaki, Y. Vander Heyden, A review on the application of chromatographic methods, coupled to chemometrics, for food authentication, *Food Control*. 93 (2018) 165–182. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.06.015>.
- [50] H. Messai, M. Farman, A. Sarraj-Laabidi, A. Hammami-Semmar, N. Semmar, Chemometrics Methods for Specificity, Authenticity and Traceability Analysis of Olive Oils: Principles, Classifications and Applications, *Foods*. 5 (2016) 77. <https://doi.org/10.3390/foods5040077>.
- [51] D. Granato, P. Putnik, D.B. Kovačević, J.S. Santos, V. Calado, R.S. Rocha, A.G. Da Cruz, B. Jarvis, O.Y. Rodionova, A. Pomerantsev, Trends in Chemometrics: Food Authentication, Microbiology, and Effects of Processing, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 17 (2018) 663–677. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12341>.
- [52] M. Guijarro-Díez, M. Castro-Puyana, A.L. Crego, M.L. Marina, A novel method for the quality control of saffron through the simultaneous analysis of authenticity and adulteration markers by liquid chromatography-(quadrupole-time of flight)-mass spectrometry, *Food Chem.* 228 (2017) 403–410. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.015>.
- [53] T.F. McGrath, S.A. Haughey, J. Patterson, C. Fauhl-Hassek, J. Donarski, M. Alewijn, S. van Ruth, C.T. Elliott, What are the scientific challenges in moving from targeted to non-targeted methods for food fraud testing and how can they be addressed? – Spectroscopy case study, *Trends Food Sci. Technol.* 76 (2018) 38–55. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.04.001>.
- [54] B.F. De Simón, M. Sanz, E. Cadahía, J. Martínez, E. Esteruelas, A.M. Muñoz, Polyphenolic compounds as chemical markers of wine ageing in contact with cherry, chestnut, false acacia, ash and oak wood, *Food Chem.* 143 (2014) 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.096>.

- [55] S. Barbosa, N. Pardo-Mates, M. Hidalgo-Serrano, J. Saurina, L. Puignou, O. Nuñez, Detection and Quantitation of Frauds in the Authentication of Cranberry-Based Extracts by UHPLC-HRMS (Orbitrap) Polyphenolic Profiling and Multivariate Calibration Methods, *J. Agric. Food Chem.* 66 (2018) acs.jafc.8b02855. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02855>.
- [56] J. Guo, Y. Yuan, P. Dou, T. Yue, Multivariate statistical analysis of the polyphenolic constituents in kiwifruit juices to trace fruit varieties and geographical origins, *Food Chem.* 232 (2017) 552–559. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.037>.
- [57] L. Sun, G. You, X. Cao, M. Wang, X. Ren, Comparative investigation for raw and processed *Aconiti Lateralis Radix* using chemical UPLC-MS profiling and multivariate classification techniques, *J. Food Drug Anal.* 27 (2019) 365–372. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.10.006>.
- [58] L. Puigventós, M. Navarro, É. Alechaga, O. Núñez, J. Saurina, S. Hernández-Cassou, L. Puignou, Determination of polyphenolic profiles by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry for the authentication of fruit extracts, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 597–608. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8298-2>.
- [59] J. Zhang, Q. Yu, H. Cheng, Y. Ge, H. Liu, X. Ye, Y. Chen, Metabolomic Approach for the Authentication of Berry Fruit Juice by Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry Coupled to Chemometrics, *J. Agric. Food Chem.* 66 (2018) 8199–8208. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01682>.
- [60] S.Z. Mudric, U.M. Gašić, A.M. Dramicanin, I.Z. Ciric, D.M. Milojkovic-Opsenica, J.B. Popovic-Dordevic, N.M. Momirovic, Z.L. Tešić, The polyphenolics and carbohydrates as indicators of botanical and geographical origin of Serbian autochthonous clones of red spice paprika, *Food Chem.* 217 (2017) 705–715. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.038>.
- [61] R. Megías-Pérez, S. Grimbs, R.N. D'Souza, H. Bernaert, N. Kuhnert, Profiling, quantification and classification of cocoa beans based on chemometric analysis of carbohydrates using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry, *Food Chem.* 258 (2018) 284–294. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.026>.
- [62] D. Zhu, L. Nyström, Differentiation of rice varieties using small bioactive lipids as markers, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 117 (2015) 1578–1588. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201500089>.

- [63] S. Mi, K. Shang, X. Li, C.H. Zhang, J.Q. Liu, D.Q. Huang, Characterization and discrimination of selected China's domestic pork using an LC-MS-based lipidomics approach, *Food Control*. 100 (2019) 305–314. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.02.001>.
- [64] M. Guijarro-Díez, M. Castro-Puyana, A.L. Crego, M.L. Marina, Detection of saffron adulteration with gardenia extracts through the determination of geniposide by liquid chromatography–mass spectrometry, *J. Food Compos. Anal.* 55 (2017) 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.11.004>.
- [65] J. Rubert, O. Lacina, M. Zachariasova, J. Hajslova, Saffron authentication based on liquid chromatography high resolution tandem mass spectrometry and multivariate data analysis, *FOOD Chem.* 204 (2016) 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.003>.
- [66] D. Cavanna, L. Righetti, C. Elliott, M. Suman, The scientific challenges in moving from targeted to non-targeted mass spectrometric methods for food fraud analysis: A proposed validation workflow to bring about a harmonized approach, *Trends Food Sci. Technol.* 80 (2018) 223–241. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.007>.
- [67] USP Pharmacopeial Convention, *Guid. Dev. Validating Nontargeted Methods Adulteration Detect.* (2016) Appendix XVIII.
- [68] R. Díaz, H. Gallart-Ayala, J. V. Sancho, O. Nuñez, T. Zamora, C.P.B. Martins, F. Hernández, S. Hernández-Cassou, J. Saurina, A. Checa, Told through the wine: A liquid chromatography-mass spectrometry interplatform comparison reveals the influence of the global approach on the final annotated metabolites in non-targeted metabolomics, *J. Chromatogr. A.* 1433 (2016) 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.010>.
- [69] C. Black, S.A. Haughey, O.P. Chevallier, P. Galvin-King, C.T. Elliott, A comprehensive strategy to detect the fraudulent adulteration of herbs: The oregano approach, *Food Chem.* 210 (2016) 551–557. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.004>.
- [70] A.K. Subbaraj, Y.H.B. Kim, K. Fraser, M.M. Farouk, A hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry (HILIC-MS) based metabolomics study on colour stability of ovine meat, *Meat Sci.* 117 (2016) 163–172. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.02.028>.

- [71] M.J. Cichon, K.M. Riedl, S.J. Schwartz, A metabolomic evaluation of the phytochemical composition of tomato juices being used in human clinical trials, *Food Chem.* 228 (2017) 270–278. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.118>.
- [72] R. Pérez-Míguez, E. Sánchez-López, M. Plaza, M. Castro-Puyana, M.L. Marina, A non-targeted metabolomic approach based on reversed-phase liquid chromatography–mass spectrometry to evaluate coffee roasting process, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 7859–7870. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1405-z>.
- [73] M.J. Martínez Bueno, F.J. Díaz-Galiano, Ł. Rajska, V. Cutillas, A.R. Fernández-Alba, A non-targeted metabolomic approach to identify food markers to support discrimination between organic and conventional tomato crops, *J. Chromatogr. A.* 1546 (2018) 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.03.002>.
- [74] D.K. Trivedi, K.A. Hollywood, N.J.W. Rattray, H. Ward, D.K. Trivedi, J. Greenwood, D.I. Ellis, R. Goodacre, Meat, the metabolites: An integrated metabolite profiling and lipidomics approach for the detection of the adulteration of beef with pork, *Analyst.* 141 (2016) 2155–2164. <https://doi.org/10.1039/c6an00108d>.
- [75] Z. Jandrić, A. Cannavan, An investigative study on differentiation of citrus fruit/fruit juices by UPLC-QToF MS and chemometrics, *Food Control.* 72 (2017) 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.12.031>.
- [76] G. D'Urso, M. Maldini, G. Pintore, L. d'Aquino, P. Montoro, C. Pizza, Characterisation of *Fragaria vesca* fruit from Italy following a metabolomics approach through integrated mass spectrometry techniques, *LWT - Food Sci. Technol.* 74 (2016) 387–395. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.061>.
- [77] D. Cavanna, D. Catellani, C. Dall'asta, M. Suman, Egg product freshness evaluation: A metabolomic approach, *J. Mass Spectrom.* 53 (2018) 849–861. <https://doi.org/10.1002/jms.4256>.
- [78] B. Popping, E. De Dominicis, M. Dante, M. Nocetti, Identification of the Geographic Origin of Parmigiano Reggiano (P.D.O.) Cheeses Deploying Non-Targeted Mass Spectrometry and Chemometrics, *Foods.* 6 (2017) 13. <https://doi.org/10.3390/foods6020013>.

- [79] G.D. Urso, G. Sarais, C. Lai, C. Pizza, P. Montoro, LC-MS based metabolomics study of different parts of myrtle berry from Sardinia ( Italy ), 7 (2017) 217–229. <https://doi.org/10.3233/JBR-170158>.
- [80] M. Guijarro-díez, L. Nozal, M.L. Marina, A.L. Crego, Metabolomic fingerprinting of saffron by LC / MS : novel authenticity markers, (2015) 7197–7213. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8882-0>.
- [81] A.E. Johnson, K.L. Sidwick, V.R. Pirgozliev, A. Edge, D.F. Thompson, Metabonomic Profiling of Chicken Eggs during Storage Using High-Performance Liquid Chromatography-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 90 (2018) 7489–7494. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01031>.
- [82] N.P. Kalogiouri, R. Aalizadeh, N.S. Thomaidis, Application of an advanced and wide scope non-target screening workflow with LC-ESI-QTOF-MS and chemometrics for the classification of the Greek olive oil varieties, *Food Chem.* 256 (2018) 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.101>.
- [83] H. Gallart-ayala, M.A. Kamleh, S. Hernández-cassou, J. Saurina, A. Checa, Ultra-high-performance liquid chromatography – high-resolution mass spectrometry based metabolomics as a strategy for beer characterization, (2016) 430–436. <https://doi.org/10.1002/jib.340>.
- [84] J. Rubert, K. Hurkova, M. Stranska, J. Hajslova, Untargeted metabolomics reveals links between Tiger nut ( *Cyperus esculentus* L .) and its geographical origin by metabolome changes associated with membrane lipids, *Food Addit. Contam. Part A.* 35 (2018) 1861–1869. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1400694>.
- [85] Z. Xin, S. Ma, D. Ren, W. Liu, B. Han, Y. Zhang, J. Xiao, UPLC – Orbitrap – MS / MS combined with chemometrics establishes variations in chemical components in green tea from Yunnan and Hunan origins, *Food Chem.* 266 (2018) 534–544. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.056>.
- [86] M. Xu, S. Heidmarsson, M. Thorsteinsdottir, M. Kreuzer, J. Hawkins, Authentication of Iceland Moss ( *Cetraria islandica* ) by UPLC-QToF-MS chemical pro fi ling and DNA barcoding, 245 (2018) 989–996. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.073>.
- [87] S. Ma, L. Chen, J. Li, Z. Wang, Z. Xin, Y. Zhang, D. Ren, Characterization and authentication of *Acori Tatarinowii* Rhizoma and its adulterants by UPLC-Orbitrap-MS / MS chromatographic fi ngerprints , elements pro fi les and chemometric

- methods, *Microchem. J.* 144 (2019) 285–295. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.09.017>.
- [88] W. Dai, D. Xie, M. Lu, P. Li, H. Lv, C. Yang, Q. Peng, Y. Zhu, L. Guo, Y. Zhang, J. Tan, Z. Lin, Characterization of white tea metabolome : Comparison against green and black tea by a nontargeted metabolomics approach, *Food Res. Int.* 96 (2017) 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.028>.
- [89] A. Shevchuk, L. Jayasinghe, N. Kuhnert, Differentiation of black tea infusions according to origin , processing and botanical varieties using multivariate statistical analysis of LC-MS data, *Food Res. Int.* 109 (2018) 387–402. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.059>.
- [90] R. Xiao, Y. Ma, D. Zhang, L. Qian, Discrimination of conventional and organic rice using untargeted LC-MS- based metabolomics, *J. Cereal Sci.* 82 (2018) 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.05.012>.
- [91] L. Sun, M. Wang, H. Zhang, Y. Liu, Comprehensive analysis of *Polygoni Multiflori Radix* of different geographical origins using ultra- high-performance liquid chromatography fingerprints and multivariate chemometric methods, 6 (2016) 0–9. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.11.009>.
- [92] S.P. Vander Kloet, *The Genus Vaccinium*, 1988.
- [93] S.P. Vander Kloet, T.A. Dickinson, A subgeneric classification of the genus *Vaccinium* and the metamorphosis of *V.* section *Bracteata* Nakai: More terrestrial and less epiphytic in habit, more continental and less insular in distribution, *J. Plant Res.* 122 (2009) 253–268. <https://doi.org/10.1007/s10265-008-0211-7>.
- [94] L. Villar, *Vaccinium L.* In: Castroviejo, S., Aedo, C., Laínz, M., Muñoz Garmendia, F., Nieto Feliner, G., Paiva, J. & Benedí, C. (eds.) *Flora Ibérica* 4: 519. Real Jardín Botánico, CSIC. Madrid., 2003.
- [95] El cultivo del arandano rojo en el norte de España.pdf, (n.d.).
- [96] J.I. De Sebastián Palomares, Los frutos del bosque o pequeños frutos en la cornisa cantábrica: el arándano, Consejería de Desarrollo Rural Ganadería Pesca y Biodiversidad, 2010. <https://doi.org/978-84-693-9406-9>.
- [97] M. Nusstein, Fuente: iNaturalist; <https://www.inaturalist.org/photos/42161676>. Licencia: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>, (n.d.).

- [98] K. Feghali, M. Feldman, V.D. La, J. Santos, D. Grenier, Cranberry proanthocyanidins: Natural weapons against periodontal diseases, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 5728–5735. <https://doi.org/10.1021/jf203304v>.
- [99] G.-O. Song, J. Hancock, *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*, Kole, Chit, 2011.
- [100] D. Allais, La canneberge d'Amérique, *Actual. Pharm.* 48 (2009) 53–55. [https://doi.org/10.1016/s0515-3700\(09\)70021-7](https://doi.org/10.1016/s0515-3700(09)70021-7).
- [101] H.V. Kuhnlein, N.J. Turner, *Traditional plant foods of Canadian indigenous peoples: nutrition, botany and use*, Food and N, 1991. <https://doi.org/10.5860/choice.29-6359>.
- [102] B. Schlautman, G. Covarrubias-Pazarán, L. Rodríguez-Bonilla, K. Hummer, N. Bassil, T. Smith, J. Zalapa, Genetic diversity and cultivar variants in the NCGR cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Aiton) collection, *J. Genet.* 97 (2018) 1339–1351. <https://doi.org/10.1007/s12041-018-1036-3>.
- [103] E. Szwonek, R. Maciorowski, B. Koziński, K. Smolarz, L. Sas-Paszt, H. Bryk, E. Derkowska, E. Estabrooks, Initial growth and yield structure of selected cultivars of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) cultivated on mineral soils, *Folia Hortic.* 28 (2016) 77–86. <https://doi.org/10.1515/fhort-2016-0009>.
- [104] J. Kops, F.W. Van Eaden, *Flora Batava of Afbeelding en Beschrijving van Nederlandsche Gewassen*, Vol.14, Leiden, Netherlands., 1849.
- [105] W. Aiton, F.A. Bauer, G.D. Ehret, G. Nicol, J. Sowerby, *Hortus Kewensis, or, A catalogue of the plants cultivated in the Royal Botanic Garden at Kew /by William Aiton ...*, *Hortus Kewensis, or, A Cat. Plants Cultiv. R. Bot. Gard. Kew /by William Ait. ...* (2011). <https://doi.org/10.5962/bhl.title.4504>.
- [106] Z. Gudžinskas, L. Petrulaitis, L. Arlikevičiūtė, *Vaccinium Macrocarpon – A new Alien Plant Species in Lithuania*, *Bot. Lith.* 20 (2014) 41–45. <https://doi.org/10.2478/botlit-2014-0005>.
- [107] D.H. Tutin, T G Heywood, V H Burges, N A Valentine, *Flora Europaea*, 1981.
- [108] S. Porse, Fuente: Own photo, taken in Jutland. <https://es.m.wikipedia.org/wiki/Archivo:Vaccinium-macrocarpon-total.JPG>. Licencia: [https://commons.wikimedia.org/wiki/Commons:GNU\\_Free\\_Documentation\\_License,\\_version\\_1.2](https://commons.wikimedia.org/wiki/Commons:GNU_Free_Documentation_License,_version_1.2). Sin modificaciones., (n.d.).



- [109] K.K. Girard, N.K. Sinha, Cranberry, Blueberry, Currant, and Gooseberry, in: Y.H. Hui (Ed.), *Handb. Fruits Fruit Process.*, 2012.
- [110] L.A. Comisi, P. Europeo, P. Europeo, REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) 2018/1631 DE LA COMISIÓN de 30 de octubre de 2018, 2018 (2018).
- [111] European Parliament, DIRECTIVA 2002/46/CE relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de complementos alimenticios, (2002) 51–57.  
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002L0046&from=ES>.
- [112] K.K. Girard, N.K. Sinha, and Gooseberry, (2012) 399–417.
- [113] R.L. Prior, S.A. Lazarus, G. Cao, H. Muccitelli, J.F. Hammerstone, Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) Using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 1270–1276. <https://doi.org/10.1021/jf001211q>.
- [114] Y. Sapozhnikova, Development of liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for analysis of polyphenolic compounds in liquid samples of grape juice, green tea and coffee, *Food Chem.* 150 (2014) 87–93.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.131>.
- [115] I. Tarascou, J.P. Mazauric, E. Meudec, J.M. Souquet, D. Cunningham, S. Nojeim, V. Cheynier, H. Fulcrand, Characterisation of genuine and derived cranberry proanthocyanidins by LC-ESI-MS, *Food Chem.* 128 (2011) 802–810.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.062>.
- [116] J. Côté, S. Caillet, G. Doyon, J.-F. Sylvain, M. Lacroix, Bioactive Compounds in Cranberries and their Biological Properties, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 50 (2010) 666–679. <https://doi.org/10.1080/10408390903044107>.
- [117] N.P. Seeram, L.S. Adams, M.L. Hardy, D. Heber, Total Cranberry Extract versus Its Phytochemical Constituents: Antiproliferative and Synergistic Effects against Human Tumor Cell Lines, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 2512–2517.  
<https://doi.org/10.1021/jf0352778>.
- [118] H. El Gharras, Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review, *Int. J. Food Sci. Technol.* 44 (2009) 2512–2518.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02077.x>.

- [119] F. Sánchez-Patán, B. Bartolomé, P.J. Martín-Alvarez, M. Anderson, A. Howell, M. Monagas, Comprehensive assessment of the quality of commercial cranberry products. Phenolic characterization and in vitro bioactivity, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 3396–3408. <https://doi.org/10.1021/jf204912u>.
- [120] I. Iswaldi, A.M. Gómez-Caravaca, D. Arráez-Román, J. Uberos, M. Lardón, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, Characterization by high-performance liquid chromatography with diode-array detection coupled to time-of-flight mass spectrometry of the phenolic fraction in a cranberry syrup used to prevent urinary tract diseases, together with a study of its antibacter, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 58 (2012) 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.09.027>.
- [121] N. Biswas, P. Balac, S.K. Narlakanti, E. Haque, M. Hassan, Identification of Phenolic Compounds in Processed Cranberries by HPLC Method, *J. Nutr. Food Sci.* 3 (2013) 1–6. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000181>.
- [122] E. Jungfer, B.F. Zimmermann, A. Ruttkat, R. Galensa, Comparing procyanidins in selected *Vaccinium* species by UHPLC-MS 2 with regard to authenticity and health effects, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 9688–9696. <https://doi.org/10.1021/jf303100q>.
- [123] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, L. Jime, Polyphenols: food sources and bioavailability, *Am. J. Clin. Nutr.* 79 (2004) 727–747.
- [124] N.P. Seeram, L.S. Adams, Y. Zhang, R. Lee, D. Sand, H.S. Scheuller, D. Heber, Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 9329–9339. <https://doi.org/10.1021/jf061750g>.
- [125] B.L. White, L.R. Howard, R.L. Prior, Proximate and polyphenolic characterization of cranberry pomace, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 4030–4036. <https://doi.org/10.1021/jf902829g>.
- [126] L. Rock, A.S. Group, B. Human, L. Rock, Screening of Foods Containing Proanthocyanidins and Their Structural Characterization Using LC-MS / MS and Thiolytic, (2003). <https://doi.org/10.1021/jf034815d>.
- [127] T.C. Wallace, M.M. Giusti, Extraction and normal-phase HPLC-fluorescence-electrospray MS characterization and quantification of procyanidins in cranberry extracts, *J. Food Sci.* 75 (2010). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01799.x>.

- [128] M. Naczk, F. Shahidi, Extraction and analysis of phenolics in food, 1054 (2004) 95–111. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.059>.
- [129] H. Chen, Y. Zuo, Y. Deng, Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography, 913 (2001) 387–395.
- [130] L. Boudesocque-Delaye, A. Lanoue, J. Dorat, F. Bruyère, A. Gueiffier, C. Enguehard-Gueiffier, Quality control of commercial cranberry products: HPTLC-densitometry a new deal, *Food Control*. 86 (2018) 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.017>.
- [131] R. Zadernowski, S. Czaplicki, M. Naczk, Phenolic acid profiles of mangosteen fruits (*Garcinia mangostana*), *Food Chem.* 112 (2009) 685–689. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.030>.
- [132] A. Khoddami, M.A. Wilkes, T.H. Roberts, Techniques for analysis of plant phenolic compounds, *Molecules*. 18 (2013) 2328–2375. <https://doi.org/10.3390/molecules18022328>.
- [133] I. Ignat, I. Volf, V.I. Popa, A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables, *Food Chem.* 126 (2011) 1821–1835. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>.
- [134] M. Navarro, O. Núñez, J. Saurina, S. Hernández-Cassou, L. Puignou, Characterization of fruit products by capillary zone electrophoresis and liquid chromatography using the compositional profiles of polyphenols: Application to authentication of natural extracts, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 1038–1046. <https://doi.org/10.1021/jf404776d>.
- [135] I. Bakhytkyzy, O. Nuñez, J. Saurina, Determination of flavanols by liquid chromatography with fluorescence detection. Application to the characterization of cranberry-based pharmaceuticals through profiling and fingerprinting approaches, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 156 (2018) 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.04.031>.
- [136] L. Zhu, Y. Zhang, J. Deng, H. Li, J. Lu, Phenolic Concentrations and Antioxidant Properties of Wines Made from North American Grapes Grown in China, (2012) 3304–3323. <https://doi.org/10.3390/molecules17033304>.

- [137] Y. Zhao, P. Chen, L. Lin, J.M. Harnly, L. (lucy) Yuc, L. Zhangwan, Tentative identification, quantitation, and principal component analysis of green pu-erh, green, and white teas using UPLC/DAD/MS, *Food Chem.* 126 (2011) 1269–1277. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.055>. Tentative.
- [138] N. Teixeira, J. Azevedo, N. Mateus, V. De Freitas, Proanthocyanidin screening by LC – ESI-MS of Portuguese red wines made with teinturier grapes, 190 (2016) 300–307. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.065>.
- [139] I. van Dooren, K. Foubert, M. Theunis, T. Naessens, L. Pieters, S. Apers, Advantages of a validated UPLC–MS/MS standard addition method for the quantification of A-type dimeric and trimeric proanthocyanidins in cranberry extracts in comparison with well-known quantification methods, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 148 (2018) 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.09.002>.
- [140] A. Vallverdú-Queralt, O. Jáuregui, A. Medina-Remón, C. Andrés-Lacueva, R.M. Lamuela-Raventós, Improved characterization of tomato polyphenols using liquid chromatography/electrospray ionization liner ion trap quadrupole Orbitrap mass spectrometry and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (2010) 2986–2992. <https://doi.org/10.1002/rcm.4731>.
- [141] I.I. Rockenbach, E. Jungfer, C. Ritter, B. Santiago-Schübel, B. Thiele, R. Fett, R. Galensa, Characterization of flavan-3-ols in seeds of grape pomace by CE, HPLC-DAD-MSn and LC-ESI-FTICR-MS, *Food Res. Int.* 48 (2012) 848–855. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.001>.
- [142] J. Pérez-jiménez, J.L. Torres, Analysis of proanthocyanidins in almond blanch water by HPLC – ESI – QqQ – MS / MS and MALDI – TOF / TOF MS, *FRIN.* 49 (2012) 798–806. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.005>.
- [143] Y. Wang, J. Johnson-Cicalese, A.P. Singh, N. Vorsa, Characterization and quantification of flavonoids and organic acids over fruit development in American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) cultivars using HPLC and APCI-MS/MS, *Plant Sci.* 262 (2017) 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.06.004>.
- [144] M.D.M. Contreras, D. Arráez-Román, A. Fernández-Gutiérrez, A. Segura-Carretero, Nano-liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry for phenolic profiling: A case study in cranberry syrups, *Talanta.* 132 (2015) 929–938. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.10.049>.

- [145] B. Abad-García, L.A. Berrueta, S. Garmón-Lobato, A. Urkaregi, B. Gallo, F. Vicente, Chemometric characterization of fruit juices from spanish cultivars according to their phenolic compound contents: I. Citrus fruits, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 3635–3644. <https://doi.org/10.1021/jf300022u>.
- [146] Ł. Górski, W. Sordoń, F. Ciepiela, W.W. Kubiak, M. Jakubowska, Voltammetric classification of ciders with PLS-DA, *Talanta*. 146 (2016) 231–236. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.08.027>.
- [147] S. Barbosa, N. Pardo-Mates, M. Hidalgo-Serrano, J. Saurina, L. Puignou, O. Núñez, Detection and Quantitation of Frauds in the Authentication of Cranberry-Based Extracts by UHPLC-HRMS (Orbitrap) Polyphenolic Profiling and Multivariate Calibration Methods, *J. Agric. Food Chem.* 66 (2018) 9353–9365. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02855>.
- [148] T.C. Wallace, M.M. Giusti, Extraction and normal-phase HPLC-fluorescence-electrospray MS characterization and quantification of procyanidins in cranberry extracts, *J. Food Sci.* 75 (2010) 690–696. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01799.x>.
- [149] H. Du, J. Wua, H. Li, P.X. Zhong, Y.J. Xu, C.H. Li, K.X. Ji, L.S. Wang, Polyphenols and triterpenes from *Chaenomeles* fruits: Chemical analysis and antioxidant activities assessment, *Food Chem.* 141 (2013) 4260–4268. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.109>.
- [150] C. Carrizo García, M.H.J. Barfuss, E.M. Sehr, G.E. Barboza, R. Samuel, E.A. Moscone, F. Ehrendorfer, Phylogenetic relationships, diversification and expansion of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae), *Ann. Bot.* 118 (2016) 35–51. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw079>.
- [151] G.E. Barboza, C.C. García, S.L. González, M. Scaldaferrro, X. Reyes, Four new species of *Capsicum* (Solanaceae) from the tropical Andes and an update on the phylogeny of the genus, *PLoS One*. 14 (2019) 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209792>.
- [152] N. Bañuelos Flores, P. Salido Araiza, A. Gardea, Etnobotánica del Chiltepín. Pequeño gran señor en la cultura de los sonorenses, *Estud. Soc. Rev. Investig. Científica*. 16 (2008) 177–206.
- [153] F. Nuez, M.J. Ruiz, P. Fernández de Córdoba, J. Costa, M.S. Catalá, J.A. González, A. Rodríguez, *Catálogo de semillas de pimiento*, Monografías INIA Núm 105, Madrid, 1998.

- [154] J. Andrews, Diffusion of Mesoamerican food complex to Southeastern Europe, *Geogr. Rev.* 83. (1993) 194–204.
- [155] W.H. Eshbaugh, Peppers: History and exploitation of a serendipitous new crop discovery., in: J. Janick J.E. Simon (Eds.), *New Crop.*, Wiley, New York., 1993: pp. 132–139.
- [156] J. Andrews, *Peppers: The Domesticated Capsicum*, University of Texas Press, Austin., 1995.
- [157] J. Long Solís, *Capsicum y cultura: la historia del chilli*, Fondo de Cultura Económica.Ciudad de México, 1998.
- [158] A. González Bueno, El descubrimiento de la naturaleza del Nuevo Mundo: las plantas americanas en la Europa del siglo XVI., *Circumscribere 2. Int. J. Hist. Sci.* (2007) 10–25.
- [159] J. Pardo Tomás, M.L. López Terrada, Las primeras noticias sobre plantas americanas en las relaciones de viajes y crónicas de Indias.( 1493-1553)., *Cuadernos valencianos de la historia de la medicina y de la ciencia, XL.Serie A (monografías)*. Instituto de Estudios Documentales e Históricos sobre la Ciencia. Universidad de Valencia - CSIC., 1993.
- [160] M.L. López Terrada, J. Pardo Tomás, Las primeras noticias y descripciones de las planta americanas (1492-1553). *Medicinas, drogas y alimentos vegetales del Nuevo Mundo. Textos e imágenes españolas que los introdujeron en Europa*, in: Ministerio de Sanidad y Consumo (España)., 1992.
- [161] A. González Bueno, La flora del paraíso: recepción de las plantas americanas en la literatura científica europea del Renacimiento., in: A. Baratas (Ed.), *Memorias La Real Soc. Española Hist. Nat. III (Segunda Época)*. El Libr. La Nat., 2004: pp. 5–33.
- [162] J. Pardo Tomás, *El tesoro natural de América. Colonialismo y ciencia en el siglo XVI.*, Nivola, Madrid, 2002.
- [163] J.L. Fresquet Febrer, El impacto del descubrimiento de América en la ciencia europea del siglo XVI., *Cuadernos de pensamiento*, 9., 1994.
- [164] J. López Piñero, M.. López Terrada, La influencia española en la introducción en Europa de las plantas americanas (1493-1623)., in: *Cuad. Valencia. La Hist. La Med. y La Cienc. LIII. Ser. A*, Instituto de Estudios Documentales e Históricos sobre la Ciencia.Universitat de Valencia-CSIC. Valencia., 1997. [http://www.worldcat.org/title/influencia-espanola-en-la-introduccion-en-europa-de-las-plantas-americanas-1463-1623/oclc/807674159&referer=brief\\_results](http://www.worldcat.org/title/influencia-espanola-en-la-introduccion-en-europa-de-las-plantas-americanas-1463-1623/oclc/807674159&referer=brief_results).

- [165] N. Monardes, *De Simplicibus Medicamentis Ex. Occidentali India Delatis, quorum in Medicina usus est*. Trad. de C. de l'Écluse., Plantin, Anvers., 1574.
- [166] N. Monardes, *Primera y segunda y tercera partes de la historia medicinal de las cosas que se traen de nuestras Indias Occidentales que sirven en Medicina*, Sevilla, en casa de Alonso escribano., 1574.
- [167] T. Bartolomé García, J. Coletto, R. Velázquez, *Historias De La Plantas II: La Historia Del Pimientoi. La agricultura y ganadería extremeñas en 2015.*, (2016) 241–254. <https://www.unex.es/conoce-la-uex/centros/eia/archivos/iag/2015/2015-14-historias-de-plantas-ii-la-historia-del.pdf>.
- [168] J.M. López Piñero, J. Pardo Tomás, *La influencia de Francisco Hernández, 1515-1587, en la constitución de la botánica y la materia médica modernas*, in: *Cuad. Valencia. La Hist. La Med. y La Cienc. Ll. Ser. A (Monografías)*., Instituto de Estudios Documentales e Históricos sobre la Ciencia. Universitat de Valencia-CSIC. Valencia., 1996. <http://digital.csic.es/handle/10261/92148>.
- [169] I. Bata-Vidács, E. Baka, Á. Tóth, O. Csernus, S. Luzics, N. Adányi, A. Székács, J. Kukolya, *Investigation of regional differences of the dominant microflora of spice paprika by molecular methods*, *Food Control*. 83 (2018) 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.04.030>.
- [170] A. Martín, A. Hernández, E. Aranda, R. Casquete, R. Velázquez, T. Bartolomé, M.G. Córdoba, *Impact of volatile composition on the sensorial attributes of dried paprikas*, *Food Res. Int.* 100 (2017) 691–697. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.068>.
- [171] N. Wu, W. Gao, Y. Lian, J. Du, X. Tie, *The transfer of natural Rhodamine B contamination from raw paprika fruit to capsicum oleoresin during the extraction process*, *Food Chem.* 237 (2017) 786–792. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.147>.
- [172] A. Topuz, C. Dincer, K.S. Özdemir, H. Feng, M. Kushad, *Influence of different drying methods on carotenoids and capsaicinoids of paprika (Cv.; Jalapeno)*, *Food Chem.* 129 (2011) 860–865. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.035>.
- [173] S. Jackson, D.J. Swiner, P.C. Capone, A.K. Badu-Tawiah, *Thread spray mass spectrometry for direct analysis of capsaicinoids in pepper products*, *Anal. Chim. Acta.* 1023 (2018) 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.04.008>.

- [174] S. Tunali Akar, A. Gorgulu, T. Akar, S. Celik, Decolorization of Reactive Blue 49 contaminated solutions by *Capsicum annuum* seeds: Batch and continuous mode biosorption applications, *Chem. Eng. J.* 168 (2011) 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.12.049>.
- [175] G. Barboza, Lectotypifications, synonymy, and a new name in *Capsicum* (Solanoideae, Solanaceae), *PhytoKeys.* 2 (2011) 23–38. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.2.730>.
- [176] A.S. Antonio, L.S.M. Wiedemann, V.F. Veiga Junior, The genus *Capsicum*: a phytochemical review of bioactive secondary metabolites, *RSC Adv.* 8 (2018) 25767–25784. <https://doi.org/10.1039/c8ra02067a>.
- [177] O. Fayos, C.M.A. Garcés-claver, Evolución del conocimiento sobre la pungencia de la cebolla (*Allium cepa* L.) y del pimiento (*Capsicum* spp.): desde sus orígenes hasta el potencial nutracéutico actual. *Revisión bibliográfica*, 114 (2018) 99–118.
- [178] A. da Silva Antonio, L.S.M. Wiedemann, V.F. da Veiga Junior, Food Pungency: the Evolution of Methods for Capsaicinoid Analysis, *Food Anal. Methods.* 12 (2019) 1327–1345. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01470-2>.
- [179] C. Mallor, G.F. Barbero, A. Garce, Assessment of Capsaicinoid and Capsinoid Accumulation Patterns during Fruit Development in Three Chili Pepper Genotypes (*Capsicum* spp.) Carrying Pun1 and pAMT Alleles Related to Pungency, *Cite This J. Agric. Food Chem.* 2019, 67, 12219–12227 *Artic. Pubs.Acs.Org/JAFC.* (2019). <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05332>.
- [180] M.G.M. Olinillo, R.O.S.A.M. V Arela, M.I.P. Alma, G.E.F.B. Arbero, J. Ose, F.R.A.M.A.C.I. As, C.A.G.B. Arroso, Application of Hansch ' s Model to Capsaicinoids and Capsinoids : A Study Using the Quantitative Structure - Activity Relationship . A Novel Method for the Synthesis of Capsinoids, (2010) 3342–3349. <https://doi.org/10.1021/jf9035029>.
- [181] J. Díaz, F. Pomar, F. Merino, Peroxidases and the metabolism of capsaicin in *Capsicum annuum* L., (2004) 141–157.
- [182] G.F. Barbero, A. Liazid, L. Azaroual, M. Palma, Capsaicinoid Contents in Peppers and Pepper- Related Spicy Foods Capsaicinoid Contents in Peppers and Pepper-Related Spicy Foods, *Int. J. Food Prop.* 19 (2016) 485–493. <https://doi.org/10.1080/10942912.2014.968468>.



- [183] Ä.A.A.B. Ernal, J. Ose, F.U.M. Erino, Capsaicinoids in Vegetative Organs of *Capsicum annum* L. in Relation to Fruiting, (2002) 1188–1191. <https://doi.org/10.1021/jf011270j>.
- [184] E.R. Naves, L. de Ávila Silva, R. Sulpice, W.L. Araújo, A. Nunes-Nesi, L.E.P. Peres, A. Zsögön, Capsaicinoids: Pungency beyond Capsicum, *Trends Plant Sci.* 24 (2019) 109–120. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.11.001>.
- [185] G. Appendino, Capsaicin and Capsaicinoids, in: E.F. and O. Tagliabatella-Scafati (Ed.), *Mod. Alkaloids*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2008: pp. 73–109. <https://doi.org/10.16309/j.cnki.issn.1007-1776.2003.03.004>.
- [186] S. Kim, M. Park, S.I. Yeom, Y.M. Kim, J.M. Lee, H.A. Lee, E. Seo, J. Choi, K. Cheong, K.T. Kim, K. Jung, G.W. Lee, S.K. Oh, C. Bae, S.B. Kim, H.Y. Lee, S.Y. Kim, M.S. Kim, B.C. Kang, Y.D. Jo, H.B. Yang, H.J. Jeong, W.H. Kang, J.K. Kwon, C. Shin, J.Y. Lim, J.H. Park, J.H. Huh, J.S. Kim, B.D. Kim, O. Cohen, I. Paran, M.C. Suh, S.B. Lee, Y.K. Kim, Y. Shin, S.J. Noh, J. Park, Y.S. Seo, S.Y. Kwon, H.A. Kim, J.M. Park, H.J. Kim, S.B. Choi, P.W. Bosland, G. Reeves, S.H. Jo, B.W. Lee, H.T. Cho, H.S. Choi, M.S. Lee, Y. Yu, Y. Do Choi, B.S. Park, A. Van Deynze, H. Ashrafi, T. Hill, W.T. Kim, H.S. Pai, H.K. Ahn, I. Yeom, J.J. Giovannoni, J.K.C. Rose, I. Sørensen, S.J. Lee, R.W. Kim, I.Y. Choi, B.S. Choi, J.S. Lim, Y.H. Lee, D. Choi, Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species, *Nat. Genet.* 46 (2014) 270–278. <https://doi.org/10.1038/ng.2877>.
- [187] C. Stewart, B.C. Kang, K. Liu, M. Mazourek, S.L. Moore, Y.Y. Eun, B.D. Kim, I. Paran, M.M. Jahn, The Pun1 gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase, *Plant J.* 42 (2005) 675–688. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02410.x>.
- [188] M. Mazourek, A. Pujar, Y. Borovsky, I. Paran, L. Mueller, M.M. Jahn, A dynamic interface for capsaicinoid systems biology, *Plant Physiol.* 150 (2009) 1806–1821. <https://doi.org/10.1104/pp.109.136549>.
- [189] OPAQ, Convención sobre las armas químicas, (2016).
- [190] G. Fernández, Extracción, análisis, estabilidad y síntesis de capsaicinoides., Universidad de Cádiz, 2007.

- [191] G. Córdoba Ramos, A. Hernández León, T. Bartolomé García, Avances en la autenticación del pimentón de la Vera 2007. La agricultura y ganadería extremeñas. Informe 2006., Facultad de Ciencias Económicas y Empresariales y Escuela de Ingenierías Agrarias., 2007.
- [192] REGLAMENTO (CE) No 982/2007 DE LA COMISIÓN de 21 de agosto de 2007. Diario Oficial de la Unión Europea., n.d.
- [193] ORDEN APA/4178/2005, de 22 de diciembre, BOE núm. 4, 05-01-2006, in: n.d.: pp. 778–786.
- [194] J. Gragera Facundo, C.G. Gil Torralvo, J.M. Cano Suárez, M.A. M.D., Fichas varietales de pimientos de “La Orden”, Instituto de Investigaciones Agrarias Finca “La Orden-Valdesequera”. Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX). Consejería de Empleo, Empresa e Innovación. Gobierno de Extremadura., 2014.
- [195] Boletín Oficial de la Región de Murcia, Consejería de Agricultura , Agua y Medio Ambiente, Núm 299 (2001) 13446–13449.
- [196] Boletín Oficial de la Región de Murcia, Consejería de Agricultura , Agua y Medio Ambiente, Núm 98 (2001) 6479–6480.
- [197] N. Serrano, X. Cetó, O. Núñez, M. Aragón, A. Gámez, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, Characterization and classification of Spanish paprika (*Capsicum annuum* L.) by liquid chromatography coupled to electrochemical detection with screen-printed carbon-based nanomaterials electrodes, *Talanta*. 189 (2018) 296–301. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.06.085>.
- [198] X. Cetó, N. Serrano, M. Aragón, A. Gámez, M. Esteban, J.M. Díaz-Cruz, O. Núñez, Determination of HPLC-UV fingerprints of spanish paprika (*Capsicum annuum* L.) for its classification by linear discriminant analysis, *Sensors (Switzerland)*. 18 (2018). <https://doi.org/10.3390/s18124479>.



