



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020027054-0 A2



(22) Data do Depósito: 30/12/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 12/07/2022

(54) **Título:** DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE ANÁLISE DE IMAGENS PARA QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS POLIFENÓLICOS A PARTIR DE FINGERPRINTS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

(51) **Int. Cl.:** G16C 20/20; G01N 21/01.

(52) **CPC:** G16C 20/20; G01N 21/01; G01N 2021/0181; G01N 2201/1296.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) **Inventor(es):** LUIZ ALBERTO LIRA SOARES; WELLINGTON PINHEIRO DOS SANTOS; RHAYANNE THAÍS DE MORAES RAMOS; MAÍRA DE ARAÚJO DE SANTANA; MAGDA RHAYANNY ASSUNÇÃO FERREIRA; PATRÍCIA ANDRADE SOUSA.

(57) **Resumo:** DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE ANÁLISE DE IMAGENS PARA QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS POLIFENÓLICOS A PARTIR DE FINGERPRINTS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA. A presente invenção trata do processo para obtenção de rede neural artificial (RNA), caracterizado por atributos de imagens, para quantificação de polifenóis em cromatoplacas. Para o desenvolvimento e avaliação da nova abordagem analítica, foram empregados diversos padrões representantes dos polifenóis (ácido gálico, quercetina, rutina, ácido cafeico e catequina). Diferentemente das demais ferramentas analíticas, este processo utiliza a análise de imagem para determinação quantitativa de polifenóis. O produto desta invenção é a aplicação de uma ferramenta de análise de imagem associado a software de desenvolvimento de rede neural artificial a placas cromatográficas para quantificação de compostos bioativos. Com os atributos de imagem obtidos, são estabelecidas correlações desses dados de imagem com a respectiva concentração do analito através do emprego da máquina de alto aprendizado. Este processo apresenta baixo custo e facilidade de manuseio de arquivos digitais para quantificações de compostos polifenólicos.



Desenvolvimento de Sistema de Análise de Imagens para Quantificação de compostos polifenólicos a partir de *Fingerprints* por Cromatografia em Camada Delgada

[1]Esta invenção trata-se de um produto tecnológico para quantificação de compostos bioativos empregando redes neurais artificiais para aplicação na área farmacêutica.

[2]Atualmente, considerando as inúmeras características inovadoras na quantificação de compostos bioativos, a disponibilidade de ferramentas instrumentais apropriadas para identificação/quantificação de fitoconstituintes é um desafio ao desenvolvimento do setor produtivo. O problema é mais crítico para espécies vegetais nativas que, embora apresentem relatos de atividades biológicas, não possuem relatos de marcadores químicos ativos ou clínicos. Portanto, a escassez de ferramentas simples e que permitam o controle contínuo da complexa composição química, ainda impede maiores avanços no esclarecimento da eficácia e segurança de muitas espécies medicinais brasileiras (SOARES; FERREIRA, 2017).

[3]Para identificação de marcadores químicos de espécies vegetais a técnica de *fingerprint* apresenta ampla aplicabilidade. A técnica define padrão único à uma espécie vegetal através da identificação de múltiplos sinais correspondentes aos constituintes químicos, de modo que, em uma amostra, os constituintes majoritários e minoritários são considerados simultaneamente. Deste modo, todos os compostos que eventualmente possam contribuir para a eficácia e/ou segurança do fitoproduto, podem ser acompanhados, auxiliando no esclarecimento dos efeitos terapêuticos, os quais são frequentemente baseados nos efeitos aditivos e/ou sinérgicos dos diversos componentes (WONG et al., 2014). Para estudo mais detalhado acerca da eficácia terapêutica de espécies medicinais é necessário realizar a quantificação dos marcadores químicos presentes em determinada espécie. Para isso, associa-se o emprego de técnicas analíticas que possibilitem a quantificação de componentes bioativos.

[4]Atualmente, as técnicas analíticas disponíveis para análise química de fitocompostos são a Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia Gasosa (CG) (DECONINCK et al., 2013).

[5]A CCD apresenta como característica simplicidade, facilidade de acesso e permite análises de diversas classes de compostos do metabolismo secundário, entretanto está limitada a identificação. A CCDAE apresenta um incremento que inclui o uso de aplicadores e cubas de eluição automatizados agregando reprodutibilidade à técnica; porém a ferramenta apresenta resistência do setor produtivo em razão do alto custo instrumental e operacional (SHEWIYO et al., 2012). A CLAE é o método analítico usualmente utilizado na separação de componentes, sendo considerado padrão ouro na autenticação de produtos farmacêuticos e naturais devido à precisão, sensibilidade e reprodutibilidade. Entretanto, esta técnica apresenta alto custo instrumental, tempo de análise longo e elevado consumo de solventes (SHERMA, 2012).

[6]Com o intuito de solucionar tais problemas, desenvolveu-se esta invenção associando à utilização de rede neural artificial a análise de dados de imagens cromatográficas digitalizadas como alternativa para quantificação de fitocompostos e possivelmente adição ao controle de qualidade de fitoprodutos.

[7]A aplicação de dispositivos de digitalização, a captura e processamento de imagens associados a técnicas cromatográficas e quimiométricas está se tornando um campo atraente e promissor da ciência de separação (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012; ABOUDONEA, 2014; GULZEMERIC et. al., 2017). A exploração de imagens digitalizadas tem resultado em grandes inovações para classificação e quantificação. Com a utilização de imagens digitalizadas e o auxílio de programas computacionais e técnicas de processamento de imagens, é possível realizar avaliações quantitativas através de *fingerprints* cromatográficos. O procedimento é rápido e preciso, além de mais simples e de menor custo operacional (SANTOS, 2009).

[8]A análise multivariada de imagens é essencial para aquisição adequada de dados provenientes de imagens. Nesse sentido, variáveis obtidas como intensidade de cinza de pixels, área de pico e valores médios de cinza são utilizados como dados de entrada para o desenvolvimento de uma rede neural artificial, cuja técnica quimiométrica é empregada para investigar a solução de problemas através da utilização de modelos matemáticos (GULZEMERIC et. al., 2017).

[9]Dentre os diversos tipos de redes neurais existentes, a Máquina de Aprendizado Extremo (Extreme Learning Machine - ELM) se destaca devido a velocidade de treinamento e predição de dados quando comparada a outros métodos não lineares (HUANG et al., 2012). A rede ELM normalmente apresenta camada oculta única baseada em um método analítico para estimar os pesos de saída de rede, em qualquer inicialização aleatória de pesos de entrada (HUANG; WANG; LAN, 2011; CAMBRIA et al., 2013). O processo de aprendizado é realizado em lote, onde todos os dados são apresentados à rede antes do ajuste de rede (HUANG; WANG; LAN, 2011). A principal vantagem de rede ELM consiste em a camada oculta não requerer ajuste. Essa ferramenta tem sido amplamente utilizada em muitos campos, como análise de sinal biomédico e análise de dados de grande porte (SINGH et. al., 2013), devido ao baixo custo operacional.

[10]As máquinas de alto aprendizado são baseadas no sistema de operação de computador chamado de Kernel que além de apresentar rápido treinamento mostra desempenho de classificação e regressão de dados robustos. O núcleo Kernel permite que os processadores e dispositivos possam realizar sua função, comunicando processos e sistemas (HUANG et. al., 2012).

[11]A obtenção de tecnologias especializadas (*hardware* e *software*) que utilizem técnicas da inteligência artificial e quimiométricas, associado ao processamento de imagens, é difundida para analisar imagens representadas em gráficos complexos, avaliar padrões de cor e diferenciação de imagens (CUSTÓDIO, 2009). Em decorrência da crescente sofisticação das técnicas instrumentais de análise química, incentivada pela maior aplicabilidade de microprocessadores e microcomputadores em laboratórios, técnicas de tratamentos de dados mais complexas do aspecto matemático e estatístico tornaram-se necessárias para solução de problemas (DA-COL; DANTAS; POPPI, 2018)

[12]A literatura aponta alguns programas de processamento de imagens empregados para medições quantitativas associados a técnicas quimiométricas: Image J, JusTLC e Sorbfil. Estudos apontam que o *software* Image J apresentou melhor desempenho comparado as demais ferramentas citadas por possuir maior sensibilidade, linearidade e precisão para os problemas propostos

(SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012; ABOU-DONIA et al., 2014).

[13]O estudo utilizando ferramentas de imagem no âmbito farmacêutico apresentou êxito para investigação de radicais livres (OLECH et al., 2012), determinação de catecolaminas (SIMA; CASONI; SÂRBU, 2013), análise de compostos fenólicos em vinho (AGATONOVIC-KUSTRIN et al., 2015) e avaliação da atividade inibitória da acetilcolinesterase de diferentes extratos de *Amaryllidacea* (ABOU-DONIA et al., 2014). Assim, o estudo de imagem associada à técnicas quimiométricas vigora como uma ferramenta simples, acessível e de baixo custo instrumental, funcionando como alternativa para estudos acerca de constituintes químicos de interesse farmacêutico com a finalidade de ser adicionado ao controle de qualidade de fitoprodutos.

[14]O desenvolvimento desta inovação está fundamentado no fluxograma da figura 1, que mostra as etapas para o desenvolvimento de programa computacional para quantificação de fitoconstituintes.

[15]Realizou-se o estudo desta invenção com os padrões polifenólicos: ácido gálico, quercetina, rutina, ácido cafeico e catequina. As soluções são preparadas em metanol e diluídas para obtenção de 5 concentrações diferentes. A faixa de concentração para cada solução corresponde a: ácido gálico (20-30 µg/mL); quercetina (7,5-17,5 µg/mL); rutina (15-27 µg/mL); ácido cafeico (25-35 µg/mL) e catequina (12-20 µg/mL)

[16]As soluções são aplicadas individualmente à cromatoplasca de gel de sílica 60 - F₂₅₄ (Macherey-Nagel®, Alemanha), com o auxílio de aplicador semiautomático Linomat® V (Camag®, Suíça) monitorado pelo software WinCats® (Camag®, Suíça). As seguintes condições são aplicadas: velocidade de dispensação, 100 s/µL; largura da banda, 3 mm; espaço entre as bandas, 7,7 mm; posição, 5 mm antes do início. As cromatoplasca foram desenvolvidas em câmara horizontal (20 x 10 cm) (Camag®, Suíça), previamente saturadas com os sistemas de eluição: ácido gálico - tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (3:3:0,8:0,2); quercetina – tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (6:4:0,3); rutina – acetato de etila:ácido fórmico:água (90:5:5) ; ácido cafeico – tolueno:acetato de etila: ácido fórmico (4,5:3:0,2) e catequina - tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (3:3:0,8:0,2). Ao total, cinquenta curvas de calibração de cada solução padrão são

preparadas com a finalidade de gerar um conjunto de dados de imagem que sejam suficientes para o desenvolvimento de Rede Neural Artificial (RNA).

[17]A aquisição de imagens é realizada por fotodocumentador (MultiDoc-It Imaging System[®], Mod.125, UVP, EUA) acoplado a câmera digital (RebelT3, EOS1100D, Canon[®], Japão). Após digitalização, as imagens são processadas com auxílio do *software ImageJ* (SCHNEIDER et al., 2012). O programa calcula atributos de imagem e valores estatísticos de pixels selecionados pelo usuário e suporta funções padrões de processamento de imagens (alterações no contraste, suavizações e detecções de bordas).

[18]As imagens são tratadas utilizando técnica de contraste preto no branco e os limiares são ajustados até suavização e adequada delimitação das bandas. As medidas selecionadas em pixels para verificar as semelhanças de imagem são: área, valor de cinza médio, desvio padrão, valor de cinza modal, valores mínimos e máximos de cinza, retângulo delimitador, perímetro, elipse, circularidade, diâmetro de Ferret, densidade integrada e mediana.

[19]A opção *display label* é selecionada para detectar medidas correspondentes às bandas em análise. Após obtenção dos atributos de imagem, são gerados formatos de arquivo de atributo-relação (ARFF) para estruturar a base de dados manipulada pela plataforma de classificação.

[20]O desenvolvimento da Rede Neural Artificial baseia-se na utilização do *software* GNU Octave[®] versão 4.0.0 que fornece uma linha de comando conveniente para resolução de problemas lineares e não lineares numéricos (JONH et al., 2015). Emprega-se a Máquina de Aprendizado Extremo em várias configurações para o Kernel da camada intermediária. As variáveis de Kernel sigmoide ($n = 100$), polinomial ($P = 2, 3, 4, 5$), função de base radial RBF gaussiana ($n = 100$), dilatação ($n = 100$) e erosão ($n = 100$) são testadas para modelagem e predição dos resultados.

[21]Dois métodos são utilizados para análise das variáveis: divisão percentual e validação cruzada (10 k-folds). O método de divisão percentual consiste em dividir o conjunto total de dados em dois subconjuntos mutuamente exclusivos, um corresponde ao treinamento para estimação dos parâmetros e outro para teste. O método por validação cruzada consiste em avaliar a capacidade

de generalização de um modelo, a partir de um conjunto de dados. Das 50 curvas de calibração, 75% são utilizadas para treinamento da rede e 25% para teste. São realizadas 30 leituras dos dados de imagem para cada variável de Kernel aplicada. Após a estimação do modelo, os dados do teste e o erro de predição (erro percentual médio-EPM) são calculados e analisados.

[22]O programa *ImageJ* apresentou sensibilidade para gerar dados de imagens característicos para cada padrão de acordo com as concentrações utilizadas. Após tratamento das imagens foi verificada a presença de bandas cromatográficas definidas, delimitadas e sem a presença de ruído, o que contribui para predição de resultados.

[23]Os resultados matemáticos, gerados após aplicação dos modelos de Kernel para os testes validação cruzada e divisão percentual, indicaram menores erros de previsão, indicando que os resultados experimentais se aproximam ao máximo do real.

[24]Para as cromatoplasmas registradas em 254 nm, foi verificado menores erros para os modelos de Kernel linear, dilatação e erosão quando ambos os testes foram aplicados para os padrões quercetina, rutina e catequina. Para o padrão de ácido cafeico no teste de validação cruzada, os modelos de dilatação e erosão apresentaram resultados de modelagem de dados satisfatórios. E para o padrão ácido gálico foi verificado os menores EPM em ambos os testes aplicados para os modelos sigmoide, linear e polinomial 2.

[25]Para as cromatoplasmas registradas em 366 nm, verificou-se que para todos os padrões analisados, os modelos dilatação e erosão apresentaram os menores erros em ambos os testes. O modelo de Kernel linear apresentou desempenho de correlação de atributos de imagem e concentração para quercetina, rutina, ácido cafeico e catequina.

REFERÊNCIAS

[26]ABOU-DONIA, A. H.; DARWISH, F. A.; TOAIMA, S. M.; SHAWKY, E.; TAKLA, S. S. A new approach to develop a standardized method for assessment of acetylcholinesterase inhibitory activity of different extracts using HPTLC and image analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 955, p. 50-57, 2014.

- [27]CAMBRIA, E.; HUANG, G. B.; KASUN, L.L.C.; ZHOU, H.; C.; VONG, C. M.; YING, J.; et. al., J. Extreme learning machines, **IEEE Intelligent Systems**, v. 28, n. 6, p. 30–59, 2013.
- CUSTÓDIO, A. T. N. **Análise de imagens de imunohistoquímica da placenta e do pulmão usando segmentação e descritores de forma**. Trabalho de Conclusão de Curso Engenharia da Computação. Escola Politécnica de Pernambuco. UPE. Orientador: Prof. Wellington Pinheiro dos Santos. 2009.
- [28]DA-COL, J.A.; DANTAS, W.F.C.; POPP, R.J. Experimento didático de quimiometria para o mapeamento de *pellets* farmacêuticos utilizando espectroscopia de imagem na região do infravermelho próximo e resolução multivariada de curvas com mínimos quadrados alternantes: um tutorial, parte IV. **Química Nova**, v. 41, n. 3, p. 345-354, 2018.
- [29]DECONINCK, E. et al. Chromatography in the detection and characterization of illegal pharmaceutical preparations. **Journal Chromatography Science**, v. 51, p. 791–806, 2013.
- EATON, J. W.; BATEMAN, D.; HAUBERG, S.; WEHBRING, R. (2015). GNU Octave version 4.0.0 manual: a high-level interactive language for numerical computations. URL <http://www.gnu.org/software/octave/doc/interpreter/>.
- [30]GULZEMEREC, E.; RISTIVOJEVIC, P.; VOVK, I.; MILOJKOVIC-OPSENICA, D.; YESILADA, E. Quality assessment of marketed chamomile tea products by a validated HPTLC method combined with multivariate analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 132, p. 35-45, 2017.
- [31]HUANG, G. B.; WANG, D. H.; LAN, Y. Extreme learning machines: a survey, **International Journal of Machine Learning and Cybernetics**, v. 2, n. 2, p. 107–122, 2011.
- [32]HUANG, G. B.; ZHOU, H.; DING, X.; ZHANG, R. Extreme learning machine for regression and multiclass classification. **IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, Part B: Cybernetics**, v. 42, n. 2, p. 513–529, 2012.
- [33]AGATONOVIC-KUSTRIN, S.; HETTIARACHCHI, C.G. MORTON, D. W.; RAZIC, S. Analysis of phenolics in wine by high performance thin-layer chromatography with gradient elution and high resolution plate imaging. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 102, P.93-99, 2015.

- [34]LOSADA-ECHEBERRIA, M.; HERRANZ-LÓPEZ, M.; MICOL, V.; BARRAJÓN-CATALÁN, E. Polyphenols as promising drugs against main breast cancer signatures. **Antioxidants**, v. 6, n. 4, p. 1-24, 2017.
- [35]OLECH, M.; KOMSTA, L.; NOWAK, R.; GIESLA, L.; MONICA, W.H. Investigation of antiradical activity of plant material by thin-layer chromatography with image processing. **Food Chemistry**, v. 132, p. 549-553, 2012.
- [36]SANTOS, W. P. **Análise Digital de Imagens em Patologia: Ferramentas de Morfologia Matemática e Lógica Fuzzy**. New York: Create Space, 2009.
- [37]SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to *ImageJ*: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n.7, p. 671-675, 2012.
- [38]SHERMA, J. Biennial review of planar chromatograph: 2009-2011. **Journal AOAC International**, v. 95, n. 4, p. 992-1009, 2012.
- [39]SHEWIYO, D. H. HPTLC methods to assay active ingredients in pharmaceutical formulations: A review of the method development and validation steps. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 66, p. 11–23, 2012.
- [40]SIMA, I. A.; CASONI, D.; SÂRBU, C. High sensitive and selective HPTLC method assisted by digital image processing for simultaneous determination of catecholamines and related drugs. **Talanta**, v. 114, p. 117-123, 2013.
- [41]SINGH, I.; JUNEJA, P.; KAUR, B.; KUMAR, P. Pharmaceutical Applications of Chemometric Techniques. **ISRN Analytical Chemistry**, v. 2013, p. 1-13, 2013.
- SOARES, L. A. L.; FERREIRA, M. R. A. **Standardization and Quality Control of Herbal Medicines**. In.: FREITAS, L. A. P. et al. Recent Development in Phytomedicine Technology. New York: Nova Science Publishers Inc., Chap. 9, 2017.
- [42]WONG, K. H. et al. Differentiating *Puerariae lobatae* Radix and *Puerariae thomsonii* Radix using HPTLC coupled with multivariate classification analyses. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 95, p. 11–19, 2014.

REIVINDICAÇÕES

1. **“DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE ANÁLISE DE IMAGENS PARA QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS POLIFENÓLICOS A PARTIR DE *FINGERPRINTS* POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA”**, caracterizado por um sistema que recebe um conjunto de imagens com as concentrações associadas e representa estas imagens por meio de atributos de forma e de textura.
2. **DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE ANÁLISE DE IMAGENS PARA QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS POLIFENÓLICOS A PARTIR DE *FINGERPRINTS* POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA”** de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por estes vetores de atributos que representam as imagens serem utilizados para treinar uma máquina de aprendizado, preferencialmente uma rede neural artificial.
3. **“DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE ANÁLISE DE IMAGENS PARA QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS POLIFENÓLICOS A PARTIR DE *FINGERPRINTS* POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA”** de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por esta máquina de aprendizado associar imagens com seus atributos de forma e textura, às concentrações.
4. **“DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE ANÁLISE DE IMAGENS PARA QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS POLIFENÓLICOS A PARTIR DE *FINGERPRINTS* POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA”** de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado pela obtenção de rede neural artificial utilizar atributos de imagens e concentrações de padrões polifenólicos.
5. **“DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE ANÁLISE DE IMAGENS PARA QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS POLIFENÓLICOS A PARTIR DE *FINGERPRINTS* POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA”** de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado pela obtenção de rede neural artificial por meio de atributos de imagens e concentrações de espécies vegetais com potencial farmacológico.

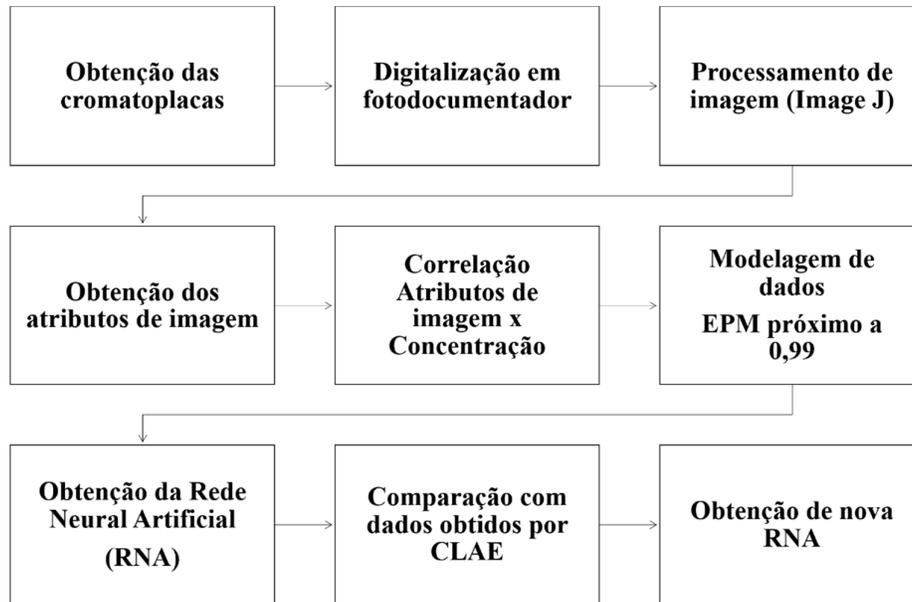


Figura 1

Limiar de imagem		Ácido gálico	Quercetina	Rutina	Ácido cafeico	Catequina
254 nm	Thresholding method	Intermodes	Intermodes	Isodata	Huang	Default
	Thresholding color	B&W	B&W	B&W	B&W	B&W
	Color back	LAB	LAB	LAB	HSB	B&W
366 nm	Thresholding method	Default	Default	Huang	Default	Default
	Thresholding color	B&W	B&W	B&W	B&W	B&W
	Color back	RGB	HSB	HSB	LAB	B&W

Figura 2

RESUMO**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE ANÁLISE DE IMAGENS PARA QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS POLIFENÓLICOS A PARTIR DE *FINGERPRINTS* POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA**

A presente invenção trata do processo para obtenção de rede neural artificial (RNA), caracterizado por atributos de imagens, para quantificação de polifenóis em cromatoplasmas. Para o desenvolvimento e avaliação da nova abordagem analítica, foram empregados diversos padrões representativos dos polifenóis (ácido gálico, quercetina, rutina, ácido cafeico e catequina). Diferentemente das demais ferramentas analíticas, este processo utiliza a análise de imagem para determinação quantitativa de polifenóis. O produto desta invenção é a aplicação de uma ferramenta de análise de imagem associado a *software* de desenvolvimento de rede neural artificial a placas cromatográficas para quantificação de compostos bioativos. Com os atributos de imagem obtidos, são estabelecidas correlações desses dados de imagem com a respectiva concentração do analito através do emprego da máquina de alto aprendizado. Este processo apresenta baixo custo e facilidade de manuseio de arquivos digitais para quantificações de compostos polifenólicos.