

Universidad de Huelva

Departamento de Química “Profesor José Carlos Vílchez
Martin”



Optimización de técnicas de microextracción y metabólicoma no dirigida en muestras alimentarias bioactivas

Memoria para optar al grado de doctora
presentada por:

María del Carmen Villegas Álvarez

Fecha de lectura: 14 de julio de 2025

Bajo la dirección de las doctoras:

Tamara García Barrera

Ana Arias Borrego

Huelva, 2025

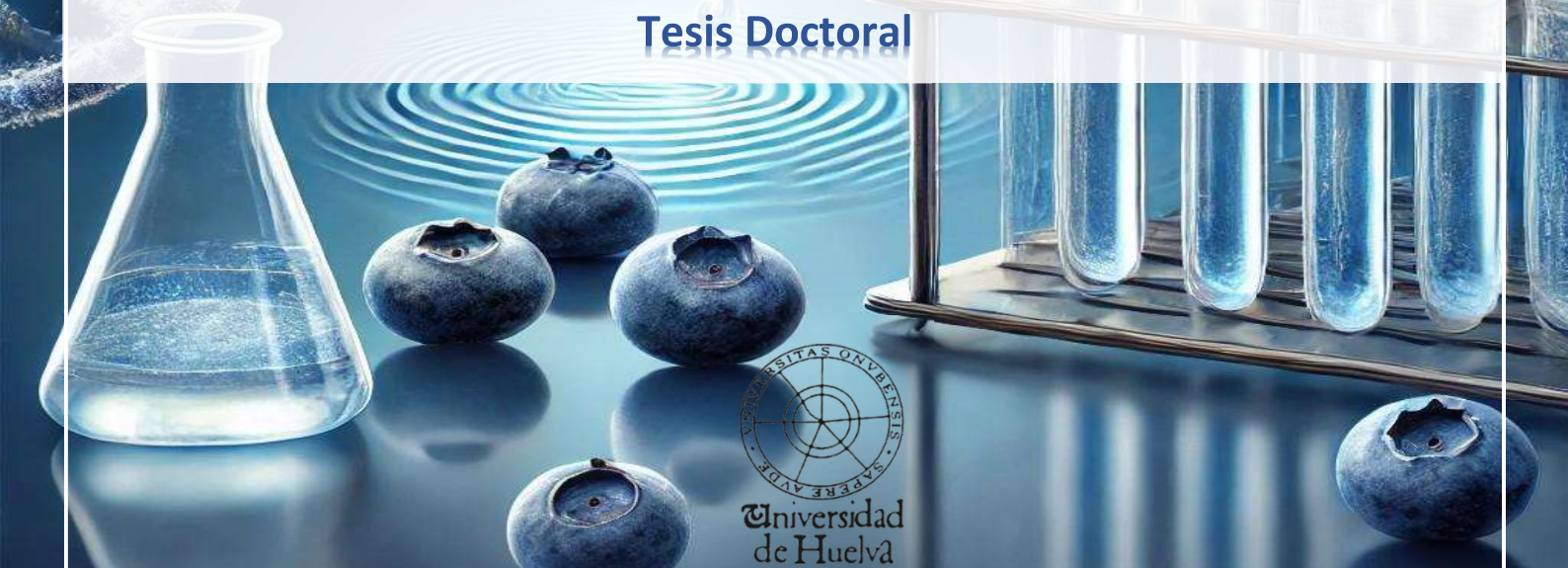




OPTIMIZACIÓN DE TÉCNICAS DE MICROEXTRACCIÓN Y METABOLÓMICA NO DIRIGIDA EN MUESTRAS ALIMENTARIAS BIOACTIVAS

María del Carmen Villegas Alvarez

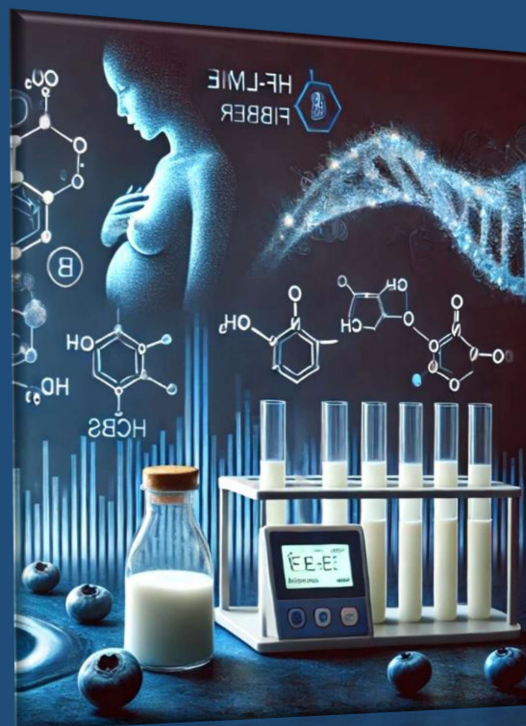
Tesis Doctoral



Esta tesis doctoral se enfoca en el desarrollo y optimización de técnicas analíticas avanzadas para la identificación de metabolitos y contaminantes en alimentos con propiedades bioactivas.

El estudio se centra en la optimización y desarrollo de metodologías avanzadas de microextracción en fase líquida con fibra hueca (HF-LPME) y en métodos analíticos no dirigidos en metabolómica.

A través de metodologías innovadoras, se busca mejorar la sensibilidad y selectividad en el análisis de estos compuestos, contribuyendo al avance de la foodómica y proporcionando nuevas herramientas para la investigación en ciencia de los alimentos.



“La investigación y la maternidad pueden coexistir, porque el conocimiento y el amor no tienen límites”.



Universidad
de Huelva



Centro de Investigación en
Recursos Naturales
Salud y Medio Ambiente





Universidad de Huelva
Escuela de Doctorado

**OPTIMIZACIÓN DE TÉCNICAS DE MICROEXTRACCIÓN Y METABOLÓMICA
NO DIRIGIDA EN MUESTRAS ALIMENTARIAS BIOACTIVAS**

**Optimization of microextraction techniques and untargeted
metabolomics in bioactive food samples**

Tesis Doctoral

Presentada por **María del Carmen Villegas Alvarez**

Bajo la dirección de las doctoras:

Tamara Carmen García Barrera

Ara Arias Borrego

Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología Industrial y Ambiental

Universidad de Huelva

Marzo de 2025

Universidad de Huelva

Departamento de Química "Profesor José Carlos Vílchez Martín"

Facultad de Ciencias Experimentales



**OPTIMIZACIÓN DE TÉCNICAS DE MICROEXTRACCIÓN Y METABOLÓMICA NO DIRIGIDA EN
MUESTRAS ALIMENTARIAS BIOACTIVAS**

**Optimization of microextraction techniques and untargeted metabolomics in
bioactive food simples**

Memoria para optar al grado de Doctor por la Universidad de Huelva presentada por

María del Carmen Villegas Alvarez

Bajo la dirección de las Doctoras:

Tamara Carmen García Barrera

Ana Arias Borrego

Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología Industrial y Ambiental

Escuela de Doctorado de la Universidad de Huelva

Línea de Investigación ANÁLISIS MEDIOAMBIENTAL, BIOANÁLISIS Y BIOTECNOLOGÍA

Marzo de 2025

AGRADECIMIENTOS

Llegar hasta aquí no ha sido un camino fácil, pero he tenido la fortuna de contar con personas extraordinarias que me han acompañado en cada paso y han hecho que este proceso, con sus desafíos y sacrificios, valiera la pena.

*En primer lugar, quiero expresar mi más profunda gratitud a la **Dra. Tamara García** y la **Dra. Ana Arias**, quienes han sido mucho más que tutoras en esta tesis. Desde el primer día, me han brindado su apoyo incondicional, guiándome con su experiencia, paciencia y dedicación. Han sido mis profesoras y mentoras, y a lo largo de este proceso he tenido la suerte de aprender no solo de su conocimiento, sino también de su compromiso con la investigación y la enseñanza.*

Gracias por su orientación, por transmitirme su pasión por la ciencia y por exigirme siempre lo mejor de mí misma. Han estado a mi lado en los momentos de incertidumbre, alentándome a seguir adelante, y han celebrado conmigo cada pequeño avance. Han soportado todas las presiones junto a mí, compartiendo tanto las dificultades como las alegrías de este camino. Su confianza en mis capacidades ha sido un motor fundamental para seguir adelante, y su ejemplo profesional y humano deja en mí una huella imborrable. Espero poder honrar todo lo que me han enseñado y llevar conmigo los valores que me han transmitido a lo largo de este proceso.

*También quiero agradecer al **Centro Tecnológico ADESVA** por darme la oportunidad de realizar mi tesis en el marco del proyecto en el que me han permitido participar. Gracias a este proyecto, he podido desarrollar mi investigación en un entorno de innovación y crecimiento, lo que ha sido clave en la consecución de este trabajo. Valoro enormemente la confianza depositada en mí y la oportunidad de haber formado parte de esta experiencia.*

*Del mismo modo, agradezco haber formado parte del grupo de investigación **Análisis Medioambiental y Bioanálisis**, un espacio en el que he tenido la oportunidad de aprender, crecer y desarrollar esta investigación en un entorno de excelencia. Ha sido un honor formar parte de este equipo y compartir con grandes investigadores que han enriquecido mi formación.*

*A mis **compañeros de laboratorio**, quienes han sido un pilar fundamental en este camino. Gracias por el apoyo, la ayuda desinteresada y la camaradería que han hecho más llevaderos los días largos de trabajo. Las conversaciones, el compañerismo y las risas compartidas en el laboratorio han sido parte esencial de esta experiencia, y me llevo un gran aprendizaje de cada uno de ustedes.*

*A mis **padres**, porque sin ustedes nada de esto habría sido posible. No hay palabras suficientes para agradecer todo lo que han hecho por mí. Gracias por inculcarme desde pequeña el valor del esfuerzo, la perseverancia y la importancia de luchar por mis sueños. Han sido mi mayor ejemplo de sacrificio y dedicación, dejándose la piel para que yo pudiera tener oportunidades y llegar a donde estoy hoy.*

Gracias por estar siempre a mi lado en cada momento difícil, por sostenerme cuando sentía que no podía más y por recordarme que cada obstáculo es solo un paso más en el camino hacia mis metas. Han celebrado cada uno de mis logros como si fueran propios y han sido mi refugio en los momentos de mayor dificultad. Este logro es tan mío como suyo, y espero que se sientan tan orgullosos de mí como yo lo estoy de ser su hija.

A mi **pareja**, por estar a mi lado en cada instante, por soportar mi estrés, por animarme cuando sentía que no podía más y por recordarme que todo esfuerzo vale la pena. Gracias por tu amor, paciencia y compañía en esta etapa tan desafiante.

Finalmente, quiero dedicar unas palabras a la experiencia más transformadora de mi vida: la **maternidad**. Ser madre mientras desarrollaba esta tesis ha sido una prueba de resistencia, amor y determinación. Ha sido un reto inmenso, pero también una fuente infinita de motivación para seguir adelante y demostrar que los sueños, con esfuerzo y perseverancia, pueden alcanzarse.

A todos ustedes, de corazón, **gracias**.

Índice

AGRADECIMIENTOS.....	1
Índice de Figuras.....	6
Índice de Tablas	8
Índice de Abreviaturas.....	9
RESUMEN	11
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN.....	17
1.1. Técnicas de microextracción en fase líquida.....	17
1.1.1. Fundamentos de la microextracción en fase líquida (LPME).....	19
1.1.2. Optimización de los métodos LPME.....	23
1.1.3. Aplicaciones de LPME en la determinación de contaminantes orgánicos.....	29
1.2. Metabolómica no dirigida.....	37
1.2.1. Fundamentos de la metabolómica.....	38
1.2.2. Técnicas de extracción en metabolómica no dirigida.....	46
1.2.3. Metabolómica como herramienta para la foodómica.....	48
1.3. Contaminantes en alimentos: Bifenilos Policlorados (PCBs).....	50
1.3.1. Leche materna: composición e importancia de la lactancia.....	51
1.3.2. Papel de la leche materna como indicador de contaminantes orgánicos persistentes.....	53
1.4. Metabolómica como herramienta en la búsqueda de compuestos bioactivos.....	56
1.4.1. Metabolómica como herramienta en el estudio de compuestos bioactivos de la leche materna.....	59
1.4.2. Metabolitos bioactivos en alimentos: tratamientos postcosecha.....	67
2. OBJETIVOS.....	83
2.1. Objetivo general de investigación.....	83
2.2. Objetivos específicos.....	83
3. MATERIALES Y METODOS.....	86
3.1. Diseño experimental.....	86
3.1.1. Capítulo 1: Estrategia de optimización para la extracción de PCBs en leche materna mediante HF-LPME.....	86
3.1.2. Capítulo 2: Desarrollo de un método de HF-LPME trifásica asistida por ultrasonido para análisis metabolómico.....	89
3.1.3. Capítulo 3: Evaluación de cambios metabolómicos en arándanos sometidos a distintos tratamientos postcosecha.....	92
3.2. Procedimientos experimentales.....	93

3.2.1.	Capítulo 1: Parámetros y condiciones optimizadas para la extracción de PCBs en leche materna.	93
3.2.2.	Capítulo 2: Implementación de HF-LPME trifásica para la caracterización de metabolitos en leche materna.	97
3.2.3.	Capítulo 3: Análisis del perfil metabolómico de arándanos tratados con diferentes tecnologías postcosecha.	101
3.3.	Análisis estadístico de los resultados.	103
3.3.1.	Capítulo 1: Evaluación de la sensibilidad y precisión del método para detección de PCBs.	103
3.3.2.	Capítulo 2: Validación estadística de la metodología metabolómica en leche materna.	107
3.3.3.	Capítulo 3: Análisis de variabilidad metabolómica en arándanos según el tratamiento postcosecha.	115
4.	RESULTADOS Y DISCUSION.	131
4.1.	Capítulo 1: Impacto de la optimización de HF-LPME en la detección de PCBs en leche materna.	134
4.2.	Capítulo 2: Aplicación de HF-LPME trifásica asistida por ultrasonido en la identificación de metabolitos en leche materna.	152
4.3.	Capítulo 3: Efecto de los tratamientos postcosecha en el perfil metabolómico de los arándanos.	171
4.3.1.	Evaluación de la calidad: Cambios fisicoquímicos y organolépticos en los arándanos tratados.	171
4.3.2.	Efectos de los tratamientos postcosecha en el perfil metabolómico: Identificación de metabolitos clave tras el almacenamiento.	178
4.3.3.	Papel clave de los metabolitos alterados tras los tratamientos en la calidad del fruto: Relevancia nutricional y funcional de los compuestos identificados.	186
5.	CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.	219
5.1.	Conclusiones.	219
5.1.1.	Capítulo 1: Avances en la determinación de PCBs en leche materna mediante HF-LPME optimizada.	219
5.1.2.	Capítulo 2: Contribuciones de HF-LPME trifásica en el análisis metabolómico de la leche materna.	219
5.1.3.	Capítulo 3: Influencia de los tratamientos postcosecha en la estabilidad y biodisponibilidad de metabolitos en arándanos.	220
5.2.	Conclusions.	221
5.2.1.	Chapter 1: Advances in the Determination of PCBs in Breast Milk Using Optimized HF-LPME.	221
5.2.2.	Chapter 2: Contributions of Three-Phase HF-LPME in the Metabolomic Analysis of Breast Milk.	221

5.1.3. Chapter 3: Influence of Postharvest Treatments on the Stability and Bioavailability of Metabolites in Blueberries	222
REFERENCIAS.....	225

Índice de Figuras

Figura 1.1. Esquema del fundamento de extracción líquido-líquido donde la partición de los analitos depende únicamente del equilibrio K_d , sin reacciones secundarias.....	20
Figura 1.2. Representación esquemática de los modos de inmersión directa y de espacio de cabeza de la microextracción de gota única (SDME).....	20
Figura 1.3. Representación esquemática de LPME en dos y tres fases.....	21
Figura 1.4. Representación esquemática de UA-LPME.....	21
Figura 1.5. Representación esquemática de EME-LPME.....	22
Figura 1.6. Representación esquemática de HF-LPME.....	22
Figura 1.7. Cascada ómica: diferenciación de las distintas ómicas desde el genotipo al fenotipo.	37
Figura 1.8. Estudios metabolómicos no dirigidos frente a los dirigidos.....	38
Figura 1.9. Flujo de trabajo en estudios metabolómicos.....	40
Figura 1.10. Esquema general de la complejidad de un experimento metabolómico.....	41
Figura 1.11. Ejemplos de los diagramas scores y loadings de una PCA.....	44
Figura 1.12. Estructura química básica de los PCBs.....	50
Figura 1.13. Visualización gráfica del efecto de pulsos eléctricos sobre las moléculas de agua en los alimentos.....	74
Figura 1.14. Efecto de la tecnología PEF sobre la vida útil de los alimentos.....	74
Figura 1.15. Mecanismo de absorción del etileno de la tecnología EAS. (Fuente: Elaboración propia).....	76
Figura 1.16. Esquema general del mecanismo de acción de la tecnología CAP.....	77
Figura 1.17. Mecanismo de oxidación del etileno provocado por las ROS.....	78
Figura 1.18. Representación del formato de MAP empleado.....	80
Figura 3.1. Diseño experimental de la extracción de PCBs en leche materna mediante el uso de HF-LPME.....	87
Figura 3.2. Procedimiento experimental de la extracción HF-LPME de PCBs en leche materna.....	88
Figura 3.3. Diseño del proceso experimental para el análisis metabolómico de leche materna empleando HF-LPME trifásica con disposición en U.....	90
Figura 3.4. Diseño del proceso experimental para el análisis metabolómico de leche materna empleando HF-LPME trifásica con disposición en barra de disolvente (SBME).....	91
Figura 3.5. Diseño experimental del estudio de los cambios en el perfil metabolómico de los arándanos como consecuencia de los tratamientos postcosecha.....	93
Figura 3.6. Factores optimizados en el método de extracción de PCBs mediante HF-LPME.....	94
Figura 3.7. Optimización del disolvente de la fase aceptora.....	95
Figura 4.1. Factores de enriquecimiento (n=3) obtenidos en la optimización del disolvente orgánico de la fase aceptora.....	134
Figura 4.2. Factores de enriquecimiento (n=3) obtenidos en la optimización de la velocidad de agitación.....	135
Figura 4.3. Factores de enriquecimiento (n=3) obtenidos en el ajuste del pH de la fase donadora.....	135
Figura 4.4. Gráficos combinados de respuesta 3D y de contorno de la forma de la superficie en función de los ejes de temperatura, tiempo y longitud, así como el punto óptimo.....	137
Figura 4.5. Cromatogramas obtenidos a partir de una muestra de leche materna humana enriquecida con $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de PCBs antes (A) y después (B) de la extracción mediante HF-LPME seguida de GC- μ ECD.....	138
Figura 4.6. Selección del disolvente empleado como fase aceptora en función del número de metabolitos identificados en la extracción.....	152

Figura 4.7. Optimización del tiempo de extracción en función del número de metabolitos identificados.....	153
Figura 4.8. Comparación de resultados obtenidos en el análisis metabolómico no dirigido de leche materna mediante GC-MS a través de una extracción a) LLE y b) HF-LPME trifásica con disposición en U.	154
Figura 4.9. Número total de características moleculares extraídas por UA-HF-LPME trifásica y posteriormente anotadas por GC-MS dependiendo del efecto de los solventes como fase aceptora (MeOH o MeCN) y los tiempos de extracción.....	155
Figura 4.10. Efecto de la longitud de la fibra en la eficiencia de extracción a diferentes tiempos de extracción.	156
Figura 4.11. Cobertura de metabolitos según las familias de compuestos utilizando a) LLE y b) tres-fases-UA-HF-LPME para metabolómica de la leche humana. Diagrama de Venn comparando c) el número total de características extraídas y d) el número total de metabolitos anotados utilizando tres-fases-UA-HF-LPME y LLE mediante GC-MS.....	157
Figura 4.12. Resultados obtenidos en el estudio de vida útil de E1 (A-E) y E2 (F-J).....	172
Figura 4.13. Gráfico circular que indica el porcentaje de metabolitos alterados por grupo en relación al total.....	179
Figura 4.14. Diagrama de mapa de calor que muestra la abundancia de los metabolitos más relevantes alterados en los diferentes grupos analizados en los ensayos: (A) correspondiente a E1 y (B) correspondiente a E2.	180
Figura 4.15. Vías metabólicas asociadas a metabolitos alterados en muestras de arándanos después de 21 días de almacenamiento, comparando cada grupo de tratamiento postcosecha con el control: (A) MAP, (B) PEF, (C) EAS y (D) CAP.	187

Índice de Tablas

Tabla 1.1. Ventajas y desventajas de SPME.....	18
Tabla 1.2. Desarrollo histórico de la técnica de microextracción en fase líquida.....	19
Tabla 1.3. Cuadro resumen de los distintos diseños DOE, y sus ventajas, inconvenientes y aplicaciones en LPME.....	27
Tabla 1.4. Cuadro resumen de los ajustes de Modelos en la optimización experimental de técnicas LPME.....	29
Tabla 1.5. Aplicaciones de los métodos convencionales de (DLLME) para el análisis de contaminantes orgánicos.	32
Tabla 1.6. Aplicaciones de los métodos convencionales del uso de disolventes supramoleculares en LPME para el análisis de contaminantes orgánicos.....	36
Tabla 3.1. Experimentos de diseño compuesto central (RCCD) con niveles codificados y reales para la optimización de los parámetros de extracción Tiempo, Temperatura y Longitud.	96
Tabla 3.2. Modelos matemáticos de variables y respuestas.	104
Tabla 3.3. Figuras de mérito del enfoque HF-LPME/GC- μ ECD para el análisis de PCB en la leche materna humana.....	105
Tabla 3.4. Figuras de mérito de HF-LPME/GC- μ ECD para el análisis de PCBs en leche materna humana.	106
Tabla 3.5. Comparación de los resultados obtenidos en la validación del método con respecto a los registrados en la literatura.....	107
Tabla 3.6. Valores Q^2 y R^2 de PLS-DA comparando los grupos de estudios; UA-HF-LLLME (5, 10 y 15 minutos de tiempo de extracción) versus método LLE.	108
Tabla 3.7. Metabolitos identificados por GC-MS.....	112
Tabla 3.8. Fold-Changes (FC) y valores p de los metabolitos identificados por el método propuesto UA-HF-LLLME (5 min) versus LLE.	113
Tabla 3.9. Parámetros de validación del método propuesto en comparación con LLE.....	114
Tabla 3.10. Parámetros del modelo obtenidos de PLS-DA de diferentes grupos de postcosecha. *Nota: R^2 y Q^2 son los parámetros de prueba de clasificación de respuesta utilizados para evaluar si el modelo estaba sobreajustado.....	117
Tabla 3.11. Metabolitos alterados de E1 en arándanos ordenados por clase.....	122
Tabla 3.12. Metabolitos alterados de E2 en arándanos ordenados por clase.....	127
Tabla 4.1. Áreas de los picos de los analitos después del análisis por HF-LPME a partir de los ensayos RCCD.	136
Tabla 4.2. Parámetros de calidad del ensayo E1 durante 42 días de almacenamiento.....	175
Tabla 4.3. Parámetros de calidad del ensayo E2 durante 42 días de almacenamiento.....	177
Tabla 4.4. Metabolitos alterados en E1 determinados por GC-MS.....	183
Tabla 4.5. Metabolitos alterados en E2 determinados por GC-MS.....	185

Índice de Abreviaturas

BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide	N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
BT-LPME	Ball-Tip Protected Liquid Phase Microextraction	Microextracción en fase líquida protegida con punta de bola
CA	Controlled Atmospheres	Atmósferas controladas
CAP	Cold Atmospheric Plasma	Plasma frío atmosférico
CCD	Central Composite Design	Diseño central compuesto
CE	Capillary Electrophoresis	Electroforesis capilar
CV	Coefficient of Variation	Coeficiente de variación
DES	Deep Eutectic Solvents	Disolventes eutécticos profundos
DLLME	Dispersive Liquid-Liquid Microextraction	Microextracción en fase líquida-líquida dispersiva
DOE	Design of Experiments	Diseño de experimentos
EAS	Ethylene Absorbent Sheets	Láminas absorbentes de etileno
ECPTM	Electron Cold Pasteurization	Pasteurización electrónica fría
EF	Enrichment Factor	Factor de enriquecimiento
EI	Electron Impact	Impacto electrónico
EME	Electromembrane Extraction	Extracción con electromembrana
EME-LPME	Electromembrane-Assisted Liquid Phase Microextraction	Microextracción en fase líquida asistida por electromembrana
GC	Gas Chromatography	Cromatografía de gases
GC-μECD	Gas Chromatography with Micro Electron Capture Detector	Cromatografía de gases con detector de microcaptura de electrones
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
HAP	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HBM	Human Breast Milk	Leche materna humana
HF-LPME	Hollow Fiber-Liquid Phase Microextraction	Microextracción en fase líquida con fibra hueca
HMOs	Human Milk Oligosaccharides	Oligosacáridos de la leche humana
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Cromatografía líquida de alta eficacia
HS	Headspace	Espacio de cabeza
ILs	Ionic Liquids	Líquidos iónicos
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
LLE	Liquid-Liquid Extraction	Extracción líquido-líquido
LOD	Limit of Detection	Límite de detección
LOQ	Limit of Quantification	Límite de cuantificación
LPME	Liquid Phase Microextraction	Microextracción en fase líquida
LS	Least Squares	Mínimos cuadrados
MA	Modified Atmospheres	Atmósferas modificadas
MAP	Modified Atmosphere Packaging	Bolsas de atmósfera modificada

MCP	1-Methylcyclopropene	1-Metilciclopropeno
MeCN	Acetonitrile	Acetonitrilo
MeOH	Methanol	Metanol
MFGs	Milk Fat Globules	Glóbulos de grasa de leche
MILs	Magnetic Ionic Liquids	Líquidos iónicos magnéticos
MTBE	Methyl Tert-Butyl Ether	Metil terc-butil éter
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Resonancia magnética nuclear
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity	Capacidad antioxidante
PCA	Principal Components Analysis	Análisis de componentes principales
PCBs	Polychlorinated Biphenyls	Bifenilos policlorados
PEF	Pulsed Electric Field	Campo eléctrico pulsado
PLS-DA	Partial Least Squares Discriminant Analysis	Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales
PME	Pectin Methylesterase	Pectina metil esterasa
POPs	Persistent Organic Pollutants	Contaminantes orgánicos persistentes
QC	Quality Control	Controles de calidad
ROS	Reactive Oxygen Species	Especies reactivas de oxígeno
RSD	Relative Standard Deviation	Desviación estándar relativa
RSM	Response Surface Methodology	Metodología de superficie de respuesta
SBME	Solvent Bar Microextraction	Microextracción en barra de solvente
SDME	Single Drop Microextraction	Microextracción en gota suspendida
SLM	Supported Liquid Membrane	Membrana líquida soportada
SPE	Solid Phase Extraction	Extracción en fase sólida
SPME	Solid Phase Microextraction	Microextracción en fase sólida
SUPRAS	Supramolecular Solvents	Disolventes supramoleculares
TCMS	Trimethylchlorosilane	Trimetilclorosilano
UAE	Ultrasound-Assisted Extraction	Extracción asistida por ultrasonido
UA-LPME	Ultrasound-Assisted Liquid Phase Microextraction	Microextracción en fase líquida asistida por ultrasonido
UPLC-QTOF-MS	Ultra-High Performance Liquid Chromatography with Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry	Cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento con espectrometría de masas de tiempo de vuelo acoplada a un cuadrupolo
UV	Ultraviolet	Ultravioleta
WHO	World Health Organization	Organización Mundial de la Salud

RESUMEN

La presente tesis doctoral, titulada "**Optimización de técnicas de microextracción y metabolómica no dirigida en muestras alimentarias bioactivas**", se centra en el desarrollo y optimización de estrategias analíticas avanzadas para el estudio de metabolitos y contaminantes en alimentos con propiedades beneficiosas para la salud. En particular, esta investigación se centra en dos matrices alimentarias de gran interés: la leche materna humana y los arándanos, cuyo perfil nutricional y bioactivo desempeña un papel fundamental en la salud humana. Mediante la implementación de metodologías innovadoras, esta tesis busca proporcionar herramientas analíticas más sensibles, selectivas y eficientes, contribuyendo al avance de la foodómica, un campo multidisciplinario que integra la metabolómica con la ciencia de los alimentos.

Los enfoques metodológicos desarrollados incluyen la optimización de la microextracción en fase líquida con fibra hueca (Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction, HF-LPME) en sus modalidades bifásica y trifásica, permitiendo una extracción eficiente y selectiva de analitos en matrices alimentarias complejas. Además, se emplean técnicas avanzadas de separación e identificación de compuestos, como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS) y la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS). La combinación de estos enfoques permite una caracterización exhaustiva de metabolitos bioactivos y contaminantes, proporcionando información clave sobre la composición química de los alimentos estudiados y su impacto en la salud.

Uno de los principales objetivos de esta investigación es el desarrollo de un método analítico basado en HF-LPME para la determinación de bifenilos policlorados (PCBs) en leche materna humana. Los PCBs son contaminantes ambientales persistentes con efectos adversos para la salud, particularmente en lactantes debido a su toxicidad y capacidad de bioacumulación. La optimización de este método analítico busca mejorar la sensibilidad y especificidad en la detección de estos compuestos, proporcionando una alternativa eficiente y sostenible a las técnicas convencionales. Asimismo, la metodología desarrollada permite la extracción eficaz de los PCBs bajo condiciones más respetuosas con el medio ambiente, reduciendo el uso de disolventes y los tiempos de extracción, en línea con los principios de la química verde y la seguridad alimentaria.

El segundo enfoque de la tesis se centra en el estudio del metaboloma de la leche materna mediante la combinación de microextracción en fase líquida con fibra hueca trifásica y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Esta metodología permite la identificación de una amplia gama de metabolitos, incluyendo ácidos grasos, aminoácidos, vitaminas y compuestos bioactivos esenciales para el desarrollo del lactante. La incorporación de la microextracción trifásica mejora la eficiencia del proceso de extracción, aumentando la sensibilidad y selectividad del análisis. Este estudio proporciona una herramienta poderosa para el análisis de la metabolómica no dirigida y comprender la composición de la leche materna y su influencia en la salud infantil, facilitando la optimización de las recomendaciones nutricionales durante la lactancia.

El tercer componente de la investigación se enfoca en el análisis metabolómico no dirigido de los arándanos, un alimento ampliamente reconocido por sus propiedades antioxidantes, tras su tratamiento con distintas tecnologías postcosecha. Mediante el uso de GC-MS y LC-MS, se

evalúan los cambios en el perfil de metabolitos de los arándanos sometidos a diferentes condiciones de almacenamiento. El objetivo es identificar los compuestos responsables de sus efectos antioxidantes y evaluar cómo las condiciones postcosecha afectan su estabilidad y biodisponibilidad. Este análisis permite la identificación de metabolitos bioactivos clave, como antocianinas, flavonoides y otros compuestos fenólicos, proporcionando información esencial sobre su papel en la prevención de enfermedades crónicas y su contribución a la salud humana.

La principal contribución de esta tesis es la integración de técnicas analíticas avanzadas para el estudio tanto de contaminantes como de metabolitos bioactivos en alimentos con potencial saludable. La combinación de GC-MS y LC-MS con microextracción en fase líquida con fibra hueca trifásica permite realizar análisis de alta resolución, mejorando la capacidad de detección de una amplia variedad de compuestos en matrices complejas. Además, el enfoque holístico aplicado en el estudio de la leche materna y los arándanos destaca tanto su potencial terapéutico como los riesgos asociados con la exposición a contaminantes. Estos avances metodológicos pueden extenderse a una variedad más amplia de alimentos con propiedades beneficiosas para la salud, facilitando el desarrollo de productos más seguros y nutritivos.

Finalmente, las metodologías propuestas en esta investigación no solo mejoran la precisión y eficiencia del análisis de alimentos, sino que también abren nuevas perspectivas en el campo de la nutrición y la salud pública. El impacto de estos avances puede contribuir significativamente tanto a la industria alimentaria como a la investigación en salud, promoviendo el uso de alimentos con beneficios nutricionales como herramientas clave en la prevención de enfermedades y la mejora del bienestar humano.

Palabras clave: Metabolómica, foodómica, alimentos bioactivos, microextracción, HF-LPME

ABSTRACT

The present doctoral thesis, titled "**Optimization of Microextraction Techniques and Untargeted Metabolomics in Bioactive Food Samples**", focuses on the development and optimization of advanced analytical strategies for studying metabolites and contaminants in foods with health-beneficial properties. Specifically, this research centers on two highly relevant food matrices: **human breast milk and blueberries**, whose nutritional and bioactive profiles play a crucial role in human health. Through the implementation of innovative methodologies, this thesis aims to provide more sensitive, selective, and efficient analytical tools, contributing to the advancement of **foodomics**, a multidisciplinary field that integrates metabolomics with food science.

The methodological approaches developed include the optimization of **Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction (HF-LPME)** in both biphasic and triphasic modalities, allowing for efficient and selective extraction of analytes from complex food matrices. Additionally, advanced separation and identification techniques, such as **Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)** and **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)**, are employed. The combination of these approaches enables a comprehensive characterization of bioactive metabolites and contaminants, providing key insights into the chemical composition of the studied foods and their impact on health.

One of the main objectives of this research is the development of an analytical method based on **HF-LPME** for the determination of **polychlorinated biphenyls (PCBs) in human breast milk**. PCBs are persistent environmental contaminants with adverse health effects, particularly in infants due to their toxicity and bioaccumulation capacity. The optimization of this analytical method aims to enhance the sensitivity and specificity of PCB detection, offering an efficient and sustainable alternative to conventional techniques. Furthermore, the developed methodology allows for effective PCB extraction under environmentally friendly conditions, reducing solvent use and extraction time, in alignment with **green chemistry principles and food safety**.

The second focus of the thesis is the **metabolomic study of human breast milk**, using a combination of **triphasic hollow fiber liquid-phase microextraction** and **GC-MS**. This methodology enables the identification of a wide range of metabolites, including **fatty acids, amino acids, vitamins, and essential bioactive compounds for infant development**. The incorporation of **triphasic microextraction** enhances the efficiency of the extraction process, increasing the sensitivity and selectivity of the analysis. This study provides a powerful tool for **untargeted metabolomics analysis**, helping to understand the composition of breast milk and its influence on infant health, facilitating the optimization of **nutritional recommendations during lactation**.

The third component of the research focuses on the **untargeted metabolomic analysis of blueberries**, a food widely recognized for its **antioxidant properties**, after being subjected to different **postharvest technologies**. Using **GC-MS and LC-MS**, changes in the metabolite profile of blueberries stored under different conditions are evaluated. The objective is to identify **the compounds responsible for their antioxidant effects** and assess how postharvest conditions affect their **stability and bioavailability**. This analysis allows for the identification of **key bioactive metabolites**, such as anthocyanins, flavonoids, and other **phenolic compounds**, providing essential insights into their role in **chronic disease prevention** and their contribution to human health.

One of the **main contributions** of this thesis is the integration of **advanced analytical techniques** to study both **contaminants and bioactive metabolites** in **health-promoting foods**. The combination of **GC-MS and LC-MS** with **triphasic hollow fiber liquid-phase microextraction** enables **high-resolution analysis**, improving the detection capabilities for a wide variety of compounds in complex matrices. Additionally, the **holistic approach** applied in the study of **human breast milk and blueberries** highlights both their **therapeutic potential** and the risks associated with **contaminant exposure**. These methodological advances can be extended to a **broader range of functional foods**, facilitating the development of **safer and more nutritious products**.

Finally, the methodologies proposed in this research not only **enhance the precision and efficiency of food analysis**, but also open new perspectives in the fields of **nutrition and public health**. The impact of these advances may **significantly contribute** to both the **food industry and health research**, promoting the use of **nutritionally beneficial foods** as **key tools for disease prevention and human well-being improvement**.

Keywords: Metabolomics, foodomics, bioactive foods, microextraction, HF-LPME

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN.

En los últimos años, el desarrollo de técnicas analíticas avanzadas ha permitido una mejor comprensión de la composición química de los alimentos y su impacto en la salud. Dentro de este campo, la microextracción en fase líquida (LPME) ha emergido como una estrategia eficiente para la preconcentración y el análisis de compuestos en matrices complejas, destacándose por su bajo consumo de solventes y alta selectividad. En particular, la combinación de la microextracción en fase líquida con membrana hueca (HF-LPME) y la asistencia por ultrasonido representa una innovación prometedora para la detección y cuantificación de diversos analitos en alimentos.

Paralelamente, la metabolómica no dirigida se ha consolidado como una herramienta esencial en el estudio del perfil metabólico de los alimentos, permitiendo la identificación de compuestos bioactivos y la evaluación de cambios metabólicos inducidos por factores externos. Esta aproximación ha sido clave en la caracterización de metabolitos en productos agrícolas, proporcionando información valiosa sobre su calidad, seguridad y valor nutricional.

Por otro lado, la presencia de contaminantes orgánicos persistentes en los alimentos representa un desafío significativo para la seguridad alimentaria. Estos compuestos, derivados de actividades industriales y agrícolas, pueden acumularse en los tejidos de los organismos y representar un riesgo para la salud humana. La detección y cuantificación de estos contaminantes mediante técnicas sensibles y selectivas es fundamental para evaluar su impacto y establecer estrategias de control.

Finalmente, el estudio de los compuestos bioactivos en metabolómica ha cobrado gran relevancia debido a su potencial en la promoción de la salud y la prevención de enfermedades. La identificación y caracterización de estas moléculas en alimentos permite comprender mejor sus efectos beneficiosos y su papel en la dieta.

En conjunto, estas áreas de estudio convergen en la necesidad de desarrollar metodologías analíticas innovadoras que permitan la identificación, cuantificación y evaluación de compuestos de interés en alimentos. La presente tesis aborda estos aspectos a través del desarrollo de nuevos métodos basados en la combinación de HF-LPME y LPME asistida por ultrasonido. Estas estrategias se aplican a la caracterización de metabolitos y contaminantes en matrices alimentarias, incorporando en algunos casos un enfoque metabolómico no dirigido para un análisis más amplio y detallado.

1.1. Técnicas de microextracción en fase líquida.

La microextracción en fase líquida (LPME) ha surgido como una alternativa eficaz y sostenible a las metodologías tradicionales de preparación de muestras. En el campo de la química analítica, existe una demanda creciente por desarrollar técnicas que sean más precisas, sensibles y con mayor eficiencia analítica, especialmente para la extracción de compuestos en matrices complejas. Además, el desarrollo de enfoques basados en los principios de la "química verde" se ha convertido en una prioridad, con el objetivo de reducir el uso de disolventes orgánicos y minimizar la generación de residuos, lo que contribuye a disminuir el impacto ambiental (1).

Uno de los principales retos en la preparación de muestras biológicas o ambientales es la reducción de los pasos previos al análisis, como la desproteización o los procedimientos de clean-up, los cuales pueden ser complejos, laboriosos y propensos a la pérdida de analitos. Técnicas convencionales como la extracción líquido-líquido (LLE) y la extracción en fase sólida (SPE) han sido ampliamente utilizadas; sin embargo, presentan ciertas limitaciones, como la necesidad de volúmenes elevados de solventes, tiempos de análisis prolongados y dificultad para su automatización. Además, el empleo de grandes cantidades de disolventes orgánicos genera residuos peligrosos que pueden afectar tanto al medio ambiente como a la salud del personal de laboratorio, además de incrementar los costos asociados a su eliminación (1).

La tendencia actual en preparación de muestras se orienta hacia el desarrollo de técnicas rápidas, sencillas, económicas y con menor impacto ambiental, además de ser compatibles con diferentes instrumentos analíticos. Esto ha llevado a la miniaturización de los procesos de extracción y a la reducción en el consumo de solventes orgánicos, promoviendo metodologías más sostenibles y eficientes.

En 1990, Arthur y Pawliszyn (2) introdujeron un nuevo método denominado microextracción en fase sólida (SPME). Se coloca en la muestra o en su espacio de cabeza una fibra recubierta de polímero, sobre la que se adsorbe el compuesto investigado. La SPME tiene varias ventajas importantes en comparación con las técnicas tradicionales de preparación de muestras. Sin embargo, aunque el uso de fibras SPME es cada vez más popular, tienen desventajas significativas.

Ventajas	Inconvenientes
<ul style="list-style-type: none"> • Técnica simple y efectiva • Compatible con la separación y detección de analitos mediante HPLC-UV • Resultados lineales para un amplio rango de concentraciones de analitos • Tamaño pequeño, conveniente para diseñar dispositivos portátiles para muestreos de campo. • Resultados altamente consistentes y cuantificables a partir de concentraciones muy bajas de analitos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Temperatura de operación recomendada relativamente baja • Inestabilidad e hinchamiento en solventes orgánicos • Rotura de fibras y desprendimiento de recubrimientos • Doblamiento de agujas y su costo (3)

Tabla 1.1. Ventajas y desventajas de SPME. Elaborada a partir de (2).

Para abordar estas limitaciones, se ha desarrollado la microextracción en fase líquida (LPME), una técnica innovadora que permite la preconcentración de analitos utilizando volúmenes mínimos de disolventes. A diferencia de la LLE convencional, que requiere cientos de mililitros de solvente, la LPME solo emplea unos pocos microlitros, lo que la convierte en una alternativa más económica y ecológica. Además, es compatible con múltiples técnicas analíticas como la cromatografía de gases capilar (GC), electroforesis capilar (CE) y HPLC (1).

A lo largo del tiempo, la microextracción en fase líquida (LPME) ha experimentado un continuo desarrollo con el objetivo de mejorar la eficiencia de extracción, la selectividad y la compatibilidad con diferentes matrices y técnicas analíticas. Este proceso de evolución ha dado lugar a diversas variantes de LPME, cada una adaptada a necesidades específicas y con mejoras en aspectos clave como la reducción del volumen de disolvente, el aumento de la preconcentración y la minimización de interferencias en muestras complejas.

Año	Autores		Técnica desarrollada	Ref
1995	Liu y Dasgupta		Desarrollan un método en el que un flujo de gas pasa a través de una gota de líquido	(4)
1996	Liu y Dasgupta		Desarrollan el sistema de extracción con disolvente “drop-in-drop”	(5)
1996	Jeannot Cantwell	y	Introducen el término microextracción líquido-líquido	(6)
1997	Jeannot Cantwell	y	Utilizan una jeringa de cromatografía para poner en contacto la gota con la muestra	(7)
1997	He y Lee		Desarrollan la misma modalidad y definen, además, el término LPME estática y dinámica	(8)
1998	Ma y Cantwell		Utilizan tres fases usando un soporte de membrana líquida y una gota acuosa de disolución aceptora	(9)
1999	Pedersen Rasmussen	y	Introducen la LPME introduciendo el disolvente en una fibra hueca porosa (HF-LPME)	(10)
2000	Liu y Lee		Desarrollan una técnica de microextracción en flujo continuo	(11)
2001	Jeannot y col.		Introducen simultáneamente la microextracción en gota en el modo de espacio de cabeza	(12)
2001	Vickackaite col.	y		(13)
2002	Przyjazny Kokosa	y		(14)
2002	Hauser u Popp		Utilizan una membrana de polietileno de baja densidad para separar la fase acuosa de la fase orgánica dentro de un vial	(15)
2006	Pedersen Rasmussen	y	Desarrollan la extracción con electromembrana combinando la extracción en fibra hueca con los principios de la electroextracción	(16)
2006	Rezaee y col.		Introducen la microextracción líquido-líquido dispersiva	(17)

Tabla 1.2. Desarrollo histórico de la técnica de microextracción en fase líquida. Fuente: (18).

Gracias a estos avances, actualmente existen múltiples enfoques de LPME, como la microextracción en gota suspendida (SDME), la microextracción en fase líquida con fibra hueca (HF-LPME) y la LPME en modo dispersivo (DLLME), cada una con características particulares que optimizan su rendimiento en distintos escenarios analíticos.

En este contexto, la LPME ha surgido como una herramienta clave, permitiendo la extracción eficiente de compuestos con mínima manipulación de la muestra y menor consumo de reactivos.

1.1.1. Fundamentos de la microextracción en fase líquida (LPME).

La LPME se basa en la transferencia selectiva de analitos desde una muestra líquida hacia un volumen reducido de fase extractora, que puede ser un disolvente inmiscible con la muestra o un líquido compatible con la técnica de análisis posterior.

El proceso ocurre a través de mecanismos de partición o difusión, donde los analitos migran desde la muestra a la fase extractora debido a diferencia de solubilidad de los analitos en ambas fases, favoreciendo la extracción de aquellos con mayor afinidad por el disolvente de extracción (19).

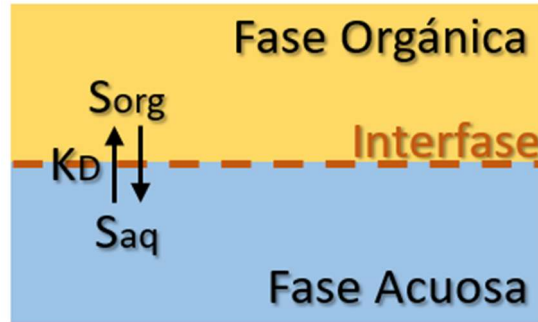


Figura 1.1. Esquema del fundamento de extracción líquido-líquido donde la partición de los analitos depende únicamente del equilibrio K_D , sin reacciones secundarias. (Fuente: Elaboración propia).

Esto permite la concentración selectiva de compuestos objetivo antes de su análisis por técnicas cromatográficas como GC-MS, LC-MS o CE. Dependiendo de la estrategia utilizada, la extracción puede realizarse en una fase estática o mediante procesos dinámicos que favorecen el enriquecimiento de los compuestos de interés.

Tipos de microextracción en fase líquida (LPME)

A lo largo de los años, se han desarrollado varias modalidades de LPME para mejorar la eficiencia de extracción y adaptarse a diferentes tipos de muestras y técnicas analíticas.

- **Microextracción en fase líquida de una sola gota (SDME):** En esta técnica, se utiliza una microgota de disolvente orgánico suspendida en la punta de una aguja o en la superficie de la muestra. Los analitos se difunden hacia la gota, que posteriormente es recuperada y analizada (20). Utiliza volúmenes mínimos de disolvente y permite una alta preconcentración. Sin embargo, puede ser susceptible a la evaporación del disolvente y requiere condiciones controladas para evitar la pérdida de la microgota.

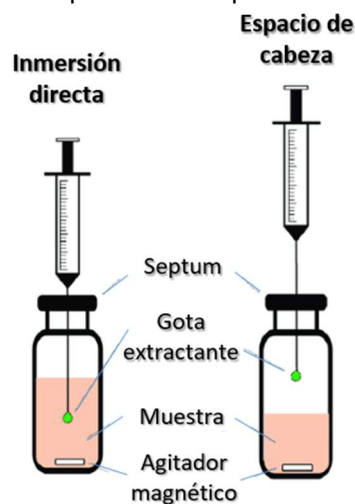


Figura 1.2. Representación esquemática de los modos de inmersión directa y de espacio de cabeza de la microextracción de gota única (SDME). Adaptada de (20).

- **Microextracción en fase líquida de dos fases (Two-phase LPME):** Implica la extracción de los analitos en una fase orgánica inmisible con el medio acuoso de la muestra (21). Este método es útil para la extracción de compuestos apolares y se ha utilizado

ampliamente en la determinación de contaminantes ambientales y fármacos en fluidos biológicos.

- **Microextracción en fase líquida de tres fases (Three-phase LPME):** Este enfoque utiliza una membrana hidrofóbica para separar la muestra y la fase de extracción acuosa. Los analitos migran a través de la membrana desde la muestra acuosa hasta una fase receptora, donde se acumulan para su análisis (21). Este tipo de LPME es ideal para compuestos polares y ha demostrado ser altamente eficiente en la extracción selectiva de fármacos y metabolitos en muestras biológicas.

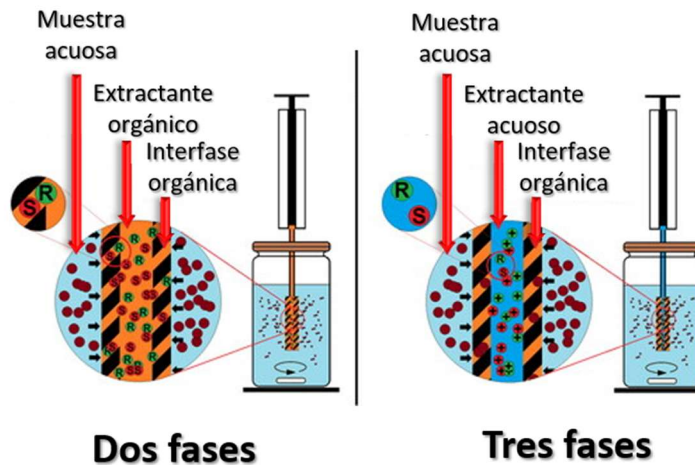


Figura 1.3. Representación esquemática de LPME en dos y tres fases. Adaptada de (21).

- **Microextracción en fase líquida asistida por ultrasonido (UA-LPME):** El uso de ultrasonido facilita la dispersión de la fase extractora dentro de la muestra, mejorando la transferencia de masa y acelerando el proceso de extracción. Esta técnica ha mostrado mejoras significativas en términos de tiempo de análisis y eficiencia de extracción (22).

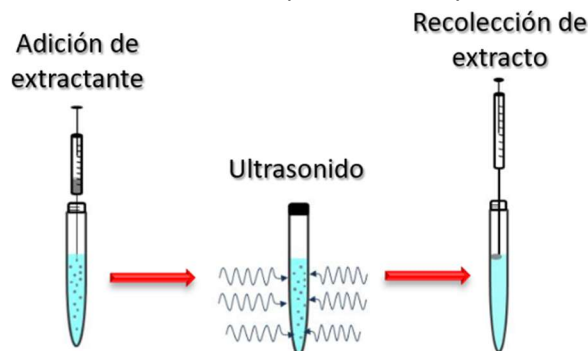


Figura 1.4. Representación esquemática de UA-LPME. Adaptada de (23).

- **Microextracción en fase líquida asistida por electromembrana (EME-LPME):** En esta modalidad, un campo eléctrico se utiliza para dirigir la migración de analitos cargados a través de una membrana hacia la fase extractora. Es particularmente útil para la extracción selectiva de compuestos iónicos, como drogas y contaminantes ambientales (24).

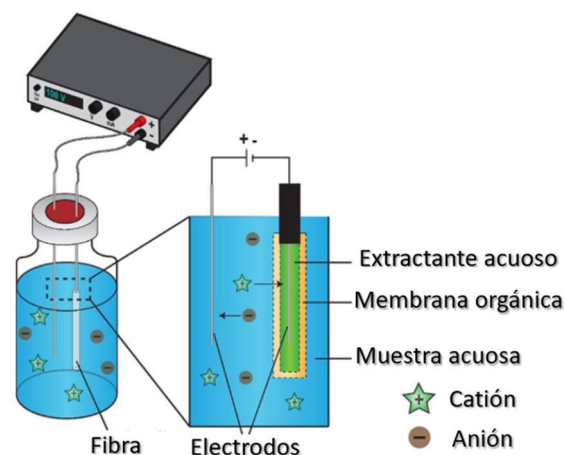


Figura 1.5. Representación esquemática de EME-LPME. Adaptada de (24).

- Microextracción en fase líquida asistida por fibra hueca (HF-LPME):** Esta técnica utiliza una fibra hueca porosa para crear una membrana que soporte la fase extractora. La fibra permite una mayor área de contacto con la muestra, lo que aumenta la eficiencia en la extracción (24). Además, es una técnica rápida, fácil de usar y requiere pequeñas cantidades de disolventes. No obstante, puede requerir optimización del tipo de disolvente y, en algunos casos, resulta más costosa debido a la necesidad de equipos específicos.

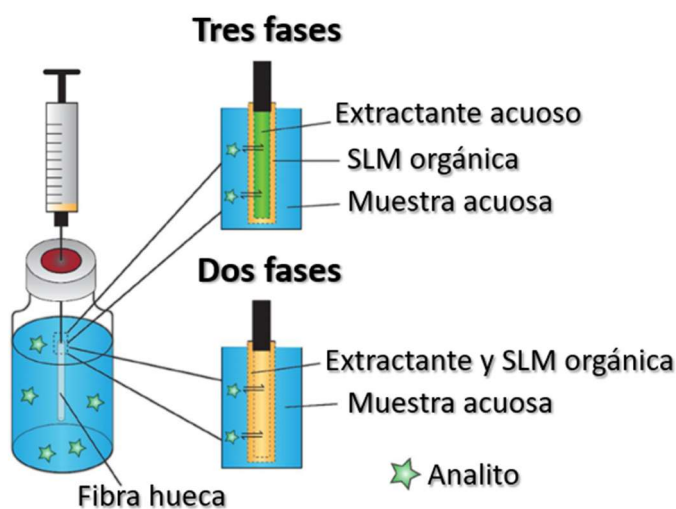


Figura 1.6. Representación esquemática de HF-LPME. Adaptada de (24).

El desarrollo de la microextracción en fase líquida ha permitido avances significativos en la química analítica, proporcionando métodos más sensibles, selectivos y sostenibles. La evolución hacia técnicas con menor impacto ambiental y mayor eficiencia analítica sigue siendo un área activa de investigación, con enfoques innovadores como la microextracción asistida por ultrasonido y la electromembrana. A medida que las necesidades de análisis de compuestos en matrices complejas continúan creciendo, la LPME seguirá desempeñando un papel clave en la optimización de los procesos de preparación de muestras.

En esta tesis, se empleará el uso de microextracción en fase líquida asistida por fibra hueca (HF-LPME) y se desarrollará un nuevo método que combine HF-LPME con la

microextracción en fase líquida asistida por ultrasonido (UA-LPME), resultando en un método innovador que toma las ventajas de ambas técnicas. Este enfoque tiene como objetivo mejorar la eficiencia de extracción, aumentar la sensibilidad y reducir los tiempos de análisis. Se analizarán los factores que afectan el rendimiento de este método combinado, como el tipo de disolvente, la temperatura y el tiempo de extracción, además de estudiar la disposición de la fibra hueca. Este desarrollo busca ofrecer una solución más eficiente y sostenible para la metabolómica no dirigida, alineándose con los principios de "química verde" al reducir el uso de disolventes y optimizar los procedimientos.

1.1.2. Optimización de los métodos LPME.

Durante el desarrollo de un procedimiento LPME, existe la necesidad de optimizar cuidadosamente los factores significativos que afectan la calidad de los resultados. Entre estos factores, destacan (25):

- **Tipo de disolvente de extracción:** El disolvente debe ser compatible con la técnica analítica utilizada (GC, HPLC, CE), tener una alta capacidad de extracción para los analitos de interés y una baja solubilidad en la fase de la muestra para evitar pérdidas significativas. En el caso de HF-LPME, debe ser inmiscible con la fase acuosa y presentar una alta afinidad con la membrana de la fibra hueca.
- **Volumen de la fase de extracción:** Un menor volumen de disolvente mejora la preconcentración de los analitos, aumentando la sensibilidad. Sin embargo, un volumen demasiado pequeño puede generar dificultades en la manipulación y recuperación de la muestra extraída.
- **pH de la muestra:** En técnicas como la HF-LPME en modalidad de tres fases, el pH de la muestra y de la fase receptora es crucial para la ionización y transferencia de los analitos a través de la membrana. Ajustar estos parámetros permite mejorar la selectividad y eficiencia de extracción. Además, la adición de sales (efecto de fuerza iónica) puede mejorar o dificultar la partición de los analitos dependiendo de sus propiedades químicas.
- **Tiempo de extracción:** El equilibrio de extracción depende del tiempo de contacto entre la muestra y la fase extractante. Un tiempo insuficiente puede resultar en una baja recuperación de los analitos, mientras que tiempos excesivos pueden causar el reequilibrio de los analitos entre la muestra y la fase extractante, disminuyendo la eficiencia de preconcentración.
- **Agitación y ultrasonido:** La agitación mecánica o el uso de ultrasonido en la extracción asistida por ultrasonido (UA-LPME) favorece la dispersión del disolvente extractante, acelera la transferencia de masa y reduce el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio de extracción.
- **Temperatura:** La temperatura afecta la velocidad de difusión de los analitos y la solubilidad de estos en la fase extractante. Un aumento en la temperatura puede acelerar el proceso de extracción, pero también podría afectar la estabilidad de algunos compuestos.
- **Disposición y material de la fibra (en HF-LPME):** En la HF-LPME, la configuración de la fibra (longitud, diámetro, tipo de membrana polimérica) influye en la eficiencia de la

extracción. Diferentes materiales de membrana pueden afectar la permeabilidad selectiva de los analitos y la estabilidad del disolvente dentro de la fibra hueca.

La metodología de superficie de respuesta (RSM) desempeña un papel clave en la determinación de la combinación óptima de factores que maximizan una respuesta determinada, como la sensibilidad, el porcentaje de recuperación o el área del pico en un análisis cromatográfico (26).

Esta metodología consiste en un conjunto de herramientas estadísticas diseñadas para modelar y analizar el impacto de múltiples variables dentro de un proceso. Su principal ventaja es la capacidad de encontrar las condiciones óptimas mediante un número reducido de experimentos, considerando además las interacciones entre las variables independientes.

A diferencia del enfoque univariado, que evalúa una variable a la vez, la RSM se basa en un enfoque multivariado que permite evaluar simultáneamente los efectos combinados de los factores experimentales. Esto la hace más eficiente y práctica en comparación con los métodos convencionales, ya que los datos obtenidos a partir de un diseño experimental bien estructurado permiten construir modelos matemáticos que describen con precisión la relación entre las variables y la respuesta del sistema (26).

La conocida RSM, basada en la aplicación de un diseño multivariante de experimentos (DOE) seguido de una optimización mediante un modelo matemático, juega un papel importante en las aplicaciones de pretratamiento de muestras. Probablemente, esto se debe a que su implementación requiere menos esfuerzos y recursos que los involucrados en procedimientos univariantes, consumiendo menos tiempo para lograr el mismo objetivo (26). Su aplicación sigue una serie de pasos estructurados:

- 1) Identificación de la respuesta a optimizar, como el porcentaje de recuperación en un proceso de extracción.
- 2) Diseño de cribado, utilizado para reducir el número de factores que podrían influir en la respuesta.
- 3) Construcción del modelo de superficie de respuesta, con el fin de establecer la relación matemática entre las variables y la respuesta analizada.
- 4) Optimización de respuestas múltiples, en casos donde se requiere evaluar simultáneamente varias respuestas dentro del mismo estudio (27).

En el ámbito del pretratamiento de muestras, particularmente en las etapas de extracción y preconcentración, uno de los principales objetivos es maximizar el porcentaje de recuperación de los analitos. Idealmente, se busca que la totalidad de la sustancia presente en la muestra migre hacia la solución final donde será analizada. Para lograrlo, es fundamental identificar la combinación óptima de factores experimentales que permitan alcanzar una recuperación máxima.

Además, otro aspecto clave es la precisión del método, la cual debe mantenerse dentro de parámetros adecuados. Esto se evalúa mediante la repetición del procedimiento y el cálculo de métricas como el coeficiente de variación, con el fin de minimizar cualquier variabilidad en los resultados.

El proceso de selección de factores implica la identificación de las variables que pueden influir en la eficiencia de extracción. Inicialmente, se consideran múltiples factores, los cuales son evaluados a través de un diseño de cribado, seguido de un análisis estadístico de los datos,

generalmente mediante ANOVA. Este enfoque permite determinar cuáles de estos factores tienen un impacto significativo sobre la respuesta analítica.

Los factores pueden clasificarse en tres categorías:

- Cuantitativos, como la temperatura, el tiempo de extracción o el volumen de solvente.
- Cualitativos, que incluyen variables como el tipo de agitación o el material de la fibra utilizada.
- Relacionados con la mezcla, que consideran la composición de solventes y su influencia en la solubilidad de los analitos debido a diferencias en su polaridad.

Este enfoque sistemático facilita la optimización del proceso de extracción, permitiendo mejorar la eficiencia y reproducibilidad del método

Diseños de optimización

Los diseños de selección suelen implicar la variación de factores en dos niveles (-1, +1), donde el rango representa el intervalo más amplio en el que un factor puede fluctuar dentro del sistema analizado. La elección de este rango generalmente se basa en datos previos de la literatura científica o en la experiencia del analista (28).

Entre los diseños más utilizados para la selección de factores se encuentran:

- Factorial completo, que evalúa todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores.
- Factorial fraccionado, que analiza solo una parte del total de combinaciones, reduciendo la cantidad de experimentos necesarios.
- Diseño de Plackett–Burman (PBD), empleado para identificar los factores más influyentes con un número mínimo de ensayos.
- Diseño de Taguchi (TD), que optimiza procesos mediante un enfoque robusto basado en matrices ortogonales.

Como se mencionó anteriormente, estos diseños trabajan con dos niveles por cada factor (k). Entre ellos, el diseño factorial fraccionado es el más empleado, ya que permite analizar un gran número de factores con menos experimentos en comparación con un diseño factorial completo 2^k . Para lograr esta reducción, se fragmenta el diseño completo en un diseño 2^{k-p} , donde p es el número de fracciones en las que se divide el experimento.

Por otro lado, los diseños Plackett–Burman (PBD) y Taguchi (TD) son altamente fraccionados, lo que facilita el estudio de múltiples factores con un número mínimo de ensayos. Sin embargo, presentan la desventaja de que los efectos principales pueden confundirse con interacciones dobles, lo que requiere una aplicación cuidadosa para evitar interpretaciones erróneas (27).

Existen diversos diseños para modelar una superficie de respuesta, y la elección del más adecuado depende del objetivo específico del estudio. Algunos factores clave a considerar incluyen la reducción del número de experimentos, la exclusión de ciertas zonas dentro de la región experimental o la obtención de parámetros ajustados con alta precisión. Cada diseño ofrece ventajas particulares según las necesidades del análisis y las restricciones del experimento

(28). Los diseños más reportados en la literatura son el factorial completo, el compuesto central (CCD), el Box-Behnken (BBD) y los diseños de centroide simplex mixto, que se discutirán brevemente a continuación.

El diseño factorial completo es una extensión del diseño 2^k utilizado en los diseños de cribado, pero en este caso, el número de experimentos es igual a 3^k .

Uno de los diseños más utilizados es el diseño compuesto central (CCD), el cual combina puntos factoriales de dos niveles (-1 y +1), puntos axiales o de estrella, y puntos centrales (donde todos los factores se establecen en 0). En los puntos de estrella, solo un factor toma el valor $\pm\alpha$, que define su posición y suele variar entre 1 y \sqrt{k} . El número total de experimentos en este diseño se determina mediante la ecuación [2^k+2k +puntos centrales].

Por otro lado, el diseño Box-Behnken requiere un menor número de experimentos en comparación con los diseños anteriores. Su número de experimentos se calcula como [$2k(k-1)$ +puntos centrales]. Sin embargo, este diseño solo se puede aplicar cuando hay tres o más factores en estudio.

En el caso de estudios en los que los factores representan los componentes de una mezcla, se emplea el diseño simplex centroide de mezcla. En este tipo de diseño, los niveles de los factores no son independientes, ya que están relacionados entre sí en función de su proporción dentro de la mezcla. Esto permite analizar cómo las variaciones en las proporciones afectan la respuesta del sistema. El espacio experimental en este diseño adopta una forma geométrica regular con tantos vértices como componentes, en un espacio cuya dimensionalidad es igual al número de componentes menos uno (26). Estos diseños suelen complementarse con puntos adicionales dentro de la región experimental. Es importante destacar que los modelos empleados en los diseños de mezcla, conocidos como polinomios de Scheffé, difieren de los utilizados en las superficies de respuesta para variables independientes.

Diseño Factorial Completo	
Estudia todos los posibles niveles de los factores en combinación, permitiendo analizar de manera exhaustiva sus efectos individuales e interacciones.	
Aplicación en LPME: Optimización detallada de varios factores, como la temperatura, el pH y el volumen del disolvente extractante.	
Ventajas	Inconvenientes
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Considera todas las combinaciones posibles de factores. ✓ Permite detectar efectos principales e interacciones entre factores. 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Requiere un alto número de experimentos, especialmente si hay muchos factores y niveles.
Diseño Factorial Fraccionado	
Solo se analizan una fracción de todas las combinaciones posibles.	
Aplicación en LPME: Adecuado para estudios preliminares en los que se busca identificar los factores más influyentes sin realizar un número excesivo de experimentos.	
Ventajas	Inconvenientes
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Reduce el número de experimentos en comparación con el diseño factorial completo. 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Puede perder información sobre algunas interacciones entre factores si la fracción seleccionada es demasiado pequeña.

<p>✓ Útil para eliminar factores poco influyentes en etapas iniciales.</p>	
<p>Diseño de Superficie de Respuesta (RSM)</p>	
<p>Optimizar procesos cuando hay una respuesta cuantitativa continua (como la eficiencia de extracción en LPME). Modela la relación entre los factores y la respuesta mediante ecuaciones matemáticas. (CCD, Box-Behnken)</p>	
<p>Aplicación en LPME: Ideal para encontrar las condiciones óptimas de extracción, como el mejor equilibrio entre tiempo de extracción y volumen de disolvente.</p>	
<p>Ventajas</p>	<p>Inconvenientes</p>
<p>✓ Permite modelar la relación entre factores y la respuesta de manera precisa.</p> <p>✓ Requiere menos experimentos que un diseño factorial completo.</p> <p>✓ Permite optimización matemática de los parámetros.</p>	<p>✗ Es más complejo que los diseños factoriales simples y requiere herramientas estadísticas avanzadas para su análisis.</p>
<p>Diseño de Plackett-Burman</p>	
<p>Diseño de cribado (screening) utilizado para identificar cuáles factores tienen un efecto significativo en un proceso, sin analizar interacciones entre ellos.</p>	
<p>Aplicación en LPME: Estudios preliminares para determinar qué variables afectan más la eficiencia de extracción, antes de hacer una optimización más detallada.</p>	
<p>Ventajas</p>	<p>Inconvenientes</p>
<p>✓ Permite reducir rápidamente el número de factores a estudiar.</p> <p>✓ Requiere pocos experimentos en comparación con los diseños factoriales completos.</p>	<p>✗ No permite evaluar interacciones entre factores.</p> <p>✗ Solo proporciona información preliminar; se requiere otro diseño para optimizar los parámetros seleccionados.</p>
<p>Diseño de Mezclas</p>	
<p>Cuando los factores a optimizar son proporciones de componentes en una mezcla</p>	
<p>Aplicación en LPME: Cuando se trabaja con mezclas de disolventes o soluciones buffer para optimizar la selectividad y eficiencia de extracción.</p>	
<p>Ventajas</p>	<p>Inconvenientes</p>
<p>✓ Permite optimizar formulaciones de mezclas con varias proporciones.</p> <p>✓ Es ideal cuando el rendimiento depende de combinaciones específicas de componentes.</p>	<p>✗ No es adecuado para optimizar factores como temperatura o tiempo de extracción.</p>

Tabla 1.3. Cuadro resumen de los distintos diseños DOE, y sus ventajas, inconvenientes y aplicaciones en LPME. (Fuente: Elaboración propia).

Modelado: mínimos cuadrados (LS)

El modelado matemático permite predecir la respuesta del sistema en función de diferentes variables. Una de las metodologías más utilizadas para este propósito es el método de mínimos cuadrados (LS, Least Squares), el cual se emplea para ajustar modelos matemáticos a los datos experimentales (28).

El método de mínimos cuadrados (LS) es una técnica de regresión que estima los coeficientes de una ecuación matemática minimizando la suma de los errores al cuadrado entre los valores experimentales y los valores predichos por el modelo.

Matemáticamente, la relación entre la variable respuesta Y y las variables predictoras X_1, X_2 se expresa como:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{1-2} X_1 X_2 + \varepsilon$$

donde:

- Y es la respuesta (por ejemplo, eficiencia de extracción en LPME).
- X_1, X_2 son las variables independientes (pH, volumen de disolvente, tiempo de extracción, etc.).
- $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_n$ son los coeficientes del modelo, que se estiman mediante mínimos cuadrados, y β_{1-2} representa la interacción.
- ε representa el error del modelo (diferencia entre valores reales y predichos).

Donde la significancia de los coeficientes se investiga a través de ANOVA.

El objetivo del LS es encontrar los coeficientes β que minimizan la suma de los cuadrados de los errores (SSE):

$$SSE = \sum (Y_{\text{exp}} - Y_{\text{pred}})^2$$

Se debe aplicar una prueba ANOVA para determinar la significancia del modelo. Esta última puede considerarse satisfactoria cuando la regresión es significativa y se obtiene una falta de ajuste no significativa para el nivel de confianza seleccionado ($\alpha=0,05$). Sin embargo, un modelo significativo no significa necesariamente que la variación en los datos se explique correctamente. Además, es obligatorio el análisis de los gráficos de residuos, así como las evaluaciones del coeficiente de determinación (R^2) y del coeficiente de determinación ajustado (R_{adj}^2), que representan el porcentaje de varianza explicada por el modelo. El gráfico de probabilidad normal indica que los residuos siguen una distribución normal, uno de los supuestos básicos para la validez del ANOVA. La homogeneidad de la varianza (otro supuesto del ANOVA) puede evaluarse mediante el gráfico de residuos frente a los valores de respuesta previstos ascendentes (27).

Ajuste de Modelos en la Optimización Experimental	
Ajustar modelos matemáticos a los datos obtenidos mediante diseños experimentales como el Diseño Central Compuesto (CCD) o el Box-Behnken.	
Validación del Modelo: evaluar calidad y precisión	
-	Coeficiente de determinación (R^2): Indica qué porcentaje de la variabilidad en la respuesta es explicada por el modelo. Un R^2 cercano a 1 sugiere un buen ajuste.
-	Prueba de significancia de coeficientes (p-valores): Permite determinar qué factores tienen un efecto significativo en la extracción.
-	Análisis de residuos: Se revisa si los residuos ($Y_{\text{exp}} - Y_{\text{pred}}$) siguen una distribución normal y si la variabilidad es constante.

Ventajas	Inconvenientes
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Permite ajustar modelos matemáticos de manera sencilla. ✓ Facilita la predicción y optimización de condiciones experimentales. ✓ Es compatible con técnicas de superficie de respuesta (RSM). 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Es sensible a valores atípicos, que pueden afectar la estimación de los coeficientes. ✗ Supone que la relación entre variables es lineal o cuadrática, lo que puede no ser válido en algunos casos. ✗ La multicolinealidad (correlación alta entre variables) puede afectar la interpretación de los coeficientes.

Tabla 1.4. Cuadro resumen de los ajustes de Modelos en la optimización experimental de técnicas LPME. (Fuente: Elaboración propia).

1.1.3. Aplicaciones de LPME en la determinación de contaminantes orgánicos.

En los últimos años, la microextracción en fase líquida (LPME) se ha consolidado como una de las técnicas más utilizadas para el pretratamiento y separación de muestras en diversos campos, incluyendo el análisis ambiental (29–31), alimentario (32,33) y farmacéutico (34,35). En este método, la transferencia de los analitos entre la interfaz del disolvente orgánico (fase aceptora) y el agua permite su extracción y preconcentración en la fase orgánica. Para obtener factores de enriquecimiento más altos, se recomienda utilizar una alta relación entre el volumen de muestra y el volumen de disolvente orgánico.

La LPME destaca por ser un procedimiento simple, rápido y económico, permitiendo la extracción de una gran variedad de analitos a partir de matrices complejas. Recientemente, se han desarrollado innovaciones en esta técnica, optimizando la preparación de la fase de extracción y reduciendo o eliminando etapas que consumen mucho tiempo dentro de los procedimientos analíticos. Desde su introducción, la LPME se ha consolidado como una herramienta altamente eficiente para la determinación de numerosos compuestos en diversas matrices, ofreciendo ventajas clave como un bajo consumo de disolventes, facilidad operativa, costos reducidos, alta capacidad de preconcentración y tiempos de extracción más cortos en comparación con la extracción líquido-líquido convencional (LLE).

El interés por metodologías analíticas más sostenibles ha impulsado el uso de la LPME en la determinación de microcontaminantes en muestras ambientales, ya que su impacto ecológico es menor en comparación con métodos convencionales (36). La selección de una estrategia de preparación de muestras basada en LPME depende de varios factores, incluyendo las propiedades fisicoquímicas de los analitos, la composición de la matriz de la muestra y las características del diseño experimental de la técnica utilizada. Por ello, se han desarrollado distintos enfoques para la extracción de diversas clases de microcontaminantes orgánicos.

En particular, los contaminantes emergentes, un grupo de compuestos orgánicos sintéticos cuya presencia en el medio ambiente ha suscitado preocupación, han sido objeto de numerosos estudios. La mayoría de estos compuestos aún no están regulados y sus efectos en la salud humana no han sido completamente determinados. Dentro de esta categoría se incluyen sustancias como los perfluoroalquilos y los retardantes de llama organofosforados (37,38). Además, entre los contaminantes orgánicos ampliamente reportados en distintas matrices ambientales se encuentran los pesticidas organofosforados y organoclorados, los hidrocarburos aromáticos policíclicos y los trihalometanos.

A medida que aumenta la necesidad de metodologías analíticas más eficientes y ecológicas, las técnicas de microextracción han ganado popularidad en la determinación de microcontaminantes orgánicos. En particular, la LPME ha sido ampliamente adoptada gracias a sus características analíticas únicas que la convierten en una opción eficiente y sostenible. En las siguientes secciones, se presentan estudios recientes que han aplicado la LPME en este campo, resaltando sus ventajas y aplicaciones en el análisis de contaminantes en distintas matrices.

Microextracción en fase líquida-líquida dispersiva, DLLME

La microextracción en fase líquida-líquida dispersiva (DLLME) ha demostrado ser una técnica altamente eficiente y rápida para la extracción de analitos en distintas matrices. Su configuración clásica se basa en la mezcla de pequeñas cantidades de disolventes de extracción y dispersantes, permitiendo la preconcentración efectiva de compuestos orgánicos en muestras acuosas (17). A lo largo del tiempo, se han propuesto diversas modificaciones para mejorar su aplicabilidad en el análisis de trazas, entre las que destacan el uso de líquidos iónicos (ILs), los cuales han sido fundamentales en los avances recientes en esta técnica (39).

El empleo de ILs como fases de extracción en metodologías de microextracción resulta particularmente valioso debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas, como su presión de vapor prácticamente nula, estabilidad térmica elevada, amplia gama de viscosidades y su capacidad para solvatación múltiple. Estas características hacen que los ILs sean materiales versátiles y altamente selectivos en el contexto de la LPME. Su estructura está compuesta por un catión orgánico y un anión, ya sea inorgánico u orgánico, lo que permite ajustar sus propiedades y mejorar la eficiencia de extracción en función del analito de interés (40,41).

En los últimos años, diversas revisiones han resaltado el potencial de los ILs en los procesos de microextracción (39,42), evidenciando su idoneidad como alternativa a los disolventes convencionales en la determinación de microcontaminantes orgánicos. Su integración con la técnica DLLME ha demostrado ser una estrategia confiable, eficiente y ecológica, ya que los ILs no solo mejoran la capacidad de extracción, sino que también aumentan la superficie de contacto entre el disolvente y la muestra, optimizando el rendimiento del proceso.

Los enfoques basados en IL-DLLME han sido explorados en distintos estudios (39,43). En 2017, se desarrolló un método basado en IL-DLLME in situ para la determinación de bifenilos policlorados (PCBs) y acrilamida en muestras de alimentos mediante cromatografía de gases en espacio de cabeza (HS-GC) acoplada a detección por captura de electrones y espectrometría de masas. Los investigadores evaluaron ILs con distintas estructuras químicas con el fin de mejorar la eficiencia de extracción de los analitos. Inicialmente, estos ILs presentaban una naturaleza hidrofílica, pero tras la adición de un reactivo de intercambio aniónico (bis[(trifluorometil)sulfonil]imida), adquirieron una estructura hidrófoba. Como resultado, el método basado en [BMIM][Br] permitió la determinación de PCBs en muestras de grasa de leche con límites de detección de 5 a 25 ng L⁻¹ y coeficientes de determinación (R²) superiores a 0,996, con valores de desviación estándar relativa (RSD) entre 3 y 13%. Además, el IL [HeOHMIM][Cl] se utilizó para cuantificar la acrilamida en café preparado, obteniéndose una concentración de 91,2 µg L⁻¹ (44).

Otro avance significativo se introdujo también en 2017 con el desarrollo de un método analítico basado en IL-DLLME asistida por temperatura (TA-IL-DLLME) para la detección de

glifosato y ácido aminometilfosfónico en muestras de agua. En este caso, el IL 1-decil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato ([DMIM][BF₄]) presentó el mejor desempeño de extracción, mientras que la variación en la temperatura permitió su dispersión y posterior agregación antes de la detección por cromatografía líquida de alto rendimiento con análisis de fluorescencia. El método desarrollado logró límites de detección de 0,27 y 0,22 µg L⁻¹ para glifosato y ácido aminometilfosfónico, respectivamente, con coeficientes de determinación superiores a 0,99 para ambos compuestos (45).

Recientemente, se ha introducido una nueva subcategoría de líquidos iónicos, los denominados líquidos iónicos magnéticos (MILs), que han sido utilizados en técnicas basadas en LPME para la determinación de microcontaminantes orgánicos (46,47). Estos compuestos conservan las propiedades de los ILs convencionales, pero tienen la particularidad de responder a campos magnéticos debido a la presencia de un catión o anión con propiedades magnéticas en su estructura. En un estudio de 2017, los MILs fueron empleados tanto en DLLME como en microextracción de gota única en espacio de cabeza (HS-SDME). Para ello, se utilizaron MILs a base de manganeso, caracterizados por su baja absorbancia en la región UV, obteniendo resultados satisfactorios en la determinación de diversos compuestos orgánicos en niveles de partes por billón. Al aplicar HS-SDME, los coeficientes de determinación oscilaron entre 0,994 y 0,999, con límites de detección de 0,04 a 1 µg L⁻¹, mientras que en el caso de DLLME, los valores de R² variaron entre 0,997 y 0,999, con límites de detección de 0,05 a 1 µg L⁻¹ (48).

Otra modificación en la elección del disolvente de extracción en DLLME fue reportada en 2018, cuando se desarrolló un método de microextracción líquido-líquido dispersiva basado en afinidad fluorosa para la determinación de sustancias perfluoroalquiladas y polifluoroalquiladas en muestras acuosas. En este estudio, se empleó perfluoro-tert-butanol, un compuesto con múltiples enlaces C-F, como disolvente de extracción, mientras que el acetonitrilo actuó como disolvente dispersante en una proporción de 120:800 (µL, v/v). Este enfoque optimizado demostró una alta selectividad en la extracción de los analitos, logrando límites de cuantificación en el rango de 0,8 a 8,7 ng L⁻¹ y coeficientes de correlación (R) superiores a 0,98 (49).

Analitos	Matriz	Sistema de detección	Solvente de extracción	Solvente dispersante	Ref
Metomilo	Agua natural	HPLC-VWD	Tetracloroetano	Metanol	(50)
Clenbuterol	Agua de río, lago y arroyo	LC-UV	Triclorometano	Acetona	(51)
Éteres difenílicos polibromados	Agua ambiental	RP-HPLC	Tetracloroetano	Acetonitrilo	(52)
Ésteres de ftalato	Agua	HPLC-VWD	Tetracloruro de carbono	Acetonitrilo	(53)
Insecticidas heterocíclicos	Agua	HPLC-DAD	[C6MIM][PF6]	Metanol	(54)
Piretroides	Agua de río	HPLC-UV	Tetracloroetano	Acetona	(55)

Tetrabromobisfenol A	Agua	HPLC-ESI-MS/MS	[C8MIM][PF6]	Acetonitrilo	(56)
Fungicidas	Agua	HPLC-UV	[C8MIM][PF6]	Metanol	(57)
Verde malaquita y violeta cristal	Agua ambiental	HPLC-UV	[C8MIM][PF6]	Metanol	(58)
Pesticidas benzoilurea	Agua ambiental	HPLC-UV	Clorobenceno	Etanol	(59)
Nitroimidazoles y antibióticos amfenicoles	Agua	UHPLC-MS/MS	Diclorometano	Acetonitrilo	(60)
Ésteres de ftalato	Productos cosméticos	LC-MS	Tetracloruro de carbono	Acetonitrilo	(61)
HAPs	Muestras de agua superficial	GC-FID	Tetracloroetileno	Acetona	(17)
Ftalatos y almizcles policíclicos	Agua	GC-MS	Tetracloruro de carbono	Metanol	(62)
BTEXs	Agua de grifo, pozo y lago	GC-FID	Nitrobenzeno	-	(63)
Filtros UV	Aguas marinas	GC-MS	Cloroformo	Acetona	(64)
OPPs	Agua de río y jugo de frutas	GC-FID	Diclorometano	DMSO	(65)
Colorantes	Muestras de agua	UV-Vis	Cloroformo	Etanol	(66)

Tabla 1.5. Aplicaciones de los métodos convencionales de (DLLME) para el análisis de contaminantes orgánicos. Adaptada de (67).

Estas innovaciones han permitido ampliar significativamente las aplicaciones de la DLLME, ofreciendo soluciones más sostenibles y eficientes para la determinación de contaminantes en distintas matrices. El uso de líquidos iónicos, tanto convencionales como magnéticos, en combinación con DLLME continúa evolucionando, consolidándose como una estrategia de extracción versátil y respetuosa con el medio ambiente.

Microextracción con una sola gota, SDME

La microextracción con una sola gota (SDME) es una técnica basada en LPME que destaca por su simplicidad, facilidad de operación y alta confiabilidad. Desarrollada en la década de 1990, ha sido objeto de múltiples mejoras y aplicaciones en la determinación de diversos microcontaminantes orgánicos (6). En los últimos años, las innovaciones en esta técnica se han centrado en el desarrollo de nuevas fases de extracción y en la optimización de las configuraciones del procedimiento.

Entre los avances recientes, los líquidos iónicos magnéticos (MILs) han adquirido gran relevancia debido a sus propiedades únicas, tal como se ha mencionado anteriormente. En el contexto de SDME, la propiedad magnética de estos compuestos ha sido aprovechada para mejorar la estabilidad de la microgota durante el proceso de extracción. Al fijar el disolvente

magnético a un imán de varilla, se logra una mayor estabilidad y control sobre la fase extractora al exponerse a la muestra.

En 2017, este principio fue aplicado en la determinación de compuestos aromáticos e hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras de agua, utilizando un enfoque basado en MIL-HS-SDME (48). Posteriormente, un estudio reciente propuso por primera vez el uso de un líquido iónico magnético hidrofílico como fase de extracción en HS-SDME para la determinación de clorobenzenos. En este método, el líquido iónico magnético 1-etil-3-metilimidazolio tetraisotiocianatocobaltato (II) se empleó como fase de extracción antes de la desorción térmica y el análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Esta metodología demostró una alta sensibilidad en la detección de clorobenzenos, con límites de detección entre 4 y 8 ng L⁻¹, coeficientes de correlación superiores a 0,988 y recuperaciones relativas en muestras de agua real que oscilaron entre 84 y 114% (68).

Otra innovación importante fue reportada en 2018 con el desarrollo de la microextracción en fase líquida protegida con punta de bola (BT-LPME), la cual se presentó como una alternativa a los métodos convencionales de SDME. En esta nueva configuración, una pequeña cantidad de disolvente orgánico se confinó dentro de la cavidad hueca de una punta de bola metálica (BT), con una abertura mínima utilizada exclusivamente para la extracción del analito. Las BT, fabricadas en acero inoxidable, permitieron una rápida rotación del dispositivo, lo que aceleró el proceso de extracción. Este enfoque se aplicó a la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en muestras de agua, utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. El método alcanzó límites de detección en el rango de 0,002 a 0,011 µg L⁻¹, con coeficientes de determinación (R²) superiores a 0,9993 y una precisión satisfactoria en muestras de agua de río, con recuperaciones relativas entre 92,3 y 103,4% (69).

Estos avances destacan la continua evolución de las técnicas de microextracción, en particular en el desarrollo de nuevas configuraciones y materiales de extracción, con el fin de mejorar la eficiencia, sensibilidad y sostenibilidad de los procesos analíticos.

Extracción por electromembrana (EME)

La microextracción en fase líquida con fibras huecas (HF-LPME) es una técnica eficaz para la preparación de muestras, especialmente útil cuando se trata de muestras complejas. Desde su desarrollo en 1999 (10), el uso de membranas en las técnicas de microextracción ha ganado una notable atención, con numerosas publicaciones y revisiones que profundizan en estos métodos (70,71). Una variante de los enfoques LPME basados en membranas es la extracción por electromembrana (EME), introducida en 2006, donde el potencial eléctrico (DC) aplicado a través de una membrana líquida soportada (SLM) actúa como fuerza impulsora para la extracción (16). La selectividad de la extracción en EME puede ser controlada mediante diversos factores, como la dirección y magnitud del campo eléctrico, la composición química de la SLM, y ajustes en el pH de la muestra y la fase aceptora. Esta técnica permite realizar extracciones eficientes, incluso en matrices complejas como las muestras ambientales, con altos factores de enriquecimiento (72).

Recientemente, las investigaciones sobre EME se han centrado en nuevos materiales para la SLM y en aditivos en la muestra que mejoren la transferencia de masa (73–75). La agarosa, un biopolímero natural obtenido de algas marinas, ha demostrado ser un soporte

adecuado para la difusión y la migración electrocinética de varios compuestos. En este contexto, ha sido utilizada como soporte alternativo para la SLM en técnicas de microextracción impulsadas por electricidad. En 2017, se propuso el uso de gel de agarosa como membrana en EME para la extracción de compuestos como rivastigmina, verapamilo, amlodipino y morfina de muestras de aguas residuales, sin necesidad de disolvente orgánico (73). Además, se utilizó un disco de gel de agarosa impregnado con disolvente como soporte para 1-octanol, que también se usó como fase aceptora para la extracción de compuestos fenólicos de muestras de agua de ríos y lagos (74). Estos enfoques combinan extracción y preconcentración en un proceso eficiente y respetuoso con el medio ambiente, alineado con los principios de la química analítica verde.

Otra innovación reciente empleó una membrana de líquido iónico impregnada en agarosa (76). Este material, compuesto de [C6MIM][PF6], fue exitosamente utilizado para la preconcentración y determinación de residuos de fármacos antidepresivos como imipramina, amitriptilina y clorpromazina en muestras de agua de río y de grifo. Se alcanzaron buenos factores de enriquecimiento y recuperaciones relativas entre 110-150% y 88-111%, respectivamente, después de 8 minutos de extracción electromembrana asistida por líquido iónico (IL-AF- μ -EME) a 10 V.

En 2018, un nuevo enfoque propuso el uso de gel de poliacrilamida como membrana para EME, aplicada a la extracción de fármacos básicos como pseudoefedrina, lidocaína y propranolol en aguas residuales (75). Este método mostró una excelente eficiencia de extracción debido a la estructura porosa del gel, con poros de solo 20 nm, lo que evita que macromoléculas o partículas no disueltas entren en la fase aceptora, resultando en un extracto limpio. Después de 28 minutos de EME, se logró una recuperación relativa de 75% para pseudoefedrina en aguas residuales, lo que demuestra la viabilidad de este enfoque para extraer analitos polares sin necesidad de reactivos de apareamiento iónico.

Un desarrollo más reciente que modifica la SLM integra un electrodo sin burbujas en EME, utilizando membranas de inclusión de polímeros huecos (HPIMs). Este procedimiento ha mostrado su efectividad en la determinación simultánea de herbicidas catiónicos y aniónicos en agua de río, alcanzando factores de enriquecimiento y recuperaciones de hasta 152-185 y 99-100%, respectivamente (77). En paralelo, un estudio innovador exploró el uso de un surfactante como aditivo de muestra para mejorar el transporte de analitos hacia la fase aceptora en EME. La adición de Triton X-100, a concentraciones ligeramente inferiores a su concentración micelar crítica (CMC), proporcionó una mayor sensibilidad y un mejor enriquecimiento, así como límites de detección más bajos para la determinación de herbicidas en muestras de río (78).

Finalmente, la extracción artificial por membrana líquida paralela (PALME) ha sido propuesta como una estrategia que permite un flujo de trabajo sencillo y una limpieza eficiente de muestras, con la capacidad de procesar hasta 96 muestras simultáneamente (79). Además, la automatización de este proceso, mediante un muestreador automático de EME acoplado a cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS), promete mejorar la eficiencia y la velocidad de extracción, lo que hace de este enfoque una opción prometedora para aplicaciones de alto rendimiento (80).

Disolventes supramoleculares (SUPRAS) en LPME

Los disolventes supramoleculares (SUPRAS) son líquidos nanoestructurados inmiscibles en agua, compuestos por agregados anfífilos tridimensionales que se generan de manera

espontánea en soluciones acuosas o hidroorgánicas de anfifilos. Este proceso, denominado coacervación, se ve inducido por estímulos externos como variaciones de pH, temperatura o la adición de sales (81). La disposición de regiones con diferentes polaridades dentro de los agregados supramoleculares proporciona excelentes propiedades de solvatación para una amplia gama de compuestos orgánicos e inorgánicos. Además, la alta cantidad de sitios de unión disponibles ofrece una plataforma ideal para mejorar la interacción del soluto. Gracias a sus propiedades fisicoquímicas, como la posibilidad de modificar la estructura química (variando los grupos hidrófobos o polares de los anfifilos), sus buenas capacidades de solvatación y su baja volatilidad e inflamabilidad, los SUPRAS tienen aplicaciones destacadas en la química analítica (82).

A lo largo de los años, los SUPRAS han sido empleados en diversas técnicas de extracción, como la extracción de punto de enturbiamiento. Una de sus propiedades más atractivas es su capacidad para extraer y preconcentrar compuestos anfifílicos como fármacos, pesticidas, bisfenoles, surfactantes, compuestos bioactivos y micotoxinas, tanto en muestras líquidas como sólidas (83,84). Recientemente, se introdujo un nuevo enfoque basado en SUPRAS gemini para la microextracción en fase líquida de parabenos en agua corriente y aguas residuales (85). Los surfactantes gemini se forman mediante la unión covalente de dos surfactantes ordinarios a través de un espaciador y son más eficaces en la reducción de la tensión superficial, favoreciendo la formación de micelas en comparación con los surfactantes iónicos convencionales. Este enfoque ha mostrado buenos factores de enriquecimiento y recuperaciones relativas (98-156% y 99-106%, respectivamente).

Otro uso reciente de SUPRAS fue en la investigación de micelas inversas de 1-decanol dispersas en THF/agua para la determinación de herbicidas comunes de caña de azúcar (diurón, hexazinona, ametrina y tebutiurón) en muestras de agua subterránea y superficial. Este método, simple, rápido y respetuoso con el medio ambiente, logró buenas recuperaciones relativas (95-111%) en solo 30 segundos de extracción y 10 minutos de centrifugación, sin necesidad de evaporación (86).

Finalmente, un nuevo procedimiento propuesto por Zohrabi et al. (87) empleó un solvente supramolecular como portador de ferrofluido. Este ferrofluido se genera combinando partículas magnéticas recubiertas de ácido oleico con un solvente supramolecular. Las partículas magnéticas pueden ser atraídas por un imán, lo que elimina la necesidad de centrifugación para separar las fases. Este método fue utilizado con éxito para extraer y determinar tres pesticidas organofosforados en muestras de agua y jugo de frutas, con límites de detección entre 0,1 y 0,35 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Analitos	Matriz	Sistema de detección	Fase impulsora de separación	Ref.
Compuestos orgánicos	Agua ambiental	LC-MS	Vesículas de ácido octanoico en presencia de (Bu ₄ N ⁺)	(88)
Bisfenol A, bisfenol F y sus diglicidil éteres correspondientes	Aguas residuales y agua de río	LC-Fluorescencia	Micelas inversas de ácido decanoico en THF	(89)
CPAHs	Agua ambiental	LC-Fluorescencia	Micelas inversas de ácido decanoico en THF	(90)

Fungicidas benzimidazólicos	Agua de río y subterránea	LC-Fluorescencia	Vesículas de ácido decanoico en presencia de (Bu ₄ N ⁺)	(91)
PAHs	Carne y pescado ahumado	LC-Fluorescencia	Vesículas de ácido octanoico en presencia de (Bu ₄ N ⁺)	(92)
Fenoles	Aguas residuales, superficiales y subterráneas	LC-UV	Vesículas de ácido decanoico en presencia de (Bu ₄ N ⁺)	(93)
Parabenos	Agua natural y muestras cosméticas	HPLC-UV	Vesículas de ácido decanoico en presencia de (Bu ₄ N ⁺)	(94)
Herbicidas triazina	Agua de grifo, río y manantial	HPLC-UV	Vesículas de ácido decanoico en presencia de (Bu ₄ N ⁺)	(95)
Parabenos	Cosméticos, bebidas y agua	HPLC-UV	Propanol/surfactante gemini	(85)
Glucocorticoides	Muestras de agua	HPLC-DAD	[BMIM]BF ₄ /n-butanol	(96)
Verde de Malaquita	Aguas residuales de la industria textil	FO-LADs	Micelas inversas de ácido decanoico en THF	(97)

Tabla 1.6. Aplicaciones de los métodos convencionales del uso de disolventes supramoleculares en LPME para el análisis de contaminantes orgánicos Adaptada de (67).

Disolventes eutécticos profundos (DES) como fases de extracción en LPME

La microextracción con disolventes eutécticos profundos (DES) ha despertado un creciente interés debido a su consideración como alternativa “verde” a los disolventes orgánicos tradicionales, ya que presentan una menor toxicidad. Los DES son líquidos iónicos formados a partir de la combinación de componentes biodegradables, reciclables y de bajo costo. Se obtienen al mezclar una sal de amonio cuaternario o un metal con un donador de enlaces de hidrógeno (HBD), como un ácido, amida, amina o alcohol, y generalmente permanecen en estado líquido a temperaturas iguales o inferiores a 100 °C (98). En los últimos años, estos solventes ecológicos han sido explorados en diversas aplicaciones de preparación de muestras.

En 2017, se desarrolló una técnica de microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por gas utilizando un disolvente eutéctico profundo para la determinación de pesticidas en verduras y jugos de frutas mediante cromatografía de gases con detección por ionización de llama (99). En esta metodología, se empleó una mezcla de colina y 4-clorofenol en proporción 1:2, y se burbujeó un gas en el vial para facilitar la dispersión del solvente de extracción. Los límites de detección obtenidos oscilaron entre 0,24 y 1,4 µg L⁻¹, con factores de enriquecimiento de 247 a 355 y recuperaciones entre el 49 y el 71%.

Otro estudio exploró la extracción de filtros UV de benzofenona utilizando un nuevo DES hidrofóbico basado en DL-mentol, en combinación con cromatografía líquida y detección mediante matriz de diodos (100). Se utilizó una mezcla de DL-mentol y ácido decanoico en proporción 1:1, logrando límites de detección entre 0,05 y 0,2 ng mL⁻¹ y coeficientes de correlación (R²) superiores a 0,9930. La técnica fue validada en muestras de piscinas, ríos y aguas residuales, obteniendo recuperaciones que oscilaron entre 89 y 106%.

Un avance reciente introdujo un enfoque innovador basado en la congelación de DES (LPME-FDES) para la extracción de pesticidas en muestras de agua ambiental (101). Se utilizó una combinación de cloruro de 1-octil-3-metilimidazolio y 1-undecanol como solvente de extracción, logrando factores de enriquecimiento de 150 a 180 y recuperaciones entre el 75 y el 90%. Los límites de detección obtenidos variaron entre 0,05 y 0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$, con coeficientes de correlación (R^2) superiores a 0,9982.

La microextracción en fase líquida (LPME) juega un papel crucial en el desarrollo de técnicas analíticas para la determinación de microcontaminantes. Los avances recientes en LPME han permitido optimizar sus características ecológicas, reduciendo el uso de disolventes orgánicos y promoviendo la aplicación de solventes magnéticos líquidos iónicos (MIL) y disolventes de extracción sostenibles, como los DES y los SUPRAS. Asimismo, la combinación de dos técnicas de microextracción y el desarrollo de dispositivos de microchip capaces de realizar extracciones rápidas y eficientes representan tendencias prometedoras en este campo. Sin embargo, aún se requieren más investigaciones para consolidar estas estrategias en la determinación de microcontaminantes orgánicos (36). Además, en los próximos años, será necesario afrontar los desafíos asociados con la automatización de estos enfoques, optimizando las configuraciones disponibles para su implementación en análisis rutinarios.

1.2. Metabolómica no dirigida.

Las "ciencias ómicas" han jugado un papel fundamental en la evolución rápida de la biología de sistemas. Entre ellas, la genómica ha sido la más destacada hasta ahora. La genómica se enfoca en el estudio de los genes (genoma) de un organismo. Uno de los mayores desafíos científicos en este campo fue el Proyecto Genoma Humano, que buscaba secuenciar por completo el genoma humano y se logró completar en 2003.

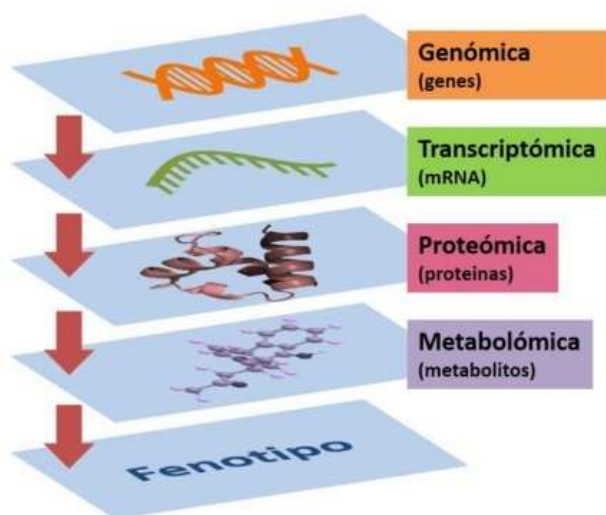


Figura 1.7. Cascada ómica: diferenciación de las distintas ómicas desde el genotipo al fenotipo. (Fuente: <https://culturacientifica.com/2019/02/22/metabolomica-el-todo-sobre-la-suma-de-las-partes/>)

La metabolómica es una disciplina dentro de la biología de sistemas que estudia de manera integral los metabolitos presentes en una célula, tejido u organismo en un momento determinado. Dependiendo del enfoque utilizado, la metabolómica puede dividirse en dos

estrategias principales: dirigida y no dirigida. Mientras que la metabolómica dirigida se centra en la cuantificación específica de un conjunto de metabolitos previamente conocidos, la metabolómica no dirigida busca analizar de manera global todos los metabolitos detectables en una muestra sin un sesgo previo hacia ciertos compuestos (102).

El enfoque no dirigido permite la identificación de diferencias metabólicas entre condiciones experimentales sin necesidad de hipótesis preconcebidas, lo que lo hace particularmente útil en estudios exploratorios, descubrimiento de biomarcadores y caracterización de estados fisiológicos o patológicos (103). Esta estrategia se basa en la adquisición de datos de alta resolución mediante técnicas analíticas avanzadas, como la espectrometría de masas (MS) acoplada a cromatografía de líquidos (LC-MS) o cromatografía de gases (GC-MS), y su posterior análisis con herramientas bioinformáticas para la identificación y anotación de metabolitos (102).



Figura 1.8. Estudios metabolómicos no dirigidos frente a los dirigidos. Adaptada de (102).

El desarrollo de la metabolómica no dirigida ha permitido avances significativos en diversas áreas como la medicina personalizada, la nutrición, la biotecnología y la ciencia ambiental, proporcionando una visión integral de los procesos bioquímicos en organismos vivos.

1.2.1. Fundamentos de la metabolómica.

Las ciencias ómicas se centran en considerar la mayor cantidad de variables posible para extraer información valiosa y trabajar en conjunto con ellas. En el caso específico de la metabolómica, el objetivo es analizar la mayor cantidad de metabolitos (metaboloma) posible, para luego

seleccionar aquellos que proporcionen información relevante en el estudio. Estos metabolitos se procesan utilizando algoritmos de procesamiento de señales, que son propios de la inteligencia artificial. De esta manera, se busca aprovechar la capacidad de la inteligencia artificial para identificar patrones y relaciones en los datos metabolómicos y obtener conocimientos más profundos sobre los sistemas biológicos (104).

Los metabolitos son moléculas de bajo peso molecular (<1500 Da) que desempeñan funciones clave en los procesos celulares, ya sea como productos finales o como intermediarios de procesos químicos o enzimáticos. Estas moléculas revelan cómo funciona el metabolismo en un organismo específico. La metabolómica se enfoca en el estudio de dos tipos de metabolitos: los endógenos, producidos de manera natural por el organismo (como aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos nucleicos, ácidos grasos, azúcares, vitaminas, cofactores, entre otros); y los exógenos, que provienen de la interacción con el entorno externo (como fármacos, contaminantes ambientales, aditivos alimentarios, toxinas, etc.). Constituyen una familia diversa de moléculas con una amplia gama de estructuras, propiedades físico-químicas y concentraciones (105).

Dada esta heterogeneidad, resulta imposible medir simultáneamente todo el metaboloma utilizando una única técnica analítica. Por lo tanto, para abarcar el máximo rango posible del metaboloma, se requiere el uso de diferentes plataformas analíticas, que pueden incluir técnicas como la espectrometría de masas, la resonancia magnética nuclear (RMN) y la cromatografía (106).

El enfoque multimodal de la metabolómica, combinando múltiples técnicas analíticas, permite obtener una visión más completa y detallada de los perfiles metabolómicos en un organismo, lo que a su vez brinda información invaluable sobre los procesos bioquímicos, las vías metabólicas y las interacciones entre los metabolitos endógenos y exógenos.

A diferencia del genoma o el proteoma, el metaboloma no se define fácilmente. A diferencia de los genes y las proteínas, los metabolitos no son exclusivos de una sola vía metabólica y, en muchos casos, múltiples reacciones bioquímicas contribuyen a la producción de un metabolito en particular. Además, el metaboloma puede verse afectado por diversos factores, lo que nos permite utilizar la metabolómica para estudiar el efecto de un estado específico del organismo debido a estímulos externos o enfermedades (107).

Una de las grandes ventajas de la metabolómica es que se puede trabajar sin hipótesis previas, ya que considera simultáneamente todos los posibles cambios, lo que la hace extremadamente atractiva para hacer descubrimientos. La característica distintiva del análisis metabolómico es su enfoque holístico, ya que no solo se centra en todos los metabolitos, sino que también permite el análisis de diversas matrices y se puede aplicar a una amplia variedad de estudios. Esta flexibilidad metodológica y su capacidad para abordar múltiples aspectos la convierten en una herramienta poderosa para comprender los perfiles metabólicos y explorar las interacciones complejas entre los metabolitos y los sistemas biológicos (108).

La metabolómica ofrece una perspectiva muy prometedora en la identificación de nuevos biomarcadores que pueden mejorar los actuales métodos de diagnóstico para diversas enfermedades, especialmente el cáncer, enfermedades neurológicas y metabólicas. Estos biomarcadores podrían mejorar la selectividad, especificidad y permitir una detección más temprana o distinguir entre diferentes fases de una enfermedad (109–113). Además, la metabolómica tiene otras aplicaciones, como la identificación de vías metabólicas alteradas en una enfermedad (114), el análisis de la microbiota intestinal, la farmacometabolómica (que desempeña un papel importante en el desarrollo de nuevos fármacos) (115), y la

nutrimetabolómica, que permite la monitorización de intervenciones nutricionales al medir los cambios producidos por la dieta. Estas aplicaciones abren nuevas posibilidades en la investigación biomédica y la medicina personalizada.

Procedimientos analíticos en metabolómica.

La amplia diversidad de metabolitos se caracteriza por su variabilidad en términos de pesos moleculares, polaridades, grupos funcionales, reactividad química y estabilidad, entre otras propiedades. Debido a esta heterogeneidad, es necesario utilizar diferentes plataformas y métodos analíticos para lograr una cobertura máxima del metaboloma en estudio. Por lo tanto, en un experimento metabolómico, es fundamental seguir varias etapas de manera rigurosa.

Estas etapas incluyen la recolección y preparación adecuada de las muestras, la selección de la metodología analítica más apropiada para el objetivo de estudio, la adquisición de datos utilizando técnicas como la espectrometría de masas, la cromatografía o la resonancia magnética nuclear, y el procesamiento y análisis de los datos obtenidos. Además, es esencial contar con herramientas de bioinformática y estadística para interpretar los resultados y realizar comparaciones entre grupos de muestras (116).

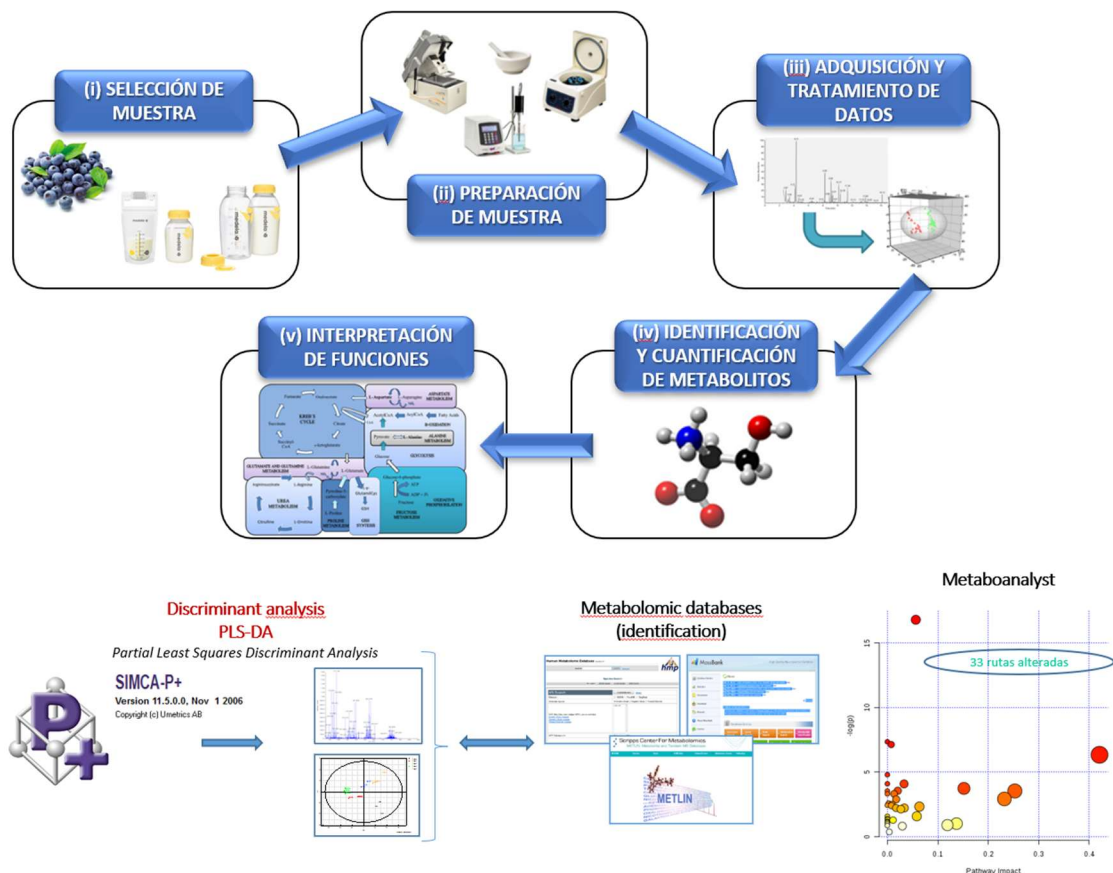


Figura 1.9. Flujo de trabajo en estudios metabolómicos (Fuente: Elaboración propia).

Al seguir estas etapas de manera rigurosa, se garantiza una mayor confiabilidad y reproducibilidad de los resultados metabolómicos, lo que facilita la identificación de biomarcadores, la comprensión de las vías metabólicas y el descubrimiento de patrones metabólicos asociados a diferentes condiciones biológicas o enfermedades.

- Diseño experimental:

La metabolómica es una disciplina de gran complejidad, ya que implica la realización de varios pasos que van desde la formulación de la pregunta biológica (planteamiento del problema) hasta la interpretación de los resultados obtenidos. Uno de los pasos más fundamentales y críticos en este proceso es el diseño experimental.

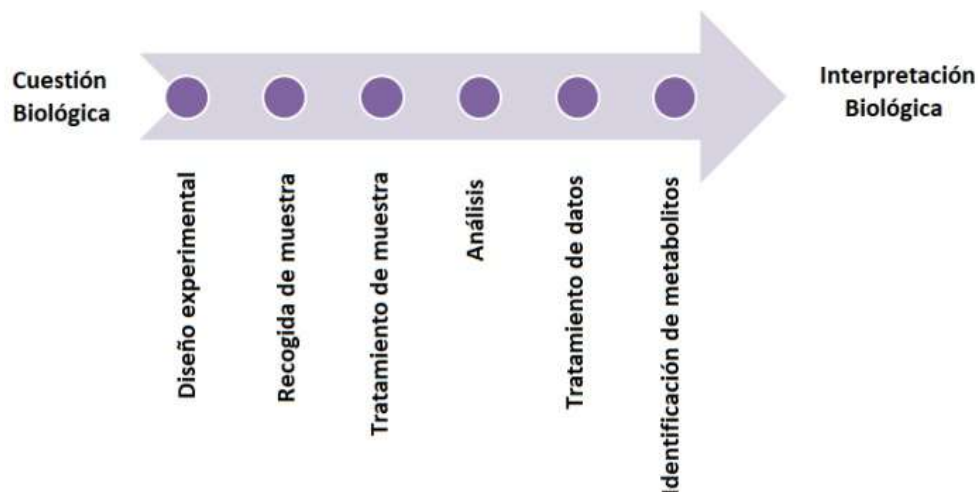


Figura 1.10. Esquema general de la complejidad de un experimento metabolómico. (Fuente: Elaboración propia).

El diseño experimental es el proceso de planificar y estructurar de manera adecuada el estudio metabolómico. En esta etapa, se deben considerar aspectos como la elección de las muestras (número elevado), la definición de los grupos de comparación, la determinación de los controles, la selección de las técnicas analíticas apropiadas y la consideración de factores que podrían afectar los resultados, como la variabilidad biológica y técnica (117,118).

Un diseño experimental sólido y bien pensado es esencial para obtener resultados confiables y significativos en metabolómica. Permite minimizar el sesgo y maximizar la eficiencia en la detección de diferencias metabólicas entre grupos de muestras. Además, un diseño experimental cuidadoso facilita la reproducibilidad y comparabilidad de los resultados entre diferentes estudios. Por ello, y debido al elevado número de muestras que se trabajan, la elección de la técnica de análisis también es un factor importante ya que la automatización es un punto clave (119).

En resumen, el diseño experimental en metabolómica es una etapa crítica que establece las bases para obtener información significativa y confiable sobre los perfiles metabólicos en el contexto de la pregunta biológica planteada.

- Preparación de muestras:

La preparación de muestras en metabolómica es una etapa esencial para obtener resultados precisos y reproducibles. El objetivo principal es maximizar la recuperación de los metabolitos de interés y minimizar cualquier efecto negativo que pueda afectar a su estabilidad o solubilidad durante la extracción de la muestra. Un enfoque adecuado en la preparación de la muestra garantiza la obtención de resultados confiables y reproducibles en los estudios de metabolómica, lo que permite una mejor comprensión de la composición y las funciones de los metabolitos en el sistema biológico bajo estudio. La preparación de la muestra es un paso crítico

en los experimentos de metabolómica, ya que influye en la precisión, sensibilidad y robustez del análisis.

A continuación, se describen los principales pasos involucrados en la preparación de muestras en metabolómica:

1. *Extracción de metabolitos*: Es el proceso de separar los metabolitos de la matriz biológica. Se utilizan diferentes métodos de extracción dependiendo de la naturaleza de los metabolitos y la muestra. Algunas técnicas comunes incluyen la extracción líquido-líquido, la extracción en fase sólida y la precipitación de proteínas. Cada método de extracción utilizado puede implicar la pérdida de metabolitos, ya sea debido a su eliminación durante la extracción de proteínas o a la selección de un disolvente que los disuelva de manera deficiente o incluso no los disuelva debido a los efectos de saturación (120). Por ello, es fundamental elegir cuidadosamente el método de extracción de muestra adecuado, considerando la naturaleza de los metabolitos de interés y optimizando las condiciones para minimizar la pérdida o degradación de los mismos. Además, es importante tener en cuenta la selectividad del disolvente utilizado para garantizar una extracción eficiente y completa de los metabolitos objetivo.
2. *Fraccionamiento*: En ocasiones, es necesario realizar una separación adicional de los metabolitos en diferentes fracciones para reducir la complejidad de la muestra y facilitar su análisis. Esto se puede lograr mediante técnicas como la cromatografía de columna o la electroforesis.
3. *Derivatización*: Algunos metabolitos son poco volátiles o tienen baja ionización, lo que dificulta su detección por técnicas de espectrometría de masas. La derivatización química se utiliza para modificar los metabolitos y mejorar su estabilidad, solubilidad, volatilidad o ionización. Esto permite aumentar la sensibilidad y selectividad de las técnicas analíticas.
4. *Desproteínización*: En muchas muestras biológicas, las proteínas pueden interferir con el análisis de los metabolitos. Por lo tanto, es común realizar una eliminación de proteínas para reducir su efecto. Se utilizan métodos como la precipitación de proteínas, la filtración o la inmovilización de proteínas.
5. *Concentración y reconstitución*: Después de los pasos anteriores, los metabolitos se concentran para aumentar su detección y se reconstituyen en un solvente compatible con la técnica analítica utilizada. Esto asegura que los metabolitos estén en una forma adecuada para el análisis y permite la inyección en el sistema de instrumentación.

Es importante tener en cuenta que la preparación de muestras puede variar según el tipo de muestra (tejido, sangre, orina, etc.) y la técnica analítica utilizada. Cada paso debe realizarse con cuidado para evitar la degradación, contaminación o pérdida de los metabolitos de interés (121,122).

- Medidas analíticas:

Existen varias técnicas analíticas utilizadas para identificar y cuantificar metabolitos en estudios metabolómicos. Las dos más comunes son la resonancia magnética nuclear (NMR) y la espectrometría de masas (MS), a menudo acopladas a técnicas cromatográficas.

La resonancia magnética nuclear (NMR) es una técnica robusta y versátil que permite la identificación y cuantificación de una amplia gama de metabolitos de manera fiable y repetitiva. Se caracteriza por su nivel de automatización y su capacidad para medir en flujos y materiales semisólidos, como cultivos celulares. Se utiliza un campo magnético elevado (>10 Teslas) y el desarrollo de criosondas ha mejorado la sensibilidad, alcanzando niveles de detección en el rango de mg/mL.

Por otro lado, las técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas (GC/MS y LC/MS) permiten analizar una gran cantidad de metabolitos con sensibilidades superiores a las de la NMR. Estas técnicas ofrecen una alta selectividad al elegir el método de separación adecuado. Sin embargo, la falta de estandarización de los métodos, su menor robustez y el tratamiento tedioso de las muestras son limitaciones a considerar (104).

Por tanto, en ciertos experimentos metabolómicos, es recomendable combinar más de una plataforma analítica para obtener una cobertura más completa del metaboloma y aprovechar las ventajas de cada técnica.

Plataforma	Ventajas	Limitaciones
GC/MS	-Alta reproducibilidad y sensibilidad analítica. -Facilidad en la identificación de metabolitos.	-Aplicable a compuestos volátiles y térmicamente estables.
LC/MS	-Muchas variantes cromatográficas. -Gran cobertura de metabolitos detectados. -Alta sensibilidad.	-Importantes requerimientos bioinformáticos para el procesamiento de datos. -Identificación indirecta de metabolitos.
CE/MS	-Poca cantidad de muestra.	-Aplicable a compuestos polares cargados. -Limitada robustez y reproducibilidad analítica.
RMN	-Altamente cuantitativa y reproducible. -Mínima preparación de muestra.	-Poca sensibilidad.
MALDI	-Permite estudiar la localización en tejidos biológicos. -Resolución de hasta 10 μm . -Análisis muy rápidos.	-Poco cuantitativa y reproducible.

Tabla 1.7. Plataformas tecnológicas más empleadas en la identificación y cuantificación de metabolitos. Ventajas y limitaciones. Elaborada a partir de (104).

- Procesado de señal:

En los experimentos metabolómicos, uno de los desafíos más comunes es lidiar con un gran número de muestras, cada una con miles de variables. Para poder representar y analizar estos datos de manera efectiva, es necesario realizar una reducción de la dimensionalidad. Una técnica ampliamente utilizada para este propósito es el análisis de componentes principales (PCA, Principal Components Analysis), que genera nuevas dimensiones seleccionando las direcciones de máxima variabilidad de los datos. En otras palabras, el PCA es un método estadístico que simplifica la complejidad de los espacios de muestras con múltiples dimensiones mientras conserva la información relevante (123).

Los diagramas de "scores" generados a partir de un análisis de PCA permiten visualizar cómo se agrupan las muestras según la similitud o diferencia en sus perfiles de metabolitos, es decir, en su metaboloma. Por otro lado, los diagramas de "loadings" indican qué variables son responsables de la separación observada entre las muestras (124).

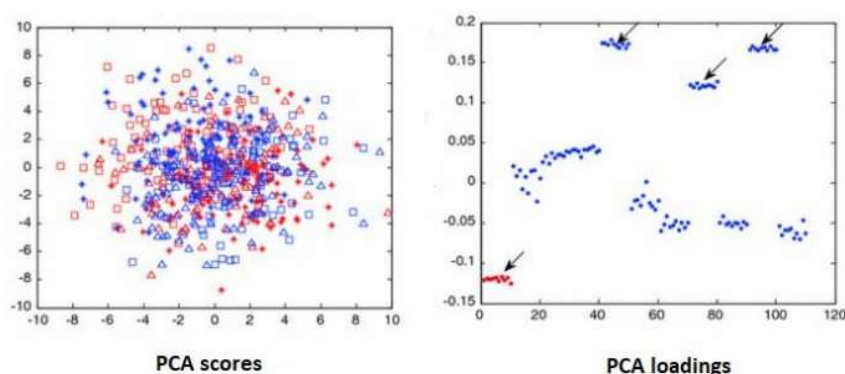


Figura 1.11. Ejemplos de los diagramas scores y loadings de una PCA (124).

El uso del PCA en metabolómica es invaluable para explorar y comprender la estructura subyacente de los datos, identificar patrones, detectar agrupaciones y revelar las variables más influyentes en la separación de las muestras.

- Identificación de metabolitos:

Para poder identificar un analito en un experimento metabolómico, es crucial que su señal en el espectro sea discernible del resto de los analitos o que se pueda realizar una deconvolución de la señal. La deconvolución implica recuperar una señal que ha sido distorsionada o degradada por algún tipo de proceso.

Una vez que se ha logrado una señal clara y deconvolucionada, se compara la respuesta experimental con una base de datos de metabolitos. Si hay una coincidencia entre la respuesta experimental y un metabolito conocido en la base de datos, se puede identificar el analito en cuestión.

En casos en los que existan dudas respecto a la identificación, es común recurrir a la verificación mediante la comparación con estándares. Los estándares son compuestos químicos bien caracterizados y previamente identificados, que se utilizan como referencia para confirmar la presencia de un metabolito específico en una muestra (125).

En algunos casos, es posible realizar la cuantificación de un metabolito una vez que ha sido identificado. En este sentido, la resonancia magnética nuclear (NMR) puede ser una técnica muy útil debido a su naturaleza cuantitativa.

Una vez que se han recopilado los datos experimentales, se procede a analizar y evaluar de manera científica los resultados metabolómicos obtenidos. Esta evaluación implica examinar y comparar las diferentes señales y perfiles de metabolitos para extraer conclusiones relevantes del experimento (126).

Base de datos pública	Descripción
HMDB	www.hmdb.ca/ Espectros de LC-MS, GC-MS y RMN de >10000 compuestos
METLIN	https://metlin.scripps.edu/ Espectros de LC-MS de >13000 compuestos
LipidBlast	http://fiehnlab.ucdavis.edu/projects/LipidBlast Espectros de masas de >25 clases de lípidos predichos in silico
LipidMaps	www.lipidmaps.org/ Contiene >40000 estructuras lipídicas únicas
mzCloud	https://www.mzcloud.org/ Espectros de LC-MS en MSn muy bien anotados de ≈3000 compuestos
MassBank	www.massbank.jp/ Espectros de LC-MS y GC-MS de ≈3000 compuestos
GMD	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/ Espectros de GC-MS de >1400 compuestos
GNPS	http://gnps.ucsd.edu/ Espectros de LC-MS de >3000 compuestos

Tabla 1.8. Principales bases de datos o bibliotecas espectrales públicas (127).

- Distintas aproximaciones en metabolómica:

Las dos estrategias más utilizadas en metabolómica son el análisis del perfil metabolómico y la determinación de la huella metabólica.

En el análisis del perfil metabolómico, se enfoca en un grupo específico de metabolitos que tienen propiedades físico-químicas similares o que están involucrados en una ruta metabólica particular. Se selecciona un conjunto de metabolitos de interés y se analiza su evolución a lo largo del tiempo o en diferentes condiciones. Si se conocen los metabolitos clave en el proceso, se puede adaptar el tratamiento de la muestra y elegir la técnica de medición más adecuada para su determinación y cuantificación.

En la determinación de la huella metabólica, el objetivo es obtener el mayor número posible de señales analíticas de metabolitos presentes en una muestra. En este caso, no se conoce de antemano qué metabolitos están presentes en la muestra, por lo que el enfoque del estudio se centra en la clasificación de muestras o en la búsqueda de biomarcadores. Se suelen tener múltiples espectros de diferentes muestras, los cuales se comparan utilizando métodos de reconocimiento de patrones. No es necesario conocer la naturaleza de los picos o los metabolitos involucrados, ya que el enfoque se basa en observar cómo se agrupan las muestras y permitir la separación de diferentes tipos de muestras según las diferencias encontradas en los espectros (por ejemplo, individuos sanos versus enfermos) (125,128).

1.2.2. Técnicas de extracción en metabolómica no dirigida.

La selección de una técnica de extracción en metabolómica no dirigida es un paso crítico que afecta la cobertura metabolómica, la reproducibilidad y la eficiencia analítica. Dado que los metabolitos presentan gran diversidad en términos de polaridad, estabilidad química y concentración, es fundamental emplear estrategias que maximicen su recuperación sin introducir sesgos.

Históricamente, la extracción de metabolitos en metabolómica no dirigida ha evolucionado desde métodos tradicionales basados en la extracción con disolventes orgánicos hasta enfoques más sofisticados y selectivos. Los más comunes incluyen la precipitación de proteínas mediante la adición de disolventes orgánicos (como acetonitrilo, metanol, etanol, entre otros) y la ultrafiltración (129,130). La adición de disolventes orgánicos no solo facilita la precipitación de las proteínas, sino que también puede liberar metabolitos que se encuentran unidos a las proteínas, una ventaja que la ultrafiltración no proporciona (122). Sin embargo, a pesar de su uso extendido, no existe consenso sobre la composición ideal del disolvente orgánico ni sobre la proporción exacta que debe añadirse (131–135).

Por otro lado, la ultrafiltración se destaca como un método adecuado para análisis metabolómicos mediante resonancia magnética nuclear (RMN) (129), y se ha demostrado que proporciona mayor estabilidad para ciertos metabolitos en técnicas como la electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas (CE-MS) (136).

La extracción en fase sólida (SPE) es otro método útil en metabolómica, particularmente cuando se requiere un procedimiento más selectivo que los mencionados previamente (137). Este método se emplea comúnmente en estudios metabolómicos no dirigidos (138) y es especialmente beneficioso cuando se desea concentrar la fracción metabólica de la muestra.

Para la extracción de metabolitos de tejidos y cultivos celulares, se utilizan disolventes variados, generalmente después de congelar y pulverizar la muestra biológica. Los disolventes se seleccionan según el tipo de metabolitos que se desea extraer: para metabolitos polares, se emplean disolventes como isopropanol, etanol y agua (139,140); para metabolitos apolares, se utilizan disolventes como cloroformo o etilacetato; o bien se combinan ambos tipos de

disolventes en un sistema bifásico para analizar por separado ambos extractos metabólicos (141,142).

Sin embargo, estas estrategias presentaban limitaciones en términos de selectividad y eficiencia para la recuperación de metabolitos con un amplio rango de polaridades. Con el desarrollo de la metabolómica basada en espectrometría de masas (MS) y resonancia magnética nuclear (NMR), surgieron enfoques de extracción más versátiles. Entre las más empleadas, se encuentran la extracción con solventes orgánicos, la microextracción en fase sólida (SPME), la microextracción en fase líquida (LPME) y la extracción asistida por ultrasonido (UAE). Sin embargo, estas técnicas presentan inconvenientes.

Método	Fundamento	Ventajas	Inconvenientes	Ref
LLE con disolventes orgánicos	Uso de disolventes orgánicos para precipitación de proteínas y solubilización de metabolitos.	<ul style="list-style-type: none"> - Cobertura amplia de metabolitos. - Compatible con MS y NMR. - Métodos estandarizados. 	<ul style="list-style-type: none"> - Uso elevado de solventes. - No es selectivo. - Posible degradación de metabolitos sensibles. 	(143)
Microextracción en fase sólida (SPME)	Absorción de metabolitos en una fibra recubierta, seguida de desorción térmica o en solvente.	<ul style="list-style-type: none"> - Sin uso de solventes. - Alta selectividad para compuestos volátiles. - Compatible con GC-MS. 	<ul style="list-style-type: none"> - Limitada para metabolitos polares o no volátiles. - Vida útil reducida de la fibra. - Variabilidad según la matriz. 	(144)
Microextracción en fase líquida (LPME)	Uso de pequeñas cantidades de solvente en equilibrio con la muestra para extraer metabolitos.	<ul style="list-style-type: none"> - Menor consumo de solventes. - Alta preconcentración. - Adecuada para matrices complejas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Requiere tiempos largos de equilibrio. - Variabilidad en la recuperación. - Dificultad de automatización. 	(145)
Extracción en fase sólida (SPE)	Uso de una fase estacionaria (cartucho o disco) para retener metabolitos, seguidos de elución selectiva.	<ul style="list-style-type: none"> - Purificación de la muestra. - Preconcentración de analitos específicos. - Compatible con matrices biológicas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Costo elevado de los cartuchos. - Pérdida de analitos en etapas de lavado/elución. 	(146)
Extracción asistida por ultrasonido (UAE)	Uso de ondas ultrasónicas para romper estructuras celulares y facilitar la extracción de metabolitos.	<ul style="list-style-type: none"> - Rápida y eficiente. - Mejora la extracción intracelular. - Compatible con solventes verdes. 	<ul style="list-style-type: none"> - Posible degradación térmica. - Formación de emulsiones. - Requiere optimización de parámetros. 	(147)

Extracción asistida por microondas (MAE)	Aplicación de microondas para calentar solventes y acelerar la extracción de metabolitos.	<ul style="list-style-type: none"> - Rápida y eficiente. - Menor consumo de solventes. - Mejora la recuperación de metabolitos difíciles. 	<ul style="list-style-type: none"> - Posible degradación térmica. - No es adecuada para todas las matrices. - Requiere equipamiento especializado. 	(148)
Extracción QuEChERS	Uso de sales y solventes para facilitar la extracción y purificación de metabolitos.	<ul style="list-style-type: none"> - Método rápido y reproducible. - Compatible con múltiples metabolitos. - Bajo consumo de solventes. 	<ul style="list-style-type: none"> - No altamente selectivo. - Puede haber interferencias en matrices complejas. - No adecuado para metabolitos muy polares. 	(149)

Tabla 1.9. Métodos de extracción más empleados en metabolómica no dirigida: fundamento, ventajas e inconvenientes. (Fuente: Elaboración propia)

Cada una de estas técnicas presenta ventajas, como la alta sensibilidad o la capacidad de extraer una amplia gama de metabolitos, pero también conlleva inconvenientes, como el uso de grandes volúmenes de solventes, la necesidad de equipos especializados o la complejidad de los procedimientos.

Uno de los principales objetivos de esta tesis es desarrollar un método que minimice las limitaciones asociadas con las técnicas tradicionales, como es LLE, SPE o SPME, optimizando su eficiencia y reduciendo su impacto ambiental. En este sentido, nos hemos enfocado en el desarrollo de un método basado en la microextracción líquida con fibra hueca (HF-LPME), que, aunque no es tan comúnmente utilizada en estudios de metabolómica no dirigida, ha mostrado un aumento en su aplicación debido a su capacidad para mejorar tanto la eficiencia de la extracción como la sostenibilidad del proceso.

1.2.3. Metabolómica como herramienta para la foodómica.

La "foodómica" es un campo emergente de investigación que combina la ciencia de los alimentos con la tecnología omics, que incluye áreas como la genómica, la proteómica, la metabolómica y la transcriptómica. La foodómica se centra en el estudio integral de los componentes y procesos biológicos en los alimentos y su impacto en la salud humana (150).

La foodómica se basa en la idea de que los alimentos son mucho más que la suma de sus componentes individuales. Los alimentos son matrices complejas que contienen una amplia gama de moléculas, incluyendo nutrientes, compuestos bioactivos, microorganismos y metabolitos, que interactúan de manera dinámica en el cuerpo humano.

Esta disciplina utiliza tecnologías avanzadas para analizar y comprender la composición molecular de los alimentos, así como las interacciones entre los componentes alimentarios y el organismo humano. Por ejemplo, la genómica alimentaria estudia el ADN presente en los

alimentos, lo que puede ayudar a identificar la especie de origen, detectar alérgenos o patógenos, y comprender cómo los genes de los alimentos pueden influir en la salud humana.

El genotipo, que comprende la información completa y detallada sobre la estructura, organización y función de todos los genes de un organismo, desempeña un papel crucial en el estado final del organismo. No obstante, el fenotipo, que describe todas las características de un sistema biológico, incluyendo la morfología, el desarrollo y el metabolismo, está fuertemente influenciado por factores ambientales externos al organismo.

La proteómica alimentaria se enfoca en el estudio de las proteínas presentes en los alimentos y cómo interactúan con el cuerpo humano. Esto puede ayudar a identificar nuevas proteínas funcionales con propiedades beneficiosas para la salud, así como comprender cómo las proteínas pueden desencadenar reacciones alérgicas o intolerancias.

La metabolómica alimentaria analiza los perfiles de metabolitos presentes en los alimentos y cómo son absorbidos y procesados por el cuerpo humano. Esto puede proporcionar información sobre los efectos metabólicos de los alimentos, como la respuesta a los nutrientes, la bioactividad de los compuestos y la detección de biomarcadores relacionados con la salud.

La transcriptómica alimentaria se centra en el estudio de los ácidos ribonucleicos (ARN) presentes en los alimentos y cómo pueden influir en la expresión génica en el cuerpo humano. Esto puede ayudar a comprender cómo los componentes alimentarios pueden regular la expresión de genes relacionados con la salud y enfermedad.

En este sentido, la metabolómica se considera la disciplina más cercana al fenotipo y, por lo tanto, la más representativa del estado del organismo, ya que examina los perfiles de metabolitos que reflejan la actividad bioquímica en respuesta a los factores internos y externos (151,152).

La metabolómica ha surgido como una herramienta fundamental en diversas disciplinas, incluyendo farmacología, medicina y especialmente nutrición. En el campo de la ciencia de los alimentos, se ha reconocido su importancia en la garantía de calidad, cumplimiento de regulaciones, microbiología y procesamiento de materias primas y productos finales (108).

En particular, la metabolómica desempeña un papel crucial en la búsqueda de biomarcadores necesarios para validar los llamados "alimentos funcionales", que afirman proporcionar beneficios específicos para el organismo cuando se consumen. Esto se debe a que el metaboloma ofrece información que puede no estar reflejada en el estudio de otros componentes, ya que los metabolitos son los productos finales del metabolismo (153).

Cuando se ingiere un alimento funcional, se producen cambios en el organismo que se reflejan en el metaboloma. Aquellos metabolitos que pueden estar directamente relacionados con la funcionalidad deseada se consideran biomarcadores que confirman dicha funcionalidad.

Lo mismo ocurre en el control de calidad de los alimentos. Existen regulaciones que establecen, en función de la cuantificación de ciertos metabolitos, si un alimento puede clasificarse como funcional o no. Mediante el uso de técnicas de metabolómica no dirigida, se analiza la totalidad del metaboloma y, a través del análisis posterior de datos, se identifican las moléculas que cambian después de la ingestión del alimento. Una vez identificados, se cuantifican mediante la metabolómica dirigida, que se centra en los metabolitos específicos de interés en el estudio, lo que permite confirmar la efectividad de un alimento funcional (105).

Los estudios metabolómicos se utilizan cada vez más para obtener información sobre la composición metabólica de los alimentos.

1.3. Contaminantes en alimentos: Bifenilos Policlorados (PCBs).

Los Contaminantes Orgánicos Persistentes (POPs) son sustancias químicas tóxicas y resistentes a la degradación, que se acumulan en suelos, sedimentos, aire o biota y que pueden transportarse a gran distancia de la fuente de emisión, lo que supone una amenaza global para la salud y el medio ambiente. En principio, no se ha establecido el tiempo de vida media de un compuesto en un entorno dado para que se confiera el término "persistente"; sin embargo, se conoce que la vida media de un POP puede durar años e incluso décadas antes de degradarse.

Los POPs son hidrófobos y lipofílicos, por lo que se acumulan en lípidos en los organismos; es decir, se almacenan en el tejido graso, lo que les confiere persistencia en la biota, y la consiguiente acumulación en las cadenas alimenticias (154). Debido a su alta capacidad acumulativa, la preocupación por estos compuestos se centra en su impacto en las principales especies depredadoras, inclusive los humanos.

De los compuestos químicos considerados como tóxicos para los organismos vivos, el Comité Intergubernamental de Negociación sobre POPs catalogó 12 tipos como los más tóxicos (155). Dentro de éstos se encuentran los bifenilos policlorados (PCBs).

Los PCBs son plaguicidas, producto de la cloración electrofílica del bifenilo con gas cloro. Las posiciones de los átomos de cloro en la molécula determinan sus propiedades químicas, siendo mayoritarios los que presentan de dos a siete cloros en su estructura.

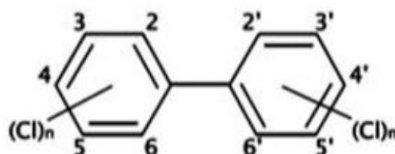


Figura 1.12. Estructura química básica de los PCBs (Fuente: Elaboración propia).

Presentan un aspecto físico de fluido aceitoso, resina dura y transparente, o cristales blancos; según el grado de cloración. Los PCBs son compuestos térmicamente estables, con baja reactividad, insolubles en agua, no inflamables, no conductores, con baja volatilidad a temperaturas normales, y no biodegradables. Son estas mismas propiedades físicas las que le concedieron importancia en el sector industrial.

En 1881, se sintetizaron por primera vez en Alemania, lo que dio pie a que en Estados Unidos iniciara su producción a nivel industrial en 1929. Ciertos estudios estiman una producción media de 440.000 toneladas entre 1929 y 1977 en Estados Unidos (156).

A pesar de que en 1979 se prohibió la producción de este tipo de compuestos, aún persisten en el aire, agua y suelo, donde queda demostrado su poder de acumulación (157–159).

Como se ha mencionado previamente, los PCBs son contaminantes que tienden a acumularse en la grasa, por lo que alimentos ricos en estas sustancias, como la leche materna, pueden ser un buen indicador de este tipo de contaminantes. La presencia de estos contaminantes en este fluido resulta ser peligrosa, ya que puede provocar daños irreversibles en

los lactantes. Debido al gran impacto de la lactancia en la sociedad actual, es importante conocer el nivel de exposición y peligrosidad que supone la presencia de PCBs en la leche materna.

1.3.1. Leche materna: composición e importancia de la lactancia.

La leche materna es el alimento natural que producen las madres para alimentar a sus recién nacidos. La organización mundial de la salud (WHO) y la Fundación de las Naciones Unidas para los Niños (UNICEF) declaran que la leche materna es el estándar de oro para la nutrición infantil. Su singular composición hace de este fluido el único alimento que puede cubrir todas las necesidades nutricionales e inmunológicas de un recién nacido durante los primeros seis meses de vida, favoreciendo un crecimiento y desarrollo saludable (160).

Composición de la leche materna

Como continuación de la nutrición intrauterina, la leche materna debe asegurar una nutrición adecuada para el lactante. Las necesidades cambiantes del niño y el estado nutricional de la madre pueden afectar la composición de este líquido y, por tanto, al aporte nutricional. Otros factores que afectan su composición son la edad, la dieta de la madre, el número de partos, el entorno de la madre y el tiempo transcurrido desde el parto. Según la variación de su composición, se diferencian varias etapas: leche pre-término, calostro, leche de transición y leche madura.

El calostro se produce durante los primeros días tras el parto. Es un líquido amarillento y espeso de alta densidad que se produce en pequeñas cantidades, pero es del todo suficiente como primer alimento, en espera de la llegada de la "auténtica leche". Contiene menos cantidades de lactosa (4g/100ml), grasa (2g/100ml) y vitaminas hidrosolubles que la leche madura; mientras que contiene mayor cantidad de proteínas (2g/100ml), vitaminas liposolubles (E, A, K), carotenos y algunos minerales como sodio y zinc (160). Junto a los oligosacáridos, que también están elevados en el calostro (20 g/L), una gran cantidad de células vivas, como linfocitos y macrófagos (100.000 mm³), que confieren al recién nacido una eficiente protección contra los gérmenes del medio ambiente y ayudan al desarrollo de su sistema inmunitario (161). El calostro es rico desde el punto de vista nutricional, y muy valioso para aumentar las defensas inmunitarias de un niño que acaba de nacer.

La leche de transición es la leche que se produce tras el calostro, antes de la subida de la leche madura. Los cambios en la composición y volumen son muy significativos durante los primeros días tras la subida de la leche, para luego estabilizarse. Adquiere un tono más cremoso en color y textura, aumentando también su nivel de grasa, calorías y lactosa. Esto lo convierte en el alimento ideal para lograr un crecimiento acelerado del recién nacido. Esta leche continúa siendo rica en anticuerpos protectores, células vivas, y otros ingredientes bioactivos que favorecen una salud óptima para el bebé (162).

La leche pre-término es la que producen las mujeres con partos prematuros, para los que la leche materna tiene una importancia fundamental: nutre al niño, favorece su neurodesarrollo y lo protege de enfermedades. Contiene mayor cantidad de proteínas y menor cantidad de lactosa que la leche madura; siendo más apropiada, ya que el infante requiere niveles más elevados de proteínas. No alcanza a cubrir las necesidades de calcio y fósforo, por lo

que debe ser suplementada con fortificadores de lactancia. A partir de las 2-3 semanas aproximadamente, la composición de la leche se estabiliza y se considera madura. La leche madura aporta gran cantidad de agua y numerosos nutrientes tales como hidratos de carbono (lactosa, glucosa y galactosa, y oligosacáridos), lípidos (triglicéridos, ácidos grasos, fosfolípidos y colesterol) y proteínas (caseínas, proteínas de suero e inmunoglobulinas). Además, contiene vitaminas, minerales de alta biodisponibilidad en cantidades suficientes para cubrir las necesidades del lactante y otros componentes como antioxidantes. La leche madura va cambiando de composición dependiendo de los requerimientos nutricionales del bebé, por lo que no se pueden establecer valores fijos (163).

Componente	Calostro	Leche madura
Calorías (cal/L)	670	750
Minerales cationes (mEq/L) Na, K, Ca, Mg	70	50
Minerales aniones (mEq/L) P, S, Cl	30	40
Oligoelementos (mcg/dL)		
Fe	70 mcg/dL	3 mg/dL
Cu	40	1.1
Zn	40	30
Proteínas (d/L)	10-12	23
Aminoácidos (g/L)	12	12.8
Nitrogeno no proteico (mg/L)	910	30-500
Lisozima (mg/L)	460	390
Hidratos de carbono (g/L)	57	60-70
Grasas (g/L)	30	35-45
Vitaminas (mg/L)		
Vitamina A	1.61	0.61
Caroteno	1.37	0.25
Tocoferol	14.8	2.4
Tiamina	0.019	0.142
Rivoflavina	0.302	0.373
Vitamina B6	-	0.15
Acido nicotínico	0.75	1.83
Vitamina B12 (mcg/L)	0.45	0.5
Biotina (mcg/L)	0.5	2
Acido folico	0.5 mcg/L	24-30 mg/mL
Acido pantoténico	1.8	2.5
Acido ascórbico	72	52

Tabla 1.10. Comparación entre componentes de la leche humana en las etapas de calostro y leche madura. (Fuente: Acta Pediátrica de México Volumen 32, Núm. 4, julio-agosto, 2011).

Importancia de la lactancia.

La leche materna se caracteriza por aportar una mezcla equilibrada de macronutrientes (proteínas, hidratos de carbono, lípidos, vitaminas, minerales y oligoelementos) necesarios para el correcto funcionamiento y desarrollo anatómico del niño.

Además, este fluido también se caracteriza por la presencia de anticuerpos protectores frente a infecciones virales y bacterianas. El sistema inmunitario de un recién nacido madura tras

los seis primeros meses, por lo que la lactancia materna actúa como una inmunidad pasiva, similar al funcionamiento de las vacunas, proporcionando cierta protección frente algunas enfermedades (164).

Otra característica de interés es su mínimo efecto antigénico; es decir, es de origen biológico y producido por el cuerpo humano, por lo que no hay riesgo de alergias. Gracias a esto, existen bancos de leche disponibles para aquellas madres que no pueden amamantar a sus hijos o infantes sin acceso a la lactancia.

Varios estudios sugieren una estrecha relación entre la lactancia materna y el desarrollo cognitivo del bebé, especialmente en los prematuros que sufren mayor riesgo de tener problemas relacionados con el desarrollo. La teoría sugiere que esto se debe al contacto íntimo entre el bebé y su madre. Entre los resultados más relevantes se determinó que los bebés que fueron alimentados con leche materna tenían una mayor puntuación de inteligencia y eran menos propensos a tener problemas de desarrollo y aprendizaje (165).

Además de los beneficios ya mencionados en los recién nacidos, la lactancia también tiene ciertos beneficios para las madres. Algunos estudios han demostrado que la lactancia promueve el tiempo de involución por medio de la producción de oxitocina, una hormona que promueve las contracciones uterinas y reduce el sangrado (166), y se reducen los efectos de la depresión posparto, a corto y largo plazo, ayudando a las madres a estrechar la relación con sus bebés.

Otros estudios han encontrado que el tiempo que una mujer pasa amamantando a su bebé está relacionado con una reducción del 28% en el riesgo de sufrir cáncer de mama y ovárico. Se estima que una madre es 4.3% menos propensa a sufrir de cáncer de mama por cada año que pasa amamantando (167). Estudios recientes parecen indicar que la lactancia también ayuda a prevenir enfermedades del corazón, la hipertensión, la artritis, la diabetes tipo 2 y el síndrome metabólico (165,168).

Debido a la importancia nutricional de la leche materna y la influencia del vínculo afectivo que crea la lactancia sobre el desarrollo del bebé, los pediatras recomiendan la leche materna como único alimento del recién nacido durante los primeros seis meses de vida y como alimentación complementaria hasta los dos años de edad.

1.3.2. Papel de la leche materna como indicador de contaminantes orgánicos persistentes.

Debido al elevado contenido lipídico de la leche, estos contaminantes pueden presentarse en la leche de las madres expuestas, aumentando el riesgo en los lactantes. Por ello, la leche materna se considera un indicador de la exposición infantil a dichos contaminantes.

Los factores que pueden afectar los niveles de PCBs en la leche materna humana incluyen la edad de la madre, los cambios en el peso de la madre durante la lactancia, así como su dieta durante el embarazo y, especialmente, el lugar de residencia y exposición a dichos compuestos (169,170).

Las madres que tienen un mayor número de partos previos contienen mayores niveles de PCBs en su leche, a pesar de que la lactancia puede resultar un medio para la secreción de

dichos contaminantes del cuerpo humano. Esto se debe a que el factor condicionante no es el número de partos, sino la edad de la madre (171). Además, se ha demostrado que las mujeres que habitan en áreas industriales presentan mayor contenido de PCBs que las que habitan en áreas rurales, debido a la exposición que sufren al medio contaminado (172).

Por otro lado, se han realizado estudios de la sangre de los recién nacidos antes de su primera alimentación materna, durante la lactancia y transcurridos 42 meses, así como de recién nacidos alimentados exclusivamente con leche de fórmula. En estos estudios, se estimó que un recién nacido que recibe lactancia materna durante los 6 primeros meses recibirá entre el 6,8% y el 12% de la cantidad total de PCBs media que recibirá a lo largo de su vida (173,174).

Un estudio realizado entre 1991 y 1993, concluyó que la concentración promedio de PCBs en la leche materna de mujeres que vivían a lo largo del lago Ontario (Nueva York) era de 271 ± 116 ng/g de lípidos (175), y otros estudios realizados en Canadá, determinaron que la leche materna de 497 mujeres tenía una concentración media de PCBs de 238 ng/g de lípidos (176,177), demostrando la presencia de estos compuestos en la leche materna.

Otras investigaciones han demostrado que las concentraciones de estos contaminantes en la leche materna humana de madres suecas han disminuido con el tiempo desde la década de los 70s (178,179), observando que las concentraciones de PCBs en 1972, 1980, 1984–1985, 1990 y 1992 fueron 1,090, 780, 600, 510 y 380 ng/g de lípidos, respectivamente. En Alemania, los investigadores estudiaron los niveles de PCB desde 1986 a 1996 en la leche materna humana de madres primerizas de entre 27 y 31 años. Encontraron que las concentraciones de PCB en 1986, 1988, 1990, 1992, 1994 y 1996 fueron 1,300, 1,050, 1,000, 750, 650 y 450 ng/g de lípidos, respectivamente (180). En 2007, una investigación llevada a cabo en USA (Pacific Northwest) y Canadá, determinó que el contenido medio de PCBs en leche materna se encontraba en un rango de 49-415 ppb (181). Ese mismo año, otro estudio desarrollado en Sao Paulo (Brasil) estableció un contenido de PCBs en leche materna en un rango de 2,42-7,34 ppb (182). En 2013, se llevó a cabo una investigación del contenido de PCBs en leche materna, cuyas muestras fueron suministradas desde Gran Canaria (España). Este estudio reveló que el contenido de dichos analitos variaba de 0,05 a 100 ppb (183).

También se analizó la exposición a PCBs de recién nacidos cuyas madres tienen una dieta rica en pescado. Los resultados de la investigación mostraron que, en general, las madres que consumen pescado contaminado con PCBs tienen niveles más altos en la leche materna en comparación con las no consumidoras (175,184), demostrando el poder acumulativo de dichos compuestos en las cadenas tróficas.

Un análisis más específico de la leche indicó que los congéneres 138, 153, 118, 180 y 105 son los más prevalentes y que los tres congéneres coplanares (77, 126 y 169) no se detectaron o se detectaron en concentraciones muy pequeñas (<1 ppb) en la grasa láctea (185).

Location	Sample size	Year	PCB concentration (ng/g lipid)	PCB concentration (ng/g milk)	Source
National Canadian Study	No data	1970		6	(186)
	100	1975		12	
	210	1982		26	(187)
	412	1986		6.35	(188)
National Sweden Study	135	1972	1090		(179)

	153	1976	910		
	431	1980	780		
	102	1984-1985	600		
	120	1988-1989	650		
	60	1990	510		
	60	1991	410		
	40	1992	380		
Akwesasne Indian Reservation	19	1986-1989	602		(189)
	38	1990	352		
	40	1991-1992	254		
Warren and Schoharie County, New York (rural)	52	1986-1989	375		(189)
	57	1990	404		
	45	1991-1992	318		
Northern Germany (age 22-31, primiparae)	15	1986	1300		(180)
	68	1988	1050		
	84	1990	1000		
	43	1992	750		
	29	1994	650		
	14	1996	450		
Zagreb, Croatia	40	1987-1990	243		(190)
	54	1991-1993	213		
	45	1994-1995	212		
16 Counties in New York state adjacent to Lake Ontario	213	1991-1993	271	8.28	(175)
New York state	7	1991-1993	239-428	3.5-14-1	(191)
Helsinki, Finland (urban)	20	1992-1994	296		(192)
Kuopio, Finland (rural)	64	1992-1993	198		
New Bedford Harbor, Massachusetts (near superfund site)	4	1993	1107-2379		(193)
Murmansk, Russia	15	1993	429.4		(194)
Monchegorsk, Russia (industrialized area)	15	1993	490.5		
Keewatin, Northern Canada	12	1996-1997	247		(177)
Pacific Northwest (USA) and Canada		2007	4900-41500		(181)
Sao Paulo, Brasil		2007	2420-7340		(182)
Canary Islands, Spain		2013	4900-41500		(183)

--	--	--	--	--	--

Tabla 1.11. Análisis de tendencia representativo de las concentraciones de PCB en la leche materna humana a lo largo del tiempo. (Fuente: Toxicological profile for PCBs, U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, November 2000)

1.4. Metabolómica como herramienta en la búsqueda de compuestos bioactivos.

Los compuestos bioactivos son componentes clave del metabolismo secundario tanto en vegetales como en animales, y desempeñan un papel fundamental en la salud humana y animal. Su consumo ha sido asociado con la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares, inflamatorias, neurológicas y metabólicas, así como el cáncer (195,196). Entre los compuestos bioactivos más estudiados se encuentran los polifenoles, glucosinolatos, isotiocianatos, carotenoides, terpenoides, alcaloides, fibra dietética y monoglicéridos de cadena media (196,197). A pesar de los avances en la identificación y cuantificación de estos compuestos mediante enfoques analíticos tradicionales, dichos métodos presentan limitaciones debido a su especificidad, lo que impide una caracterización integral del metaboloma de los alimentos y de las vías metabólicas involucradas en su biosíntesis (198,199).

El metaboloma de los alimentos es altamente complejo y dinámico, determinado por factores tanto internos (especie, variedad) como externos (ambiente, procesamiento). En este contexto, la metabolómica se ha consolidado como una metodología de alto rendimiento que permite obtener perfiles químicos detallados y caracterizar las vías bioquímicas responsables de la composición bioactiva de los alimentos (200,201). Su aplicación ha permitido un mejor entendimiento de la relación entre los compuestos bioactivos y la calidad de los alimentos, facilitando estrategias para optimizar su producción y procesamiento (202,203). Además, la metabolómica ha reforzado el enfoque integrador de la foodómica y la feedómica, permitiendo una mejor comprensión de los factores que influyen en la calidad y seguridad alimentaria (150,204).

Calidad de alimentos

Los compuestos bioactivos desempeñan un papel clave en la calidad de los alimentos, ya que influyen en sus propiedades sensoriales, y nutricionales. Estos compuestos, que incluyen polifenoles, carotenoides, flavonoides, ácidos grasos esenciales y péptidos bioactivos, pueden mejorar la estabilidad, el valor nutricional y los efectos beneficiosos para la salud de los alimentos.

La percepción de calidad de un alimento depende en gran medida de sus características sensoriales, como color, sabor, textura y aroma, muchas de las cuales están determinadas por la presencia de compuestos bioactivos.

- **Color:** Los carotenoides (β -caroteno, licopeno, luteína) son responsables de los colores rojos, naranjas y amarillos en frutas y verduras, mientras que las antocianinas y flavonas contribuyen a los tonos azules, morados y rojos en productos como las uvas y el trigo morado (205). La variabilidad en la síntesis de estos compuestos afecta la percepción visual de frescura y calidad.

- Sabor y aroma: Los polifenoles y ácidos fenólicos pueden modificar el perfil de sabor de los alimentos, proporcionando notas amargas o astringentes, como ocurre con el té, el vino y algunos vegetales crucíferos (205,206). Además, compuestos volátiles derivados de terpenoides y ésteres contribuyen a los aromas característicos de frutas y hierbas.
- Textura: Los compuestos funcionales también pueden influir en la firmeza y textura de los alimentos. Por ejemplo, en los productos cárnicos, los polifenoles pueden interactuar con proteínas, afectando la retención de agua y la percepción de jugosidad.

Los compuestos bioactivos son fundamentales para la calidad nutricional de los alimentos, ya que aportan beneficios más allá de la simple provisión de macronutrientes.

- Propiedades antioxidantes: Los polifenoles y carotenoides ayudan a reducir el daño oxidativo en las células humanas, lo que contribuye a la prevención de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y ciertos tipos de cáncer (195,196).
- Regulación metabólica: Algunos compuestos bioactivos, como los glucosinolatos en el brócoli y la col rizada, tienen efectos protectores contra el estrés oxidativo y pueden modular la respuesta inflamatoria del organismo (207).
- Biodisponibilidad de nutrientes: La presencia de ciertos compuestos funcionales puede mejorar la absorción de minerales y vitaminas. Por ejemplo, la vitamina C en frutas cítricas mejora la absorción del hierro no hemo en la dieta.

El contenido y la estabilidad de los compuestos bioactivos pueden verse afectados por el procesamiento y almacenamiento de los alimentos.

- Fermentación y bioactividad: En alimentos fermentados como el té Oolong y el vino, los procesos enzimáticos pueden modificar el perfil de polifenoles y mejorar su biodisponibilidad, aumentando así su efecto beneficioso para la salud (208,208,209).
- Efecto del estrés y condiciones de cultivo: Factores ambientales como la exposición a la luz, el déficit hídrico y la temperatura pueden modificar la biosíntesis de compuestos funcionales. En estudios sobre uvas y brócoli, se ha observado que la restricción hídrica o la exposición a la luz azul pueden estimular la producción de antocianinas y glucosinolatos, respectivamente, mejorando así la calidad nutricional (210–212).

Los compuestos bioactivos desempeñan un papel central en la calidad de los alimentos. Su estudio a través de herramientas avanzadas como la metabolómica permite comprender mejor los factores que influyen en su presencia y actividad, lo que puede ayudar a mejorar la producción, procesamiento y conservación de alimentos con alto valor bioactivo y beneficios para la salud.

Deterioro de calidad y vida útil

Los compuestos bioactivos desempeñan un papel crucial en la calidad y vida útil de los alimentos, ya que pueden influir tanto en la estabilidad como en los procesos de deterioro de los productos alimentarios. Estos compuestos incluyen polifenoles, carotenoides, ácidos grasos esenciales, péptidos bioactivos y otros metabolitos secundarios, que poseen propiedades antioxidantes, antimicrobianas y estructurales que afectan la conservación y el envejecimiento de los alimentos.

Uno de los principales mecanismos de deterioro que afecta la calidad de los alimentos es la oxidación de lípidos, un proceso que conduce a la formación de radicales libres y compuestos volátiles que generan olores y sabores desagradables (213). Los compuestos bioactivos con actividad antioxidante, como los polifenoles y los carotenoides, pueden retrasar este proceso al neutralizar los radicales libres o quelar metales de transición que catalizan la oxidación.

Por ejemplo, estudios han demostrado que extractos ricos en polifenoles de semillas de guaraná y hojas de pitanga pueden extender la vida útil de productos cárnicos al reducir la acumulación de aldehídos y otros compuestos oxidativos (214,215). De manera similar, el ácido ascórbico y los tocoferoles (vitamina C y E, respectivamente) se utilizan en la industria alimentaria para prevenir la oxidación en aceites y grasas.

Los compuestos bioactivos también pueden influir en la actividad microbiana, otro factor clave en la vida útil de los alimentos. Algunos polifenoles y terpenoides presentan propiedades antimicrobianas que pueden inhibir el crecimiento de bacterias, mohos y levaduras.

Por ejemplo, ciertos flavonoides y ácidos fenólicos presentes en el té verde, el romero y el orégano han demostrado actividad antimicrobiana contra patógenos como *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*. Estos compuestos alteran la membrana celular de los microorganismos, reduciendo su viabilidad y evitando el deterioro prematuro de los alimentos (216).

Además, también afectan la textura, el color y otras propiedades sensoriales de los alimentos. En frutas y hortalizas, los polifenoles y flavonoides pueden participar en reacciones de pardeamiento enzimático, un proceso que reduce la apariencia y aceptabilidad del producto. Por otro lado, en productos como el vino y el té, los mismos compuestos pueden mejorar la estabilidad sensorial al proporcionar color y sabor característicos.

Durante el almacenamiento de productos lácteos y cárnicos, la interacción de proteínas con compuestos fenólicos puede generar modificaciones en la textura y firmeza, afectando la percepción de calidad por parte del consumidor.

El análisis metabolómico ha permitido comprender con mayor profundidad el impacto de los compuestos bioactivos en la vida útil de los alimentos. Por ejemplo, en estudios sobre brócoli dañado, se encontró que la acumulación de polifenoles y glucosinolatos se incrementaba en respuesta al estrés físico, lo que sugiere que estos compuestos juegan un papel protector en la planta (217,218).

Asimismo, en experimentos con uvas Cabernet Sauvignon, se observó que el déficit hídrico inducía una mayor biosíntesis de antocianinas, lo que resultaba en una mejor estabilidad del color y un aumento en la vida útil del producto (212).

Los metabolitos bioactivos desempeñan un papel fundamental en el deterioro de los alimentos. El uso de técnicas avanzadas, como la metabolómica, está proporcionando nuevas herramientas para comprender mejor estos procesos y desarrollar estrategias innovadoras que mejoren la estabilidad y la calidad de los productos alimentarios (219).

A pesar de los avances en la aplicación de la metabolómica en la investigación de compuestos bioactivos, aún existen desafíos técnicos y metodológicos, como la falta de estandarización en la preparación de muestras y la disponibilidad de bases de datos para la identificación de metabolitos. Superar estos obstáculos permitirá una mejor integración de la metabolómica con

otras tecnologías -ómicas, impulsando la investigación y desarrollo de alimentos ricos en compuestos bioactivos (200).

1.4.1. Metabolómica como herramienta en el estudio de compuestos bioactivos de la leche materna.

Los avances en el desarrollo de métodos analíticos han revolucionado los estudios destinados a identificar y cuantificar el conjunto completo de metabolitos presentes en la leche materna. Esta evolución se enmarca en el campo de la metabolómica.

El análisis metabolómico de la leche materna humana permite obtener una comprensión integral de su composición dinámica y bioquímica, así como de las funciones de los metabolitos presentes. Este enfoque analítico abarca la identificación y cuantificación de una amplia variedad de metabolitos, proporcionando información valiosa sobre los nutrientes, compuestos bioactivos y metabolitos endógenos presentes en la leche materna (120).

La metabolómica de la leche materna se ha convertido en una herramienta crucial para comprender la complejidad y la importancia de esta sustancia en la nutrición y el desarrollo infantil. Los estudios metabolómicos ayudan a desentrañar los cambios dinámicos en la composición de la leche materna a lo largo del tiempo, así como las variaciones individuales entre las madres. Esto contribuye a mejorar nuestra comprensión de los factores que influyen en la calidad y el contenido nutricional de la leche materna (220).

La leche materna es una fuente rica y compleja de metabolitos que brindan nutrientes esenciales y desempeñan diversos roles en el crecimiento y desarrollo del lactante. Estos metabolitos se pueden clasificar en lípidos, carbohidratos, proteínas y compuestos bioactivos, cada uno con funciones específicas.

- *Lípidos:* Los lípidos constituyen una parte significativa de la composición de la leche materna y desempeñan un papel crucial en la nutrición del lactante. Estos lípidos se secretan en forma de estructuras coloidales conocidas como "glóbulos de grasa de leche" (MFGs), cuyo núcleo está compuesto principalmente por triacilgliceroles (TGs), que proporcionan energía y ácidos grasos esenciales para el desarrollo del cerebro y el sistema nervioso del bebé. También se encuentran fosfolípidos, colesterol y otros lípidos estructurales que son importantes para el desarrollo de las membranas celulares y la absorción de vitaminas liposolubles (221).
- *Carbohidratos:* Los carbohidratos en la leche materna son principalmente oligosacáridos, también conocidos como HMOs (oligosacáridos de la leche humana). Estos oligosacáridos son indigestibles por el lactante, pero juegan un papel vital en la salud intestinal al actuar como prebióticos, promoviendo el crecimiento de bacterias beneficiosas en el intestino y ayudando a proteger contra infecciones (222).
- *Proteínas:* Las proteínas en la leche materna proporcionan aminoácidos esenciales y son importantes para el crecimiento y desarrollo del bebé. Las principales proteínas presentes en la leche materna son la lactoalbúmina, la lactoferrina, la caseína y las inmunoglobulinas. Estas proteínas tienen propiedades antimicrobianas, inmunológicas y antioxidantes que protegen al bebé contra infecciones y ayudan a fortalecer su sistema inmunológico. También se hallan otras moléculas que contienen nitrógeno, como amino-azúcares, creatina, carnitina y aminoácidos libres (223,224).

- *Compuestos bioactivos*: La leche materna contiene una amplia variedad de compuestos bioactivos, además de los ya mencionados, que brindan beneficios adicionales para la salud del lactante. Estos compuestos incluyen factores de crecimiento, enzimas, hormonas, citocinas, vitaminas, minerales y antioxidantes. Estos elementos desempeñan funciones cruciales en el desarrollo y la maduración de diversos órganos y sistemas, así como en la protección contra el estrés oxidativo y el fortalecimiento del sistema inmunológico del bebé (160,161,225,226).

Además de estos metabolitos principales, la leche materna también contiene otros compuestos como nucleótidos, poliaminas, taurina, ácidos nucleicos y muchos más, cada uno con su función y papel específico en el desarrollo y salud del lactante (227–230).

Se han desarrollado estrategias analíticas para la detección exhaustiva de todas las moléculas presentes en extractos crudos, incluyendo aquellas que aún no han sido identificadas. Estas estrategias son de gran utilidad para el análisis completo del metaboloma de la leche materna humana (HBM) (231).

El flujo de trabajo utilizado en la metabolómica de la leche materna implica la colección, almacenamiento y preparación de las muestras, así como la separación y detección de los analitos, y finalmente, el análisis de los datos. En primer lugar, es necesario obtener muestras de varios donantes para asegurar un número adecuado de muestras y cada muestra debe ser recolectada utilizando un método estandarizado. Para evitar la degradación de las muestras, ya que los análisis no se pueden realizar inmediatamente después de la recolección, es necesario manipular y almacenar las muestras adecuadamente (232). Las muestras o los extractos de metabolitos deben ser almacenados a -80°C hasta su análisis. Además, los ciclos de congelación y descongelación pueden afectar la integridad de las muestras, por lo que es recomendable dividir las muestras en alícuotas necesarias para cada análisis, minimizando así el riesgo de degradación (233).

En tercer lugar, los métodos de preparación de las muestras deben ser rápidos, reproducibles y permitir el aislamiento de una amplia gama de metabolitos. Además, deben ser compatibles con los métodos de separación y detección seleccionados (234). La elección del método de preparación de la muestra adecuado dependerá de la clase o subclase de metabolitos de interés, considerando aspectos como la evaluación de la recuperación de la muestra, la repetibilidad, la capacidad para eliminar interferencias, la compatibilidad con la automatización y el costo.

La extracción líquido-líquido (LLE) es el método de preparación de muestras más comúnmente utilizado para extraer metabolitos de la leche materna humana (HBM) (235–240). Este método implica la mezcla de la muestra con un disolvente orgánico inmiscible en agua, para separar los componentes lipídicos de la leche. La fracción acuosa resultante puede ser sometida a procesos adicionales de extracción para recuperar otros metabolitos de interés.

Además de la extracción líquido-líquido, existen otros métodos empleados para la preparación de muestras antes de un análisis de espectrometría de masas (MS). Estos incluyen la precipitación de proteínas mediante el uso de metanol (241,242), la extracción en fase sólida (SPE) (243–245) y la microextracción en fase sólida (SPME) (246). La precipitación de proteínas con metanol se utiliza para eliminar las proteínas presentes en la muestra y concentrar los metabolitos. Los métodos de extracción en fase sólida, como SPE y SPME, implican el uso de resinas o fibras que tienen afinidad por los metabolitos de interés, lo que permite su captura selectiva y posterior elución para su análisis.

Adicionalmente, se emplean otros métodos de preparación de muestras específicos para análisis de resonancia magnética nuclear (RMN), como la filtración (247), centrifugación (248,249) y ultrafiltración (237). Estos métodos se utilizan para eliminar partículas o componentes indeseables de la muestra antes de su análisis por RMN.

La elección del método de preparación de muestras depende del tipo de análisis que se vaya a realizar y de los metabolitos específicos de interés. Cada método tiene sus ventajas y limitaciones en términos de selectividad, eficiencia y capacidad de extracción de diferentes clases de metabolitos. Es importante seleccionar el método más adecuado para obtener una muestra representativa y preparada de manera óptima para el análisis metabolómico de la leche materna.

Componentes HBM analizados	Preparación de muestra	Ventajas	Inconvenientes	Técnica de detección	Referencias
FAs	Método de extracción Blight y Dryer modificado con derivatización			GC-FID	(250)
Fas	SPE	<ul style="list-style-type: none"> ·Simple ·Permite enriquecimiento de compuestos ·Selectivo 	<ul style="list-style-type: none"> ·Largo tiempo ·Uso de gran cantidad de disolvente orgánico 	GC-MS	(243)
GPs				HPLC-MS	(245)
				HPLC-ELSD	(244)
SMs (fase orgánica)	Método de Blight y Dryer modificado	<ul style="list-style-type: none"> ·Bien establecido ·Económico ·Compatible con numerosas técnicas de detección ·Corto tiempo ·Extracción simultánea de varias clases de lípidos ·Alta reproducibilidad 	<ul style="list-style-type: none"> ·Grandes volúmenes de disolvente ·Aspiración de fases polares y no polares es difícil ·Análisis independientes de las fases duplican el número de metabolitos en el perfilado 	HPLC-MS/MS	(251)
Metabolitos polares, p. Ej. carbohidratos (fase acuosa); FAs (fase orgánica)				GC-MS (fase orgánica) NMR (fase acuosa)	(235)
Metabolitos polares, p. Ej. carbohidratos (fase acuosa)				MRS	(252)
Metabolitos de colina, colina (Fase acuosa); PCs, SMs, liso-PCs, FAs, TGs (fase orgánica)				GC-FID (fase orgánica) LC-MS/MS (fase orgánica y acuosa por separado)	(239)
Fas				GC	(253)

Fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilcolina, esfingomielina	Método Folch modificado		<ul style="list-style-type: none"> ·Cuantificación impedida por la partición no exclusiva en las fases ·Metabolitos en altas concentraciones requieren dilución para evitar saturación ·Metabolitos en baja abundancia bajo el LOD 	LC-ELS	(254)
Amino ácidos, FAs, lactosa, oligosacáridos, azúcares				NMR	(238)
FAs y TGs				GC-FID, MS/MS	(255)
FAs, GPs, TGs				GC-FID, MS/MS	(256)
PCs, Pes, Pls, SMs				P ¹³ NMR LC-ELSD LC-MS/MS	(240)
Fas	Precipitación de proteínas y derivatización de FAs a metil ésteres	<ul style="list-style-type: none"> ·Sencillo ·Barato ·Alta eficiencia de precipitación con disolvente óptimo ·Monofásico ·Fácil separación de proteínas precipitadas 	<ul style="list-style-type: none"> ·Uso de disolventes orgánicos ·Insuficiente para aislamiento de muchos metabolitos ·Dilución para evitar saturación de las señales ·Metabolitos en baja abundancia no se detectan ·incompatible con el uso de 1HNMR 	GC-FID	(257)
FAs, gangliósidos, PLs				GC-MS	(241)
				GC-MS	(242)
Carbohidratos, FAs, GLs, GPs, PRs, SPs, STs y otros	Extracción monofásica con MTBE	<ul style="list-style-type: none"> ·Adecuado para FC-MS y LC-MS ·Extracción de amplio rango de metabolitos 	<ul style="list-style-type: none"> ·Incompatible con 1HNMR ·Captura HMOs, aminoácidos y azúcares 	GC-MS LC-MS	(259)

		<ul style="list-style-type: none"> ·Una sola fase ·Poco tiempo · Extracción simultánea de varias clases de lípidos ·Alta reproducibilidad ·Fácil ·Solventes menos tóxicos ·Barato 	<ul style="list-style-type: none"> · Dilución para evitar saturación de las señales · Metabolitos en baja abundancia bajo el LOD 		
Compuestos acíclicos alifáticos, aminoácidos y derivados, monocíclicos aromáticos, ácidos carboxílicos, ceramidas, compuestos de colina, alcoholes cíclicos, DGs, disacáridos, FAs, PCs, PE, glicerofosfoglicerol, PI, PS, cetonas, lactamas, MG, monosacáridos, nucleótidos oxoaniónicos, HMOs, ácidos orgánicos, PS, nucleósidos de pirimidina, pirrolidinas, sacáridos, SM, esteroides y derivados, ácidos de azúcares, alcoholes de azúcares, TGs, vitaminas	Método Folch modificado, extracción monofásica con MTBE	·Cada preparación de muestra proporciona un conjunto de metabolitos para diferentes plataformas analíticas, haciendo posible la caracterización simultánea de metabolitos polares y apolares		NMR GC-MS HPLC-MS UPLC-MS CE-MS	(260)
Aminoácidos y derivados, azúcares, metabolitos energéticos, FAs y asociados, nucleótidos y derivados, vitaminas	Ultrafiltración	<ul style="list-style-type: none"> ·Simple ·Reproducible ·Barato ·Sin disolvente 	<ul style="list-style-type: none"> ·Separa solo metabolitos polares ·Insuficiente para la metabolómica global 	NMR	(249)
Aminoácidos y derivados, metabolitos energéticos, FAs y asociados, azúcares, nucleótidos y derivados, vitaminas y otros				NMR	(248)

Metabolitos polares: 2-oxoglutarato, 3'-SL, 3-BHBA, 6'-SL, acetato, alanina, betaína, butirato, caprato, caprilato, carnitina, colina, citrato, creatina, creatinina, dimetilamina, GlcNAC, glutamato, glutamina, lactato, leucina, malonato, metionina, O-fosfocolina, pantotenato, ácido siálico, valina				NMR	(247)
2-hidroxiisobutirato, acetato, acetona, alanina, aspartato, butirato, caprato, colina, citrato, creatina, creatinina, formiato, fumarato, galactosa, glucosa, glucosa-1-fosfato, glutamato, glutamina, isoleucina, lactato, lactosa, leucina, lisina, maltosa, N-acetilglucosamina, O-fosfocolina, fenilalanina, succinato, sacarosa, taurina, treonina, tirosina, valina, xilosa, sn-glicerol-3-fosfocolina, histidina	Método Folch modificado, Ultrafiltración	· Los metabolitos polares pequeños se separan de biomoléculas de matriz más grandes (lípidos y proteínas) de manera más eficiente con el uso de ultrafiltración que con el uso del método de Folch modificado, que facilita la cuantificación de metabolitos polares de HBM y, por lo tanto, proporciona más información		NMR	(237)
Aminoácidos, ácidos biliares, carbohidratos, FAs, Ciclos de TCA, vitaminas y otros	Extracción Bligh y Dyer modificada con derivatización y extracción ACN/MeOH			GC-MS LC-MS	(236)
DGs y TGs	Extracción N-hexano	·Aislamiento rápido y eficaz de GLs ·Barato ·Fácil	·Disolventes tóxicos ·Sólo para extraer lípidos de alta abundancia	SFC-MS/MS	(261)
FAs, GPs, PL, GLs, SPs, STs	SPME	·Pequeños volúmenes de disolvente	·Sólo para lípidos	LC-MS/MS	(246)

		<ul style="list-style-type: none"> ·Fácil ·Poco tiempo ·Sin precipitación proteica previa 	<ul style="list-style-type: none"> ·Caracterización cualitativa · Dilución para evitar saturación de las señales · Metabolitos en baja abundancia bajo el LOD 		
Submetaboloma amino/fenol	Eliminación de proteínas y lípidos y etiquetado con dansyl	·Alta cobertura	<ul style="list-style-type: none"> ·Solo para metabolitos polares individuales ·Largo tiempo 	LC-UV LC-MS	(262)

Tabla 1.12. Información sobre las estrategias de preparación de muestras utilizadas para el análisis de metabolitos endógenos de HBM, incluidos el tipo de metabolitos detectados, el tipo de técnicas y resumidas ventajas y desventajas. Elaborada a partir de (263) .

La información biológica obtenida en estos estudios demuestra ser muy útil cuando se combina con otros datos a nivel "ómico" (como genómica, proteómica, transcriptómica, entre otros). Esta integración de diferentes niveles de datos permite obtener un conocimiento sistemático muy avanzado. Esto contrasta especialmente con las aplicaciones en otros campos científicos que se centran exclusivamente en el descubrimiento de biomarcadores. Al combinar datos de diferentes niveles "ómicos", se obtiene una visión más completa y detallada de los procesos biológicos y de las interacciones entre los distintos componentes del sistema biológico. Esto permite comprender mejor las relaciones causales, identificar nuevas vías metabólicas y descubrir interacciones moleculares clave (264).

El enfoque "ómico" en la investigación biológica ofrece la posibilidad de explorar y analizar múltiples aspectos del sistema biológico de manera integral. Al integrar los datos de diferentes niveles, se pueden descubrir patrones, correlaciones y relaciones que proporcionan una comprensión más profunda y una base sólida para la investigación y el desarrollo de aplicaciones biomédicas (265).

1.4.2. Metabolitos bioactivos en alimentos: tratamientos postcosecha.

1.4.2.1. Efectos de los tratamientos postcosecha en el perfil metabólico de los frutos.

Durante la maduración, los frutos experimentan cambios metabólicos significativos que incluyen la degradación de la clorofila, la acumulación de pigmentos como antocianinas y carotenoides, la modificación de la pared celular y la síntesis de metabolitos de bajo peso molecular, como azúcares, ácidos y compuestos volátiles. Estos cambios son fundamentales para mejorar sus características sensoriales y atraer a los dispersores de semillas (266). Sin embargo, una vez separados de la planta, los frutos inician un proceso de maduración o senescencia postcosecha cuya duración varía según la especie y el estado de maduración en el momento de la cosecha.

Los frutos climatéricos, como el tomate, el kiwi y el aguacate, se caracterizan por un aumento repentino en la producción de etileno y la respiración, lo que les permite continuar con la maduración después de la cosecha (267). Por ello, el control del etileno es un aspecto clave en la conservación poscosecha de estos frutos (268). En contraste, los frutos no climatéricos, como las fresas y las uvas, no presentan este comportamiento y deben ser recolectados en un estado óptimo de maduración, ya que su calidad se deteriora rápidamente.

La senescencia postcosecha implica una serie de procesos degradativos irreversibles que incluyen la descomposición de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, así como la pérdida de funcionalidad celular. Factores como la respiración, la deshidratación y la actividad microbiana aceleran este proceso (269,270), afectando la calidad del fruto en términos de apariencia, textura, sabor, aroma y valor nutricional, lo que a su vez impacta negativamente en su aceptación por parte del consumidor y genera pérdidas económicas en la industria frutícola.

Para mitigar estos efectos y prolongar la vida útil de los frutos, se han desarrollado diversas estrategias postcosecha que incluyen la refrigeración, atmósferas controladas, tratamientos térmicos, radiación UV, baños de ozono y la aplicación de productos fitosanitarios.

Estos métodos pueden preservar la calidad sensorial y nutricional de los frutos, aunque también pueden inducir alteraciones metabólicas (271).

La refrigeración es la técnica más común para reducir la tasa de respiración y la actividad enzimática, retrasando la maduración y el desarrollo de patógenos. No obstante, este método puede causar daños por frío, cuyos síntomas incluyen pardeamiento, harinosidad, sangrado de la pulpa y alteraciones en la textura (272). En muchos casos, los síntomas aparecen después de la compra del fruto, afectando su aceptación. Para reducir estos efectos adversos, se han implementado estrategias combinadas como tratamientos térmicos previos al almacenamiento en frío en cítricos y nísperos (273), o el uso de atmósferas controladas con niveles ajustados de oxígeno y dióxido de carbono en manzanas, fresas, duraznos y peras (274). Además, el enfriamiento retardado ha sido efectivo en la reducción del escaldado suave en manzanas (275).

El almacenamiento en atmósferas controladas contribuye a disminuir la respiración y ralentizar la maduración, mientras que los tratamientos térmicos pueden inducir mecanismos de defensa al fortalecer la integridad de la membrana celular y promover la síntesis de proteínas de choque térmico y antioxidantes (276). En frutos cítricos, por ejemplo, el tratamiento térmico ha demostrado mejorar la acumulación de azúcares sin afectar los niveles de ácidos orgánicos (277).

Sin embargo, estos tratamientos también pueden inducir modificaciones metabólicas no deseadas. La refrigeración puede disminuir la actividad de enzimas implicadas en la biosíntesis de compuestos volátiles, lo que altera el perfil aromático del fruto. Del mismo modo, los cambios en la concentración de azúcares, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos pueden modificar el sabor y la percepción sensorial del producto final.

En frutos climatéricos, como el tomate y el plátano, la aplicación de 1-metilciclopropeno (1-MCP), un inhibidor del etileno, es una práctica común para prolongar la vida útil (278). No obstante, su efectividad varía según la especie y variedad del fruto, y en algunos casos puede retrasar excesivamente la maduración, afectando negativamente el desarrollo de compuestos responsables del sabor y aroma. Además, es importante considerar que cualquier tratamiento postcosecha representa un estrés abiótico para el fruto, que debe adaptar su metabolismo para mantener la homeostasis (279).

En respuesta a estas condiciones de estrés, los frutos pueden activar la síntesis de compuestos protectores, incrementar la producción de antioxidantes y modificar su metabolismo del carbono. Aunque estos mecanismos de adaptación pueden mejorar la resistencia del fruto al almacenamiento prolongado, también pueden alterar sus características sensoriales y nutricionales (280,281).

Dado que los tratamientos postcosecha pueden alterar significativamente el metabolismo de los frutos, es fundamental analizar su impacto en compuestos de interés nutricional y biológico. Entre estos, los metabolitos bioactivos desempeñan un papel clave en la calidad y el valor agregado de los frutos, ya que contribuyen no solo a sus características sensoriales, sino también a sus beneficios para la salud.

Un ejemplo notable es el arándano, cuya composición rica en polifenoles, antocianinas y otros antioxidantes lo convierte en un fruto de alto interés tanto para la industria alimentaria como para la investigación en salud humana. Por lo tanto, comprender cómo las condiciones de almacenamiento y los tratamientos postcosecha afectan la concentración y estabilidad de estos

metabolitos resulta crucial para optimizar la conservación del arándano sin comprometer su potencial bioactivo.

1.4.2.2. Compuestos bioactivos del arándano.

En el caso de los arándanos, la metabolómica se utiliza para analizar y comprender los perfiles químicos y metabólicos de estas frutas.

La metabolómica puede aplicarse de varias maneras en el estudio de los arándanos. Una de las técnicas comunes utilizadas es la espectrometría de masas, que permite la identificación y cuantificación de metabolitos específicos presentes en los arándanos. Mediante esta técnica, los investigadores pueden analizar los compuestos orgánicos, como ácidos grasos, aminoácidos, flavonoides y antioxidantes, presentes en los arándanos (282).

Estos estudios de metabolómica en arándanos han revelado la presencia de una amplia variedad de compuestos beneficiosos para la salud. Por ejemplo, los arándanos son conocidos por ser ricos en antocianinas, que son pigmentos naturales responsables de su color azul intenso. Estas antocianinas tienen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, y se ha demostrado que están asociadas con una serie de beneficios para la salud, como la protección contra enfermedades cardiovasculares y el envejecimiento celular.

Además de las antocianinas, los arándanos también contienen otros compuestos fenólicos, como los flavonoides y ácidos fenólicos, que contribuyen a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Estos compuestos pueden ayudar a reducir el estrés oxidativo en el cuerpo y combatir los radicales libres, lo que puede tener efectos protectores para la salud.

La metabolómica también puede proporcionar información sobre los cambios en el perfil metabólico de los arándanos en respuesta a diferentes condiciones de cultivo, como la composición del suelo, el riego y la exposición a la luz solar. Estos estudios pueden ayudar a los agricultores a optimizar las condiciones de cultivo para obtener arándanos de mayor calidad nutricional y características sensoriales deseables.

Metabolitos presentes en el arándano.

El arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) es reconocido por su rica composición de metabolitos primarios y secundarios, los cuales desempeñan un papel crucial en su calidad organoléptica y en sus beneficios para la salud humana. Estos compuestos incluyen azúcares, ácidos orgánicos, fenoles, vitaminas, minerales y fibra dietética, además de otros compuestos bioactivos (283).

Los metabolitos primarios en los arándanos son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta. Entre ellos destacan:

- **Azúcares:** Glucosa, fructosa, sacarosa, turanosa y galactosa. Estos azúcares contribuyen al sabor dulce del fruto y actúan como fuentes de energía durante el desarrollo del fruto.
- **Ácidos orgánicos:** Ácido cítrico, málico, quínico, succínico, tartárico, shikímico y fosfórico. Contribuyen a la acidez y al sabor, regulan el pH citosólico y actúan como precursores biosintéticos de otros compuestos esenciales.

- **Aminoácidos:** Prolina, triptófano, fenilalanina, asparagina, histidina, valina, arginina, metionina, glicina, treonina, citrulina y leucina. Estos compuestos participan en la síntesis de proteínas, transporte de nitrógeno, respuesta al estrés y metabolismo de hormonas.

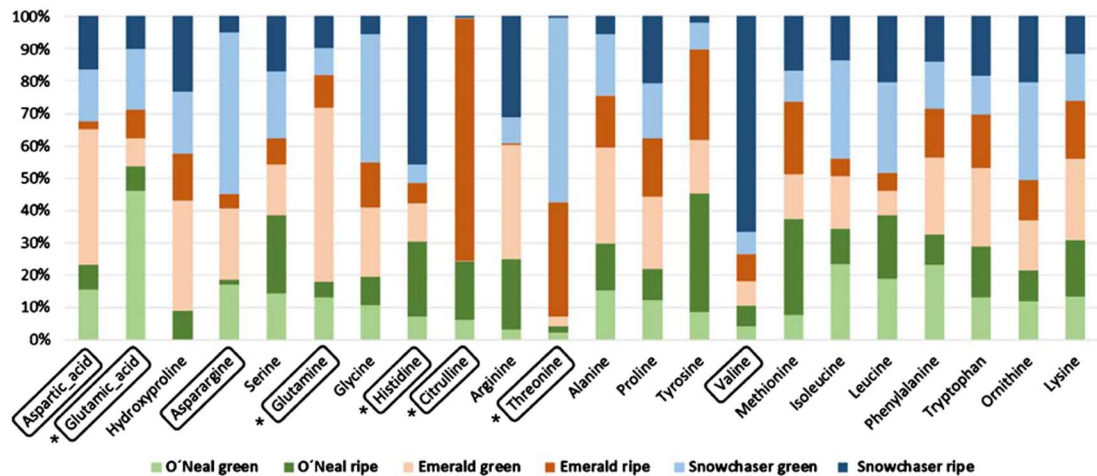


Figura 1.13. Aporte de aminoácidos en cada variedad y estado de maduración de los arándanos. Fuente: (283).

Los metabolitos secundarios no son esenciales para el crecimiento básico de la planta, pero desempeñan funciones clave en su defensa y en las propiedades bioactivas del fruto.

- **Polifenoles:** Antocianinas, flavonoles, proantocianidinas, estilbenos, ácidos cinámicos y ácidos clorogénicos. Estos compuestos son responsables del color azul del fruto y poseen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.
- **Taninos:** Taninos condensados y elagitaninos, que ofrecen protección frente a patógenos y contribuyen al sabor astringente.
- **Terpenoides:** Ácido ursólico y sus ésteres, que tienen propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas.

Funciones de los metabolitos en el fruto

- **Ácidos orgánicos:** Regulan el sabor y el pH del fruto, y están implicados en procesos metabólicos como la disponibilidad de hierro y la síntesis de compuestos secundarios.
- **Azúcares:** Fuente principal de energía y componentes clave del sabor. También actúan como señalizadores en procesos de maduración.
- **Polialcoholes (como el manitol y el sorbitol):** Protegen los tejidos de la deshidratación y ayudan a mantener la presión de turgencia.
- **Aminoácidos:** Como la prolina, tienen roles osmoprotectores y participan en la estructura de las paredes celulares, mientras que la fenilalanina es precursora de antocianinas y otros fenoles.
- **Antocianinas:** Contribuyen al color azul del fruto y mejoran su capacidad antioxidante.

La concentración de fenoles totales es mayor en los frutos inmaduros y disminuye conforme el fruto madura y adquiere su característico color azul. Paralelamente, la capacidad antioxidante (ORAC) también disminuye con la maduración, pero las antocianinas aumentan, contribuyendo a un equilibrio en las propiedades antioxidantes del fruto (284).

Los arándanos son una fuente rica en vitamina C, que representa hasta un tercio de la ingesta diaria recomendada por cada 100 g de fruta fresca, además de contener vitamina A, vitamina E y vitamina K. Entre los minerales presentes destacan el calcio, hierro, magnesio, manganeso, fósforo, potasio, y zinc, entre otros (285).

Aspectos metabólicos relacionados con la firmeza del fruto

La firmeza del fruto es un atributo clave que influye en su calidad percibida. Durante la maduración, se observan cambios en la actividad de enzimas como la pectina metil esterasa (PME) y la β -galactosidasa, que afectan la integridad de la pared celular. En ciertas variedades, se ha detectado una menor actividad de β -galactosidasa y un incremento en PME durante la maduración, lo que contribuye a su mayor firmeza (283).

Adicionalmente, los niveles de ácidos orgánicos como el cítrico y el málico, así como el contenido de metabolitos secundarios como fenilalanina y antocianinas, están correlacionados con la textura del fruto. La menor descomposición de la pared celular en variedades firmes se asocia también con una reducción en el contenido de xilosa, un azúcar no celulósico importante en la estructura de la pared celular.

Familia Metabólica	Metabolito
Azúcares	Glucosa
	Fructosa
	Sacarosa
	Turanosa
	Galactosa
Ácidos orgánicos	Acido citrico
	Acido malico
	Acido quinico
	Acido succínico
	Acido tartárico
	Acido shikimico
	Acido fosforico
Aminoácidos	Prolina
	Triptofano
	Fenilalanina
	Asparagina
	Histidina
	Valina
	Arginina
	Metionina
	Glicina
	Treonina
	Citrulina
Leucina	
Polifenoles	Antocianinas
	Flavonoles
	Proantocianidinas
	Estilbenos

	Acidos cinámicos
	Acidos clorogénicos
Taninos	Taninos condensados
	Elagitaninos
Terpenoides	Acido ursólico

Tabla 1.13. Metabolitos hallados en el arándano en el estudio (283).

En conjunto, los metabolitos presentes en el arándano no solo determinan su calidad sensorial (sabor, textura, color) y capacidad de almacenamiento, sino que también lo convierten en un alimento funcional con múltiples beneficios para la salud humana, incluyendo la prevención de enfermedades crónicas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y diabetes. Además, la comprensión de los procesos metabólicos relacionados con la maduración y firmeza del fruto proporciona información valiosa para mejorar las prácticas agrícolas y de manejo postcosecha.

1.4.2.3. Tratamientos postcosecha en la preservación del arándano.

Los arándanos exhiben un comportamiento respiratorio climatérico, lo cual significa que experimentan un aumento en la actividad respiratoria y en la producción de etileno durante su proceso de maduración. A diferencia de otros frutos climatéricos, los arándanos deben ser cosechados cuando están cerca de su punto de madurez, ya que sus características organolépticas no mejoran después de ser recolectados. Es relevante tener en cuenta que diferentes variedades de arándanos pueden presentar niveles de respiración distintos entre sí. Además, es importante tener en consideración que la tasa de respiración de los arándanos se ve afectada por la temperatura ambiente (286).

Debido al reducido tamaño de los arándanos, son más propensos a sufrir pérdida de agua en comparación con frutas de mayor tamaño. Sin embargo, esta característica morfológica tiene una ventaja: los arándanos requieren menos tiempo para enfriarse. Por otro lado, la piel de los arándanos es delgada y altamente vulnerable a daños mecánicos y a la deshidratación. No obstante, una característica morfológica que ayuda a reducir la pérdida de agua es la presencia de una cutícula cerosa que se encuentra sobre la epidermis. Preservar esta capa durante el proceso de producción tiene un efecto estético, ya que contribuye tanto a la disminución de la pérdida de agua como al “blooming” de la fruta.

La calidad de los arándanos se define a través de diversos factores que se pueden agrupar en calidad visible, organoléptica y nutritiva. La calidad visible se corresponde con la apariencia externa de la fruta, la cual se caracteriza por un color azul, la presencia de una capa de cera en la superficie, la ausencia de defectos como daños mecánicos y pudriciones, así como la forma y tamaño adecuados de la fruta, y una firmeza apropiada. Por otro lado, la calidad organoléptica se determina por un contenido adecuado de azúcares, ácidos y compuestos volátiles responsables del aroma característico. Por lo tanto, todas las actividades tanto antes como después de la cosecha deben centrarse en la entrega de un producto de la mayor calidad posible al consumidor. Los indicadores de calidad comúnmente utilizados por la industria son el color, el tamaño, la forma, la ausencia de defectos, la firmeza y el sabor.

La durabilidad de la fruta después de la cosecha se determina en su mayor medida en el momento de la recolección. En primer lugar, se debe seleccionar el momento adecuado de cosecha, el cual se determina por el color de la fruta. Aunque las frutas cosechadas en color rojo conservan una mayor firmeza y desarrollarán un color azul más adelante, su calidad organoléptica será inferior a la de aquellas cosechadas con un color apropiado. Además, se deben tomar precauciones para reducir los daños causados por golpes y la exposición a altas temperaturas, lo cual se logrará mediante una adecuada capacitación del personal encargado de la cosecha. Un manejo excesivo de la fruta solo provocará daños y removerá la capa de cera protectora. También se debe tener en cuenta que, si los contenedores se llenan en exceso, la compresión puede dañar directamente la fruta y dificultar su enfriamiento posterior. Si la cosecha se realiza directamente en el contenedor destinado a la exportación, se reduce la manipulación, lo que favorece la conservación del aspecto fresco, disminuye el daño por compresión y reduce la exposición a la contaminación.

Para combatir este inconveniente, se han desarrollado diversas tecnologías y tratamientos poscosecha dedicadas a alargar la vida útil de este fruto (287,288), permitiendo que se conserve más días de disponibilidad en el mercado y mejorando así las condiciones del fruto en la exportación (289).

Entre dichas tecnologías, la más empleada es la conservación en Atmósferas Controladas (CA), donde se regulan los niveles de CO₂, O₂ e incluso N₂ (290). También se emplean las Atmósferas Modificadas (MA), donde la concentración de los gases no se mantiene constante, sino que va variando (291). Además, se ha estudiado el efecto de dichas tecnologías complementadas con tratamientos con O₃ (292–294) y SO₂ (295), pero no tienen buena aceptación por los consumidores.

Otras tecnologías poscosecha que se han estudiado son los recubrimientos comestibles (296,297), absorbentes e inhibidores de etileno (298), Plasma frío (299), Irradiación con haz de electrones (300), Pasteurización electrónica fría (ECPTM) (301) y envases biodegradables (302), entre otros.

Además, se están desarrollando nuevas tecnologías poscosecha basadas en la utilización de compuestos naturales y métodos no invasivos para reducir el uso de productos químicos en la conservación del arándano. Estos tratamientos incluyen la utilización de extractos de plantas, gases de baja toxicidad y luz pulsada, entre otros (303).

Para la presente tesis, se han seleccionado cuatro tecnologías poscosecha para estudiar su efecto en los cambios metabólicos del arándano.

Campo eléctrico pulsado (PEF).

La tecnología de Campo Eléctrico Pulsado (PEF) es una técnica innovadora utilizada en el campo de la poscosecha para el procesamiento de alimentos. Consiste en aplicar pulsos de alta tensión y corta duración a los alimentos con el objetivo de mejorar su calidad y prolongar su vida útil.

Se basa en la activación molecular del agua presente en los organismos vivos. Consiste en un emisor de ondas electromagnéticas (50Hz, 2100V) que no representa ningún riesgo para

la salud humana. Este emisor emite un campo de pulsos eléctricos que activa los átomos del agua y los hace vibrar, generando un movimiento en el agua y aumentando los niveles de energía de las sustancias tratadas.

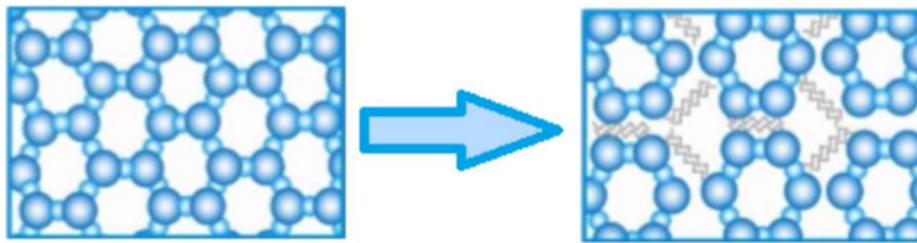


Figura 1.14. Visualización gráfica del efecto de pulsos eléctricos sobre las moléculas de agua en los alimentos. (Fuente: <https://www.denba.com.au/>)

Esta tecnología, utilizada en alimentos a bajas temperaturas y lugares cerrados, logra una maduración lenta sin que se deterioren y prolonga su vida útil, permitiendo así el acceso a nuevos mercados y clientes y extendiendo la campaña de suministro de frutas y verduras. Uno de los principales beneficios del PEF es su capacidad para inactivar microorganismos y enzimas indeseables presentes en los alimentos. Los pulsos eléctricos de alta intensidad dañan la membrana celular de bacterias, mohos y levaduras, lo que resulta en su inactivación o destrucción. Esto puede contribuir a reducir la carga microbiana de los alimentos, mejorando su seguridad y prolongando su vida útil. Además de la inactivación de microorganismos, también puede tener otros efectos positivos en los alimentos. Por ejemplo, puede mejorar la textura de los productos vegetales al ablandar los tejidos y romper las estructuras celulares rígidas. Esto es especialmente útil en el caso de frutas y verduras, donde el ablandamiento puede mejorar la calidad y facilitar su procesamiento. Otro efecto del PEF es la estimulación de respuestas de defensa en los alimentos. Los pulsos eléctricos pueden desencadenar respuestas de estrés en los tejidos vegetales, lo que a su vez activa mecanismos de defensa naturales, como la síntesis de compuestos antioxidantes y fitoalexinas. Estas sustancias pueden ayudar a prolongar la vida útil de los alimentos al inhibir el crecimiento de microorganismos y prevenir la oxidación (304).

Además, esta tecnología puede mantener los alimentos frescos a temperaturas por debajo de 0°C durante períodos prolongados sin congelarlos. Al reducir significativamente el deterioro, se logra prolongar la vida útil comercial de los productos, mejorando su sabor y aumentando su contenido de azúcares. Después de someterse al tratamiento, los alimentos se conservan más lentamente cuando se pasan a refrigeración convencional (305–307).



Figura 1.15. Efecto de la tecnología PEF sobre la vida útil de los alimentos. (Fuente: <https://www.denba.com.au/>)

La tecnología de campo eléctrico pulsado se destaca por su bajo consumo energético y su versatilidad, ya que se trata de un kit adaptable a cualquier instalación. Una de sus principales

ventajas es que no necesita entrar en contacto directo con los alimentos para ser efectiva, lo que maximiza el espacio de almacenamiento disponible y permite su uso en diversos entornos.

En general, la tecnología de campo eléctrico pulsado en la postcosecha ofrece varias ventajas. Sin embargo, es importante destacar que es una tecnología en desarrollo y su aplicación específica puede variar según el tipo de alimento y las condiciones de procesamiento.

Láminas absorbentes de Etileno (EAS).

Los absorbentes de etileno son productos utilizados en la postcosecha de los arándanos y otros productos agrícolas para controlar la maduración y prolongar su vida útil. El etileno es una hormona vegetal natural que acelera el proceso de maduración de las frutas y verduras. Sin embargo, un exceso de etileno puede resultar en una maduración acelerada, ablandamiento y deterioro de los productos (298).

Los absorbentes de etileno son sustancias o materiales diseñados para adsorber o eliminar el etileno del ambiente de almacenamiento de los arándanos. Al reducir la concentración de etileno en el entorno, se puede ralentizar el proceso de maduración y extender la vida útil de los arándanos, manteniéndolos frescos y de calidad por más tiempo.

Existen diferentes tipos de absorbentes de etileno disponibles en el mercado. Algunos de ellos utilizan productos químicos como el permanganato de potasio o el óxido de manganeso como absorbentes. Estos productos químicos reaccionan con el etileno y lo convierten en subproductos no dañinos. Otros absorbentes utilizan zeolitas, que son minerales microporosos con capacidad para adsorber moléculas de etileno.

El uso de absorbentes de etileno en la postcosecha de los arándanos tiene varios beneficios. En primer lugar, ayuda a prevenir la sobre maduración y el ablandamiento de los frutos, lo que reduce la pérdida de calidad y prolonga la vida útil. Además, al controlar el etileno, se pueden minimizar los efectos negativos del almacenamiento conjunto de arándanos con otras frutas o vegetales que también producen etileno, evitando así el proceso de maduración cruzada (298).

En los últimos años se ha desarrollado una gama de envases/embalaje activo cuyo principal objetivo es alargar la vida útil de frutas y hortalizas. Estos envases consisten en una lámina activa que retarda la maduración. Su funcionamiento se basa en la absorción de parte del etileno liberado por la fruta durante su proceso de maduración. Esto ayuda a mantener una hidratación adecuada de la fruta y a aumentar su tiempo de vida útil. Esta tecnología se aplica principalmente a frutas climatéricas, las cuales siguen madurando después de ser cosechadas.



Figura 1.16. Mecanismo de absorción del etileno de la tecnología EAS. (Fuente: Elaboración propia)

Estudios previos han demostrado que el uso de tecnologías basadas en envases activos que absorben el etileno puede reducir el deterioro de los frutos causado por la acción del hongo *Botrytis Cinerea*.

Estos envases se fabrican utilizando una combinación de aditivos inorgánicos que permanecen de forma permanente en la estructura del polímero y se encargan de captar el etileno. Esto garantiza que el material sea inerte con respecto a la fruta, sin alterar sus propiedades organolépticas. Además, no afecta la seguridad alimentaria del envase.

Gracias a esta tecnología, los clientes tienen la posibilidad de transportar frutas y hortalizas a destinos cada vez más distantes, logrando una mayor duración para que el producto llegue en mejores condiciones al consumidor final. Estos envases se presentan en diversos formatos para adaptarse a las diferentes necesidades del sector, como láminas de fondo para tarrinas, bolsas y fundas.

Plasma frío atmosférico (CAP).

El plasma frío a presión atmosférica (CAP) es una tecnología emergente que se utiliza en la postcosecha de arándanos y otros productos agrícolas para controlar patógenos, reducir la carga microbiana y prolongar la vida útil de los alimentos. El plasma frío es un estado de la materia compuesto por especies químicas activas, como radicales, electrones, iones y moléculas excitadas, que se generan a través de descargas eléctricas en un gas a presión atmosférica (308).

En el contexto de la postcosecha del arándano, el plasma frío se utiliza como una alternativa a los métodos convencionales de desinfección, como el lavado con agentes químicos. El CAP tiene varias ventajas, como la eficacia antimicrobiana, la rápida acción y la no formación de residuos químicos en los productos tratados.

El plasma frío a presión atmosférica actúa de diferentes maneras para controlar los patógenos y prolongar la vida útil de los arándanos. Primero, las especies químicas activas presentes en el plasma pueden dañar las membranas celulares de bacterias, hongos y otros microorganismos, lo que resulta en su muerte o inhibición de crecimiento. Además, el plasma

puede generar ozono, que es un potente desinfectante y oxidante, capaz de degradar compuestos orgánicos y eliminar microorganismos.

El tratamiento de arándanos con plasma frío generalmente se realiza mediante sistemas de inmersión o mediante la exposición directa de los frutos al plasma. Los tiempos de tratamiento y las condiciones de operación varían según el equipo utilizado y el objetivo específico del tratamiento.

Es importante destacar que, aunque la tecnología de plasma frío a presión atmosférica muestra promesas en la postcosecha de arándanos, aún se requiere más investigación para optimizar los parámetros de tratamiento, evaluar los efectos en la calidad sensorial de los arándanos y evaluar la factibilidad económica de su implementación a gran escala (309,310).

La tecnología CAP es un sistema de control microbiológico ambiental que transforma los componentes del aire en moléculas o especies reactivas. Estas especies reactivas se mezclan y reaccionan con moléculas y microorganismos presentes en el ambiente que se desea tratar. El mecanismo de acción se basa en someter el aire ambiental a un campo eléctrico de alto voltaje y frecuencia en una cámara de reacción, lo que ocasiona cambios en las moléculas del aire, convirtiéndolas en un estado de alta energía.

Esta tecnología, tiene como objetivo principal la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), las cuales desempeñan un efecto de desinfección en el ambiente sin generar residuos. Además, se caracteriza por presentar bajos niveles de generación de ozono.



Figura 1.17. Esquema general del mecanismo de acción de la tecnología CAP. (Fuente: <https://oxyion.com/es/nam/agroindustrial>)

Las células vivas cuentan con antioxidantes para defenderse de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Es importante destacar que no existe un antioxidante "universal" que pueda prevenir todos los tipos de daño oxidativo. Por lo tanto, se producen siete especies reactivas de oxígeno diferentes, lo que garantiza su eficacia frente a diversos antioxidantes que puedan presentar las células de los microorganismos.

Dado el amplio espectro y la complejidad microbiológica que existe en el mundo, que incluye virus, bacterias, levaduras y mohos, es necesario considerar y ajustar adecuadamente la tecnología para lograr su máxima efectividad y eficacia en función de factores externos como la humedad, la temperatura y el proceso o producto específico involucrado.

Es decir, transforma el aire, que puede ser una fuente de contaminación, en un agente de higienización. Esto permite generar entornos bioseguros y mejorar la inocuidad en la producción, manipulación y conservación de alimentos al eliminar hongos, esporas, mohos, bacterias, virus, elementos contaminantes, compuestos orgánicos volátiles, partículas sólidas en suspensión, malos olores, humo, ácaros, y otros contaminantes.

La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) tiene varios efectos beneficiosos en el ámbito hortofrutícola. Por un lado, impide la apertura de las estomas en las estructuras vegetales, lo que reduce la deshidratación y evita pérdidas de peso en los productos. Además, ayuda a mantener la frescura de los productos vegetales y retrasa significativamente el inicio de la maduración de frutas y verduras al oxidar el etileno a través de estos oxidantes naturales, lo que resulta en la producción de CO₂ y vapor de agua. Por lo tanto, esta tecnología encuentra aplicaciones principalmente en la industria hortofrutícola.

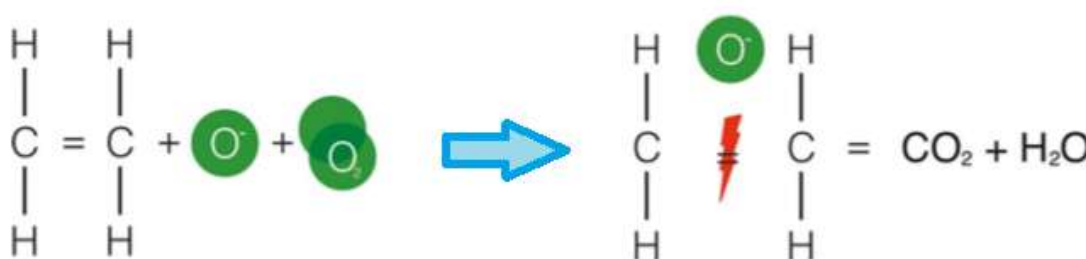


Figura 1.18. Mecanismo de oxidación del etileno provocado por las ROS. (Fuente: <https://oxyion.com/es/nam/agroindustrial>)

Bolsas de Atmósfera Modificada.

Las atmósferas modificadas (MAP) son una técnica ampliamente utilizada en la poscosecha de arándanos y otros productos agrícolas para prolongar su vida útil. La técnica se basa en alterar la composición gaseosa del entorno en el que se almacenan los arándanos, creando una atmósfera específica que ayuda a controlar la maduración y prevenir el deterioro (311).

El objetivo principal de las atmósferas modificadas es regular los niveles de oxígeno (O₂) y dióxido de carbono (CO₂) alrededor de los arándanos. Dependiendo del tipo de producto y de las características específicas de almacenamiento, se pueden emplear diferentes combinaciones de gases y niveles de concentración.

La reducción del nivel de oxígeno en la atmósfera de almacenamiento disminuye la respiración de los arándanos y ralentiza el proceso de maduración, lo que a su vez ayuda a prevenir la sobre maduración y el ablandamiento de los frutos. Al mismo tiempo, el aumento de dióxido de carbono inhibe la actividad microbiana y reduce la tasa de descomposición de los arándanos, lo que contribuye a extender su vida útil.

Es importante tener en cuenta que los niveles de oxígeno y dióxido de carbono óptimos pueden variar según la variedad de arándanos y las condiciones específicas de almacenamiento. Además, otros factores como la temperatura y la humedad relativa también deben tenerse en cuenta para lograr los mejores resultados en la conservación de los arándanos. Además de controlar los niveles de oxígeno y dióxido de carbono, las atmósferas modificadas también pueden incorporar otros gases, como el nitrógeno, para ayudar a mantener la frescura y calidad

de los arándanos. Estos gases pueden ayudar a reducir la actividad microbiana, prevenir la formación de moho y minimizar el deterioro causado por el estrés oxidativo.

Las atmósferas modificadas pueden implementarse tanto en sistemas de almacenamiento a pequeña escala como en instalaciones comerciales de postcosecha. Los métodos utilizados para crear y controlar las condiciones de las MAP pueden incluir el uso de materiales de embalaje especiales, como películas o bolsas permeables al gas, así como sistemas de control de gases y monitoreo de la composición atmosférica (312–314).

La tecnología seleccionada consiste en envases con atmósfera modificada activa e inteligente que permite conservar los productos de manera natural durante más tiempo al retardar los procesos enzimáticos, hormonales y de maduración.

Son bolsas de polietileno completamente recubiertas con una combinación de aditivos orgánicos e inorgánicos. Estos aditivos crean condiciones específicas en función de las necesidades metabólicas del producto, lo que le permite al fruto ralentizar su maduración y senescencia. De esta manera, se crea un ambiente equilibrado que prolonga la vida útil del producto.

Esta tecnología se distingue por la inclusión de minerales como la zeolita en toda la película plástica mediante nanotecnología. Esto proporciona una alta permeabilidad a los gases, permitiendo una entrada y salida de oxígeno hasta 30 a 50 veces mayor que en otras bolsas. Además, reduce las pérdidas por deshidratación a menos del 1%, preservando la firmeza y apariencia de los productos. Estos minerales también contribuyen a minimizar la tasa respiratoria de la fruta y oxidan los gases dañinos que afectan al producto. Además, la tecnología reacciona ante cambios bruscos de temperatura para mantener una atmósfera equilibrada en el interior del envase.

Estos envases han demostrado ser muy útiles en tránsitos, almacenamiento y destinos específicos, brindando protección al fruto desde su empaquetado hasta su comercialización. A diferencia de las atmósferas controladas que se utilizan en contenedores y que representan una inyección artificial de gases que se pierde una vez que se abre el envase, la tecnología MAP se mantiene activa durante todo el proceso.

La tecnología se presenta en diversos formatos que se adaptan a las cajas más comunes utilizadas para el empaque. Además, se considera una tecnología sostenible, ya que emplea materiales reciclables y genera un bajo impacto ambiental.

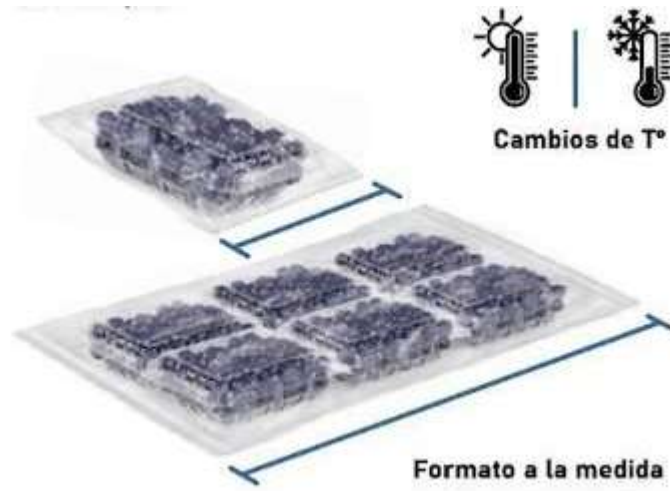


Figura 1.19. Representación del formato de MAP empleado. (Fuente: <https://www.paclife.tech/>)

2. OBJETIVOS.

2.1. Objetivo general de investigación.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es contribuir al desarrollo y optimización de métodos analíticos innovadores en el ámbito de la *Foodómica*, una disciplina que integra tecnologías avanzadas para el estudio integral de los alimentos y sus componentes. Este objetivo se desarrolla mediante la implementación de estrategias analíticas eficientes, sensibles y sostenibles para abordar problemas específicos en la caracterización química y funcional de matrices alimentarias de relevancia nutricional y biológica.

2.2. Objetivos específicos.

- i. Optimizar la técnica de microextracción en fase líquida mediante el uso de fibra hueca (HF-LPME) para la determinación de PCBs, en leche materna. Este desarrollo permitirá un análisis más preciso y eficiente de contaminantes que afectan la seguridad alimentaria y la salud humana, vinculando directamente la innovación metodológica con los principios de la *Foodómica* (Capítulo 1).
- ii. Desarrollar un método analítico que combina la HF-LPME con el uso de ultrasonido para mejorar la extracción de metabolitos. La combinación de estas técnicas persigue un enfoque sostenible y robusto para la caracterización del perfil metabolómico de la leche materna, facilitando la comprensión de sus propiedades nutricionales y su impacto en la salud del lactante. Este avance se alinea con los objetivos de la *Foodómica*, promoviendo métodos que integran calidad, seguridad y sostenibilidad (Capítulo 2).
- iii. Aplicar enfoques metabolómicos no dirigidos para estudiar los cambios químicos en arándanos sometidos a diferentes tratamientos postcosecha. Mediante la identificación de metabolitos clave y su relación con la calidad y propiedades bioactivas del fruto, se establece un vínculo directo entre los métodos analíticos avanzados y la mejora de alimentos nutritivos y saludables, destacando el papel de la *Foodómica* en la innovación agrícola y alimentaria (Capítulo 3).

De manera integrada, estas investigaciones contribuyen al desarrollo de métodos analíticos avanzados que no solo cumplen con los requisitos de precisión y eficiencia, sino que también abordan problemáticas clave en la caracterización de alimentos saludables y matrices complejas. El enfoque propuesto en esta tesis doctoral posiciona a la *Foodómica* como una herramienta esencial para el avance de la ciencia y la tecnología alimentaria.

MATERIALES Y METODOS



3. MATERIALES Y METODOS.

3.1. Diseño experimental.

El presente trabajo de investigación se estructura en tres estudios diferenciados, cada uno abordado en un capítulo específico. En los Capítulos 1 y 2, se emplean técnicas avanzadas de microextracción en fase líquida con fibra hueca (HF-LPME) como estrategia clave para la extracción y preconcentración de analitos en matrices alimentarias complejas. En particular, el Capítulo 1 se centra en la optimización de un método basado en HF-LPME para la determinación de bifenilos policlorados (PCBs) en leche materna humana, contribuyendo a la detección eficiente de estos contaminantes ambientales con un enfoque sostenible y de bajo consumo de disolventes.

Por otro lado, el Capítulo 2 aplica la microextracción en fase líquida con fibra hueca trifásica, asistida por ultrasonido, como una herramienta innovadora para el análisis metabolómico no dirigido en leche materna. Esta metodología permite la identificación de una amplia variedad de metabolitos bioactivos, facilitando una caracterización más completa de su perfil químico y su potencial impacto en la salud infantil.

Finalmente, el Capítulo 3 está orientado a un estudio metabolómico no dirigido en arándanos tratados con distintas tecnologías postcosecha. A diferencia de los capítulos anteriores, este estudio se centra en evaluar los cambios en el perfil de metabolitos bioactivos mediante técnicas cromatográficas avanzadas (GC-MS y LC-MS), con el objetivo de determinar el impacto de las condiciones postcosecha en la estabilidad y biodisponibilidad de los compuestos beneficiosos presentes en la fruta.

Cada uno de estos estudios ha sido diseñado con enfoques experimentales específicos que permiten abordar de manera integral el análisis de contaminantes y metabolitos bioactivos en matrices alimentarias, proporcionando herramientas analíticas de alta sensibilidad y especificidad para la investigación en foodómica.

3.1.1. Capítulo 1: Estrategia de optimización para la extracción de PCBs en leche materna mediante HF-LPME.

El presente estudio se enfocó en la optimización de un método analítico basado en la microextracción en fase líquida mediante fibra hueca (HF-LPME) en disposición de "U", empleando una configuración bifásica para la determinación de bifenilos policlorados (PCBs) en leche materna humana.

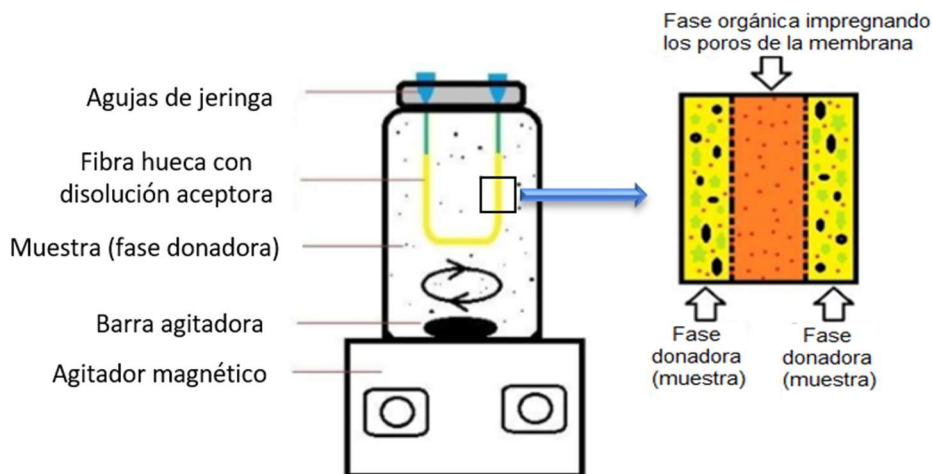


Figura 3.1. Diseño experimental de la extracción de PCBs en leche materna mediante el uso de HF-LPME. (Fuente: Elaboración propia)

El tipo de fibra hueca utilizado fue una membrana de polipropileno Accurel Q3/2 (Membrana, Wuppertal, Alemania), con las siguientes características:

- Diámetro interno: 600 μm .
- Grosor de la pared: 200 μm .
- Tamaño de poro: 0,2 μm .
- Porosidad: 70%. La fibra hueca contenía la fase orgánica aceptora tanto en los poros como en el interior de la membrana.

Las muestras de leche materna humana se recolectaron a las 48 horas posteriores al parto en el Hospital Juan Ramón Jiménez durante el año 2017. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta el momento del análisis. Previo al inicio del estudio, se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todas las participantes, y el protocolo fue aprobado por el comité de ética local correspondiente, asegurando el cumplimiento de los principios éticos y legales en la investigación. Se estableció un volumen fijo de leche materna para todas las replicaciones, y se fortificaban con las disoluciones de PCBs en concentraciones conocidas (disolución intermedia).

La disolución intermedia de PCBs se preparó a partir de la dilución con hexano (1:5) a partir de una disolución estándar suministrada por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania), preparada en n-hexano, con los siguientes congéneres y concentraciones:

- PCB 1 y PCB 5: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- PCB 29, PCB 47, PCB 116, PCB 136: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- PCB 187, PCB 194, PCB 206, PCB 209: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Todos los reactivos y disolventes utilizados en este trabajo fueron de la máxima pureza disponible. Los disolventes n-hexano, tolueno, y acetona fueron suministrados por Teknokroma (Barcelona, España).

El agua ultrapura (18M Ω cm) se obtuvo a partir de un Sistema purificador de agua Milli-Q (Millipore, Watford, UK). Esta agua se utilizó para la preparación de blancos y soluciones de trabajo.

Los extractos se analizaron en un cromatógrafo de gases modelo 6890N acoplado a un detector de captura de microelectrones de ^{63}Ni (GC- μECD) (Agilent Technologies, Hewlett Packard, Wilmington, DE, EE. UU.). La separación cromatográfica se realizó en una columna cromatográfica DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). El gas portador fue helio (99,999 %, 1,2 mL min^{-1}). Se inyectó un volumen de 1 μl de los extractos en el GC utilizando el modo splitless (tiempo splitless: 30 s). La temperatura del inyector se ajustó a 250 $^{\circ}\text{C}$. La temperatura del horno se programó a 75 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 min, luego se aumentó a 150 $^{\circ}\text{C}$ con una rampa de 30 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, a 180 $^{\circ}\text{C}$ con una rampa de 5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ mantenida durante 15 min, a 190 $^{\circ}\text{C}$ con una rampa de 5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ durante 5 min, a 200 $^{\circ}\text{C}$ con una rampa de 5 $^{\circ}\text{C}$ durante 3 min, a 280 $^{\circ}\text{C}$ con una rampa de 5 $^{\circ}\text{C}$ mantenida durante 2,5 min y luego se aumentó 50 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ a 290 $^{\circ}\text{C}$ con un tiempo de retención de 4,8 min. Se utilizó nitrógeno como gas de reposición para el detector ECD (60 mL min^{-1} , 99,999%). El paquete de software ChemStation (versión A0903) se utilizó para la adquisición de datos.

Los extractos se analizaron simultáneamente en un GC-MS de trampa de iones modelo ITQ 900 (Thermo Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific Spa, Rhone, Milán, Italia). Las condiciones de temperatura de la columna analítica y del horno fueron las mismas que las utilizadas para el cromatógrafo de gases con microelectrones (GC- μECD). La temperatura del inyector se fijó en 250 $^{\circ}\text{C}$. El gas portador fue helio (1,3 mL min^{-1}). La temperatura de la línea de transferencia entre el cromatógrafo y el detector de masas se fijó en 280 $^{\circ}\text{C}$. Para la separación de los 133 picos, el programa de temperatura del horno fue el mismo descrito anteriormente para el cromatógrafo de gases con microelectrones (GC- μECD). La ionización de los analitos en el espectrómetro de masas se llevó a cabo mediante impacto electrónico (EI) con una fuente de ionización electrónica a 70 eV en el modo de monitorización de iones seleccionado (SIM). Los PCB se identificaron mediante la comparación del tiempo de retención con los estándares, la base de datos del NIST y la espectrometría de masas en tándem.

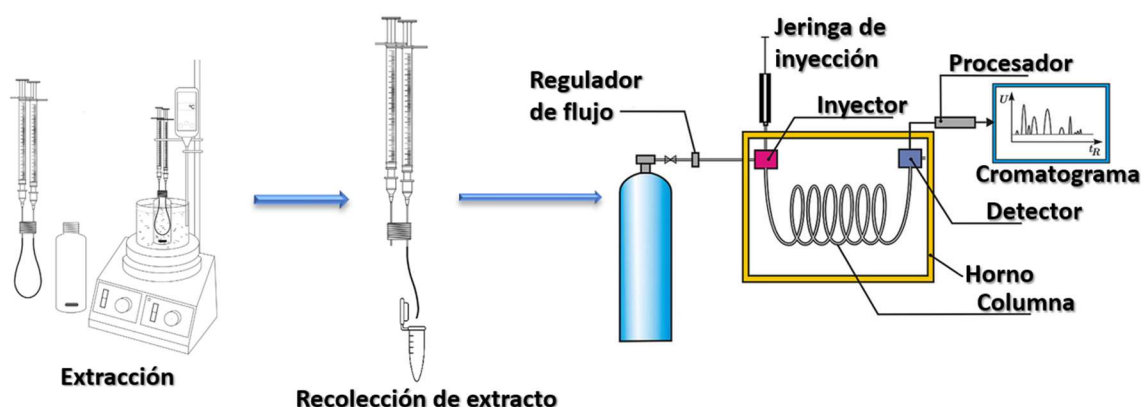


Figura 3.2. Procedimiento experimental de la extracción HF-LPME de PCBs en leche materna. (Fuente: Elaboración propia)

3.1.2. Capítulo 2: Desarrollo de un método de HF-LPME trifásica asistida por ultrasonido para análisis metabólico.

En este segundo estudio, se ha desarrollado un método analítico basado en la microextracción en fase líquida con fibra hueca (HF-LPME) para el estudio metabólico de la composición de la leche materna. Esta es la primera vez que esta técnica se emplea en el campo de la metabolómica, lo que ha requerido una optimización exhaustiva de los parámetros experimentales.

Inicialmente, se diseñó un método basado en la configuración en U de la fibra hueca, similar al utilizado en el primer estudio. En esta etapa, se optimizaron variables como la fase aceptora, el tipo de membrana, la velocidad de agitación, el tiempo de extracción y la temperatura. Una vez optimizados estos parámetros, se reconfiguró el sistema para emplear una disposición en barra, sustituyendo la agitación por un baño de ultrasonidos para mejorar la eficiencia de la extracción y reducir el tiempo del procedimiento. Tras este cambio, se reoptimizaron el tiempo de extracción y la longitud de la fibra, empleando una de mayor diámetro, pero con la misma porosidad y material.

Con el método desarrollado y optimizado, se procedió a su validación mediante la determinación de parámetros clave como la precisión, la sensibilidad, la recuperación y los factores de enriquecimiento de la fibra para los compuestos seleccionados. Finalmente, los resultados obtenidos fueron comparados con los del método de extracción líquido-líquido con metanol, ampliamente utilizado en estudios metabólicos de leche materna.

Para la preparación de todas las soluciones acuosas se utilizó agua ultrapura obtenida de un sistema Milli-Q (Millipore Milli-Q, Watford, Reino Unido). Los estándares puros se disolvieron individualmente en metanol (MeOH, Fisher Scientific, Nepean, Canadá) hasta alcanzar una concentración final de 1000 mg L^{-1} y se almacenaron a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Las soluciones de trabajo intermedias se prepararon mediante diluciones en metanol y se conservaron protegidas de la luz a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento del análisis.

Los estándares empleados en la validación del método, incluidos ácido láctico, urea, glicerol, prolina, ácido glutámico, glucosa, ácido cítrico y serina, fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Además, de la misma fuente se obtuvieron reactivos como clorhidrato de O-metilhidroxilamina, N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) con 1 % de trimetilclorosilano (TCMS), así como disolventes como anhídrido de piridina, n-decano y metil terc-butil éter (MTBE).

La fibra hueca utilizada para la inmovilización de la membrana líquida soportada y que contenía la solución aceptora fue una fibra de polipropileno S6/2 Accurel® (1800 μm de diámetro interior, 450 μm de espesor de pared y 0,2 μm de tamaño de poro), adquirida a Membrana (Wuppertal, Alemania). El acetonitrilo (MeCN) utilizado en la extracción fue suministrado por Fisher Chemical (Madrid, España).

Las muestras de leche materna (LM) se recolectaron durante los primeros cuatro meses de lactancia y se almacenaron a $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. La recolección de muestras se realizó entre 2019 y 2020 en el Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, Badalona, España. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética Local y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todas las participantes (Referencia del Comité de Ética: PI-18-266). Se proporcionó información detallada, tanto oral como escrita, sobre el estudio a cada participante.

Se establecieron criterios de exclusión para mujeres con embarazos múltiples, enfermedades o complicaciones perinatales. También se excluyeron aquellas que no podían amamantar debido a afecciones graves que requirieran ingreso en la unidad de cuidados intensivos, las que tomaban medicamentos con posibles efectos adversos para el lactante y aquellas de quienes no fue posible obtener muestras de leche materna.

Dado que este estudio representa la primera aplicación de HF-LPME en metabolómica, el número de factores a optimizar fue significativamente mayor que en estudios previos. Además de los parámetros clásicos como el tiempo de extracción, la fase aceptora, la temperatura y la agitación, se investigaron otros factores como la longitud de la fibra, el disolvente utilizado en la membrana y la disposición de la fibra hueca en el sistema. También se optimizó la fuerza impulsora del proceso, sustituyendo la agitación por un baño de ultrasonidos para mejorar la eficiencia de extracción.

Inicialmente, se diseñó un método basado en una configuración en "U" de la fibra hueca, empleando un sistema de extracción en tres fases con agitación para mejorar el rendimiento. En esta etapa, se optimizaron la fase aceptora, la membrana, la velocidad de agitación, el tiempo de extracción y la temperatura.

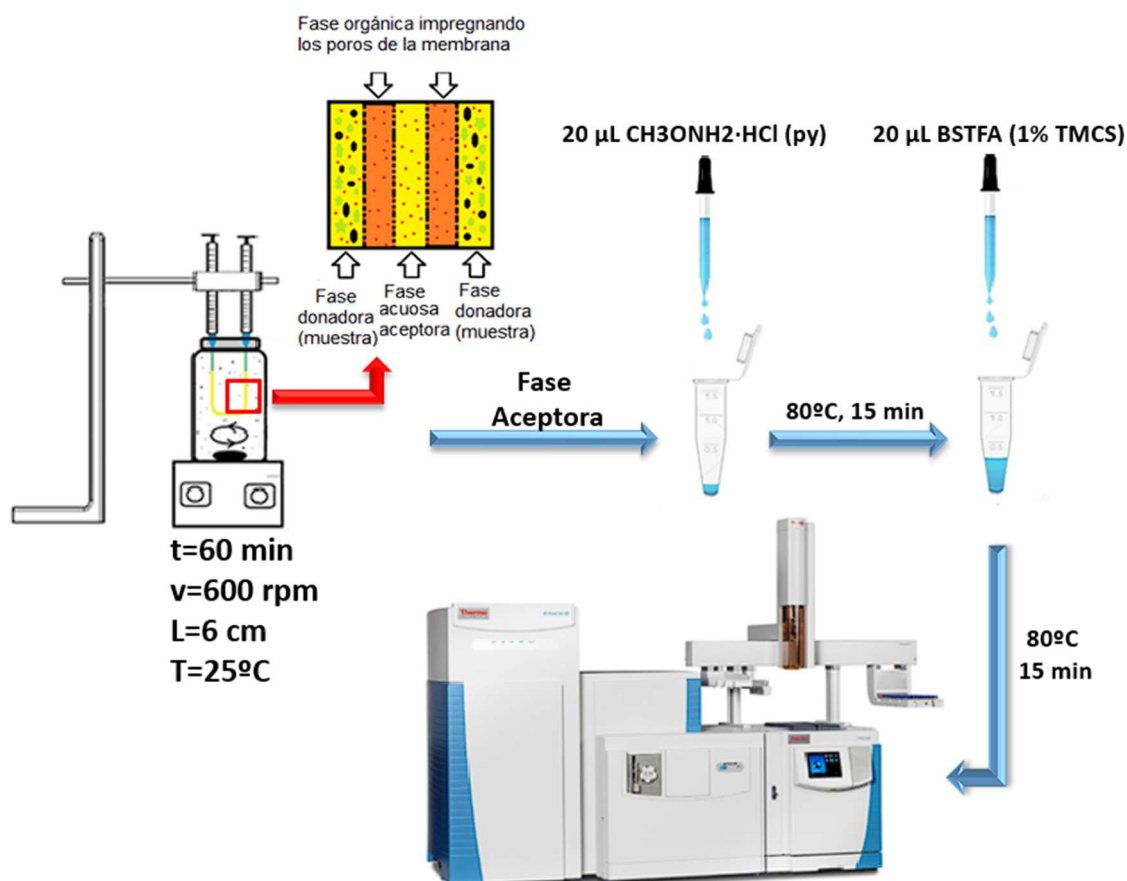


Figura 3.3. Diseño del proceso experimental para el análisis metabolómico de leche materna empleando HF-LPME trifásica con disposición en U. (Fuente: Elaboración propia)

Tras definir los parámetros óptimos, se reconfiguró el método utilizando una disposición en barra de disolvente. Para evitar daños en la membrana y mejorar la eficiencia del método, se sustituyó la agitación por un baño de ultrasonidos, lo que requirió una nueva optimización del

tiempo de extracción y la longitud de la fibra. En esta fase, se utilizó una fibra de mayor diámetro, pero con la misma porosidad y material.

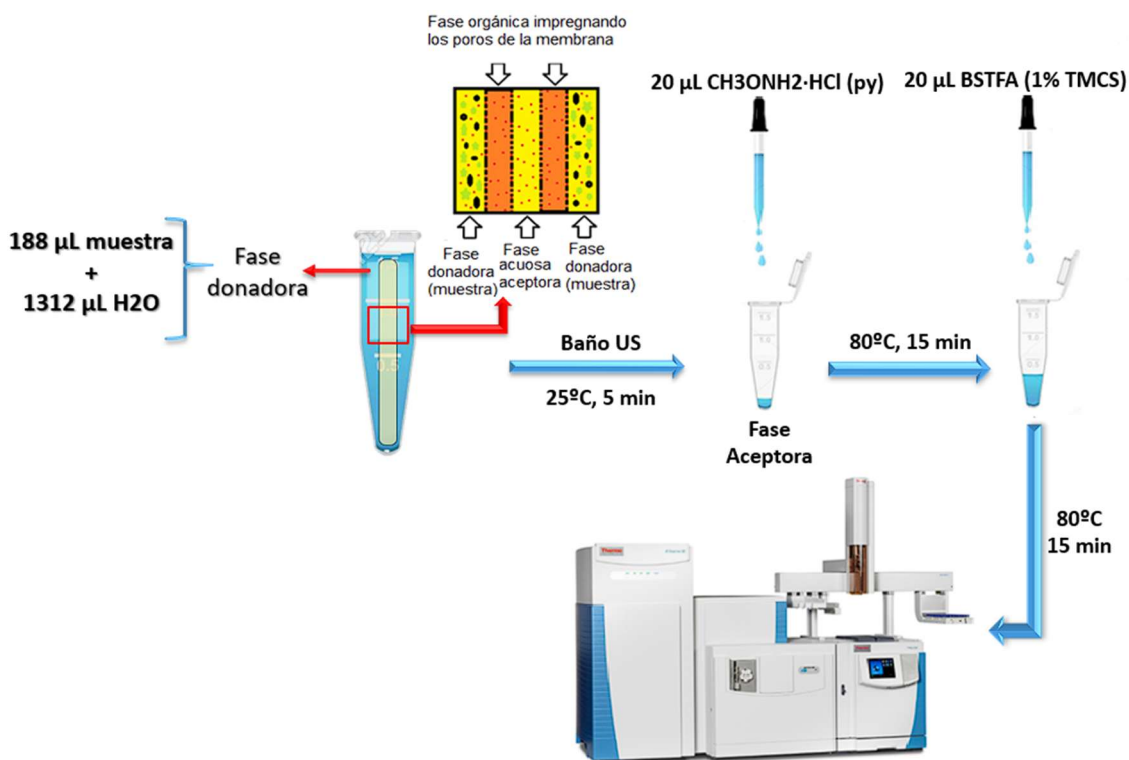


Figura 3.4. Diseño del proceso experimental para el análisis metabolómico de leche materna empleando HF-LPME trifásica con disposición en barra de disolvente (SBME). (Fuente: Elaboración propia)

Finalmente, con el método desarrollado y optimizado, se llevó a cabo su validación, evaluando parámetros como la precisión, la sensibilidad, la recuperación y los factores de enriquecimiento. Para comprobar la eficacia del método, los resultados obtenidos se compararon con los del método de extracción líquido-líquido con metanol, ampliamente utilizado en estudios metabolómicos de leche materna.

Los extractos obtenidos fueron secados y derivatizados. La derivatización se llevó a cabo con metoxiamina en piridina, y la sililación se realizó con MSTFA siguiendo un método desarrollado previamente (315).

Los extractos derivatizados se analizaron mediante un cromatógrafo de gases (Trace GC ULTRA) equipado con un analizador de trampa de iones modelo ITQ 900 (Thermo Fisher Scientific). La columna capilar utilizada fue una VF-5MS de dimensiones: 30 m \times 0,25 mm I.D. y 0,25 μm de espesor de película (Agilent Technologies, Tokio, Japón). Se seleccionó el modo splitless para las inyecciones en el horno inyector a 250 $^{\circ}\text{C}$ y se utilizó helio como gas portador a 1,2 mL min^{-1} . El programa de temperatura del horno comenzó a 60 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 min, luego aumentó a 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta 325 $^{\circ}\text{C}$, y se enfrió durante 10 min antes de la siguiente inyección (259,316). La fuente de ionización electrónica (EI) se operó en modo 70 eV. La detección MS se realizó en modo de escaneo completo en el rango m/z 50–650 a una velocidad de 1 espectro/s. El tiempo cromatográfico total fue de 30 min. La temperatura del detector MS se mantuvo a 280 $^{\circ}\text{C}$, utilizando nitrógeno como gas auxiliar a 60 mL min^{-1} . La adquisición, evaluación y cálculo de las áreas de pico cromatográficas se realizaron con el software ChemStation (versión A0903).

3.1.3. Capítulo 3: Evaluación de cambios metabolómicos en arándanos sometidos a distintos tratamientos postcosecha.

Los ensayos de vida útil se llevaron a cabo en el laboratorio agroalimentario de ADESVA, dentro del Departamento de Tecnología de los Alimentos y Postcosecha. Estas instalaciones están ubicadas en el módulo de laboratorios piloto del edificio CIDERTA, en el Parque Huelva Empresarial La Alquería (Avd. Jamón de Huelva s/n, 21007 Huelva). El laboratorio cuenta con diversos equipos especializados, entre ellos cámaras de frigoconservación de 11 m³ con una humedad relativa del 70-75%, sin posibilidad de modificación, tecnologías seleccionadas y humidificadores para incrementar la humedad en su interior.

Para determinar la calidad del producto almacenado, se analizaron la pérdida de peso, la firmeza mediante un penetrómetro manual, el contenido de sólidos solubles en el jugo de arándano con un refractómetro digital y expresado en °Brix, el pH con papel tornasol, así como parámetros restrictivos como contenido de pruina, deshidratación, frutos podridos y moretones evaluados visualmente.

Los arándanos altos (*Vaccinium corymbosum* L.), variedad "Venture", fueron recolectados manualmente en su punto de madurez comercial, identificado por el color azul de la superficie del fruto. La cosecha fue realizada por una cooperativa privada en el sur de España, en la ubicación GPS 37° 16' 28.704" N y 6° 50' W (Huelva, España). El estudio se llevó a cabo entre febrero y junio de 2020. Para el almacenamiento, los frutos se distribuyeron en setenta tarrinas de 125 g, asignadas al grupo control con 21 tarrinas, primera campaña experimental con 21 tarrinas, segunda campaña experimental con 21 tarrinas y 7 tarrinas destinadas a estudios metabolómicos posteriores. El muestreo se realizó en siete puntos a lo largo del periodo de almacenamiento, con tres réplicas por punto de muestreo en los días 0, 7, 14 y 21 de vida útil.

Las muestras se almacenaron en cámaras de refrigeración a una temperatura de 4°C ± 2°C y una humedad relativa del 85% ± 5%, basándose en datos recopilados en estudios anteriores expuestos en la biografía (281).

Posteriormente, se aplicaron los tratamientos postcosecha seleccionados, mientras que las muestras de control se conservaron en las mismas condiciones sin ningún tratamiento adicional. En el estudio se compararon dos tecnologías postcosecha con un tratamiento control, que consistió en almacenamiento en frío sin aplicación de tecnología adicional. Basándose en estudios previos, las cámaras se programaron a temperaturas de 2°C, 0°C y 9°C.

El estudio se estructuró en dos ensayos. En el ensayo 1, realizado de febrero a abril, se compararon muestras de control con muestras sometidas a los tratamientos postcosecha PEF y EAS. En el ensayo 2, llevado a cabo de mayo a junio, se compararon muestras de control con muestras tratadas con CAP y MAP. Los análisis metabolómicos se realizaron en los laboratorios del Departamento de Análisis Medioambiental y Bioanálisis de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Huelva. Se evaluaron muestras de los días 0 y 21 de vida útil. Tras la evaluación, las muestras fueron criohomogeneizadas con nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C para análisis posterior. Para el análisis metabolómico, se utilizó espectrometría de masas con trampa de iones modelo ITQ900 acoplado a un Trace GC ULTRA, un UHPLC modelo Agilent 1290 Infinity con un iFunnel QTOF6550, así como una columna VF-5 MS Factor Four para el análisis GC-MS y una columna ACQUITY UPLC HSS T3 para el UHPLC. Además, se empleó un concentrador Speedvac para el secado de extractos metabólicos.

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Se empleó agua ultrapura con una resistividad superior a 18,2 MΩ·cm⁻¹, obtenida del sistema Millipore Milli-Q. Los reactivos empleados incluyeron clorhidrato de O-metilhidroxilamina, N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) + 1% trimetilclorosilano (TCMS), estándares internos como Ribitol y ácido palmítico d31 de Sigma-Aldrich, anhídrido de piridina de Merck KGaA, así como metanol y acetonitrilo de Fisher Scientific. Este diseño experimental permitió evaluar la efectividad de los tratamientos postcosecha en la conservación de los arándanos, así como analizar los cambios metabólicos asociados a su almacenamiento.

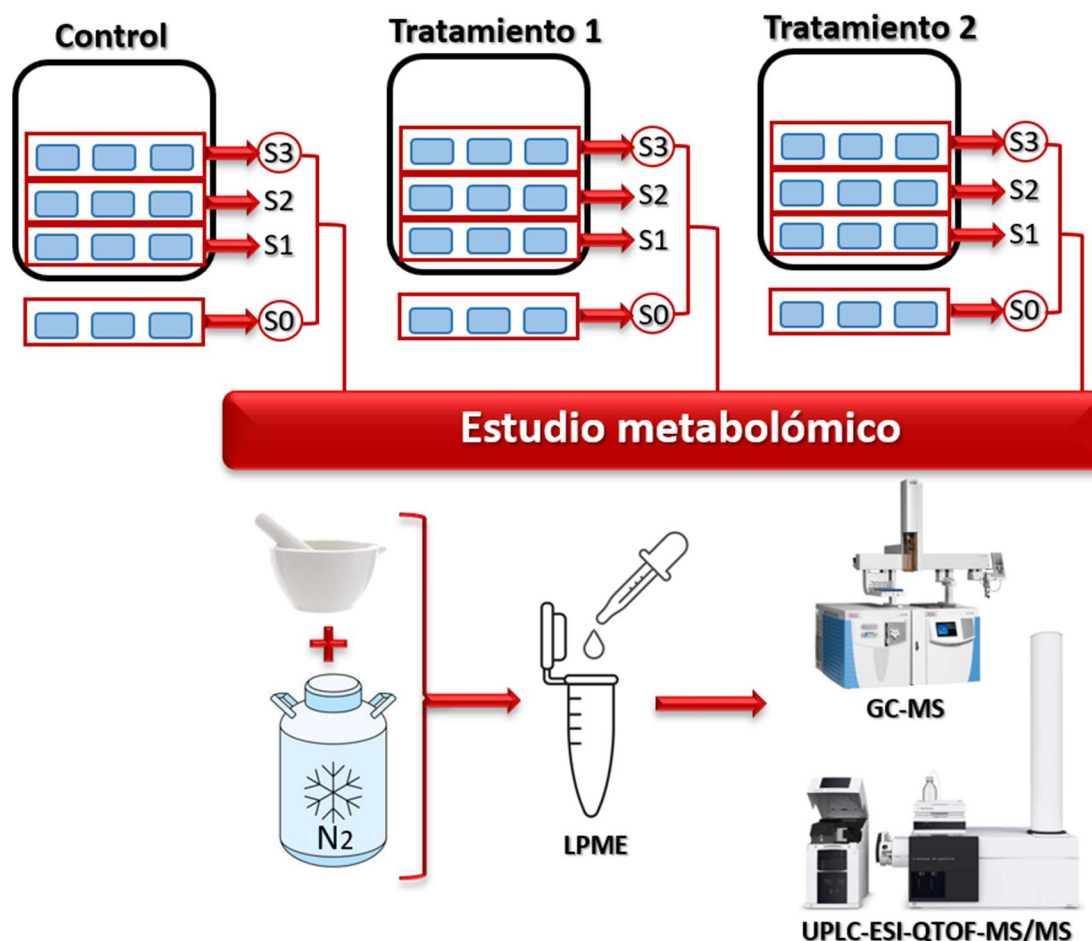


Figura 3.5. Diseño experimental del estudio de los cambios en el perfil metabólico de los arándanos como consecuencia de los tratamientos postcosecha. (Fuente: Elaboración propia)

3.2. Procedimientos experimentales.

3.2.1. Capítulo 1: Parámetros y condiciones optimizadas para la extracción de PCBs en leche materna.

Para la optimización analítica del método, la fase de muestra estuvo compuesta por 350 µL de leche materna humana diluida hasta un volumen final de 7 mL con agua ultrapura (18,2 MΩ cm).

En primer lugar, se realizó un cribado preliminar mediante una optimización univariante para estudiar la influencia de las diferentes variables de extracción, así como el rango de valores a optimizar. Las variables estudiadas fueron: solvente de extracción, temperatura, velocidad de agitación, fuerza iónica, pH, longitud de fibra y tiempo de extracción. En la Figura 3.6 se muestran las variables más significativas estudiadas.



Figura 3.6. Factores optimizados en el método de extracción de PCBs mediante HF-LPME. (Fuente: Elaboración propia)

Para ello, se modificaron de forma individual las distintas variables, manteniendo constantes las siguientes condiciones: temperatura a 25 °C, tiempo de extracción de 5 minutos, longitud de la fibra hueca de 4 cm, tiempo de inmersión de 1 minuto, pH sin ajustar y un volumen de muestra de 350 µL. Los factores identificados como relevantes fueron consistentes con los reportados en la mayoría de los estudios previos sobre la extracción HF-LPME de compuestos orgánicos (317,318). Los cambios en las áreas de los picos de los PCBs se representaron gráficamente en función de la variación de cada factor analizado, lo que permitió determinar los rangos adecuados para su posterior optimización multivariante.

Disolvente de la fase aceptora.

Al seleccionar el disolvente para la fase extractante en el procedimiento HF-LPME, es fundamental considerar varios aspectos (319):

- Debe ser compatible con el material de la fibra (polipropileno).
- Debe ser inmiscible con agua para garantizar la formación de dos fases necesarias para la extracción.
- Su viscosidad debe permitir tanto el llenado adecuado de los poros de la membrana como la difusión eficiente de los analitos.
- Debe tener baja volatilidad para evitar pérdidas durante el proceso de extracción.

Con base en estos criterios, se evaluaron tres disolventes orgánicos: 1-octanol, tolueno y n-hexano, y se comprobó su impacto en los factores de enriquecimiento.

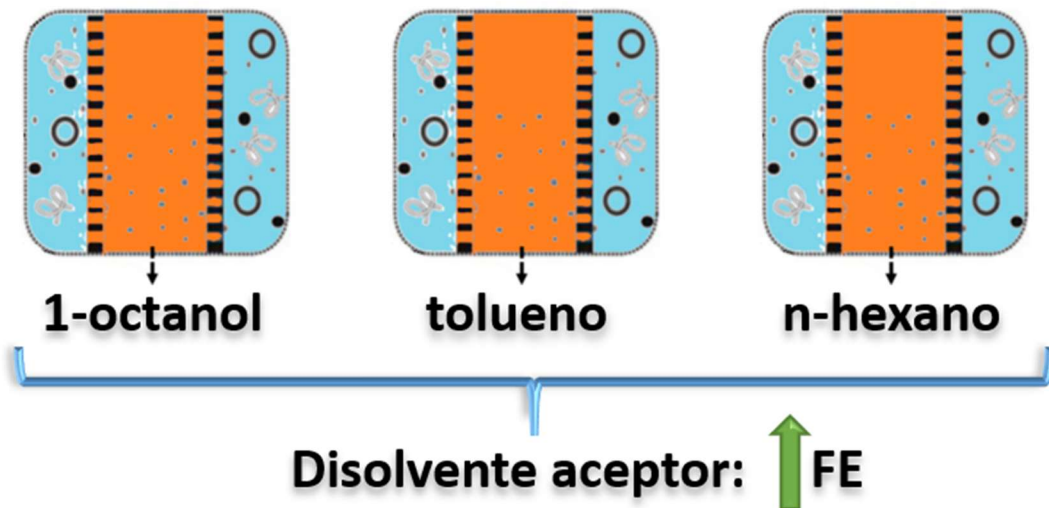


Figura 3.7. Optimización del disolvente de la fase aceptor. (Fuente: Elaboración propia)

Fuerza iónica.

La fuerza iónica puede influir en los coeficientes de reparto de los analitos cuando están en contacto dos fases inmiscibles, ya que aumenta la polaridad del medio acuoso, lo que impacta directamente en la eficiencia de la extracción. Incrementar la fuerza iónica mediante la adición de sal podría potencialmente mejorar los factores de enriquecimiento de los analitos en el disolvente orgánico (317,320–324). Para evaluar este efecto, se probaron diferentes concentraciones de cloruro de sodio hasta un 10% (p/v).

Velocidad de agitación.

La agitación aumenta el contacto entre las dos fases inmiscibles (fase de muestra y fase extractante), lo que facilita el movimiento de los analitos desde la fase de muestra hacia la fase extractante. Al favorecer una mayor interacción entre las fases, acelera el proceso. Además, ayuda a mantener una distribución uniforme de los analitos en la muestra, evitando la formación de gradientes de concentración.

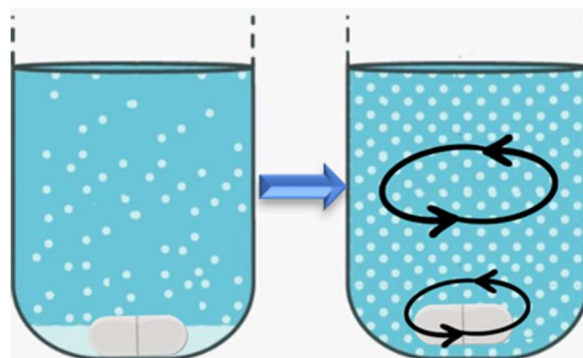


Figura 3.8. Efecto de la agitación en la muestra. (Fuente: Elaboración propia)

Sin embargo, una agitación demasiado vigorosa puede generar burbujas de aire que dificultan la extracción uniforme o, en caso de la técnica HF-LPME, dañar la membrana. Por lo tanto, es importante optimizar la velocidad de agitación para encontrar un equilibrio entre la mejora de la eficiencia de extracción y la estabilidad del sistema. Para ello, el efecto de la velocidad de agitación se estudió hasta 1200 rpm, con la ayuda de un agitador magnético.

Efecto del pH.

La modificación del pH en la extracción puede tener un impacto significativo dependiendo de la naturaleza química de los analitos y el tipo de extracción, ya que puede cambiar el estado de ionización de los analitos. Sin embargo, se debe tener en cuenta que un pH inadecuado puede degradar ciertos analitos sensibles, además de afectar la estabilidad del solvente extractante o su capacidad para llenar los poros de la fibra.

El efecto del pH en la extracción de PCBs por HF-LPME se optimizó en el rango de 4-12 y se comprobó con los factores de enriquecimiento correspondientes. Las condiciones ácidas se lograron agregando HCl 6 M y las condiciones básicas con hidróxido de sodio 1 M.

Temperatura, tiempo y longitud de fibra.

Se creó un RCCD (320) de segundo orden para la optimización de las variables teniendo en cuenta las interacciones entre ellas. Para este fin, los datos fueron procesados con el Software Estadístico MINITAB® Release 16 (State College, EE.UU.). La respuesta combinada también fue optimizada utilizando algunos programas caseros escritos en QUICKBASIC. Esto se empleó para optimizar las tres variables más importantes: temperatura (T), tiempo (tm) y longitud de membrana (L). El número de experimentos del diseño factorial completo se puede calcular por 2^k , donde k es el número de variables. Estos ocho experimentos se pueden aumentar con 2k puntos estrella, que son los vértices de un politopo cruzado en los ejes de coordenadas del diseño. Finalmente, se incluyen C puntos centrales como réplicas. Por lo tanto, para tres variables a optimizar, el CCD consta de 17 experimentos (2^k+2k+C). Las variables a optimizar tienen cinco niveles codificados ($-\alpha, -1, 0, 1, \alpha$), donde $\alpha = 2^{k/4}$ (~ 1.68), el brazo estrella (distancia) desde el centro a un punto estrella. El $-\alpha$ (mínimo) y $+\alpha$ (máximo) definen el rango de parámetros a optimizar. Para evitar errores sistemáticos, los ensayos fueron aleatorios. La Tabla X1 recoge los ensayos incluidos en el RCCD mostrando los niveles reales y codificados.

Run	Time, min (X1)		Temperature, °C (X2)		Length, cm (X3)	
	Coded Level	Real level	Coded Level	Real level	Coded Level	Real level
1	-1	20	-1	35	-1	4
2	1	40	-1	35	-1	4
3	-1	20	1	45	-1	4
4	1	40	1	45	-1	4
5	-1	20	-1	35	1	6
6	1	40	-1	35	1	6
7	-1	20	1	45	1	6
8	1	40	1	45	1	6
9	0	30	0	40	0	5
10	0	30	0	40	0	5
11	-1.68	13.2	0	40	0	5
12	1.68	46.8	0	40	0	5
13	0	30	-1.68	31.6	0	5
14	0	30	1.68	48.4	0	5
15	0	30	0	40	-1.68	3.32
16	0	30	0	40	1.68	6.68
17	0	30	0	40	0	5

Tabla 3.1. Experimentos de diseño compuesto central (RCCD) con niveles codificados y reales para la optimización de los parámetros de extracción Tiempo, Temperatura y Longitud. (Fuente: Elaboración propia)

Validación del método

A pesar de que la leche materna humana es una matriz de muestra muy compleja, el método propuesto es muy simple porque no incluye un paso de preparación de la muestra, lo que se debe principalmente a la excelente capacidad de limpieza de la técnica HF-LPME. De hecho, este procedimiento implica solo una dilución inicial de la muestra en agua ultrapura, seguida de HF-LPME de dos fases. Para este fin, las recuperaciones de extracción (ER) se calcularon utilizando la fase de muestra fortificada a tres concentraciones diferentes ($100 \mu\text{g L}^{-1}$ de PCB1 y PCB5, $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de PCB187 y $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de otros PCB).

Para la evaluación de la precisión del método, la reproducibilidad (interdía) y la repetibilidad (intradía) se calcularon utilizando la misma fase de muestra enriquecida que para las recuperaciones de extracción. Se analizaron cinco réplicas en el mismo día para la repetibilidad y cinco análisis replicados durante 3 días diferentes para la reproducibilidad.

3.2.2. Capítulo 2: Implementación de HF-LPME trifásica para la caracterización de metabolitos en leche materna.

3.2.2.1. Primera fase: Desarrollo del método HF-LPME en disposición U.

Para el diseño del nuevo método HF-LPME, se tomó como referencia el diseño del capítulo 1. Antes de diseñar el método, se estudió la configuración trifásica de la extracción. Dado que HF-LPME es la miniaturización de LLE, inicialmente planeamos reproducir la extracción usando MeOH mezclado con MTBE como fase aceptora. La razón es que el método LLE exitoso informado previamente se basa en una mezcla de MeOH, para metabolitos polares, MTBE, para metabolitos lipofílicos y luego, la muestra de HM diluida se mezcla para una extracción monofásica seguida de la precipitación posterior de proteínas por centrifugación (259). Sin embargo, la extracción de metabolitos de HM por HFLPME usando MeOH/MTBE en la fase aceptora no es posible porque las dos fases (aceptora y donadora) están mezcladas, lo que impide el funcionamiento adecuado de la membrana. Por lo tanto, el HF-LPME para metabolitos de HM se configuró en el modo trifásico usando un disolvente inmovilizado en los poros de HF, proporcionando así un SLM. La fase aceptora supondría otro disolvente diferente, llenando su lumen y la muestra de HM diluida como fase donadora. El paso de centrifugación utilizado después del LLE tradicional no fue necesario en el UA-HF-LPME trifásico, ya que, a diferencia de las moléculas pequeñas como los metabolitos, las proteínas y otras moléculas interferentes (por ejemplo, componentes grasos) no pueden atravesar los poros de la membrana.

Para el diseño del nuevo método HF-LPME, se tomó como referencia el diseño del capítulo 1. Por tanto, se mantuvo la disposición en U para la fibra y la longitud de fibra en 6 cm, y se fijaron los valores de temperatura en 25°C (para evitar la desnaturalización o modificaciones en la muestra) y velocidad de agitación en 600 rpm (para evitar la formación de burbujas y posible rotura de la fibra).

La optimización de las variables que afectan a los metabolitos HM por el UA-HF-LPME trifásico se llevó a cabo teniendo en cuenta el número de metabolitos identificados posteriormente por GC-MS en los extractos como objetivo principal. Posteriormente, se comparó el número de familias de compuestos a las que pertenecen estos metabolitos y las

áreas de pico de los metabolitos con el método LLE. Por lo tanto, se consideraron varias variables, a saber: fase aceptora, SLM, factor de dilución de HM, tiempo de extracción, fuerza iónica y pH de la muestra. Estas variables se optimizaron cambiando un parámetro a la vez mientras se utilizaban condiciones estándar para los demás.

Disolvente para la creación de la membrana (SLM)

El SLM debe ser compatible con la fibra para formar una película de membrana orgánica muy delgada relleno completamente los poros en la pared de la fibra. Además, el SLM debe ser inmiscible con la fase donante acuosa y con la fase orgánica aceptora.

La elección del disolvente orgánico se basó en estudios previos del grupo de investigación con leche materna humana. En estas investigaciones, se evaluaron disolventes como tolueno, hexano y n-octanol. Finalmente, se seleccionó n-dodecano como SLM, ya que el uso de una mezcla de MeOH/n-dodecano ha sido reportado previamente por su efectividad en la extracción de ácidos grasos (325,326). Además, estudios anteriores (327) respaldaron su superioridad en comparación con los otros disolventes evaluados.

Disolvente de la fase aceptora.

Uno de los factores clave que influyen en la HF-LPME es la elección del disolvente extractante, es decir, la fase aceptora. Para lograr una extracción eficiente de los analitos de interés, esta fase debe cumplir ciertos criterios. En primer lugar, debe presentar una alta afinidad por los analitos, permitiendo su disolución y transferencia desde la muestra. Además, es fundamental que sea inmiscible con el disolvente utilizado en la membrana para evitar pérdidas de la fase aceptora durante el proceso de extracción. Por último, debe ser compatible con la técnica analítica empleada en el estudio. Además, estudios previos informaron el uso de diferentes fasesceptoras como MeOH o acetonitrilo (MeCN) para desproteínizar y extraer metabolitos (315,328).

Teniendo en cuenta estas consideraciones, primero se seleccionó MeOH, ya que se utiliza en el método LLE tradicional, pero también se ensayó MeCN.

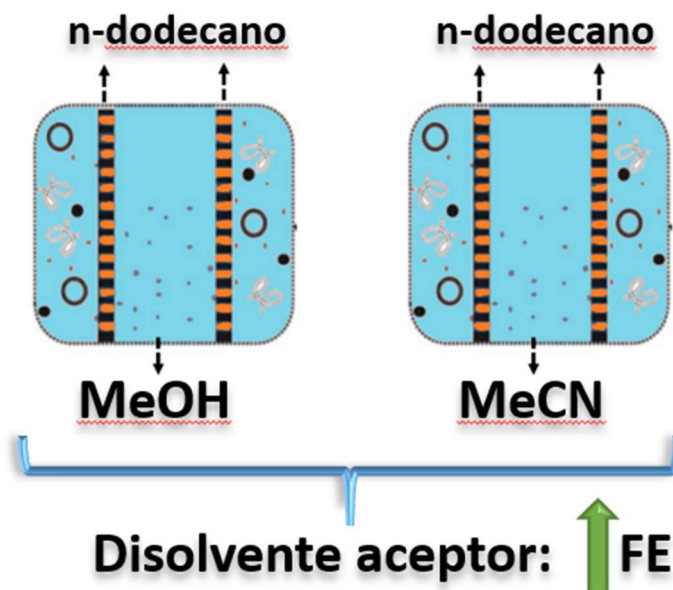


Figura 3.9. Optimización del disolvente empleado como fase aceptora. (Fuente: Elaboración propia)

Fuerza impulsora: velocidad de agitación.

Para acelerar la extracción, generalmente se selecciona la agitación como fuerza impulsora, como en la mayoría de los métodos HF-LPME (329,330), favoreciendo el proceso de transferencia de los analitos a la fase aceptora, reduciendo el tiempo de extracción. Basándose en los resultados obtenidos en el estudio previo (Capítulo 1), se fijó la velocidad de agitación en 600 rpm.

Fuerza iónica y ajuste de pH.

Se aplicaron protocolos no selectivos a la UA-HF-LPME trifásica con el propósito de maximizar la capacidad de detectar el mayor número de metabolitos y compararlos con las técnicas de extracción reportadas utilizadas hasta ahora en metabolómica, en las que no existe información previa sobre los metabolitos objetivo que se pueden extraer con un enfoque de análisis no dirigido. Por lo tanto, se decidió no ajustar el pH y la fuerza iónica de la muestra en los experimentos futuros, como en el LLE tradicional aplicado a la metabolómica no dirigida, a menos que se observara una cierta baja cobertura de metabolitos en la aplicación final del procedimiento. Sin embargo, este hecho no sucedió.

Factor de dilución de la muestra.

La composición en HBM difiere en términos de estructura química y concentración de metabolitos, lo que requiere a menudo la dilución de la muestra y el enriquecimiento antes del análisis. Por lo tanto, el factor de dilución es un parámetro importante en el proceso de extracción. Inicialmente, utilizamos el mismo factor de dilución (~8 veces) que se informó anteriormente con el método LLE (259). Los resultados obtenidos demostraron buenos factores de enriquecimiento y una amplia cobertura de metabolitos detectados con un bajo consumo de muestra, que se explican en las siguientes secciones. Por lo tanto, se decidió llevar a cabo los experimentos en estas condiciones.

Tiempo de extracción.

Se realizaron ensayos interrumpiendo el proceso de extracción a 15, 30, 45, 60 y 75 min para determinar cuál de ellos proporcionaba mejores resultados en base a los picos cromatográficos proporcionados.

3.2.2.2. Segunda fase: Adaptación del método cambiando la disposición a barra de disolvente (SBME).

El método desarrollado presentó un enfoque innovador, altamente sensible, reproducible, económico, rápido y de fácil aplicación. Su implementación simplificó procesos complejos en estudios metabólicos, como la precipitación de proteínas, haciéndola innecesaria. Además, permitió una extracción eficiente y una alta preconcentración de los metabolitos que tradicionalmente se obtienen mediante la extracción líquido-líquido (LLE), junto con la detección de nuevos metabolitos, utilizando un volumen mínimo de disolventes.

La técnica HF-LPME ofrece múltiples ventajas en comparación con la extracción LLE, previamente discutidas, y representa un avance significativo en el campo de la metabolómica, ya que su metodología puede adaptarse a diferentes tipos de muestras biológicas.

Sin embargo, uno de los principales desafíos del método inicial era el tiempo de extracción, que resultaba más prolongado (45 minutos) en comparación con la extracción LLE convencional. Para optimizar este aspecto, se miniaturizó el procedimiento mediante una nueva configuración de la fibra en modo barra de disolvente (SBME), lo que permitió reducir aún más el volumen de muestra requerido.

Para lograr esta mejora, se sustituyó la fibra original por otra con la misma porosidad, pero con un diámetro diferente, asegurando el uso del mismo volumen de disolvente aceptor. Asimismo, se recalculó la cantidad de muestra necesaria para mantener el mismo factor de dilución, posibilitando el análisis con volúmenes de muestra significativamente menores que los requeridos en el método LLE convencional.

Dado que en la fase inicial del desarrollo ya se habían optimizado factores como el disolvente aceptor, el disolvente de membrana, la fuerza iónica y el ajuste de pH, las optimizaciones del nuevo diseño se centraron en la fuerza motriz, la longitud de la fibra y el tiempo de extracción, con el objetivo de mejorar la eficiencia y reducir la duración del proceso.

Fuerza motriz: baño US.

Para agilizar el proceso de extracción, se eligió la agitación como fuerza impulsora. No obstante, debido a la necesidad de emplear un volumen mínimo de muestra, se descartó el uso de agitación magnética, ya que no resultaba compatible con el modelo miniaturizado. Esto se debía a que la fibra hueca no quedaba completamente sumergida en la solución donante, y el agitador no giraba de manera eficiente en un volumen tan reducido de fase donante, lo que comprometía la repetibilidad del HF-LPME trifásico.

Como alternativa, se optó por el uso de un baño de ultrasonidos para acelerar el proceso de extracción mediante HF-LPME.

Tiempo de extracción.

Se evaluó la eficiencia de extracción a los 5, 10 y 15 minutos bajo las mismas condiciones experimentales. Además, para asegurar que el nuevo método no se viera afectado por la elección del disolvente aceptor, se realizó una optimización adicional, analizando estos tiempos de extracción tanto en metanol (MeOH) como en acetonitrilo (MeCN).

Longitud de fibra.

La extracción se llevó a cabo con diferentes longitudes de fibra de 1 a 4 cm, para los tres tiempos de extracción estudiados. De este modo, se realizaron los experimentos con las distintas longitudes a 5 min, 10 min y 15 min.

Validación del método trifásico UA-HF-LPME/GC-MS mediante metabolómica dirigida

Para evaluar la confiabilidad práctica del método de extracción, se determinaron las figuras de mérito, a saber: linealidad, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), repetibilidad (intradía), reproducibilidad (interdía), factor de enriquecimiento (Ee) y recuperación.

Para la validación del método, se utilizaron cinco muestras, cada una compuesta por 175 μL de HM adicionadas con los estándares comerciales a diferentes concentraciones (10 mgL^{-1} de ácido láctico y glutámico; 25 mgL^{-1} de glucosa; 50 mgL^{-1} de urea; 100 mgL^{-1} de glicerol; 5 mgL^{-1} de ácido cítrico y serina; 2,5 mgL^{-1} de prolina) en quintuplicado ($n = 5$) hasta un volumen final de 1,4 mL con agua ultrapura (18,2 M Ω cm).

La linealidad se obtuvo trazando curvas de calibración del área relativa (área del pico del analito/área del pico del estándar interno) frente a la concentración de cada analito. Las curvas analíticas se construyeron en seis niveles por triplicado, en los siguientes rangos de concentración: 2–25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ácidos láctico y cítrico; 30–260 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para urea; 60–500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para glicerol; 0,5–7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para prolina; 6–60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ácido glutámico; 15–150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para glucosa y 1,5–15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para serina.

Los LOD y LOQ se calcularon como $a+3S_{y/x}$ y $a+10S_{y/x}$, respectivamente, donde “a” es la ordenada del origen y “ $S_{y/x}$ ” los errores aleatorios en los valores de la pendiente y la intersección (331). Las concentraciones de elementos por debajo del LOQ se excluyeron del análisis estadístico.

La repetibilidad y reproducibilidad se evaluaron con el análisis de muestras ($n = 5$) en el mismo día y en días diferentes. Además, el factor de enriquecimiento (Ee) de la extracción se midió con la relación ($Ee = C_{a,f}/C_{d,i}$) donde $C_{a,f}$ es la concentración final de cada estándar en la fase aceptora y $C_{d,i}$ es la concentración inicial de cada estándar en la solución de muestra.

La estabilidad instrumental se determinó mediante inyecciones múltiples por quintuplicado de una muestra de control de calidad. Además, estas muestras de control de calidad se inyectaron al principio, a la mitad y al final de cada ejecución.

3.2.3. Capítulo 3: Análisis del perfil metabolómico de arándanos tratados con diferentes tecnologías postcosecha.

En el día inicial, se tomaron tres réplicas de la salida inicial para cada uno de los tres tratamientos (S0). Posteriormente, las muestras restantes fueron sometidas a sus respectivos tratamientos. Cada siete días, se realizaron muestreos con tres réplicas por tratamiento. El tercer muestreo (S3) de cada tratamiento se destinó a estudios metabólicos.

Durante la vida útil, se midieron parámetros fisicoquímicos para evaluar los cambios bajo los diferentes tratamientos postcosecha. La firmeza (g mm^{-1}), el contenido de sólidos solubles ($^{\circ}\text{Brix}$) y el pH se determinaron utilizando la instrumentación previamente descrita. La pérdida de peso se calculó restando el peso final al peso inicial, dividiendo la diferencia entre el peso inicial y multiplicando el resultado por 100. Otros parámetros se evaluaron mediante escalas visuales y se expresaron en número de frutos. La deshidratación se clasificó en leve (1-2) o severa (3-4), según la Figura 3.10-A. La apariencia interna se evaluó según la Figura 3.10-B. La presencia de pruina se determinó en función de su ausencia en la superficie del fruto, junto con la evaluación de magulladuras y frutos podridos.

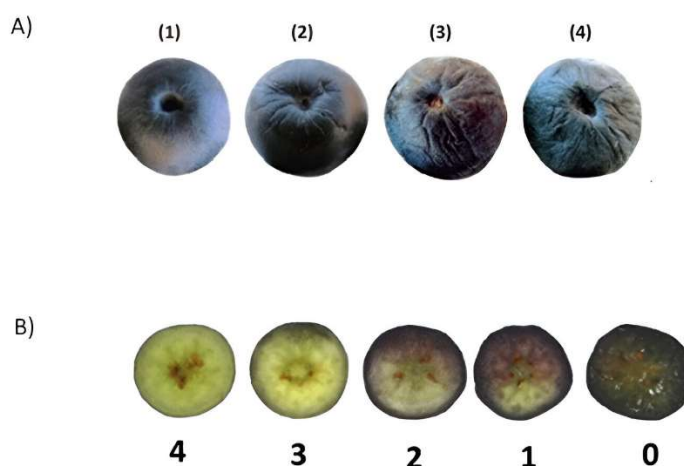


Figura 3.10. Escala visual empleada en la valoración de la deshidratación y apariencia interna de los frutos durante el estudio de vida útil. (Fuente: Elaboración propia)

Las muestras se criohomogeneizaron y se combinaron 30 mg del material homogeneizado con 300 μL de metanol preenfriado. La mezcla se homogeneizó con un mezclador de pellets y perlas de vidrio durante dos minutos y luego se centrifugó a 4°C y 4000 g durante diez minutos. Se tomó una alícuota de 50 μL del sobrenadante, la cual se fortificó a una concentración final de 10 mg L^{-1} de ribitol como estándar interno y se secó en un dispositivo de vacío rápido.

La derivatización química se realizó utilizando metoxiamina en piridina y sililación con BSTFA, siguiendo el método descrito en la literatura (315) con pocas modificaciones (316). Posteriormente, se transfirió 1 μL de los extractos a viales cromatográficos con un inserto para su análisis.

El análisis cromatográfico por GC-MS se realizó siguiendo un modelo previamente publicado (332). Para la separación de metabolitos, se utilizó helio como gas portador a un caudal de 1 ml min^{-1} , con una temperatura de inyector de 280°C . La temperatura de la columna se programó en cinco etapas: inicialmente 100°C durante dos minutos, luego un aumento a 200°C

a 5 °C/min, mantenimiento por tres minutos, incremento a 300 °C a 10 °C/min y mantenimiento por cinco minutos. La espectrometría de masas se llevó a cabo con un voltaje de ionización de 70 eV y una temperatura de fuente de iones de 200 °C, adquiriendo espectros de barrido completo en el rango de m/z 35-650. Los datos obtenidos se procesaron siguiendo el procedimiento descrito por Katajamaa y Oresic (333). Posteriormente, se extrajeron datos utilizando el método de filtro combinado, dividiendo la información en cromatogramas iónicos extraídos (XIC) y filtrando cada segmento con la segunda derivada gaussiana como modelo de forma de pico. Los parámetros de XCMS se optimizaron para maximizar la extracción de información. Se aplicaron aproximaciones como una relación señal-ruido (S/N) de umbral 2, un ancho de pico medio (FWHM) de 3, y un intervalo de 3 m/z con un paso de 0,1.

Después de la extracción de picos, se realizaron correcciones de agrupamiento y tiempo de retención en tres ciclos repetidos. Se ajustó el ancho de banda (BW) de 5 a 1 segundo, y las áreas de pico faltantes por debajo del umbral S/N se abordaron con un algoritmo de relleno de picos. La normalización se realizó mediante el diagrama de dispersión LOESS. Finalmente, los datos preprocesados se exportaron en formato .csv para su análisis multivariado.

Para el análisis UPLC-QTOF-MS, se añadieron 300 μ L de metanol preenfriado a 30 mg de muestra criohomogeneizada. La muestra se homogeneizó con perlas de vidrio en un disruptor durante un minuto, luego se almacenó a -80°C durante 30 minutos en oscuridad. Posteriormente, se centrifugó a 4°C y 4000 g durante diez minutos y se recolectó una alícuota de 50 μ L del sobrenadante. Se añadió ácido palmítico d31 como estándar interno a una concentración final de 50 μ g L⁻¹. Luego, 10 μ L de los extractos se transfirieron a viales cromatográficos para el análisis.

Los metabolitos se separaron a un caudal de 0,3 ml min⁻¹ utilizando ácido fórmico al 0,05% en agua como fase móvil A y ácido fórmico al 0,05% en acetonitrilo como fase móvil B, siguiendo un método previamente publicado (334). El gradiente consistió en un 5% de fase móvil B en el primer minuto, un aumento al 95% en 12 minutos, mantenimiento hasta los 13,5 minutos, y retorno a condiciones iniciales con un equilibrio de cinco minutos en 5% de B. La temperatura de la columna se mantuvo a 40°C y la del gestor de muestras a 4°C.

Durante el análisis, se usaron dos masas de referencia para corrección en ambos modos de polaridad: m/z 121,0509 y 922,0098 (ESI+) y m/z 112,9856 y 1033,9881 (ESI-). Para el QTOF-MS, los voltajes capilares se establecieron en 4000 V para ESI- y 3500 V para ESI+, con una velocidad de barrido de 1,02 por segundo. Se utilizó el modo de barrido completo en un rango de masas de 100–1200 m/z y análisis MS/MS en el rango de 40–1000 m/z . El voltaje del fragmentador fue de 175 V para ESI+ y 250 V para ESI-. Se empleó nitrógeno como gas de colisión y energías de colisión (CE) de 10 y 40 eV para todos los iones, garantizando patrones de fragmentación comparables.

3.3. Análisis estadístico de los resultados.

3.3.1. Capítulo 1: Evaluación de la sensibilidad y precisión del método para detección de PCBs.

Tras la optimización de los parámetros de extracción, se realizó un análisis de regresión para obtener modelos reducidos de ecuaciones polinómicas para calcular la respuesta de los analitos utilizando las variables estudiadas.

Model equation
PCB1 = 285,974–900493T ² –913135L ²
PCB5 = 917,345 + 607208L
PCB29 = 168,089–346052T -372945L ²
PCB47 = 165,103–521151T+577754T*L+412916L ²
PCB116 = 103,614 + 27027tm-186973T–65655L
PCB136 = 134,154–271583T+366794L–299454T*L
PCB187 = 557,634–185368L+148860T*L+77180L ²
Equation model: $y = B_0 + \sum B_{0i}X_i + \sum B_{ii}X_i^2 + \sum B_{ij}X_iX_j$
Response (peak area)
Variables: T (temperature), tm (extraction time), L (HF length)

Tabla 3.2. Modelos matemáticos de variables y respuestas. (Fuente: Elaboración propia)

Se realizó una prueba t de Student significativa para obtener los coeficientes de regresión b_k , $s(b_k)$. Un efecto se considera significativo cuando $t_k = |b_k|/s(b_k)$ es mayor que el $t_{\text{crítico}}$ tabulado, (ν , P), con ν grados de libertad ($\nu =$ número de corrida – número de coeficientes a calcular), a un nivel de confianza P del 95% (valor $p > 0,05$).

Para tener el compromiso de la mejor respuesta de cada analito de acuerdo con las variables utilizadas, se combinaron las respuestas de todos los analitos para una mejor optimización.

De esta manera, las operaciones analíticas se simplifican y se evitan posibles errores de redondeo y sin descuidar ningún término. La variable de respuesta, es decir, “Respuesta combinada”, es la suma ponderada de todas las respuestas utilizando la ecuación:

$$COMB = \sum_i \{k w_i \left| \frac{Y_i - G_i}{R_i} \right| \}$$

Donde w_i es el peso de la variable, que puede ser elegido por el usuario (generalmente la unidad), Y_i son las diferentes respuestas para la optimización y R_i su rango. Cuando el objetivo es la maximización de la respuesta combinada, entonces $G_i =$ mínimo en el rango ($Y_i - 1/2R_i$) y $K=1$. La optimización aleatoria de la superficie combinada (tm, L, T) se lleva a cabo utilizando un algoritmo casero y el óptimo simultáneo es el máximo de la superficie COMB. Varios estudios previos han utilizado este método de optimización con muy buenos resultados (317).

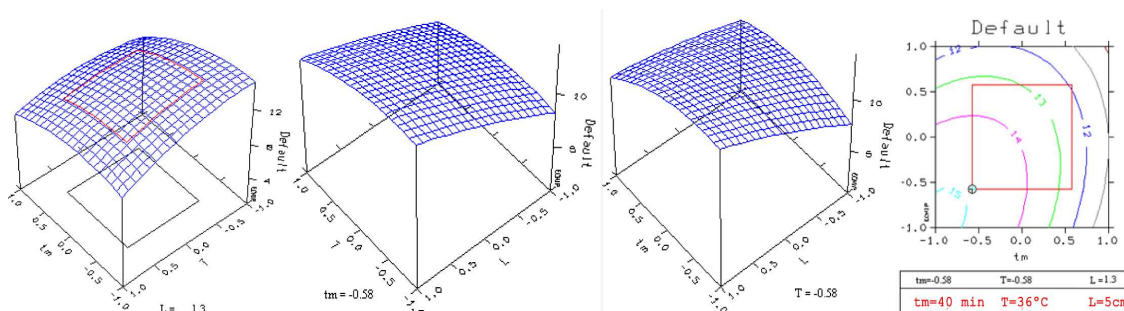


Figura 3.11. Gráfico de superficie combinada 3D obtenida en la optimización multivariante de tiempo, temperatura y longitud. (Fuente: Elaboración propia)

Para la validación del método, se calcularon las figuras de mérito del método HF-LPME GC- μ ECD optimizado para el análisis de PCBs como: coeficientes de determinación (R^2), rango lineal, límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), desviación estándar relativa (%RSD) y factores de enriquecimiento (EF). Los experimentos se realizaron utilizando una fase de muestra enriquecida (350 μ L de leche materna humana diluida con agua ultrapura hasta un volumen final de 7 mL).

	Ion m/z	Rec (%)	Repet RSD (%) ^a	Reprod RSD (%) ^b	EF	Rango (ng L ⁻¹)	R ²	LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ng L ⁻¹)
PCB 1	188.08	73	5	7	124	30-1400	0.96	10	33
PCB 5	222.07	70	7	10	168	30-1400	0.98	8	27
PCB 29	256.05	82	6	9	128	20-1400	0.98	7	23
PCB 47	291.97	117	6	8	128	20-1400	0.97	8	27
PCB 116	325.98	97	9	11	144	30-1400	0.98	9	29
PCB 136	359.96	80	7	10	118	30-1400	0.97	10	33
PCB 187	395.88	72	4	7	75	50-700	0.97	14	47

Tabla 3.3. Figuras de mérito del enfoque HF-LPME/GC- μ ECD para el análisis de PCB en la leche materna humana. (Fuente: Elaboración propia)

La linealidad se examinó mediante rectas de calibración de las áreas relativas obtenidas (relación de las áreas de pico de los analitos entre el área de pico del patrón interno) frente a la concentración de cada analito. Se obtuvieron curvas de calibración lineales para todos los analitos con muy buenos coeficientes de correlación ($R^2 > 0,96$), las cuales se muestran en la Figura 3.12.

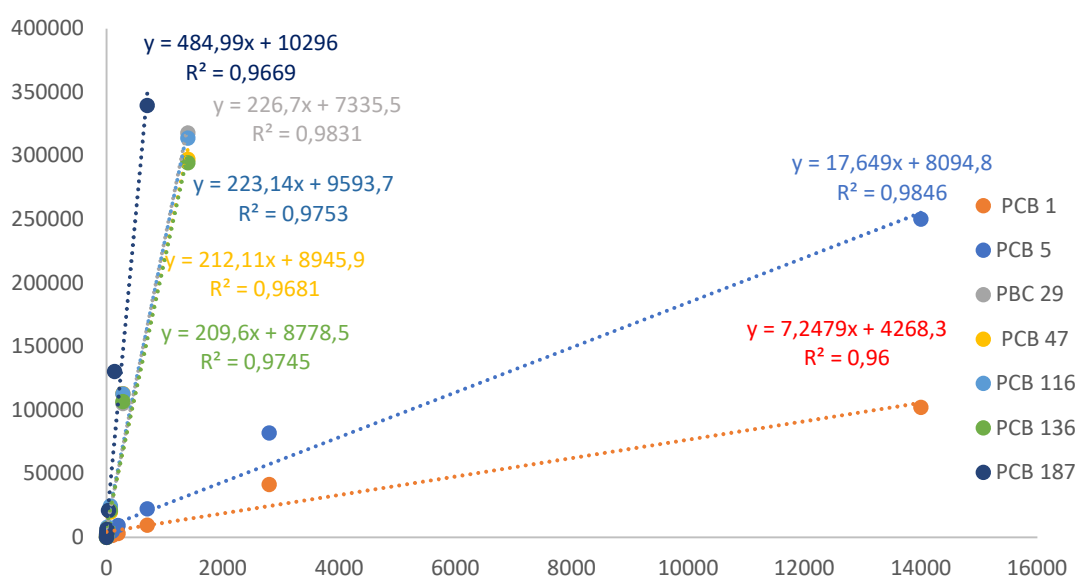


Figura 3.12. Rectas de calibrado de los PCBs de estudio. (Fuente: Elaboración propia)

Los límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ,) se calcularon con los datos generados en los estudios de linealidad como la concentración correspondiente a un área de pico 3 veces mayor que el ruido de fondo (LOD = 3S/N), y los límites de cuantificación como la concentración correspondiente a un área de pico 10 veces mayor que el ruido de fondo del cromatograma (LOQ = 10S/N).

En la tabla 3.4 se muestran los resultados obtenidos en el estudio de la validación del nuevo método.

PCB	Precursor ion m/z*	Recovery (%)	Repeatability RSD (%) ^a	Reproducibility RSD (%) ^b	EF	Range (ng L ⁻¹)	R ²	LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ng L ⁻¹)
PCB 1	188.08	73	5	7	124	30–1400	0.96	10	33
PCB 5	222.07	70	7	10	168	30–1400	0.98	8	27
PCB 29	256.05	82	6	9	128	20–1400	0.98	7	23
PCB 47	291.97	117	6	8	128	20–1400	0.97	8	27
PCB 116	325.98	97	9	11	144	30–1400	0.98	9	29
PCB 136	359.96	80	7	10	118	30–1400	0.97	10	33
PCB 187	395.88	72	4	7	75	50–700	0.97	14	47

^aPrecisión intra-día, calculada mediante la extracción de n = 5.
^bPrecisión inter-día, calculada mediante la extracción de n = 5.
*Los compuestos se identifican de manera inequívoca mediante GC-MS.

Tabla 3.4. Figuras de mérito de HF-LPME/GC-μECD para el análisis de PCBs en leche materna humana. (Fuente: Elaboración propia)

Los PCB estaban por debajo de los límites de detección en las muestras utilizadas para la validación del método. La linealidad estuvo en el rango de 0,02 a 140 μg L⁻¹ para PCB29 y PCB47, de 0,05 a 70 μg L⁻¹ para PCB187, y en el rango de 0,03 a 140 μg L⁻¹ para otros PCB determinados, y los coeficientes de determinación variaron de 0,96 a 0,98. Los valores de LOD variaron de 8 a 14 ng L⁻¹ con el método propuesto. Estos resultados son muy bajos en comparación con otros métodos publicados previamente en la literatura.

Bajo condiciones optimizadas de HF-LPME, los factores de enriquecimiento (EF), calculados como la relación entre la concentración de PCB en la fase extractante (C_a) y su concentración inicial en la fase de muestra (C_d) (320,335), fueron satisfactorios en el rango de 74 a 143 veces, lo que concuerda bien con otros trabajos publicados relacionados con el uso de HP-LPME para otras muestras de alimentos (317). Los resultados han confirmado que las características del método son muy buenas y la metodología se puede aplicar con éxito para el análisis de muestras.

Las recuperaciones obtenidas variaron de 70 a 109% en esos niveles enriquecidos, que concuerdan bien con otros métodos propuestos en la literatura (317,336,337).

Para la repetibilidad y reproducibilidad, los resultados fueron muy buenos con respecto a los métodos mencionados en la literatura, en los rangos 4-9% y 7-11% respectivamente.

	HF-LPME			SPME (182)		QuEChERS (183)	
	LOD (μgL^{-1})	LOQ (μgL^{-1})	% Rec.	LOD (μgL^{-1})	LOQ (μgL^{-1})	LOD (μgL^{-1})	% Rec.
C₁₂H₉Cl	0.010	0.913	100	-	-	-	-
C₁₂H₈Cl₂	0.008	0.5588	100	-	-	-	-
C₁₂H₇Cl₃	0.007	0.5868	100	1.65	5.00	0.2	101
C₁₂H₆Cl₄	0.008	0.8122	100	2.24	6.79	0.2	103
C₁₂H₅Cl₅	0.0086	0.7116	100	1.84	5.57	0.1	101
C₁₂H₄Cl₆	0.010	0.7231	100	1.14	3.47	0.1	99
C₁₂H₃Cl₇	0.014	0.8277	100	1.00	3.04	0.05	93

Tabla 3.5. Comparación de los resultados obtenidos en la validación del método con respecto a los registrados en la literatura. (Fuente: Elaboración propia)

3.3.2. Capítulo 2: Validación estadística de la metodología metabolómica en leche materna.

Los datos brutos de GC-MS se procesaron como se informó anteriormente (338). Se seleccionó el formato CDF para convertir los archivos utilizando la herramienta Thermo File Converter y, posteriormente, se importó la matriz de datos de GC-MS con áreas de pico normalizadas a SIMCA-P (versión 11.5, Umetrics).

Se utilizaron análisis de componentes principales (PCA) y análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) para obtener modelos predictivos para visualizar la información metabólica, así como para explorar las diferencias en el número de características extraídas utilizando diferentes tiempos de extracción (5, 10 y 15 min) por UA-HF-LPME trifásico frente a LLE.

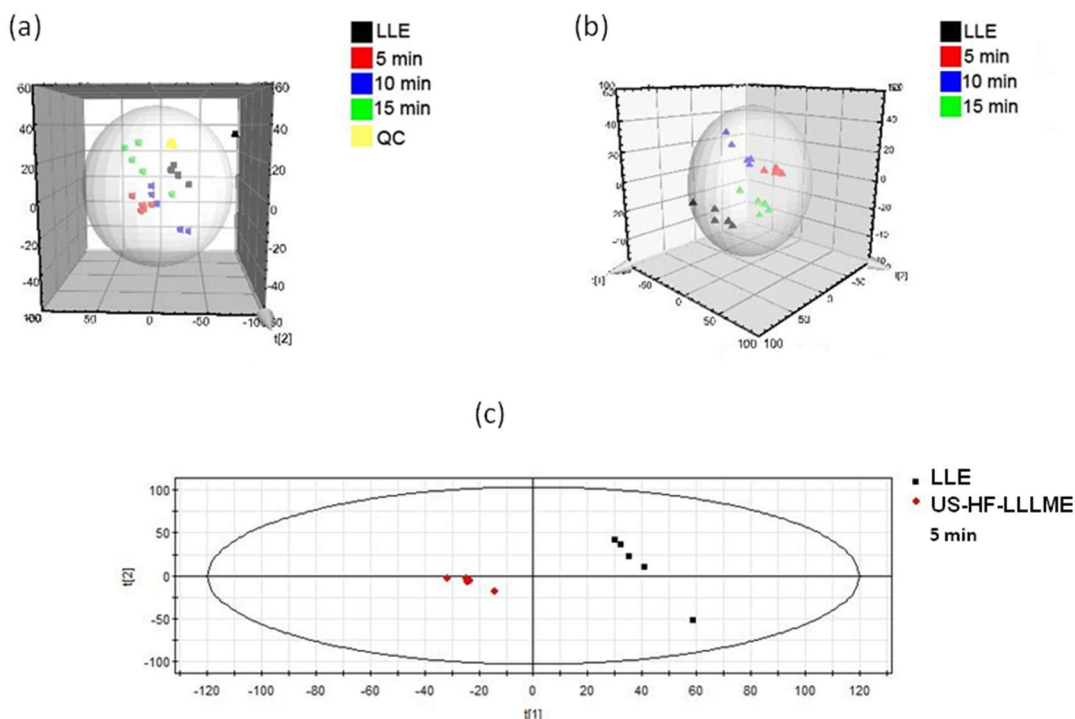


Figura 3.13. (a) 3D-PCA, (b) 3D-PLS de muestras de leche materna determinadas por GC-MS; LLE (triángulos negros), 5 min (triángulos rojos), 10 min (triángulos azules) y 15 min (triángulos verdes) por UA-HF-LLLME, y (c) 3D-PLS de muestras de leche materna extraídas por UA-HF-LLLME durante 5 min versus LLE.

Los gráficos de PCA mostraron una buena agrupación de QC (Figura 3.13-a). PLS-DA mostró una buena separación entre los diferentes métodos de extracción incluidos en este estudio y analizados por GC-MS (Figura 3.13-b).

Además, se calcularon los valores de Fold-Change para cada metabolito, con el fin de estimar la variación en su abundancia dentro de la comparación. La calidad del modelo se aseguró mediante los parámetros de separación de clases (R^2) y predictivos (Q^2). Se realizaron tres comparaciones por pares entre LLE versus UA-HF-LPME trifásico en tres tiempos diferentes (5, 10 y 15 min) para identificar los metabolitos responsables de la discriminación entre ambas técnicas analíticas. Los valores de R^2 y Q^2 confirmaron el poder de discriminación de los modelos. La eficiencia del método de extracción se evaluó mediante el número total de metabolitos extraídos y la intensidad total de las características extraídas.

	Parámetros	
	Q^2	R^2Y
LLE vs UA-HF-LLLME (5 min)	0.966	1
LLE vs UA-HF-LLLME (10 min)	0.977	1
LLE vs UA-HF-LLLME (15 min)	0.961	0.999

Tabla 3.6. Valores Q^2 y R^2 de PLS-DA comparando los grupos de estudios; UA-HF-LLLME (5, 10 y 15 minutos de tiempo de extracción) versus método LLE. (Fuente: Elaboración propia)

Las diferencias entre los tipos de extracción (trifásica-UA-HF-LPME vs LLE) se evaluaron para cada metabolito individual mediante ANOVA unidireccional y prueba de Tukey utilizando Statistica 8 (Statsoft, Tulsa, OK, EE. UU.) para encontrar comparaciones estadísticamente significativas e investigar la tendencia de las concentraciones de metabolitos. Luego, también se llevó a cabo el método Benjamini-Hochberg (corrección FDR) para ajustar los valores p.

La biblioteca de espectros de masas NIST (versión 08) se utilizó para la anotación de metabolitos. Aquellos metabolitos con puntajes de espectro > 80% e índice de retención concordante (usando la escala de n-alcanos) se utilizaron para la anotación de metabolitos. Los iones objetivo con mayores intensidades y masas se eligieron de cada espectro de masas de metabolito ya que se ven afectados por la matriz en menor medida. Además, verificamos el área de la relación de iones calificador/objetivo para cada metabolito y se seleccionaron aquellos con una variación < 20%.

Antes de cualquier análisis estadístico, se utilizó el estándar interno a 10 mg L⁻¹ (IS, Ribitol) para normalizar las concentraciones de la muestra y corregir cualquier variabilidad instrumental. Además, se utilizó el coeficiente de variación de la señal (CV) en los controles de calidad (QC) para filtrar los datos, considerando valores < 30 % como aceptables. Los metabolitos que llevaron a la discriminación entre el tipo de extracción, trifásica-UA-HF-LPME y LLE, se consideraron estadísticamente significativos utilizando una importancia variable en la proyección (valores VIP, una suma ponderada de cuadrados del peso PLS) ≥ 1 y valores p $\leq 0,05$.

Usando el nuevo método UA-HF-LPME trifásico, los metabolitos fueron anotados usando índices de retención de Kovats, experimentos de espectrometría de masas en tándem y búsqueda de MS en la base de datos NIST.

	Compound	Accession Numbers	Category	Mass Human database	nº C	MW	MW (Derivative)	Target Ion	RT (min)	Kovat Retention Index	XTMS
1	Boric acid	HMDB0035731	Non-Metal compounds	62.017	9	62	278	221, 263, 264	5.83	980	3TMS
2	Lactic acid	HMDB0000190	Organic acids and derivatives	90.031	9	90	234	147, 191, 219	6.95	1071	2TMS
3	Butylamine	HMDB0031321	Organic nitrogen compounds	73.089	4	73	217	86, 128, 174	7.45	1118	2TMS
4	Hydroxybutyric acid	HMDB0000008	Hydroxy acids and derivatives	104,0473	10	104	248	131	7,97	1016	2TMS
5	Urea	HMDB0000294	Organic acids and derivatives	60.032	7	60	204	147, 189, 191	9.30	1220	2TMS
6	Glycerol	HMDB0000131	Carbohydrates and derivatives	92.047	12	92	308	147, 205, 218	9.72	1247	3TMS
7	Glycine	HMDB0000123	Amino acids, peptides and analogues	75.032	11	75	291	147, 174, 248	10.22	1281	3TMS
8	Decanoic acid	HMDB0000511	Fatty acids and derivatives	172.146	13	172	244	117, 129, 229	12.22	1413	1TMS
9	Proline	HMDB0000162	Amino acids, peptides and analogues	115.063	11	115	273	147, 156, 230	13.08	1470	2TMS
10	Benzoic acid	HMDB0001869	Benzene and substituted derivatives	122.036	11	122	194	263, 278, 279	13.27	1483	2EtO
11	Glutamine	HMDB0000641	Amino acids, peptides and analogues	146.069	14	146	363	128, 147, 246	14.23	1576	3TMS
12	Dodecanoic acid (Lauric acid)	HMDB0000638	Fatty acids and derivatives	200.177	15	200	272	117, 129, 257	14.63	1883	1TMS
13	Acetyl glucosamine	HMDB0000803	Carbohydrates and derivatives	221.089	21	221	538	147, 217, 319	15.30	1922	4TMS
14	Phosphoric acid	HMDB0001429	Non-Metal compounds	97.976	16	98	488	147, 299, 357	15.70	1955	4TMS
15	Azelaic acid	HMDB0000784	Fatty acids and derivatives	188.104	9	118	332	129, 147, 317	16.18	1980	2TMS

16	Citric acid	HMDB0000094	Organic acids and derivatives	192.027	18	192	480	147, 273, 347	16.33	2123	4TMS
17	Tetradecanoic acid (myristic)	HMDB0000806	Fatty acids and derivatives	228.208	17	228	300	75, 117, 285	16.77	2140	1TMS
18	Fructose	HMDB0000660	Carbohydrates and derivatives	180.063	22	180	569	147, 217, 307	16.93	2153	5TMS
19	Galactose	HMDB0000143	Carbohydrates and derivatives	180.063	22	180	569	147, 205, 319	16.98	2157	5TMS
20	Glucose	HMDB0000122	Carbohydrates and derivatives	180.063	22	180	569	147, 217, 319	17.10	2169	5TMS
21	Palmitoleic acid	HMDB0003229	Fatty acids and derivatives	254.224	19	254	326	117, 129, 311	18.52	1751	1TMS
22	Palmitic acid	HMDB0000220	Fatty acids and derivatives	256.240	19	256	328	117, 129, 313	18.78	1755	1TMS
23	Inositol	HMDB0000211	Carbohydrates and derivatives	180.063	24	180	612	147, 217, 318	19.02	1983	6TMS
24	Uric acid	HMDB0000289	Purines and derivatives	168.028		168	456	147, 441, 456	19.13	2009	4TMS
25	Linoleic acid	HMDB0000673	Fatty acids and derivatives	280.240	21	280	352	178, 262, 337	20.23	2017	1TMS
26	Stearic acid	HMDB0000827	Fatty acids and derivatives	284.271	21	284	356	117, 201, 341	20.52	2022	1TMS
27	Myristic acid	HMDB0000806	Fatty acids and derivatives	228.208	23	228	446	147, 211, 343	21.73	2046	2TMS
28	Oleamide	HMDB0002117	Lipids and lipid-like molecules	281.271	21	281	353	131, 144, 338	21.98	2051	1TMS
29	Monopalmitin	HMDB0011533	Lipids and lipid-like molecules	330.277	25	330	474	203, 239, 371	23.23	2972	2TMS
30	Turanose	HMDB0011740	Lipids and lipid-like molecules	342.116	33	342	846	147, 217, 361	23.70	3007	7TMS

Tabla 3.7. Metabolitos identificados por GC-MS. (Fuente: Elaboración propia)

Además, usamos el Fold-Change para explorar las diferencias en la intensidad total de la señal m/z de los metabolitos entre ambas técnicas de extracción analítica. Los Fold-Change se calcularon simplemente como la relación entre la intensidad máxima de m/z utilizando la técnica UA-HFLPME trifásica frente a la intensidad máxima utilizando LLE para el metabolito.

Compuesto	*valor p	Regulación	FC
Boric acid	0.351	↑	2.29
Trimethylene glycol (Propanediol)	0.001	↑	2.06
Lactic acid	0.036	↑	3.25
Butylamine	0.040	↑	1.54
Hydroxybutyric acid	0.389	↑	2.13
Urea	0.023	↓	0.15
Glycerol	0.041	↑	3.67
Glycine	0.031	↑	2.01
Decanoic acid	0.085	↑	1.65
Proline	0.006	↑	2.11
Benzoic acid	0.054	↑	2.79
Glutamine	0.034	↑	3.02
Dodecanoic acid (Lauric acid)	0.069	↑	2.88
Phosphoric acid	0.039	↓	0.02
Citric acid	0.011	↑	2.67
Tetradecanoic acid (myristic)	0.007	↑	3.05
Fructose	0.181	↑	1.97
Galactose	0.134	↓	0.25
Glucose	0.045	↑	1.96
Palmitoleic acid	0.024	↑	2.73
Palmitic acid	0.011	↑	3.02
Inositol	0.050	↓	0.09
Linoleic acid	0.109	↑	1.54
Stearic acid	0.008	↑	2.06
Myristic acid	0.004	↑	2.43
Oleamide	0.003	↑	2.06
Monopalmitin	0.185	↑	2.75
Turanose	0.096	↓	0.26
Azelaic acid	0.014	↑	3.27
Uric acid	0.198	↓	0.04

Tabla 3.8. Fold-Changes (FC) y valores p de los metabolitos identificados por el método propuesto UA-HF-LLLME (5 min) versus LLE. (*) Los valores p corregidos por Benjamini-Hochberg, $p < 0,05$ se muestran en la tabla en negrita. Regulación: variaciones observadas en las señales m/z de los metabolitos, ↑ aumento y ↓ disminución de la señal m/z. (Fuente: Elaboración propia)

Los coeficientes de linealidad obtenidos fueron todos mayores al 99 % ($R^2 > 0,99$). Las recuperaciones se estimaron comparando los valores de las muestras enriquecidas por triplicado ($n=3$), obteniendo recuperaciones dentro del rango 99-86 % (328). Los LOD y LOQ se encontraban en los rangos 0,08–0,16 y 0,26–0,54 mg L⁻¹, respectivamente. Los resultados de E_e son muy altos, mejorando así la eficiencia de extracción de LLE.

Validation parameters	Lactic acid	Glutamic acid	Urea	Glycerol	Glucose	Citric acid	Serine	Proline
LLE (*)								
LOD mg L⁻¹*	0.53	1.51	3.22	4.63	0.53	0.20	0.70	0.13
LOQ mg L⁻¹*	1.87	5.03	10.72	15.44	1.60	0.61	2.32	0.64
Intra-day (%RSD) n=5 *	3.5	3	4.1	4	4.7	5.8	3.9	6.8
Inter-day (%RSD) n=5 *	5.0	6.6	4.7	5.2	6.7	7.8	4.7	10.8
Recovery (%) n=3	97.5	95.6	100.5	98.4	90.1	80.3	103.2	82.4
Average concentration (mg L⁻¹± S.E.M)	12.4± 0.5	98.3±3.2	160.4±8.9	420.3±26.4	99.3±7.5	70.9±5.7	6.8±4.5	2.2±0.7
UA-HF-LLLME								
LOD (mg L⁻¹)	0.16	0.08	0.08	0.16	0.14	0.09	0.14	0.09
LOQ (mg L⁻¹)	0.54	0.26	0.27	0.53	0.48	0.53	0.46	0.48
Intra-day (%RSD) n=5	0.24	10.46	6.74	3.64	6.93	4.37	2.42	7.96
Inter-day (%RSD) n=5	6.31	8.09	3.71	5.20	4.93	8.94	5.99	6.11
Recovery (%) n=3	86.4	99.2	98.1	90.6	98.2	98.5	97.8	98.4
Ee (RSD%) n=3	15 (12)	123 (5)	8 (7)	107 (10)	75 (4)	84 (6)	103 (11)	78.9 (16)
Linearity								
Regression equation	Y=0.79X+1.75	Y=0.06X+2.48	Y=0.08X+1.48	Y=0.12X-4.74	Y=0.03X+2.27	Y=0.03X+0.29	Y=0.34X+3.21	Y=0.25X+0.98
Determination coefficient (R²)	0.998	0.996	0.997	0.991	0.993	0.991	0.994	0.997
Range (mg L⁻¹)	0.54-23	0.26-60	0.27-260	0.53-500	0.48-125	0.53-25	0.46-15	0.48-7
Average concentration mg L⁻¹± S.E.M)	15.3± 0.9	120.6±1.3	149.4±6.2	450.4±29.6	104.3±4.7	85.2±1.2	5.6±0.6	3.1±0.4

Tabla 3.9. Parámetros de validación del método propuesto en comparación con LLE. Factores de enriquecimiento, Ee; S.E.M, error estándar de la media; (*)Parámetros de validación en LLE según la literatura (235).

Estos resultados han confirmado que las características del método son excelentes y que la metodología puede aplicarse exitosamente al análisis de muestras complejas.

3.3.3. Capítulo 3: Análisis de variabilidad metabólica en arándanos según el tratamiento postcosecha.

Los datos de GC-MS se procesaron estadísticamente con el software SIMCA-P (versión 11.5, Umetrics AB, Umea, Suecia), y la selección de los metabolitos responsables de distinguir los tratamientos se basó en su Importancia Variable en la Proyección (VIP). Se prestó especial atención a las variables con valores VIP mayores que 1, indicando diferencias significativas entre los grupos. Los datos obtenidos por UHPLC-QTOF se trataron utilizando el algoritmo Molecular Feature Extraction (MFE) del software MassHunter Qualitative Analysis (versión B.08.00), y el software Mass Profiler Professional (versión B.10.0) se empleó para el filtrado y alineación de picos. Para ambos enfoques, las características determinadas se sometieron a un análisis de componentes principales (PCA) como método no supervisado para todos los grupos, mientras que el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) se aplicó para distinguir entre los grupos de estudio. Todos los datos fueron escalados de Pareto para reducir la importancia relativa de los valores, y se aplicaron transformaciones logarítmicas para aproximarse a una distribución normal.

No se detectaron valores atípicos en los gráficos de puntuación de PCA, y las muestras de control de calidad se agruparon de manera consistente, lo que evidencia una buena reproducibilidad y baja variabilidad en las mediciones.

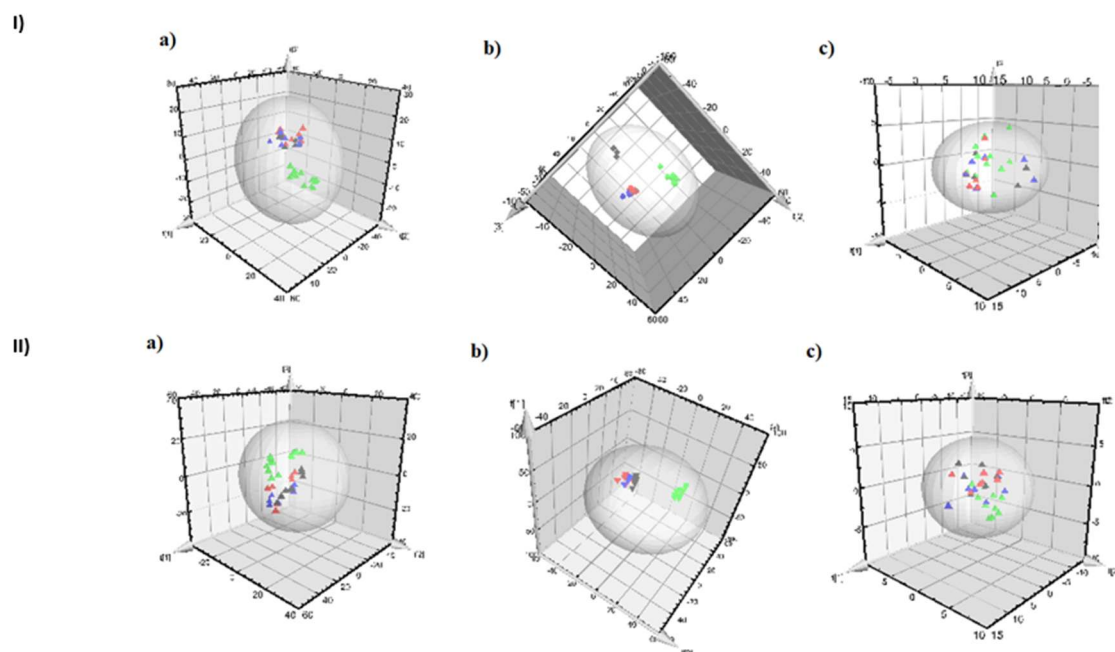


Figura 3.14. PCA 3D de muestras de arándanos determinadas por (a) UHPLC-ESI(+)-QTOF-MS. (b) UHPLC-ESI(-)-QTOF-MS y (c) GC-MS para I) E1 (C (triángulos negros), PEF (triángulos rojos), AES (triángulos azules), QC (triángulos verdes)), y II) E2 (C (triángulos negros), CAP (triángulos rojos), MAP (triángulos azules), QC (triángulos verdes)). (Fuente: Elaboración propia)

Además, el análisis PLS-DA mostró una separación clara y significativa entre los diferentes tratamientos.

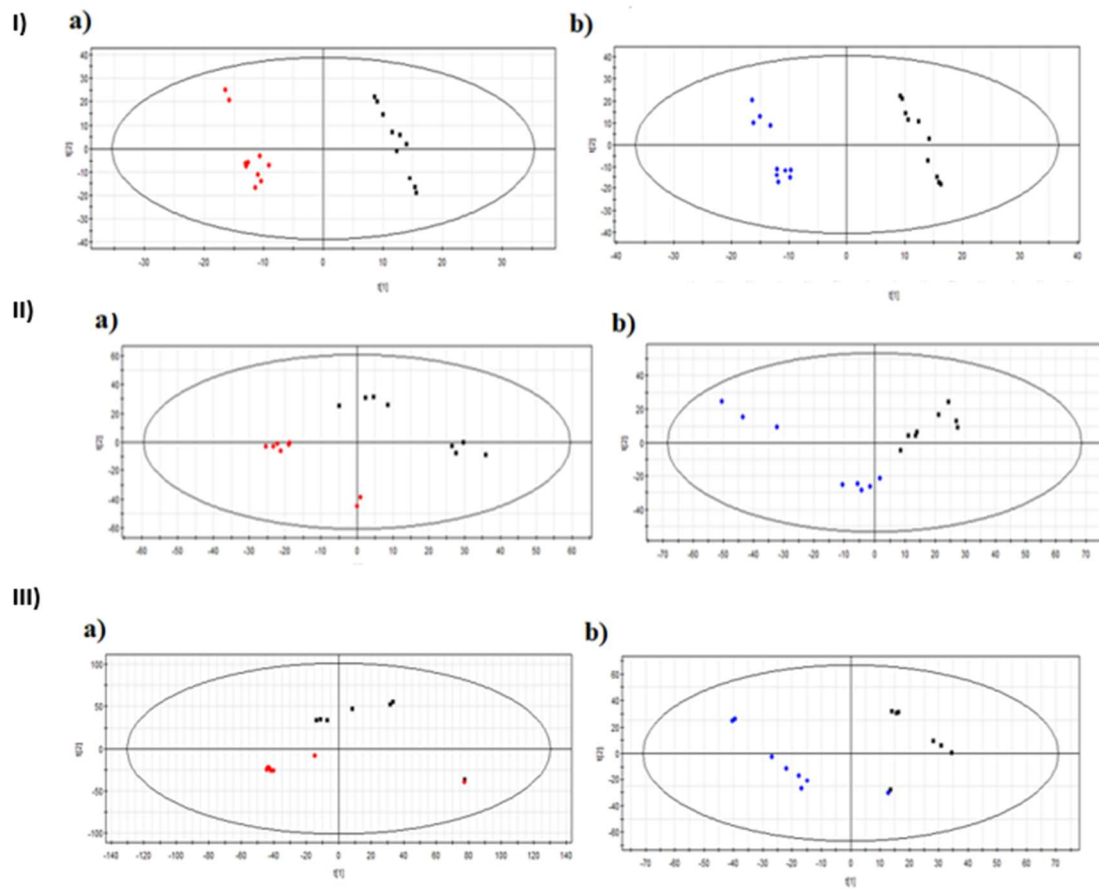


Figura 3.15. 2D-PLS-DA de comparaciones por pares de muestras de arándanos de C (puntos negros), PEF (puntos rojos) y EAS (puntos azules) determinadas por I) GC-MS, II) ESI-(+)-UHPLC-MS y III) ESI-(-)-UHPLC-MS. a) PEF vs. C, b) EAS vs. C.

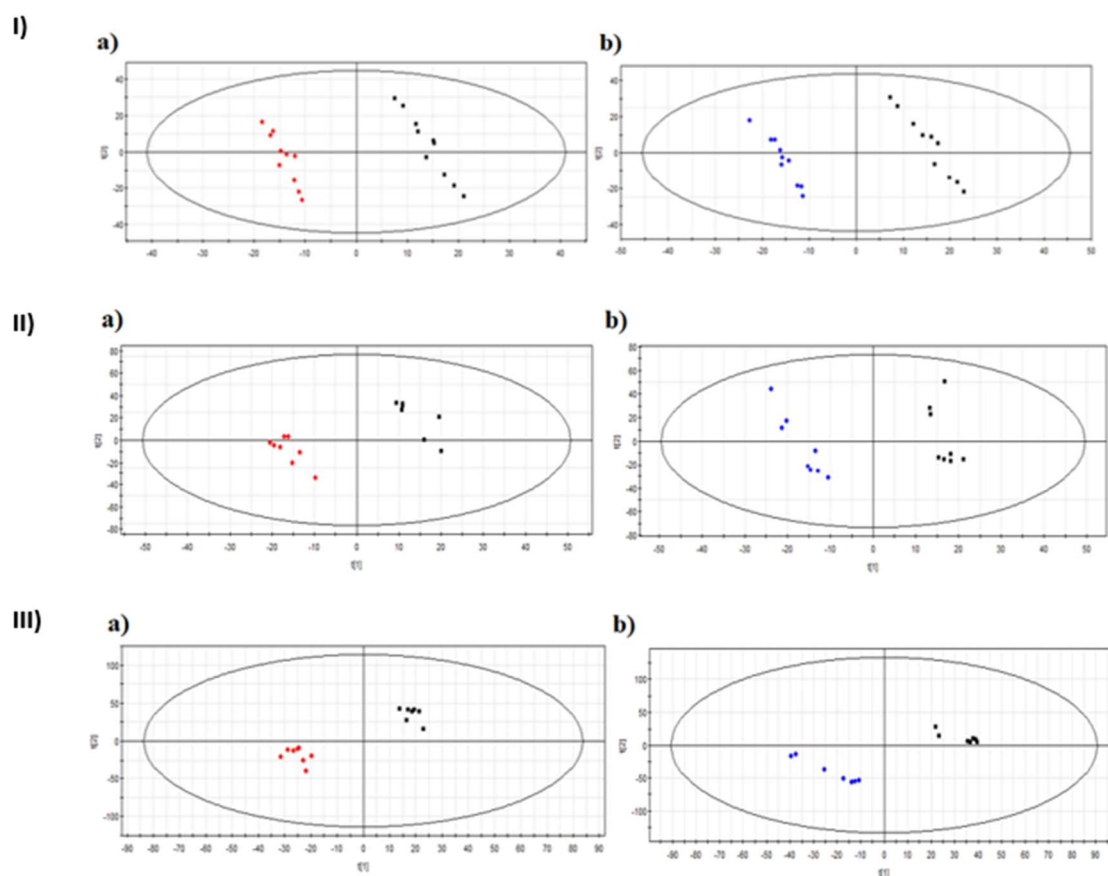


Figura 3.16. 2D-PLS-DA de comparaciones por pares de muestras de arándanos de C (puntos negros), CAP (puntos rojos) y MAP (puntos azules) determinadas por I) GC-MS, II) ESI(+)-UHPLC-MS y III) ESI(-)-UHPLC-MS. a)CAP vs. C, b)MAP vs. C.

Los valores Q^2 y R^2 proporcionados por el software se utilizaron para evaluar la capacidad de separación de clases y el poder predictivo del modelo, respectivamente. La Tabla 3.10 presenta los valores de R^2 y Q^2 del análisis PLS-DA, confirmando la capacidad discriminativa del modelo. En conjunto, la suma de las puntuaciones del primer y segundo componente principal explicó más del 65 % de la variabilidad entre los grupos de arándanos analizados.

		GC-MS		ESI(+)-UHPLC-MS		ESI(-)-UHPLC-MS	
	Parameters	Q^2	R^2Y	Q^2	R^2Y	Q^2	R^2Y
E 1	PEF vs. Control	0.754	1	0.829	0.998	0.921	1
	EAS vs. Control	0.791	1	0.877	0.984	0.923	0.998
E 2	CAP vs. Control	0.825	1	0.862	0.999	0.952	0.997
	MAP vs. Control	0.890	1	0.753	0.997	0.949	1

Tabla 3.10. Parámetros del modelo obtenidos de PLS-DA de diferentes grupos de postcosecha. *Nota: R^2 y Q^2 son los parámetros de prueba de clasificación de respuesta utilizados para evaluar si el modelo estaba sobreajustado. (Fuente: Elaboración propia)

Se utilizó la herramienta Metaboanalyst versión 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) para evaluar el impacto potencial de los diferentes tratamientos postcosecha aplicados sobre las distintas vías metabólicas. Las diferencias entre los tratamientos postcosecha y el control se determinaron mediante ANOVA de una vía ($p < 0,05$) y prueba de Tukey, con corrección posterior mediante la prueba de Benjamini-Hochberg. Este análisis estadístico se realizó utilizando el software Statistica, versión 8.0 (StatSoft, Tulsa, EE. UU.).

Para evaluar la respuesta biológica de los arándanos a los tratamientos postcosecha, se realizó una cuantificación relativa de los metabolitos alterados, basada en el cambio en el pliegue (*fold change*), para comparar su abundancia total entre los diferentes grupos. Este cambio se calculó como la relación entre la intensidad máxima m/z en los tratamientos (PEF, EAS, CAP y MAP) y la intensidad máxima en el grupo de control (C).

Experimental Mass (Da)	Theoretical Mass (Da)	RT (min)	Compound	Mode	PEF vs. C		EAS vs. C		Sub Class	HMD
					p	FC	p	FC		
426.191	426.18	6.347	11.13-Dihydrotaraxinic acid glucosyl ester	Esi-	0.0214	2.4456	N.S.	N.S.	Saccharolipids	HMDB0035867
199.230	182.20	9.417	1-Tridecene	Esi+	N.S.	N.S.	0.0045	1.3613	Unsaturated aliphatic hydrocarbons	HMDB0030930
740.175	740.17	5.705	2''-4''-Bis-O-(4-hydroxycinnamoyl)astragaline	Esi-	0.0019	0.1148	N.S.	N.S.	Flavonoids	HMDB0037435
257.271	240.24	10.684	2-Hexadecanone	Esi+	N.S.	N.S.	0.0449	1.5615	Carbonyl compounds	HMDB0031052
482.105	482.10	4.625	3'-(2''-Galloylglucosyl)-phloroacetophenone	Esi+	N.S.	N.S.	0.0046	3.2052	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	HMDB0040622
512.151	512.15	4.390	3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,2-propanediol 2-O-(galloylglucoside)	Esi-	0.0170	1.3520	0.0285	1.0208	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	HMDB0036376
162.032	162.03	6.239	3-Hydroxycoumarin	Esi+	N.S.	N.S.	0.0263	1.6271	Hydroxycoumarins	HMDB0002149
332.075	332.07	1.670	6-Galloylglucose	Esi-	N.S.	N.S.	0.0281	3.1918	Pyrimidines and pyrimidine derivatives	HMDB0034051
358.146	358.14	8.454	6-Gingesulfonic acid	Esi+	0.0001	2.8815	0.0001	1.5962	Phenols	HMDB0038999
505.272	488.24	4.887	7-Sulfocholic acid	Esi+	0.0025	1.4123	N.S.	N.S.	Bile acids, alcohols and derivatives	HMDB0002421
486.335	486.33	11.098	Bassic acid	Esi-	0.0013	*	0.0010	*	Triterpenoids	HMDB0034526
165.079	165.07	2.478	Benzocaine	Esi-	0.0160	1.9784	N.S.	N.S.	Benzoic acids and derivatives	HMDB0004992
468.323	451.29	8.831	Cabergoline	Esi+	N.S.	N.S.	0.0331	0.4658	Lysergic acids and derivatives	HMDB0014393

181.183	181.18	6.337	Dicyclohexylamine	Esi+	0.0001	2.3454	0.0003	1.6370	Cyclohexylamines	HMDB0251214
133.000	133.038	14.250	DL-Malic acid	GC-MS	0.0050	0.3332	0.0050	0.3472	Amino acids. peptides and analogues	HMDB0000744
192.000	192.027	20.750	D-Mannose	GC-MS	0.3057	0.6594	N.S.	N.S.	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	HMDB0000169
134.000	134.022	13.520	D-Turanose	GC-MS	0.0439	0.4749	0.0443	0.4844	Fatty acyl glycosides	HMDB0011740
204.090	204.08	4.468	Ethotoin	Esi-	0.0052	1.6949	0.0219	0.8694	Imidazolidines	HMDB0014892
180.000	180.063	30.23	Glutamine	GC-MS	0.0110	1.9032	0.0040	0.4643	Amino acids. peptides. and analogues	HMDB0000641
307.084	307.08	1.054	Glutathione	Esi+	N.S.	N.S.	0.0383	6.2283	Amino acids. peptides. and analogues	HMDB0062697
188.116	188.11	1.498	Glycyl-L-leucine	Esi+	0.0023	1.7412	N.S.	N.S.	Amino acids. peptides. and analogues	HMDB0028929
239.225	222.19	9.142	Guaioxide	Esi+	N.S.	N.S.	0.0223	1.6577	Tetrahydrofurans	HMDB0036447
466.110	466.11	4.870	Hesperetin-7-O-glucuronide	Esi-	0.0312	0.8818	N.S.	N.S.	Phenols	HMDB0029203
264.137	264.13	7.670	Hulupinic acid	Esi-	0.0201	4.9185	N.S.	N.S.	Vinylogous acids	HMDB0030102
342.000	342.116	33.350	Inositol	GC-MS	0.0182	0.5692	0.3355	0.0293	Alcohols and polyols	HMDB0000211
146.000	146.069	16.550	Isocitric acid	GC-MS	0.0066	0.6292	0.0031	0.3110	Tricarboxylic acids and derivatives	HMDB0000193
364.099	342.11	0.845	Lactulose	Esi+	N.S.	N.S.	0.0028	*	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	HMDB0000740

180.000	180.063	26.920	L-Alanine	GC-MS	N.S.	N.S.	0.0114	0.5428	Amino acids, peptides, and analogues	HMDB0000161
89.000	89.000	5.220	L-Asparagine	GC-MS	0.0002	5.3856	0.0005	0.0749	Amino acids, peptides, and analogues	HMDB0000168
132.000	132.054	17.680	L-Aspartic acid	GC-MS	0.0044	0.4221	0.0010	0.4348	Amino acids, peptides and analogues	HMDB0000191
287.246	287.24	10.752	Lauroyl diethanolamide	Esi+	N.S.	N.S.	0.0052	1.3404	Fatty amides	HMDB0032358
332.109	332.11	3.554	Leonuriside A	Esi-	0.0252	1.4149	N.S.	N.S.	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	HMDB0031721
321.099	321.09	1.743	L-L-Homoglutathione	Esi-	0.0049	2.5850	N.S.	N.S.	Hybrid peptides	HMDB0029395
115.000	115.063	14.350	L-Proline	GC-MS	0.1645	1.3322	0.0004	3.3318	Amino acids, peptides and analogues	HMDB0000162
98.000	97.977	8.430	L-Serine	GC-MS	N.S.	N.S.	0.0010	0.4053	Amino acids, peptides and analogues	HMDB0000187
792.415	792.9	6.690	Lyciumoside II	Esi-	0.0014	2.7413	N.S.	N.S.	Terpene glycosides	HMDB0039576
402.189	402.18	8.275	Methyl 7-epi-12-hydroxyjasmonate glucoside	Esi-	0.0002	2.8941	N.S.	N.S.	Fatty acyl glycosides	HMDB0031763
696.407	696.40	8.252	Momordicoside E	Esi-	0.0011	*	N.S.	N.S.	Steroidal glycosides	HMDB0035697
500.300	500.29	8.101	Mupirocin	Esi-	0.0352	0.1976	N.S.	N.S.	Fatty acids and conjugates	HMDB0014554
336.164	336.16	0.740	N2-Fructopyranosylarginine	Esi+	0.0007	2.6331	0.0296	1.5099	Amino acids, peptides, and analogues	HMDB0041541
228.116	228.11	7.658	Nabumetone	Esi+	0.0275	1.9374	N.S.	N.S.	Naphthalenes	HMDB0014604
225.126	225.12	10.143	ortho-Aminoazotoluene	Esi+	0.0187	1.5819	N.S.	N.S.	Azobenzenes	HMDB0255841

256.000	256.240	26.250	Palmitic acid	GC-MS	0.2698	1.5207	0.2155	0.5250	Fatty acids and conjugates	HMDB0000220
270.266	253.24	9.028	Palmitoleamide	Esi+	N.S.	N.S.	0.0145	1.6104	Fatty amides	HMDB0256086
342.000	342.116	33.320	Phosphate	GC-MS	N.S.	N.S.	0.0038	0.1286	Non-metal phosphates	HMDB0001429
550.096	550.09	6.406	Quercetin 3-O-(6-O-malonyl- β -D-glucoside)	Esi-	0.0083	1.6582	0.0108	1.2825	Flavonoids	HMDB0037368
105.000	105.043	10.430	Stearic acid	GC-MS	0.0832	1.6364	0.2177	7.6068	Fatty acids and conjugates	HMDB0000827
284.000	284.272	29.480	Sucrose	GC-MS	0.0112	0.3572	0.0393	0.8881	Fatty acids and conjugates	HMDB0000258
838.434	838.43	12.869	Talinumoside I	Esi-	0.0494	1.9588	N.S.	N.S.	Terpene glycosides	HMDB0040957
428.204	428.20	6.072	Taraxacolide 1-O- β -D-glucopyranoside	Esi-	0.0344	2.2302	N.S.	N.S.	Terpene lactones	HMDB0035610
534.158	474.13	3.882	trans-Caffeic acid [apiosyl-(1-6)-glucosyl] ester	Esi-	0.0013	3.1443	N.S.	N.S.	Hydroxycinnamic acids and derivatives	HMDB0033694
326.101	326.10	4.606	trans-o-Coumaric acid 2-glucoside	Esi-	0.0394	1.2642	N.S.	N.S.	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	HMDB0033581
372.106	372.10	2.279	Veranisatin C	Esi-	0.0175	3.3003	N.S.	N.S.	Terpene lactones	HMDB0031756
460.139	460.13	8.377	Wistin	Esi-	0.0154	7.3306	N.S.	N.S.	Isoflavonoids	HMDB0030869
267.096	267.09	1.475	Zidovudine	Esi+	N.S.	N.S.	0.0007	2.4482	Pyrimidine nucleosides	HMDB0014638

Tabla 3.11. Metabolitos alterados de E1 en arándanos ordenados por clase. RT: tiempo de retención. FC: Fold-Change. N.S.: no significativo. valor p obtenido a partir de ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tuckey y corregido mediante corrección posterior múltiple de Benjamini-Hochberg. *Solo aparece en el primer tratamiento.; N.S: No significativo (Fuente: Elaboración propia)

Experimental Mass (Da)	Theoretical Mass (Da)	RT (min)	Compound	Mode	CAP vs. C		MAP vs. C		Sub Class	Code
					p	FC	p	FC		
506.27	506.27	6.118	(3b.9R)-5-Megastigmene-3.9-diol 9-[apiosyl-(1-6)-glucoside]	Esi-	0.011	5.390	N.S.	N.S.	Fatty acyl glycosides	HMDB0038327
458.34	458.33	11.522	(3beta.5alpha.9alpha.22E.24R)-3.5.9-Trihydroxy-23-methylergosta-7.22-dien-6-one	Esi-	0.000	*	N.S.	N.S.	Ergostane steroids	HMDB0032669
267.26	250.22	10.419	(Z)-9-Cycloheptadecen-1-one	Esi+	N.S.	N.S.	0.000	0.062	Carbonyl compounds	HMDB0031336
316.06	316.05	5.580	alpha-Caryophyllene Alcohol	Esi+	0.000	0.223	0.000	0.266	Aurone flavonoids	HMDB0039210
297.34	280.31	12.020	1.3.5.8-Tetrahydroxy-6-methoxy-2-methylantraquinone	Esi+	0.019	0.207	N.S.	N.S.	Unsaturated aliphatic hydrocarbons	HMDB0040709
384.36	384.6	15.324	10-Eicosene	Esi+	0.001	0.569	N.S.	N.S.	Unsaturated aliphatic hydrocarbons	HMDB0040709
330.28	330	33.330	15-methoxy-tricosanoic acid	Esi-	0.013	*	N.S.	N.S.	Monoradylglycerols	HMDB0011564
562.34	516.7	12.053	1-Monopalmitin	GC-MS	0.037	2.325	0.018	0.064	Monoradylglycerols	HMDB0011564
508.12	508.12	6.546	3-Hydroxychavicol 1-[rhamnosyl-(1-6)-glucoside]	Esi-	0.000	2.254	0.012	2.280	Flavonoid glycosides	HMDB0037753
302.04	302.04	7.218	4'.8-Dimethylgossypetin 3-glucoside	Esi-	0.035	1.627	N.S.	N.S.	Isoflav-2-enes	HMDB0041687
134.04	134.13	6.238	5.6.7.3'.4'-Pentahydroxyisoflavone	Esi+	0.002	3.325	N.S.	N.S.	Isoflav-2-enes	HMDB0041687

294.22	294.21	11.429	7.8.3'.4'-Tetrahydroxyisoflavone	Esi+	0.035	0.871	N.S.	N.S.	Lineolic acids and derivatives	HMDB0010224
465.26	448.23	7.343	9-HOTE	Esi-	N.S.	N.S.	0.019	0.668	Terpene glycosides	HMDB0029347
239.22	222.19	9.281	Acuminoside	Esi+	0.035	0.523	0.007	0.376	Aurone flavonoids	HMDB0036732
798.17	798.16	6.509	Apigenin 4'-[feruloyl-(-2)-glucuronyl-(1-2)-glucuronide]	Esi-	0.002	2.692	0.027	5.015	Flavonoid glycosides	HMDB0038295
312.30	312	31.700	Arachidic acid	GC-MS	0.000	*	N.S.	N.S.	Fatty acids and conjugates	HMDB0002212
486.34	486.33	10.937	Bassic acid	Esi-	N.S.	N.S.	0.002	0.066	Triterpenoids	HMDB0034526
356.07	356.07	4.301	Caffeic acid 3-O-glucuronide	Esi-	0.022	9.402	N.S.	N.S.	Organic oxygen compounds	HMDB0041705
866.21	866.20	5.730	Cinnamtannin A1	Esi-	0.031	2.120	N.S.	N.S.	Biflavonoids and polyflavonoids	HMDB0038370
192.03	192	20.750	Citric acid	GC-MS	0.000	3.333	0.000	0.063	Tricarboxylic acids and derivatives	HMDB0000094
372.14	372.14	5.472	Citrusin E		N.S.	N.S.	0.030	0.431	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	HMDB0039234
506.10	507.11	5.280	Delphinidin 3-(acetylglucoside)	Esi+	0.000	0.049	0.000	0.171	Flavonoid glycosides	HMDB0038004
180.06	180.060	21.900	D-Fructose	GC-MS	0.056	0.205	0.010	0.197	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	HMDB0000660
181.18	181.18	6.337	Dicyclohexylamine	Esi+	0.040	2.692	0.001	3.422	Cyclohexylamines	HMDB0251214
266.10	206.07	1.630	Diethyl tartrate	Esi-	N.S.	N.S.	0.041	0.164	Beta hydroxy acids and derivatives	HMDB0033584

419.11	373.10	6.245	DIMBOA-Glc	Esi-	N.S.	N.S.	0.035	*	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	HMDB0029710
134.02	133.038	13.520	DL-Malic acid	GC-MS	0.001	0.250	0.000	0.174	Amino acids. peptides and analogues	HMDB0000744
342.12	342	23.900	D-Turanose	GC-MS	0.255	0.660	0.016	0.168	Fatty acyl glycosides	HMDB0011740
516.13	516.12	6.565	Formononetin 7-(6''-malonylglucoside)	Esi-	N.S.	N.S.	0.005	0.013	Isoflavonoid O-glycosides	HMDB0029493
472.14	472.4	7.714	Formononetin 7-O-(6''-acetylglucoside)	Esi-	N.S.	N.S.	0.022	2.885	isoflavonoid	-
210.04	210	25.880	Galactaric acid	GC-MS	0.002	5.201	0.000	*	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	HMDB0000639
524.23	524.22	6.321	Gibberellin A38 glucosyl ester	Esi-	0.000	4.403	N.S.	N.S.	Terpene glycosides	HMDB0036903
239.22	222.19	9.142	Guaioxide	Esi+	0.000	0.079	0.000	0.106	Tetrahydrofurans	HMDB0036447
180.06	180.06	26.92	Inositol	GC-MS	0.000	0.300	0.000	0.081	Alcohols and polyols	HMDB0000211
538.13	538.13	5.555	Isolimocitrol 3-glucoside	Esi-	N.S.	N.S.	0.001	0.117	Flavonoid glycosides	HMDB0038757
89.05	89.04	5.220	L-Alanine	GC-MS	0.028	1.685	0.000	2.406	Amino acids. peptides. and analogues	HMDB0000161
132.05	132.05	17.680	L-Asparagine	GC-MS	0.000	0.035	0.000	0.079	Amino acids. peptides. and analogues	HMDB0000168
133.04	133.03	14.250	L-Aspartic acid	GC-MS	0.015	1.640	N.S.	N.S.	Amino acids. peptides. and analogues	HMDB0000191

387.15	370.12	6.660	Linusitamarin	Esi+	0.003	0.380	N.S.	N.S.	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	HMDB0040865
115.06	115.06	14.350	L-Proline	GC-MS	0.107	1.455	N.S.	N.S.	Amino acids. peptides. and analogues	HMDB0000162
117.08	117.08	7.230	L-Valine	GC-MS	0.047	1.553	0.055	1.445	Amino acids. peptides. and analogues	HMDB0000883
519.33	519.33	11.210	LysoPC(18:2(9Z.12Z))	Esi+	0.001	0.437	0.003	0.417	Glycerophosphocholines	HMDB0010386
534.14	535.14	5.804	Malvidin 3-(6-acetylglucoside)	Esi+	0.003	0.000	0.000	0.000	Flavonoids	HMDB0038008
656.17	655.16	6.548	Malvidin 3-(6''-p-caffeyglucoside)	Esi-	0.001	5.807	N.S.	N.S.	Chalcones and dihydrochalcones	HMDB0301904
502.33	502.32	10.332	Medicagenic acid	Esi-	0.009	0.893	0.003	0.065	Triterpenoids	HMDB0034551
256.24	256.24	26.250	Palmitic acid	GC-MS	0.436	1.307	0.355	4.169	Fatty acids and conjugates	HMDB0000220
520.12	521.12	5.580	Petunidin 3-(6''-acetylglucoside)	Esi+	0.000	0.162	0.000	0.171	Flavonoid glycosides	HMDB0301901
246.05	747.0	0.893	Phosphatidyl glycerol	Esi-	0.001	1.616	0.000	3.323	fatty acids	HMDB0249321
97.98	97.97	8.430	Phosphoric acid	GC-MS	0.002	2.156	0.036	0.667	Non-metal phosphates	HMDB0002142
970.45	970.45	7.190	PIP2(16:0/16:0)	Esi-	0.000	*	N.S.	N.S.	Glycerophospholipids	HMDB0010032
488.35	488.35	12.795	Pitheduloside I	Esi-	0.000	*	N.S.	N.S.	Triterpenoids	HMDB0034036
302.04	302.04	6.144	Quercetin	Esi+	N.S.	N.S.	0.010	7.374	Flavonoids	HMDB0005794
478.08	480.09	6.162	Quercetin 3-O-glucuronide	Esi-	N.S.	N.S.	0.012	*	Amino acids. peptides. and analogues	HMDB0029213

284.27	284	33.020	Stearic acid	GC-MS	0.001	4.732	0.022	0.011	Fatty acids and conjugates	HMDB0000827
342.12	342	34.570	Sucrose	GC-MS	0.227	0.456	0.001	0.073	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	HMDB0000258
966.69	920.68	12.198	TG(20:5(5Z.8Z.11Z.14Z.17Z)/18:3(9Z.12Z.15Z)/20:5(5Z.8Z.11Z.14Z.17Z))[iso3]	Esi-	0.000	*	0.000	*	Triradylglycerols	HMDB0010539
540.19	540.18	6.872	Torachryson 8-(2-apiosylglucoside)	Esi-	0.000	6.137	N.S.	N.S.	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	HMDB0034612
724.44	724.43	12.790	Torvonin A	Esi-	0.016	0.158	0.024	0.314	Steroidal glycosides	HMDB0030732
326.10	326.10	4.606	trans-o-Coumaric acid 2-glucoside	Esi-	0.020	3.047	N.S.	N.S.	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	HMDB0033581
557.23	497.21	5.649	Validamycin A	Esi-	0.011	1.770	N.S.	N.S.	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	HMDB0036592
364.08	364.07	6.557	Xanthotoxol glucoside	Esi-	0.001	*	N.S.	N.S.	Coumarin glycosides	HMDB0038626

Tabla 3.12. Metabolitos alterados de E2 en arándanos ordenados por clase. RT: tiempo de retención. FC: Fold-Change. N.S.: no significativo. valor p obtenido a partir de ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tuckey y corregido mediante corrección posterior múltiple de Benjamini-Hochberg. *Solo aparece en el primer tratamiento.; N.S: No significativo (Fuente: Elaboración propia).

Los metabolitos seleccionados por GC-MS fueron anotados utilizando la biblioteca de espectros de masas NIST versión 08 y los índices de retención de Kovats, con un umbral de probabilidad mínimo del 80%. Se seleccionaron iones específicos con mayores intensidades y masas dentro de los espectros de masas, evitando aquellos con mayor influencia de la matriz. Además, se examinó la relación de iones objetivo/calificadores de área para cada metabolito, y solo se incluyeron aquellos con una variación menor al 20%.

Para el análisis UHPLC-QTOF-MS, la anotación de metabolitos se realizó comparando la masa de los metabolitos con bases de datos en línea, incluidas HMDB (<http://hmdb.ca>) y METLIN (<http://metlin.scripps.edu>), permitiendo un error de masa de hasta 10 ppm. Solo se conservaron para el análisis estadístico aquellos metabolitos detectados en al menos el 90% de todas las muestras (incluyendo control de calidad y muestras experimentales). La anotación de los metabolitos se confirmó como MSI Nivel 2, siguiendo las pautas establecidas por la Metabolomics Standards Initiative (MSI) (339).

4. RESULTADOS Y DISCUSION.

En la presente tesis se presentan y analizan los principales hallazgos obtenidos en cada uno de los estudios que conforman esta tesis. A través de tres capítulos, se detallan los resultados experimentales que contribuyen al desarrollo y optimización de técnicas de microextracción, así como su aplicación en el análisis de contaminantes y metabolitos en matrices biológicas y alimentarias.

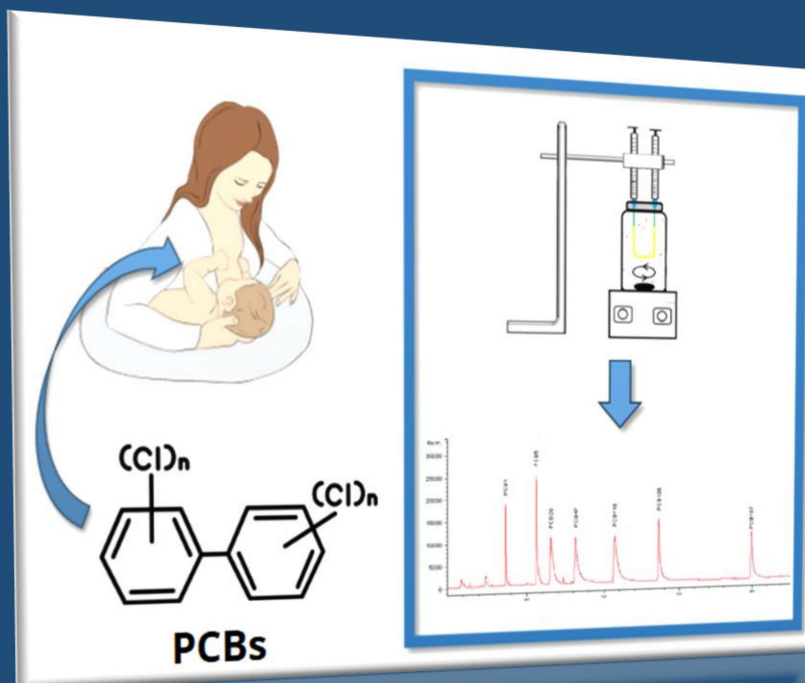
En el Capítulo 1, se exponen los resultados de la optimización del método HF-LPME para la extracción y determinación de bifenilos policlorados (PCBs) en leche materna. Se presentan los parámetros experimentales optimizados, los factores de preconcentración alcanzados y la eficiencia del método en términos de sensibilidad, reproducibilidad y eliminación del efecto matriz.

El Capítulo 2 muestra los resultados de la aplicación de la microextracción en fase líquida con fibra hueca en configuración trifásica asistida por ultrasonido (UA-HF-LPME) para el análisis metabolómico no dirigido en leche materna. Se detallan los metabolitos identificados, la cobertura analítica lograda en comparación con métodos convencionales y los beneficios de la técnica en términos de selectividad, enriquecimiento y reducción de interferencias.

Finalmente, en el Capítulo 3, se presentan los hallazgos del estudio metabolómico no dirigido aplicado a arándanos sometidos a distintos tratamientos postcosecha. Se analizan las modificaciones en el perfil metabólico de los frutos, identificando las rutas metabólicas afectadas y la influencia de los tratamientos en la estabilidad y biodisponibilidad de metabolitos clave para la calidad postcosecha.

Los resultados obtenidos en cada capítulo proporcionan información clave para el desarrollo de estrategias analíticas innovadoras y su aplicación en la evaluación de contaminantes y compuestos bioactivos en matrices de interés biológico y alimentario.

CAPÍTULO 1



bCB²



4.1. Capítulo 1: Impacto de la optimización de HF-LPME en la detección de PCBs en leche materna.

Disolvente orgánico

Según los factores de enriquecimiento obtenidos, el tolueno resultó ser el disolvente más eficiente para la extracción de los analitos objetivo. Además, se observó que prolongar el tiempo para impregnar los poros de la fibra más allá de 1 minuto no mejora los factores de enriquecimiento.

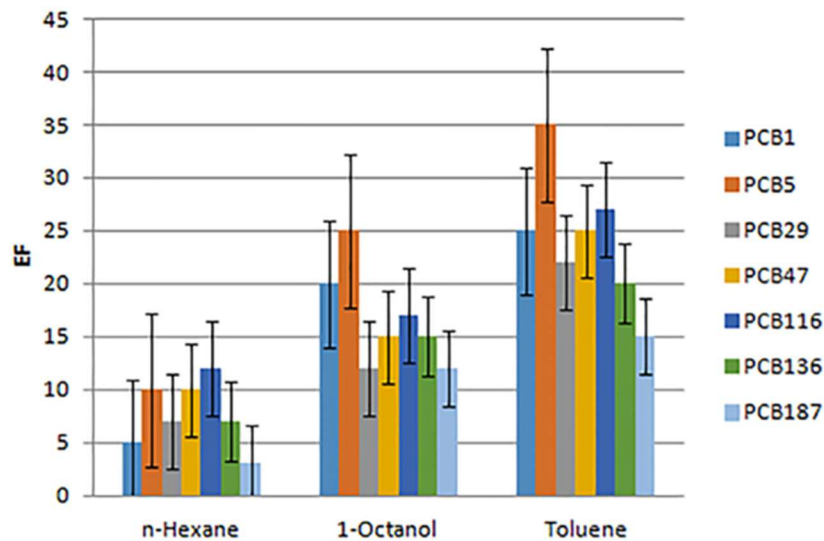


Figura 4.1. Factores de enriquecimiento (n=3) obtenidos en la optimización del disolvente orgánico de la fase aceptora. (Fuente: Elaboración propia)

Fuerza iónica

Al estudiar el efecto de la adición de sal, no se observó ningún cambio significativo. Esto podría deberse al carácter poco polar de los compuestos PCB, que facilita su extracción sin necesidad de alterar la fuerza iónica (340). Este hallazgo está concuerda con estudios previos realizados por nuestro equipo (317).

Velocidad de Agitación

Los resultados mostraron un aumento progresivo de los factores de enriquecimiento hasta 600 rpm. Sin embargo, valores más altos de estas variables disminuyen la reproducibilidad de los resultados, principalmente debido a la aparición de burbujas de aire en la solución o incluso la rotura de la membrana.

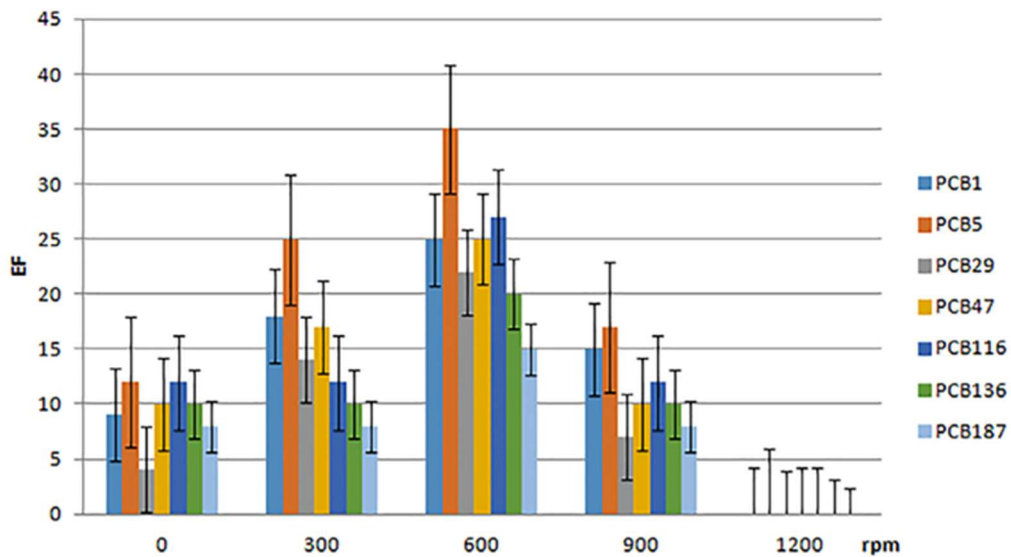


Figura 4.2. Factores de enriquecimiento (n=3) obtenidos en la optimización de la velocidad de agitación. (Fuente: Elaboración propia)

Con base en estos hallazgos, se utilizaron 600 rpm en experimentos posteriores.

Efecto del pH

Los factores de enriquecimiento correspondientes se muestran en la Fig. 4.3. No hubo un efecto considerable en los factores de enriquecimiento de los PCB al variar el pH en el rango de 6-8, en el que se incluye el pH de la muestra.

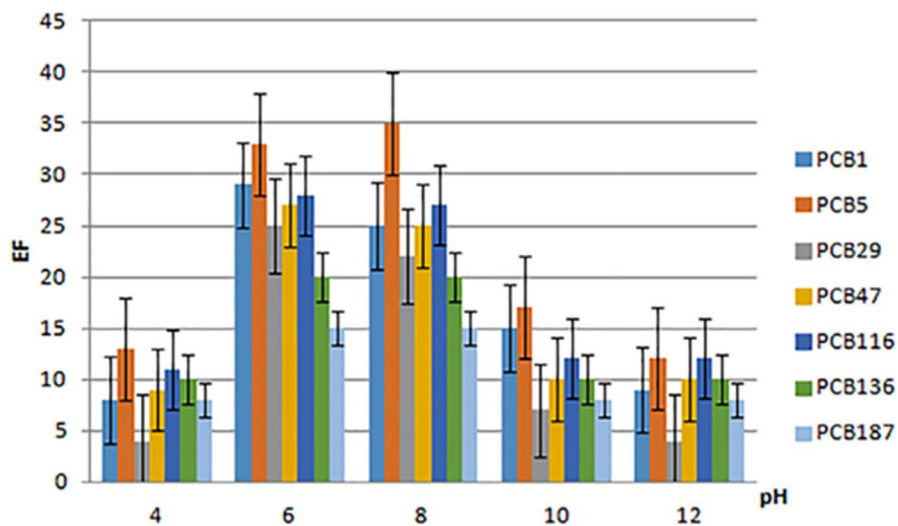


Figura 4.3. Factores de enriquecimiento (n=3) obtenidos en el ajuste del pH de la fase donadora. (Fuente: Elaboración propia)

Por lo tanto, el pH de la muestra no se ajustó para experimentos posteriores.

Temperatura, tiempo y longitud de fibra

La Tabla 4.1 muestra la respuesta (áreas pico de los analitos) de los PCB obtenida por HF-LPME en los diferentes ensayos para la optimización de la temperatura, tiempo de extracción y longitud de membrana.

Run	PCB 1	PCB 5	PCB 29	PCB 47	PCB 116	PCB 136	PCB 187
1	1,445,437	151,166	341,421	2,982,558	992,053	576,920	1,079,141
2	1,224,615	315,737	459,125	2,072,237	2,018,372	1,072,200	1,138,348
3	2,532,024	978,107	290,671	144,663	445,166	1,094,476	684,602
4	1,514,127	106,678	381,923	151,113	739,466	986,393	670,114
5	2,090,428	13,532,203	1,635,603	803,381	471,934	2,719,882	241,383
6	1,787,659	18,015,125	1,041,421	873,296	823,271	2,091,914	385,883
7	1,981,037	17,599,705	395,431	754,873	774,625	1,484,487	533,688
8	215,935	10,079,523	249,864	784,821	1,092,053	1,363,427	421,684
9	32,821,417	8,971,327	1,635,202	1,906,952	14,896,527	1,270,088	565,888
10	47,586,625	9,125,733	1,444,278	1,706,678	13,739,257	1,592,765	542,409
11	8,670,406	338,390	810,645	229,711	236,551	1,098,930	394,146
12	10,514,127	13,151,374	1,637,315	1,893,551	21,003,809	1,177,669	498,725
13	4,670,909	11,119,787	1,980,343	1,935,806	15,188,631	1,962,856	569,321
14	5,709,354	1,298,494	455,265	617,351	749,486	669,072	431,516
15	996,262	145,265	1,044,196	287,919	1,859,647	645,741	887,167
16	8,670,406	15,131,803	753,395	436,889	1,941,386	1,285,688	565,888
17	4,670,909	9,599,705	1,867,114	1,383,234	1,305,880	1,221,292	581,988

Tabla 4.1. Áreas de los picos de los analitos después del análisis por HF-LPME a partir de los ensayos RCCD. (Fuente: Elaboración propia)

Se puede observar que la temperatura (T) y la longitud del HF (L) tienen los efectos más significativos en la respuesta de todos los analitos objetivo (las variables con términos al cuadrado indican un alto efecto en la respuesta del analito). El tiempo de extracción también tiene un efecto significativo en la respuesta de PCB116, como se puede ver en su modelo de ecuaciones. En casi todos los ensayos, la interacción entre la temperatura (T) y la longitud del HF (L) mejora las áreas de pico de los PCB.

La figura 4.4 muestra la respuesta combinada 3D y los gráficos de contorno frente al tiempo, la longitud y la temperatura, así como el punto óptimo. Los valores codificados óptimos se fijaron en las siguientes coordenadas: temperatura (T)=0,00, tiempo de extracción (tm)=0,0 0

y longitud de HF (L)=0,00, que corresponden a los valores decodificados de 40°C para la temperatura de extracción, 30 min para el tiempo de extracción y 5 cm de longitud.

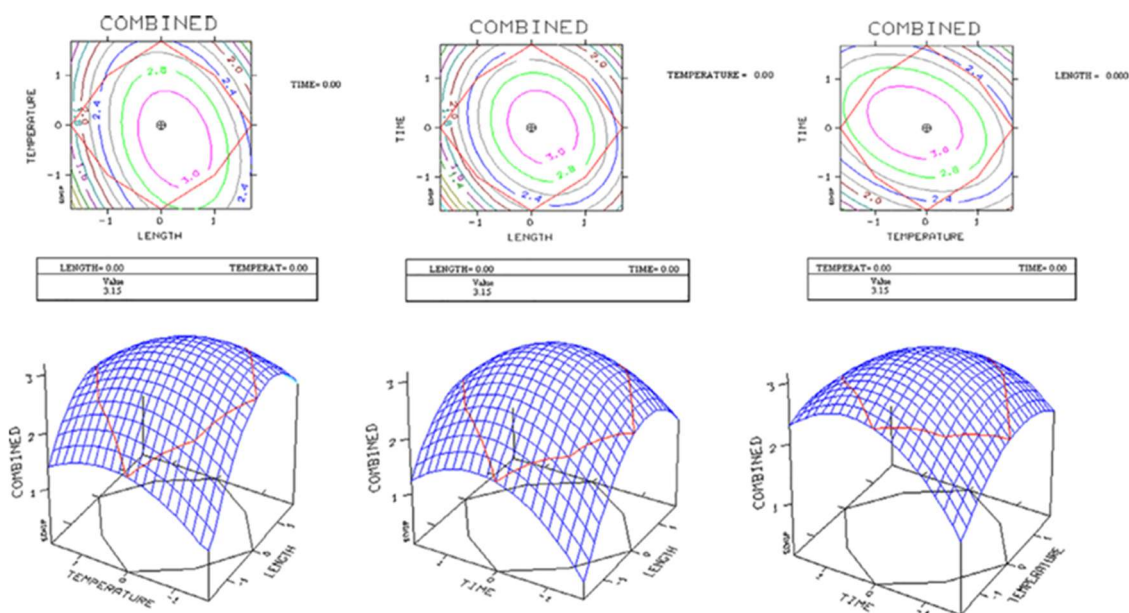


Figura 4.4. Gráficos combinados de respuesta 3D y de contorno de la forma de la superficie en función de los ejes de temperatura, tiempo y longitud, así como el punto óptimo. (Fuente: Elaboración propia)

Procedimiento experimental optimizado

Una vez optimizados los parámetros de extracción, se concluyó el procedimiento experimental. Las fibras se cortaron en porciones de 5 cm y luego se limpiaron en un baño de ultrasonidos con acetona durante 10 min. Luego, la fibra limpia y secada al aire se insertó en una de las agujas de jeringa médica. La fase extractante tolueno (500 μL) se cargó en el lumen de la membrana mediante la inmersión de la fibra en un vial que contenía ese solvente, evitando el llenado incompleto y las burbujas de aire. El segundo extremo de la fibra se insertó en otra aguja de jeringa. Ambas jeringas se introdujeron a través del septum en un vial que contenía tolueno durante 1 min para llenar los poros de la membrana con la fase extractante (SLM). Posteriormente, la fibra en forma de U se introdujo en un vial de vidrio de 10 mL con 7 mL de muestra (fase de muestra). La extracción se realizó en modo de inmersión directa durante 40 min a 36 °C y 600 rpm. Posteriormente, el extracto se recogió del lumen y se vertió en un vial de 1,5 mL con un inserto de 250 μL separando un extremo de la fibra de la jeringa. Finalmente, se obtuvieron 10 μL de la fibra y 1 μL se inyectó en GC- $\mu\text{ECD/MS}$.

Comparación Inyección directa vs. HF-LPME

La figura 4.5 muestra los cromatogramas obtenidos de una muestra de leche materna humana enriquecida con 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de PCB antes y después de la extracción utilizando HF-LPME seguido de GC- μECD .

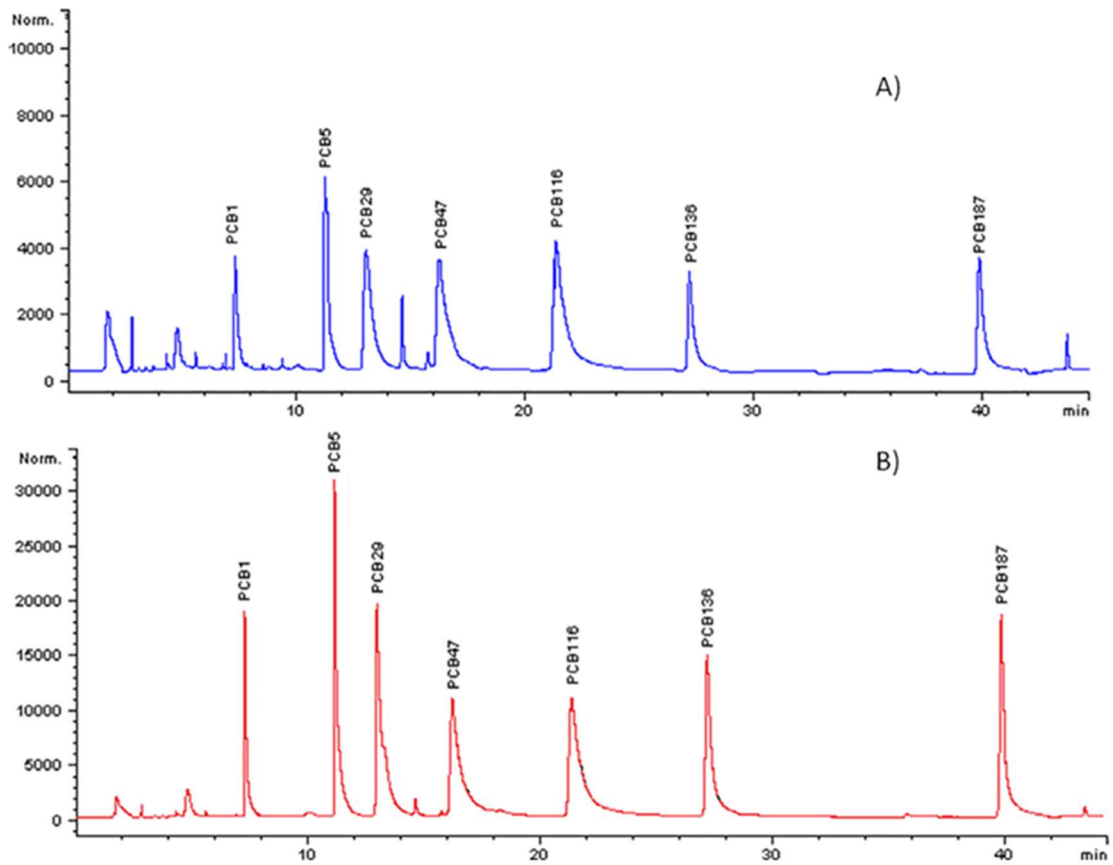
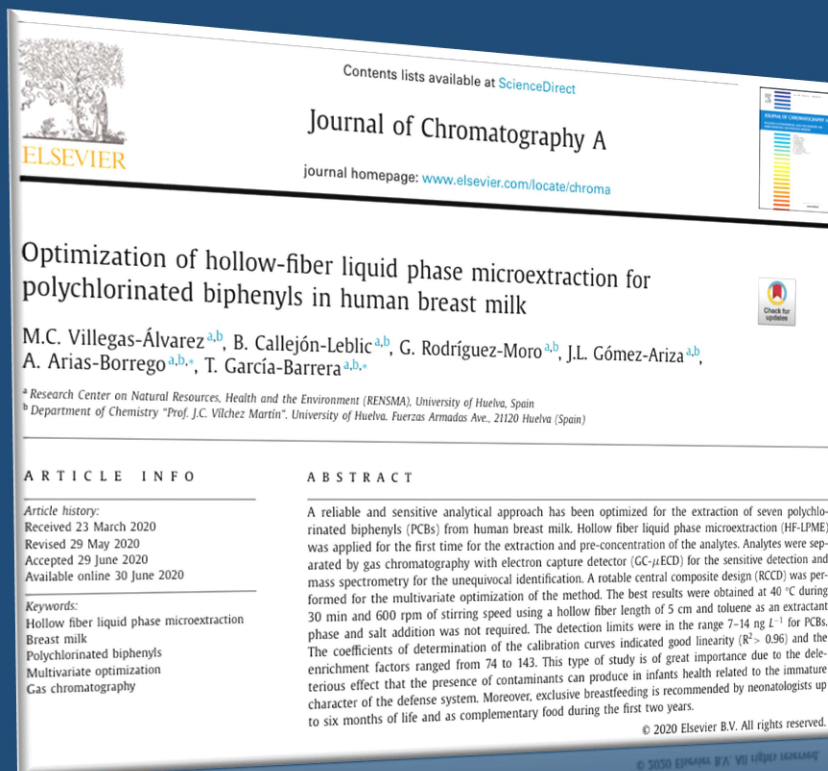


Figura 4.5. Cromatogramas obtenidos a partir de una muestra de leche materna humana enriquecida con $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de PCBs antes (A) y después (B) de la extracción mediante HF-LPME seguida de GC- μ ECD. (Fuente: Elaboración propia)

Como se puede observar, los factores de enriquecimiento son muy altos, así como la selectividad obtenida después de la optimización precisa del HF-LPME combinado con la alta selectividad y sensibilidad del detector ECD para compuestos halogenados.

ARTÍCULO 1





Optimization of hollow-fiber liquid phase microextraction for polychlorinated biphenyls in human breast milk

M.C. Villegas-Álvarez^{a,b}, B. Callejón-Leblic^{a,b}, G. Rodríguez-Moro^{a,b}, J.L. Gómez-Ariza^{a,b},
A. Arias-Borrego^{a,b,*}, T. García-Barrera^{a,b,*}

^a Research Center on Natural Resources, Health and the Environment (RENSMA) University of Huelva, Spain

^b Department of Chemistry "Prof. J.C. Vilchez Martín", University of Huelva, Fuerzas Armadas Ave., 21120 Huelva (Spain)

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 March 2020

Revised 29 May 2020

Accepted 29 June 2020

Available online 30 June 2020

Keywords:

Hollow fiber liquid phase microextraction

Breast milk

Polychlorinated biphenyls

Multivariate optimization

Gas chromatography

ABSTRACT

A reliable and sensitive analytical approach has been optimized for the extraction of seven polychlorinated biphenyls (PCBs) from human breast milk. Hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME) was applied for the first time for the extraction and pre-concentration of the analytes. Analytes were separated by gas chromatography with electron capture detector (GC- μ ECD) for the sensitive detection and mass spectrometry for the unequivocal identification. A rotatable central composite design (RCCD) was performed for the multivariate optimization of the method. The best results were obtained at 40 °C during 30 min and 600 rpm of stirring speed using a hollow fiber length of 5 cm and toluene as an extractant phase and salt addition was not required. The detection limits were in the range 7–14 ng L⁻¹ for PCBs. The coefficients of determination of the calibration curves indicated good linearity ($R^2 > 0.96$) and the enrichment factors ranged from 74 to 143. This type of study is of great importance due to the deleterious effect that the presence of contaminants can produce in infants health related to the immature character of the defense system. Moreover, exclusive breastfeeding is recommended by neonatologists up to six months of life and as complementary food during the first two years.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are environmental pollutants with deleterious effects for humans, characterized by a high persistence and bioaccumulation capacity [1–3]. They are a class of persistent organic pollutants (POPs), considered a major public concern [4]. The existing 209 congeners contain from one to eight atoms of chlorine in different positions, which belong to poly-, mono- and non-ortho substituted PCBs. They are semivolatile, hydrophobic and have the basic unit of biphenyl, being structurally similar to thyroid hormones, which in turn led to thyroid disruption [5].

They were widely produced between 1930 and 1985 from industry, where they were used as plasticizers, insulating fluids in electric instruments and as sealants additives [6]. As a rule, the main source of PCBs are industries [7], leakage from landfills, incomplete incineration, inappropriate disposal, volatilization [7,8] and port activities [9,10]. They are considered as probable human

carcinogens [2] by the Environmental Protection Agency (EPA) and as Group I human carcinogens by the International Agency for Research on Cancer (IARC) classified them [11]. During the prenatal period, exposure to PCBs comes from placental transfer and human breast milk (HBM) [12] causing health problems such as low birth weight [13], reduced head circumference [14], neurological effects [15] and thyroid disruption [5]. For this reason, several studies have suggested the use of breast milk as an indicator of the level of POPs in humans [16,17]. The content of lipids in breast milk is very high ranging from 3.5–4.5 per 100 g (mature milk) and due to the lipophilic character of polychlorinated biphenyls, they are accumulated and transferred to infants during breastfeeding [18].

For this reason, analytical methods for the sensitive and selective extraction, pre-concentration and determination of PCBs in this biological fluid are claimed. To this end, different analytical methods have been described for the extraction of PCBs from breast milk to be later analyzed by gas chromatography, like liquid-liquid extraction (LLE) [19], solid-phase microextraction (SPME) [20], accelerated solvent extraction (ASE) [21] and QuEChERS [16,18,22]. However, although nowadays hollow-fiber liquid phase microextraction (HP-LPME) is a very promising analytical technique, there is not any HP-LPME method described in the lit-

* Corresponding authors; Department of Chemistry, Faculty of Experimental Science, University of Huelva, Campus de El Carmen, 21007, Huelva.

E-mail addresses: ana.arias@dqcm.uhu.es (A. Arias-Borrego), tamara@uhu.es (T. García-Barrera).

erature for the extraction of PCBs from breast milk. The most important advantages of HF-LPME are among others, the simplicity of operation and required equipment [23], low organic solvent consumption, robustness, low cost, disposable character (avoiding memory effects). The technique is based on the use of a supported liquid membrane containing the extractant phase and separated to the sample phase, which led to high surface area for the extraction and high enrichment factors [24].

After the extraction from breast milk, PCBs are usually determined by gas chromatography (GC) with mass spectrometry (MS) and/or electron capture detection (ECD) [16,18,22,25]. The sensitivity of ECD for halogenated compounds is usually better than MS detector, although this last detector allows the unequivocal identification of the compounds by mass spectra databases and tandem mass spectrometry [26].

In this paper, a sensitive and reliable HF-LPME method has been optimized and applied for the first time to the extraction of PCBs from human breast milk. The extracts have been analyzed by both GC-MS and GC- μ ECD for the determination of seven PCBs in breast milk. A multivariate optimization of the variables that affect the extraction was based on the combination and maximization of the response of all the PCBs. This optimization was performed using chemometric tools obtaining high enrichment factors. The developed method was sensitive, simple, reliable, reproducible and low-cost being easily transferable to routine analysis in laboratories to control the occurrence of PCBs in breast milk.

2. Experimental

2.1. Chemical and standard solution preparation

The mixture of PCBs standards (PCB# 1, 5, 29, 47, 116, 136,187,194, 206) were supplied by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Ultrapure water (18.2 M Ω cm) was obtained using a Millipore Milli-Q® Direct 8 equipment (Watford, UK). A solution with all the PCBs was prepared by dissolving in n-hexane the corresponding amount to attain the following concentrations of the standards (mg L⁻¹): PCB1 (100), PCB5 (100), PCB29 (10), PCB47 (10), PCB116 (10), PCB 136 (10) and PCB 187 (5). Intermediate working solutions used in direct injection were daily prepared by stepwise dilution of the above described solution with n-hexane. All the standard solutions were stored in darkness at 4°C until analysis. All reagents and solvents used in this study were of the highest purity. N-hexane, acetone and toluene were supplied by Teknokroma (Barcelona, Spain). The hollow fiber membranes (Accurel Q3/2) were made of polypropylene (inner diameter 600 μ m, wall thickness 200 μ m, pore size 0.2 μ m) (Wuppertal, Germany).

2.2. Samples

Human breast milk samples were taken after 48 h of life and stored at -80 °C until their analysis. Samples were collected at the Juan Ramón Jiménez Hospital, during 2017. Written informed consent was obtained from all the participants and the study was approved by a local ethical committee.

For analytical validation of the method, the sample phase was composed by 350 μ L of human breast milk to a final volume of 7 mL with ultrapure water (18.2 M Ω cm).

2.3. Instrumentation

Extracts were analyzed into a gas chromatograph model 6890 N coupled to a ⁶³Ni microelectron capture detector (GC- μ ECD) (Agilent Technologies, Hewlett Packard, Wilmington, DE, USA). Chromatographic separation was conducted on a DB-5 chromatographic

column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m). The carrier gas was helium (99.999%, 1.2 mL min⁻¹). A volume of 1 μ L of the extracts was injected into the GC using the splitless mode (splitless time: 30 s). The injector temperature was set at 250°C. The oven temperature was programmed at 75°C for 1 min, then increased to 150°C ramped to 30°Cmin⁻¹, to 180°C with a ramp to 5°Cmin⁻¹ held for 15 min, to 190°C ramped to 5°Cmin⁻¹ for 5 min, to 200°C with a ramp of 5°C for 3 min, to 280°C with a ramp of 5°C held for 2.5 min and then raised by 50°Cmin⁻¹ to 290°C with 4.8 min hold time. Nitrogen was used as makeup gas for the ECD detector (60 mL min⁻¹, 99.999%). The ChemStation software package (version A0903) was used for data acquisition. The extracts were simultaneously analyzed on an ion-trap GC-MS model ITQ 900 (Thermo Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific Spa, Rhone, Milan, Italy). The analytical column and oven temperature conditions were same than that used for GC- μ ECD. The injector temperature was set at 250 °C. The carrier gas was helium (1.3 mL min⁻¹). The temperature of the transfer line between the chromatograph and the mass detector was set at 280 °C. For the separation of the peaks, the temperature program of the oven was the same above described for the GC- μ ECD. The ionization of analytes in the mass spectrometer was carried out by electronic impact (EI) with electronic ionization source at 70 eV in selected ion monitoring mode (SIM). PCBs were identified by retention time matching with standards, NIST database and tandem mass spectrometry.

2.4. Extraction of PCBs by HF-LPME

The extraction procedures were optimized prior to the application. The U-shaped configuration of the fiber and two-phase mode were used for HF-LPME. The arrangement is shown in Fig. 1. The fibers were cut into 5 cm portions and then cleaned into an ultrasound bath with acetone during 10 min. Then the cleaned and air-dried fiber was inserted into one of the medical syringe needles. The extractant phase toluene (500 μ L) was loaded into the lumen of the membrane by the immersion of the fiber into a vial containing that solvent, avoiding incomplete filling and air bubbles. The second end of the fiber was inserted into other syringe needle. Both syringes were introduced through of the septum into a vial containing toluene during 1 min in order to fill the pores of the membrane with the extractant phase (SLM). Afterwards, the U-shaped fiber was introduced into a 10 mL glass vial with 7 mL of sample (sample phase). The extraction was carried out in direct immersion mode during 40 min at 36°C and 600 rpm. After that, the extract was collected from the lumen and poured into a 1.5 mL vial with an insert of 250 μ L by separating one end of the fiber from the syringe. Finally, 10 μ L were obtained from the fiber and 1 μ L was injected into GC- μ ECD/MS.

2.5. Optimization of hollow-fiber liquid phase microextraction

The most influential variables in HF-LPME were optimized for the simultaneous analysis of 7 PCBs in human breast milk. Firstly, a preliminary screening using a univariate optimization was carried out to explore the influence of the different variables as well as the range of values that should be optimized. The following variables were studied in this work: extraction solvent, temperature, stirring rate, ionic strength, pH, fiber length and extraction time. After that, a Rotatable Central Composite Design (RCCD) of second order was used for the optimization of the variables taking into account the interactions between them. To this end, the data were processed with the MINITAB®Release 16 Statistical Software (State College, USA). The combined response was also optimized using some homemade programs written in QUICKBASIC.

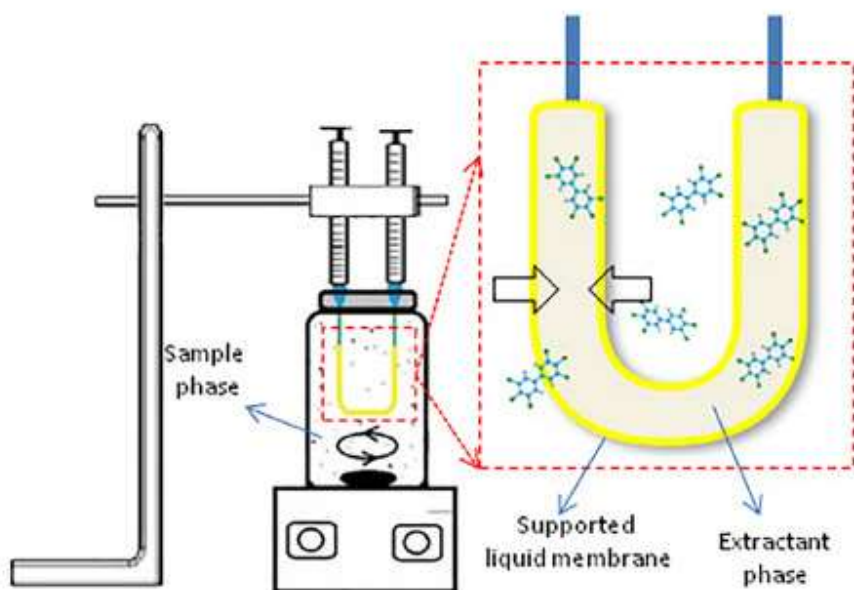


Fig. 1. U-shaped HF-LPME configuration for two-phase extraction of PCBs from human breast milk.

3. Results and discussion

3.1. Screening of the critical variables in the extraction process

A univariate approach was applied to screen the main factors with significant effects on the HF-LPME extraction procedure. To this end, when one of the variables is modified, the other features were set at the following values: temperature (25°C), extraction time (5 min), HF length (4 cm), immersion time (1 min), pH (not adjusted) and sample volume (350 µL). The screened factors have been matching with those selected in most of the previous works about the HF-LPME extraction process of organic compounds [27,28]. The changes in the peak areas of the PCBs were plotted against the variation of each factor optimized and analyzed to select the ranges for the multivariate optimization.

3.1.1. Selection of the extractant phase for the HF-LPME

Several considerations should be taken into account to select the solvent for the extractant phase to be used for the HF-LPME: (i) it should be compatible with the material of the fiber (polypropylene) and (ii) the solvent should be immiscible with water to form two phases for the extraction, (iii) the viscosity should be adequate to allow filling the membrane pores as well as the diffusion of analytes, (iv) low volatility to avoid losses during the extraction procedure [29]. Under these conditions, three organic solvents were checked to extract the target analytes (1-octanol, toluene and n-hexane). Fig. 2 shows the enrichment factors for all the analytes using these solvents concluding that toluene is the most efficient extractant phase for the extraction. Longer times than 1 min to embed the pores of the HF do not enhance the enrichment factors.

3.1.2. Effect of salt addition

The ionic strength could influence the partition coefficients of the analytes when two immiscible phases are in contact, which in turn affects the extraction efficiency. The ionic strength could be increased by adding salt, which could enhance the enrichment factors of the analytes in the organic solvent [27,28,30–34]. To this end, different percentages of sodium chloride were assayed up to 10% (w/v), but any effect was detected. The reason maybe could be the low polar character of the PCBs compounds, which enhance the

extraction and does not need the modification of the ionic strength [35]. This result is in agreement with our previous work [27].

3.1.3. Effect of agitation

The stirring speed is important to enhance the mass transfer of the analytes from the sample phase to the extractant phase, reducing also the extraction time. Thus, the stirring rate was increased up to 1200 rpm, and the results showed a progressive increase of the enrichment factors until 600 rpm (Fig. 3). However, higher values of this variables decrease the reproducibility of the results, mainly due to the occurrence of air bubbles in the solution. Based on these findings, 600 rpm was used in further experiments.

3.1.4. Effect of pH

The effect of pH in the extraction of PCBs by HF-LPME was optimized in the range of 4–12 and the corresponding enrichment factors are shown Fig. 4. Acid conditions were achieved by adding 6 M HCl and basic conditions with 1 M sodium hydroxide. There was no considerable effect in the enrichment factors of the PCBs varying the pH in the range of 6–8, in which the sample pH is included. Thus, the sample pH was not adjusted for subsequent experiments.

3.3. Central composite design

A RCCD was created [28] to optimize the three most important variables: temperature (T), time (t_m) and membrane length (L). The number of experiments of the full factorial design can be calculated by 2^k , where k is the number of variables. These eight experiments can be augmented with 2k star points, which are the vertices of a cross-polytope at the coordinate axes of the design. Finally, C central points are included as replicates. Thus, for three variables to optimize, the CCD consist of 17 experiments ($2^k + 2k + C$). The variables to be optimized has five coded levels ($-\alpha, -1, 0, 1, \alpha$), where $\alpha = 2^{1/4} (-1.68)$, the star arm (distance) from the center to a star point. The $-\alpha$ (minimum) and $+\alpha$ (maximum) define the range of parameters to be optimized. To avoid systematic errors the trials were randomized. Table 1 collect the trials included in the RCCD showing the real and coded levels. Table 2 shows the response (areas peak of the analytes) of the PCBs obtained by HF-LPME in the different trials for the optimization of

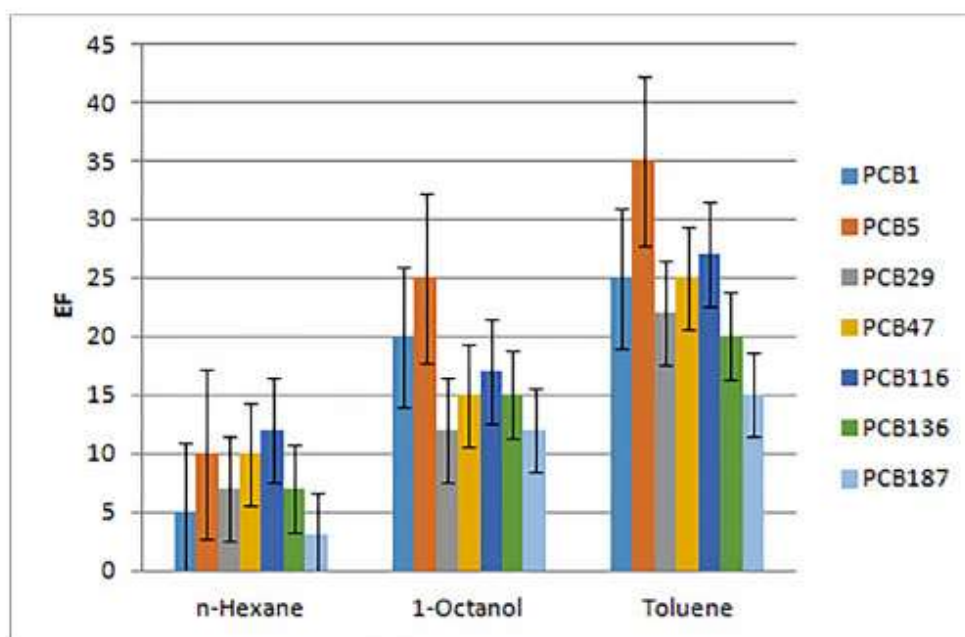


Fig. 2. Mean values ($n = 3$) of the enrichment factors for the analytes using different solvents.

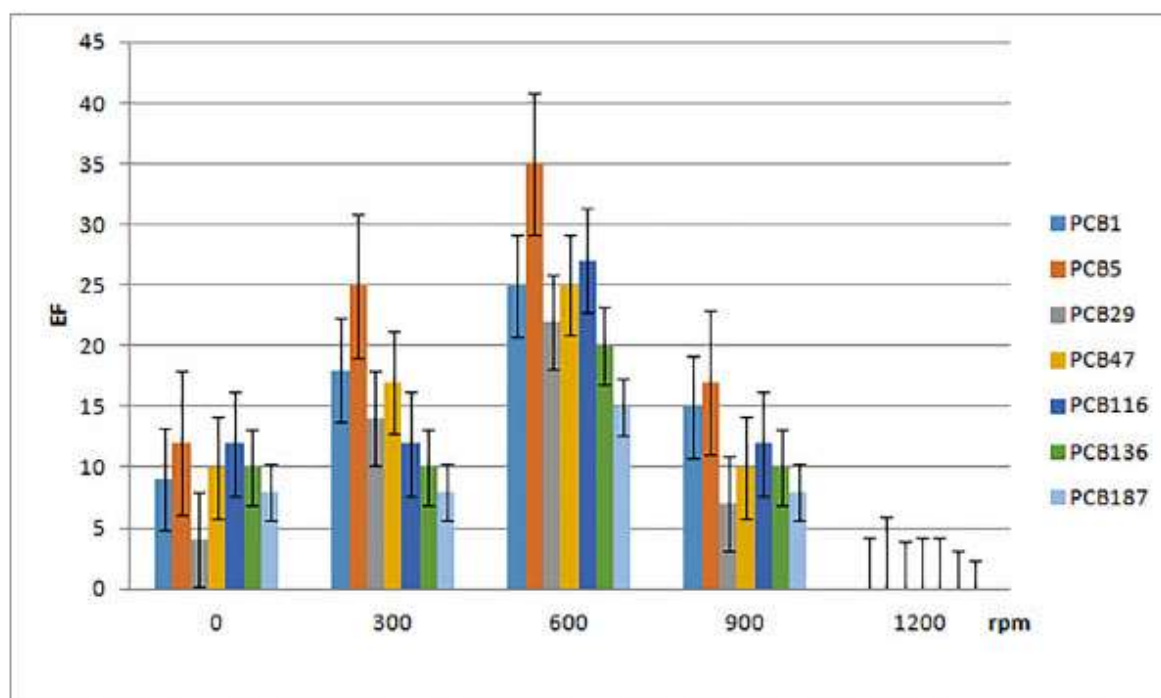


Fig. 3. Mean values ($n = 3$) of the enrichment factors for the analytes at different stirring speeds.

the temperature, extraction time and membrane length. After that, a regression analysis was performed to obtain reduced models of polynomial equations to calculate the response of the analytes using the studied variables (Table 3). A significant Student's "t-test" was performed to obtain the regression coefficients b_k , $s(b_k)$. An effect is considered significant when $t_k = |b_k|/s(b_k)$ is greater than the tabulated $t_{crit,c}$, (v, P), with v degrees of freedom ($v =$ number

of run – number of coefficients to be calculated), at a P confidence level of 95% ($p\text{-value} > 0.05$).

As we can see in Table 3, the temperature (T) and the HF length (L) have the most significant effects in the response of all the target analytes (the variables with squared terms indicate a high effect in the response of the analyte). The extraction time also has a significant effect in the response of PCB116, as can be seen in its

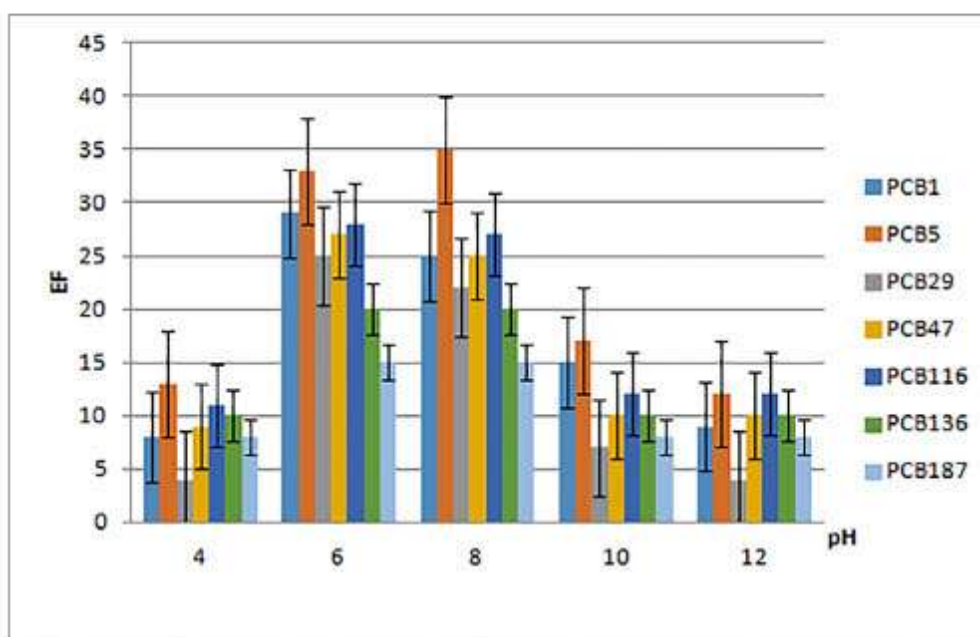


Fig. 4. Mean values ($n = 3$) of the enrichment factors for the analytes at different pH.

Table 1
Experiments performed in the design of the RCCD.

Run	Time min (X1)		Temperature °C (X2)		Length cm (X3)	
	Coded level	Real level	Coded level	Real level	Coded level	Real level
1	-1	20	-1	35	-1	4
2	1	40	-1	35	-1	4
3	-1	20	1	45	-1	4
4	1	40	1	45	-1	4
5	-1	20	-1	35	1	6
6	1	40	-1	35	1	6
7	-1	20	1	45	1	6
8	1	40	1	45	1	6
9	0	30	0	40	0	5
10	0	30	0	40	0	5
11	-1,68	13,2	0	40	0	5
12	1,68	46,8	0	40	0	5
13	0	30	-1,68	31,6	0	5
14	0	30	1,68	48,4	0	5
15	0	30	0	40	-1,68	3,32
16	0	30	0	40	1,68	6,68
17	0	30	0	40	0	5

Table 2
Peak areas of the analytes after the analysis by HF-LPME from the RCCD trials.

Run	PCB 1	PCB 5	PCB 29	PCB 47	PBC 116	PCB 136	PCB 187
1	1,445,437	151,166	341,421	2,982,558	992,053	576,920	1,079,141
2	1,224,615	315,737	459,125	2,072,237	2,018,372	1,072,200	1,138,348
3	2,532,024	978,107	290,671	144,663	445,166	1,094,476	684,602
4	1,514,127	106,678	381,923	151,113	739,466	986,393	670,114
5	2,090,428	13,532,203	1,635,603	803,381	471,934	2,719,882	241,383
6	1,787,659	18,015,125	1,041,421	873,296	823,271	2,091,914	385,883
7	1,981,037	17,599,705	395,431	754,873	774,625	1,484,487	533,688
8	215,935	10,079,523	249,864	784,821	1,092,053	1,363,427	421,684
9	32,821,417	8,971,327	1,635,202	1,906,952	14,896,527	1,270,088	565,888
10	47,586,625	9,125,733	1,444,278	1,706,678	13,739,257	1,592,765	542,409
11	8,670,406	338,390	810,645	229,711	236,551	1,098,930	394,146
12	10,514,127	13,151,374	1,637,315	1,893,551	21,003,809	1,177,669	498,725
13	4,670,909	11,119,787	1,980,343	1,935,806	15,188,631	1,962,856	569,321
14	5,709,354	1,298,494	455,265	617,351	749,486	669,072	431,516
15	996,262	145,265	1,044,196	287,919	1,859,647	645,741	887,167
16	8,670,406	15,131,803	753,395	436,889	1,941,386	1,285,688	565,888
17	4,670,909	9,599,705	1,867,114	1,383,234	1,305,880	1,221,292	581,988

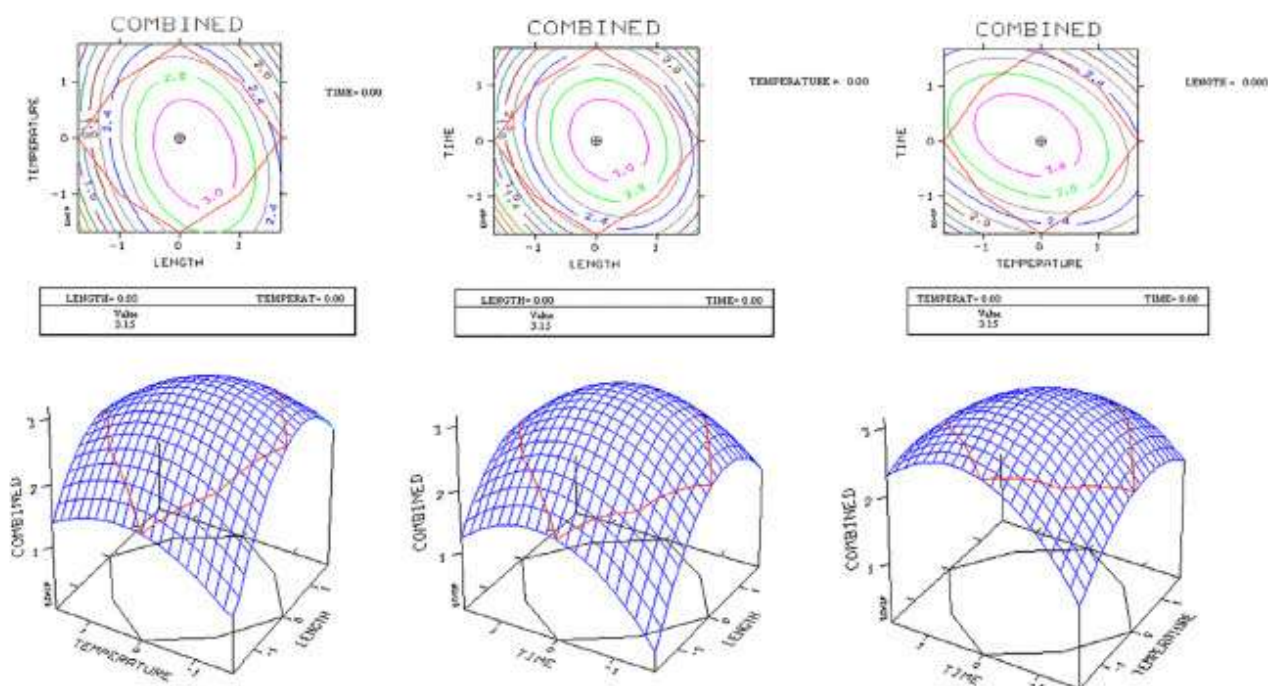


Fig. 5. 3D combined response and contour plots of the surface shape against the temperature, time and length axis as well as the optimum point.

Table 3
Mathematical models of responses and variables.

Model equation
PCB1=285,974-900493T ² -913135L ²
PCB5=917,345+607208L
PCB29=168,089-346052T-372945L ²
PCB47=165,103-521151T+577754T*L + 412916L ²
PCB116=103,614+27027tm-186973T-65655L
PCB136=134,154-271583T+366794L-299454T*L
PCB187=557,634-185368L+148860T*L + 77180L ²
Equation model: $y = B_0 + \sum B_{0i}X_i + \sum B_{ij}X_i^2 + \sum B_{ij}X_iX_j$
Response (peak area)
Variables: T (temperature), tm (extraction time), L (HF length)

equation model. In almost all the trials, the interaction between the temperature (T) and HF length (L) enhance the peak areas of the PCBs.

In order to have the compromise of the best response of each analyte according to the variables used, the responses of all the analytes were combined for a better optimization. In this way, the analytical operations are simplified and avoided possible rounding mistakes and without neglecting any term. The response variable, namely "Combined Response" is the weighed sum of all the responses using the equation (Eq. (1)):

$$COMB = \sum_i \left\{ kw_i \left| \frac{Y_i - G_i}{R_i} \right| \right\}$$

Where w_i is the weight of the variable, which can be chosen by the user (generally the unity), Y_i are the different responses for the optimization and R_i their range. When the aim is the maximization of the combined response, then G_i =minimum in the range $(Y_i - 1/2R_i)$ and $K = 1$. The randomized optimization of the combined surface (tm, L, T) is carried out using a homemade algorithm and the simultaneous optimum is the maximum of the COMB surface. Several previous studies have used this optimization method with

very good results [27,36]. Fig. 5 shows the 3D combined response and contour plots against the time, length and temperature as well as the optimum point. The optimum coded values were fixed at the following coordinates: temperature (T)=0.00, extraction time (tm)=0.00, and HF length (L)=0.00, which correspond to the decoded values of 40 °C for the extraction temperature, 30 min for the extraction time and 5 cm of length.

3.4. Method validation

For method validation, the figures of merit of the optimized HF-LPME GC-μECD method were calculated for the analysis of PCBs (Table 4) such as: coefficients of determination (R^2), linear range, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), relative standard deviation (%RSD) and enrichment factors (EF). The experiments were performed using a spiked sample phase (350 μL of human breast milk diluted with ultrapure water to a final volume of 7 mL). PCBs were under the detection limits in the samples used for method validation. The linearity was in the range 0.02 to 140 μg L⁻¹ for PCB29 and PCB47, 0.05 to 70 μg L⁻¹ for PCB187, and in the range of 0.03 to 140 μg L⁻¹ for other PCBs determined, and the determination coefficients ranged from 0.96 to 0.98. Seven different concentration levels of the PCBs under study were prepared and analyzed to determine the LODs and LOQs. The limits of detection were calculated as the concentration corresponding to a peak area 3-fold higher than the background noise, and the limits of quantification as the concentration corresponding to a peak area 10-fold higher than the background noise of the chromatogram (LOQ=10S/N). The LOD values ranged from 8 to 14 ng L⁻¹ with the proposed method. These results are very low when compared with other methods previously published in literature Table 5. Under optimized HF-LPME conditions, the enrichment factors (EF), calculated as the ratio between the PCBs concentration in the extractant phase (Ca) and their initial concentration in the sample phase (Cd) [28,37], were satisfactory in the range of 74 to

Table 4
Figures of merit of the HF-LPME/GC- μ ECD approach for the analysis of PCBs in human breast milk.

	Precursor ion m/z^a	Recovery (%)	Repeatability RSD (%) ^a	Reproducibility RSD (%) ^b	EF	Range (ng L ⁻¹)	R ²	LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ng L ⁻¹)
PCB 1	188,08	73	5	7	124	30–1400	0,96	10	33
PCB 5	222,07	70	7	10	168	30–1400	0,98	8	27
PCB 29	256,05	82	6	9	128	20–1400	0,98	7	23
PCB 47	291,97	117	6	8	128	20–1400	0,97	8	27
PCB 116	325,98	97	9	11	144	30–1400	0,98	9	29
PCB 136	359,96	80	7	10	118	30–1400	0,97	10	33
PCB 187	395,88	72	4	7	75	50–700	0,97	14	47

^a Intra-day precision, calculated by extracting $n = 5$.

^b Inter-day precision, calculated by extracting $n = 5$.

* The compounds are unequivocally identified by GC-MS.

Table 5
Comparison of parameters validation of the proposed method with others previously published for the extraction of PCBs in human breast milk.

Method	SPME [22]			QuEChERS [16,18]			
	LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ng L ⁻¹)	Recovery (%)	LOD (ng L ⁻¹)	Intra-day RSD (%)	Inter-day RSD (%)	Recovery (%)
PCB 1	-	-	-	-	-	-	-
PCB 5	-	-	-	-	-	-	-
PCB 29	1650	5000	83	200	4	11	96
PCB 47	2240	6790	99	200	14	10	102
PCB 116	1840	4330	101	100	9	9	107
PCB 136	1140	3470	101	100	7	10	104
PCB 187	1000	3040	96	50	8	11	101

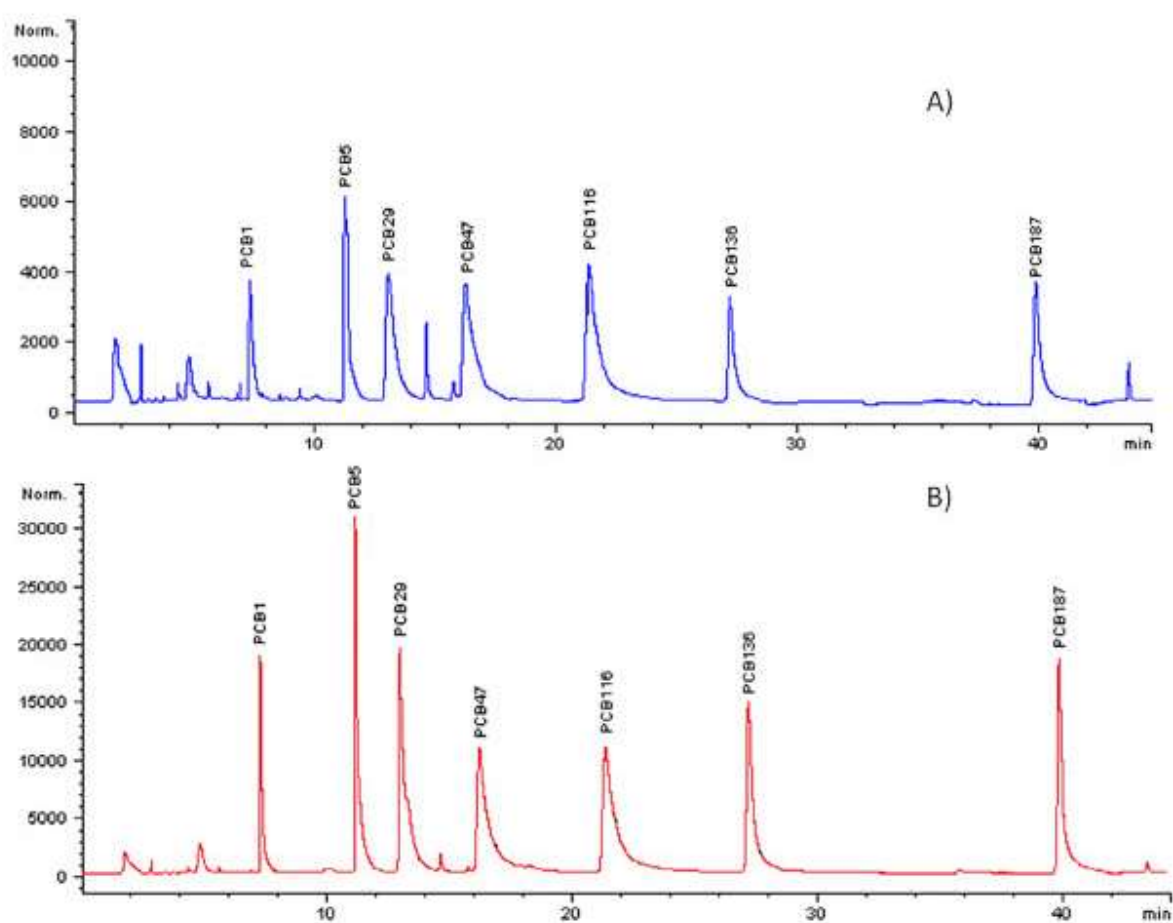


Fig. 6. Chromatograms obtained from a human breast milk sample spiked with 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ of PCBs before (blue line) and after (red line) the extraction using HF-LPME followed GC- μ ECD.

143-fold that is in good agreement with other published works related with the use of HP-LPME for other food samples [27]. The results have confirmed that the features of the method are very good and the methodology can be successfully applied for the analysis of samples.

The optimized method has been applied to human breast milk for the analysis of a group of seven PCBs. In spite of human breast milk is a sample matrix very complex the proposed method is very simple because it does not include a sample preparation step, which is mainly due to the excellent clean-up capability of the HF-LPME technique. In fact, this procedure involves only an initial dilution of the sample in ultrapure water, followed by two-phase HF-LPME. To this end, the extraction recoveries (ER) were calculated using the sample phase fortified at three different concentrations ($100 \mu\text{g L}^{-1}$ of PCB1 and PCB5, $5 \mu\text{g L}^{-1}$ of PCB187 and $10 \mu\text{g L}^{-1}$ of other PCBs). Recoveries obtained ranged from 70 to 109% at those spiked level, which are in good agreement with other methods proposed in the literature (Table 4 and 5) [18,27,38]. For method precision evaluation, the reproducibility (inter-day) and repeatability (intra-day) were calculated using the same spiked sample phase than that for the extraction recoveries. Five replicates were analyzed in the same day for the repeatability and the results were very good ranging from 4 to 9% for PCBs, when they are compared with other methods [18,27,38]. The reproducibility was calculated with five replicated analysis over 3 different days. The results were very good in the range of 7 to 11% [18,27,38]. Fig. 6 show the chromatograms obtained from a sample of human breast milk spiked with $10 \mu\text{g L}^{-1}$ of PCBs before and after the extraction using HF-LPME followed GC- μ ECD. As can be seen, the enrichment factors are very high, as well as the selectivity obtained after the accurate optimization of the HF-LPME combined with the high selectivity and sensitivity of the ECD detector for halogenated compounds.

3.5. Comparison of the developed method with current methods

Taking into account the extraction efficiency (enrichment factors) and sensitivity (LODs), the proposed approach was in good agreement with other methods for the extraction and preconcentration of the analytes from human breast milk. On the basis of the analytical features collected in Table 4, the optimized method revealed that the LODs were very close to other analytical methods previously proposed in the literature, and the repeatability and (%RSD) the reproducibility (%RSD) were lower than those of other reported (Table 4 and 5). On the other hand, it is remarkable that the extraction time of the HF-LPME method is shorter than those of other methods. The comparison of the results revealed that the developed method is rapid, accurate and simple for the sensitive determination of PCBs in human breast milk samples.

4. Conclusions

In this work, a simple, effective and selective HF-LPME method has been accurately optimized for the analysis of PCBs from human breast milk, involving low consumption of organic solvents, high pre-concentration factors of the analytes and relatively low cost. This is the first time that HF-LPME is applied to breast milk samples for the extraction of PCBs, which are environmental pollutants with important deleterious effects in human health. A rotatable second-order central composite multivariate design was applied to determine the operational variables which allows obtaining maximum peak areas of seven PCBs in human breast milk. The proposed method allows obtaining limits of detection in the range of $7\text{--}14 \text{ ngL}^{-1}$ with average recoveries of 85% for the target analytes and enrichment factors very satisfactory when compared with previous analytical methods for the analysis of PCBs in breast milk.

The proposed method can be easily automatizable, converted into a green analytical technique and transferrable to routine applications due to its low cost, sensitivity, simplicity, robustness and utility.

Declaration of competing interest

None.

CRediT authorship contribution statement

M.C. Villegas-Álvarez: Investigation. **B. Callejón-Leblic:** Investigation. **G. Rodríguez-Moro:** Investigation. **J.L. Gómez-Ariza:** Writing - review & editing, Resources. **A. Arias-Borrego:** Validation, Visualization, Methodology, Investigation, Supervision, Writing - original draft, Writing - review & editing. **T. García-Barrera:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Supervision, Writing - original draft, Writing - review & editing, Funding acquisition, Resources.

Acknowledgements

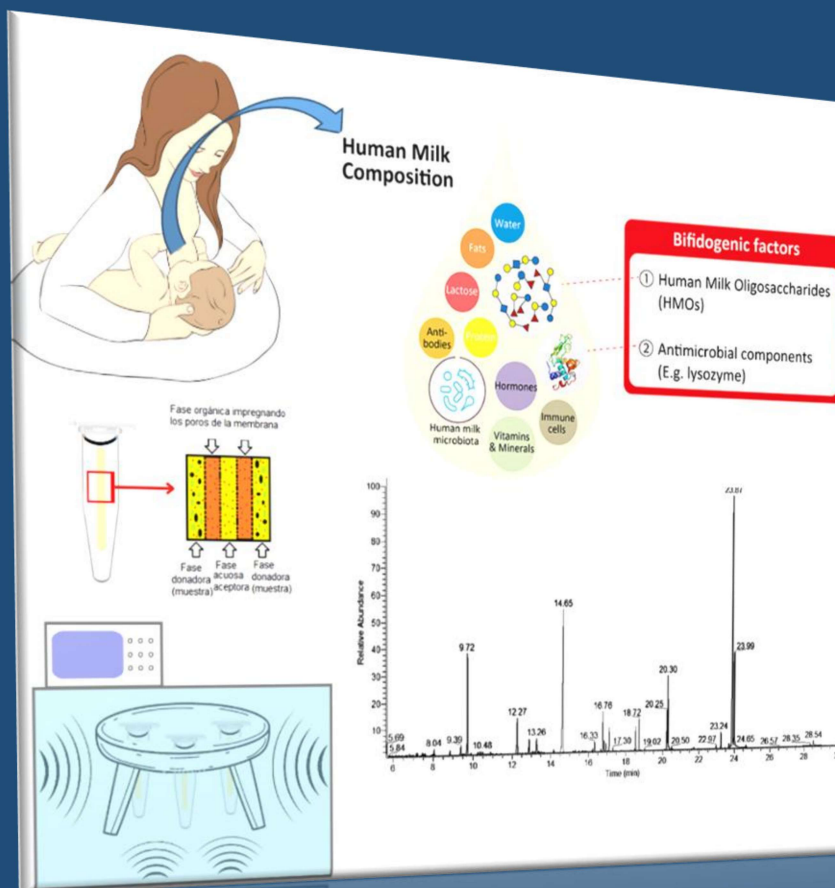
The authors thank projects UHU-1256905 (Operative program FEDER-Andalusia 2014–2020, Consejería de Economía, Conocimiento, Empresa y Universidad, Spain) and PGC2018-096608-B-C21 (Ministry of Science and Innovation, Spain). Authors also thank European Community (FEDER) for financial support (UNHU15-CE-3140 and UNHU13-1E-1611). The authors thank Dr. Eduardo García-Soblechero, Celia Pérez-Serralbo and Dr. Elisabeth Gómez-Santos, from the Pediatric Unit of Juan Ramón Jiménez Hospital for the collection of samples.

References

- [1] A. Naqvi, A. Qadir, A. Mahmood, M. Baqar, I. Aslam, N. Jamil, M. Mumtaz, S. Saeed, G. Zhang, Screening of human health risk to infants associated with the polychlorinated biphenyl (PCB) levels in human milk from Punjab Province, Pakistan, *Environ. Sci. Pollut. Res.* (2019) In Press, doi:10.1007/s11356-019-07126-2.
- [2] US EPA 2015., Learn about Polychlorinated Biphenyls (PCBs) [Internet]. n.d. <https://www.epa.gov/pcbs/learn-about-polychlorinated-biphenyls-pcbs>.
- [3] H. Arfaeinia, Z. Asadgol, E. Ahmadi, M. Seifi, M. Moradi, S. Dobaradaran, Characteristics, distribution and sources of polychlorinated biphenyls (PCBs) in coastal sediments from the heavily industrialized area of Asalouyeh, Iran, *Water Sci. Technol* 76 (2017) 3340–3350, doi:10.2166/wst.2017.500.
- [4] B. Cetin, S. Yurdakul, M. Keles, I. Celik, F. Ozturk, C. Dogan, Atmospheric concentrations, distributions and air-soil exchange tendencies of PAHs and PCBs in a heavily industrialized area in Kocaeli, *Chemosphere* 183 (2017) 69–79, doi:10.1016/j.chemosphere.2017.05.103.
- [5] Z.-M. Li, M. Albrecht, H. Fromme, K.-W. Schramm, M. De Angelis, Persistent Organic Pollutants in Human Breast Milk and Associations with Maternal Thyroid Hormone Homeostasis, *Environ. Sci. Technol* 54 (2020) 1111–1119, doi:10.1021/acs.est.9b06054.
- [6] M.D. Erickson, R.G. Kaley, Applications of polychlorinated biphenyls, *Environ. Sci. Pollut. Res* 18 (2011) 135–151, doi:10.1007/s11356-010-0392-1.
- [7] N. Cardellicchio, A. Buccolieri, S. Giandomenico, L. Lopez, F. Pizzulli, L. Spada, Organic pollutants (PAHs, PCBs) in sediments from the Mar Piccolo in Taranto (Ionian Sea, Southern Italy), *Mar. Pollut. Bull.* 55 (2007) 451–458, doi:10.1016/j.marpolbul.2007.09.007.
- [8] F. Smedes, J. De Boer, Determination of chlorobiphenyls in sediments - Analytical methods, *TrAC - Trends Anal. Chem* 16 (1997) 503–517, doi:10.1016/S0165-9936(97)00080-0.
- [9] S.H. Hong, U.H. Yim, W.J. Shim, J.R. Oh, Congener-specific survey for polychlorinated biphenyls in sediments of industrialized bays in Korea; regional characteristics and pollution sources, *Environ. Sci. Technol* 39 (2005) 7380–7388, doi:10.1021/es050397c.
- [10] S.H. Hong, U.H. Yim, W.J. Shim, D.H. Li, J.R. Oh, Nationwide monitoring of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in sediments from coastal environment of Korea, *Chemosphere* 64 (2006) 1479–1488, doi:10.1016/j.chemosphere.2005.12.056.
- [11] B. Lauby-Secretan, D. Loomis, Y. Grosse, F. El Ghissassi, V. Bouvard, L. Benbrahim-Tallaa, N. Guha, R. Baan, H. Mattock, K. Straif, Carcinogenicity of polychlorinated biphenyls and polybrominated biphenyls, *Lancet Oncol* 14 (2013) 287–288, doi:10.1016/S1470-2045(13)70104-9.

- [12] M.H.B. Müller, A. Polder, O.B. Brynildsrud, R. Grønnestad, M. Karimi, E. Lie, W.B. Manyillzu, R.H. Mdegele, F. Mokiti, M. Murtadha, H.E. Nonga, J.U. Skaare, A. Solhaug, J.L. Iyche, Prenatal exposure to persistent organic pollutants in Northern Tanzania and their distribution between breast milk, maternal blood, placenta and cord blood, *Environ. Res* 170 (2019) 433–442, doi:10.1016/j.envres.2018.12.026.
- [13] M.P. Longnecker, M.A. Klebanoff, H. Zhou, J.W. Brock, Association between maternal serum concentration of the DDT metabolite DDE and preterm and small-for-gestational-age babies at birth, *Lancet* 358 (2001) 110–114, doi:10.1016/S0140-6736(01)05329-6.
- [14] M.H.B. Müller, A. Polder, O.B. Brynildsrud, M. Karimi, E. Lie, W.B. Manyillzu, R.H. Mdegele, F. Mokiti, M. Murtadha, H.E. Nonga, J.U. Skaare, J.L. Iyche, Organochlorine pesticides (OCPs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in human breast milk and associated health risks to nursing infants in Northern Tanzania, *Environ. Res* 154 (2017) 425–434, doi:10.1016/j.envres.2017.01.031.
- [15] N. Ribas-Fitó, M. Cardo, M. Sala, C. Eulàlia de Muga, A. Mazón, M. Verdú, J.O. Kogevinas, J. Grimait, Sunyer, Breastfeeding, exposure to organochlorine compounds, and neurodevelopment in infants, *Pediatrics* 111 (2003) e580–e585, doi:10.1542/peds.111.5.e580.
- [16] O.P. Luzardo, N. Ruiz-Suárez, M. Almeida-González, L.A. Henríquez-Hernández, M. Zumbado, L.D. Boada, Multi-residue method for the determination of 57 Persistent Organic Pollutants in human milk and colostrum using a QuEChERS-based extraction procedure, *Anal. Bioanal. Chem* 405 (2013) 9523–9536, doi:10.1007/s00216-013-7377-0.
- [17] I. Çök, B. Mazmanci, M.A. Mazmanci, C. Turgut, B. Henkelmann, K.W. Schramm, Analysis of human milk to assess exposure to PAHs, PCBs and organochlorine pesticides in the vicinity Mediterranean city Mersin, Turkey, *Environ. Int* 40 (2012) 63–69, doi:10.1016/j.envint.2011.11.012.
- [18] M. Pajewska-Szmyt, E. Sinkiewicz-Darol, U. Bernatowicz-Lojko, T. Kowalkowski, R. Gadzala-Kopciuch, B. Buszewski, QuEChERS extraction coupled to GC-MS for a fast determination of polychlorinated biphenyls in breast milk from Polish women, *Environ. Sci. Pollut. Res* 26 (2019) 30988–30999, doi:10.1007/s11356-019-06201-y.
- [19] V. Bencko, M. Černá, L. Jech, J. Šmíd, Exposure of breast-fed children in the Czech Republic to PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs, *Environ. Toxicol. Pharmacol* 18 (2004) 83–90, doi:10.1016/j.etap.2004.01.009.
- [20] L. Röhrig, H.U. Meisch, Application of Solid Phase Micro Extraction for the rapid analysis of chlorinated organics in breast milk, *Fresenius. J. Anal. Chem* 366 (2000) 106–111, doi:10.1007/s002160050019.
- [21] J. She, A. Holden, M. Sharp, M. Tanner, C. Williams-Derry, K. Hooper, Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in breast milk from the Pacific Northwest, *Chemosphere* 67 (2007) S307–S317, doi:10.1016/j.chemosphere.2006.05.154.
- [22] C.H. Kowalski, G.A. da Silva, R.J. Poppi, H.T. Godoy, F. Augusto, Neuro-genetic multi-optimization of the determination of polychlorinated biphenyl congeners in human milk by headspace solid phase microextraction coupled to gas chromatography with electron capture detection, *Anal. Chim. Acta* 585 (2007) 66–75, doi:10.1016/j.aca.2006.11.073.
- [23] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, T. Grønhaug Halvorsen, Liquid-liquid extraction procedures for sample enrichment in capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 902 (2000) 91–105, doi:10.1016/S0021-9673(00)00738-X.
- [24] J. Lee, H.K. Lee, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Environmental and bio-analytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: a review, *Anal. Chim. Acta* 624 (2008) 253–268, doi:10.1016/j.aca.2008.06.050.
- [25] B. Deng, J.Q. Zhang, L. Zhang, Y.S. Jiang, J. Zhou, D. Fang, H. Zhang, H.Y. Huang, Levels and profiles of PCDD/Fs, PCBs in mothers' milk in Shenzhen of China: estimation of breast-fed infants' intakes, *Environ. Int* 42 (2012) 47–52, doi:10.1016/j.envint.2011.03.022.
- [26] A.D. Nikolaou, T.D. Lekkas, S.K. Goltinopoulos, M.N. Kostopoulou, Application of different analytical methods for determination of volatile chlorination by-products in drinking water, *Talanta* 56 (2002) 717–726, doi:10.1016/S0039-9140(01)00613-0.
- [27] J. Manso, T. García-Barrera, J.L. Gómez-Ariza, New home-made assembly for hollow-fiber membrane extraction of persistent organic pollutants from real world samples., *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 7923–7935, doi:10.1016/j.chroma.2011.09.023.
- [28] A. Domínguez-Tello, A. Arias-Borrego, T. García-Barrera, J.L. Gómez-Ariza, Application of hollow fiber liquid phase microextraction for simultaneous determination of regulated and emerging iodinated trihalomethanes in drinking water, *J. Chromatogr. A*, 1402 (2015) 8–16, doi:10.1016/j.chroma.2015.05.020.
- [29] M. Ghambarian, Y. Yamini, A. Esratli, Developments in hollow fiber based liquid-phase microextraction; principles and applications, *Microchim. Acta* 177 (2012) 271–294, doi:10.1007/s00604-012-0773-x.
- [30] S.-D.H. Pai-Shan Chen, Determination of ethoprop, diazinon, disulfoton and fenthion using dynamic hollow fiber-protected liquid-phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry, *Talanta* 69 (2006) 669–675.
- [31] P.H. Howard, W.M. Meylan, *Handbook of Physical Properties of Organic Chemicals*, CRC-Press, Taylor & Francis, Florida, U.S., 1997.
- [32] C. Basheer, R. Balasubramanian, H.K. Lee, Determination of organic micropollutants in rainwater using hollow fiber membrane/liquid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1016 (2003) 11–20, doi:10.1016/S0021-9673(03)01295-0.
- [33] C. Basheer, H.K. Lee, J.P. Obbard, Application of liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of polychlorinated biphenyls in blood plasma, *J. Chromatogr. A*, 1022 (2004) 161–169, doi:10.1016/j.chroma.2003.09.043.
- [34] G.E.P. Box, K.B. Wilson, On the Experimental Attainment of Optimum Conditions, *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 13 (1951) 1–38, doi:10.1111/j.2517-6161.1951.tb00067.x.
- [35] M. Shamsipur, B. Hashemi, Extraction and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples using stir bar sorptive extraction (SBSE) combined with dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of floating organic drop (DLIME-SFO) followed by, *RSC Adv*, 5 (2015) 20339–20345, doi:10.1039/c4ra14959a.
- [36] J.L. Gómez-Ariza, T. García-Barrera, F. Lorenzo, A.G. González, Optimisation of a pressurised liquid extraction method for haloanisoles in cork stoppers, *Anal. Chim. Acta* 540 (2005) 17–24, doi:10.1016/j.aca.2004.08.031.
- [37] S. Ranjbar Banforuzi, M.R. Hadjmohammadi, Two-phase hollow fiber-liquid microextraction based on reverse micelle for the determination of quercetin in human plasma and vegetables samples, *Talanta* 173 (2017) 14–21, doi:10.1016/j.talanta.2017.05.058.
- [38] G. Li, L. Zhang, Z. Zhang, Determination of polychlorinated biphenyls in water using dynamic hollow fiber liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1204 (2008) 119–122, doi:10.1016/j.chroma.2008.07.081.

CAPÍTULO 2



4.2. Capítulo 2: Aplicación de HF-LPME trifásica asistida por ultrasonido en la identificación de metabolitos en leche materna.

4.2.1. Primera fase: HF-LPME con disposición en U.

Disolvente aceptor

Tras los ensayos realizados para la selección del disolvente empleado como fase aceptora, se observó que MeOH proporcionó resultados mucho mejores en términos de la cantidad de características extraídas que conservan las familias de compuestos, se seleccionó como fase aceptora.

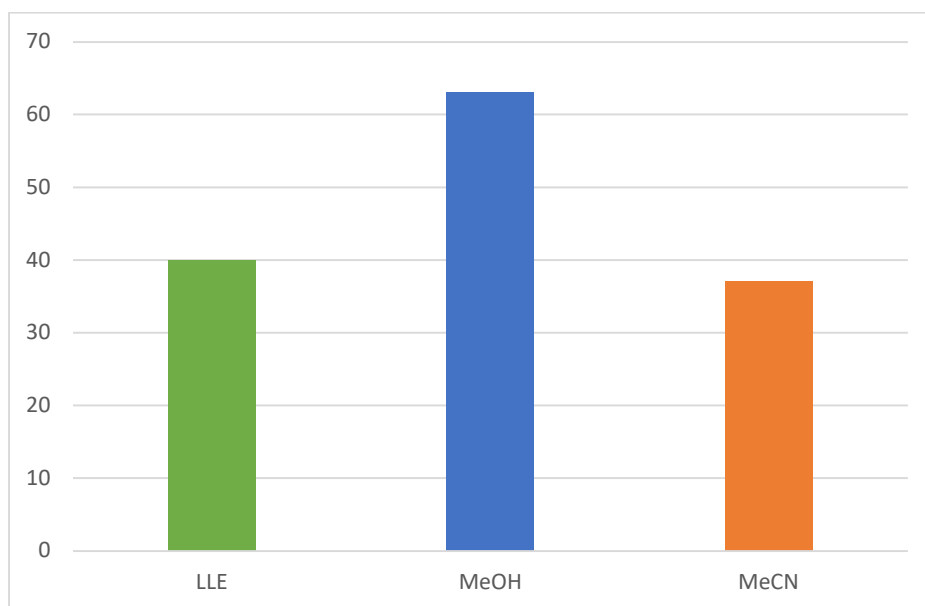


Figura 4.6. Selección del disolvente empleado como fase aceptora en función del número de metabolitos identificados en la extracción. (Fuente: Elaboración propia)

Tiempo de extracción.

Los resultados obtenidos mostraban que el tiempo óptimo de extracción se daba a los 60 min.

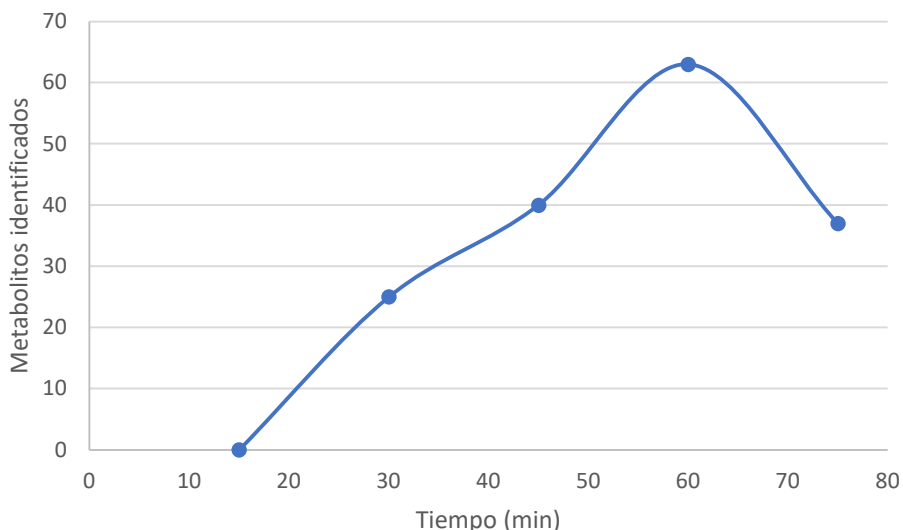


Figura 4.7. Optimización del tiempo de extracción en función del número de metabolitos identificados. (Fuente: Elaboración propia)

Procedimiento experimental optimizado.

La fibra se cortó en segmentos de 6 cm y se sometió a un lavado con acetona en un baño de ultrasonidos para eliminar posibles residuos del material de la membrana de polipropileno (PP) o cualquier interferencia que pudiera afectar la determinación de los analitos. Luego, se dejó secar al aire antes de su uso.

Tras la limpieza, la fibra se sumergió en un disolvente orgánico (n-dodecano) durante 10 segundos para facilitar la apertura de los poros de la membrana y asegurar la fijación del disolvente en su interior.

Después de la impregnación, un extremo de la fibra se insertó en una aguja conectada a una jeringa que contenía la fase aceptora, mientras que el otro extremo se unió a una segunda aguja con una jeringa vacía. La fase aceptora se introdujo en la fibra utilizando este sistema. Ambas jeringas quedaron inmobilizadas en el tapón del vial, atravesando un septum de PTFE/silicona de 20 mm de diámetro y 3 mm de grosor. Una vez cargada la fibra, se sumergió en la muestra preparada. El sistema final se mantuvo en un baño térmico a 25 °C, con una agitación de 600 rpm, durante un tiempo de extracción de 60 minutos.

Una vez finalizado el tiempo de extracción, se retiró el vial del baño térmico y se extrajo la fibra de la muestra. A continuación, se desconectó el extremo de la fibra que estaba unido a la jeringa que contenía originalmente la fase aceptora y se colocó dentro de un tubo Eppendorf. Utilizando la jeringa vacía aún conectada a la fibra, se extrajo el contenido del lumen y se transfirió al tubo Eppendorf para su posterior proceso de derivatización.

El método desarrollado mostraba cromatogramas con intensidades mucho mayores y picos cromatográficos mejor definidos, lo que suponía una mayor preconcentración, que para el método tradicional LLE (Figura 4.8).

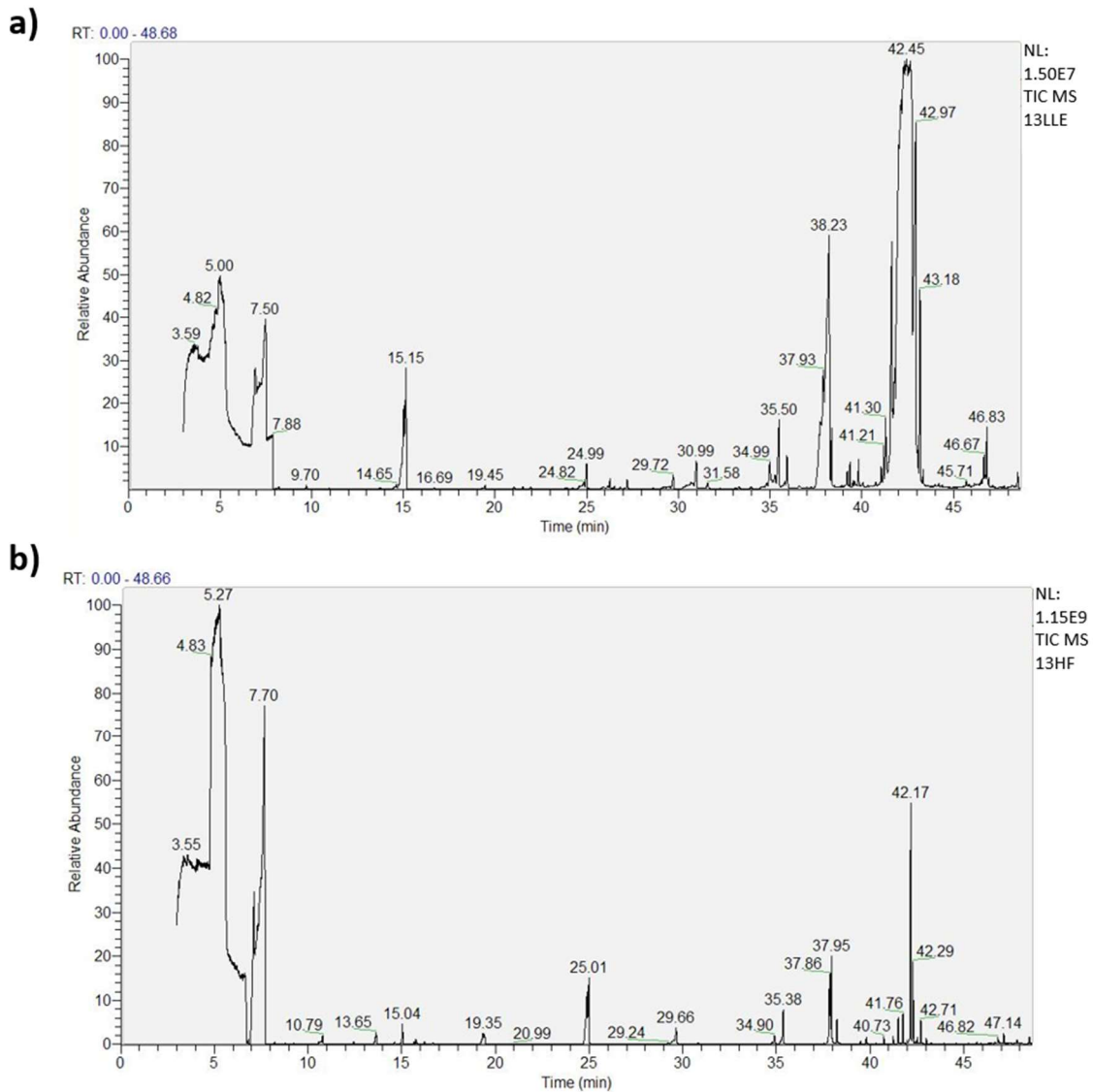


Figura 4.8. Comparación de resultados obtenidos en el análisis metabolómico no dirigido de leche materna mediante GC-MS a través de una extracción a) LLE y b) HF-LPME trifásica con disposición en U. (Fuente: Elaboración propia)

Este nuevo método proporcionaba muchas ventajas con respecto al LLE, entre las que destacaban la reducción del uso de disolventes, una mejor preconcentración, menor contaminación y emulsificación, compatibilidad con muestras complejas, mayor eficiencia de extracción y reducción de los pasos previos en la preparación de muestras. Sin embargo, el tiempo de extracción era mucho más largo comparado con el método LLE y el volumen de muestra empleado no era elevado, lo que suponía un hándicap en su aplicación para un número elevado de muestras y para muestras de dificultad de adquisición. Tras estos resultados, se procedió a rediseñar el método empleando una disposición en barra de disolvente, con el fin de minimizar el volumen de muestra empleado, y cambiando la agitación por el baño ultrasonido con el fin de agilizar el proceso de extracción y acortar el tiempo.

4.2.2. Segunda fase: HF-LPME con disposición en barra de disolvente (SBME).

Fuerza motriz

La aplicación de ultrasonidos permitió reducir significativamente los tiempos de extracción, probablemente debido a la combinación de cavitación y agitación generadas dentro del baño ultrasónico (341). Además, esta técnica facilitó el uso de volúmenes de muestra reducidos y mejoró el rendimiento en comparación con la agitación convencional.

Tiempo de extracción

Como se observa en la Figura 4.9, los tiempos de 5 y 10 minutos demostraron ser los más adecuados. Las eficiencias de extracción fueron similares a los 5 y 10 minutos, basándose en la cantidad total de características detectadas (2411 y 2405, respectivamente). Por esta razón, se seleccionó un tiempo de 5 minutos para reducir la duración del análisis.

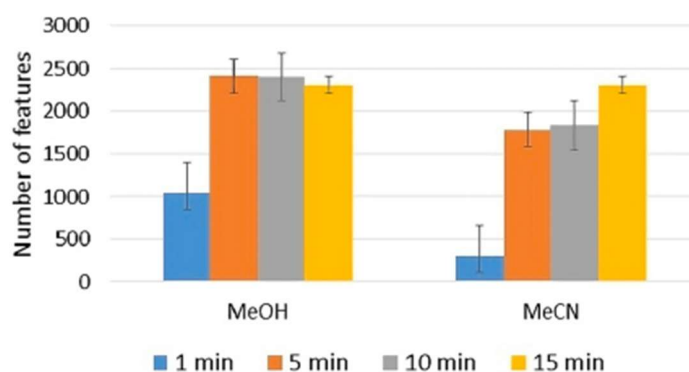


Figura 4.9. Número total de características moleculares extraídas por UA-HF-LPME trifásica y posteriormente anotadas por GC-MS dependiendo del efecto de los solventes como fase aceptora (MeOH o MeCN) y los tiempos de extracción. (Fuente: Elaboración propia)

Longitud de fibra

La longitud de fibra óptima fue de 3 cm, ya que ofreció una mejor cobertura de metabolitos y un mayor número total de características. No se detectó ningún cambio significativo al aumentar la longitud de la fibra de 3,5 a 4 cm. Por lo tanto, se eligió 3 cm como la longitud de fibra óptima para los experimentos posteriores.

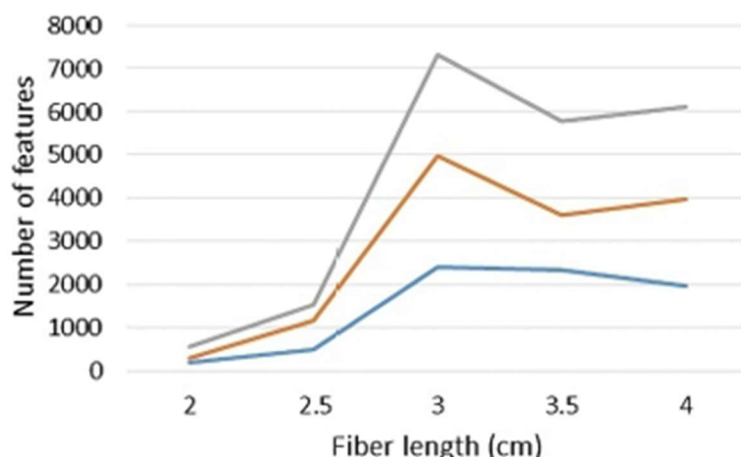


Figura 4.10. Efecto de la longitud de la fibra en la eficiencia de extracción a diferentes tiempos de extracción (línea gris = 5 min, línea roja = 10 min y línea azul = 15 min). (Fuente: Elaboración propia)

Proceso experimental optimizado.

Las fibras fueron cortadas en segmentos de 3 cm y sometidas a un proceso de limpieza en un baño de ultrasonidos con acetona durante 5 minutos. Posteriormente, se dejaron secar al aire y se selló uno de sus extremos utilizando un soldador térmico. Luego, se sumergieron en n-dodecano durante 20 segundos para facilitar la formación de la membrana líquida soportada (SLM).

A continuación, se introdujeron 50 μL de MeOH en el lumen de la fibra como fase aceptora, lo que permitió la extracción de los analitos desde la muestra de leche materna (HM) primero hacia el n-dodecano y posteriormente al MeOH. Después de este paso, se selló el otro extremo de la fibra y se introdujo en la fase donante, compuesta por 175 μL de muestra de HM diluida hasta alcanzar un volumen total de 1.4 mL con agua Milli-Q (~dilución 8 veces). Posteriormente, la fibra fue colocada en un baño de ultrasonidos y se dejó en estas condiciones durante el tiempo óptimo de extracción de 5 minutos.

Al finalizar el proceso de extracción, la solución aceptora fue recolectada en un tubo Eppendorf y evaporada bajo una corriente de nitrógeno para su posterior reprivatización.

Comparación de LLE y UA-HF-LPME trifásico para metabolómica no dirigida de HM con respecto a la cobertura de metabolitos

La Fig 4.11 muestra las principales familias de compuestos a las que pertenecen los metabolitos anotados y el porcentaje de cada clase frente al número total de metabolitos utilizando tanto LLE como UA-HF-LPME trifásico.

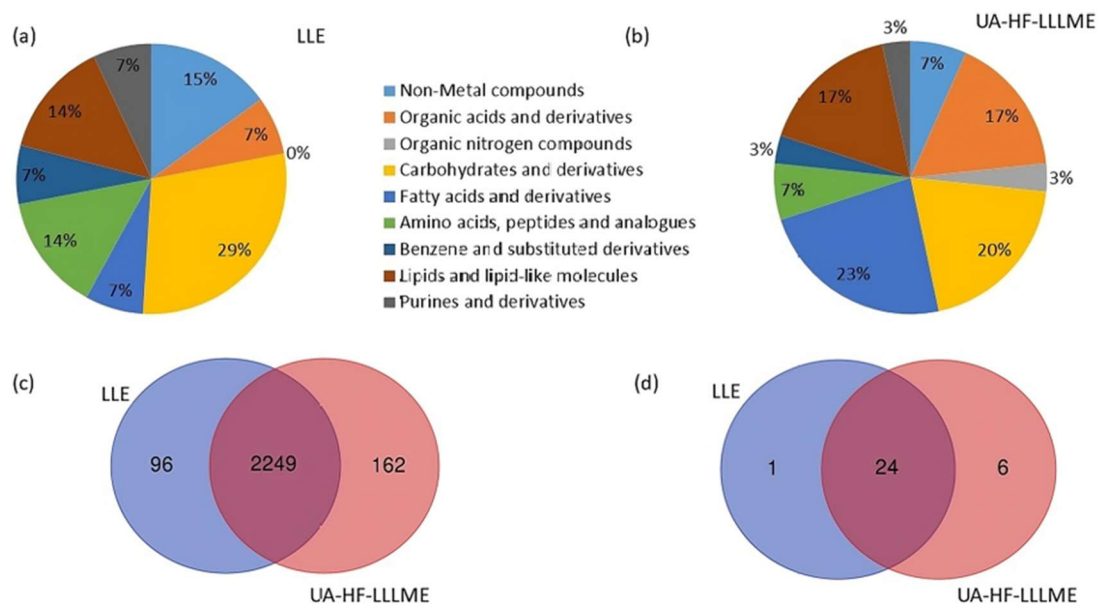


Figura 4.11. Cobertura de metabolitos según las familias de compuestos utilizando a) LLE y b) tres-fases-UA-HF-LPME para metabolómica de la leche humana. Diagrama de Venn comparando c) el número total de características extraídas y d) el número total de metabolitos anotados utilizando tres-fases-UA-HF-LPME y LLE mediante GC-MS. (Fuente: Elaboración propia)

Como podemos ver, el UA-HF-LPME trifásico proporciona una mayor cobertura de metabolitos y permite extraer un mayor número de metabolitos (UA-HF-LPME trifásico vs LLE). Curiosamente, el HFLPME trifásico permite la extracción de compuestos nitrogenados orgánicos de HM (3 % del número total de metabolitos anotados por UA-HF-LPME trifásico), lo que no era posible utilizando LLE. Estos metabolitos detectados solo con UA-HF-LPME trifásico, como la butilamina, pueden ser de especial interés porque existe evidencia científica de su posible relación con la hipergastrinemia neonatal (342). Por otra parte, la técnica UA-HF-LPME trifásica fue más eficiente para la extracción de ácidos grasos y derivados (23 % vs 7 % utilizando LLE) así como para lípidos (17 % vs 14 % utilizando LLE). Como una familia de compuestos (compuestos orgánicos nitrogenados) no puede ser extraída por LLE y el número total de metabolitos extraídos por esta técnica analítica también fue menor, los porcentajes de cada familia de compuestos referidos a esta última fueron altos como en el caso de compuestos no metálicos (15 %), carbohidratos y derivados (29 %) y aminoácidos y péptidos (14 %) en comparación con la técnica UAHF-LPME trifásica (7 %, 20 % y 7 %, respectivamente).

Comparación del perfil cromatográfico y de los metabolitos anotados por GC-MS después de LLE y UA-HF-LPME trifásico

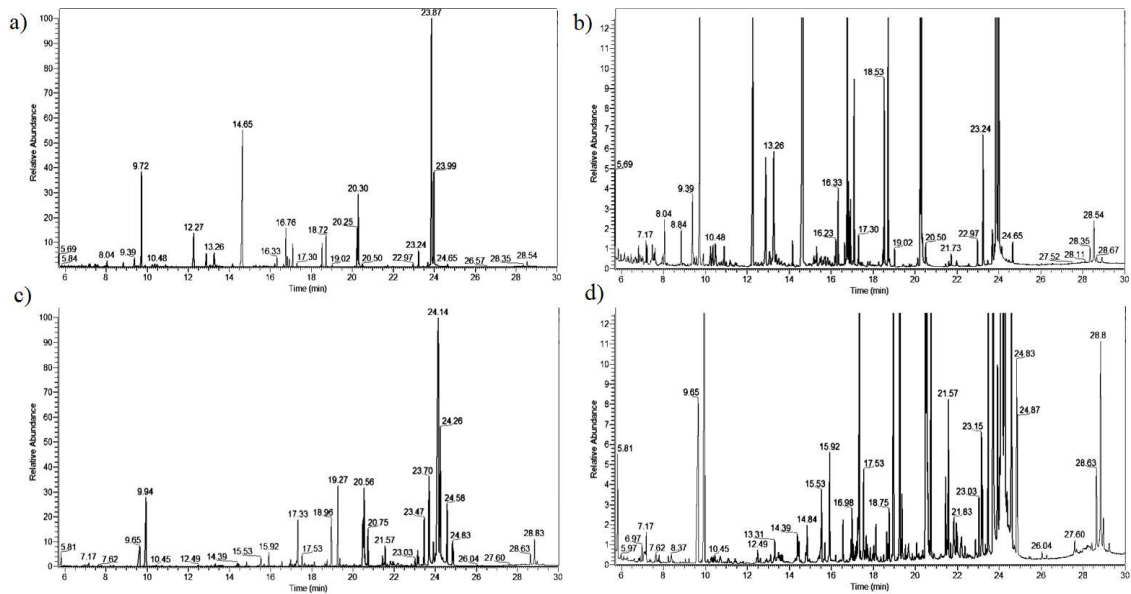


Figura 4.12. Perfiles metabolómicos de muestras de leche materna a partir del análisis GC-MS de: (a) HF-LLLME, (b) HF-LLLME amplificado, (c) LLE y (d) LLE amplificado. (Elaboración propia)

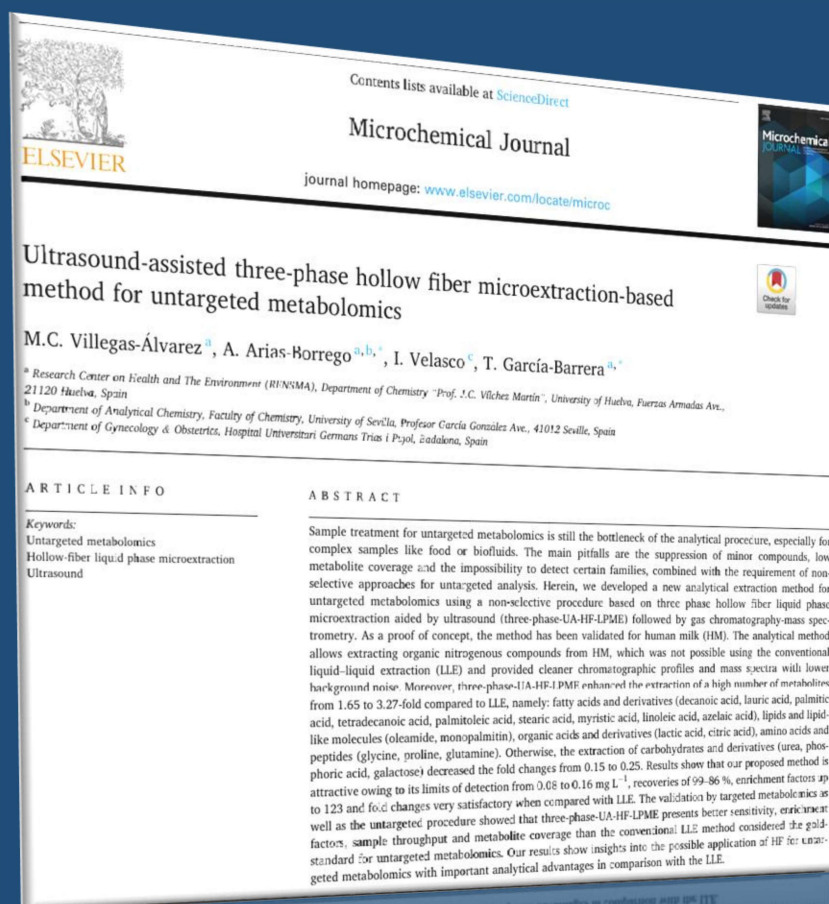
UA-HF-LPME trifásico elimina el ruido de fondo en comparación con el método LLE. Para obtener una buena confiabilidad y estabilidad de los resultados metabolómicos, el análisis se evaluó utilizando QC, que consistieron en un grupo de todas las muestras. Las figuras 3c y 3d muestran el número total de características extraídas y el número total de metabolitos anotados con las diferentes técnicas de extracción comparadas en este estudio. Como se puede ver, LLE y UAHF-LPME trifásico permiten extraer 2345 y 2411 características respectivamente, y finalmente, 25 y 30 metabolitos fueron anotados por LLE y UA-HF-LPME trifásico.

Por lo tanto, la técnica UA-HF-LPME trifásica mejoró la extracción de ácidos grasos y derivados como el ácido decanoico (1,65 veces), el ácido láurico (2,87 veces), el ácido tetradecanoico (3,05 veces), el ácido palmítico (3,02 veces), el ácido palmitoleico (2,73 veces), el ácido esteárico (2,65 veces), el ácido mirístico (2,43 veces), el ácido linoleico (1,54 veces) y el ácido azelaico (3,27 veces). Asimismo, también encontramos un aumento de lípidos y moléculas similares a lípidos como oleamida (2,06 veces) y monopalmitina (2,75 veces), ácidos orgánicos y derivados como ácido láctico (3,25 veces) y ácido cítrico (2,67 veces), aminoácidos y péptidos como glicina (2,01 veces), prolina (2,11 veces) y glutamina (3,02 veces).

La capacidad de extracción de estos metabolitos mejoró significativamente con el método trifásico UA-HF-LPME en comparación con LLE. Estos compuestos son moléculas bioactivas necesarias para funciones metabólicas y fisiológicas clave relacionadas con el desarrollo, crecimiento y salud adecuados del recién nacido (343,344). Por otro lado, LLE parece ser mayor para la extracción de carbohidratos y derivados como urea (0,15 veces), ácido fosfórico (0,02) y galactosa (0,25 veces).

Los resultados han confirmado que las características del método son muy buenas y la metodología puede aplicarse con éxito para el análisis de muestras complejas.

ARTÍCULO 2





Ultrasound-assisted three-phase hollow fiber microextraction-based method for untargeted metabolomics

M.C. Villegas-Álvarez^a, A. Arias-Borrego^{a,b,*}, I. Velasco^c, T. García-Barrera^{a,*}

^a Research Center on Health and The Environment (RENSMA), Department of Chemistry "Prof. J.C. Vilchez Martín", University of Huelva, Fuerzas Armadas Ave., 21120 Huelva, Spain

^b Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Sevilla, Profesor García González Ave., 41012 Sevilla, Spain

^c Department of Gynecology & Obstetrics, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Untargeted metabolomics
Hollow-fiber liquid phase microextraction
Ultrasound

ABSTRACT

Sample treatment for untargeted metabolomics is still the bottleneck of the analytical procedure, especially for complex samples like food or biofluids. The main pitfalls are the suppression of minor compounds, low metabolite coverage and the impossibility to detect certain families, combined with the requirement of non-selective approaches for untargeted analysis. Herein, we developed a new analytical extraction method for untargeted metabolomics using a non-selective procedure based on three phase hollow fiber liquid phase microextraction aided by ultrasound (three-phase-UA-HF-LPME) followed by gas chromatography-mass spectrometry. As a proof of concept, the method has been validated for human milk (HM). The analytical method allows extracting organic nitrogenous compounds from HM, which was not possible using the conventional liquid-liquid extraction (LLE) and provided cleaner chromatographic profiles and mass spectra with lower background noise. Moreover, three-phase-UA-HF-LPME enhanced the extraction of a high number of metabolites from 1.65 to 3.27-fold compared to LLE, namely: fatty acids and derivatives (decanoic acid, lauric acid, palmitic acid, tetradecanoic acid, palmitoleic acid, stearic acid, myristic acid, linoleic acid, azelaic acid), lipids and lipid-like molecules (oleamide, monopalmitin), organic acids and derivatives (lactic acid, citric acid), amino acids and peptides (glycine, proline, glutamine). Otherwise, the extraction of carbohydrates and derivatives (urea, phosphoric acid, galactose) decreased the fold changes from 0.15 to 0.25. Results show that our proposed method is attractive owing to its limits of detection from 0.08 to 0.16 mg L⁻¹, recoveries of 99–86 %, enrichment factors up to 123 and fold changes very satisfactory when compared with LLE. The validation by targeted metabolomics as well as the untargeted procedure showed that three-phase-UA-HF-LPME presents better sensitivity, enrichment factors, sample throughput and metabolite coverage than the conventional LLE method considered the gold-standard for untargeted metabolomics. Our results show insights into the possible application of HF for untargeted metabolomics with important analytical advantages in comparison with the LLE.

1. Introduction

Untargeted metabolomics measures global sets of low-molecular-weight metabolites that result from cellular activity and, therefore, they serve as a snapshot of relevant biological processes [1]. These molecules usually belong to the families of amino acids, lipids, organic acids, steroids, fatty acids, vitamins, and small peptides among others. In contrast to proteins or genes, which require the activation of post-translational modifications or epigenetics, respectively, the metabolites can serve as biomarkers of cell activity, which reflect changes in the

phenotype and therefore the function [2]. Metabolite profiles play a critical role in diverse biological functions and they have been shown to be good biomarkers for the early diagnosis and prognosis of several diseases [2–5] as well as for environmental pollution monitoring using free-living organisms [6,7], to evaluate the biological response against xenobiotics [8] or the food quality [9–11]. Biological fluids like urine, serum or plasma are often used in metabolomics studies due to their ease sampling and because they are a direct reflection of the metabolism of an individual or organism [12].

Nevertheless, there are other less common biofluids, such as human

* Corresponding author at: Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Sevilla, Profesor García González Ave., 41012 Sevilla, Spain (A. Arias-Borrego).

E-mail addresses: axriaz1@us.es (A. Arias-Borrego), tamara@dqcm.uhu.es (T. García-Barrera).

<http://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109473>

Received 4 July 2023; Received in revised form 28 September 2023; Accepted 3 October 2023

Available online 6 October 2023

0026-265X/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

milk (HM), which can provide a valuable and complementary information, due to the potential consequences for maternal-infant health [13–16]. However, the analysis of HM, is complex and challenging from the analytical viewpoint, especially the sample preparation since there are fats and other major components that could hide important biomarkers as well as differences in concentrations and great structural diversity among metabolites. Thus, cleaning the sample to remove protein interferences, as well as a subsequent separation into multiple fractions to reduce sample complexity is usually required before the untargeted metabolomic analysis by mass spectrometry (MS) or nuclear magnetic resonance (NMR), but not other enrichment or clean-up procedures are applied to obtain a wide metabolite coverage by untargeted and non-selective procedures [13,17]. Nevertheless, this fact can lead to signal suppression by major components, other matrix effects, and interferences that difficult the detection of minor metabolites. Otherwise, it has been shown that protein precipitation alone, even when solvents of different polarities are used, cannot solve this problem completely [18,19]. A previous study has reported the metabolic profile of HM using liquid-liquid extraction (LLE) with a chloroform-methanol mixture obtaining two different phases (lower phase containing nonpolar metabolites and upper phase containing polar metabolites) by NMR as the analytical platform [20,22]. Subsequently, an extraction of metabolites has been proposed using methyl *tert*-butyl ether (MTBE) and methanol that were later centrifuged and then analyzed by mass spectrometry after both, gas and liquid chromatographic separations (GC-MS, LC-MS) providing a very good metabolite coverage from polar metabolites to fatty acids and lipids [23]. This sample preparation analytical method has been successfully employed to determine the changes in the HM metabolome during lactation [14,23,24], as well as the potential impact of maternal iodine deficiency [13] and COVID-19 in the HM metabolome [15,25–27].

The hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME) is a promising membrane-based analytical technique that has been successfully applied to solve many analytical problems [28]. It is remarkable the reliability of the diverse HF-LPME modes and the simplicity of the assembly that enables low sample consumption. This aspect is particularly significant when dealing with biological samples. Furthermore, these modes exhibit high enrichment factors for analytes of diverse nature, while simultaneously reducing matrix effects, cross contamination, and memory effects. This is primarily attributed to the disposable nature of the fiber, which eliminates the need for subsequent cleaning steps and minimizes solvent usage. All these features of HF led to an enhancement of the parameters of quality of the analytical method against others such as LLE or solid-phase microextraction (SPME) [29,30]. Furthermore, the application of ultrasound energy is a powerful aid in the acceleration of various steps in the analytical process [31,32].

Accordingly, ultrasound-assisted (UA) extraction has been extensively used to improve mass transfer between immiscible phases [33] and few research so far have used ultrasound-assisted extraction combined with HF-LPME and they are related to the targeted analysis trace elements in urine samples [34] and estrogens from aqueous matrices [35].

Herein, a new analytical sample preparation method has been developed for HM untargeted metabolomics. The extraction and pre-concentration of the HM metabolites along with fat and proteins removal were carried out in a single step by HF-LPME using the three-phase mode three-phase-HF-LPME. Moreover, the simultaneous extraction and pre-concentration of HM metabolites were aided by ultrasound (three-phase-UA-HF-LPME). HM metabolites were annotated by GC-MS and the figures of merit of the new analytical approach were compared with the existing methods for HM metabolomics regarding metabolite coverage, extraction efficiency, repeatability, sensitivity, and feature detection. This sample treatment provides a handy analytical tool for the extraction of features in HM metabolomics and opens further research for the pretreatment of complex biological samples.

2. Material and methods

2.1. Chemicals and reagent solutions

Ultrapure water, employed for the preparation of all aqueous solutions, was procured from a Milli-Q system (Millipore Milli-Q, Watford, UK). Pure standards were individually dissolved in methanol (MeOH, Fisher Scientific, Nepean, Canada) to attain a final concentration of 1000 mg L⁻¹ and subsequently stored at -20 °C. Intermediate working solutions were prepared by diluting the aforementioned solutions with methanol and kept in darkness at 4 °C until analysis. Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) was the source of all standards utilized for method validation, including lactic acid, urea, glycerol, proline, glutamic acid, glucose, citric acid, and serine. Additionally, *O*-methylhydroxylamine hydrochloride, *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) + 1 % trimethylchlorosilane (TCMS), as well as solvents such as pyridine anhydride, *n*-decane, and methyl *tert*-butyl ether (MTBE), were also procured from Sigma-Aldrich. The hollow fiber employed for the immobilization of the supported liquid membrane and housing the acceptor solution was an S6/2 Accurel® polypropylene hollow fiber (1800 µm i.d., 450 µm wall thickness, and 0.2 µm pore size) purchased from Membrana (Wuppertal, Germany). Acetonitrile (MeCN), utilized for the extraction, was acquired from Fisher Chemical (Madrid, Spain).

2.2. Sample collection

Breast milk (HM) samples were collected during the first four months of infancy and subsequently stored at -80 °C until analysis. The collection of HM samples took place between 2019 and 2020 at the University Hospital Germans Trias I Pujol, Badalona, Spain. This study received approval from the Local Ethics Committee, and written informed consent was obtained from all participating women (Ethics Committee Reference: PI-18-266). Comprehensive oral and written information regarding the study was provided to all participants. Women with multiple gestations, diseases, or perinatal complications were excluded from the study. The exclusion criteria encompassed women who were unable to breastfeed due to severe symptomatology requiring intensive care unit support, women who required the use of medications with potential adverse effects on the infant, and those for whom obtaining HM was not feasible.

2.3. Human milk liquid-liquid extraction

The extraction protocol used was previously developed by Villaseñor et al. [23]. A total of 50 µL of HM was vortex-mixed with 175 µL of methanol (MeOH) and 175 µL of MTBE (~8-fold dilution). The mixture was vortex and mixed for 1 min. Then the extract was centrifuged at 4000 g for 15 min at 15 °C and then analyzed by GC-MS after derivatization. The derivatization process was carried out with methoxyamine in pyridine and the silylation was performed with MSTFA following a previously developed method [36].

2.4. Ultrasound-assisted three-phase hollow fiber microextraction of human milk metabolites

The extraction procedure was optimized prior to the application. The solvent bar configuration of the fiber and the three-phase mode was used for three-phase-UA-HF-LPME (Fig. 1). The fibers were cut into 3 cm pieces and later cleaned into an ultrasound bath with acetone for 5 min. The clean air-dried fiber was then sealed at one end with the help of a thermal welder. Once sealed, it was immersed in *n*-dodecane solvent for 20 s to facilitate the formation of the supported liquid membrane (SLM). Then, the acceptor phase (50 µL of MeOH) was injected into the fiber lumen and thus, the analytes were extracted from HM to *n*-dodecane and then to MeOH. After that, the other end was sealed and introduced into the donor phase (175 µL of HM sample up to 1.4 mL with Milli-Q water,

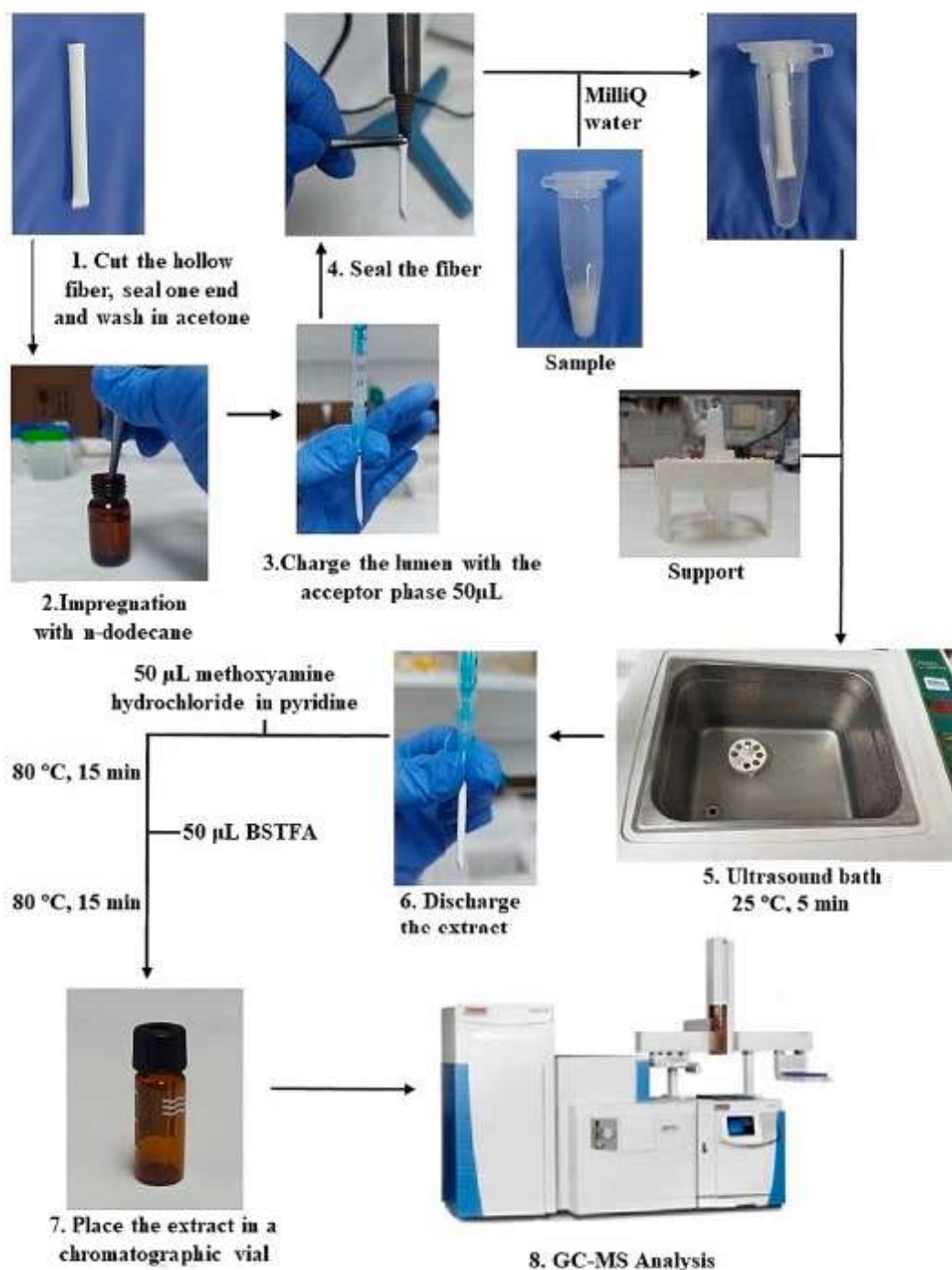


Fig. 1. Schematic drawing of the three-phase-UA-HF-LPME process used for the extraction.

~8-fold dilution). Then, it was placed into an ultrasound bath for the optimal extraction time at 5 min. Once the extraction time was elapsed, the collected acceptor solutions was discharged into an Eppendorf tube and dried under a nitrogen stream. The derivatization procedure was performed in the same way as in the previous section. Methoxyamine in pyridine was used for the initial reaction, followed by silylation with MSTFA.

2.5. Mass spectrometric metabolomic analysis

Extracts were analyzed by gas chromatograph (Trace GC ULTRA)

equipped with an ion trap analyzer model ITQ 900 (Thermo Fisher Scientific). The capillary column used was a VF-5MS of dimensions: 30 m × 0.25 mm I.D. and 0.25 µm of film thickness (Agilent Technologies, Tokyo, Japan). Splitless mode was selected for the injections in the injector oven at 250 °C and helium was used as carrier gas at 1.2 mL min⁻¹. The oven temperature program started at 60 °C during 1 min, then ramped at 10 °C min⁻¹ to 325 °C, and cooled down during 10 min before the next injection [13,23]. The electron ionization (EI) source was operated at 70 eV mode. The MS detection was performed in full scan mode in the *m/z* range 50–650 at a rate of 1 spectra/s. The total chromatographic time was 30 min. The temperature of the MS detector

was kept at 280 °C, using nitrogen as auxiliary gas at 60 mL min⁻¹. The acquisition, evaluation and calculation of chromatographic peak areas were performed with the ChemStation software (version A0903).

2.6. Data treatment and metabolite identification

GC-MS raw data was processed as reported previously [11]. In brief, CDF format was selected to convert the files using the Thermo File Converter tool and later, GC-MS data matrix with normalized peak areas was imported into the SIMCA-P (version 11.5, Umetrics). Principal component analysis (PCA) and Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) were used to obtain predictive models to visualize the metabolic information as well as to explore the differences in the number features extracted using different extraction times (5, 10 and 15 min) by three-phase-UA-HF-LPME versus LLE. Besides, the fold change values were calculated for each metabolite, in order to estimate the variation in their abundance within the comparison. The quality of the model was assured by the class separation (R^2) and predictive (Q^2) parameters. The differences between the types of extraction (three-phase-UA-HF-LPME vs LLE) were evaluated for each individual metabolite by One-way ANOVA and Tukey's test by using Statistica 8 (Statsoft, Tulsa, OK, USA) to find statistically significant comparisons and to investigate the trend of metabolite concentrations. Then, the Benjamini-Hochberg (FDR correction) method was also carried out to adjust the *p*-values. NIST Mass Spectral Library (version 08) was used for metabolites annotation. Those metabolites with spectrum scores > 80 % and concordant retention index (using the *n*-alkane scale) (Table S1), were used for the annotation of metabolites. Target ions with higher intensities and masses were chosen from each metabolite mass spectrum since they are affected by matrix into a lesser extent. Moreover, we checked the area of the qualifier/target ion ratio for each metabolite and those with a variation < 20 % were selected. Before any statistical analysis, the internal standard at 10 mg L⁻¹ (IS, Ribitol) abundance was used to normalize sample concentrations to correct any instrumental variability. In addition, coefficient of signal variation (CV) in quality controls (QCs) was used to filter data, considering values < 30 % as acceptable. Metabolites that led to the discrimination between the extraction type, three-phase-UA-HF-LPME and LLE, were considered as statistically significant using a variable importance in the projection (VIP values, a weighted sum of squares of the PLS weight) ≥ 1 and *p*-values ≤ 0.05.

2.7. Validation of the methodology by targeted metabolomics

To evaluate the practical reliability of the extraction method, the figures of merit were determined, namely: linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), repeatability (intra-day), reproducibility (inter-day), enrichment factor (E_e) and recovery. For method validation, five samples were used, each composed of 175 µL of HM spiked with the commercial standards at different concentrations (10 mg L⁻¹ of lactic and glutamic acid; 25 mg L⁻¹ of glucose; 50 mg L⁻¹ of urea; 100 mg L⁻¹ of glycerol; 5 mg L⁻¹ of citric acid and serine; 2.5 mg L⁻¹ proline) in quintuplicate (*n* = 5) to a final volume of 1.4 mL with ultrapure water (18.2 MΩ cm). The linearity was obtained by plotting calibration curves of the relative area (analyte peak area/internal standard peak area) versus the concentration of each analyte. The analytical curves were constructed at six levels in triplicate, at the following concentration ranges: 2–25 µg mL⁻¹ for lactic and citric acids; 30–260 µg mL⁻¹ for urea; 60–500 µg mL⁻¹ for glycerol; 0.5–7 µg mL⁻¹ for proline; 6–60 µg mL⁻¹ for glutamic acid; 15–150 µg mL⁻¹ for glucose and 1.5–15 µg mL⁻¹ for serine. LODs and LOQs were calculated as $a + 3 S_{y/x}$ and $a + 10 S_{y/x}$, respectively, where "a" is the origin ordinate and " $S_{y/x}$ " the random errors in the values for the slope and intercept [37]. Element concentrations below LOQ were excluded from statistical analysis. Repeatability and reproducibility were evaluated with the analysis of samples (*n* = 5) on the same and on different days. Also, the

enrichment factor (E_e) of the extraction was measured with the ratio (E_e = C_{a,f}/C_{d,i}) where, C_{a,f} is the final concentration of each standard in the acceptor phase and C_{d,i} is the initial concentration of each standard in the sample solution. The instrumental stability was determined by multiple injections in quintuplicate of a QC sample. In addition, These QC samples were injected at the beginning, in the middle, and at the end of each run.

3. Results and discussion

3.1. Optimisation of the ultrasound-assisted three-phase hollow fiber microextraction of human milk metabolites

3.1.1. Optimisation of the three-phase-UA-HF-LPME general configuration

Since HF-LPME is the miniaturization of LLE, initially we plan to reproduce the extraction using MeOH mixed with MTBE as the acceptor phase. The reason is that the previously reported successful LLE method is based in a mixture of MeOH, for polar metabolites, MTBE, for lipophilic metabolites and then, the diluted HM sample is mixed for a monophasic extraction followed by the later precipitation of proteins by centrifugation [23]. However, the extraction of HM metabolites by HF-LPME using MeOH/MTBE in the acceptor phase is not possible because the two phases (acceptor and donor) are mixed, preventing the proper functioning of SLM. Therefore, the HF-LPME for HM metabolites was configured in the three-phase mode using *n*-dodecane immobilized in the HF pores, thus providing a SLM. The acceptor phase (MeOH) was filled in its lumen and the diluted HM sample as the donor phase. The centrifugation step used after the traditional LLE was not required in the three-phase-UA-HF-LPME, since unlike small molecules such as metabolites, the proteins and other interfering molecules (e.g. fat components) cannot cross the membrane pores. The optimization of the variables affecting HM metabolites by three-phase-UA-HF-LPME was carried out taking into account the number of metabolites later identified by GC-MS in the extracts as the main objective. Later, the number of families of compounds to which these metabolites belong and the peak areas of the metabolites was compared with the LLE method. Thus, several variables were considered namely: acceptor phase, SLM, HM dilution factor, extraction time, fiber length, ionic strength and sample pH. These variables were optimized by changing one parameter at a time while utilizing standard conditions for the other ones: MeOH (acceptor phase), *n*-dodecane (SLM), 8-fold HM dilution with Milli-Q water, 5 min of extraction time, 3 cm of fiber length and the absence of ionic strength and pH adjustment.

3.1.2. Acceptor phase selection

One of the most important parameters affecting HF-LPME is the type of extracting solvent. The acceptor phase must be selective regarding the nature of the analytes, which must have a high tendency to dissolve them and leave the sample matrix. In addition, previous studies reported the use of different acceptor phases such as MeOH or acetonitrile (MeCN) to deprotenize and to extract metabolites [35,36]. Taking these considerations into account, MeOH was first selected as it is used in the traditional LLE method, but MeCN was also assayed. Since MeOH provided much better results in terms of the number of extracted features conserving the compound families, it was selected as the acceptor phase (Fig. 2a).

3.1.3. Supported liquid membrane selection

The SLM must be compatible with the fiber to form a very thin organic membrane film by filling completely the pores in the fiber wall. In addition, the SLM must be immiscible with the aqueous donor phase and with the acceptor organic phase. Moreover, the use of a mixture of MeOH/*n*-dodecane solvents has been previously reported as it favors the extraction of fatty acids [38,39]. Based on the above considerations and in agreement with previous works [40], *n*-dodecane was selected as the SLM.

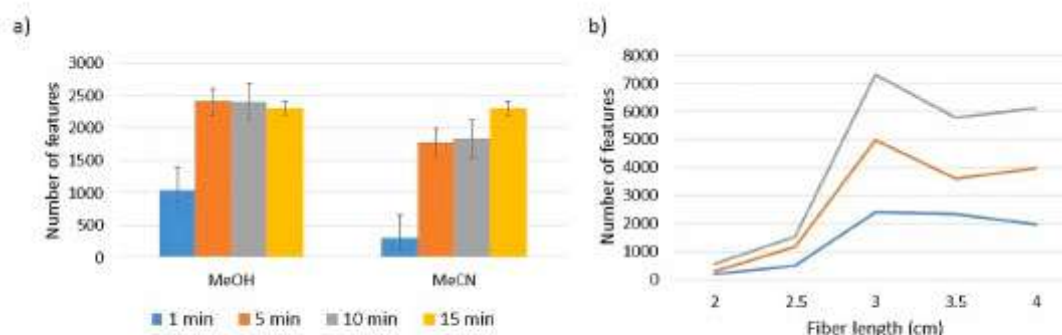


Fig. 2. Total number of molecular features extracted by three-phase-UA-HF-LPME and later annotated by GC-MS depending on: a) effect of solvents as acceptor phase (MeOH or MeCN) and extraction times, b) effect of fiber length on the extraction efficiency at different extraction times (gray line = 5 min, red line = 10 min and blue line = 15 min).

3.1.4. Driving force

To speed up the extraction, stirring is usually selected as the driving force as in most of the HF-LPME methods [18,41]. However, in order to use a minimal sample volume, the magnetic stirring was ruled out for incompatibility with the miniaturized model because HF was not immersed properly into the donor solution and the stirrer did not rotate properly in such a low donor phase volume affecting the repeatability of the three-phase-HF-LPME. Alternatively, an ultrasound bath was used to speed up the HF-LPME process. The use of sonication usually led to short extraction times, probably due to a combined process of cavitation and agitation attained inside the ultrasound bath [42]. Moreover, it also made possible to work with low sample volumes and higher sample throughput than using stirring. Using the new three-phase-UA-HF-LPME arrangement, the other variables were optimized as follows.

3.1.5. Extraction time

The extraction efficiency was studied at 1, 5, 10, and 15 min under the same conditions. As can be seen in Fig. 2a, the times 5 and 10 min were found to be the most optimal. The extraction efficiencies were equivalent at 5 and 10 min using the total number of features detected, (2411 and 2405, respectively). For this reason, 5 min was chosen to shorten the analysis time.

3.1.6. Fiber length

The extraction was carried out with different fiber lengths from 1 to 4 cm, and the optimum was 3 cm since the metabolite coverage and the total number of features slightly better (Fig. 2b.), and no discernible influence was changed when the fiber length increased from 3.5 to 4 cm. Accordingly, 3 cm was adopted as optimized fiber length in the subsequent experiments.

3.1.7. HM dilution factor

The composition in HBM differs in terms of chemical structure and metabolites concentration, which require often dilution of the sample and enrichment before analysis. Therefore, the dilution factor is an important parameter in the extraction process. Initially, we used the same dilution factor (~8-fold) as previously reported with the LLE method [23]. The results obtained demonstrated good enrichment factors and wide metabolite coverage detected with low sample consumption, which are explained in the following sections. Therefore, it was decided to carry out the experiments under these conditions.

3.1.8. Ionic strength adjustment and pH adjustment

Non-selective protocols were applied to three-phase-UA-HF-LPME with the purpose to maximize the ability to detect the higher number of metabolites and compare them with the reported extraction techniques used until now in metabolomics, in which there is no prior information about the target metabolites that can be extracted with a focus of untargeted analysis. Therefore, it was decided not to adjust the pH

and ionic strength of the sample in the future experiments, like in the traditional LLE applied to untargeted metabolomics, unless a certain low metabolite coverage was observed in the final application of the procedure. However, this fact did not happen, as can be seen in the following section and supplementary information (Fig. S1).

3.2. Comparison of LLE and three-phase-UA-HF-LPME for HM untargeted metabolomics regarding metabolite coverage

Fig. 3 shows the main families of compounds to which the annotated metabolites belong and the percentage of each class against the total number of metabolites using both LLE and three-phase-UA-HF-LPME. As we can see, the three-phase-UA-HF-LPME provides greater metabolite coverage and allows extracting a greater number of metabolites (three-phase-UA-HF-LPME vs LLE, Table S1). Interestingly, three-phase-HF-LPME allows the extraction of organic nitrogenous compounds from HM (3 % of the total number of metabolites annotated by three-phase-UA-HF-LPME), which was not possible using LLE. These metabolites detected only with three-phase-UA-HF-LPME, such as *butylamine*, may be of special interest because there is scientific evidence of their possible relationship with neonatal hypergastrinemia [43]. On the other hand, three-phase-UA-HF-LPME was more efficient for the extraction of fatty acids and derivatives (23 % vs 7 % using LLE) as well as for lipids (17 % vs 14 % LLE). As one family of compounds (organic nitrogen compounds) cannot be extracted by LLE and the total number of metabolites extracted by this analytical technique was also lower, the percentages of each family of compounds referred to the latter were high as in the case of non-metallic compounds (15 %), carbohydrates and derivatives (29 %) and amino acids and peptides (14 %) compared to three-phase-UA-HF-LPME (7 %, 20 % and 7 %, respectively).

3.3. Comparison of the chromatographic profiling and annotated metabolites by GC-MS after LLE and three-phase-UA-HF-LPME

HM chromatographic profiles were obtained using both extraction methods, LLE and three-phase-UA-HF-LPME by GC-MS analysis (Fig. S1). As can be seen in SI, the chromatographic profile obtained by three-phase-UA-HF-LPME remove background noise compared to the LLE method. In order to obtain good reliability and stability of the metabolomic results, the analysis was evaluated using QCs, which consisted of a pool of all the samples. PCA plots displayed a good QCs clustering (Fig. S2a). PLS-DA showed good separation between the different extraction methods included in this study and analyzed by GC-MS (Fig. S2b). In addition, three pairwise comparisons between LLE versus three-phase-UA-HF-LPME at three different times (5, 10, and 15 min) were performed to identify the metabolites responsible for the discrimination between both analytical techniques. The values of R^2 and Q^2 confirmed the discrimination power of the models (Table S2). The efficiency of the extraction method was evaluated by the total number of

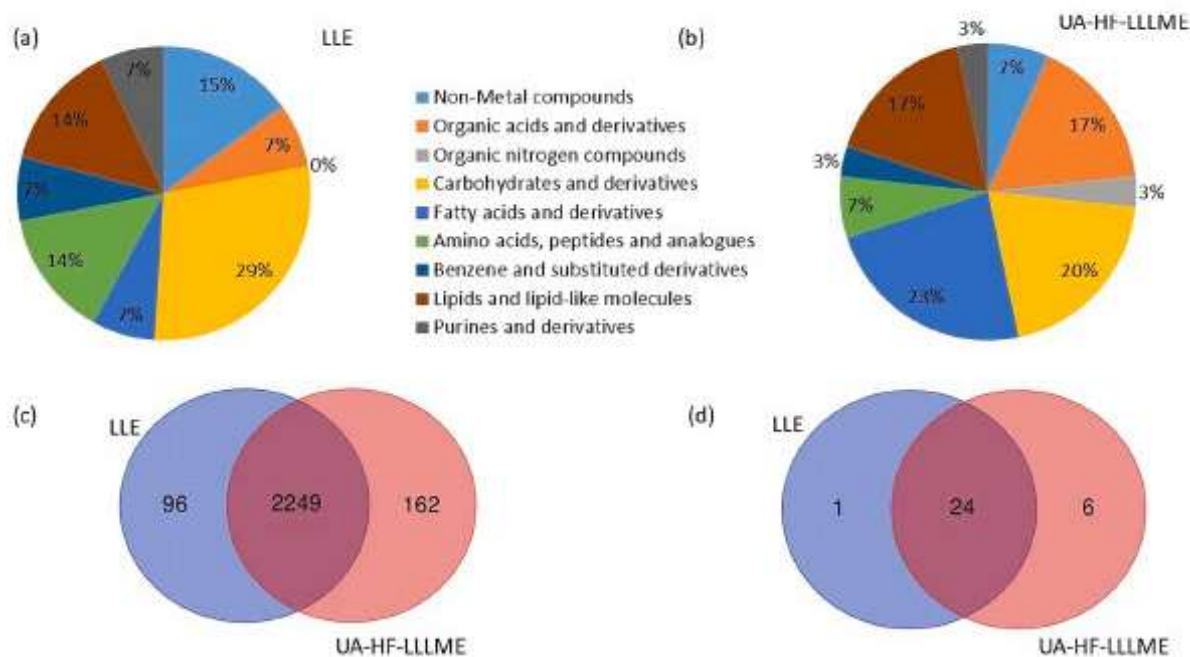


Fig. 3. Metabolite coverage according to the families of compounds using both a) LLE and b) three-phase-UA-HF-LPME for human milk metabolomics. Venn diagram comparing c) total number extracted features and d) total number annotated metabolites using three-phase-UA-HF-LPME and LLE by GC-MS.

extracted metabolites and the total intensity of the extracted features. Fig. 3c and 3d shown the total number of features extracted and the total number of annotated metabolites with the different extraction techniques compared in this study. As can be seen, LLE and three-phase-UA-HF-LPME allow extracting 2345 and 2411 features respectively, and finally, 25 and 30 metabolites were annotated by LLE and three-phase-UA-HF-LPME. Using the new three-phase-UA-HF-LPME method, the metabolites were annotated using Kovats retention indices, tandem mass spectrometric experiments, and NIST database MS searching (Table S1). Additionally, we used the fold change to explore the differences in the total intensity of the m/z signal of metabolites between both analytical extraction techniques (Table S3). Fold changes were computed simply as the ratio between m/z peak intensity using the three-phase-UA-HF-LPME against the peak intensity using LLE for metabolite. Thus, the three-phase-UA-HF-LPME technique enhanced the extraction of fatty acids and derivatives such as decanoic acid (1.65-fold), lauric acid (2.87-fold), tetradecanoic acid (3.05-fold), palmitic acid (3.02-fold), palmitoleic acid (2.73-fold), stearic acid (2.65-fold), myristic acid (2.43-fold), linoleic acid (1.54-fold), and azelaic acid (3.27). Likewise, we also found an increase of lipids and lipid-like molecules such as oleamide (2.06-fold) and monopalmitin (2.75-fold), organic acids and derivatives such as lactic acid (3.25-fold) and citric acid (2.67-fold), amino acids and peptides such as glycine (2.01-fold), proline (2.11-fold) and glutamine (3.02-fold). The extraction capability of these metabolites were significantly enhanced with the three-phase-UA-HF-LPME method in comparison with LLE. These compounds are bioactive molecules necessary for key metabolic and physiological functions related with the proper development, growth and health of the newborn [44,45]. Otherwise, LLE seems to be greater for the extraction of carbohydrates and derivatives such as urea (0.15-fold), phosphoric acid (0.02), and galactose (0.25-fold).

3.4. Validation of the three-phase-UA-HF-LPME /GC-MS by targeted metabolomics

To evaluate the applicability of the proposed three-phase-UA-HF-LPME, the following figures of merit were determined and compared with LLE: repeatability, reproducibility, recoveries, enrichment factor,

linearity and detection limits (LODs) and limits of quantification (LOQs), by means of targeted metabolomics using standard solutions of lactic acid, urea, glycerol, serine, proline, glutamic acid, citric acid, and glucose. Ribitol was included as an internal standard to correct possible errors in the signal. Linear ranges were evaluated by analyzing six different levels of concentrations of standard solutions in triplicate, where the linearity coefficients were all greater than 99 % ($R^2 > 0.99$). The recoveries were estimated by comparing the values of the samples enriched in triplicate ($n = 3$), obtaining recoveries within the range 99–86 % [35]. The LODs and LOQs were in the ranges 0.08–0.16 and 0.26–0.54 mg L^{-1} , respectively (Table 1). The Ee results are very high, thus enhancing the extraction efficiency of LLE (Table 1). The results have confirmed that the features of the method are very good and the methodology that can be applied successfully for the analysis of complex samples.

4. Conclusions

The new method optimized for HM untargeted metabolomics, based on three-phase-UA-HF-LPME by GC-MS provides a wide metabolite coverage with higher features and family of compounds annotated than LLE, probably because the former analytical technique achieves lower background noise and higher peak signal to noise ratio in chromatograms and mass spectra, thus preventing the common signal suppression. The analytical validation of the analytical method using commercially available standards and targeted metabolomics showed lower detection limits, higher enrichment factors and high fold changes in comparison with LLE. Moreover, the new optimized approach allows higher sample throughput with shorter extraction times aided by ultrasound and because with HF the common LLE step for proteins precipitation by centrifugation is not required. Thus, HF is a potential analytical technique that can be applied to untargeted metabolomics with comparable results to LLE combining both, a non-selective procedure and high enrichment factors, that are ideal for untargeted analysis and metabolite coverage, respectively. Our results provide insights into the possible application of HF to HM untargeted metabolomics and open further research related to other samples, especially complex biofluids in which the sample consumption and sample throughput is

Table 1

Validation parameters of the proposed method in comparison with LLE.

Validation parameters	Lactic acid	Glutamic acid	Urea	Glycerol	Glucose	Citric acid	Serine	Proline
LLE (*)								
LOD mg L ⁻¹ *	0.53	1.51	3.22	4.63	0.53	0.20	0.70	0.13
LOQ mg L ⁻¹ *	1.87	5.03	10.72	15.44	1.60	0.61	2.32	0.64
Intra-day (%RSD) n = 5 *	3.5	3	4.1	4	4.7	5.8	3.9	6.8
Inter-day (%RSD) n = 5 *	5.0	6.6	4.7	5.2	6.7	7.8	4.7	10.8
Recovery (%) n = 3	97.5	95.6	100.5	98.4	90.1	80.3	103.2	82.4
Average concentration (mg L ⁻¹ ± S.E.M)	12.4 ± 0.5	98.3 ± 3.2	160.4 ± 8.9	420.3 ± 26.4	99.3 ± 7.5	70.9 ± 5.7	6.8 ± 4.5	2.2 ± 0.7
three-phase-UA-HF-LPME								
LOD (mg L ⁻¹)	0.16	0.08	0.08	0.16	0.14	0.09	0.14	0.09
LOQ (mg L ⁻¹)	0.54	0.26	0.27	0.53	0.48	0.53	0.46	0.48
Intra-day (%RSD) n = 5	0.24	10.46	6.74	3.64	6.93	4.37	2.42	7.96
Inter-day (%RSD) n = 5	6.31	8.09	3.71	5.20	4.93	8.94	5.99	6.11
Recovery (%) n = 3	86.4	99.2	98.1	90.6	98.2	98.5	97.8	98.4
Ee (RSD%) n = 3	15 (12)	123 (5)	8 (7)	107 (10)	75 (4)	84 (6)	103 (11)	78.9 (16)
Linearity								
Regression equation	Y = 0.79X + 1.75	Y = 0.06X + 2.48	Y = 0.08X + 1.48	Y = 0.12X + 4.74	Y = 0.03X + 2.27	Y = 0.03X + 0.29	Y = 0.34X + 3.21	Y = 0.25X + 0.98
Determination coefficient (R ²)	0.998	0.996	0.997	0.991	0.993	0.991	0.994	0.997
Range (mg L ⁻¹)	0.54–23	0.26–60	0.27–260	0.53–500	0.48–125	0.53–25	0.46–15	0.48–7
Average concentration (mg L ⁻¹ ± S.E.M)	15.3 ± 0.9	120.6 ± 1.3	149.4 ± 6.2	450.4 ± 29.6	104.3 ± 4.7	85.2 ± 1.2	5.6 ± 0.6	3.1 ± 0.4

Enrichment factors, Ee; S.E.M, standard error of the mean; (*) Validation parameters in LLE according to literature [21].

critical. Further research will be focused on the analysis of the obtained extract with LC-MS since it is also compatible with the polarity and volume of the obtained extract using three-phase-UA-HF-LPME.

CRediT authorship contribution statement

M.C. Villegas-Álvarez: Formal analysis, Investigation, Visualization, Validation, Data curation. A. Arias-Borrego: Formal analysis, Investigation, Visualization, Validation, Data curation, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing. I. Velasco: Resources, Writing – review & editing. T. García-Barrera: Conceptualization, Supervision, Investigation, Visualization, Methodology, Funding acquisition, Project administration, Resources, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

This work was supported by the projects PID2021-123073NB-C21 and TED2021-130361B-I00 (Spanish Ministry of Science and innovation (MCIN). Generación del Conocimiento. MCIN/ AEI /10.13039/501100011033/ FEDER "Una manera de hacer Europa"), PI18/01857 (Carlos III Health Institut, co-funded by European Regional Development Fund & "A way to make Europe"), UHU-1256905 and UHU-202009 from the FEDER Andalusian operative program (Ministry of Economic Transformation, Industry, Knowledge and Universities, Andalusia, Spain). Project PCM_00023 and PY18-RE-0052 (Ministry of Universities, Research and Innovation, Andalusia, Spain). The authors are grateful to FEDER (European Community) for financial support through grants UNH13-1E-1611 and UNH15-CE-3140. We thank the advice of Prof. José Luis Capelo (NOVA University Lisbon) regarding the use of ultrasound for HF-LPME during the 4th International Caparica

Christmas Conference on Sample Treatment held in Caparica (Portugal) 30th November – 3rd December 2020.

Appendix A. Supplementary data

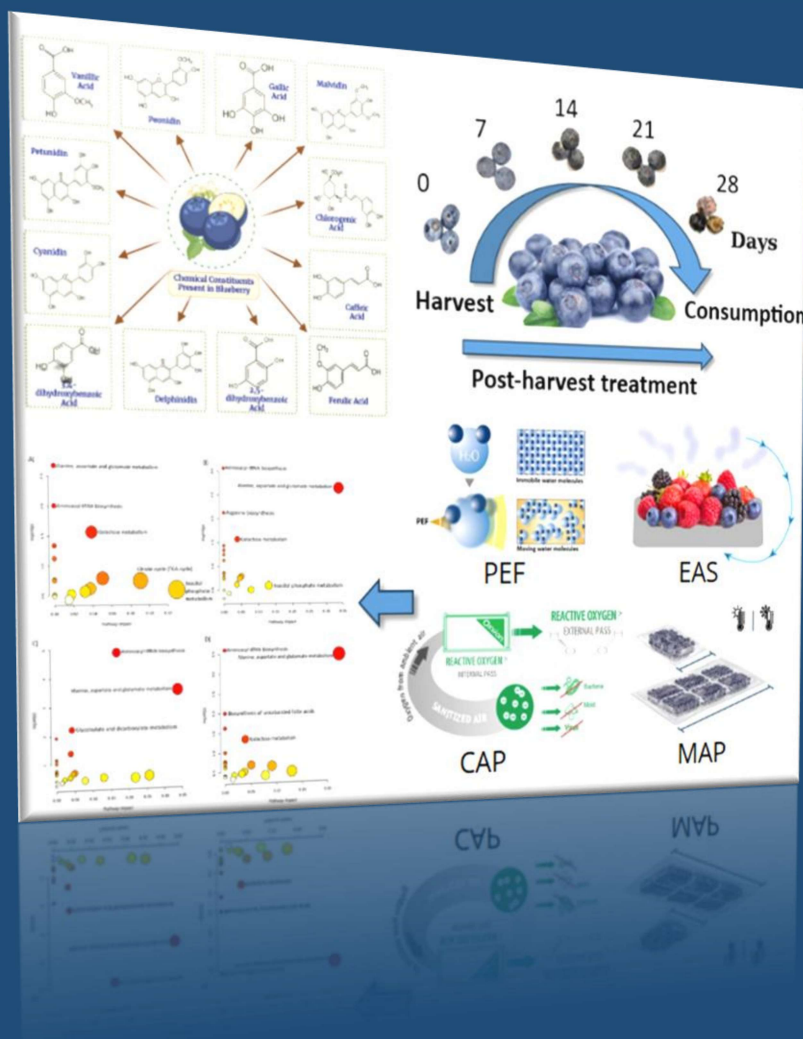
Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109473>.

References

- [1] G.A.N. Gowda, S. Zhang, H. Gu, V. Asiago, N. Shanaiiah, D. Raftery, Metabolomics-based methods for early disease diagnostics, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 8 (2006) 617–633, <https://doi.org/10.1586/147371598.5.617>.
- [2] J.L. Spratlin, N.J. Serkova, S.G. Eckhardt, Clinical applications of metabolomics in oncology: A review, *Clin. Cancer Res.* 15 (2009), <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1059>.
- [3] P. Radfar, L. Ding, L.R. de la Fuente, H. Aboulkheyr, D. Gallego-Ortega, M. E. Warkiani, Rapid metabolomic screening of cancer cells via high-throughput static droplet microfluidics, *Biosens. Bioelectron.* 223 (2023), <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114966>.
- [4] P.A. LeWitt, J. Li, K.-H. Wu, M. Lu, Diagnostic metabolomic profiling of Parkinson's disease biospecimens, *Neurobiol. Dis.* 177 (2023), <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105962>.
- [5] R. González-Domínguez, P.J. Rupérez, T. García-Barrera, C. Barbas, J.L. Gómez-Ariza, Metabolomic-driven elucidation of serum disturbances associated with alzheimer's disease and mild cognitive impairment, *Curr. Alzheimer Res.* 13 (2016) 641–653.
- [6] M.Á. García-Sevillano, T. García-Barrera, F. Navarro-Roldán, Z. Montero-Lobato, J. L. Gómez-Ariza, A combination of metallomics and metabolomics studies to evaluate the effects of metal interactions in mammals, Application to *Mus Musculus* Mice under Arsenic/cadmium Exposure, *J. Proteomics* 104 (2014) 66–79, <https://doi.org/10.1016/j.jpro.2014.02.011>.
- [7] A. Arias-Borrego, M. Selma-Royo, M.C. Collado, N. Abril, T. García-Barrera, Impact of "chemical cocktails" exposure in shaping mice gut microbiota and the role of selenium supplementation combining metallomics, metabolomics, and metatranscriptomics, *J. Hazard. Mater.* 438 (2022), <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129444>.
- [8] M.A. García-Sevillano, T. García-Barrera, N. Abril, C. Pueyo, J. López-Barea, J. L. Gómez-Ariza, Omics technologies and their applications to evaluate metal toxicity in mice *M. spretus* as a bioindicator, *J. Proteomics* 104 (2014) 42–43, <https://doi.org/10.1016/j.jpro.2014.02.032>.
- [9] M.J. Primitivo, M. Neves, C.L. Pires, P.P. Cruz, C. Brito, A.C. Rodrigues, C.C.C.R. de Carvalho, M.M. Mortimer, M.J. Moreno, R.M.M. Brito, D.C. Vaz, V.S. Ribeiro, Edible flowers of *Helichrysum italicum*: Composition, nutritive value, and bioactivities, *Food Res. Int.* 157 (2022), <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111399>.
- [10] M.A. Parag, F. Elmetwally, R. Elghanam, N. Kamal, K. Hellal, H.S. Hamezah, C. Zhao, A. Mediani, Metabolomics in tea products: a compile of applications for enhancing agricultural traits and quality control analysis of *Camellia sinensis*, *Food Chem.* 404 (2023), <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134628>.

- [11] R. Sun, R. Xing, J. Zhang, T. Deng, Y. Ge, W. Zhang, Y. Chen, Quality changes of HHP orange juice during storage: Metabolomic data integration analyses, *Food Chem.* 404 (2023), <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134612>.
- [12] A.D. Maher, S.F.M. Zirah, E. Holmes, J.K. Nicholson, Experimental and analytical variation in human urine in ^1H NMR spectroscopy-based metabolic phenotyping studies, *Anal. Chem.* 79 (2007) 5204–5211, <https://doi.org/10.1021/ac070212f>.
- [13] A. Arias-Borrego, I. Velasco, J.L. Gómez-Ariza, T. García-Barrera, Iodine deficiency disturbs the metabolic profile and elemental composition of human breast milk, *Food Chem.* 371 (2022), <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131329>.
- [14] K.L. Olschan, A.R. Zomorodi, M. Pujolassos, J. Troisi, N. Khan, B. Fanelli, V. Kenyon, A. Pasano, M.M. Leonard, Microbiota and metabolomic patterns in the breast milk of subjects with celiac disease on a gluten-free diet, *Nutrients* 13 (2021), <https://doi.org/10.3390/nu13072243>.
- [15] M. Wójcik, H. Mojska, Human milk metabolome: Impact of gestational age, lactational stage and maternal diet, *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* 73 (2022) 139–145, <https://doi.org/10.32394/rph.2022.0214>.
- [16] A. Arias-Borrego, F.J. Soto Cruz, M. Selma-Royo, C. Bäuerl, E. García Verdeño, P. J. Pérez-Cano, C. Lerin, I. Velasco López, C. Martínez-Costa, M.C. Collado, M. C. Collado, T. García-Barrera, Metallomic and Untargeted Metabolomic Signatures of Human Milk from SARS-CoV-2 Positive Mothers, *Mol. Nutr. Food Res.* 66 (2022), <https://doi.org/10.1002/mnfr.202200071>.
- [17] L.S. Nolan, A.N. Lewis, Q. Gong, J.J. Sollome, O.N. Dewitt, R.D. Williams, M. Good, Untargeted metabolomic analysis of human milk from mothers of preterm infants, *Nutrients* 13 (2021), <https://doi.org/10.3390/nu13102604>.
- [18] M.C. Villegas-Álvarez, B. Callejón-Leblic, G. Rodríguez-Moro, J.L. Gómez-Ariza, A. Arias-Borrego, T. García-Barrera, Optimization of hollow-fiber liquid phase microextraction for polychlorinated biphenyls in human breast milk, *J. Chromatogr. A* 1626 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461391>.
- [19] Y. Yang, C. Cruickshank, M. Armstrong, S. Mahaffey, R. Reisdorph, N. Reisdorph, New sample preparation approach for mass spectrometry-based profiling of plasma results in improved coverage of metabolome, *J. Chromatogr. A* 1300 (2013) 217–226, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.04.030>.
- [20] E.J. Want, G. O'Maille, C.A. Smith, T.R. Brandon, W. Uritboonthai, C. Qin, S. A. Trauger, G. Siuzdak, Solvent-dependent metabolite distribution, clustering, and protein extraction for serum profiling with mass spectrometry, *Anal. Chem.* 79 (2007) 743–752, <https://doi.org/10.1021/ac051312t>.
- [21] F.C. Marincola, A. Noto, P. Caboni, A. Reali, L. Barberini, M. Lusu, P. Murgia, M. L. Santoru, L. Atzori, V. Fanos, A metabolomic study of preterm human and formula milk by high resolution NMR and GC/MS analysis: Preliminary results, *J. Maternal-Fetal Neonatal Med.* 25 (2012) 62–67, <https://doi.org/10.3109/14767058.2012.715436>.
- [22] G. Praticò, G. Capuani, A. Tomassini, M.E. Baldassarre, M. Delfini, A. Micheli, Exploring human breast milk composition by NMR-based metabolomics, *Nat. Prod. Res.* 29 (2014) 95–101, <https://doi.org/10.1080/14786419.2013.843180>.
- [23] A. Villaseñor, I. García-Pérez, A. García, J.M. Pomaa, M. Fernández-López, A. J. Nicholas, N. Modi, E. Holmes, C. Barbas, Breast milk metabolome characterization in a single-phase extraction, multiplatform analytical approach, *Anal. Chem.* 86 (2014) 8245–8252, <https://doi.org/10.1021/ac501853d>.
- [24] N.J. Andreas, M.J. Hyde, M. Gomez-Romero, M.A. Lopez-Gonzalez, A. Villaseñor, A. Wijeyesekera, C. Barbas, N. Modi, E. Holmes, I. García-Pérez, Multiplatform characterization of dynamic changes in breast milk during lactation, *Electrophoresis* 36 (2015) 2269–2285, <https://doi.org/10.1002/elpa.201500011>.
- [25] K. Li, J. Jiang, H. Xiao, K. Wu, C. Qi, J. Sun, D. Li, Changes in the metabolite profile of breast milk over lactation stages and their relationship with dietary intake in Chinese women: HPLC-QTOFMS based metabolomic analysis, *Food Funct.* 9 (2018) 5189–5197, <https://doi.org/10.1039/c8fo01005f>.
- [26] Y.-C. Zhao, Y. Zhang, C.-X. Liu, D.-Y. Yan, P. Dong, Compositional Differences between Preterm Milk of Different Gestational Ages with the Term Milk: A Comparative Lipidomic Study by LC-MS/MS, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 124 (2022), <https://doi.org/10.1002/ejlt.202100224>.
- [27] E. Sakarya, N.T. Sanlier, N. Sanlier, The relationship between human milk, a functional nutrient, and microbiota, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* (2021), <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.2006301>.
- [28] G. Boudry, E. Charton, I. Le Huerou-Luron, S. Ferret-Bernard, S. Le Gall, S. Even, S. Blat, The Relationship Between Breast Milk Components and the Infant Gut Microbiota, *Front. Nutr.* 8 (2021), <https://doi.org/10.3389/fgut.2021.629740>.
- [29] M. Alexovic, B. Horstkotte, P. Solich, J. Sabo, Automation of static and dynamic non-dispersive liquid phase microextraction. Part 2: Approaches based on impregnated membranes and porous supports, *Anal. Chim. Acta* 907 (2016) 18–30, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.11.046>.
- [30] A. Domínguez-Tello, A. Arias-Borrego, T. García-Barrera, J.L. Gómez-Ariza, Application of hollow fiber liquid phase microextraction for simultaneous determination of regulated and emerging iodinated trihalomethanes in drinking water, *J. Chromatography A* 1402 (2015) 8–16, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.05.020>.
- [31] M.D.L. de C. F. Priego Capote, *Analytical Applications of Ultrasound*, 1st ed., Elsevier, 2006.
- [32] J. Regueiro, M. Llompart, C. Garcia-Jares, J.C. Garcia-Monteagudo, R. Cela, Ultrasound-assisted emulsification-microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters, *J. Chromatogr. A* 1190 (2008) 27–38, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.02.091>.
- [33] N.A. Tsochatzidis, P. Guiraud, A.M. Wilhelm, H. Delmas, Determination of velocity, size and concentration of ultrasonic cavitation bubbles by the phase-Doppler technique, *Chem. Eng. Sci.* 56 (2001) 1831–1840, [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(00\)00460-7](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(00)00460-7).
- [34] K.-C. Hsu, C.-F. Lee, Y.-Y. Chao, C.-C. Hung, P.-C. Chen, C.-H. Chiang, Y.-L. Huang, Ultrasound-assisted hollow fiber/ionic liquid-based liquid phase microextraction using an ionic liquid solvent for preconcentration of cobalt and nickel ions in urine samples prior to FAAS determination, *J. Anal. At. Spectrom.* 31 (2016) 2338–2345, <https://doi.org/10.1039/c6ja00183a>.
- [35] S.X.L. Goh, H.K. Lee, An alternative perspective of hollow fiber-mediated extraction: Bundled hollow fiber array-liquid-phase microextraction with sonication-assisted desorption and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of estrogens in aqueous matrix, *J. Chromatogr. A* 1488 (2017) 26–36, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.01.081>.
- [36] P. Begley, S. Francis-McIntyre, W.B. Dunn, D.I. Broadhurst, A. Halsall, A. Tseng, J. Knowles, R. Goodacre, D.B. Kell, Development and performance of a gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry analysis for large-scale nontargeted metabolomic studies of human serum, *Anal. Chem.* 81 (2009) 7038–7046, <https://doi.org/10.1021/ac901159g>.
- [37] James Miller, Jane C Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 2011. https://books.google.es/books/about/Statistics_and_Chemometrics_for_Analytic.html?id=BPTDwAAQBAJ&redir_esc=y (accessed February 17, 2023).
- [38] A. Bourdin-Pintueles, L. Galineau, L. Nadal-Desbarats, C. Dupuy, S. Bodard, J. Bussan, A. Lefevre, P. Emond, S. Mavel, Maternal Rat Metabolomics: Amniotic Fluid and Placental Metabolic Profiling Workflows, *J. Proteome Res.* 20 (2021) 3853–3864, <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00145>.
- [39] A. Baesu, C. Audet, S. Bayen, Evaluation of different extractions for the metabolite identification of malachite green in brook trout and shrimp, *Food Chem.* 369 (2022), <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130567>.
- [40] T. Seidensticker, A.J. Vorholt, A. Behr, The mission of addition and fission - catalytic functionalization of oleochemicals, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 118 (2016) 3–25, <https://doi.org/10.1002/ejlt.201500190>.
- [41] M. Teramoto, H. Matsuyama, N. Ohnishi, S. Uwagawa, K. Nakai, Extraction of Ethyl and Methyl Esters of Polyunsaturated Fatty Acids with Aqueous Silver Nitrate Solutions, *Ind. Eng. Chem. Res.* 33 (1994) 341–345, <https://doi.org/10.1021/ie00026a026>.
- [42] A. Gjelstad, Three-phase hollow fiber liquid-phase microextraction and parallel artificial liquid membrane extraction, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 113 (2019) 25–31, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.01.007>.
- [43] M.A. Bello-López, M. Ramos-Payán, J.A. Ocaña-González, R. Fernández-Torres, M. Callejón-Mochón, Analytical Applications of Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction (HF-LPME): A Review, *Anal. Lett.* 45 (2012) 804–830, <https://doi.org/10.1080/00032719.2012.655676>.
- [44] L.M. Lichtenberger, J.W. Gardner, J.C. Barreto, F.H. Morris, Evidence for a role of volatile amines in the development of neonatal hypergastrinemia, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 13 (1991) 342–346, <https://doi.org/10.1097/00005176-199113000-00002>.
- [45] D. Garwolińska, J. Namieśnik, A. Kot-Wasik, W. Hewelt-Belka, Chemistry of Human Breast Milk - A Comprehensive Review of the Composition and Role of Milk Metabolites in Child Development, *J. Agric. Food Chem.* 66 (2018) 11881–11896, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04031>.

CAPÍTULO 3



4.3. Capítulo 3: Efecto de los tratamientos postcosecha en el perfil metabólico de los arándanos.

4.3.1. Evaluación de la calidad: Cambios fisicoquímicos y organolépticos en los arándanos tratados.

Los resultados del control de calidad a lo largo del tiempo se presentan en la Figura 4.12, mientras que los datos detallados de los ensayos E1 y E2 se encuentran en las Tablas 4.2 y 4.3.

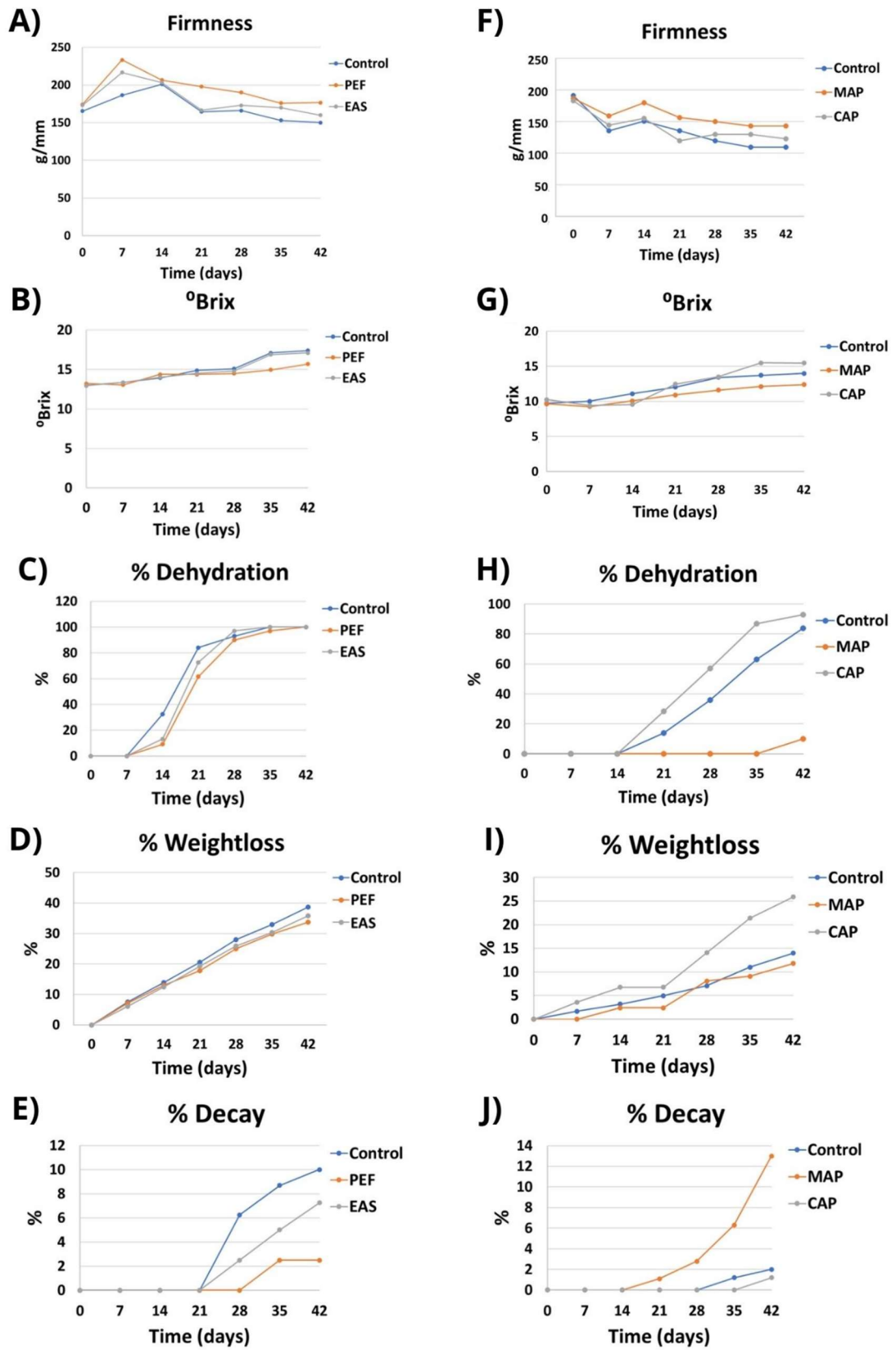


Figura 4.13. Resultados obtenidos en el estudio de vida útil de E1 (A-E) y E2 (F-J). (Fuente: Elaboración propia)

Tratamiento	días	Media (Firm)	Media (°Brix)	% Pudrición	pH	% Pruina	% Deshidratación		Apariencia Interna	% Magulladura	% Pérdida de peso
							1-2	3-4			
Control	0	173.33	13.00	0.00	3.00	100.00	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00
Control	0	146.67	12.97	0.00	3.00	100.00	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00
Control	0	176.67	13.00	0.00	3.00	100.00	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00
PEF	0	176.67	13.40	0.00	3.00	100.00	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00
PEF	0	160.00	13.00	0.00	3.00	100.00	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00
PEF	0	186.67	13.30	0.00	3.00	100.00	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00
EAS	0	186.67	12.33	0.00	3.00	100.00	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00
EAS	0	176.67	12.80	0.00	3.00	100.00	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00
EAS	0	203.33	13.70	0.00	3.00	100.00	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00
Control	7	226.67	14.40	0.00	3.00	100.00	5.00	0.00	4.00	3.75	8.11
Control	7	193.33	12.43	0.00	3.00	100.00	3.75	0.00	4.00	3.75	7.27
Control	7	220.00	13.23	0.00	3.00	100.00	2.50	0.00	4.00	1.25	7.27
PEF	7	216.67	13.23	0.00	3.00	100.00	0.00	0.00	4.00	1.25	7.07
PEF	7	230.00	13.23	0.00	3.00	100.00	0.00	0.00	4.00	1.25	7.69
PEF	7	180.00	12.73	0.00	3.00	100.00	0.00	0.00	4.00	1.25	6.67
EAS	7	233.33	13.27	0.00	3.00	100.00	1.25	0.00	4.00	1.25	5.79
EAS	7	216.67	13.67	0.00	3.00	100.00	0.00	0.00	4.00	1.25	6.31
EAS	7	186.67	13.17	0.00	3.00	100.00	2.50	0.00	4.00	2.50	6.25
Control	14	173.33	15.10	0.00	3.00	100.00	66.25	31.25	3.00	2.50	14.41
Control	14	233.33	13.60	0.00	3.00	100.00	71.25	22.50	3.00	6.25	13.64
Control	14	196.67	13.13	0.00	3.00	100.00	51.25	43.75	3.00	2.50	13.64
PEF	14	203.33	14.20	0.00	3.00	100.00	88.75	7.50	3.00	5.00	13.13

PEF	14	206.67	14.60	0.00	3.00	100.00	76.25	17.50	3.00	0.00	13.46
PEF	14	210.00	14.33	0.00	3.00	100.00	82.50	15.00	3.00	2.50	12.38
EAS	14	203.33	14.77	0.00	3.00	100.00	75.00	13.75	3.00	6.25	11.57
EAS	14	230.00	13.93	0.00	3.00	100.00	82.50	6.25	3.00	10.00	13.51
EAS	14	176.67	13.40	0.00	3.00	100.00	90.00	7.50	3.00	2.50	12.50
Control	21	216.67	15.97	0.00	4.00	85.00	11.25	88.75	2.00	5.00	20.72
Control	21	213.33	14.50	0.00	4.00	96.25	20.00	80.00	3.00	11.25	20.00
Control	21	163.33	14.20	0.00	4.00	93.75	16.25	83.75	2.00	3.75	20.91
PEF	21	176.67	13.63	0.00	4.00	97.50	46.25	53.75	2.00	5.00	17.79
PEF	21	153.33	14.93	0.00	3.00	100.0	35.00	65.00	2.00	5.00	17.23
PEF	21	163.33	14.17	0.00	3.00	100.00	33.75	66.25	3.00	5.00	18.10
EAS	21	146.67	14.47	0.00	4.00	95.00	10.00	90.00	2.00	7.50	18,18
EAS	21	183.33	15.43	0.00	3.00	95.00	18.75	81.25	2.00	6.25	19.82
EAS	21	170.00	13.67	0.00	4.00	98.75	15.00	85.00	2.00	6.25	19.64
Control	28	180.00	16.5	5.30	4	77.5	7.5	92,5	3	7	27.93
Control	28	170.00	15.04	6.80	3	85	6.25	93,75	3	5	28.18
Control	28	150.00	15.06	6.65	4	93.75	7.5	92,5	2	8.75	28.18
PEF	28	200.00	14.50	0	3	86.25	10	90	3	7.5	26.06
PEF	28	190.00	15.50	0	3	87.5	10	90	3	5	26.02
PEF	28	210.00	12.50	0	3	92.5	11	89	3	7.5	24.06
EAS	28	180.00	14.40	1.75	3	88.75	0	100	3	7.5	24.79
EAS	28	170.00	15.50	2.90	3	87.5	2.5	97.5	3	6.25	27.03
EAS	28	170.00	15.20	2.85	3	96.25	7.5	92.5	3	7	25.89
Control	42	150.00	18.6	9.20	4	97.5	0	100	2	11.25	40.74

Control	42	140.00	19.6	10.50	4	97.5	0	100	2	11.25	40.18
Control	42	150.00	16.3	10.30	4	98.75	0	100	2	12.5	38.18
PEF	42	170.00	15.8	2.10	4	98.75	0	100	2	10	32.34
PEF	42	200.00	15.3	2.80	4	97.5	0	100	2	7.5	30.65
PEF	42	160.00	13.1	2.60	4	98.75	0	100	3	10	30.33
EAS	42	150.00	18.6	6.80	4	97.5	0	100	3	15	35.23
EAS	42	180.00	15.8	7.90	4	93.75	0	100	1	8.75	40.54
EAS	42	150.00	20.1	7.80	4	97.5	0	100	2	12.5	38.82

Tabla 4.2. Parámetros de calidad del ensayo E1 durante 42 días de almacenamiento. (Fuente: Elaboración propia)

Tratamiento	días	Media (Firm)	Media (°Brix)	% Pudrición	pH	% Pruina	% Deshidratación		Apariencia Interna	% Magulladura	% Pérdida de peso
							1-2	3-4			
Control	0	183.33	9.13	0.00	2.00	100.00	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00
Control	0	196.67	11.27	0.00	2.00	100.00	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00
Control	0	193.33	8.70	0.00	2.00	100.00	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00
MAP	0	190.00	9.90	0.00	2.00	100.00	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00
MAP	0	183.33	8.90	0.00	2.00	100.00	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00
MAP	0	186.67	10.13	0.00	2.00	100.00	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00
CAP	0	186.67	10.27	0.00	2.00	100.00	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00
CAP	0	190.00	10.47	0.00	2.00	100.00	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00
CAP	0	173.33	10.03	0.00	2.00	100.00	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00
Control	7	133.33	11.23	0.00	3.00	100.00	2.54	0.00	3.00	3.39	2.48
Control	7	130.00	9.67	0.00	3.00	100.00	1.74	0.00	3.00	1.74	2.54
Control	7	143.33	9.17	0.00	3.00	100.00	2.56	0.00	3.00	4.27	2.50
MAP	7	170.00	8.50	0.00	3.00	100.00	0.00	0.00	3.00	11.61	0.00

MAP	7	146.67	9.93	0.00	3.00	100.00	0.00	0.00	3.00	11.86	0.00
MAP	7	160.00	9.37	0.00	3.00	100.00	0.00	0.00	3.00	12.50	0.00
CAP	7	146.67	8.60	0.00	3.00	100.00	24.32	0.00	3.00	6.31	2.63
CAP	7	140.00	10.97	0.00	3.00	100.00	9.65	0.00	3.00	10.53	3.39
CAP	7	146.67	8.63	0.00	3.00	100.00	23.36	0.00	3.00	4.67	2.73
Control	14	150.00	9.17	0.00	3.00	100.00	17.48	0.00	3.00	26.21	4.63
Control	14	153.33	12.67	0.00	3.00	100.00	23.96	0.00	3.00	15.63	4.00
Control	14	150.00	11.47	0.00	3.00	100.00	13.59	0.00	3.00	31.07	4.63
MAP	14	176.67	11.07	0.00	3.00	100.00	0.00	0.00	3.00	12.38	0.94
MAP	14	176.67	10.73	0.00	3.00	100.00	0.00	0.00	3.00	3.45	0.00
MAP	14	186.67	8.40	0.00	3.00	100.00	0.00	0.00	3.00	10.87	2.13
CAP	14	150.00	8.63	0.00	3.00	100.00	46.43	0.00	3.00	8.93	5.08
CAP	14	173.33	10.17	0.00	3.00	100.00	66.29	0.00	3.00	26.97	5.32
CAP	14	143.33	9.83	0.00	3.00	100.00	40.21	0.00	3.00	27.84	5.83
Control	21	140.00	12.13	0.00	3.00	100.00	89.89	10.11	3.00	28.09	9.18
Control	21	140.00	13.13	0.00	3.00	100.00	81.72	18.28	3.00	15.05	7.00
Control	21	126.67	10.83	0.00	3.00	100.00	86.42	13.58	2.00	23.46	7.95
MAP	21	156.67	8.20	1.10	3.00	100.00	0.00	0.00	3.00	5.56	1.94
MAP	21	160.00	8.70	1.11	3.00	100.00	0.00	0.00	3.00	10.00	2.43
MAP	21	153.33	9.93	1.10	3.00	100.00	0.00	0.00	3.00	13.04	2.13
CAP	21	133.33	11.70	0.00	3.00	100.00	75.58	24.42	2.00	17.44	10.42
CAP	21	113.33	12.23	0.00	3.00	100.00	64.71	35.29	3.00	20.00	11.46
CAP	21	113.33	13.43	0.00	3.00	100.00	74.39	25.61	3.00	20.73	9.89
Control	28	118.5	15.6	0.00	3.00	100.00	46.67	15.24	3	33.33	11.02
Control	28	121.0	13.1	0.00	3.00	93.88	61.22	36.73	2	15.31	12.50
Control	28	120.5	11.7	0.00	3.00	100.00	70.59	19.61	2	20.59	10.53

MAP	28	150.0	10.6	2.5	3.00	100.00	0.00	0.00	3	4.46	0.00
MAP	28	130.0	10.0	3.1	3.00	100.00	0.96	0.00	3	9.62	7.96
MAP	28	170.0	14.2	2.8	3.00	100.00	22.00	0.00	3	21.00	4.76
CAP	28	120.0	13.5	0.00	3.00	94.90	54.08	44.90	3	15.31	14.04
CAP	28	110.0	12.1	0.00	3.00	100.00	32.65	65.31	2	9.18	14.04
CAP	28	140.0	14.9	0.00	3.00	100.00	34.02	60.82	2	11.34	13.39
Control	42	110.0	11.9	1.8	4.00	98.91	15.38	84.62	1	15.38	20.87
Control	42	100.0	15.3	2.2	4.00	97.59	36.26	96.70	2	6.59	18.75
Control	42	130.0	14.9	2.0	4.00	100.00	5.26	92.63	2	26.32	21.49
MAP	42	150.0	12.8	12.5	4.00	100.00	0.00	0.00	3	28.28	1.98
MAP	42	160.0	15	13.5	4.00	100.00	0.00	0.00	3	4.04	3.88
MAP	42	120.0	9.4	13.0	4.00	100.00	22.34	3.19	3	7.45	6.00
CAP	42	122.0	14.2	1.0	4.00	100.00	6.56	93.44	2	11.48	10.61
CAP	42	122.4	16.8	1.3	4.00	100.00	0.00	100.00	2	15.00	9.83
CAP	42	122.5	15.5	1.3	4.00	100.00	6.67	93.33	2	14.67	23.00

Tabla 4.3. Parámetros de calidad del ensayo E2 durante 42 días de almacenamiento. (Fuente: Elaboración propia)

En el ensayo E1, tras 42 días de almacenamiento, no se detectaron diferencias significativas en la firmeza, los sólidos solubles totales (°Brix) o el porcentaje de deshidratación entre los tres tratamientos evaluados ($p > 0,05$) (Figura 2A-C). No obstante, los frutos tratados con PEF mostraron valores promedio de °Brix significativamente menores (14,7) en comparación con los frutos control, cuyo valor promedio fue de 18. Este resultado sugiere que el tratamiento con PEF podría retardar la senescencia del fruto, lo que a su vez reduciría la degradación ácida y, consecuentemente, disminuiría el contenido de azúcares. Investigaciones previas han señalado que la biosíntesis de etileno y la transducción de señales juegan un papel clave en la maduración y el ablandamiento de frutos no climatéricos, lo que podría explicar la reducción observada en el contenido de azúcares en los frutos sometidos a PEF (345).

Además, en el mismo ensayo, la pérdida de peso fue significativamente menor en las muestras tratadas con PEF (31 %, $p = 0,003$) en comparación con las muestras control, que registraron una pérdida del 39,7 %, lo que indica que PEF ofreció una mejor protección contra la deshidratación en comparación con los otros tratamientos evaluados (Figura 4.12D).

En el ensayo E2, después de 42 días de almacenamiento, no se encontraron diferencias significativas en la firmeza ni en los valores de °Brix entre los tratamientos ($p > 0,05$) (Figura 4.12F-G). Sin embargo, en términos de deshidratación (Figura 4.12H), los frutos tratados con MAP no mostraron signos de pérdida de humedad hasta el día 21, mientras que los frutos sometidos a los otros tratamientos presentaron deshidratación significativa en la misma etapa ($p = 0,012$). De manera similar, la pérdida de peso fue menor en los frutos tratados con MAP, con solo una reducción del 4 % y sin signos visibles de deshidratación ($p = 0,013$) (Figura 4.12I). No obstante, a partir del día 21, se observó un incremento más acelerado en el porcentaje de descomposición en los frutos tratados con MAP en comparación con los otros tratamientos (Figura 4.12J).

4.3.2. Efectos de los tratamientos postcosecha en el perfil metabolómico: Identificación de metabolitos clave tras el almacenamiento.

Se utilizó una plataforma analítica integral basada en GC-MS y UHPLC-QTOF-MS para evaluar las modificaciones en los perfiles metabólicos de arándanos (*Vaccinium corymbosum* L.) tras la aplicación de distintos tratamientos postcosecha. La Figura 4.13 presenta un gráfico circular que ilustra el porcentaje de metabolitos alterados en comparación con las muestras control para cada tratamiento.

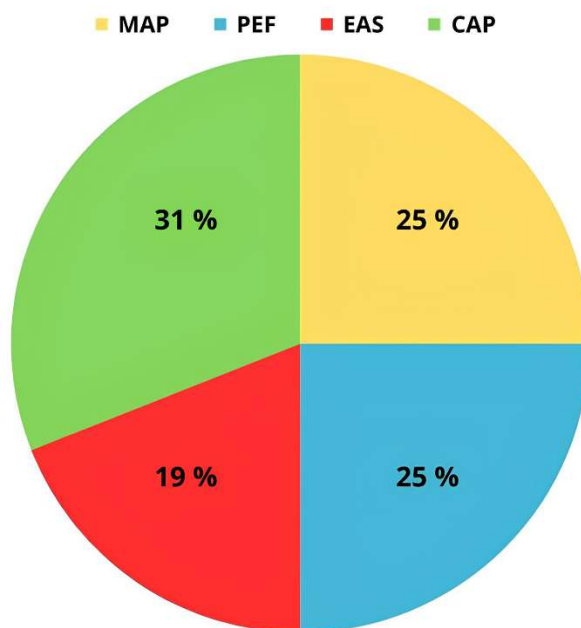


Figura 4.14. Gráfico circular que indica el porcentaje de metabolitos alterados por grupo en relación al total.
(Fuente: Elaboración propia)

Se observó que el tratamiento CAP produjo el mayor porcentaje de metabolitos alterados (31 %), mientras que el tratamiento EAS presentó el menor (19 %), aunque las diferencias entre los tratamientos no fueron estadísticamente significativas. En términos generales, los porcentajes de alteración metabólica fueron similares en todos los tratamientos, con valores que oscilaron entre el 20 % y el 30 %.

Por otro lado, la Figura 4.14 muestra un mapa de calor que representa la abundancia relativa de los metabolitos más relevantes alterados en los ensayos E1 y E2.

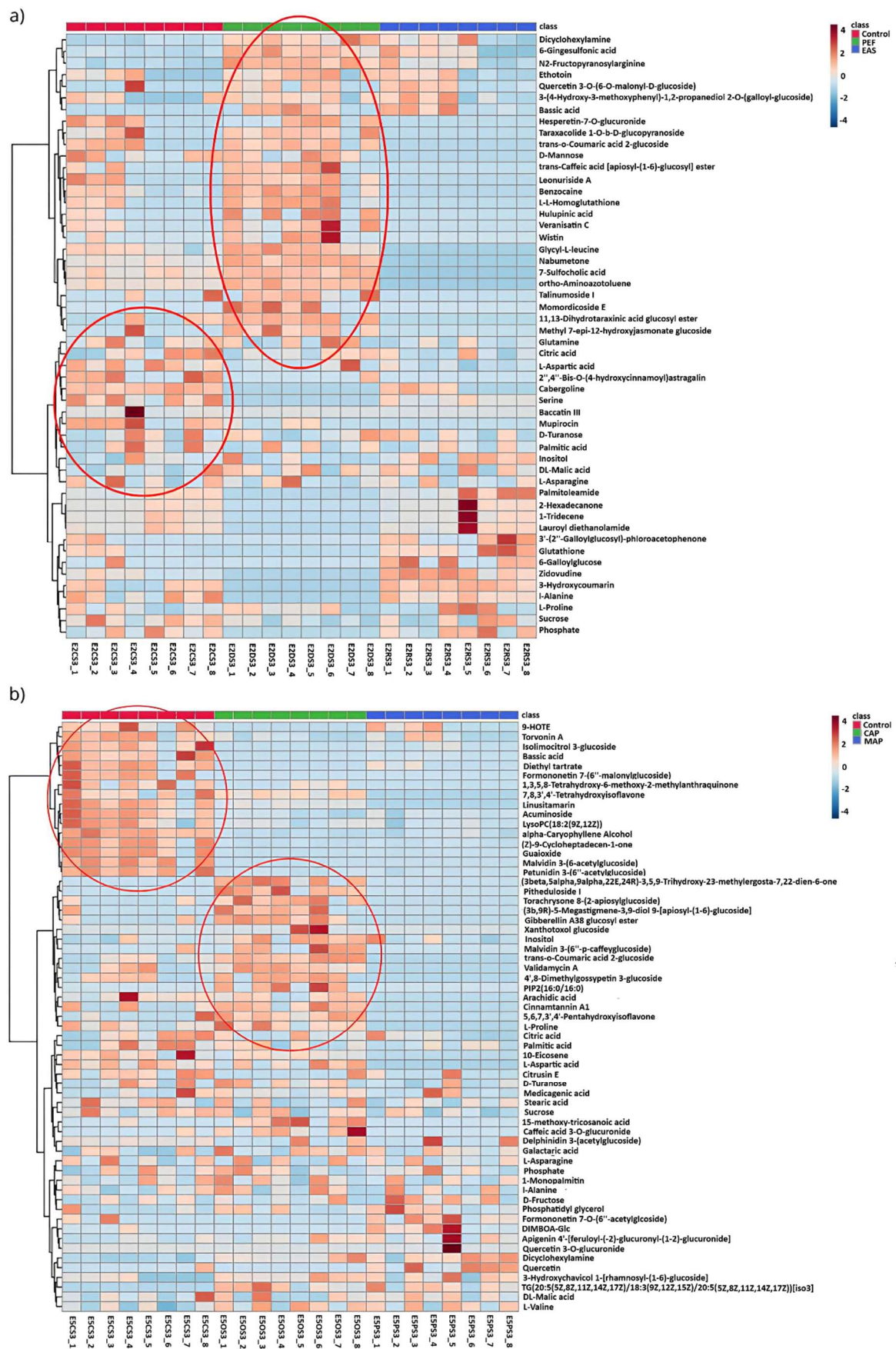


Figura 4.15. Diagrama de mapa de calor que muestra la abundancia de los metabolitos más relevantes alterados en los diferentes grupos analizados en los ensayos: (A) correspondiente a E1 y (B) correspondiente a E2. (Fuente: Elaboración propia)

En el ensayo E1 (Figura 4.14A), se identificaron dos grandes grupos de metabolitos. En particular, los arándanos tratados con PEF mostraron un incremento significativo en la abundancia de glicósidos terpénicos, isoflavonoides, compuestos fenólicos, glicósidos de acilo graso, aminoácidos, péptidos y sus análogos (representados en rojo en la figura). En contraste, estos mismos metabolitos se encontraron en menor concentración en los frutos sometidos al tratamiento EAS (color azul). Adicionalmente, se observó una reducción general de metabolitos en los otros grupos analizados, particularmente en compuestos como flavonoides, alcoholes, polioles y ácidos grasos.

En cuanto al ensayo E2 (Figura 4.14B), se destacó una disminución notable en la concentración de ciertos metabolitos en los grupos CAP y MAP, en comparación con el grupo control. Esta reducción afectó principalmente a flavonoides, isoflavonoides, carbohidratos e hidroxiácidos. No obstante, se observó un aumento en la concentración de metabolitos relacionados con carbohidratos, alcoholes y ácidos grasos en los frutos sometidos al tratamiento CAP. Los perfiles metabólicos obtenidos mediante la plataforma analítica se presentan en la Figura S3.

En total, se anotaron 116 metabolitos en el análisis combinado de los estudios E1 y E2. En el estudio E1, se identificaron 55 metabolitos, de los cuales 15 fueron detectados mediante GC-MS y 40 a través de UHPLC-ESI(±)-QTOF-MS. En el estudio E2, se anotaron 61 metabolitos (17 mediante GC-MS y 44 con UHPLC-QTOF-MS). Posteriormente, tras confirmar la clasificación de las muestras, los picos m/z responsables de la agrupación se identificaron mediante análisis MS/MS (Tablas S6 y S7), de acuerdo con el procedimiento descrito en la Sección 2.5.2. Para la identificación de metabolitos, se emplearon bases de datos como METLIN y HMDB en los espectros de masas obtenidos con UHPLC-QTOF, mientras que para los espectros generados mediante GC-MS, se utilizaron los índices de retención de Kovats en combinación con la biblioteca NIST.

Compound	Accession Numbers	Category	Exact Mass (Da)	n° C	MW (Da)	MW (Derivatized) (Da)	KRI	Target Ion (m/z)	RT (min)	XTMS
L-Alanine	HMDB0000161	Amino acids. peptides. and analogues	89	12	89	305	1083	116; 147	5.22	3TMS
Phosphoric acid	HMDB0001429	Non-metal phosphates	97.9769	16	98	488	1238	299	8.43	4TMS
Serine	HMDB0000187	Amino acids. peptides and analogues	105.0426	12	105	321	1596	147; 204; 218	10.43	3TMS
DL-Malic acid	HMDB0000156	Hydroxy acids and derivatives	134.0215	13	134	350	1846	73; 147; 233	13.52	3TMS
Aspartic acid	HMDB0000191	Amino acids. peptides and analogues	133.0375	13	133	349	1891	147; 218; 232	14.25	3TMS
L-Proline	HMDB0000162	Amino acids. peptides and analogues	115.0633	11	115	273	2052	147; 156; 258	14.35	2TMS
Glutamine	HMDB0000641	Amino acids. peptides and analogues	146.0691	14	146	363	2268	73; 128; 246	16.55	3TMS
L-Asparagine	HMDB0000168	Amino acids. peptides and analogues	132.0535	13	132	348	2567	116; 188; 231	17.68	3TMS
Citric acid	HMDB0000094	Tricarboxylic acids and derivatives	192.027	17	192	480	2647	147; 273; 347	20.75	4TMS
2-Thiobarbituric acid	HMDB0245321	Pyrimidines and pyrimidine derivatives	143.9993	13	144	360	2776	73; 147; 345	21.57	3TMS
Palmitic acid	HMDB0000220	Fatty acids and conjugates	256.2402	19	256	328	2841	75; 117; 313	26.25	1TMS
Inositol	HMDB0000211	Alcohols and polyols	180.0634	24	180	612	2981	147; 217; 318	26.92	6TMS
Stearic acid	HMDB0000827	Fatty acids and conjugates	284.2715	21	284	356	3092	117; 341	29.48	1TMS
D-Mannose	HMDB0000169	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	180.0633	21	180	541	3104	147; 205; 319	30.23	5TMS

D-Turanose	HMDB0011740	Fatty acyl glycosides	342.1162	33	342	846	3264	217; 361	33.35	7TMS
Sucrose	HMDB0000258	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	342.1162	36	342	918	3356	217; 271; 361	33.32	8TMS

Tabla 4.4. Metabolitos alterados en E1 determinados por GC-MS. MW: Peso molecular; TMS: Derivados de trimetilsililo; n°C: Número de carbonos. (Fuente: Elaboración propia)

Compound	Accession Numbers	Category	Exact Mass (Da)	n° C	MW (Da)	MW (Derivatized) (Da)	KRI	Target Ion (m/z)	RT (min)	XTMS
L-Alanine	HMDB0000161	Amino acids, peptides, and analogues	89.0477	12	89	305	830	116; 147	5.22	3TMS
L-Valine	HMDB0000883	Amino acids, peptides, and analogues	117.0789	11	117	261	890	100; 147	7.23	2TMS
Phosphoric acid	HMDB0001429	Non-metal phosphates	97.9769	16	98	488	913	299	8.43	4TMS
DL-Malic acid	HMDB0000156	Hydroxy acids and derivatives	134.0215	13	134	350	1020	73; 147; 233	13.52	3TMS
Aspartic acid	HMDB0000191	Amino acids, peptides and analogues	133.0375	13	133	349	1087	147; 218; 232	14.25	3TMS
L-Proline	HMDB0000162	Amino acids, peptides and analogues	115.0633	11	115	273	1094	147; 156; 258	14.35	2TMS
L-Asparagine	HMDB0000168	Amino acids, peptides and analogues	132.0535	13	132	348	1156	116; 188; 231	17.68	3TMS
Citric acid	HMDB0000094	Tricarboxylic acids and derivatives	192.027	17	192	480	1225	147; 273; 347	20.75	4TMS
D-Fructose	HMDB0000660	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	180.0634	22	180	569	1318	147; 217	21.9	5TMS
D-Turanose	HMDB0011740	Fatty acyl glycosides	342.1162	33	342	846	2020	217; 361	23.9	7TMS
Galactaric acid	HMDB0000639	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	210.0376	24	210	643	2170	147; 292; 333	25.88	6TMS
Palmitic acid	HMDB0000220	Fatty acids and conjugates	256.2402	19	256	328	2634	75; 117; 313	26.25	1TMS
Inositol	HMDB0000211	Alcohols and polyols	180.0634	24	180	612	2699	147; 217; 318	26.92	6TMS
Arachidic acid	HMDB0002212	Fatty acids and conjugates	312.3028	23	312	385	2937	117; 132; 145	31.7	1TMS

Stearic acid	HMDB0000827	Fatty acids and conjugates	284.2715	21	284	356	3166	117; 341	33.02	1TMS
1-Monopalmitin	HMDB0011564	Monoradylglycerols	330.2770	25	330	474	3198	103; 211; 371	33.33	2TMS
Sucrose	HMDB0000258	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	342.1162	36	342	918	3250	217; 271; 361	34.57	8TMS

Tabla 4.5. Metabolitos alterados en E2 determinados por GC-MS. MW: Peso molecular; TMS: Derivados de trimetilsililo; n°C: Número de carbonos. (fuente: Elaboración propia)

4.3.3. Papel clave de los metabolitos alterados tras los tratamientos en la calidad del fruto: Relevancia nutricional y funcional de los compuestos identificados.

El grupo PEF mostró una regulación positiva significativa de la N2-fructopiranosilarginina (2,63 veces) y la L-homoglutatión (2,58 veces). Ambos metabolitos, clasificados como aminoácidos y sus análogos, han sido reportados por sus propiedades antioxidantes y reguladoras, lo que podría conferir protección contra el estrés oxidativo y contribuir a una mayor vida útil y calidad poscosecha (315). Además, se observó un incremento en la concentración de terpenos y triterpenoides, como el ácido básico (*fold change* > 27), el licosido II (2,74 veces), el talinosido I (1,96 veces), el taraxacolide 1-ObD-glucopiranosido (2,23 veces) y la veranisatina C (3,30 veces). Se ha demostrado que estos compuestos desempeñan un papel en la respuesta de las plantas al estrés ambiental, incluyendo fluctuaciones de temperatura, sequía y ataques de patógenos (346). También están involucrados en la regulación de la maduración de la fruta, impactando en características como el color, la textura y el desarrollo del sabor (347).

Otro hallazgo importante en el grupo PEF fue el aumento en los niveles de wistina (7,3 veces) y quercetina (1,66 veces). Estos compuestos, pertenecientes a las subclases de isoflavonoides O-glucósidos y flavonoides dentro del grupo de polifenoles, son conocidos por sus propiedades protectoras contra la inflamación, la tumorigénesis y enfermedades cardiovasculares (348). Además, los glucósidos fenólicos, como el leonurísido A (1,415 veces), también mostraron una regulación positiva en este grupo, siendo el leonurísido A reconocido como un potente antioxidante (349).

En contraste, el grupo EAS presentó niveles significativamente más altos de prolina (3,33 veces), mientras que se observó una reducción en la concentración de varios compuestos, incluidos la alanina (0,54 veces), la serina (0,40 veces), el ácido málico (0,35 veces), el ácido aspártico (0,43 veces), la glutamina (0,46 veces), la asparagina (0,07 veces) y el ácido cítrico (0,31 veces). Se ha demostrado que tanto la prolina como la glutamina desempeñan funciones clave en la regulación de las respuestas de las plantas a señales ambientales relacionadas con el estrés abiótico y biótico (350). En particular, la prolina actúa como osmoprotector y es un componente fundamental de proteínas de la pared celular (351), mientras que la alanina está altamente correlacionada con el dulzor del fruto (347,348).

En general, la regulación negativa de los ácidos orgánicos fue significativa en todos los tratamientos, con excepción del ácido cítrico, que mostró un incremento únicamente en el grupo CAP (3,33 veces). Estos ácidos son antioxidantes eficaces debido a su capacidad para desactivar metales y ralentizar la oxidación de lípidos (352). Además, en el grupo CAP, se observó un aumento significativo del 5-megastigmeno-3,9-diol 9-[apiosil-(1-6)-glucósido] (5,39 veces), un acilglucósido graso de mono- y disacáridos implicado en la interconversión de azúcares y la síntesis de polisacáridos (353).

Por otro lado, en el grupo MAP se detectó un incremento significativo en los niveles de ácido galactárico (*fold change* > 10). Este compuesto, aunque no tiene un papel funcional directo en el metabolismo o el sabor del fruto, es considerado un producto de degradación del ácido ascórbico (vitamina C) en plantas, lo que sugiere una posible relación con el estrés oxidativo y los procesos de maduración (354).

La Figura 4.15 ilustra las vías metabólicas afectadas en los arándanos después de 21 días de almacenamiento, comparando cada grupo de tratamiento con el control.

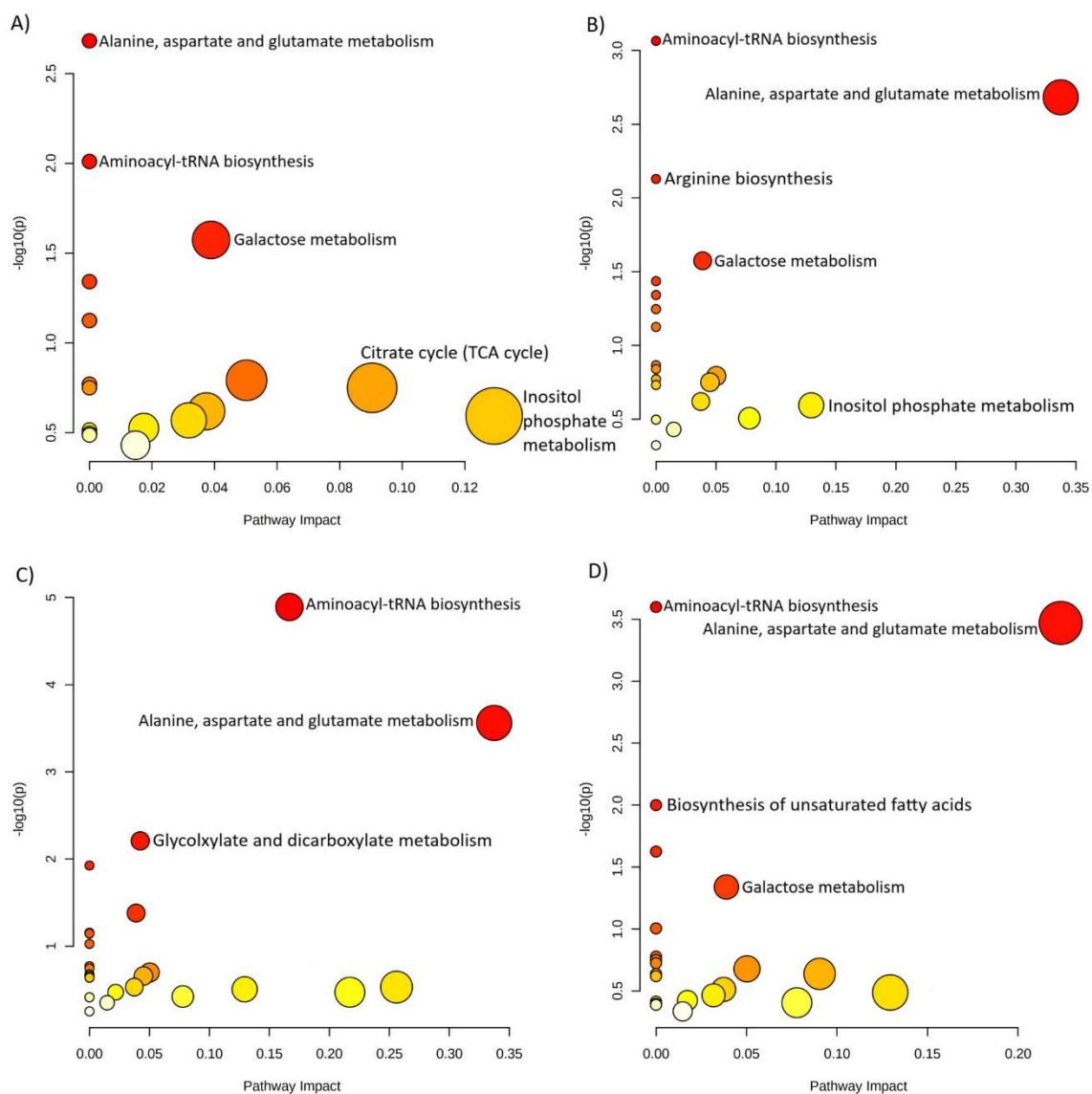


Figura 4.16. Vías metabólicas asociadas a metabolitos alterados en muestras de arándanos después de 21 días de almacenamiento, comparando cada grupo de tratamiento postcosecha con el control: (A) MAP, (B) PEF, (C) EAS y (D) CAP. (Fuente: Elaboración propia)

Se identificó que la biosíntesis de aminoacil-ARNt (relacionada con la biosíntesis de aminoácidos) y el metabolismo de alanina, aspartato y glutamato fueron las rutas metabólicas más alteradas en todos los tratamientos, excepto en el grupo MAP. En este último, el metabolismo de la alanina y la galactosa fueron las vías más impactadas (Figura 4.15A). En el grupo PEF, se observó una afectación adicional en la biosíntesis de arginina (Figura 4.15B), mientras que en el grupo EAS, la biosíntesis de aminoacil-ARNt fue la más alterada (Figura 4.15C).

La regulación de estas vías metabólicas, en particular la biosíntesis de aminoacil-ARNt y el metabolismo de alanina, aspartato y glutamato, desempeña un papel clave en la calidad postcosecha de los arándanos. Estas rutas están involucradas en la síntesis de aminoácidos que influyen en atributos como la firmeza del fruto y el contenido de azúcar, impactando en su desarrollo y calidad durante el almacenamiento (355).

ARTÍCULO 3

Untargeted Metabolomic Profiling of Blueberries: Impact of Postharvest Treatments on Metabolite Changes

M.C. Villegas-Álvarez^{a,b}, A. Arias-Borrego^c, M. Torres-Vilchez^{b,d}, R.M. García-Rodríguez^b, T. García Barrera^{a*}

^aResearch Center on Natural Resources, Health and The Environment (RENSMA), Department of Chemistry "Prof. J.C. Vilchez Martín", Faculty of Experimental Sciences, University of Huelva, Fuerzas Armadas Ave., 21120 Huelva, Spain. ^bADESVA-Agroindustry Technological Center. Bus. Park La Gravera, Dehesa del Piorno Ave., 1. 21440 Lepe, Huelva, Spain. ^cDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Seville, Profesor García González Ave., 41012 Seville, Spain. ^dExperimental Center of Tecnova Foundation, 21610 Huelva, Spain.

Corresponding Authors

* Prof. Tamara García Barrera

Research Center on Natural Resources, Health and The Environment (RENSMA), Department of Chemistry "Prof. J.C. Vilchez Martín", Faculty of Experimental Sciences, University of Huelva, Fuerzas Armadas Ave., 21120 Huelva, Spain.

tamara@dqcm.uhu.es. ORCID: 0000-0002-8859-9550. Tel. +34 959219962

* Dr. Ana Arias Borrego

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Seville, Profesor García González Ave., 41012 Seville, Spain.

aarias1@us.es ORCID: 0000-0002-0054-5639.

Tel. +34 954556442

161 +34 954556442

aarias1@us.es ORCID: 0000-0002-0054-5639

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Seville, Profesor García

* Dr. Ana Arias Borrego

tamara@dqcm.uhu.es

ORCID: 0000-0002-8859-9550. Tel. +34 959219962

Research Center on Natural Resources, Health and The Environment (RENSMA), Department of Chemistry "Prof. J.C. Vilchez Martín", Faculty of Experimental Sciences, University of Huelva, Fuerzas Armadas Ave., 21120 Huelva, Spain.

Microchemical Journal

Untargeted Metabolomic Profiling of Blueberries: Impact of Postharvest Treatments on Metabolite Changes --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	MICROC-D-25-01193
Article Type:	Research Paper
Section/Category:	Omics
Keywords:	Postharvest treatments; blueberry; untargeted metabolomics; metabolite biomarkers
Corresponding Author:	TAMARA GARCIA-BARRERA University of Huelva HUELVA, SPAIN
First Author:	Maria Carmen Villegas-Álvarez
Order of Authors:	Maria Carmen Villegas-Álvarez Ana Arias-Borrego Magdalena Torres Vilchez Rosa María García-Rodríguez Tamara García-Barrera
Abstract:	<p>A metabolomic platform combining GC-MS and UHPLC-QTOF was employed to investigate the impact of four postharvest treatments on the metabolic profile of blueberries. A total of 116 metabolites were annotated, primarily associated with aminoacyl-tRNA biosynthesis, particularly in the ethylene absorption sheet (EAS), as well as alanine, aspartate, and glutamate metabolism across all treatments. Notably, modified atmosphere packaging (MAP) primarily influenced galactose metabolism, whereas pulsed electric field (PEF) significantly enhanced the accumulation of bioactive compounds, including terpene glycosides, isoflavonoids, and phenols, compared to the other treatments. Metabolomic profiling revealed distinct effects of postharvest treatments on bioactive compounds with antioxidant activity, as well as their influence on fruit metabolism, flavor, and the timing and process of maturation. This study provides valuable insights into metabolite alterations induced by postharvest treatments, contributing to a better understanding of their impact on fruit quality and potential health benefits. The findings support the development of optimized preservation strategies to enhance blueberry shelf life and commercial value.</p>

4.3. CAPÍTULO 3.

Debido a restricciones relativas a derechos de autor, el capítulo 3, que contiene un artículo en proceso de publicación, ha sido retirado de la tesis.

Villegas Álvarez, M.C., Arias Borrego, A., Torres Vílchez, M., García Rodríguez, M., García Barrera, T. "Untargeted metabolomic profiling of blueberries impact of postharvest treatments on metabolite changes". Microchemical Journal. Manuscript draft.

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS



5. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.

5.1. Conclusiones.

5.1.1. Capítulo 1: Avances en la determinación de PCBs en leche materna mediante HF-LPME optimizada.

En este trabajo se ha optimizado con precisión un método HF-LPME simple, eficiente y selectivo para el análisis de PCBs en leche materna humana, que implica un bajo consumo de disolventes orgánicos, altos factores de preconcentración de los analitos y un coste relativamente bajo.

Esta es la primera vez que se aplica HF-LPME a muestras de leche materna para la extracción de PCBs, que son contaminantes ambientales con importantes efectos nocivos para la salud humana.

Se aplicó un diseño multivariado compuesto central de segundo orden rotatable para determinar las variables operacionales que permiten obtener áreas de pico máximas de siete PCBs en leche materna humana.

El método propuesto permite obtener límites de detección en el rango de 7–14 ngL⁻¹ con recuperaciones medias del 85% para los analitos objetivo y factores de enriquecimiento muy satisfactorios en comparación con métodos analíticos anteriores para el análisis de PCBs en leche materna.

El método propuesto puede ser fácilmente automatizable, convertido en una técnica analítica verde y transferible a aplicaciones de rutina debido a su bajo coste, sensibilidad, simplicidad, robustez y selectividad. Además, la técnica desarrollada tiene como ventaja la eliminación del efecto matriz, lo cual es importante en el análisis de muestras biológicas que suelen ser complejas causando interferencias en el análisis.

5.1.2. Capítulo 2: Contribuciones de HF-LPME trifásica en el análisis metabolómico de la leche materna.

El método optimizado para la metabolómica no dirigida de leche materna basado en la microextracción en fase líquida con fibra hueca asistida por ultrasonidos en configuración trifásica acoplada a GC-MS, ofrece una mayor cobertura de metabolitos en comparación con la extracción líquido-líquido. Esto se debe probablemente a que la nueva técnica reduce el ruido de fondo y mejora la relación señal-ruido en los cromatogramas y espectros de masas, minimizando la supresión de señal habitual en métodos convencionales.

La validación analítica del método, realizada mediante estándares comerciales y metabolómica dirigida, demostró límites de detección más bajos, mayores factores de enriquecimiento y cambios de concentración más marcados en comparación con LLE. Además, la estrategia optimizada permite un mayor rendimiento en el procesamiento de muestras gracias

a tiempos de extracción más cortos con la ayuda de ultrasonidos y a la eliminación del paso de precipitación de proteínas por centrifugación, necesario en LLE.

Por ello, la técnica HF se presenta como una alternativa prometedora para la metabolómica no dirigida, ya que combina un procedimiento no selectivo con altos factores de enriquecimiento, ideales tanto para el análisis exploratorio como para la detección de una amplia gama de metabolitos. Los resultados obtenidos destacan el potencial de HF en el estudio metabolómico de HM y sugieren su aplicación en otras matrices biológicas, especialmente en biofluidos complejos donde el volumen de muestra y el rendimiento de extracción son factores críticos.

Las investigaciones futuras se orientarán hacia el análisis del extracto obtenido mediante LC-MS, dado que esta técnica es compatible con la polaridad y el volumen del extracto generado con UA-HF-LPME en configuración trifásica.

5.1.3. Capítulo 3: Influencia de los tratamientos postcosecha en la estabilidad y biodisponibilidad de metabolitos en arándanos.

Los resultados obtenidos mediante la integración de las plataformas analíticas GC-MS y UHPLC-QTOF-MS confirmaron la eficacia de esta estrategia para identificar modificaciones metabólicas en arándanos sometidos a distintos tratamientos postcosecha. Se observó que los cuatro tratamientos evaluados (PEF, EAS, CAP y MAP) generaron alteraciones en un porcentaje similar de metabolitos, comprendido entre el 20 % y el 30 % del total de 116 compuestos analizados, lo que indica que no existen diferencias significativas en la cantidad de metabolitos afectados entre los tratamientos. No obstante, el análisis metabolómico permitió identificar diferencias específicas en las rutas metabólicas impactadas. En particular, los tratamientos PEF, CAP y EAS afectaron principalmente el metabolismo de la alanina, el aspartato y el glutamato, mientras que el tratamiento MAP tuvo una influencia destacada sobre el metabolismo de la galactosa.

Entre los tratamientos evaluados, PEF se asoció con un incremento en los niveles de glicósidos terpénicos, isoflavonoides, polifenoles, glicósidos de acilo graso, aminoácidos, péptidos y compuestos análogos en comparación con el resto. Estos cambios metabólicos podrían estar relacionados con una mayor firmeza del fruto y una menor tasa de deshidratación, lo que en conjunto contribuiría a mejorar la calidad postcosecha de los arándanos. Estos hallazgos aportan información clave sobre los mecanismos metabólicos que intervienen en la respuesta de los arándanos a los tratamientos postcosecha y proporcionan una base para el desarrollo de estrategias destinadas a prolongar su vida útil y optimizar su calidad mediante la regulación de metabolitos bioactivos.

5.2. Conclusions.

5.1.1. Chapter 1: Advances in the Determination of PCBs in Breast Milk Using Optimized HF-LPME

In this study, a simple, effective, and selective HF-LPME method was precisely optimized for the analysis of PCBs in human breast milk, involving low consumption of organic solvents, high analyte preconcentration factors, and relatively low cost.

This is the first time that HF-LPME has been applied to breast milk samples for the extraction of PCBs, which are environmental contaminants with significant adverse effects on human health.

A second-order central composite design was applied to determine the operational variables that allow obtaining maximum peak areas for seven PCBs in human breast milk.

The proposed method achieves detection limits in the range of 7–14 ng L⁻¹, with average recoveries of 85% for the target analytes and highly satisfactory enrichment factors compared to previous analytical methods for PCB analysis in breast milk.

The proposed method can be easily automated, converted into a green analytical technique, and transferred to routine applications due to its low cost, sensitivity, simplicity and robustness. Moreover, the developed technique offers the advantage of eliminating the matrix effect, which is crucial in the analysis of biological samples that are often complex and prone to interference during analysis.

5.1.2. Chapter 2: Contributions of Three-Phase HF-LPME in the Metabolomic Analysis of Breast Milk.

The optimized method for untargeted metabolomics of human breast milk (HM), based on ultrasound-assisted hollow fiber liquid-phase microextraction (UA-HF-LPME) in a three-phase configuration coupled with GC-MS, provides broader metabolite coverage compared to liquid-liquid extraction (LLE). This is likely due to the new technique's ability to reduce background noise and improve the signal-to-noise ratio in chromatograms and mass spectra, minimizing signal suppression typically observed in conventional methods.

The analytical validation of the method, performed using commercial standards and targeted metabolomics, demonstrated lower detection limits, higher enrichment factors, and more pronounced concentration changes compared to LLE. Additionally, the optimized strategy enables higher sample processing efficiency due to shorter extraction times facilitated by ultrasound and the elimination of the protein precipitation step by centrifugation, which is required in LLE.

Thus, the HF technique emerges as a promising alternative for untargeted metabolomics, as it combines a non-selective procedure with high enrichment factors, making it ideal for both exploratory analysis and the detection of a wide range of metabolites. The results obtained highlight the potential of HF in metabolomic studies of HM and suggest its application to other

biological matrices, particularly in complex biofluids where sample volume and extraction efficiency are critical factors.

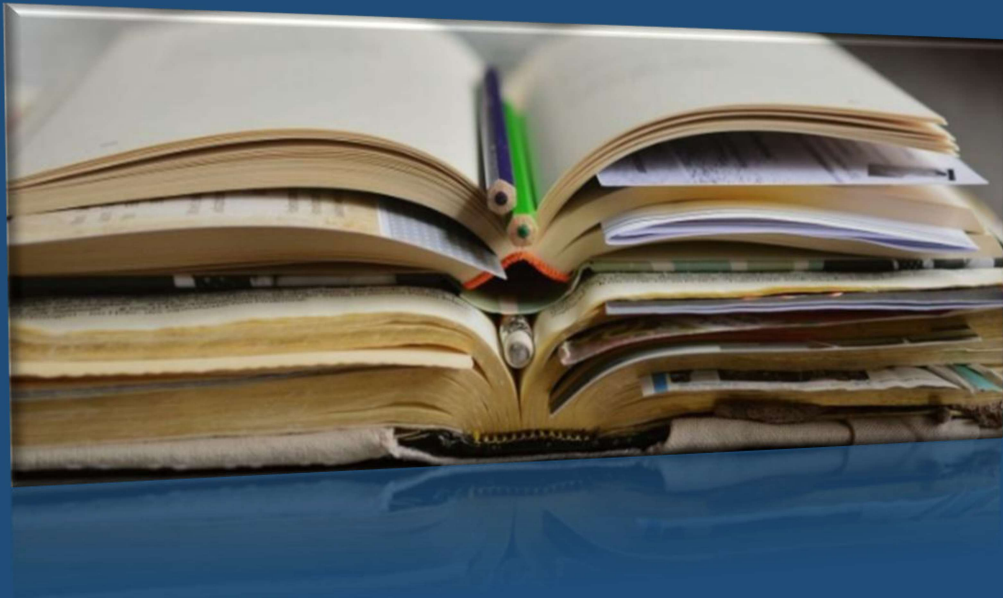
Future research will focus on analyzing the extract obtained using LC-MS, as this technique is compatible with the polarity and volume of the extract generated with UA-HF-LPME in a three-phase configuration.

5.1.3. Chapter 3: Influence of Postharvest Treatments on the Stability and Bioavailability of Metabolites in Blueberries.

The results obtained through the integration of GC-MS and UHPLC-QTOF-MS analytical platforms confirmed the effectiveness of this strategy in identifying metabolic modifications in blueberries subjected to different postharvest treatments. It was observed that the four evaluated treatments (PEF, EAS, CAP, and MAP) induced alterations in a similar percentage of metabolites, ranging between 20% and 30% of the total 116 analyzed compounds, indicating no significant differences in the number of affected metabolites among treatments. However, metabolomic analysis allowed the identification of specific differences in the impacted metabolic pathways. In particular, PEF, CAP, and EAS treatments mainly affected alanine, aspartate, and glutamate metabolism, whereas the MAP treatment had a notable influence on galactose metabolism.

Among the evaluated treatments, PEF was associated with an increase in the levels of terpenoid glycosides, isoflavonoids, polyphenols, fatty acyl glycosides, amino acids, peptides, and analogous compounds compared to the others. These metabolic changes could be related to greater fruit firmness and a lower dehydration rate, which together would contribute to improved postharvest quality of blueberries. These findings provide key insights into the metabolic mechanisms involved in the response of blueberries to postharvest treatments and lay the foundation for developing strategies aimed at extending their shelf life and optimizing their quality through the regulation of bioactive metabolites.

REFERENCIAS



REFERENCIAS

1. Sarafraz-Yazdi A, Amiri A. Liquid-phase microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1 de enero de 2010;29(1):1-14.
2. Arthur CL, Pawliszyn J. ACS Publications. American Chemical Society; 2002 [citado 2 de marzo de 2025]. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac00218a019>
3. Kumar A, Gaurav, Malik AK, Tewary DK, Singh B. A review on development of solid phase microextraction fibers by sol-gel methods and their applications. *Analytica Chimica Acta*. 3 de marzo de 2008;610(1):1-14.
4. Liu S, Dasgupta PK. ACS Publications. American Chemical Society; 2002 [citado 2 de marzo de 2025]. Liquid Droplet. A Renewable Gas Sampling Interface. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac00109a023>
5. Liu H, Dasgupta PK. Analytical Chemistry in a Drop. Solvent Extraction in a Microdrop. *Anal Chem*. 1 de junio de 1996;68(11):1817-21.
6. Jeannot MA, Cantwell FF. Solvent Microextraction into a Single Drop. *Anal Chem*. 1 de julio de 1996;68(13):2236-40.
7. Jeannot MA, Cantwell FF. Mass Transfer Characteristics of Solvent Extraction into a Single Drop at the Tip of a Syringe Needle. *Anal Chem*. 1 de enero de 1997;69(2):235-9.
8. He Y, Lee HK. Liquid-Phase Microextraction in a Single Drop of Organic Solvent by Using a Conventional Microsyringe. *Anal Chem*. 1 de noviembre de 1997;69(22):4634-40.
9. Ma M, Cantwell FF. Solvent Microextraction with Simultaneous Back-Extraction for Sample Cleanup and Preconcentration: Quantitative Extraction. *Anal Chem*. 1 de septiembre de 1998;70(18):3912-9.
10. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. Liquid-Liquid-Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis. *Anal Chem*. 1 de julio de 1999;71(14):2650-6.
11. Liu W, Lee HK. Continuous-Flow Microextraction Exceeding 1000-Fold Concentration of Dilute Analytes. *Anal Chem*. 1 de septiembre de 2000;72(18):4462-7.
12. Theis AL, Waldack AJ, Hansen SM, Jeannot MA. Headspace Solvent Microextraction. *Anal Chem*. 1 de diciembre de 2001;73(23):5651-4.
13. Tankeviciute A, Kazlauskas R, Vickackaite V. Headspace extraction of alcohols into a single drop. *Analyst*. 9 de octubre de 2001;126(10):1674-7.
14. Przyjazny A, Kokosa JM. Analytical characteristics of the determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in water by headspace solvent microextraction. *Journal of Chromatography A*. 22 de noviembre de 2002;977(2):143-53.
15. Hauser B, Popp P, Kleine-Benne E. Membrane-assisted solvent extraction of triazines and other semi-volatile contaminants directly coupled to large-volume injection-gas chromatography-mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*. 19 de julio de 2002;963(1):27-36.

16. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: New concept for rapid sample preparation of biological fluids. *Journal of Chromatography A*. 24 de marzo de 2006;1109(2):183-90.
17. Rezaee M, Assadi Y, Milani Hosseini MR, Aghaee E, Ahmadi F, Berijani S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*. 26 de mayo de 2006;1116(1):1-9.
18. Cortada Cortés C. Nuevas metodologías y aplicaciones de las técnicas de microextracción líquido-líquido para la determinación de contaminantes orgánicos [Internet] [<http://purl.org/dc/dcmitype/Text>]. Universitat d'Alacant / Universidad de Alicante; 2012 [citado 2 de marzo de 2025]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=110713>
19. Rutkowska M, Płotka-Wasyłka J, Sajid M, Andruch V. Liquid–phase microextraction: A review of reviews. *Microchemical Journal*. 1 de septiembre de 2019;149:103989.
20. Câmara JS, Perestrelo R, Berenguer CV, Andrade CFP, Gomes TM, Olayanju B, et al. Green Extraction Techniques as Advanced Sample Preparation Approaches in Biological, Food, and Environmental Matrices: A Review. *Molecules*. enero de 2022;27(9):2953.
21. Bayatloo MR, Tabani H, Nojavan S, Alexovič M, Ozkan SA. Liquid-Phase Microextraction Approaches for Preconcentration and Analysis of Chiral Compounds: A Review on Current Advances. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 17 de noviembre de 2023;53(8):1623-37.
22. Azevedo Lemos V, Bastos Santos L, Santos Assis R. Deep eutectic solvent in ultrasound-assisted liquid-phase microextraction for determination of vanadium in food and environmental waters. *Microchemical Journal*. 1 de septiembre de 2022;180:107543.
23. Chen PH, Chen PS, Huang SD, Chen PH, Chen PS, Huang SD. Determination of Pesticides in Water and Vegetable Matter by Manual Shaking-Enhanced, Ultrasound-Assisted Emulsification Microextraction Combined with Gas Chromatography-Mass Spectrometry. En: *Herbicides - Advances in Research* [Internet]. IntechOpen; 2013 [citado 23 de febrero de 2025]. Disponible en: <https://www.intechopen.com/chapters/42927>
24. Hansen F, Øiestad EL, Pedersen-Bjergaard S. Bioanalysis of pharmaceuticals using liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 10 de septiembre de 2020;189:113446.
25. Herrera-Herrera AV, Asensio-Ramos M, Hernández-Borges J, Rodríguez-Delgado MÁ. Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1 de julio de 2010;29(7):728-51.
26. Myers, Raymond H., Douglas C. Montgomery, and Christine M. Anderson-Cook. *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*. John Wiley & Sons, 2016.
27. Vera Candiotti L, De Zan MM, Cámara MS, Goicoechea HC. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta*. 15 de junio de 2014;124:123-38.

28. Carabajal M, Teglia CM, Cerutti S, Culzoni MJ, Goicoechea HC. Applications of liquid-phase microextraction procedures to complex samples assisted by response surface methodology for optimization. *Microchemical Journal*. 1 de enero de 2020;152:104436.
29. Dolatto RG, Messerschmidt I, Fraga Pereira B, Martinazzo R, Abate G. Preconcentration of polar phenolic compounds from water samples and soil extract by liquid-phase microextraction and determination via liquid chromatography with ultraviolet detection. *Talanta*. 1 de febrero de 2016;148:292-300.
30. Li X, Xue A, Chen H, Li S. Low-density solvent-based dispersive liquid-liquid microextraction combined with single-drop microextraction for the fast determination of chlorophenols in environmental water samples by high performance liquid chromatography-ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*. 8 de marzo de 2013;1280:9-15.
31. Salgueiro-González N, Concha-Graña E, Turnes-Carou I, Muniategui-Lorenzo S, López-Mahía P, Prada-Rodríguez D. Determination of alkylphenols and bisphenol A in seawater samples by dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry for compliance with environmental quality standards (Directive 2008/105/EC). *Journal of Chromatography A*. 3 de febrero de 2012;1223:1-8.
32. González-Curbelo MÁ, Hernández-Borges J, Borges-Miquel TM, Rodríguez-Delgado MÁ. Determination of organophosphorus pesticides and metabolites in cereal-based baby foods and wheat flour by means of ultrasound-assisted extraction and hollow-fiber liquid-phase microextraction prior to gas chromatography with nitrogen phosphorus detection. *Journal of Chromatography A*. 25 de octubre de 2013;1313:166-74.
33. Lemos VA, Vieira US. Single-drop microextraction for the determination of manganese in seafood and water samples. *Microchim Acta*. 1 de abril de 2013;180(5):501-7.
34. Shamsipur M, Zohrabi P, Hashemi M. Application of a supramolecular solvent as the carrier for ferrofluid based liquid-phase microextraction for spectrofluorimetric determination of levofloxacin in biological samples. *Anal Methods*. 5 de noviembre de 2015;7(22):9609-14.
35. Rezaei F, Yamini Y, Moradi M, Daraei B. Supramolecular solvent-based hollow fiber liquid phase microextraction of benzodiazepines. *Analytica Chimica Acta*. 4 de diciembre de 2013;804:135-42.
36. Carasek E, Merib J, Mafra G, Spudeit D. A recent overview of the application of liquid-phase microextraction to the determination of organic micro-pollutants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1 de noviembre de 2018;108:203-9.
37. Lorenzo M, Campo J, Picó Y. Analytical challenges to determine emerging persistent organic pollutants in aquatic ecosystems. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1 de junio de 2018;103:137-55.
38. Richardson SD, Kimura SY. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal Chem*. 7 de enero de 2020;92(1):473-505.
39. Rykowska I, Ziemblińska J, Nowak I. Modern approaches in dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) based on ionic liquids: A review. *Journal of Molecular Liquids*. 1 de junio de 2018;259:319-39.

40. Clark KD, Nacham O, Purslow JA, Pierson SA, Anderson JL. Magnetic ionic liquids in analytical chemistry: A review. *Analytica Chimica Acta*. 31 de agosto de 2016;934:9-21.
41. Ho TD, Zhang C, Hantao LW, Anderson JL. Ionic Liquids in Analytical Chemistry: Fundamentals, Advances, and Perspectives. *Anal Chem*. 7 de enero de 2014;86(1):262-85.
42. Nawata J, Dawidziuk B, Dziedzic D, Gordon D, Popiel S. Applications of ionic liquids in analytical chemistry with a particular emphasis on their use in solid-phase microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1 de agosto de 2018;105:18-36.
43. Trujillo-Rodríguez MJ, Rocío-Bautista P, Pino V, Afonso AM. Ionic liquids in dispersive liquid-liquid microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1 de noviembre de 2013;51:87-106.
44. Zhang C, Cagliero C, Pierson SA, Anderson JL. Rapid and sensitive analysis of polychlorinated biphenyls and acrylamide in food samples using ionic liquid-based *in situ* dispersive liquid-liquid microextraction coupled to headspace gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 20 de enero de 2017;1481:1-11.
45. Padilla-Alonso DJ, Garza-Tapia M, Chávez-Montes A, González-Horta A, Waksman de Torres NH, Castro-Ríos R. New temperature-assisted ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water samples. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 7 de febrero de 2017;40(3):147-55.
46. Yu H, Merib J, Anderson JL. Faster dispersive liquid-liquid microextraction methods using magnetic ionic liquids as solvents. *Journal of Chromatography A*. 9 de septiembre de 2016;1463:11-9.
47. Chatzimitakos T, Binellas C, Maidatsi K, Stalikas C. Magnetic ionic liquid in stirring-assisted drop-breakup microextraction: Proof-of-concept extraction of phenolic endocrine disruptors and acidic pharmaceuticals. *Analytica Chimica Acta*. 3 de marzo de 2016;910:53-9.
48. An J, Rahn KL, Anderson JL. Headspace single drop microextraction versus dispersive liquid-liquid microextraction using magnetic ionic liquid extraction solvents. *Talanta*. 15 de mayo de 2017;167:268-78.
49. Wang J, Shi Y, Cai Y. A highly selective dispersive liquid-liquid microextraction approach based on the unique fluorophilic affinity for the extraction and detection of per- and polyfluoroalkyl substances coupled with high performance liquid chromatography tandem-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 6 de abril de 2018;1544:1-7.
50. Wu Q, Zhou X, Li Y, Zang X, Wang C, Wang Z. Application of dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography to the determination of carbamate pesticides in water samples. *Anal Bioanal Chem*. 1 de marzo de 2009;393(6):1755-61.
51. Melwanki MB, Fuh MR. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with semi-automated *in-syringe* back extraction as a new approach for the sample preparation of ionizable organic compounds prior to liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 11 de julio de 2008;1198-1199:1-6.

52. Li Y, Wei G, Hu J, Liu X, Zhao X, Wang X. Dispersive liquid–liquid microextraction followed by reversed phase-high performance liquid chromatography for the determination of polybrominated diphenyl ethers at trace levels in landfill leachate and environmental water samples. *Analytica Chimica Acta*. 12 de mayo de 2008;615(1):96-103.
53. Liang P, Xu J, Li Q. Application of dispersive liquid–liquid microextraction and high-performance liquid chromatography for the determination of three phthalate esters in water samples. *Analytica Chimica Acta*. 18 de febrero de 2008;609(1):53-8.
54. Liu Y, Zhao E, Zhu W, Gao H, Zhou Z. Determination of four heterocyclic insecticides by ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction in water samples. *Journal of Chromatography A*. 6 de febrero de 2009;1216(6):885-91.
55. Yan H, Liu B, Du J, Yang G, Row KH. Ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of six pyrethroids in river water. *Journal of Chromatography A*. 6 de agosto de 2010;1217(32):5152-7.
56. Zhao RS, Wang SS, Cheng CG, Zhang LL, Wang X. Rapid Enrichment and Sensitive Determination of Tetrabromobisphenol A in Environmental Water Samples with Ionic Liquid Dispersive Liquid-Phase Microextraction Prior to HPLC–ESI–MS–MS. *Chromatographia*. 1 de abril de 2011;73(7):793-7.
57. Gao Y, Zhou Q, Xie G, Yao Z. Temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction combined with HPLC with ultraviolet detector for the determination of fungicides. *Journal of Separation Science*. 2012;35(24):3569-74.
58. Zhang Z, Zhou K, Bu Y qin, Shan Z jun, Liu J fu, Wu X yang, et al. Determination of malachite green and crystal violet in environmental water using temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography. *Anal Methods*. 2 de febrero de 2012;4(2):429-33.
59. Zhou Q, Wang G, Xie G. Dispersive liquid-phase microextraction in combination with HPLC for the enrichment and rapid determination of benzoylurea pesticides in environmental water samples. *Journal of Separation Science*. 2013;36(14):2323-9.
60. Ma S, Ye X, Huang P, Zhao L, Liang N. Simultaneous determination of nitroimidazoles and amphenicol antibiotics in water samples using ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction coupled with ultra-high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Anal Methods*. 24 de noviembre de 2016;8(46):8219-26.
61. Viñas P, Campillo N, Pastor-Belda M, Oller A, Hernández-Córdoba M. Determination of phthalate esters in cleaning and personal care products by dispersive liquid–liquid microextraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 9 de enero de 2015;1376:18-25.
62. Panagiotou AN, Sakkas VA, Albanis TA. Application of chemometric assisted dispersive liquid–liquid microextraction to the determination of personal care products in natural waters. *Analytica Chimica Acta*. 7 de septiembre de 2009;649(2):135-40.
63. Hashemi M, Jahanshahi N, Habibi A. Application of ultrasound-assisted emulsification microextraction for determination of benzene, toluene, ethylbenzene and o-xylene in water samples by gas chromatography. *Desalination*. 1 de marzo de 2012;288:93-7.

64. Benedé JL, Chisvert A, Salvador A, Sánchez-Quiles D, Tovar-Sánchez A. Determination of UV filters in both soluble and particulate fractions of seawaters by dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 17 de febrero de 2014;812:50-8.
65. Farajzadeh MA, Afshar Mogaddam MR, Rezaee Aghdam S, Nouri N, Bamorrowat M. Application of elevated temperature-dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organophosphorus pesticides residues in aqueous samples followed by gas chromatography-flame ionization detection. *Food Chemistry*. 1 de diciembre de 2016;212:198-204.
66. Alipanahpour Dil E, Ghaedi M, Asfaram A. Optimization and modeling of preconcentration and determination of dyes based on ultrasound assisted-dispersive liquid–liquid microextraction coupled with derivative spectrophotometry. *Ultrasonics Sonochemistry*. 1 de enero de 2017;34:27-36.
67. Hashemi B, Zohrabi P, Kim KH, Shamsipur M, Deep A, Hong J. Recent advances in liquid-phase microextraction techniques for the analysis of environmental pollutants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1 de diciembre de 2017;97:83-95.
68. Fernández E, Vidal L, Canals A. Hydrophilic magnetic ionic liquid for magnetic headspace single-drop microextraction of chlorobenzenes prior to thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 1 de julio de 2018;410(19):4679-87.
69. Ji B, Xia B, Fu X, Lei S, Ye Y, Zhou Y. Low-cost and convenient ballpoint tip-protected liquid-phase microextraction for sensitive analysis of organic molecules in water samples. *Analytica Chimica Acta*. 2 de mayo de 2018;1006:42-8.
70. Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S. Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1 de enero de 2004;23(1):1-10.
71. Chimuka L, Cukrowska E, Michel M, Buszewski B. Advances in sample preparation using membrane-based liquid-phase microextraction techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1 de diciembre de 2011;30(11):1781-92.
72. Huang C, Chen Z, Gjelstad A, Pedersen-Bjergaard S, Shen X. Electromembrane extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1 de octubre de 2017;95:47-56.
73. Tabani H, Asadi S, Nojavan S, Parsa M. Introduction of agarose gel as a green membrane in electromembrane extraction: An efficient procedure for the extraction of basic drugs with a wide range of polarities. *Journal of Chromatography A*. 12 de mayo de 2017;1497:47-55.
74. Chong YT, Mohd Ariffin M, Mohd Tahir N, Loh SH. A green solvent holder in electro-mediated microextraction for the extraction of phenols in water. *Talanta*. 1 de enero de 2018;176:558-64.
75. Asadi S, Tabani H, Nojavan S. Application of polyacrylamide gel as a new membrane in electromembrane extraction for the quantification of basic drugs in breast milk and wastewater samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 20 de marzo de 2018;151:178-85.

76. Mohamad Hanapi NS, Sanagi MM, Ismail AK, Wan Ibrahim WA, Saim N, Wan Ibrahim WN. Ionic liquid-impregnated agarose film two-phase micro-electrodriven membrane extraction (IL-AF- μ -EME) for the analysis of antidepressants in water samples. *Journal of Chromatography B*. 1 de marzo de 2017;1046:73-80.
77. Mamat NA, See HH. Simultaneous electromembrane extraction of cationic and anionic herbicides across hollow polymer inclusion membranes with a bubbleless electrode. *Journal of Chromatography A*. 30 de junio de 2017;1504:9-16.
78. Bagheri H, Fakhari AR, Sahragard A. A novel strategy based on surfactant assisted electromembrane extraction for the determination of dicamba and 2,4-DB as model herbicides in real water samples. *RSC Adv*. 7 de enero de 2016;6(6):4843-9.
79. Ask KS, Øiestad EL, Pedersen-Bjergaard S, Gjelstad A. Dried blood spots and parallel artificial liquid membrane extraction—A simple combination of microsampling and microextraction. *Analytica Chimica Acta*. 7 de junio de 2018;1009:56-64.
80. Fuchs D, Pedersen-Bjergaard S, Jensen H, Rand KD, Honoré Hansen S, Petersen NJ. Fully Automated Electro Membrane Extraction Autosampler for LC-MS Systems Allowing Soft Extractions for High-Throughput Applications. *Anal Chem*. 5 de julio de 2016;88(13):6797-804.
81. Ballesteros-Gómez A, Sicilia MD, Rubio S. Supramolecular solvents in the extraction of organic compounds. A review. *Analytica Chimica Acta*. 16 de septiembre de 2010;677(2):108-30.
82. Płotka-Wasyłka J, Rutkowska M, Owczarek K, Tobiszewski M, Namieśnik J. Extraction with environmentally friendly solvents. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1 de junio de 2017;91:12-25.
83. Dimpe KM, Nomngongo PN. Current sample preparation methodologies for analysis of emerging pollutants in different environmental matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1 de septiembre de 2016;82:199-207.
84. Beiraghi A, Pourghazi K, Amoli-Diva M. Mixed supramolecular hemimicelles aggregates and magnetic carrier technology for solid phase extraction of ibuprofen in environmental samples prior to its HPLC-UV determination. *Chemical Engineering Science*. 28 de abril de 2014;108:103-10.
85. Feizi N, Yamini Y, Moradi M, Karimi M, Salamat Q, Amanzadeh H. A new generation of nano-structured supramolecular solvents based on propanol/gemini surfactant for liquid phase microextraction. *Analytica Chimica Acta*. 8 de febrero de 2017;953:1-9.
86. Scheel GL, Tarley CRT. Feasibility of supramolecular solvent-based microextraction for simultaneous preconcentration of herbicides from natural waters with posterior determination by HPLC-DAD. *Microchemical Journal*. 1 de julio de 2017;133:650-7.
87. Zohrabi P, Shamsipur M, Hashemi M, Hashemi B. Liquid-phase microextraction of organophosphorus pesticides using supramolecular solvent as a carrier for ferrofluid. *Talanta*. 1 de noviembre de 2016;160:340-6.

88. Ruiz FJ, Rubio S, Pérez-Bendito D. Tetrabutylammonium-Induced Coacervation in Vesicular Solutions of Alkyl Carboxylic Acids for the Extraction of Organic Compounds. *Anal Chem.* 1 de octubre de 2006;78(20):7229-39.
89. Ballesteros-Gómez A, Ruiz FJ, Rubio S, Pérez-Bendito D. Determination of bisphenols A and F and their diglycidyl ethers in wastewater and river water by coacervative extraction and liquid chromatography–fluorimetry. *Analytica Chimica Acta.* 5 de noviembre de 2007;603(1):51-9.
90. Ballesteros-Gómez A, Rubio S, Pérez-Bendito D. Determination of priority carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater and surface water by coacervative extraction and liquid chromatography–fluorimetry. *Journal of Chromatography A.* 5 de septiembre de 2008;1203(2):168-76.
91. Moral A, Sicilia MD, Rubio S. Supramolecular solvent-based extraction of benzimidazolic fungicides from natural waters prior to their liquid chromatographic/fluorimetric determination. *Journal of Chromatography A.* 1 de mayo de 2009;1216(18):3740-5.
92. López-Jiménez FJ, Ballesteros-Gómez A, Rubio S. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH4) in food by vesicular supramolecular solvent-based microextraction and LC–fluorescence detection. *Food Chemistry.* 15 de enero de 2014;143:341-7.
93. López-Jiménez FJ, Rubio S, Pérez-Bendito D. Single-drop coacervative microextraction of organic compounds prior to liquid chromatography: Theoretical and practical considerations. *Journal of Chromatography A.* 27 de junio de 2008;1195(1):25-33.
94. Moradi M, Yamini Y. Application of vesicular coacervate phase for microextraction based on solidification of floating drop. *Journal of Chromatography A.* 16 de marzo de 2012;1229:30-7.
95. Safari M, Yamini Y, Tahmasebi E, Ebrahimpour B. Magnetic nanoparticle assisted supramolecular solvent extraction of triazine herbicides prior to their determination by HPLC with UV detection. *Microchim Acta.* 1 de enero de 2016;183(1):203-10.
96. Qin H, Qiu X, Zhao J, Liu M, Yang Y. Supramolecular solvent-based vortex-mixed microextraction: Determination of glucocorticoids in water samples. *Journal of Chromatography A.* 11 de octubre de 2013;1311:11-20.
97. Jafarvand S, Shemirani F. Supramolecular-based dispersive liquid–liquid microextraction: A novel sample preparation technique utilizes coacervates and reverse micelles. *Journal of Separation Science.* 2011;34(4):455-61.
98. Khandelwal S, Tailor YK, Kumar M. Deep eutectic solvents (DESs) as eco-friendly and sustainable solvent/catalyst systems in organic transformations. *Journal of Molecular Liquids.* 1 de marzo de 2016;215:345-86.
99. Farajzadeh MA, Sattari Dabbagh M, Yadeghari A. Deep eutectic solvent based gas-assisted dispersive liquid-phase microextraction combined with gas chromatography and flame ionization detection for the determination of some pesticide residues in fruit and vegetable samples. *Journal of Separation Science.* 2017;40(10):2253-60.

100. Ge D, Zhang Y, Dai Y, Yang S. Air-assisted dispersive liquid–liquid microextraction based on a new hydrophobic deep eutectic solvent for the preconcentration of benzophenone-type UV filters from aqueous samples. *Journal of Separation Science*. 2018;41(7):1635-43.
101. Pirsahab M, Fattahi N. Development of a liquid-phase microextraction based on the freezing of a deep eutectic solvent followed by HPLC-UV for sensitive determination of common pesticides in environmental water samples. *RSC Advances*. 2018;8(21):11412-8.
102. Schrimpe-Rutledge AC, Codreanu SG, Sherrod SD, McLean JA. Untargeted Metabolomics Strategies—Challenges and Emerging Directions. *J Am Soc Mass Spectrom*. 1 de diciembre de 2016;27(12):1897-905.
103. Cortés Tormo M, Marcos Tomás JV, Giner Galvañ V, Redón I Mas J. Metabolomics as a tool towards personalized medicine in type 2 diabetes mellitus. *Rev Med Lab*. 2021;2(1):30-40.
104. Santos Acunha T dos. *Metabolómica de compuestos bioactivos: nuevos desarrollos metodológicos y aplicaciones*. 2017 [citado 2 de marzo de 2025]; Disponible en: <https://digital.csic.es/handle/10261/196095>
105. Wishart DS. Metabolomics: applications to food science and nutrition research. *Trends in Food Science & Technology*. 1 de septiembre de 2008;19(9):482-93.
106. Munjal Y, Tonk RK, Sharma R. Analytical Techniques Used in Metabolomics: A Review. 2022;13(08).
107. Fiehn O. Metabolomics — the link between genotypes and phenotypes. En: Town C, editor. *Functional Genomics* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2002 [citado 2 de marzo de 2025]. p. 155-71. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-94-010-0448-0_11
108. Cevallos-Cevallos JM, Reyes-De-Corcuera JI, Etxeberria E, Danyluk MD, Rodrick GE. Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 1 de diciembre de 2009;20(11):557-66.
109. Ciborowski M, Teul J, Martin-Ventura JL, Egidio J, Barbas C. Metabolomics with LC-QTOF-MS Permits the Prediction of Disease Stage in Aortic Abdominal Aneurysm Based on Plasma Metabolic Fingerprint. *PLOS ONE*. 24 de febrero de 2012;7(2):e31982.
110. Ciborowski M, Javier Rupérez F, Martínez-Alcázar MP, Angulo S, Radziwon P, Olszanski R, et al. Metabolomic Approach with LC–MS Reveals Significant Effect of Pressure on Diver’s Plasma. *J Proteome Res*. 6 de agosto de 2010;9(8):4131-7.
111. Alberice JV, Amaral AFS, Armitage EG, Lorente JA, Algaba F, Carrilho E, et al. Searching for urine biomarkers of bladder cancer recurrence using a liquid chromatography–mass spectrometry and capillary electrophoresis–mass spectrometry metabolomics approach. *Journal of Chromatography A*. 29 de noviembre de 2013;1318:163-70.
112. Fowler SJ, Basanta-Sanchez M, Xu Y, Goodacre R, Dark PM. Surveillance for lower airway pathogens in mechanically ventilated patients by metabolomic analysis of exhaled breath: a case-control study. *Thorax*. 1 de abril de 2015;70(4):320-5.
113. Villaseñor A, Kinross JM, Li JV, Penney N, Barton RH, Nicholson JK, et al. 1H NMR Global Metabolic Phenotyping of Acute Pancreatitis in the Emergency Unit. *J Proteome Res*. 5 de diciembre de 2014;13(12):5362-75.

114. Ciborowski M, Martin-Ventura JL, Meilhac O, Michel JB, Ruperez FJ, Tuñon J, et al. Metabolites Secreted by Human Atherothrombotic Aneurysms Revealed through a Metabolomic Approach. *J Proteome Res.* 4 de marzo de 2011;10(3):1374-82.
115. Rojo D, Canuto GAB, Castilho-Martins EA, Tavares MFM, Barbas C, López-González Á, et al. A Multiplatform Metabolomic Approach to the Basis of Antimonial Action and Resistance in *Leishmania infantum*. *PLOS ONE.* 10 de julio de 2015;10(7):e0130675.
116. Nicholson JK, Wilson ID. Understanding «Global» Systems Biology: Metabonomics and the Continuum of Metabolism. *Nat Rev Drug Discov.* agosto de 2003;2(8):668-76.
117. Bylesjö M, Rantalainen M, Cloarec O, Nicholson JK, Holmes E, Trygg J. OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *Journal of Chemometrics.* 2006;20(8-10):341-51.
118. Di Guida R, Engel J, Allwood JW, Weber RJM, Jones MR, Sommer U, et al. Non-targeted UHPLC-MS metabolomic data processing methods: a comparative investigation of normalisation, missing value imputation, transformation and scaling. *Metabolomics.* 15 de abril de 2016;12(5):93.
119. Tautenhahn R, Böttcher C, Neumann S. Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS. *BMC Bioinformatics.* 28 de noviembre de 2008;9(1):504.
120. Dudzik D, Barbas-Bernardos C, García A, Barbas C. Quality assurance procedures for mass spectrometry untargeted metabolomics. a review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 5 de enero de 2018;147:149-73.
121. Fearnley LG, Inouye M. Metabolomics in epidemiology: from metabolite concentrations to integrative reaction networks. *International Journal of Epidemiology.* 1 de octubre de 2016;45(5):1319-28.
122. Vuckovic D. Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography–mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 1 de junio de 2012;403(6):1523-48.
123. Eriksson L, Byrne T, Johansson E, Trygg J, Vikström C. Multi- and Megavariate Data Analysis Basic Principles and Applications. *Umetrics Academy;* 2013. 509 p.
124. Xu Y, Goodacre R. Multiblock principal component analysis: an efficient tool for analyzing metabolomics data which contain two influential factors. *Metabolomics.* 1 de junio de 2012;8(1):37-51.
125. Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-McIntyre S, Anderson N, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc.* julio de 2011;6(7):1060-83.
126. Riekeberg E, Powers R. New frontiers in metabolomics: from measurement to insight. *F1000Research.* 19 de julio de 2017;6:1148.
127. Go EP. Database Resources in Metabolomics: An Overview. *J Neuroimmune Pharmacol.* 1 de marzo de 2010;5(1):18-30.

128. Beckonert O, Keun HC, Ebbels TMD, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc.* noviembre de 2007;2(11):2692-703.
129. Tiziani S, Emwas AH, Lodi A, Ludwig C, Bunce CM, Viant MR, et al. Optimized metabolite extraction from blood serum for ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analytical Biochemistry.* 1 de junio de 2008;377(1):16-23.
130. Rosenling T, Stoop MP, Smolinska A, Muilwijk B, Coulier L, Shi S, et al. The Impact of Delayed Storage on the Measured Proteome and Metabolome of Human Cerebrospinal Fluid. *Clinical Chemistry.* 1 de diciembre de 2011;57(12):1703-11.
131. Polson C, Sarkar P, Incledon B, Raguvaran V, Grant R. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B.* 5 de marzo de 2003;785(2):263-75.
132. A J, Trygg J, Gullberg J, Johansson AI, Jonsson P, Antti H, et al. Extraction and GC/MS Analysis of the Human Blood Plasma Metabolome. *Anal Chem.* 1 de diciembre de 2005;77(24):8086-94.
133. Fiehn O, Kind T. Metabolite Profiling in Blood Plasma. En: Weckwerth W, editor. *Metabolomics: Methods and Protocols* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2007 [citado 2 de marzo de 2025]. p. 3-17. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-1-59745-244-1_1
134. Bruce SJ, Tavazzi I, Parisod V, Rezzi S, Kochhar S, Guy PA. Investigation of Human Blood Plasma Sample Preparation for Performing Metabolomics Using Ultrahigh Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 1 de mayo de 2009;81(9):3285-96.
135. Pereira H, Martin JF, Joly C, Sébédio JL, Pujos-Guillot E. Development and validation of a UPLC/MS method for a nutritional metabolomic study of human plasma. *Metabolomics.* 1 de junio de 2010;6(2):207-18.
136. Lee R, Britz-McKibbin P. Differential Rates of Glutathione Oxidation for Assessment of Cellular Redox Status and Antioxidant Capacity by Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry: An Elusive Biomarker of Oxidative Stress. *Anal Chem.* 15 de agosto de 2009;81(16):7047-56.
137. Michopoulos F, Lai L, Gika H, Theodoridis G, Wilson I. UPLC-MS-Based Analysis of Human Plasma for Metabonomics Using Solvent Precipitation or Solid Phase Extraction. *J Proteome Res.* 3 de abril de 2009;8(4):2114-21.
138. Rezzi S, Vera FA, Martin FPJ, Wang S, Lawler D, Kochhar S. Automated SPE-RP-HPLC fractionation of biofluids combined to off-line NMR spectroscopy for biomarker identification in metabonomics. *Journal of Chromatography B.* 15 de agosto de 2008;871(2):271-8.
139. Roessner U, Wagner C, Kopka J, Trethewey RN, Willmitzer L. Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography–mass spectrometry. *The Plant Journal.* 2000;23(1):131-42.

140. Aharoni A, Ric de Vos CH, Verhoeven HA, Maliepaard CA, Kruppa G, Bino R, et al. Nontargeted Metabolome Analysis by Use of Fourier Transform Ion Cyclotron Mass Spectrometry. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*. julio de 2002;6(3):217-34.
141. Colebatch G, Desbrosses G, Ott T, Krusell L, Montanari O, Kloska S, et al. Global changes in transcription orchestrate metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus*. *The Plant Journal*. 2004;39(4):487-512.
142. Gullberg J, Jonsson P, Nordström A, Sjöström M, Moritz T. Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*. 15 de agosto de 2004;331(2):283-95.
143. Zhang Q, Nong Y, Liu Z, Gong L. Proteinase K Combining Two-Step Liquid–Liquid Extraction for Plasma Untargeted Liquid Chromatography–Mass Spectrometry-Based Metabolomics To Discover the Potential Mechanism of Colorectal Adenoma. *Anal Chem*. 19 de noviembre de 2019;91(22):14458-66.
144. Vuckovic D, Pawliszyn J. Systematic Evaluation of Solid-Phase Microextraction Coatings for Untargeted Metabolomic Profiling of Biological Fluids by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 15 de marzo de 2011;83(6):1944-54.
145. Consolación Rodríguez-Palazón M, Arroyo-Manzanares N, Viñas P, Campillo N. Metabolomic study of capsaicinoid compounds in urine samples by dispersive liquid–liquid microextraction and ultra-high performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Microchemical Journal*. 1 de julio de 2022;178:107373.
146. Calderón-Santiago M, Priego-Capote F, de Castro MDL. Enhancing detection coverage in untargeted metabolomics analysis by solid-phase extraction on-line coupled to LC–MS/MS. *ELECTROPHORESIS*. 2015;36(18):2179-87.
147. Moldovan C, Nicolescu A, Frumuzachi O, Rocchetti G, Lucini L, Mocan A, et al. Ultrasound-assisted sustainable extraction of bioactive phytochemicals in shallot (*Allium ascalonicum* L.) peel: A DoE and metabolomics combined approach. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 1 de octubre de 2024;41:101729.
148. Ovatlarnporn C, Basit A, Paliwal H, Nalinbenjapun S, Sripetthong S, Suksuwan A, et al. Untargeted metabolomics, optimization of microwave-assisted extraction using Box–Behnken design and evaluation of antioxidant, and antidiabetic activities of sugarcane bagasse. *Phytochemical Analysis*. 2024;35(7):1550-64.
149. López-Ruiz R, Romero-González R, Garrido Frenich A. Metabolomics approaches for the determination of multiple contaminants in food. *Current Opinion in Food Science*. 1 de agosto de 2019;28:49-57.
150. Balkir P, Kemahlioglu K, Yucel U. Foodomics: A new approach in food quality and safety. *Trends in Food Science & Technology*. 1 de febrero de 2021;108:49-57.
151. Wishart DS. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. *Nat Rev Drug Discov*. julio de 2016;15(7):473-84.

152. Salek RM, Steinbeck C, Viant MR, Goodacre R, Dunn WB. The role of reporting standards for metabolite annotation and identification in metabolomic studies. *GigaScience*. 1 de diciembre de 2013;2(1):2047-217X-2-13.
153. Li S, Tian Y, Jiang P, Lin Y, Liu X, Yang H. Recent advances in the application of metabolomics for food safety control and food quality analyses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 15 de mayo de 2021;61(9):1448-69.
154. Jones KC, de Voogt P. Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. *Environmental Pollution*. 1 de enero de 1999;100(1):209-21.
155. Miller-Pérez C, Sánchez-Islas E, Mucio-Ramírez S, Mendoza-Sotelo J, León-Olea M. Los contaminantes ambientales bifenilos policlorinados (PCB) y sus efectos sobre el Sistema Nervioso y la salud. *Salud mental*. agosto de 2009;32(4):335-46.
156. Breivik K, Sweetman A, Pacyna JM, Jones KC. Towards a global historical emission inventory for selected PCB congeners — a mass balance approach: 1. Global production and consumption. *Science of The Total Environment*. 6 de mayo de 2002;290(1):181-98.
157. Evans MS, Noguchi GE, Rice CP. The biomagnification of polychlorinated biphenyls, toxaphene, and DDT compounds in a Lake Michigan offshore food web. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1 de enero de 1991;20(1):87-93.
158. Tilson HA, Kodavanti PRS, Mundy WR, Bushnell PJ. Neurotoxicity of environmental chemicals and their mechanism of action. *Toxicology Letters*. 28 de diciembre de 1998;102-103:631-5.
159. Stewart P, Reihman J, Lonky E, Darvill T, Pagano J. Prenatal PCB exposure and neonatal behavioral assessment scale (NBAS) performance. *Neurotoxicology and Teratology*. 1 de enero de 2000;22(1):21-9.
160. Ballard O, Morrow AL. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatric Clinics*. 1 de febrero de 2013;60(1):49-74.
161. Hassiotou F, Geddes DT, Hartmann PE. Cells in Human Milk: State of the Science. *J Hum Lact*. 1 de mayo de 2013;29(2):171-82.
162. Martin CR, Ling PR, Blackburn GL. Review of Infant Feeding: Key Features of Breast Milk and Infant Formula. *Nutrients*. mayo de 2016;8(5):279.
163. Hamosh M. Bioactive Factors in Human Milk. *Pediatric Clinics of North America*. 1 de febrero de 2001;48(1):69-86.
164. García-López DR. Composición e inmunología de la leche humana. 2011;
165. Kramer MS, Aboud F, Mironova E, Vanilovich I, Platt RW, Matush L, et al. Breastfeeding and Child Cognitive Development: New Evidence From a Large Randomized Trial. *Archives of General Psychiatry*. 1 de mayo de 2008;65(5):578-84.
166. Amado Herrera L, Munares-García O. Práctica de lactancia materna en el puerperio inmediato e influencia de la paridad. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*. diciembre de 2018;44(4):1-10.

167. Beral V, Bull D, Doll R, Peto R, Reeves G, van den Brandt PA, et al. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast cancer: Breast cancer and abortion: collaborative reanalysis of data from 53 epidemiological studies, including 83000 women with breast cancer from 16 countries. *Lancet*. 1 de enero de 2004;363(9414):1007-16.
168. Gunderson EP, Jacobs DR Jr, Chiang V, Lewis CE, Feng J, Quesenberry CP Jr, et al. Duration of Lactation and Incidence of the Metabolic Syndrome in Women of Reproductive Age According to Gestational Diabetes Mellitus Status: A 20-Year Prospective Study in CARDIA (Coronary Artery Risk Development in Young Adults). *Diabetes*. 3 de diciembre de 2009;59(2):495-504.
169. Czaja K, Ludwicki JK, Góralczyk K, Struciński P. Effect of Changes in Excretion of Persistent Organochlorine Compounds with Human Breast Milk on Related Exposure of Breast-Fed Infants. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1 de mayo de 1999;36(4):498-503.
170. Czaja K, Ludwicki JK, Robson MG, Góralczyk K, Struciński P, Buckley B. Concentration of Persistent Organochlorine Compounds in the Placenta and Milk of the Same Women. En: *Persistent, Bioaccumulative, and Toxic Chemicals I* [Internet]. American Chemical Society; 2000 [citado 2 de marzo de 2025]. p. 284-91. (ACS Symposium Series; vol. 772). Disponible en: <https://doi.org/10.1021/bk-2001-0772.ch021>
171. Czaja K, Ludwicki JK, Góralczyk K, Struciński P. Effect of Age and Number of Deliveries on Mean Concentration of Organochlorine Compounds in Human Breast Milk in Poland. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1 de septiembre de 1997;59(3):407-13.
172. Czaja K, Ludwicki JK, Góralczyk K, Struciński P. Organochlorine Pesticides, HCB, and PCBs in Human Milk in Poland. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1 de mayo de 1997;58(5):769-75.
173. Patandin S, Lanting CI, Mulder PGH, Boersma ER, Sauer PJJ, Weisglas-Kuperus N. Effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on cognitive abilities in Dutch children at 42 months of age. *The Journal of Pediatrics*. 1 de enero de 1999;134(1):33-41.
174. Lackmann GM, Angerer J, Salzberger U, Töllner U. Influence of Maternal Age and Duration of Pregnancy on Serum Concentrations of Polychlorinated Biphenyls and Hexachlorobenzene in Full-Term Neonates. *Biology of the Neonate*. 3 de septiembre de 1999;76(4):214-9.
175. Kostyniak PJ, Stinson C, Greizerstein HB, Vena J, Buck G, Mendola P. Relation of Lake Ontario Fish Consumption, Lifetime Lactation, and Parity to Breast Milk Polychlorobiphenyl and Pesticide Concentrations. *Environmental Research*. 1 de febrero de 1999;80(2):S166-74.
176. Newsome WH, Davies D, Doucet J. PCB and organochlorine pesticides in Canadian human milk — 1992. *Chemosphere*. 1 de junio de 1995;30(11):2143-53.
177. Newsome WH, Ryan JJ. Toxaphene and other chlorinated compounds in human milk from northern and southern Canada: A comparison. *Chemosphere*. 1 de agosto de 1999;39(3):519-26.
178. Hansen LG. *The ortho Side of PCBs: Occurrence and Disposition*. Springer Science & Business Media; 2012. 271 p.

179. Lundén Å, Norén K. Polychlorinated Naphthalenes and Other Organochlorine Contaminants in Swedish Human Milk, 1972–1992. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1 de mayo de 1998;34(4):414-23.
180. Schade G, Heinzow B. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human milk of mothers living in northern Germany: Current extent of contamination, time trend from 1986 to 1997 and factors that influence the levels of contamination. *Science of The Total Environment*. 23 de abril de 1998;215(1):31-9.
181. She J, Holden A, Sharp M, Tanner M, Williams-Derry C, Hooper K. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in breast milk from the Pacific Northwest. *Chemosphere*. 1 de abril de 2007;67(9):S307-17.
182. Kowalski CH, Silva GA da, Poppi RJ, Godoy HT, Augusto F. Neuro-genetic multioptimization of the determination of polychlorinated biphenyl congeners in human milk by headspace solid phase microextraction coupled to gas chromatography with electron capture detection. *Analytica Chimica Acta*. 28 de febrero de 2007;585(1):66-75.
183. Luzardo OP, Ruiz-Suárez N, Almeida-González M, Henríquez-Hernández LA, Zumbado M, Boada LD. Multi-residue method for the determination of 57 Persistent Organic Pollutants in human milk and colostrum using a QuEChERS-based extraction procedure. *Anal Bioanal Chem*. 1 de noviembre de 2013;405(29):9523-36.
184. Stewart P, Darvill T, Lonky E, Reihman J, Pagano J, Bush B. Assessment of Prenatal Exposure to PCBs from Maternal Consumption of Great Lakes Fish: An Analysis of PCB Pattern and Concentration. *Environmental Research*. 1 de febrero de 1999;80(2):S87-96.
185. Böhm V, Schulte E, Thier HP. Polychlorinated biphenyl residues in food and human milk: determination of co-planar and mono-ortho substituted congeners. *Z Lebensm Unters Forsch*. 1 de mayo de 1993;196(5):435-40.
186. Mes J, Davies DJ. Presence of polychlorinated biphenyl and organochlorine pesticide residues and the absence of polychlorinated terphenyls in canadian human milk samples. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1 de enero de 1979;21(1):381-7.
187. Ben-Neriah Y, Daley GQ. The Chronic Myelogenous Leukemia-specific P210 Protein Is the Product of the *bcrl/abl* Hybrid Gene. *Science*. 1986;233(4760):212-4.
188. Mes J. Temporal changes in some chlorinated hydrocarbon residue levels of Canadian breast milk and infant exposure. *Environmental Pollution*. 1 de enero de 1994;84(3):261-8.
189. Fitzgerald EF, Hwang SA, Bush B, Cook K, Worswick P. Fish Consumption and Breast Milk PCB Concentrations among Mohawk Women at Akwesasne. *American Journal of Epidemiology*. 15 de julio de 1998;148(2):164-72.
190. Krauthacker B, Reiner E, Votava-Raić A, Tješić-Drinković D, Batinić D. Organochlorine pesticides and PCBs in human milk collected from mothers nursing hospitalized children. *Chemosphere*. 1 de julio de 1998;37(1):27-32.
191. Greizerstein HB, Stinson C, Mendola P, Buck GM, Kostyniak PJ, Vena JE. Comparison of PCB Congeners and Pesticide Levels between Serum and Milk from Lactating Women. *Environmental Research*. 1 de abril de 1999;80(3):280-6.

192. Kiviranta IV H, Hallikainen A, Ovaskainen ML, Kumpulainen J, Vartiainen T. Dietary intakes of polychlorinated dibenzo- p -dioxins, dibenzofurans and polychlorinated biphenyls in Finland. *Food Additives & Contaminants*. 1 de noviembre de 2001;18(11):945-53.
193. Korrick S, Altshul L. High breast milk levels of polychlorinated biphenyls (PCBs) among four women living adjacent to a PCB-contaminated waste site. *Environmental health perspectives*. 1998;106(8):513-8.
194. Polder A, Odland JO, Tkachev A, Føreid S, Savinova TN, Skaare JU. Geographic variation of chlorinated pesticides, toxaphenes and PCBs in human milk from sub-arctic and arctic locations in Russia. *Science of The Total Environment*. 1 de mayo de 2003;306(1):179-95.
195. Dhalaria R, Verma R, Kumar D, Puri S, Tapwal A, Kumar V, et al. Bioactive compounds of edible fruits with their anti-aging properties: A comprehensive review to prolong human life. *Antioxidants*. 2020;9(11):1-38.
196. Bursać Kovačević D, Brdar D, Fabečić P, Barba FJ, Lorenzo JM, Putnik P. Chapter 2 - Strategies to achieve a healthy and balanced diet: fruits and vegetables as a natural source of bioactive compounds. En: Barba FJ, Putnik P, Kovačević DB, editores. *Agri-Food Industry Strategies for Healthy Diets and Sustainability [Internet]*. Academic Press; 2020 [citado 25 de febrero de 2025]. p. 51-88. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128172261000023>
197. Jackman JA, Boyd RD, Elrod CC. Medium-chain fatty acids and monoglycerides as feed additives for pig production: towards gut health improvement and feed pathogen mitigation. *J Animal Sci Biotechnol*. 23 de abril de 2020;11(1):44.
198. Sathasivam R, Radhakrishnan R, Kim JK, Park SU. An update on biosynthesis and regulation of carotenoids in plants. *South African Journal of Botany*. 1 de agosto de 2021;140:290-302.
199. Tijjani H, Zangoma MH, Mohammed ZS, Obidola SM, Egbuna C, Abdulai SI. Polyphenols: Classifications, Biosynthesis and Bioactivities. En: Egbuna C, Dable Tupas G, editores. *Functional Foods and Nutraceuticals: Bioactive Components, Formulations and Innovations [Internet]*. Cham: Springer International Publishing; 2020 [citado 2 de marzo de 2025]. p. 389-414. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-030-42319-3_19
200. Utpott M, Rodrigues E, Rios A de O, Mercali GD, Flôres SH. Metabolomics: An analytical technique for food processing evaluation. *Food Chemistry*. 1 de enero de 2022;366:130685.
201. Wrobel K, Guerrero Esperanza M, Yanez Barrientos E, Corrales Escobosa AR, Wrobel K. Different approaches in metabolomic analysis of plants exposed to selenium: a comprehensive review. *Acta Physiol Plant*. 25 de junio de 2020;42(7):125.
202. Saia S, Fragasso M, De Vita P, Beleggia R. Metabolomics Provides Valuable Insight for the Study of Durum Wheat: A Review. *J Agric Food Chem*. 20 de marzo de 2019;67(11):3069-85.
203. Zhang T, Chen C, Xie K, Wang J, Pan Z. Current State of Metabolomics Research in Meat Quality Analysis and Authentication. *Foods*. octubre de 2021;10(10):2388.

204. Piovesana S, Cavaliere C, Cerrato A, Montone CM, Laganà A, Capriotti AL. Developments and pitfalls in the characterization of phenolic compounds in food: From targeted analysis to metabolomics-based approaches. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1 de diciembre de 2020;133:116083.
205. Wang X, Zhang X, Hou H, Ma X, Sun S, Wang H, et al. Metabolomics and gene expression analysis reveal the accumulation patterns of phenylpropanoids and flavonoids in different colored-grain wheats (*Triticum aestivum* L.). *Food Research International*. 1 de diciembre de 2020;138:109711.
206. Tomas M, Zhang L, Zengin G, Rocchetti G, Capanoglu E, Lucini L. Metabolomic insight into the profile, *in vitro* bioaccessibility and bioactive properties of polyphenols and glucosinolates from four *Brassicaceae* microgreens. *Food Research International*. 1 de febrero de 2021;140:110039.
207. Rao S, Gou Y, Yu T, Cong X, Gui J, Zhu Z, et al. Effects of selenate on Se, flavonoid, and glucosinolate in broccoli florets by combined transcriptome and metabolome analyses. *Food Research International*. 1 de agosto de 2021;146:110463.
208. Liu M, Xie H, Ma Y, Li H, Li C, Chen L, et al. High Performance Liquid Chromatography and Metabolomics Analysis of Tannase Metabolism of Gallic Acid and Gallates in Tea Leaves. *J Agric Food Chem*. 29 de abril de 2020;68(17):4946-54.
209. Chen S, Liu H, Zhao X, Li X, Shan W, Wang X, et al. Non-targeted metabolomics analysis reveals dynamic changes of volatile and non-volatile metabolites during oolong tea manufacture. *Food Research International*. 1 de febrero de 2020;128:108778.
210. Sun RZ, Cheng G, Li Q, Zhu YR, Zhang X, Wang Y, et al. Comparative physiological, metabolomic, and transcriptomic analyses reveal developmental stage-dependent effects of cluster bagging on phenolic metabolism in Cabernet Sauvignon grape berries. *BMC Plant Biol*. 26 de diciembre de 2019;19(1):583.
211. Xue A, Liang W, Wen S, Gao Y, Huang X, Tong Y, et al. Metabolomic analysis based on EESI-MS indicate blue LED light promotes aliphatic-glucosinolates biosynthesis in broccoli sprouts. *Journal of Food Composition and Analysis*. 1 de abril de 2021;97:103777.
212. Yang B, He S, Liu Y, Liu B, Ju Y, Kang D, et al. Transcriptomics integrated with metabolomics reveals the effect of regulated deficit irrigation on anthocyanin biosynthesis in Cabernet Sauvignon grape berries. *Food Chemistry*. 1 de junio de 2020;314:126170.
213. St. Angelo AJ, Vercellotti J, Jacks T, Legendre M. Lipid oxidation in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1 de febrero de 1996;36(3):175-224.
214. Rocchetti G, Barba FJ, Lorenzo JM, Munekata PES, Bernardo L, Tomasevic I, et al. Untargeted metabolomics to explore the oxidation processes during shelf life of pork patties treated with guarana seed extracts. *International Journal of Food Science and Technology*. 1 de marzo de 2020;55(3):1002-9.
215. Rocchetti G, Bernardo L, Pateiro M, Barba FJ, Munekata PES, Trevisan M, et al. Impact of a Pitanga Leaf Extract to Prevent Lipid Oxidation Processes during Shelf Life of Packaged Pork Burgers: An Untargeted Metabolomic Approach. *Foods*. noviembre de 2020;9(11):1668.

216. Arcila-Lozano CC, Loarca-Piña G, Lecona-Uribe S, González de Mejía E. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. marzo de 2004;54(1):100-11.
217. Guan Y, Hu W, Xu Y, Sarengaowa, Ji Y, Yang X, et al. Proteomic analysis validates previous findings on wounding-responsive plant hormone signaling and primary metabolism contributing to the biosynthesis of secondary metabolites based on metabolomic analysis in harvested broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*). *Food Research International*. 1 de julio de 2021;145:110388.
218. Zhang Y, Zhao X, Ma Y, Zhang L, Jiang Y, Liang H, et al. Transcriptome and metabolome profiling to elucidate mechanisms underlying the blue discoloration of radish roots during storage. *Food Chemistry*. 15 de noviembre de 2021;362:130076.
219. Munekata PES, Pateiro M, Rocchetti G, Domínguez R, Rocha JM, Lorenzo JM. Application of metabolomics to decipher the role of bioactive compounds in plant and animal foods. *Current Opinion in Food Science*. 1 de agosto de 2022;46:100851.
220. Dessì A, Briana D, Corbu S, Gavrili S, Cesare Marincola F, Georgantzi S, et al. Metabolomics of Breast Milk: The Importance of Phenotypes. *Metabolites*. diciembre de 2018;8(4):79.
221. German JB, Dillard CJ. Composition, Structure and Absorption of Milk Lipids: A Source of Energy, Fat-Soluble Nutrients and Bioactive Molecules. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1 de enero de 2006;46(1):57-92.
222. Bode L. Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*. 1 de septiembre de 2012;22(9):1147-62.
223. Hennet T, Borsig L. Breastfed at Tiffany's. *Trends in Biochemical Sciences*. 1 de junio de 2016;41(6):508-18.
224. Agostoni C, Buonocore G, Carnielli VP, De Curtis M, Darmaun D, Decsi T. Enteral nutrient supply for preterm infants: commentary from the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2012;50(1):85-91.
225. Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Doare K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Human Development*. 1 de noviembre de 2015;91(11):629-35.
226. McGuire MK, McGuire MA. Human Milk: Mother Nature's Prototypical Probiotic Food? *Advances in Nutrition*. 1 de enero de 2015;6(1):112-23.
227. Thorell L, Sjöberg LB, Hernell O. Nucleotides in Human Milk: Sources and Metabolism by the Newborn Infant. *Pediatr Res*. diciembre de 1996;40(6):845-52.
228. Xiao G, Xiao H, Zhu Y, You Y. Determination of nucleotides in Chinese human milk by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Dairy Sci & Technol*. 1 de noviembre de 2014;94(6):591-602.
229. Plaza-Zamora J, Sabater-Molina M, Rodríguez-Palmero M, Rivero M, Bosch V, Nadal JM, et al. Polyamines in human breast milk for preterm and term infants. *British Journal of Nutrition*. agosto de 2013;110(3):524-8.

230. Harzer G, Franzke V, Bindels JG. Human milk nonprotein nitrogen components: changing patterns of free amino acids and urea in the course of early lactation. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1 de agosto de 1984;40(2):303-9.
231. Navas-Iglesias N, Carrasco-Pancorbo A, Cuadros-Rodríguez L. From lipids analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part II: Analytical lipidomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1 de abril de 2009;28(4):393-403.
232. Zivkovic AM, Wiest MM, Nguyen UT, Davis R, Watkins SM, German JB. Effects of sample handling and storage on quantitative lipid analysis in human serum. *Metabolomics*. 1 de diciembre de 2009;5(4):507-16.
233. Teo CC, Chong WPK, Tan E, Basri NB, Low ZJ, Ho YS. Advances in sample preparation and analytical techniques for lipidomics study of clinical samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1 de marzo de 2015;66:1-18.
234. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*. 2007;26(1):51-78.
235. Marincola FC, Noto A, Caboni P, Reali A, Barberini L, Lussu M, et al. A metabolomic study of preterm human and formula milk by high resolution NMR and GC/MS analysis: preliminary results. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 1 de octubre de 2012;25(sup5):62-7.
236. Qian L, Zhao A, Zhang Y, Chen T, Zeisel SH, Jia W, et al. Metabolomic Approaches to Explore Chemical Diversity of Human Breast-Milk, Formula Milk and Bovine Milk. *International Journal of Molecular Sciences*. diciembre de 2016;17(12):2128.
237. Wu J, Domellöf M, Zivkovic AM, Larsson G, Öhman A, Nording ML. NMR-based metabolite profiling of human milk: A pilot study of methods for investigating compositional changes during lactation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 15 de enero de 2016;469(3):626-32.
238. Praticò G, Capuani G, Tomassini A, Baldassarre ME, Delfini M, Miccheli A. Exploring human breast milk composition by NMR-based metabolomics. *Natural Product Research*. 17 de enero de 2014;28(2):95-101.
239. Maas C, Franz AR, Shunova A, Mathes M, Bleeker C, Poets CF, et al. Choline and polyunsaturated fatty acids in preterm infants' maternal milk. *Eur J Nutr*. 1 de junio de 2017;56(4):1733-42.
240. Tavazzi I, Fontannaz P, Lee LY, Giuffrida F. Quantification of glycerophospholipids and sphingomyelin in human milk and infant formula by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometer detector. *Journal of Chromatography B*. 1 de enero de 2018;1072:235-43.
241. Cruz-Hernandez C, Goeuriot S, Giuffrida F, Thakkar SK, Destailats F. Direct quantification of fatty acids in human milk by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 5 de abril de 2013;1284:174-9.

242. Urbaniak C, McMillan A, Angelini M, Gloor GB, Sumarah M, Burton JP, et al. Effect of chemotherapy on the microbiota and metabolome of human milk, a case report. *Microbiome*. 11 de julio de 2014;2(1):24.
243. Dreiucker J, Vetter W. Fatty acids patterns in camel, moose, cow and human milk as determined with GC/MS after silver ion solid phase extraction. *Food Chemistry*. 15 de mayo de 2011;126(2):762-71.
244. Martínez Pérez-Cejuela H, Ten-Doménech I, El Haskouri J, Amorós P, Simó-Alfonso EF, Herrero-Martínez JM. Solid-phase extraction of phospholipids using mesoporous silica nanoparticles: application to human milk samples. *Anal Bioanal Chem*. 1 de agosto de 2018;410(20):4847-54.
245. Jiang C, Ma B, Song S, Lai OM, Cheong LZ. Fingerprinting of Phospholipid Molecular Species from Human Milk and Infant Formula Using HILIC-ESI-IT-TOF-MS and Discriminatory Analysis by Principal Component Analysis. *J Agric Food Chem*. 11 de julio de 2018;66(27):7131-8.
246. Garwolińska D, Hewelt-Belka W, Namieśnik J, Kot-Wasik A. Rapid Characterization of the Human Breast Milk Lipidome Using a Solid-Phase Microextraction and Liquid Chromatography–Mass Spectrometry-Based Approach. *J Proteome Res*. 1 de septiembre de 2017;16(9):3200-8.
247. Sundekilde UK, Downey E, O'Mahony JA, O'Shea CA, Ryan CA, Kelly AL, et al. The Effect of Gestational and Lactational Age on the Human Milk Metabolome. *Nutrients*. mayo de 2016;8(5):304.
248. Spevacek AR, Smilowitz JT, Chin EL, Underwood MA, German JB, Slupsky CM. Infant Maturity at Birth Reveals Minor Differences in the Maternal Milk Metabolome in the First Month of Lactation 1, 2, 3. *The Journal of Nutrition*. 1 de agosto de 2015;145(8):1698-708.
249. Smilowitz JT, O'sullivan A, Barile D, German JB, Lönnnerdal B, Slupsky CM. The Human Milk Metabolome Reveals Diverse Oligosaccharide Profiles. *The Journal of Nutrition*. 1 de noviembre de 2013;143(11):1709-18.
250. Samur G, Topcu A, Turan S. Trans Fatty Acids and Fatty Acid Composition of Mature Breast Milk in Turkish Women and Their Association with Maternal Diet's. *Lipids*. 1 de mayo de 2009;44(5):405-13.
251. Blaas N, Schüürmann C, Bartke N, Stahl B, Humpf HU. Structural Profiling and Quantification of Sphingomyelin in Human Breast Milk by HPLC-MS/MS. *J Agric Food Chem*. 8 de junio de 2011;59(11):6018-24.
252. Longini M, Tataranno ML, Proietti F, Tortoriello M, Belvisi E, Vivi A, et al. A metabolomic study of preterm and term human and formula milk by proton MRS analysis: preliminary results. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 1 de octubre de 2014;27(sup2):27-33.
253. Mäkelä J, Linderborg K, Niinikoski H, Yang B, Lagström H. Breast milk fatty acid composition differs between overweight and normal weight women: the STEPS Study. *Eur J Nutr*. 1 de marzo de 2013;52(2):727-35.

254. Giuffrida F, Cruz-Hernandez C, Flück B, Tavazzi I, Thakkar SK, Destailats F, et al. Quantification of Phospholipids Classes in Human Milk. *Lipids*. 1 de octubre de 2013;48(10):1051-8.
255. Linderborg KM, Kalpio M, Mäkelä J, Niinikoski H, Kallio HP, Lagström H. Tandem mass spectrometric analysis of human milk triacylglycerols from normal weight and overweight mothers on different diets. *Food Chemistry*. 1 de marzo de 2014;146:583-90.
256. Sokol E, Ulven T, Færgeman NJ, Ejsing CS. Comprehensive and quantitative profiling of lipid species in human milk, cow milk and a phospholipid-enriched milk formula by GC and MS/MSALL. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2015;117(6):751-9.
257. Kelishadi R, Hadi B, Iranpour R, Khosravi-Darani K, Mirmoghtadaee P, Farajian S, et al. A study on lipid content and fatty acid of breast milk and its association with mother's diet composition. *J Res Med Sci*. septiembre de 2012;17(9):824-7.
258. Giuffrida F, Cruz-Hernandez C, Bertschy E, Fontannaz P, Masserey Elmelegy I, Tavazzi I, et al. Temporal Changes of Human Breast Milk Lipids of Chinese Mothers. *Nutrients*. noviembre de 2016;8(11):715.
259. Villaseñor A, Garcia-Perez I, Garcia A, Pasma JM, Fernández-López M, Nicholas AJ, et al. Breast Milk Metabolome Characterization in a Single-Phase Extraction, Multiplatform Analytical Approach. *Anal Chem*. 19 de agosto de 2014;86(16):8245-52.
260. Andreas NJ, Hyde MJ, Gomez-Romero M, Lopez-Gonzalvez MA, Villaseñor A, Wijeyesekera A, et al. Multiplatform characterization of dynamic changes in breast milk during lactation. *ELECTROPHORESIS*. 2015;36(18):2269-85.
261. Tu A, Ma Q, Bai H, Du Z. A comparative study of triacylglycerol composition in Chinese human milk within different lactation stages and imported infant formula by SFC coupled with Q-TOF-MS. *Food Chemistry*. 15 de abril de 2017;221:555-67.
262. Mung D, Li L. Development of Chemical Isotope Labeling LC-MS for Milk Metabolomics: Comprehensive and Quantitative Profiling of the Amine/Phenol Submetabolome. *Anal Chem*. 18 de abril de 2017;89(8):4435-43.
263. Ten-Doménech I, Ramos-García V, Piñeiro-Ramos JD, Gormaz M, Parra-Llorca A, Vento M, et al. Current Practice in Untargeted Human Milk Metabolomics. *Metabolites*. febrero de 2020;10(2):43.
264. Berger B, Peng J, Singh M. Computational solutions for omics data. *Nat Rev Genet*. mayo de 2013;14(5):333-46.
265. Barabási AL, Gulbahce N, Loscalzo J. Network medicine: a network-based approach to human disease. *Nat Rev Genet*. enero de 2011;12(1):56-68.
266. Ornelas-Paz J de J, Yahia EM, Ramírez-Bustamante N, Pérez-Martínez JD, Escalante-Minakata M del P, Ibarra-Junquera V, et al. Physical attributes and chemical composition of organic strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch, Cv. Albion) at six stages of ripening. *Food Chemistry*. 1 de mayo de 2013;138(1):372-81.
267. Giovannoni JJ. Genetic Regulation of Fruit Development and Ripening. *The Plant Cell*. 1 de junio de 2004;16(suppl_1):S170-80.

268. Zhang J, Cheng D, Wang B, Khan I, Ni Y. Ethylene Control Technologies in Extending Postharvest Shelf Life of Climacteric Fruit. *J Agric Food Chem*. 30 de agosto de 2017;65(34):7308-19.
269. Yun Z, Jin S, Ding Y, Wang Z, Gao H, Pan Z, et al. Comparative transcriptomics and proteomics analysis of citrus fruit, to improve understanding of the effect of low temperature on maintaining fruit quality during lengthy post-harvest storage. *Journal of Experimental Botany*. 1 de mayo de 2012;63(8):2873-93.
270. Yang Z, Cao S, Su X, Jiang Y. Respiratory activity and mitochondrial membrane associated with fruit senescence in postharvest peaches in response to UV-C treatment. *Food Chemistry*. 15 de octubre de 2014;161:16-21.
271. Pott DM, Vallarino JG, Osorio S. Metabolite Changes during Postharvest Storage: Effects on Fruit Quality Traits. *Metabolites*. mayo de 2020;10(5):187.
272. Lauxmann MA, Brun B, Borsani J, Bustamante CA, Budde CO, Lara MV, et al. Transcriptomic Profiling during the Post-Harvest of Heat-Treated Dixiland *Prunus persica* Fruits: Common and Distinct Response to Heat and Cold. *PLOS ONE*. 6 de diciembre de 2012;7(12):e51052.
273. Aghdam MS, Bodbodak S. Postharvest Heat Treatment for Mitigation of Chilling Injury in Fruits and Vegetables. *Food Bioprocess Technol*. 1 de enero de 2014;7(1):37-53.
274. Brizzolara S, Santucci C, Tenori L, Hertog M, Nicolai B, Stürz S, et al. A metabolomics approach to elucidate apple fruit responses to static and dynamic controlled atmosphere storage. *Postharvest Biology and Technology*. 1 de mayo de 2017;127:76-87.
275. Luo H, Song J, Toivonen P, Gong Y, Forney C, Campbell Palmer L, et al. Proteomic changes in 'Ambrosia' apple fruit during cold storage and in response to delayed cooling treatment. *Postharvest Biology and Technology*. 1 de marzo de 2018;137:66-76.
276. Moreno AS, Perotti VE, Margarit E, Bello F, Vázquez DE, Podestá FE, et al. Metabolic profiling and quality assessment during the postharvest of two tangor varieties subjected to heat treatments. *Postharvest Biology and Technology*. 1 de agosto de 2018;142:10-8.
277. Perotti VE, Del Vecchio HA, Sansevich A, Meier G, Bello F, Cocco M, et al. Proteomic, metabolomic, and biochemical analysis of heat treated Valencia oranges during storage. *Postharvest Biology and Technology*. 1 de noviembre de 2011;62(2):97-114.
278. Serek M, Tamari G, Sisler EC, Borochoy A. Inhibition of ethylene-induced cellular senescence symptoms by 1-methylcyclopropene, a new inhibitor of ethylene action. *Physiologia Plantarum*. 1995;94(2):229-32.
279. Pedreschi R, Lurie S. Advances and current challenges in understanding postharvest abiotic stresses in perishables. *Postharvest Biology and Technology*. 1 de septiembre de 2015;107:77-89.
280. Kosova K, Vıtamvas P, Prašil IT, Renaut J. Plant proteome changes under abiotic stress — Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics*. 12 de agosto de 2011;74(8):1301-22.
281. Obata T, Fernie AR. The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cell Mol Life Sci*. 1 de octubre de 2012;69(19):3225-43.

282. Stewart D, McDougall GJ, Sungurtas J, Verrall S, Graham J, Martinussen I. Metabolomic approach to identifying bioactive compounds in berries: Advances toward fruit nutritional enhancement. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2007;51(6):645-51.
283. Montecchiarini ML, Bello F, Rivadeneira MF, Vázquez D, Podestá FE, Tripodi KEJ. Metabolic and physiologic profile during the fruit ripening of three blueberries highbush (*Vaccinium corymbosum*) cultivars. *Journal of Berry Research*. 1 de enero de 2018;8(3):177-92.
284. Forney CF, Kalt W, Jordan MA, Vinqvist-Tymchuk MR, Fillmore SAE. Blueberry and cranberry fruit composition during development. *Journal of Berry Research*. 1 de enero de 2012;2(3):169-77.
285. Rashidinejad A. Chapter 29 - Blueberries. En: Jaiswal AK, editor. *Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables* [Internet]. Academic Press; 2020 [citado 2 de marzo de 2025]. p. 467-82. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128127803000295>
286. Wang YW, Acharya TP, Malladi A, Tsai HJ, NeSmith DS, Doyle JW, et al. Atypical Climacteric and Functional Ethylene Metabolism and Signaling During Fruit Ripening in Blueberry (*Vaccinium* sp.). *Front Plant Sci* [Internet]. 23 de junio de 2022 [citado 25 de febrero de 2025];13. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2022.932642/full>
287. Huynh NK, Wilson MD, Eyles A, Stanley RA. Recent advances in postharvest technologies to extend the shelf life of blueberries (*Vaccinium* sp.), raspberries (*Rubus* sp.) and blackberries (*Rubus* sp.). *Journal of Berry Research*. 25 de noviembre de 2019;9(4):687-707.
288. Hu B, Sun DW, Pu H, Wei Q. Recent advances in detecting and regulating ethylene concentrations for shelf-life extension and maturity control of fruit: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 1 de septiembre de 2019;91:66-82.
289. Defilippi B, Rivera S, Arriola R. Aspectos claves durante postcosecha para para la obtención de un arándano de calidad. Unidad de Poscosecha-Centro Regional INIA La Platina Ministerio de Agricultura del Gobierno de Chile. 2017;121-42.
290. Falagán N, Miclo T, Terry LA. Graduated Controlled Atmosphere: A Novel Approach to Increase "Duke" Blueberry Storage Life. *Front Plant Sci* [Internet]. 17 de marzo de 2020 [citado 26 de julio de 2024];11. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2020.00221/full>
291. Lee JH, An DS, Song JM, Jung YB, Lee DS. An adaptively controlled modified atmosphere container system for fresh produce. *Biosystems Engineering*. 1 de agosto de 2016;148:11-7.
292. Moreno CV, Villacorta LM, Vásquez CP. Ozono gaseoso en la conservación de las características de calidad en arándanos (*Vaccinium corymbosum* L.).
293. Pinto L, Palma A, Cefola M, Pace B, D'Aquino S, Carboni C, et al. Effect of modified atmosphere packaging (MAP) and gaseous ozone pre-packaging treatment on the physico-chemical, microbiological and sensory quality of small berry fruit. *Food Packaging and Shelf Life*. 1 de diciembre de 2020;26:100573.

294. Concha-Meyer A, Eifert JD, Williams RC, Marcy JE, Welbaum GE. Shelf Life Determination of Fresh Blueberries (*Vaccinium corymbosum*) Stored under Controlled Atmosphere and Ozone. *International Journal of Food Science*. 2015;2015(1):164143.
295. Cantín CM, Minas IS, Goulas V, Jiménez M, Manganaris GA, Michailides TJ, et al. Sulfur dioxide fumigation alone or in combination with CO₂-enriched atmosphere extends the market life of highbush blueberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 2012;67:84-91.
296. Nair MS, Tomar M, Punia S, Kukula-Koch W, Kumar M. Enhancing the functionality of chitosan- and alginate-based active edible coatings/films for the preservation of fruits and vegetables: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1 de diciembre de 2020;164:304-20.
297. Eldib R, Khojah E, Elhakem A, Benajiba N, Helal M. Chitosan, Nisin, Silicon Dioxide Nanoparticles Coating Films Effects on Blueberry (*Vaccinium myrtillus*) Quality. *Coatings*. 2020;10(10):962.
298. Wang S, Zhou Q, Zhou X, Wei B, Ji S. The effect of ethylene absorbent treatment on the softening of blueberry fruit. *Food Chemistry*. 25 de abril de 2018;246:286-94.
299. Ji Y, Hu W, Liao J, Jiang A, Xiu Z, Gaowa S, et al. Effect of atmospheric cold plasma treatment on antioxidant activities and reactive oxygen species production in postharvest blueberries during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2020;100(15):5586-95.
300. Kong Q, Wu A, Qi W, Qi R, Carter JM, Rasooly R, et al. Effects of electron-beam irradiation on blueberries inoculated with *Escherichia coli* and their nutritional quality and shelf life - ScienceDirect [Internet]. 2014 [citado 26 de julio de 2024]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0925521414001100?via%3Dihub>
301. Nambeesan SU, Doyle JW, Capps HD, Starns C, Scherm H. Effect of Electronic Cold-Pasteurization™ (ECPTM) on Fruit Quality and Postharvest Diseases during Blueberry Storage. *Horticulturae*. septiembre de 2018;4(3):25.
302. Almenar E, Samsudin H, Auras R, Harte B, Rubino M. Postharvest shelf life extension of blueberries using a biodegradable package. *Food Chemistry*. 1 de septiembre de 2008;110(1):120-7.
303. Yahia EM, Serrano M, Valero D, A. González-Aguilar G. Influence of Postharvest Technologies and Handling Practices on Phytochemicals in Fruits and Vegetables. En: *Fruit and Vegetable Phytochemicals* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2017 [citado 2 de marzo de 2025]. p. 609-28. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119158042.ch27>
304. Lin SH, Chang CK, Lin CT, Gavahian M, Li PH, Tsai SY, et al. Pulse electric field pretreatment delays the texture deterioration of sweet persimmon (*Diospyros kaki* L.) during postharvest storage. *LWT*. 1 de enero de 2024;191:115711.
305. Toepfl S, Heinz V, Knorr D. High intensity pulsed electric fields applied for food preservation. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 1 de junio de 2007;46(6):537-46.

306. Jadhav HB, Annapure US, Deshmukh RR. Non-thermal Technologies for Food Processing. *Front Nutr* [Internet]. 8 de junio de 2021 [citado 2 de marzo de 2025];8. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/nutrition/articles/10.3389/fnut.2021.657090/full>
307. Pal M. Pulsed Electric Field Processing: An Emerging Technology for Food Preservation. *J Exp Food Chem* [Internet]. 2017 [citado 2 de marzo de 2025];03(02). Disponible en: <https://www.omicsonline.org/open-access/pulsed-electric-field-processing-an-emerging-technology-for-food-preservation-2472-0542-1000126.php?aid=88297>
308. Hu X, Sun H, Yang X, Cui D, Wang Y, Zhuang J, et al. Potential use of atmospheric cold plasma for postharvest preservation of blueberries. *Postharvest Biology and Technology*. 1 de septiembre de 2021;179:111564.
309. Misra NN, Pankaj SK, Segat A, Ishikawa K. Cold plasma interactions with enzymes in foods and model systems. *Trends in Food Science & Technology*. 1 de septiembre de 2016;55:39-47.
310. Paixão LMN, Fonteles TV, Oliveira VS, Fernandes FAN, Rodrigues S. Cold Plasma Effects on Functional Compounds of Siriguela Juice. *Food Bioprocess Technol*. 1 de enero de 2019;12(1):110-21.
311. Ding CK, Chachin K, Ueda Y, Imahori Y, Wang CY. Modified atmosphere packaging maintains postharvest quality of loquat fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 1 de abril de 2002;24(3):341-8.
312. Kader AA, Zagory D, Kerbel EL, Wang CY. Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1 de enero de 1989;28(1):1-30.
313. Kader AA. *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. University of California Agriculture and Natural Resources; 2002. 545 p.
314. Saltveit ME. Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*. 1 de marzo de 1999;15(3):279-92.
315. Begley P, Francis-McIntyre S, Dunn WB, Broadhurst DI, Halsall A, Tseng A, et al. Development and Performance of a Gas Chromatography–Time-of-Flight Mass Spectrometry Analysis for Large-Scale Nontargeted Metabolomic Studies of Human Serum. *Anal Chem*. 15 de agosto de 2009;81(16):7038-46.
316. Arias-Borrego A, Velasco I, Gómez-Ariza JL, García-Barrera T. Iodine deficiency disturbs the metabolic profile and elemental composition of human breast milk. *Food Chemistry*. 1 de marzo de 2022;371:131329.
317. Manso J, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL. New home-made assembly for hollow-fibre membrane extraction of persistent organic pollutants from real world samples. *Journal of Chromatography A*. 4 de noviembre de 2011;1218(44):7923-35.
318. Nikolaou AD, Lekkas TD, Golfinopoulos SK, Kostopoulou MN. Application of different analytical methods for determination of volatile chlorination by-products in drinking water. *Talanta*. 11 de marzo de 2002;56(4):717-26.

319. Ghambarian M, Yamini Y, Esrafil A. Developments in hollow fiber based liquid-phase microextraction: principles and applications. *Microchim Acta*. 1 de junio de 2012;177(3):271-94.
320. Domínguez-Tello A, Arias-Borrego A, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL. Application of hollow fiber liquid phase microextraction for simultaneous determination of regulated and emerging iodinated trihalomethanes in drinking water. *Journal of Chromatography A*. 10 de julio de 2015;1402:8-16.
321. Chen PS, Huang SD. Determination of ethoprop, diazinon, disulfoton and fenthion using dynamic hollow fiber-protected liquid-phase microextraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry. *Talanta*. 15 de mayo de 2006;69(3):669-75.
322. Howard PH, Co TSR. *Handbook of Physical Properties of Organic Chemicals*. CRC Press; 1996. 2122 p.
323. Basheer C, Balasubramanian R, Lee HK. Determination of organic micropollutants in rainwater using hollow fiber membrane/liquid-phase microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 17 de octubre de 2003;1016(1):11-20.
324. Basheer C, Lee HK, Obbard JP. Application of liquid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry for the determination of polychlorinated biphenyls in blood plasma. *Journal of Chromatography A*. 2 de enero de 2004;1022(1):161-9.
325. Bourdin-Pintueles A, Galineau L, Nadal-Desbarats L, Dupuy C, Bodard S, Busson J, et al. Maternal Rat Metabolomics: Amniotic Fluid and Placental Metabolic Profiling Workflows. *J Proteome Res*. 6 de agosto de 2021;20(8):3853-64.
326. Baesu A, Audet C, Bayen S. Evaluation of different extractions for the metabolite identification of malachite green in brook trout and shrimp. *Food Chemistry*. 1 de febrero de 2022;369:130567.
327. Seidensticker T, Vorholt AJ, Behr A. The mission of addition and fission – catalytic functionalization of oleochemicals. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2016;118(1):3-25.
328. Goh SXL, Lee HK. An alternative perspective of hollow fiber-mediated extraction: Bundled hollow fiber array-liquid-phase microextraction with sonication-assisted desorption and liquid chromatography–tandem mass spectrometry for determination of estrogens in aqueous matrices. *Journal of Chromatography A*. 10 de marzo de 2017;1488:26-36.
329. Villegas-Álvarez MC, Callejón-Leblic B, Rodríguez-Moro G, Gómez-Ariza JL, Arias-Borrego A, García-Barrera T. Optimization of hollow-fiber liquid phase microextraction for polychlorinated biphenyls in human breast milk. *Journal of Chromatography A*. 30 de agosto de 2020;1626:461381.
330. Teramoto M, Matsuyama H, Ohnishi N, Uwagawa S, Nakai K. ACS Publications. American Chemical Society; 2002 [citado 2 de marzo de 2025]. Extraction of ethyl and methyl esters of polyunsaturated fatty acids with aqueous silver nitrate solutions. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ie00026a026>

331. Miller J, Miller JC. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry [Internet]. 123Library; 2018 [citado 2 de marzo de 2025]. Disponible en: <https://123library.org/book/269312/statistics-and-chemometrics-for-analytical-chemistry>
332. Ramírez-Acosta S, Arias-Borrego A, Gómez-Ariza JL, García-Barrera T. Metabolomic study of bioactive compounds in strawberries preserved under controlled atmosphere based on GC-MS and DI-ESI-QqQ-TOF-MS. *Phytochemical Analysis*. 2019;30(2):198-207.
333. Katajamaa M, Orešič M. Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *Journal of Chromatography A*. 2007;1158(1-2):318-28.
334. Das PR, Darwish AG, Ismail A, Haikal AM, Gajjar P, Balasubramani SP, et al. Diversity in blueberry genotypes and developmental stages enables discrepancy in the bioactive compounds, metabolites, and cytotoxicity. *Food Chemistry*. 16 de abril de 2022;374:131632.
335. Ranjbar Banforuzi S, Hadjmohammadi MR. Two-phase hollow fiber-liquid microextraction based on reverse micelle for the determination of quercetin in human plasma and vegetables samples. *Talanta*. 1 de octubre de 2017;173:14-21.
336. Pajewska-Szmyt M, Sinkiewicz-Darol E, Bernatowicz-Łojko U, Kowalkowski T, Gadzała-Kopciuch R, Buszewski B. QuEChERS extraction coupled to GC-MS for a fast determination of polychlorinated biphenyls in breast milk from Polish women. *Environ Sci Pollut Res*. 1 de octubre de 2019;26(30):30988-99.
337. Li G, Zhang L, Zhang Z. Determination of polychlorinated biphenyls in water using dynamic hollow fiber liquid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 12 de septiembre de 2008;1204(1):119-22.
338. Sun R, Xing R, Zhang J, Deng T, Ge Y, Zhang W, et al. Quality changes of HHP orange juice during storage: Metabolomic data integration analyses. *Food Chemistry*. 15 de marzo de 2023;404:134612.
339. Fiehn O, Robertson D, Griffin J, van der Werf M, Nikolau B, Morrison N, et al. The metabolomics standards initiative (MSI). *Metabolomics*. 1 de septiembre de 2007;3(3):175-8.
340. Shamsipur M, Hashemi B. Extraction and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples using stir bar sorptive extraction (SBSE) combined with dispersive liquid–liquid microextraction based on the solidification of floating organic drop (DLLME-SFO) followed by HPLC-UV. *RSC Adv*. 17 de febrero de 2015;5(26):20339-45.
341. Gjelstad A. Three-phase hollow fiber liquid-phase microextraction and parallel artificial liquid membrane extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1 de abril de 2019;113:25-31.
342. Bello-López MÁ, Ramos-Payán M, Ocaña-González JA, Fernández-Torres R, Callejón-Mochón M. Analytical Applications of Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction (HF-LPME): A Review. *Analytical Letters*. 15 de mayo de 2012;45(8):804-30.
343. Lichtenberger LM, Gardner JW, Barreto JC, Morrissv Jr. FH. Evidence for a Role of Volatile Amines in the Development of Neonatal Hypergastrinemia. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 1991;13(4):342-6.

344. Garwolińska D, Namieśnik J, Kot-Wasik A, Hewelt-Belka W. Chemistry of Human Breast Milk—A Comprehensive Review of the Composition and Role of Milk Metabolites in Child Development. *J Agric Food Chem*. 14 de noviembre de 2018;66(45):11881-96.
345. Liu M, Wang C, Ji H, Sun M, Liu T, Wang J, et al. Ethylene biosynthesis and signal transduction during ripening and softening in non-climacteric fruits: an overview. *Front Plant Sci* [Internet]. 26 de abril de 2024 [citado 2 de febrero de 2025];15. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2024.1368692/full>
346. Loreto F, Schnitzler JP. Abiotic stresses and induced BVOCs. *Trends in Plant Science*. 1 de marzo de 2010;15(3):154-66.
347. Schiestl FP, Johnson SD. Pollinator-mediated evolution of floral signals. *Trends in Ecology & Evolution*. 1 de mayo de 2013;28(5):307-15.
348. Higbee J, Solverson P, Zhu M, Carbonero F. The emerging role of dark berry polyphenols in human health and nutrition. *Food Frontiers*. 1 de marzo de 2022;3(1):3-27.
349. SUGAYA K, HASHIMOTO F, ONO M, ITO Y, MASUOKA C, NOHARA T. Anti-Oxidative Constituents from Leonurii Herba (*Leonurus japonicus*). *Food Science and Technology International*, Tokyo. 1998;4(4):278-81.
350. Ashraf M, Harris PJC. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*. 1 de enero de 2004;166(1):3-16.
351. Kavi Kishor PB, Hima Kumari P, Sunita MSL, Sreenivasulu N. Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny. *Front Plant Sci* [Internet]. 20 de julio de 2015 [citado 26 de julio de 2024];6. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2015.00544/full>
352. Etienne A, Génard M, Lobit P, Mbéguié-A-Mbéguié D, Bugaud C. What controls fleshy fruit acidity? A review of malate and citrate accumulation in fruit cells. *Journal of Experimental Botany*. 1 de abril de 2013;64(6):1451-69.
353. Bhagavan N. Medical Biochemistry. En: Chapter 2-Amino Acids. 4th ed. Academic Press; 2002. p. 17-33.
354. Rangani J, Panda A, Parida AK. Metabolomic study reveals key metabolic adjustments in the xerohalophyte *Salvadora persica* L. during adaptation to water deficit and subsequent recovery conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*. 1 de mayo de 2020;150:180-95.
355. Weil JH, Parthier B. Transfer RNA and Aminoacyl-tRNA Synthetases in Plants. En: Boulter D, Parthier B, editores. *Nucleic Acids and Proteins in Plants I: Structure, Biochemistry and Physiology of Proteins* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 1982 [citado 2 de febrero de 2025]. p. 65-112. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-642-68237-7_3