

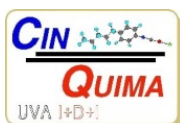


UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

TESIS DOCTORAL

**DETERMINACIÓN DE CIS-/TRANS-ESTILBENOS
(RESVERATROL Y PICEIDO), TRIPTÓFANO Y
METABOLITOS EN PRODUCTOS APÍCOLAS POR
CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS**

María Ernestina Soto Sarria



Valladolid, España, 2012





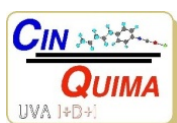
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

TESIS DOCTORAL

**DETERMINACIÓN DE CIS-/TRANS-ESTILBENOS
(RESVERATROL Y PICEIDO), TRIPTÓFANO Y
METABOLITOS EN PRODUCTOS APÍCOLAS POR
CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS**

Presentada por María Ernestina Soto Sarria para optar al
grado de doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por los Dres. María Jesús del Nozal Nalda y José Luis Bernal Yagüe



A mi familia

Para la realización de la investigación recogida en esta memoria se ha contado con la ayuda económica aportada por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio ambiente- INIA en el proyecto RTA-2009-00105-CO2-O2 a quienes expresamos nuestro agradecimiento.

El proyecto comprende la parte analítica pero también los ensayos *in vitro* y en campo los cuales han sido realizados en el Centro Apícola Regional (CAR)(Marchamalo, Guadalajara) y sus colmenares experimentales, sin su ayuda y trabajo no hubiera sido posible llevar a cabo la investigación aquí presentada, por ello queremos hacer extensivo nuestro agradecimiento a todo el personal del CAR involucrado en este estudio.

Así mismo quiero agradecer al Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación–Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (MAEC–AECID) por la beca concedida, sin la cual no hubiese sido posible la realización de mis estudios de doctorado en la Universidad de Valladolid.

AGRADECIMIENTO

Primero y antes que nada, dar gracias a ese ser supremo que llamo Dios, por estar conmigo a cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el período de investigación.

Durante estos años han sido muchas las personas que directa o indirectamente han contribuido a la realización de esta ardua empresa, a todas ellas quiero expresar mi gratitud. Aunque el hecho de presentar una lista de nombres siempre supone el riesgo de olvidar a alguna de ellas, por lo que desde ahora pido disculpas.

Mi agradecimiento a la Dra. María Dolores Vázquez Barbado, mi tutora porque ha estado disponible en todo momento, por procurar mi bienestar profesional y personal, por presentarme a las personas que serían mis directores de tesis, gracias Lola.

Mi más sincero agradecimiento a los Dres. María Jesús del Nozal Nalda y José Luis Bernal Yagüe, mis directores de tesis, por su dedicación, entrega y consejos, por tratar de comprender y tener paciencia con mi castellano antiguo, entre muchas cosas. Gracias a ellos he sido parte de un grupo de investigación con personas que han cooperado desinteresadamente, muchas de las cuales han sido un soporte en momentos de angustia y desesperación.

A Laura por sus consejos y compañía en los momentos bajos de mi estancia en España, a Maite por su importante aporte y participación activa en el desarrollo de este trabajo, a Carlos quien siempre escuchó mis dudas y por sus innumerables consejos y a Pepe que se unió al final pero también ha sido parte de esta empresa.

Agradezco a mis compañeras de laboratorio, las que siempre se han interesado en el avance del trabajo, por arrimar el hombro siempre que fue necesario, por los momentos alegres y tristes compartidos. En este punto debo agradecer especialmente a Esther quien ha sido la persona que ha compartido más tiempo conmigo, porque en su compañía la tristeza se transforma en alegría y la soledad no existe. A Ana pues aunque es menor el tiempo que nos conocemos ha demostrado ser una gran persona y sobre todo una gran amiga, con la que sé que podré contar siempre. Para el resto de compañeras: Pili, Alma y Karen....mil gracias!

A aquellas personas que han compartido conmigo los “ires y venires” en el plano personal durante esta larga estancia en la ciudad de Valladolid, con las que compartí muchas actividades extras, mi gratitud.

¡¡¡¡A todos Uds. los espero en León Santiago de los Caballeros!!!!

Agradecer hoy y siempre a mi familia porque a pesar de la distancia me brindan todo el apoyo y ánimo que me da la fortaleza necesaria para seguir adelante. A mis padres Fulvio y Socorro, mis otras madres, mi abuelita María quien no pudo ver terminada la realización de este sueño y mi tía Rosa; mis hermanos Fulvio y Norman por su ejemplo de lucha, honestidad y generosidad.

A mis amistades en Nicaragua, que siempre han confiado en mí y de quienes siempre he recibido palabras de aliento, por estar siempre pendiente de mis abejitas.

A las autoridades de la UNAN-León por permitirme hacer una pausa en el trabajo y no dejar pasar la oportunidad de crecer en la investigación, especialmente al Dr. Sergio López, por creer en mí y apoyarme siempre.

Lo que sabemos es una gota de
agua; lo que ignoramos es el
océano.

Sir Isaac Newton

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA.....	5
III. OBJETIVOS.....	23
IV. MATERIALES Y REACTIVOS.....	27
IV.1. Instrumentación	29
IV.2. Equipo adicional y consumibles.....	31
IV.3. Reactivos y disolventes	32
IV.4. Columnas analíticas	33
V. DETERMINACIÓN DE RESVERATROL Y PICEIDO.....	35
V.1. Resveratrol y Piceido.....	37
V.2. Antecedentes bibliográficos para el análisis de resveratrol.....	41
V.3. Determinación de resveratrol y piceido en miel.....	44
V.3.1. Disoluciones	44
V.3.2. Obtención de los <i>cis</i> -isómeros.....	44
V.3.3. Condiciones cromatográficas	47
V.3.4. Tratamiento de la muestra.....	60
V.3.5. Validación de la Metodología Analítica.....	69
V.3.6. Ensayos de Eficacia	79
V.3.7. Aplicación a muestras provenientes de ensayos de campo.....	81
V.4. Determinación de resveratrol y piceido en alimento	89
V.4.1. Aplicación a muestras de alimento administrado a las colmenas .	90
V.5. Determinación de resveratrol y piceido en polen.....	92
V.5.1. Condiciones cromatográficas.....	92
V.5.2. Tratamiento de muestra.....	98
V.5.3. Validación del método	105
V.5.4. Aplicación del método propuesto a muestras de polen comercial	110
V.5.5. Aplicación del método propuesto a muestras de polen de colmenas tratadas con resveratrol	110
VI. DETERMINACIÓN DE TRIPTÓFANO Y METABOLITOS EN MIEL.....	123

VI.1. Mielles monoflorales	125
VI.2. Antecedentes bibliográficos para el análisis de triptófano y sus metabolitos	126
VI.3. Desarrollo de la Metodología Analítica	128
VI.3.1. Disoluciones	128
VI.3.2. Condiciones cromatográficas	129
VI.3.3. Tratamiento de la muestra	140
VI.3.4. Validación del método analítico	144
VI.4. Aplicación en mieles monoflorales	161
VII. CONCLUSIONES	167
VIII. ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	173

I. INTRODUCCIÓN

Es de sobra conocido el papel fundamental que las abejas ejercen no solamente en lo que atañe a la producción de la colmena sino también como polinizadores tanto de plantas cultivadas como de especies silvestres, por lo que todo aquello que las afecte negativamente tiene una tremenda repercusión sobre la Agricultura y Medio Ambiente. En la última década se ha observado una drástica reducción en el número de individuos y la pérdida definitiva de numerosas colmenas, situación que en el último año ha ocasionado en España una disminución superior al 50%.

El fenómeno se ha tratado de examinar y abordar desde numerosos aspectos asumiéndose en la actualidad que es de carácter multicausal confluyendo diversos factores, dentro de los cuales la presencia del microsporidio *Nosema ceranae* parece ser preponderante. Lo más significativo ha sido la detección de *Nosema ceranae* como denominador común en la mayoría de situaciones de despoblación, que, en gran medida, han sido mitigadas o resueltas con tratamientos antibióticos similares a los empleados contra *Nosema apis*, entre los que destaca el empleo de la fumagilina. Ahora bien tras unos años de autorización en uso y probada su eficacia las autoridades sanitarias han decidido suspender su uso en tanto en cuanto no se establezca correctamente el límite máximo de residuos, cuestión nada sencilla por las implicaciones económicas que supone.

Ante esta situación es obvio que la investigación se haya dirigido a la búsqueda de compuestos alternativos bien sintéticos o naturales, la tendencia se orienta a estos últimos dado el carácter natural de la miel como principal producto de la colmena.

Las fitoalexinas y en particular el resveratrol se han empleado desde hace siglos en la medicina tradicional, de hecho el compuesto se ha mostrado tan potente como la anfotericina B frente a *Sacharomices cerevisiae* y que puede inhibir el desarrollo de *Encephalitozoon cunicoli*, al menos en experimentos *in vitro*.

Alguna experiencia reciente sugiere que su actividad antifúngica podría resultar útil en el tratamiento de nosemosis. Por ello aquí se presenta un estudio dirigido a conocer su eficacia real, para lo cual es necesario un equipo multidisciplinar, correspondiendo a nuestro grupo el desarrollo de metodología analítica para evaluar el contenido tanto en alimentos para abejas como en los principales productos apícolas.

Teniendo en cuenta que su aplicación puede conducir a la aparición de residuos en la miel, lo cual obviamente resultaría beneficioso para el consumidor se ha aprovechado el estudio para desarrollar metodología para evaluar los principales metabolitos del triptófano, cuya presencia en la miel, en algunos casos, pueden servir como marcadores de origen floral y además están implicados en el desarrollo y tratamiento de algunas enfermedades de gran repercusión actual.

Así pues la investigación que se recoge en esta memoria comprende dos líneas de actuación: el estudio de la utilidad de resveratrol y productos relacionados para combatir el despoblamiento de las colmenas y la del triptófano y metabolitos, con posibles propiedades terapéuticas y propuestos como potenciales marcadores de origen botánico. Las propiedades físico-químicas de ambos grupos de compuestos implican el uso preferente de la cromatografía líquida con diferentes modos de detección.

II. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

En el último decenio se ha producido una elevada mortandad de abejas en diferentes zonas apícolas tanto en España, como en países vecinos con características productivas similares ^[1-7] así como en otros lugares del mundo ^[8-10]. En todos los casos se denuncian elevadas mortandades de colonias de abejas, que se producen sobre todo durante el otoño y el invierno, aunque actualmente ya se detectan a lo largo de todo el año.

Los factores que influyen en el estado sanitario de las abejas son numerosos y presentan además un alto grado de interacciones entre ellos, lo que dificulta notablemente su identificación y, por lo tanto, su influencia en el manejo, control y prevención ^[11,12]. Uno de estos factores es la falta de control de *Varroa destructor*, que en algunos casos se encuentra de forma asociada a otras enfermedades ^[13,14] bien por la incorrecta aplicación de los tratamientos o el desarrollo de poblaciones de ácaros resistentes a los fármacos ^[15-17] o la utilización de acaricidas no registrados, muchas de las veces ineficaces o inadecuadamente administrados ^[18] y cuya toxicidad para las abejas no ha sido comprobada ^[19]. Por otra parte, cuando la parasitación por *Varroa* supera un determinado umbral crítico epidémico ^[20] la colonia de abejas presenta una mayor susceptibilidad frente a diferentes agentes infecciosos (virus fundamentalmente), parasitarios o sustancias tóxicas.

En otras ocasiones, las causas de mortandad de las colonias ^[21,22], pueden ser otras patologías que además pueden estar asociadas o no a problemas zootécnicos derivados de un inadecuado manejo de las mismas. Situaciones como el aumento forzado de la demanda de la productividad (colonias en transhumancia que producen en alto rendimiento todo el año) o la escasez de reservas que deja el apicultor en la colonia para pasar el invierno, entre otras, pueden favorecer el desarrollo de enfermedades ^[1].

Los análisis realizados en el laboratorio de Patología del CAR (Marchamalo, Guadalajara) sobre muestras de abejas recibidas en los últimos cinco años, indican

un notable incremento en los casos diagnosticados de nosemosis, asociados a una sintomatología clínica que difiere de la esperada, y que ha venido denominándose Síndrome de Despoblamiento de las colmenas o CCD ^[23-26], lo que unido a la detección de *Nosema ceranae* por primera vez en Europa ^[2] y posteriormente a nivel mundial ^[27-29] hacen de este microsporidio uno de los mayores patógenos actuales para las abejas.

Actualmente se considera que aproximadamente la mitad de los casi 150 géneros conocidos de microsporidios tienen insectos como hospedadores principales ^[30]. La mayoría de los microsporidios de insectos inducen infecciones subletales en sus hospedadores que se traducen en una reducción de la fertilidad, acortamiento de la longevidad y pérdida de vigor ^[31], siendo las infecciones agudas mucho más infrecuentes. Por otra parte, se ha visto que las infecciones crónicas inducidas por las microsporidiosis constituyen un problema importante en todos los insectos de interés económico, incluyendo las abejas ^[30].

En el caso de la abeja productora de miel, *Apis mellifera*, desde los primeros estudios en este grupo de parásitos, se identificó a *Nosema apis* (Zander) en 1909 ^[32] como agente productor de una patología denominada nosemosis que afecta frecuentemente a las colmenas de todo el mundo ^[33], encontrándose esta patología claramente reconocida y presente en España ^[2].

Habitualmente la nosemosis producida por *Nosema apis* se reconoce en su forma aguda y asociada a uno de sus síntomas característicos, la diarrea. Sin embargo, en los últimos años se ha observado un cambio en las manifestaciones clínicas de las colmenas afectadas por *Nosema sp.*, tanto en España como en otros países Europeos ^[2,23] caracterizándose el cuadro clínico fundamentalmente por el debilitamiento progresivo de las colmenas (despoblamiento) y ausencia de síntomas diarreicos (nosemosis seca) ^[34], llegando a morir las colmenas en los casos más severos. Esta creciente incidencia de la forma “seca” de la nosemosis se ha

desarrollado en paralelo a un aumento en la incidencia del denominado “síndrome de despoblamiento de las colmenas” que se viene detectando en España ^[2,3,24,25] y en otros países Europeos, en los que nuestros colaboradores del CAR han detectado la presencia de *Nosema ceranae* en colmenares afectados por despoblamiento y muerte de colmenas.

Todo ello ha derivado en la reconsideración de esta parasitosis como una amenaza real para las colmenas en España y Europa (en USA ya se admite su presencia e influencia) asociada al reciente descubrimiento de esta segunda especie de microsporidio, *Nosema ceranae* ^[2,35], que se confirma responsable de la forma de nosemosis asociada a la manifestación clínica de despoblamiento ^[2,3,36,37].

Uno de los principales problemas que ha planteado este hallazgo, es el hecho de que la fumagilina, el tratamiento disponible y de elección para la nosemosis causada por *Nosema apis* ^[38-40], si bien resulta efectiva en su tratamiento ^[25,41] actualmente no se comercializa en la Unión Europea, por lo que resulta fundamental desarrollar nuevas moléculas que suplan con éxito la ausencia de la fumagilina. Por lo tanto, la búsqueda de compuestos efectivos frente a *Nosema ceranae*, debe ser un objetivo prioritario teniendo en cuenta la situación actual.

Por otra parte y dado que muchos antifúngicos son de uso clínico limitado ya que frecuentemente conducen a varias toxicidades en pacientes, tales como efecto hemolítico frente a eritrocitos humanos, aparece otra opción orientada hacia el empleo de algunos productos naturales, que parecen no tener ese efecto drástico, uno de los actualmente considerados es el resveratrol que, entre otras propiedades, muestra un atractivo potencial como antifúngico en humanos, si bien todavía no se conoce el mecanismo real de su acción ^[42].

El resveratrol se ha detectado como el principal componente bioactivo en extractos de plantas usadas desde siglos pasados en la medicina tradicional para enfermedades humanas, de hecho se ha mostrado tan potente como la anfotericina B frente a *Sacharomices cerevisiae* y estudios recientes han mostrado que puede inhibir el desarrollo del microsporidio *Encephalitozoon cunicoli* en experimentos *in vitro*, y ha sido probada con éxito frente a otros microsporidios de humanos y mamíferos ^[43-44] y más recientemente se ha sugerido, a través de unos ensayos también *in vitro*, que puede ser una alternativa para combatir la nosemosis en abejas, sugiriéndose que podría darse a través del alimento ^[45,46], creemos pues que es una opción que debe considerarse.

Resveratrol es una fitoalexina producida por las angiospermas en respuesta a las infecciones microbianas, daños, radiación UV, frío, calor, ataque de microorganismos, estrés abiótico, etc., la forma *trans* aparece en la piel de uvas, cacahuetes y pistachos ^[47-49]. El isómero *cis* no se ha encontrado en *Vitis vinífera* aunque ambos suelen aparecer en los vinos. El resveratrol es un precursor de las viniferinas que son potentes agentes antifúngicos ^[49, 50].

Ambos isómeros aparecen de forma natural como dos isómeros geométricos, generalmente el *trans* es más predominante ^[51] aunque también aparecen sus glicóidos, piceidos, que también poseen propiedades similares. *In vitro* la forma *trans* es más termoestable y fotoestable, la *cis* más inestable pasando rápidamente a la forma *trans* ^[52] aunque el *trans* también puede sufrir fotoisomerización, generando algo de *cis* ^[53], de modo que en experiencias prolongadas e intensas puede incrementar la cantidad de *cis* ^[54]. También se ha comprobado que esa acción de la radiación pueda implicar la fotooxidación de los compuestos originando otras sustancias muy diversas, por lo que el paso a *cis* debe hacerse en condiciones muy controladas ^[55].

Estas consideraciones deben tenerse en cuenta a la hora de planificar los experimentos conducentes a mostrar la eficacia real en campo y conseguir una dosis adecuada, para lo cual es imprescindible disponer de metodología analítica que controle tanto las cantidades añadidas como las residuales después del tratamiento. En el apartado dedicado a estos compuestos se incluyen unos datos acerca de la metodología a aplicar en dichos ensayos.

Con respecto a la otra investigación desarrollada ha surgido paralelamente al comprobar que algunas muestras tenían resveratrol nativo e intentar ver si podía usarse como marcador de algún origen floral, al no conseguirse se dirigió la atención a algunos metabolitos del triptófano que están siendo considerados para este fin, además de por sus implicaciones en salud humana.

Las mieles monoflorales, es decir de un origen botánico específico, son preferidas con frecuencia por los consumidores, y, en consecuencia tienen precios superiores que las mieles multiflorales y los mielatos. Por estas razones, existe un creciente interés en el desarrollo de métodos para su caracterización ^[56] y la búsqueda de compuestos que puedan ser utilizados como marcadores del origen floral. En la actualidad, las técnicas avanzadas instrumentales y quimiométricas están siendo utilizadas para este propósito ^[57], aplicándose también para analizar compuestos específicos encontrados en ciertos tipos de mieles de origen floral o arbóreo.

Con el fin de explicar algunas de sus propiedades terapéuticas, se han publicado algunos trabajos sobre la miel de castaño donde se han identificado algunos alcaloides quinolínicos, principalmente ácido kinurénico (KYNA) ^[58-65], en los cuales se ha propuesto como un marcador del origen botánico de este tipo de miel ^[62]. Se ha indicado en estas publicaciones, que sí el KYNA se encuentra en mieles de otro origen botánico debe ser debido a una contaminación ^[58], porque las mieles de flores no presentan niveles detectables de alcaloides de quinolina ^[58-62]. Sin embargo,

otras investigaciones han evidenciado la presencia del KYNA en mieles de otros orígenes botánicos como la miel de tilo, de trigo sarraceno y multifloral^[66].

El triptófano (TRP), que es uno de los diez aminoácidos esenciales para muchos organismos, juega un papel importante en la síntesis de proteínas, el KYNA es un metabolito del TRP formado a través de la vía de la kinurenina (KYN) que se considera ubicua en los sistemas vivos, por lo que su determinación es de gran interés por sus funciones biológicas y sus propiedades bioquímicas^[67,68]. La mayoría de sus acciones parecen ser causadas por un antagonismo no competitivo que ejerce el ácido en un subtipo de los receptores de glutamato^[69,70], bloqueando la neurotoxicidad inducida por otros metabolitos del TRP tales como el ácido quinolínico^[71-73].

En la vía del metabolismo del TRP se produce la N-formilkinurenina por indolamina-2,3-dioxigenasa que se transforma en KYN por formamidasa como puede verse en la Figura 1. Posteriormente, la KYN es transformada enzimáticamente a KYNA por medio de la kinurenina aminotransferasa, aunque el KYNA también puede formarse, a partir de TRP a través de la triptófano-aminotransferasa mediante la ruta del indol-3-piruvato. Aunque también la KYN puede ser transformada en ácido xanturénico (XA) a través de la kinurenina-3-hidroxilasa y aminotransferasa. De este modo, de esta ruta metabólica del TRP se pueden producir la KYN, el KYNA y el XA^[74,75], así como otros compuestos relacionados. Paradójicamente, los metabolitos de la vía de la kinurenina pueden presentar tanto propiedades neuroprotectoras como neurotóxicas^[72].

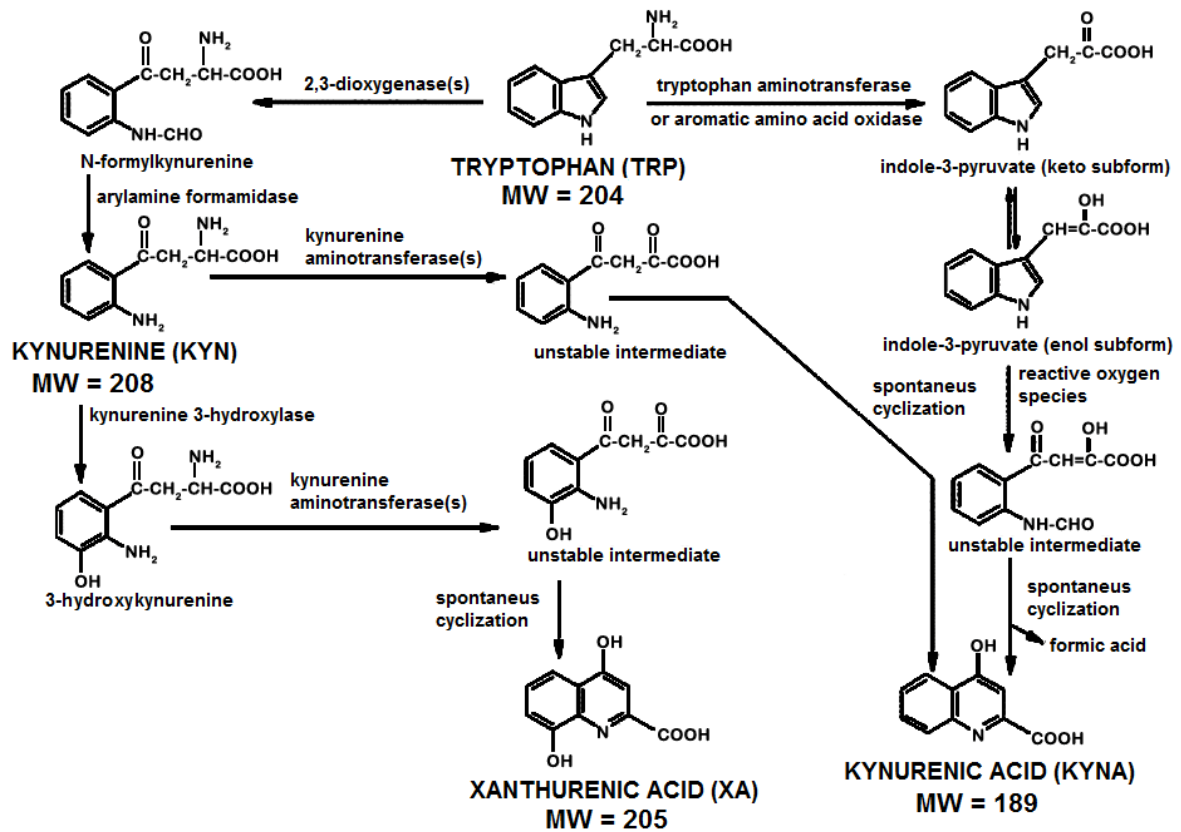


Figura 1. Metabolismo simplificado del triptófano

Debe señalarse que la KYN parece estar implicada en la patogénesis de varios trastornos neurológicos, particularmente con enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, el Alzheimer, la esquizofrenia y la epilepsia ^[74-77].# Mientras tanto, la presencia del XA se ha asociado con la inflamación en ratones debido a la deficiencia en interleukina-10 (IL-10), y podría ser útil como biomarcador de la inflamación del colon ^[78]. Algunos estudios han propuesto que el XA se une a la insulina, reduciendo su potencia biológica y por lo tanto altera el metabolismo de la glucosa ^[79]. Por todo lo anterior hemos considerado de interés desarrollar un método que permita determinar TRP, KYN y XA, junto con el KYNA y aplicarlo a su determinación en mieles monoflorales.

En resumen:

Si el empleo del resveratrol como suplemento en la alimentación de las abejas conduce a mejorar su estado de forma y que se reduzca el despoblamiento sería un hito importante para la apicultura actual.

Es preciso conocer la cantidad presente no solo de triptófano sino de sus principales metabolitos en mieles monoflorales en aras de poder establecer unas pautas en cuanto consumo saludable y en su caso potenciar el valor económico del producto, previniendo al mismo tiempo posibles adulteraciones.

Bibliografía

1. J.P. Faucon, L. Mathieu, A.C. Ribière, P. Drajnudel, S. Zeggane, C. Aurieres, M. Aubert, Honey bee winter mortality in France in 1999 and 2000. *Bee World* 83 (2002) 14–23
2. M. Higes, R. Martín-Hernández, A. Meana, *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J. Invertebr. Pathol.* 92 (2006) 93–95
3. M. Higes, R. Martín-Hernández, A. Meana, *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie* 41 (2010) 375–392
4. M.P. Chauzaut, M. Higes, R. Martín-Hernández, A. Meana, N., Cougoule, J.P. Faucon, Presence of *Nosema ceranae* in French honey bee colonies. *J. Apic. Res.* 46 (2007) 127–128
5. E. Marinelli, P. Pulcini, C. Morgia, F. De Pace, F. Allegrini, L. Persano Oddo, Oxalic acid by Varroa[®] to *varroa* control in central Italy. APIMONDIA Symposium 2004 “Prevention of Residues in Honey 2” Celle 27-28 april, 2004. *Apiacta* 39 (2004) 39-43
6. E. Stokstad, Entomology. The case of the empty hives. *Science* 316 (2007) 970–972
7. S. Plischuk, R. Martín-Hernández, L. Prieto, M. Lucía, C. Botías, A. Meana, et al. South American native bumblebees (Hymenoptera: Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*) *Environ Microbiol.* 1 (2009) 131–135

8. D. vanEngelsdorp, R. Underwood, D. Caron, J. Hayes, An estimate of managed colony losses in the winter of 2006–2007: A report commissioned by the Apiary Inspectors of America. *Am. Bee J.* 147 (2007) 599–603
9. D. vanEngelsdorp, J. Hayes, R.M. Underwood, J. Pettis, A survey of honey bee colony losses in the U.S., fall 2007 to spring 2008. *PLoS ONE* 3 1–6 e4071 (2008)
10. J.C. Biesmeijer, S.P.M. Roberts, M. Reemer, R. Ohlemuller, M. Edwards, et al., Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* 313 (2006) 351–354
11. C. Alaux, J.T. Brunet, C. Dussaubat, F. Mondet, S. Tchamitchan, et al., Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honey bees. *Env. Microbiol.* 12 (2009) 774–782
12. C.H. Krupke, G.J. Hunt, B.D. Eitzer, G. Andino, K. Given, Multiple Routes of Pesticide Exposure for Honey Bees Living Near Agricultural Fields. *PLoS ONE* 7(1): e29268. (2012) doi:10.1371/journal.pone.0029268
13. B.V. Ball, M. F. Allen, The prevalence of pathogens in honeybee (*Apis mellifera*) Colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Ann. Appl. Biol.* 113 (1988) 237-244
14. H. Shimanuki, N.W. Calderone, D.A. Knox, Parasitic mite syndrome: the symptoms. *Am. Bee J.* (1994) 134, 827–828
15. G.W. Elzen, S.N. Maldonado, M.G. Rojas, Lethal and Sub-Lethal Effects of Selected Insecticides and an IGR on the Boll Weevil Ectoparasitoid *Catalaccus Grandis*. En *Proceedings Beltwide Cotton Conferences, USA, Volume 2*. Dugger, P. & Richter, D. (Ed). 1999
16. J.P. Faucon, P. Drajnudel, C. Fleche, Mise en évidence d'une diminution de l'efficacité de l'Apistans utilisé contre la varroase de l'abeille (*Apis mellifera*). *Apidologie* (1995) 26: 291-296
17. N. Milani, The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides. *Apidologie* 30 (1999) 229-234
18. L. Mathieu, J.P. Faucon, Changes in the response time for *Varroa jacobsoni* exposed to amitraz. *J. Apic. Res.* 39 (2000) 155-158
19. K. M'Diaye, M. Bounias. 1991. Sublethal effects of the formarnidine amitraz on honey bees gut lipids, following *in vivo* Injections. *Biomed. Environ. Sci.* 4 (1991) 376-383

20. D.J.T. Sumpter, S.J. Martin, The dynamics of virus epidemics in *Varroa*-infested honey bee colonies. *J. Anim. Ecol.* 73 (2004) 51–63
21. D.L. Downey, M.L. Winston, Honey bee colony mortality and productivity with single and dual infestations of parasitic mite species. *Apidologie* 32 (2001) 567–575
22. L. Kauko, S. Honko, H. Vartiainen, Winter mortality and *Nosema apis* Z. The diagnostic value of *Nosema* spore counts—a clinical approach. *Ann Univ Mariae Curie-Skłodowska Sect DD* 58 (2003) 199–203
23. J.P. Faucon, La nosémose. La santé de l'Abeille. 209 (2005) 343-367
24. M. Higes, R. Martín-Hernández, E. Garrido Bailón, A.V. González-Porto, P. García-Palencia, A. Meana, et al. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environ Microbiol.* 1 (2009) 110–113
25. M. Higes, R. Martín-Hernández, C. Botías, E.G. Bailón, A.V. González-Porto, L. Barrios, M. del Nozal, J.L. Bernal, J. Jimenez, P.G. Palencia, A. Meana, How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ. Microbiol.* 10 (2008) 2659-2669
26. D.L. Cox-Foster, S. Conlan, E.C. Holmes, G. Palacios, J.D. Evans, N.A. Moran, et al. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science.* 318 (2007) 283–287
27. J. Klee, A.M. Besana, E. Genersch, S. Gisder, A. Nanetti, D.Q. Tam, T.X. Chinh, F. Puerta, J.M. Ruz, P. Kryger, D. Message, F. Hatjina, S. Korpela, I. Fries, R.J. Paxton, Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* 96 (2007) 169 1-10
28. G.R. Williams, A.B.A. Shafer, R.L.E. Rogers, D. Shutler, D.T. Stewart, First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite of European honey bees (*Apis mellifera*), in Canada and central USA. *J. Invertebr. Pathol.* 97 (2008) 189–192
29. Office International des Epizooties (OIE) (2008) Chapter 2.2.4, Nosemosis of honeybee. In Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines. Disponible en : http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.02.04_NOSEMOSIS.pdf
30. J. J. Becnel, T. G. Andreadis, Microsporidia in insects. In: Wittner, M. & Weiss, L. M. (ed.), The Microsporidia and Microsporidiosis. American Society for Microbiology Press, Washington, D.C. 4 (1999) 447–501

31. W.M. Brooks Entomogenous protozoa Entomogenous Protozoa. En: Ignoffo, C. M. (ed.), Handbook of Natural Pesticides, Vol. 5, Microbial Insecticides, CRC Press, Boca Raton., 1988. pp. 1-149
32. E. Zander, Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. *Leipziger Bienenzeitung* 24 (1909) 147-150, 164-166
33. L. Bailey, B.V. Ball, Honey Bee Pathology, second ed. Academic Press, London 1991.
34. J.P. Faucon, C. Aurières, P. Drajnudel, L. Mathieu, M. Ribière, A.C. Martel, S. Zeggane, M.P. Chauzat, M. FA Aubert, Experimental study on the toxicity of imidacloprid given in syrup to honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Pest. Manag. Sci.* 61 (2005)111–125
35. I. Fries, F. Feng, A. da Silva, S.B. Slemenda, N.J. Pieniazek, *Nosema ceranae* sp. (Microsporida, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *Eur. J. Protistol.* 32 (1996) 356–365
36. R. Martín-Hernández, A. Meana, L. Prieto, A. Martínez-Salvador, E. Garrido-Bailón, M. Higes, Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *App. Environ. Microbiol.* 73 (2007) 6331–6338
37. M. Higes, P. García-Palencia, R. Martín-Hernández, A. Meana, Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with the Microsporida *Nosema ceranae*. *J. Invertebr. Pathol.* 94 (2007) 211–217
38. H. Katznelson, C.A. Jamieson, Control of nosema disease of honeybees with fumagillin. *Science* 115 (1952) 70–71
39. A. Hartwig, A. Przelecka, Nucleic acids in intestine of *Apis mellifera* infected with *Nosema apis* and treated with fumagillin DCH: Cytochemical and autoradiography studies. *J. Invertebr. Pathol.* 18 (1971) 331-336
40. M. Higes, R. Martín, A. Sanz, N. Alvarez, A. Sanz, M.P. Garcia, A. Meana, El síndrome de despoblamiento de las colmenas en España. Consideraciones sobre su origen. *Vida Apícola* 133 (2005) 15–21
41. M. Higes, R. Martín-Hernández, E., Garrido-Bailón, A.V. González-Porto, P. García-Palencia, A. Meana, M.J. Del Nozal, R. Mayo, J.L. Bernal, Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environ. Microbiol. Reports* 1 (2009) 110–113

42. H.J. Jung, I.A. Hwang, W.S. Sung, H. Kang, B.S. Kang, Y.B. Seu, D.G. Lee, Fungicidal effect of resveratrol on human infectious fungi. *Arch. Pharm. Res.* 28 (2005) 557-560
43. J. Leiro, E. Cano, F.M. Ubeira, F. Orallo, M.L. Sanmartín, In Vitro Effects of Resveratrol on the Viability and Infectivity of the Microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (2004) 2497-2501
44. E.S. Didier, Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Trop.* 94 (2005) 61-76
45. L. Maistrello, M. Lodesani, C. Costa, F. Leonardi, G. Marani, M. Caldon, F. Mutinelli, A. Granato, Screening of natural compounds for the control of *Nosema* disease in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 39 (2008) 436-445
46. C. Costa, M. Lodesani, L. Maistrello, Effect of thymol and resveratrol administered with candy or syrup on the development of *Nosema ceranae* and on the longevity of honeybees (*Apis mellifera* L.) in laboratory conditions. *Apidologie* 4 (2010) 141-150
47. J.L. Rudolf, A.V.A. Resurreccion, F.K. Saalia, R.D. Phillips, Development of a reverse-phase high-performance liquid chromatography method for analyzing trans-resveratrol in peanut kernels. *Food Chem.* 89 (2005) 623-638
48. F. Grippi, L. Crosta, G. Aiello, M. Tolomeo, F. Oliveri, N. Gebbia, A. Curione, Determination of stilbenes in Sicilian pistachio by high-performance liquid chromatographic diode array (HPLC-DAD/FLD) and evaluation of eventually mycotoxin contamination. *Food Chem.* 107 (2008) 483-488
49. O. Palomino, M.P. Gómez-Serranillos, K. Slowing, E. Carretero, A Villar, Study of polyphenols in grape berries by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 870 (2000) 449-451
50. G. Loredana La Torre, G. Laganà, E. Bellocco, F. Vilasi, F. Salvo, G. Dugo Improvement on enzymatic hydrolysis of resveratrol glucosides in wine. *Food Chem.* 85 (2004) 259-266
51. V. Filip, M. Plocková, J. Šmidrkal, Z. Řiháková, K. Melzoch, Š. Schmidt, Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness. *Food Chemistry* 83 (2003) 585-593
52. D.M. Goldberg, E. Ng, A. Karumanchiri, J. Yan, E.P. Diamandis, G.J. Soleas, Assay of resveratrol glucosides and isomers in wine by direct injection high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 708 (1995) 89-98

53. I.K. Hanzlikova, K. Melzoch, V. Filip, J. Smidrkal, Rapid method for resveratrol determination by HPLC with electrochemical and UV detections in wines. *Food Chem.* 87 (2004) 151-158
54. B.C. Trela, A.L. Waterhouse, Resveratrol: Isomeric molar absorptivities and stability. *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 1253-1257
55. G. Monstko, M.S. Pour Nikfardjam, Z. Szabo, K. Boddi, T. Lorand, R. Ohmacht, L. Mark, Determination of products derived from trans-resveratrol UV photoisomerisation by means of HPLC–APCI-MS. *J. Photoch. Photobio. A: Chem.* 196 (2008) 44-50
56. F. Bianchi, M. Careri, M. Musci, Volatile norisoprenoids as markers of botanical origin of Sardinian strawberry-tree (*Arbutus unedo* L.) honey: Characterisation of aroma compounds by dynamic headspace extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chem.* 89 (2005) 527-532
57. R. Karoui, E. Dufour, J.O. Bosset, J. De Baerdemaeker, The use of front face fluorescence spectroscopy to classify the botanical origin of honey samples produced in Switzerland. *Food Chem.* 101 (2007) 314-323
58. G. Beretta, R. Artali, E. Caneva, S. Orlandini, M. Centini, R.M. Facino, Quinoline alkaloids in honey: Further analytical (HPLC-DAD-ESI-MS, multidimensional diffusion-ordered NMR spectroscopy), theoretical and chemometric studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50 (2009) 432-439
59. G. Beretta, G. Vistoli, E. Caneva, C. Anselmi, R.M. Facino, Structure elucidation and NMR assignments of two new pyrrolidinyl quinoline alkaloids from chestnut honey. *Magn. Reson. Chem.* 47 (2009) 456–459
60. G. Beretta, E. Caneva, R.M. Facino, Kynurenic Acid in Honey from Arboreal Plants: MS and NMR Evidence. *Planta Med.* 73 (2007) 1592-1595
61. G. Beretta, P. Granata, M. Ferrero, M. Orioli, R.M. Facino, Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Anal. Chim. Acta* 533 (2005) 185-191
62. G. Beretta, E. Caneva, L. Regazzoni, N.G. Bakhtyari, R.M. Facino, A solid-phase extraction procedure coupled to ¹H NMR, with chemometric analysis, to seek reliable markers of the botanical origin of honey. *Anal. Chim. Acta* 620 (2008) 176-182
63. J.A. Donarski, S.A. Jones, M. Harrison, M. Driffield, A.J. Charlton, Identification of botanical biomarkers found in Corsican honey. *Food Chem.* 118 (2010) 987-994

64. F.A. Tomás-Barberán, I. Martos, F. Ferreres, B.S. Radovic, E. Anklam, HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *J. Sci. Food Agric.* 81(2001) 485-496
65. P. Truchado, I. Martos, L. Bortolotti, A.G. Sabatini, F. Ferreres, F.A. Tomás-Barberán, Use of Quinoline Alkaloids as Markers of the Floral Origin of Chestnut Honey. *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 5680-5686
66. M.P. Turski, M. Turska, W. Zgrajka, D. Kuc, W.A. Turski, Presence of kynurenic acid in food and honeybee products. *Amino Acids* 36 (2009) 75-80
67. S. Vazquez, R.J.W. Truscott, R.A.J. O'Hair, A. Weimann, M.M. Sheil, A Study of Kynurenine Fragmentation using Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12 (2001) 786-794
68. J.P. Ruddick, A.K. Evans, D.J. Nutt, S.L. Lightman, G.A.W. Rook, C.A. Lowry, Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications. *Expert. Rev. Mol. Med.* 8 (2006) 1-27
69. C.E. Jahr, T.M. Jessell, Synaptic transmission between dorsal root ganglion and dorsal horn neurons in culture: antagonism of EPSPs and glutamate excitation by kynurenate. *J. Neurosci.* 5 (1985) 2281-2289
70. F. Moroni, S. Luzzi, S. Franchi-Micheli, L. Zilletti, The presence of N-methyl-D-aspartate-type receptors for glutamic acid in the guinea pig myenteric plexus. *Neurosci. Lett.* 68 (1986) 57-62
71. M.B. Robinson, K.D. Anderson, J. F. Koerner, Kynurenic Acid as an Antagonist of Hippocampal Excitatory Transmission. *Brain Res.* 309 (1984) 119-126
72. C.K. Lim, B.J. Brew, G.Sundaram, G.J. Guillemin, Understanding the Roles of the Kynurenine Pathway in Multiple Sclerosis Progression. *Int. J. Tryp. Res.* 3 (2010) 157-167
73. M. Tomiya, T. Fukushima, T. Ogaya, Y. Sone, S. Mitsuhashi, T. Toyo'oka Determination of kynurenic acid levels in rat brain microdialysis samples and changes in kynurenic acid levels induced by N-acetylaspartic acid. *Biomed. Chromatogr.* 24 (2010) 569-573
74. A. Vaarmann, A. Kask, U. Maëorg, Novel and sensitive high-performance liquid chromatographic method based on electrochemical coulometric array detection for simultaneous determination of catecholamines, kynurenine and indole derivatives of tryptophan. *J. Chromatogr. B* 769 (2002) 145-153

75. J.E. Roberts, J.F. Wishart, L. Martinez, C.F. Chignell, Photochemical Studies on Xanthurenic Acid. *Photochem. Photobio.* 72 (2000) 467–471
76. Z. Hartai, P. Klivenyi, T. Janaky, B. Penke, L. Dux, L. Vecsei, Kynurenine metabolism in plasma and in red blood cells in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 239 (2005) 31-35
77. A. Amirkhani, E. Heldin, K.E. Markides, J. Bergquist, Quantitation of tryptophan, kynurenine and kynurenic acid in human plasma by capillary liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 780 (2002) 381-387
78. D. Otter, M. Cao, H. -M. Lin, K. Fraser, S. Edmunds, G. Lane, R. Rowan, Identification of Urinary Biomarkers of Colon Inflammation in IL10–/–Mice Using Short-Column LCMS Metabolomics. *J. Biomed. Biotech.* 2011 (2011) 1-12
79. Y. Kotake, E. A. Murakami, A possible diabetogenic role for tryptophan metabolites and effects of xanthurenic acid on insulin. *Am. J. Clin. Nutr.* 24 (1971) 826-829

III. OBJETIVOS

El objetivo final de la investigación desarrollada está encaminado a proporcionar información útil que contribuya a remediar en lo posible los problemas derivados de la presencia masiva de *Nosema ceranae* en los colmenares de España, lo que sin duda podrá ser extrapolado a otros lugares con el mismo problema. Al mismo tiempo conocer más acerca de la miel monofloral y algunos posibles biomarcadores a fin de contribuir a incrementar el valor añadido del producto. Para conseguirlo se han establecido unos objetivos intermedios:

- Desarrollo de metodología para determinación simultánea de resveratrol y su piceído en isomería *trans-cis*.
 - Ensayos sobre patrones
 - Ensayos sobre miel y polen
 - Ensayos sobre alimentos para abejas
 - Aplicación sobre muestras provenientes de ensayos de campo
- Desarrollo de metodología para determinación simultánea de triptófano y sus principales metabolitos.
 - Ensayos sobre patrones
 - Ensayos sobre miel
 - Aplicación a mieles monoflorales

IV. MATERIALES Y REACTIVOS

IV.1. Instrumentación

Para la realización de esta investigación se han empleado tres equipos de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), la utilización de ellos se debió a las finalidades establecidas en cada caso. A continuación se describen brevemente las características generales de los mismos:

- ◆ Cromatógrafo de Líquidos de Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) series 1200 (LC-DAD/FLD) con los módulos de depósito de disolventes, desgasificador, bomba cuaternaria, inyector automático con bandeja muestreadora de 100 viales, compartimiento termostatado de columna, detector de diodos en fila (DAD), detector de fluorescencia (FLD) y colector de fracciones, todo ello controlado por el software 3D Systems ChemStation Rev. B.03.02.
- ◆ Cromatógrafo de Líquidos de Agilent Technologies series 1100 (LC-MS) con depósito de disolventes, desgasificador de disolventes, bomba cuaternaria, inyector automático con bandeja muestreadora de 100 viales, compartimiento termostatado de columna, detector de diodos en fila (DAD) y detector de espectrometría de masas con analizador cuadrupolar (MS), todo ello controlado por el software HPLC/MSD ChemStation Rev. A.10.02
- ◆ Cromatógrafo de Líquidos de Agilent Technologies modelo 1100 (LC-MS/MS) con depósito de disolventes, desgasificador de disolventes, bomba binaria de gradiente, inyector automático con bandeja muestreadora de 100 viales, compartimiento termostatado de columna, detector de diodos en fila (DAD) y detector de espectrometría de masas con analizador de trampa de iones, todo ello controlado por los software LC 3D ChemStation Rev. A.10.02 y MSD Trap Control versión 5.2. Los datos de MS fueron analizados usando Quant Analysis para LC/MSD Trap1.6 y Trap 3.2.

De manera general, se empleó, además de DAD-FLD, como herramienta para la detección la espectrometría de masas con la finalidad de alcanzar los bajos límites de detección y cuantificación característicos de la técnica.

No es objeto de esta memoria explicar pormenorizadamente los diferentes tipos de interfases y sus particulares métodos de ionización, sobre todo cuando existen excelentes textos de referencia sobre esta materia, simplemente se presenta una breve descripción de las interfases empleadas en el desarrollo de este trabajo.

Los detectores de espectrometría de masas están equipados con dos interfases, electrospray (ESI) e ionización química a presión atmosférica (APCI), ambas pertenecientes a la familia de técnicas denominadas Ionización a Presión Atmosférica. Estas interfases tienen la finalidad de transformar los analitos en disolución en iones gaseosos y al mismo tiempo eliminar la fase móvil utilizada para la separación por HPLC, realizándose la transformación a presión atmosférica.

El campo de aplicación de estas dos fuentes depende de la polaridad y masa molecular de los analitos, lo que se representa en la Figura 2.

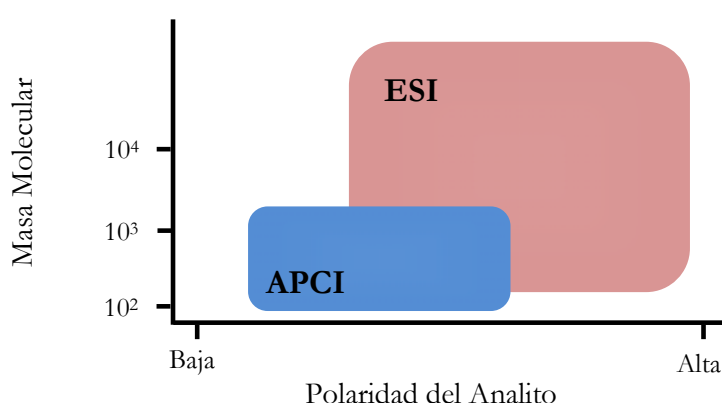


Figura 2. Campo de aplicación de interfases ESI y APCI

Como se puede observar ambas fuentes tienen campos de aplicación complementarios ya que mientras ESI funciona bien para compuestos de mediana a alta polaridad, APCI es más adecuada para los compuestos de mediana a baja polaridad.

IV.2. Equipo adicional y consumibles

Agitador Vortex Reax Top de Heidolph (Schwabach, Alemania)

Agitador Vibromatic de J.P. Selecta (Barcelona, España)

Baño de ultrasonidos Branson de J.P. Selecta

Balanza analítica de precisión EA-240 de Mettler Toledo (Darmstadt, Alemania)

Cartucho de extracción Strata™ X polimérico 33 μm , 6 mL, 200 mg de Phenomenex (Torrance, CA, USA)

Cartucho de extracción Sep-Pak® Vac C₁₈, 6mL, 200 mg de Waters (Milford, MA, USA)

Cartucho de extracción OASIS™ HLB 30 μm , 3mL, 60 mg de Waters

Cartucho de extracción OASIS™ MCX 30 μm , 3mL, 60 mg de Waters

Centrifuga 5810R de Eppendorf (Hamburg, Alemania)

Equipo de extracción en fase sólida con sistema de vacío Visiprep™ de Supelco (St Louis, MO, USA)

Filtros de jeringa con membrana de acetato de celulosa 0.45 μm x 13 mm de Advantec MFS (Dublin, CA, USA)

Filtros de jeringa con membrana de nylon 0.45 μm x 13 mm de Advantec MFS

Filtros de membrana de nylon 0.45 μm x 47 mm de Advantec MFS

Lámpara UV B100AP de Cole-Parmer (Vernon Hills, IL, USA)

pH-metro de Crison (Barcelona, España)

Rotavapor R-210/215 de Büchi (Flawil, Suiza)

IV.3. Reactivos y disolventes

Acetonitrilo, gradiente HPLC de PANREAC (Barcelona, España)

Ácido clorhídrico para análisis, 32% de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania)

Ácido fórmico, 98% de Sigma-Aldrich (Madrid, España)

Ácido kinurénico (ácido 4-hidroxiquinolina-2-carboxílico), $\geq 98\%$ de Sigma-Aldrich

Ácido xanturénico (ácido 4,8-dihidroxiquináldico), 96% de Sigma-Aldrich

Agua ultrapura obtenida por un equipo compacto que consta de dos unidades de purificación (Milli-RO y Milli-Q) de Millipore (Bedford, MA, USA)

DL-Triptófano (ácido (\pm)-2-Amino-3-(3-indolil)propiónico), $\geq 99\%$ de Sigma-Aldrich

Formiato de amonio grado reactivo, 97% de Sigma-Aldrich

Hidróxido de sodio para análisis, 99% de Merck KGaA

Isopropanol grado HPLC de Lab Scan (Dublin, Irlanda)

n-Hexano grado Pestican de Lab Scan

Metanol grado gradiente HPLC de PANREAC

Solución de amoniaco 32% purísimo de Scharlab (Barcelona, España)

Sulfato de DL-kinurenina (ácido DL-2-Amino-4-(2-aminofenil)-4-oxobutanoico), 98% de Sigma-Aldrich

trans-Piceido (*trans*-resveratrol-3- β -D-glucopiranosido), 97% de Sigma-Aldrich

trans-Resveratrol (3,4',5-trihidroxi-*trans*-estilbeno), 99% de Sigma-Aldrich

trans-Resveratrol, 50% grado farmacéutico de Megaresveratrol[®] (Danbury, CT, USA)

trans-Resveratrol, 99% grado farmacéutico de Megaresveratrol[®]

IV.4. Columnas analíticas

Características	Agilent Technologies		Phenomenex			
	Zorbax® Eclipse XDB- C ₁₈ 150	Zorbax® Eclipse XDB- C ₈ 150	Gemini C ₁₈	Synergy Max RP	Synergy Hydro RP	Kinetex HILIC
Nombre comercial	Zorbax® Eclipse XDB- C ₁₈ 150	Zorbax® Eclipse XDB- C ₈ 150	150	250	30 y 150	50
Longitud (mm)	150	150	150	250	30 y 150	50
Diámetro interno (mm)	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6	2.1
Tamaño partícula (µm)	5	5	5	4	4	2.6
Mecanismo responsable de la separación	Fase inversa	Fase inversa	Fase inversa	Fase inversa	Fase inversa	Interacción hidrofílica
SopORTE	sílice	sílice	organosílica porosa	sílice poroso	sílice poroso	Core-shell
Fase estacionaria	C ₁₈ , recubrimiento polar	C ₈ , recubrimiento polar	C ₁₈ , recubrimiento con trimetilsililo (TMS)	C ₁₈ , recubrimiento con trimetilsililo (TMS)	C ₁₈ , recubrimiento polar	Sílice no ligada
Tamaño de poro (Å)	80	80	110	80	80	100
Área superficial (m ² /g)	180	180	375	475	475	380
Carga de C (%)	10	7.5	14	17	N/A	N/A
Intervalo de pH	2 – 9	2 – 9	1 – 12	1.5 – 10	1.5 – 7.5	2 – 7.5

V. DETERMINACIÓN DE RESVERATROL Y PICEIDO

V.1. Resveratrol y Piceido

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los principales grupos de micronutrientes presentes en el mundo vegetal, y significan una parte importante de la dieta humana y animal. Presentan diversas estructuras químicas y actividad, y comprenden más de 8000 compuestos diferentes. Dentro de este amplio grupo de compuestos se encuentran las fitoalexinas, producidas por plantas pertenecientes a las gimnospermas y dicotiledóneas en respuesta al estrés producido por la irradiación de rayos ultravioleta, infección microbiana, exposición a metales pesados, tratamientos con ozono, etc. Los polifenoles son también productos del metabolismo secundario de las plantas. Estos compuestos presentan actividades anticancerígenas, antiinflamatorias, antiaterogénicas, antitrombóticas, inmunomoduladoras y analgésicas, entre otras, y ejercen estas funciones como antioxidantes. En general, los compuestos fenólicos se pueden dividir en, por lo menos, 10 tipos dependiendo de su estructura básica: los fenoles simples, ácidos fenólicos, cumarinas e isocoumarinas, naftoquinonas, xantonas, estilbenos, antraquinonas, flavonoides y ligninas^[54,55,80-82].

Químicamente, las fitoalexinas, son estilbenos, cuyo esqueleto estructural consta de un puente vinílico, que sirve de unión a dos anillos aromáticos. La fotoquímica de estos compuestos en disolución es muy diversa, puesto que pueden presentar reacciones reversibles de isomerización *cis/trans*, ciclación del *cis*-estilbeno a dihidrofenantreno y posterior oxidación a fenantreno, y dimerización del *trans*-estilbeno para generar derivados del tetrafenilciclobutano^[83].

A partir de esta estructura química, relativamente sencilla, la naturaleza ha sido capaz de crear una gran variedad de compuestos, diferenciándose entre ellos tanto el número como la posición de grupos hidroxilos, la extensión en que dichos grupos hidroxilos se encuentran a su vez sustituidos por azúcares, por grupos metilo, metoxi u otros residuos y la configuración estérica de moléculas químicamente idénticas. Otra causa que aumenta mucho más el número de

sustancias integrantes de esta familia es su habilidad para existir como dímeros, trímeros o polímeros mayores, llamados viniferinas^[84-88].

Diversos estudios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* han demostrado que los estilbenos, y en particular el resveratrol, presentan efectos beneficiosos para la salud, por lo cual su inclusión en la dieta humana y animal resulta de mucho interés^[89-94].

El resveratrol, en el cual se basa una buena parte de este trabajo, existe como dos isómeros, la forma *trans* aparece en la piel de las uvas y su síntesis es estimulada por la luz UV, las enfermedades y las infecciones fúngicas. El isómero *cis* no ha sido reportado en *Vitis vinifera*, aunque ambos suelen estar presentes en cantidades variables en el vino^[52,95].

Ambos isómeros existen naturalmente así como sus glucósidos. *In vitro* la forma *trans* es más fotoestable y termoestable, la forma *cis* es muy inestable isomerizándose a la forma *trans* principalmente por la acción del calor, aunque en algunas plantas es más estable la configuración *cis*. Las fuentes de resveratrol en la naturaleza no son muchas, y menos aún las plantas y vegetales de consumo humano que lo contienen, entre ellas se pueden citar los cacahuetes, el eucalipto y la zarzamora, aunque no existe duda acerca de que las principales fuentes para la dieta humana son los productos derivados de la vid, esto es, la uva y el vino^[96,97].

Los niveles más altos de producción natural de resveratrol se encuentran en las raíces japonesas Ko-jo-Kon (*Polygonum cuspidatum*), que se han utilizado en la medicina tradicional asiática durante cientos de años para tratar las enfermedades cardiovasculares, así como también el té japonés *Itadori*. Además de su efectivo papel antioxidante y de su acción inhibitoria del apelmazamiento de las plaquetas, varios estudios han demostrado su eficacia en la prevención del cáncer, inhibiendo la iniciación y desarrollo de tumores, así como propiedades antiinflamatorias, estrogénicas, antivirales y neuroprotectoras^[98-100].

El carácter antifúngico ^[101] y antioxidante ^[102,103] del resveratrol ha sido ampliamente discutido, sin embargo, no debe dejarse de lado los posibles efectos secundarios o toxicológicos que pueden tener los compuestos naturales al ser usados con fines medicinales en humanos o animales. Es de sobra conocido que los mayores venenos son productos naturales de origen vegetal o animal. Pero en el caso que nos ocupa, el resveratrol ha demostrado a través de numerosos estudios la ausencia de ese carácter tóxico y más bien ha exhibido grandes beneficios para la salud.

Algunos estudios han revelado que el resveratrol incrementa la longevidad de algunas especies como nematodos, levaduras y dípteros. Desde el punto de vista médico se ha estudiado, en animales y humanos, su eficacia en la prevención del cáncer colorrectal ^[104]. El Dr. David Sinclair de la Escuela de Medicina de Harvard ha descubierto que el resveratrol aumenta la producción de una proteína llamada SIRT1, que puede aumentar la duración de la vida humana dramáticamente. El estudio de Harvard podría explicar la “paradoja francesa”, que el resveratrol en el vino tinto puede contribuir a la baja incidencia de enfermedades coronarias en Francia, a pesar de la alta ingesta dietética de grasas saturadas. La dosis utilizada en el estudio de Harvard fue de 24 mg de *trans*-resveratrol por 1 kg de peso corporal, lo cual equivaldría a alrededor de 500 mg de *t*-resveratrol por cada 50 libras (23 kg) de peso corporal ^[105-107].

En el caso que nos ocupa, como se ha mencionado en el Capítulo II, se está estudiando la eficacia del resveratrol en el tratamiento de la nosemosis, causada por el microsporidio *Nosema ceranae*, que sobre las abejas se ha comprobado que altera el metabolismo causando una menor digestión de las proteínas lo que disminuye las energías reduciendo la longevidad, produce la esterilidad de la reina y origina anemia que se manifiesta como una parálisis, no teniendo fuerza para mover las alas. Además al provocar la disminución de la población de abejas adultas implica una reducción notable en la producción de miel, en algunos casos se ha indicado una reducción del 75%.

En la mayoría de los países europeos está prohibido el uso de antibióticos para el tratamiento de colmenas enfermas, por lo que la prevención es la mejor medida para el control de la enfermedad. Aun cuando los tratamientos con fumagilina son posibles existe el problema de la recurrencia de la enfermedad, ya que, según algunos autores sólo las formas vegetativas del parásito son eliminadas, mientras que otros sugieren que la fumagilina es capaz de alterar la ultraestructura de la membrana de las esporas jóvenes. En algunos estudios se han encontrado residuos de fumagilina después del tratamiento para la enfermedad de *Nosema*, principalmente cuando este tratamiento no se realizó bajo control veterinario, además el antibiótico y alguno de sus metabolitos son relativamente estables en la miel ^[108]. Por otra parte, el uso de antibióticos y sulfamidas para las enfermedades de las abejas representa una preocupación creciente para el mercado de la miel ya que cada vez son más las muestras en las que se detectan residuos de dichos compuestos debido, en gran medida, al creciente poder de detección de los instrumentos actuales a disposición del químico analítico. El desarrollo de nuevos métodos para el control de nosemosis es por lo tanto muy esperado por los apicultores. Como ya se ha mencionado, la fumagilina y, en ciertos casos, el albendazol son los fármacos más usados para el tratamiento de este tipo de enfermedades en humanos y animales. Sin embargo, la respuesta de las infecciones ante estos fármacos es muy variable.

En este sentido, se ha empleado para nuestro estudio un suplemento alimenticio autorizado por la FDA, USA, que contiene *trans*-resveratrol como principio activo. Se encuentra disponible como resveratrol-99 y resveratrol-50, el primero contiene el 99% de *trans*-resveratrol puro, mientras que en el segundo su contenido es del 50%, el restante 50% corresponde a componentes naturales de la planta pero que no presentan efectos beneficiosos para la salud. Entre estos ingredientes se incluyen el *cis*-resveratrol y la emodina natural, que puede actuar como un laxante en algunas personas sensibles, además la presencia de éstos le confiere un color más oscuro y fuerte olor respecto al de resveratrol-99 que es blanco, inodoro y no

presenta efectos adversos. Desde el punto de vista económico, debido al proceso de purificación, el resveratrol 50% puede costar alrededor del 30–40% menos que el resveratrol 99% ^[109]. Para nuestras experiencias y ensayos de campo hemos optado en principio por emplear el producto de mayor pureza pues conviene asegurar que en caso de aparecer residuos después del tratamiento estos no tengan efectos perjudiciales para la salud del consumidor.

V.2. Antecedentes bibliográficos para el análisis de resveratrol

En lo que se refiere a los métodos encontrados en la bibliografía para el análisis de resveratrol y compuestos estructuralmente similares se suelen utilizar técnicas de separación instrumentales, fundamentalmente Cromatografía de Líquidos (LC), Cromatografía de Gases (GC) y Electroforesis Capilar (CE).

Estas técnicas se han aplicado para la determinación de todos o algunos de los estilbenos de interés en muestras de vino y algunos derivados ^[52,82,110-126], uvas ^[49,127-129], fresas ^[130], tomate ^[131], cervezas ^[132], zumos de frutas ^[133], pistacho ^[48], cacahuets ^[47,134-135], chocolate y cacao ^[136], plantas ^[137-141], fluidos biológicos ^[142-148] y preparados farmacéuticos ^[148], en lo que se refiere a productos derivados de la colmena se han encontrado métodos en los que se analiza resveratrol en propóleos ^[149], pero en ningún caso en miel o polen.

En la etapa de tratamiento de muestra, que reviste especial importancia debido a la fotoisomerización de las configuraciones *trans/cis*, se han empleado técnicas de limpieza y/o concentración como la extracción sólido–líquido, la extracción en fase sólida (SPE), extracción líquido–líquido (LLE), extracción por fluidos supercríticos (SFE), extracción asistida por microondas (MAE), extracción asistida por ultrasonidos (UAE) o empleando fluidos presurizados (PLE) a fin de obtener extractos de resveratrol y sus análogos para su posterior análisis cromatográfico.

En lo que se refiere a la SPE, ésta ha sido empleada en muestras acuosas como la cerveza,^[132] así como la microextracción en fase sólida aplicada en diversos tipos de bebidas en las que el tiempo de análisis y la preparación de muestra es sensiblemente menor.^[133,150]

Entre las técnicas de extracción mencionadas, cabe señalar que para la extracción de polifenoles, la SFE presenta ciertas limitaciones, puesto que se trabaja en condiciones subcríticas, es decir, se requieren porcentajes relativamente elevados de modificadores orgánicos, siendo esta técnica más compatible con compuestos de baja o media polaridad^[151-155]. Sin embargo, la PLE ha demostrado su eficacia en lo que se refiere al tiempo de extracción utilizando altas temperaturas (150°) para acelerar el proceso^[156].

La MAE ha sido utilizada en plantas con buenos porcentajes de recuperación, puesto que se utilizan temperaturas por debajo del punto de ebullición de los disolventes orgánicos lo que es muy compatible con la termolabilidad de la mayoría de los polifenoles^[157-158]. Una de las ventajas de estas técnicas, es que permiten realizar la extracción en ausencia de luz, debido a la sensibilidad de los polifenoles a este factor. Con estas técnicas también es posible asegurar la estabilidad de los polifenoles frente a condiciones extremas de temperatura.

Debido a las propiedades físico-químicas de los analitos la cuantificación directa por cromatografía de gases no es posible, por lo que se ha recurrido habitualmente a la formación de derivados con bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), previa hidrólisis enzimática, que se inyectan en el cromatógrafo con detección por espectrometría de masas analizándose de este modo: téis^[150], frutos secos^[159], fluidos biológicos^[160] y vinos^[161].

Otra técnica alternativa, es la electroforesis capilar donde las diferencias encontradas se basan principalmente en la etapa de preparación de la muestra, y en el modo de separación. En cuanto a la preparación de la muestra, se suele realizar una inyección directa o extracción en fase sólida. Respecto al modo de separación se han empleado la Zona Libre (CZE) o Electro cromatografía Micelar (MEKC) haciendo uso de la detección UV, fluorescente o electroquímica^[162-170]. También se ha propuesto una metodología en medio no acuoso con detección fluorescente^[171].

Sin embargo, las metodologías usando cromatografía de líquidos son las que mayor aceptación han tenido, empleándose principalmente el modo de separación en fase inversa, utilizando columnas principalmente C₁₈ aunque también se ha hecho uso de columnas tipo ciano. La detección se realiza usualmente por UV con diodos en fila únicamente o bien combinado con fluorescencia, aunque la tendencia actual es la confirmación empleando espectrometría de masas. También se ha propuesto la detección por resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas (NMR/MS)^[172], electroquímica^[148,173] y quimioluminiscente^[174,175]. Aunque con menos utilidad real se ha sugerido la posibilidad de identificación y determinación empleando cromatografía en capa fina^[176].

En cuanto a los métodos encontrados para la cuantificación del resveratrol y sus análogos, solamente se ha encontrado un método por Electroforesis Capilar en el que determinaba únicamente resveratrol junto con otros compuestos fenólicos en muestras de propóleos^[149], sin embargo no se ha propuesto un método en el que se determinen el resveratrol y piceido en sus formas *trans/cis* ya sea en miel o polen.

V.3. Determinación de resveratrol y piceído en miel

A continuación se detallan las etapas llevadas a cabo para la determinación de los compuestos de interés en miel.

V.3.1. Disoluciones

Las disoluciones de patrones de *t*-resveratrol y piceído se prepararon por pesada en una concentración de 1000 mgL⁻¹ en metanol/agua (50:50, v/v), fueron almacenadas a 4°C y protegidas de la luz para evitar la fotoisomerización. Estas soluciones han sido estables por un período de 6 meses.

V.3.2. Obtención de los *cis*-isómeros

Esta etapa se desarrolló simultáneamente a la puesta a punto de las condiciones cromatográficas, puesto que se hacía necesario establecer la mejor forma de obtener los *cis*-isómeros en el laboratorio, por exposición a la radiación ultravioleta del respectivo *trans*-estilbeno en disolución. Siguiendo como directrices las recomendaciones extraídas de la bibliografía, se empleó una lámpara UV a 254 nm, evaluándose el tiempo de exposición.

Para establecer el tiempo requerido para la conversión de *trans*-isómeros en *cis*-isómeros, se irradiaron mezclas de compuestos *trans* a diferentes intervalos de tiempo (1, 6, 12, 18, 24, y h 30) y entonces, se inyectaron las disoluciones resultantes, cabe señalar que se prepararon cinco experimentos paralelos, y cada uno fue inyectado tres veces.

Para controlar la reacción de fotoisomerización se empleó como muestra de control una disolución de 2.5 mgL⁻¹ de *trans*-isómeros, en el cromatograma obtenido sólo se detectaron dos picos (Figura 3.A) correspondientes a los compuestos *trans*. Después de 1 h de irradiación UV a 254 nm, aparecieron en el cromatograma dos picos más, las formas *cis*-estereoisoméricas. Sin embargo,

también se observaron otros dos picos de baja intensidad (Figura 3.B), que de acuerdo con las experiencias de Montsko et al. ^[55] debe corresponder a los respectivos productos de oxidación (PO) de ambos estilbenos. Los picos de los *cis*-isómeros alcanzaron su máxima altura en la muestra irradiada durante 24 h, no observándose un incremento significativo después de este tiempo, por lo tanto con 24 h se obtuvieron las mayores proporciones de *cis* isómeros (93% para el *cis*-resveratrol y 94% *cis*-piceído). Mientras tanto, para el producto de oxidación después de 6 h, no se observó ninguna variación significativa.

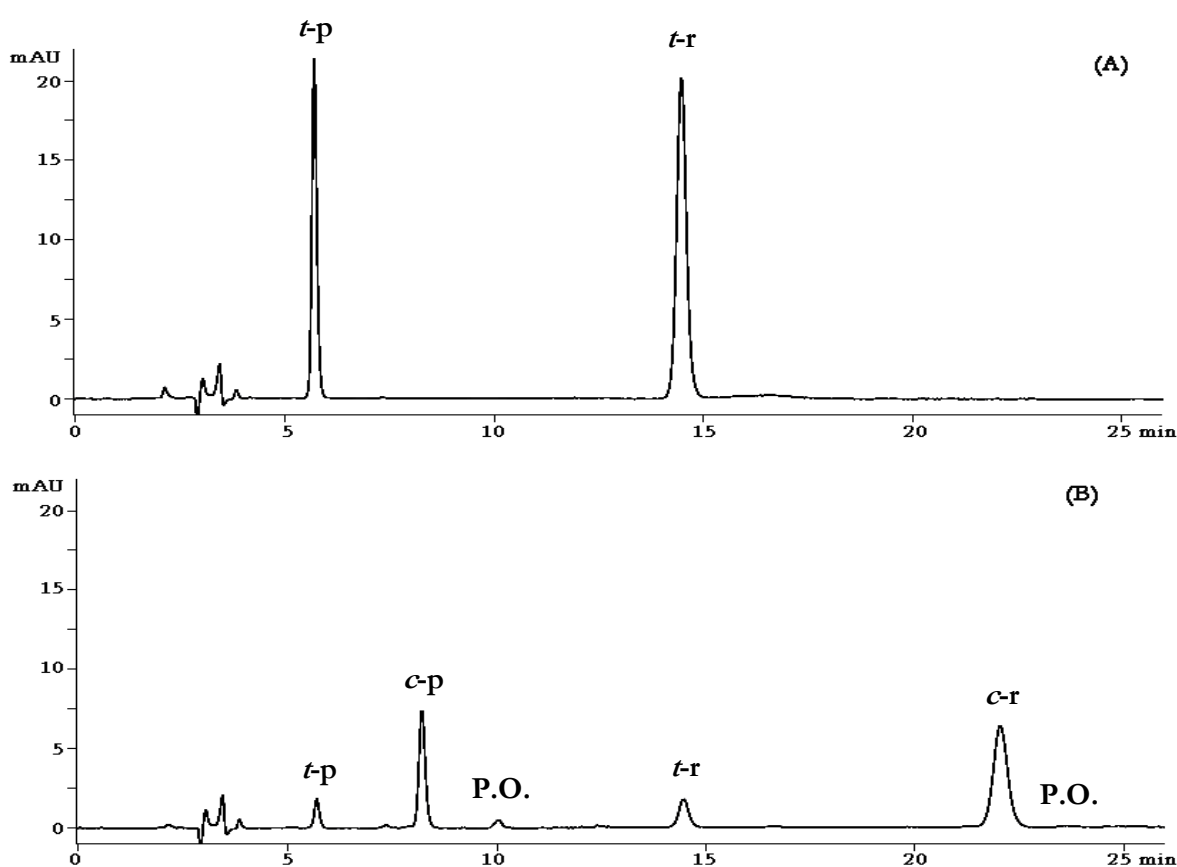


Figura 3. Cromatogramas de disoluciones de (A) *t*-isómeros de piceído y resveratrol, (B) *c*-isómeros de piceído y resveratrol expuestos 24 h a la luz solar.

Cabe señalar que después de establecidas las condiciones en LC-MS, se confirmaron las estructuras mediante los respectivos espectros de masas, incluyendo los productos de oxidación, en la Figura 4 se representan las estructuras químicas de los compuestos.

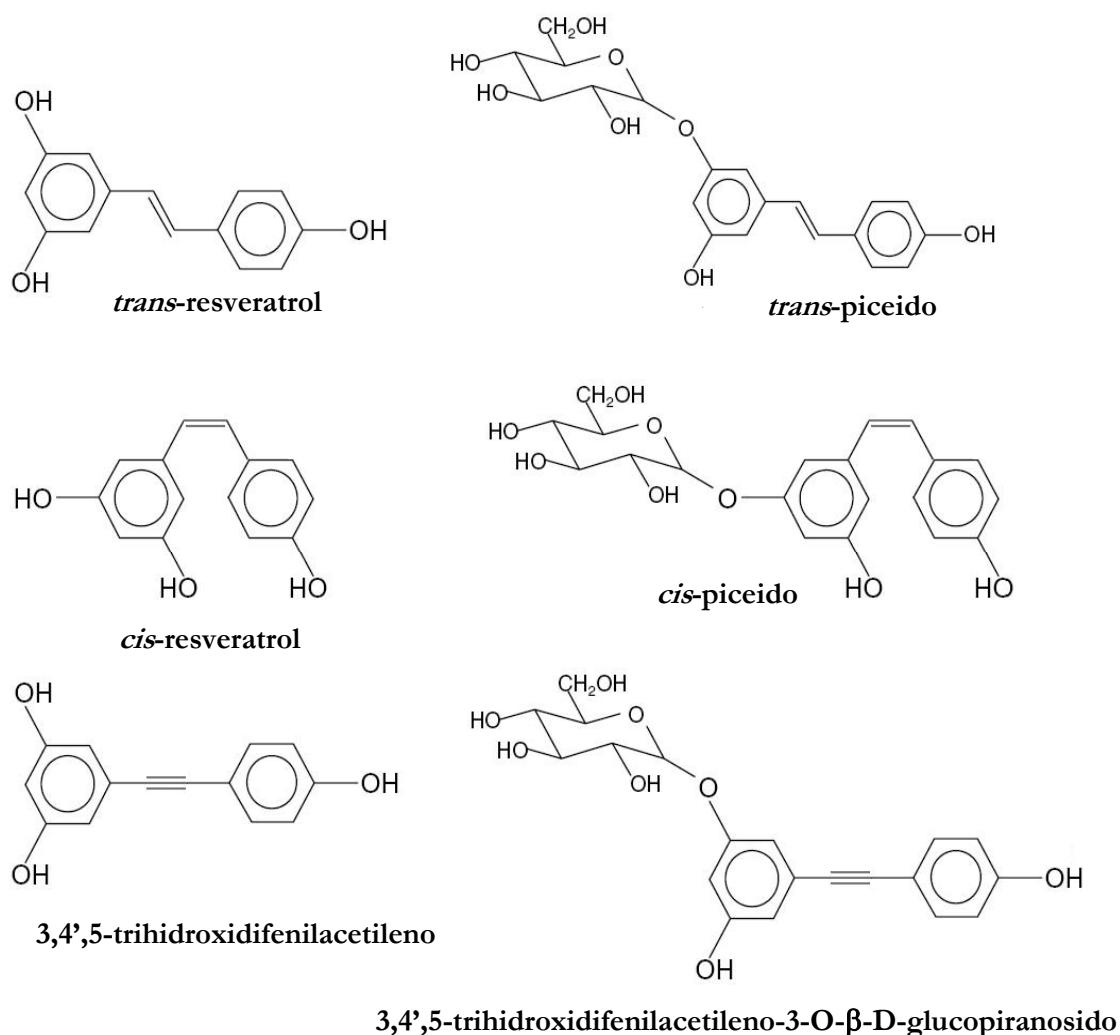


Figura 4. Estructuras químicas de los isómeros del resveratrol y piceido y productos de oxidación

Los valores de concentración para los patrones de *cis*-isómeros fueron asignados sobre la base de la desaparición de los *trans*-isómeros después de la irradiación. Una vez que se llevó a cabo esta transformación, se preparó una mezcla de los cuatro analitos en una concentración de 20 mgL^{-1} para cada compuesto, la cual se evaluó diariamente y se diluyó con la fase móvil para producir las disoluciones patrón de trabajo. Cabe señalar que los productos de reacción se mantuvieron estables durante un período de 3 meses cuando se conservaban a -20°C protegidos de la luz.

V.3.3. Condiciones cromatográficas

Las referencias bibliográficas consultadas en su gran mayoría proponen métodos para el análisis de resveratrol y su glucósido empleando el mecanismo de reparto en fase inversa con un régimen de elución por gradiente, utilizando como fase móvil disoluciones de sales de amonio o de ácidos, fundamentalmente ácido acético o fórmico y como modificador orgánico metanol o acetonitrilo. Estas condiciones se tomaron como punto de partida para encontrar las condiciones óptimas de determinación de resveratrol y piceído en las mieles.

Se realizó un estudio de la influencia que las distintas variables cromatográficas podrían ejercer sobre la separación con la finalidad de encontrar las condiciones óptimas que permitieran realizar una correcta determinación de los analitos en mieles. Para la realización de este estudio se procedió a modificar una variable manteniendo las demás constantes con el fin de comprobar el efecto que produce cada una de ellas en los parámetros cromatográficos. A continuación se describe de manera detallada este proceso para cada una de las variables estudiadas.

Condiciones para la detección

Debido a que se emplearon tres tipos de detectores, DAD, FLD y MS, se tuvieron que establecer las condiciones para cada uno de ellos. Las pruebas se hicieron con una fase móvil binaria compuesta por metanol/formiato de amonio 20 mM en agua (75:25, v/v) a pH 6.7 con una columna Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ Analytical (150 x 4.6 mm i.d.) a un flujo de fase móvil de 1 mLmin⁻¹ y manteniendo la temperatura del compartimiento de columna a 25°C, salvo cuando se realizó el FIA para el MS donde no se empleó columna y el flujo fue de 0.3 mLmin⁻¹.

Absorción molecular

Con las condiciones cromatográficas iniciales seleccionadas e inyectando los patrones de 5 mgL^{-1} en metanol se obtuvo el espectro de absorción molecular en el intervalo de 200 a 400 nm. Los espectros obtenidos se presentan en la Figura 5.

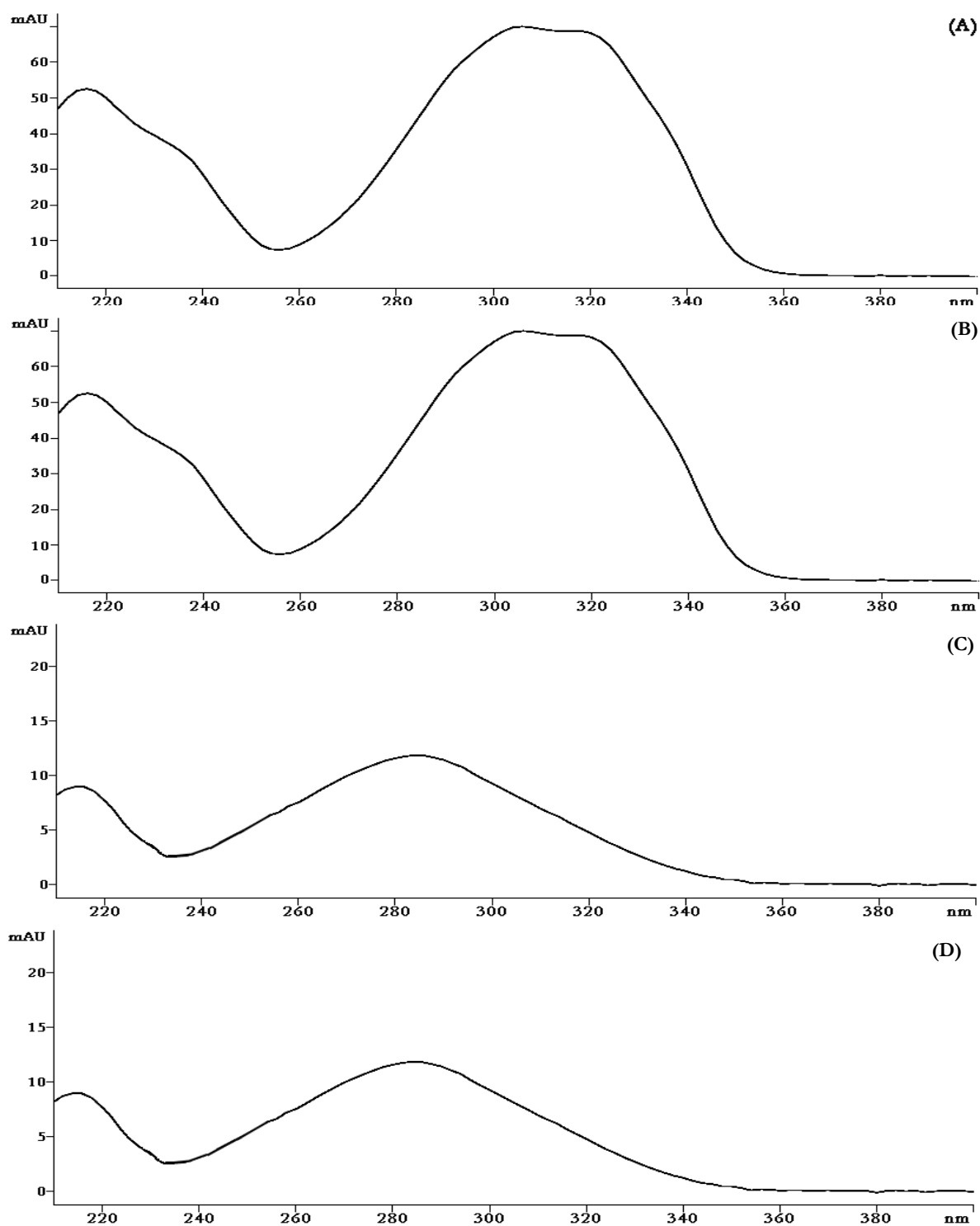


Figura 5. Espectros de absorción molecular (A) *t*-resveratrol, (B) *t*-piceido, (C) ϵ -resveratrol y (D) ϵ -piceido en disoluciones de 5 mgL^{-1} en metanol

Los *trans*-isómeros presentaron espectros de absorción molecular idénticos con máximos de absorción a 216 y 315 nm, igual situación se dio con los *cis*-isómeros cuyos máximos se encontraron en 230 y 286 nm, resultados que se correspondían con la bibliografía. En el apartado de selectividad se explica la razón por la cual no se utilizó la detección por DAD para la cuantificación de los *trans*-estilbenos, por lo que se seleccionó para la detección para los *cis*-isómeros como longitud de onda 286 nm.

Fluorescencia molecular

De igual manera se procedió para la obtención de los espectros de excitación y emisión, de los *trans*-isómeros, ya que los isómeros *cis* no presentaron fluorescencia, los compuestos *trans* del resveratrol y piceído tuvieron el máximo de excitación a 318 nm y máximo de emisión en torno a 390 nm. La cuantificación de los *trans*-isómeros se llevó a cabo con la señal de FLD debido a la mayor selectividad y sensibilidad de este detector. En la Figura 6 se presentan los espectros de excitación y emisión del *t*-resveratrol y *t*-piceído, que como puede observarse son idénticos.

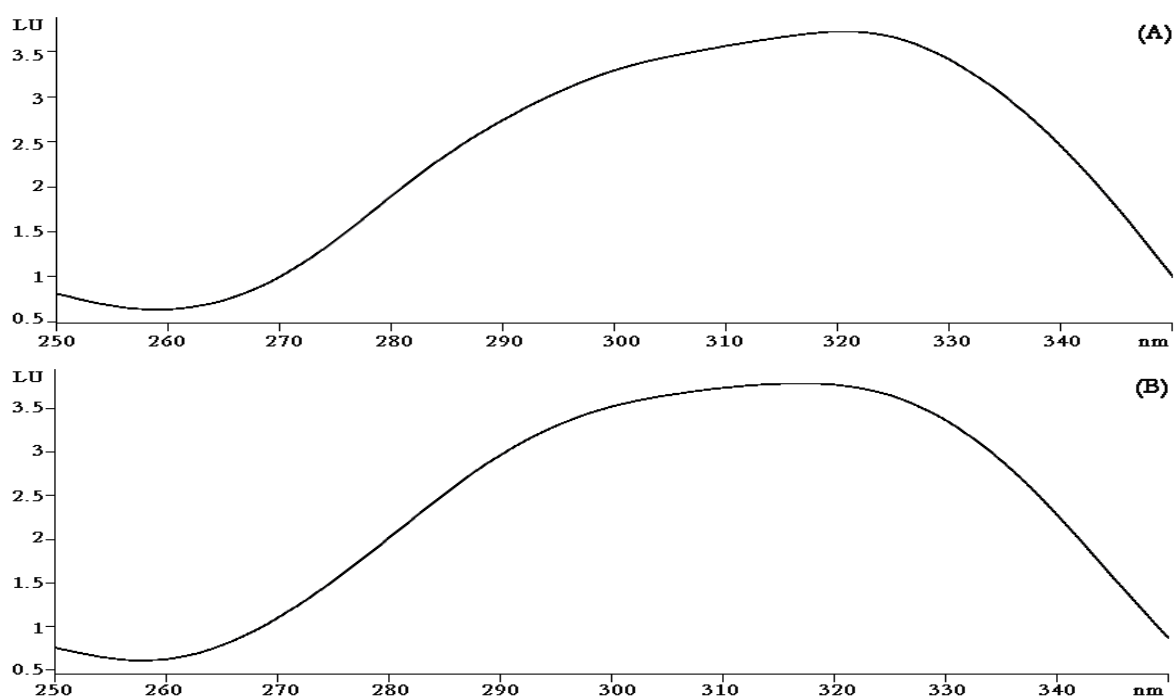


Figura 6. Espectros de excitación del (A) *t*-piceído y (B) *t*-resveratrol, y emisión del (B) *t*-piceído y (C) *t*-resveratrol en disolución de 5 mgL⁻¹

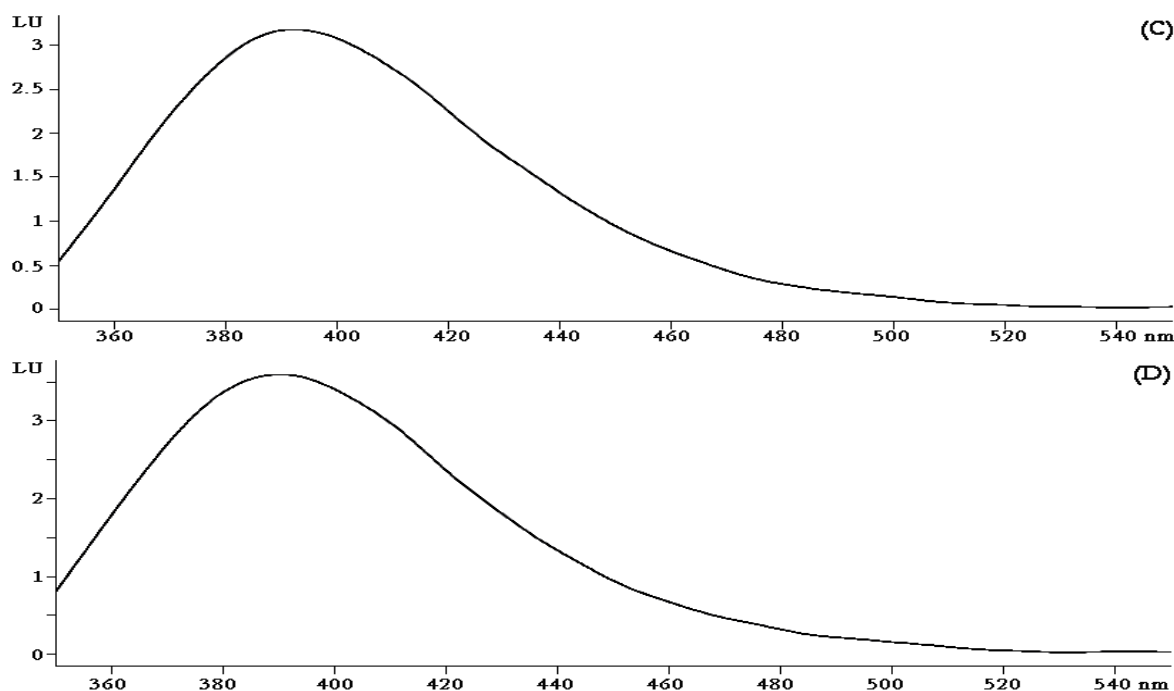


Figura 6. Espectros de excitación del (A) *t*-piceído y (B) *t*-resveratrol, y emisión del (B) *t*-piceído y (C) *t*-resveratrol en disolución de 5 mgL^{-1}

Por lo que para el método analítico en el que se combinaron la detección DAD/FLD, quedó establecida la longitud de onda de 286 nm para determinar los *c*-isómeros en la señal de absorción molecular y 318 nm de excitación y 390 nm de emisión para la señal de fluorescencia con la que se cuantificaron los *t*-isómeros.

Después de obtener las mejores condiciones cromatográficas para la cuantificación de los estilbenos, se repitieron los espectros para los dos tipos de detectores, verificándose que los cambios efectuados no afectan significativamente ni a la absorción ni a la señal fluorescente.

Espectrometría de Masas

El tercer sistema que se empleó para la detección de los analitos fue un espectrómetro de masas cuadrupolar equipado con dos fuentes de ionización, electrospray (ESI) e ionización química a presión atmosférica (APCI). Dadas las características de los compuestos objeto de estudio (polaridad y masas moleculares

medias), se realizaron pruebas con ambas fuentes por medio del FIA, a partir del seguimiento de iones negativos y positivos, se observaron únicamente iones en modo negativo, por lo que son los resultados con iones negativos los que se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Comparación de parámetros cromatográficos

Compuesto	ESI		APCI	
	Área	Anchura	Área	Anchura
Piceido	3.57×10^7	0.2463	4.02×10^7	0.2312
Resveratrol	2.70×10^7	0.1752	4.10×10^6	0.2897

De los resultados obtenidos se dedujo que para el piceido la fuente de ionización no influía de manera apreciable en la intensidad de la señal, sin embargo, para el resveratrol se obtuvieron mejores resultados con ESI, por lo cual se seleccionó esta fuente de ionización. Elegida la fuente de ionización y la polaridad de trabajo se procedió a obtener las condiciones de detección para alcanzar la máxima sensibilidad. Las experiencias se llevaron a cabo mediante el FIA a un flujo de 0.3 mLmin^{-1} y un volumen de inyección de $5 \mu\text{L}$. Los factores que afectan la respuesta del detector se estudiaron de manera individual, los resultados de los valores más adecuados de cada parámetro se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Parámetros de MS-ESI en modo negativo

Parámetros MS	Intervalo estudiado	Valor óptimo
Voltaje del fragmentador (V)	20 – 380	140
Voltaje del capilar (V)	2000 – 5600	3500
Flujo de gas secante N_2 (L/min)	2 – 12	10
Temperatura del gas secante ($^{\circ}\text{C}$)	10 – 350	300
Presión del gas nebulizador (psig)	10 – 60	30
Ganancia	5 – 20	20

Con las condiciones de detección seleccionadas se realizó un barrido (modo SCAN), entre 100 y 600 unidades de m/z , para encontrar los iones más abundantes para cada analito, que se emplearon en modo SIM, a fin de obtener la máxima sensibilidad en el análisis cuantitativo. Los espectros de masas se muestran en la Figura 7.

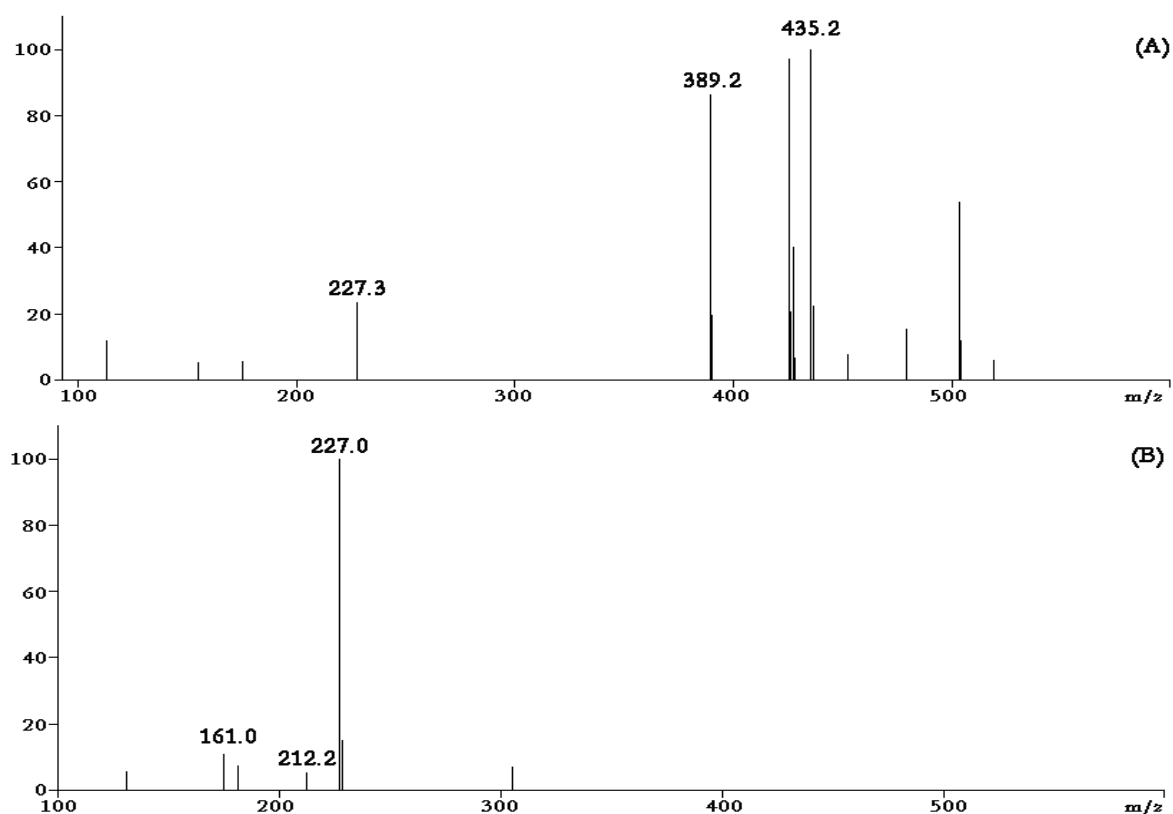


Figura 7. Espectros de masas de disoluciones acuosas de (A) piceído y (B) resveratrol en concentración de 5 mgL^{-1} por LC-MS-ESI

En la figura se presentan solo los espectros de masas de los isómeros *trans*, puesto que los correspondientes a los *cis* son idénticos, lo que se esperaba lógicamente debido a que se trata de estereoisómeros *trans/cis*.

En la Tabla 3 se presentan los iones usados para la cuantificación y confirmación de los analitos.

Tabla 3. Iones (m/z) para la cuantificación y confirmación por MS/MS-ESI

Compuestos	Ion de cuantificación (m/z)	Iones de confirmación (m/z)
<i>t</i> -/ <i>c</i> -piceido	389.2	435.2 227.0
<i>t</i> -/ <i>c</i> -resveratrol	227.0	212.2 161.0

Columna cromatográfica

En la bibliografía consultada, como ya se ha comentado, no se encontraron métodos por LC para la determinación de estos analitos en miel, por lo que se utilizaron inicialmente para el análisis de estos compuestos las condiciones cromatográficas propuestas para otras matrices.

Como ya se comentó anteriormente, el mecanismo de reparto en fase inversa es el más utilizado por lo que todas las pruebas se realizaron con este tipo de columnas cromatográficas.

Los experimentos se realizaron con una fase móvil de formiato de amonio 20 mM y MeOH en régimen isocrático (70:30, v/v), las pruebas se llevaron a cabo con mezcla de patrones, miel sin adicionar y adicionada con una cantidad conocida de los analitos usando la columna Zorbax Eclipse XDB de 150 mm.

En este caso no se logró la resolución de la mezcla de patrones, pues se presentó un solapamiento entre el *c*-piceido y su producto de oxidación en DAD, cabe señalar que en las experiencias realizadas con la miel, se observaron algunas interferencias de la matriz a los tiempos de retención de los analitos. Se probaron las columnas Gemini C₁₈ de igual longitud, con las cuales se logró una mejor resolución entre los picos de los analitos antes mencionados. Lo que nos llevó a pensar que sería necesario el empleo de estas columnas pero con una mayor longitud.

A continuación, se ensayaron las columnas Synergi Max-RP y Gemini C₁₈ de 150 mm, utilizando la misma fase móvil. La resolución con estas columnas fue mejor, sin embargo, la columna Synergi MAX-RP presentaba una menor eficacia (Figura 8). Por esta razón, el resto del estudio se realizó con la columna Gemini C₁₈ de 150 mm de longitud, con la que se obtuvieron picos simétricos como se observa en los cromatogramas siguientes.

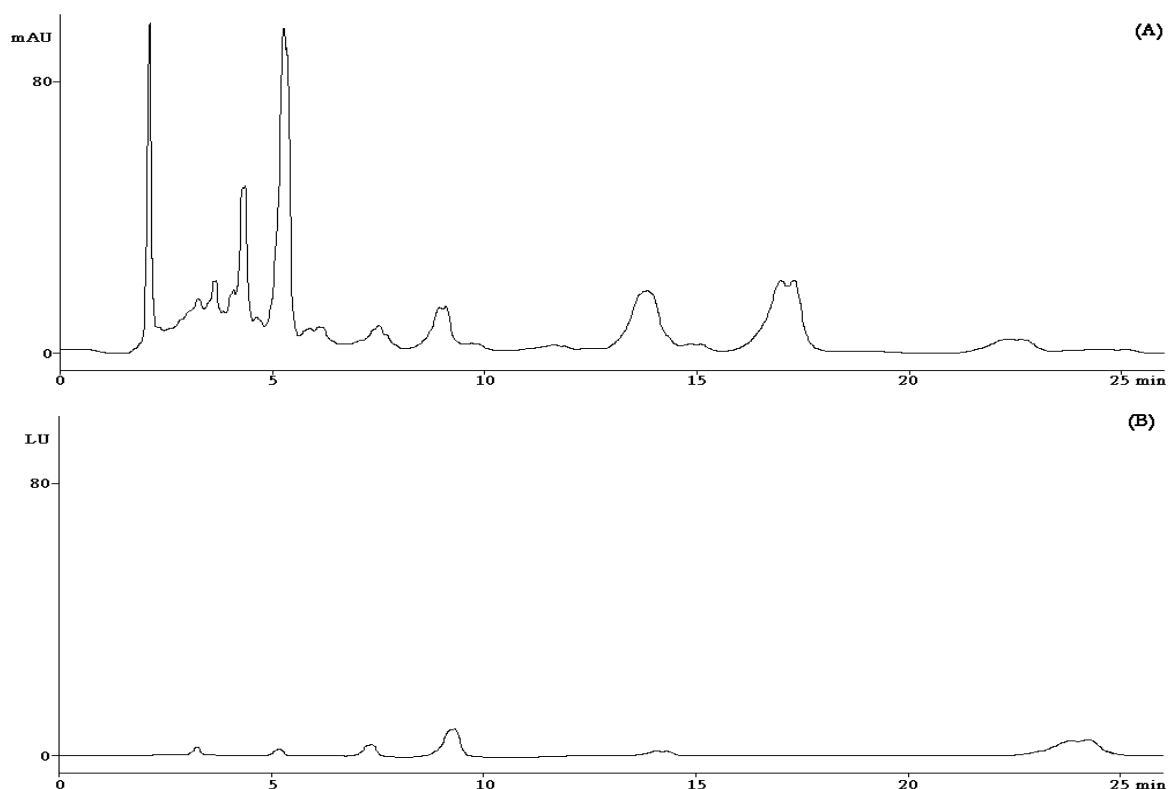


Figura 8. Cromatogramas de miel adicionada con 0.4 mgkg^{-1} de patrones obtenidos con la columna Synergi MAX-RP de 250 mm de largo

Composición de la fase móvil

Para comenzar el estudio de la composición de la fase móvil más adecuada para llevar a cabo la determinación de los compuestos, se utilizaron inicialmente, las condiciones propuestas en artículos dedicados a otras matrices. En dichos trabajos se utilizaban sales o ácidos con un modificador orgánico (metanol o acetonitrilo) realizándose la separación en régimen isocrático o bien con gradiente de elución. Por lo cual, se realizaron una serie de experiencias en las que se empleó, además de

MeOH, en un caso formiato amónico 30 mM y en otro ácido fórmico 0.1%, para establecer cual proporcionaba mejores resultados.

Las pruebas iniciales se llevaron a cabo con formiato amónico o ácido fórmico a una concentración de 30 mM, con un 30% de MeOH, como puede observarse en los cromatogramas correspondientes en las y Figura 10, se aprecia una mayor retención de los analitos con formiato amónico, sin embargo el perfil del cromatograma es más sucio que con ácido fórmico, por lo que se decidió seleccionar y realizar las pruebas posteriores con ácido fórmico, a fin de establecer la concentración más adecuada para el análisis.

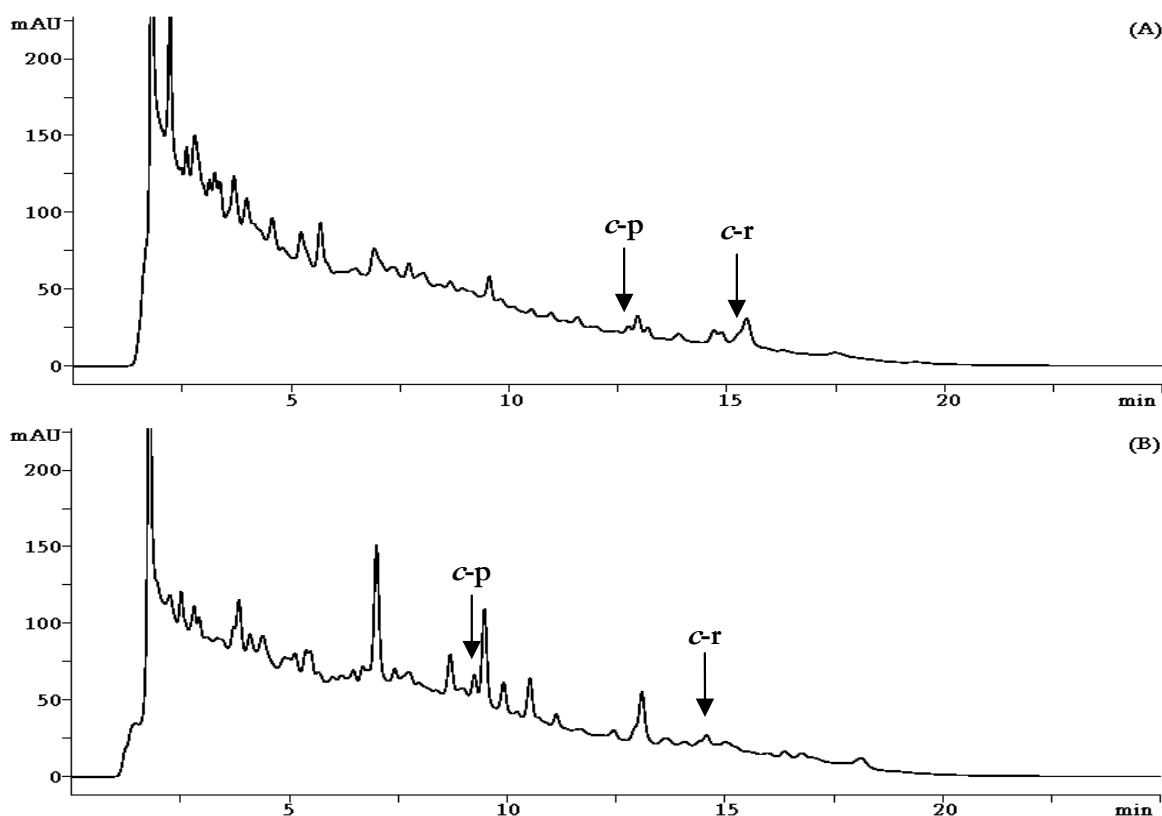


Figura 9. Cromatogramas de miel diluida en agua y a la que se adicionó 0.8 mgkg⁻¹ con fase móvil (A) formiato amónico 30 mM/MeOH y (B) ácido fórmico 0.1%/MeOH por DAD

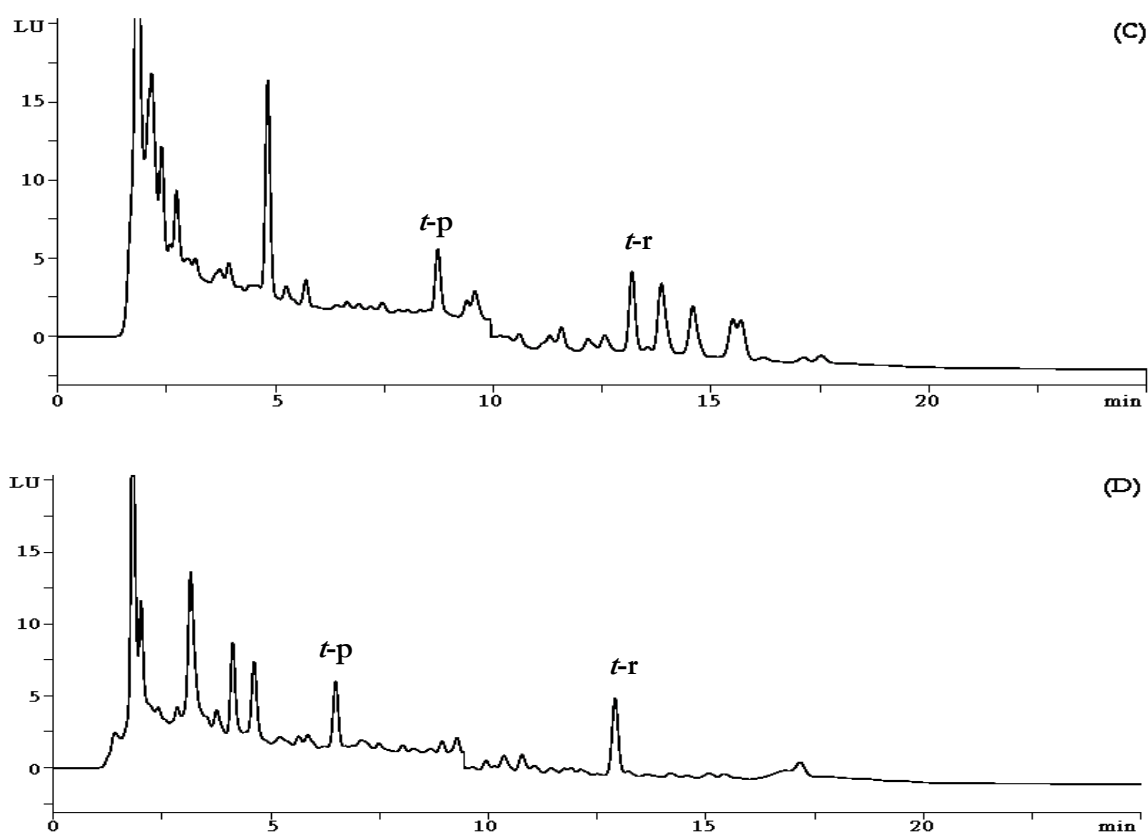


Figura 10. Cromatogramas de miel diluida en agua y a la que se adicionó 0.8 mgkg^{-1} empleando como fase móvil (C) formiato amónico 30 mM/MeOH y (D) ácido fórmico 0.1%/MeOH por FLD

Respecto a la concentración de ácido fórmico necesaria, ésta se varió en un intervalo comprendido entre 0.1 y 2%. Los resultados mostraron una disminución en la retención y un aumento de la señal de los analitos a medida que se incrementaba la concentración de ácido fórmico hasta 1%, a una concentración mayor el incremento no era muy marcado, por lo que se seleccionó como concentración de trabajo el 1%.

Una vez establecida la composición de la fracción acuosa de la fase móvil, se procedió a estudiar la influencia que ejercía la naturaleza del modificador orgánico sobre la separación. Se realizaron una serie de experiencias en las que se sustituyó el MeOH por acetonitrilo en la fase móvil, manteniéndose su porcentaje en el 30% y el flujo de 1 mLmin^{-1} . De los cromatogramas que se obtuvieron se dedujo que el empleo de acetonitrilo, como modificador orgánico, mejoraba tanto la eficacia

como la simetría de los picos, además reducía la retención de los analitos. Por estos motivos se seleccionó el acetonitrilo como componente de la fase móvil.

A continuación se estudió la posibilidad de utilizar un régimen de gradiente para solventar el solapamiento de un componente de la miel con el ϵ -piceído. Se ensayaron diferentes gradientes, no consiguiéndose en ningún caso mejorar la resolución, por lo que se descartó esta opción, seleccionándose el régimen isocrático.

Por último, para establecer el porcentaje de acetonitrilo más adecuado, se realizaron una serie de ensayos, en los que se varió dicho porcentaje. De los resultados que se obtuvieron y que aparecen en la Tabla 4 se desprende, que como era de esperar, al aumentar el porcentaje se produjo una disminución en la retención de los compuestos, reducción que fue más acusada para los compuestos más retenidos.

Tabla 4. Tiempo de retención en función del porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil

ACN %	Tiempos de retención (min)			
	t -pic	ϵ -pic	t -resv	ϵ -resv
40	3.6	5.2	8.1	7.8
35	4.8	5.9	9.3	10.5
30	5.3	6.2	10.5	15.7
25	5.7	8.5	15.4	24.2
20	6.3	9.2	18.9	28.0

A través de la inyección de muestras de miel a las que se añadió una cantidad conocida de patrones se seleccionó como más adecuado un porcentaje del 25%, puesto que proporcionó además de una buena resolución un tiempo de análisis adecuado.

Cabe señalar que porcentajes mayores al 40% provocaron un solapamiento del compuesto menos retenido (t -piceído) con el pico del frente.

Temperatura

Para estudiar la influencia que la temperatura ejercía sobre la separación se realizaron una serie de experiencias variándola entre 25 y 50 °C, en intervalos de 5 °C. Los resultados obtenidos se evaluaron en función de la relación señal/ruido (S/N) y el tiempo de retención de los picos. Los resultados se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Influencia de la temperatura en los parámetros cromatográficos (MS)

Compuesto	Parámetro	Temperatura (°C)					
		25	30	35	40	45	50
<i>t</i> -piceído	t_R	6.0	5.7	5.4	5.2	5.0	4.8
	S/N	35.8	36.5	33.5	4.4	24.9	67.6
<i>ε</i> -piceído	t_R	8.8	8.5	8.1	7.7	7.2	6.9
	S/N	140.1	155.8	82.2	8.8	23.2	29.8
<i>t</i> -resveratrol	t_R	17.1	15.3	13.8	12.7	11.5	10.6
	S/N	185.4	242.1	146.3	9.2	80.7	36.7
<i>ε</i> -resveratrol	t_R	31	24.3	21.9	19.8	17.8	16.2
	S/N	425.8	772.9	56.6	0.5	30.2	291.8

De la observación de los datos se dedujo que la utilización de temperaturas inferiores a 30 °C provocaba un incremento innecesario en el tiempo de análisis sin conducir a aumentos en la resolución, ya que tanto los analitos como los componentes de la miel se desplazaban igual, temperaturas mayores de 35 °C provocaban una disminución en la señal de los analitos sin aumentar la resolución, razón por la cual se seleccionó como temperatura de separación la de 30 °C, además de que esta temperatura conducía a una mejora en la simetría de los picos correspondientes a los compuestos que se pretenden determinar.

Volumen de inyección

Por último se estudió la influencia del volumen de inyección sobre la forma y simetría de los picos, con la finalidad de establecer un volumen máximo que permitiera obtener límites de detección menores. El inyector automático utilizado permite variar el volumen de 20 a 100 µL. Como era de esperar, a medida que

aumentaba el volumen de inyección se producía un incremento en el tamaño del pico correspondiente al compuesto de interés, pero producía un solapamiento entre picos de la matriz y el *c*-piceido, por lo que se eligió un volumen de inyección de 20 μL .

Condiciones cromatográficas finales

Como resultado de los estudios realizados se propone para la separación del *t*-piceido, *c*-piceido, *t*-resveratrol y *c*-resveratrol la utilización de una columna Gemini C_{18} 110 Å (150 x 4.6 mm, 5 μm) y una fase móvil compuesta por ácido fórmico 1% en agua y acetonitrilo (75:25, v/v), en régimen isocrático, con un flujo de fase móvil de 1 mLmin^{-1} , termostataando la columna a 30 °C y utilizando un volumen de inyección de 20 μL . En la se muestran los cromatogramas correspondientes a la inyección de 20 μL de una disolución patrón de los 4 analitos obtenidos por los tres sistemas de detección empleados.

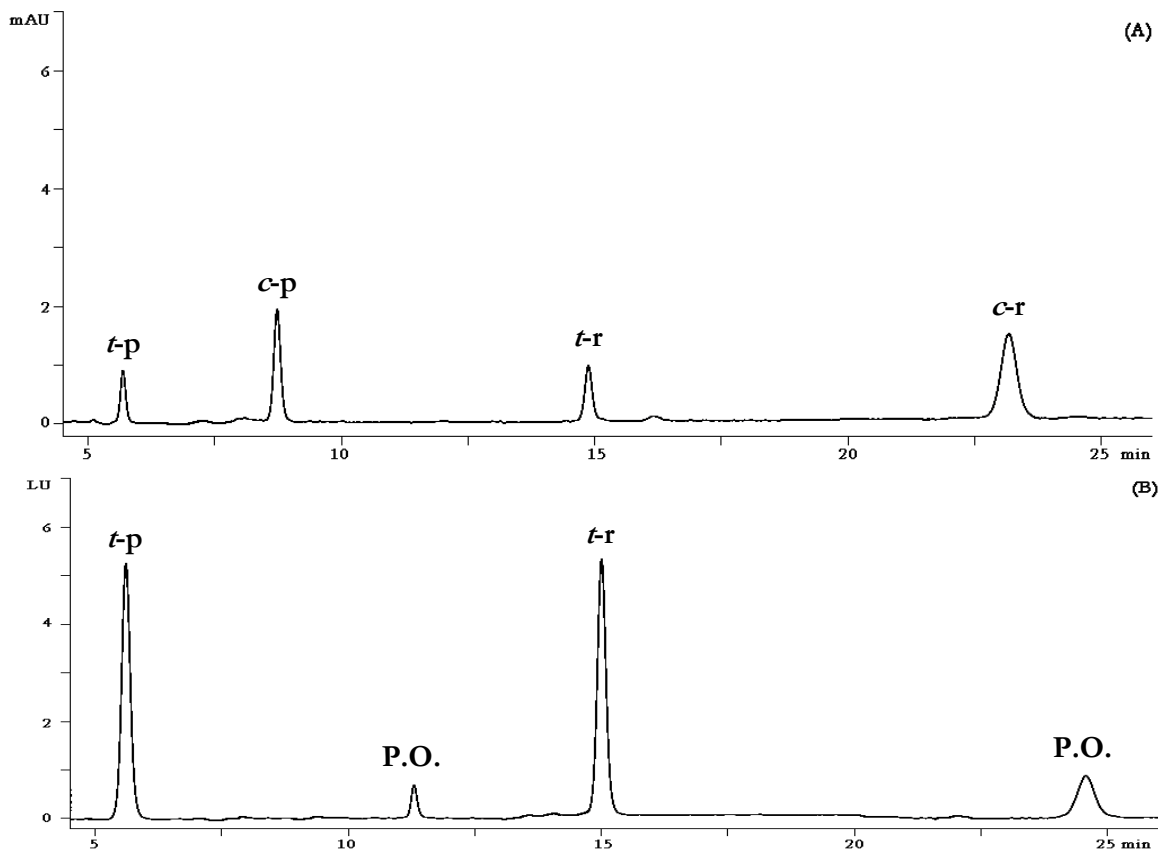


Figura 11. Cromatogramas de mezcla de patrones de 0.6 mgL^{-1} por (A) DAD y (B) FLD

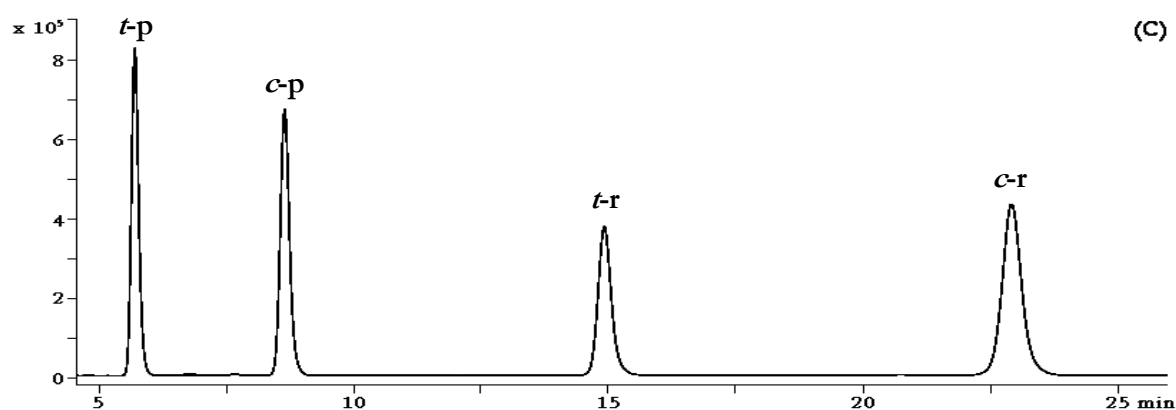


Figura 11. (Cont.) Cromatogramas de mezcla de patrones de 0.6 mgL⁻¹ por (C) MS-ESI⁻

V.3.4. Tratamiento de la muestra

Una vez seleccionadas las condiciones cromatográficas, el siguiente estudio que se realizó tuvo como finalidad desarrollar un procedimiento de limpieza–concentración que permitiese eliminar por un lado las posibles interferencias de la matriz y al mismo tiempo realizar una concentración de los analitos, esto con el fin de detectar y cuantificar menores concentraciones de los mismos.

Para realizar dicho tratamiento se pensó en la utilización de la extracción en fase sólida ya que dicho tratamiento ha sido utilizado con éxito para la determinación de otros analitos en mieles por nuestro grupo de investigación.

Extracción en fase sólida

El motivo de plantearse la necesidad de realizar un tratamiento previo de las muestras de miel se debió a que en ensayos previos se observó que la inyección directa de la miel diluida en agua, adicionada y sin adicionar con patrones, no era posible ya que aparecieron algunos solapamientos, de los compuestos de interés con componentes de la miel, que impedían la correcta determinación al emplearse los detectores DAD y FLD, para el detector MS dichas interferencias no se observaron debido a que se trabajó en modo SIM para aumentar la selectividad del

detector. Pero como se pretende desarrollar un método válido mediante la utilización de los sistemas de detección indicados había que tratar de solventar esas interferencias.

Para seleccionar el tipo de relleno más adecuado se prepararon por triplicado 3 tipos de disoluciones de la siguiente manera: (1) disoluciones en agua de los compuestos de interés en una concentración de 5 mgL^{-1} ; (2) diluciones de 5 g de miel multifloral que se disolvieron en 10 mL de agua; (3) diluciones de 5 g de miel a la que se adicionó el volumen necesario de una disolución patrón de los 4 analitos para que al diluir con agua a 10 mL la concentración de los analitos añadidos fuese de 5 mgL^{-1} .

Una vez activados los cartuchos haciendo pasar 5 mL de metanol seguidos de 5 mL de agua, se hicieron pasar por los distintos cartuchos, los 10 mL de las muestras anteriormente preparadas y a continuación se realizó una etapa de lavado con 5 mL de una solución acuosa al 10% de metanol, se procedió a la elución de los compuestos retenidos con 2 mL de metanol, 20 μL de los cuales fueron posteriormente inyectados en el sistema cromatográfico, en las condiciones establecidas. En la Tabla 6 se presentan los porcentajes de recuperación obtenidos con los cartuchos estudiados.

Tabla 6. Porcentajes de recuperación promedio obtenidos con los diferentes cartuchos estudiados, (n=3)

Compuestos	Oasis™ HLB	Strata™X	Waters® C ₁₈
<i>t</i> -piceído	76 ± 3.6	100 ± 3.1	83 ± 2.9
<i>c</i> -piceído	79 ± 4.3	89 ± 3.7	83 ± 3.3
<i>t</i> -resveratrol	84 ± 4.8	93 ± 5.8	79 ± 5.8
<i>c</i> -resveratrol	75 ± 4.2	96 ± 4.7	83 ± 4.1

A partir de los resultados obtenidos se pudo deducir que la mejor recuperación se obtenía con el empleo de los cartuchos C₁₈ poliméricos Strata™ X, por lo que se seleccionó para el tratamiento de las muestras de miel.

Una vez seleccionado el tipo de sorbente, el siguiente paso que se realizó tuvo como finalidad la optimización de las etapas del procedimiento de extracción en fase sólida.

Cantidad de muestra

En primer lugar, se evaluó el efecto que el disolvente empleado para diluir la muestra podría ejercer, para lo cual se realizaron 3 experiencias en las cuales 5 g de miel se disolvieron en ácido fórmico 1%, en hidróxido de amonio 20 mM y en agua, obteniéndose para todos los casos resultados similares en cuanto al perfil de los cromatogramas y los porcentajes de recuperación de los compuestos, por lo cual se optó por disolver la miel en agua.

A continuación se estudió la cantidad de muestra más apropiada que permitiera la retención de los analitos sin sobrepasar la capacidad del sorbente y al mismo tiempo obtener límites de cuantificación bajos. Para lo cual se prepararon distintas disoluciones acuosas de miel, disueltas en 10 mL de agua ultrapura, conteniendo entre 5 y 7 g, ya que cantidades superiores generaban disoluciones muy viscosas, a las que se añadió una cantidad conocida de mezcla de patrones. En la Tabla 7 se presentan los porcentajes de recuperación obtenidos.

Tabla 7. Porcentajes de recuperación en función de la cantidad de miel

Compuesto	Cantidad de miel		
	5 g	6 g	7 g
<i>t</i> -piceido	95	97	89
<i>c</i> -piceido	74	81	72
<i>t</i> -resveratrol	65	83	71
<i>c</i> -resveratrol	74	77	49

De los resultados obtenidos se dedujo que cantidades superiores a 6 g contenidas en 10 mL impiden la retención del analito en el sorbente, al compararlas con los porcentajes de recuperación obtenidos con patrones acuosos. Por lo que se

estableció la cantidad de muestra en 6 g diluida con 10 mL de agua, pasándose en su totalidad a través de los cartuchos.

Lavado

Con esta etapa se pretendía eliminar los componentes de la miel menos retenidos por el sorbente y al mismo tiempo evitar la elución de los compuestos de interés, lo cual se comprobó por la limpieza de los cromatogramas y los porcentajes de recuperación. Para establecer tanto la composición como el volumen que se debía emplear y que permitieran alcanzar dichos objetivos, se realizaron una serie de experiencias.

En cuanto a la composición del líquido de lavado el primer ensayo que se llevó a cabo consistió en establecer la naturaleza del disolvente orgánico, para ello se prepararon disoluciones acuosas al 10% de metanol y de acetonitrilo, que se emplearon en un volumen de 10 mL como líquidos de lavado, obteniéndose mayores porcentajes de recuperación con metanol, por lo que fue este el disolvente seleccionado como de líquido de lavado.

Una vez establecido el disolvente orgánico se procedió a establecer el contenido de metanol en la disolución acuosa, se ensayaron disoluciones con porcentajes comprendidos entre el 5 y el 20%, los porcentajes de recuperación obtenidos se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Porcentajes de recuperación según la cantidad de MeOH en líquido de lavado

Compuestos	Cantidad de metanol en agua (%)			
	5	10	15	20
<i>t</i> -piceido	-	86	10	5
<i>c</i> -piceido	82	71	86	83
<i>t</i> -resveratrol	77	74	71	68
<i>c</i> -resveratrol	92	76	53	52

De los resultados obtenidos se dedujo que a partir del 10% disminuía el porcentaje de recuperación, mientras que porcentajes del 5% impedían la cuantificación del *t*-piceído por solapamiento con el frente, por lo que se fijó el contenido de metanol en 10%. Sin embargo, con estas condiciones aún se obtenía un cromatograma con mucho frente, optándose por estudiar si el pH del líquido de lavado influía en el perfil del cromatograma. Las pruebas se realizaron añadiendo 2% de ácido fórmico o hidróxido de amonio concentrados a una disolución que contenía 10% de metanol, los cromatogramas obtenidos se muestran en la Figura 12.

De los cromatogramas obtenidos se dedujo que el pH básico favorece la eliminación de componentes de la miel. La siguiente prueba consistió en determinar la concentración de hidróxido de amonio necesaria, para lo cual se ensayaron concentraciones comprendidas entre el 0.5 y el 4%, los resultados mostraron que a partir del 1% no había mejoría en el perfil del cromatograma, por lo cual se estableció como líquido de lavado una disolución de hidróxido de amonio al 1% con un 10% de metanol.

Se ensayaron distintos volúmenes a emplear de la disolución seleccionada en la etapa de lavado, de los resultados que se obtuvieron se pudo deducir que la utilización de volúmenes superiores a 5 mL no suponía una mejora en cuanto a la limpieza del cromatograma, y por el contrario implicaba un aumento en el tiempo de análisis, por lo cual se optó por utilizar un volumen en 5 mL.

Elución

Esta etapa se ensayó únicamente con metanol, puesto que en las pruebas anteriores realizadas con patrones, se observó que la elución de los analitos retenidos en el sorbente era cuantitativa, razón por la cual únicamente se buscó el volumen de eluyente necesario.

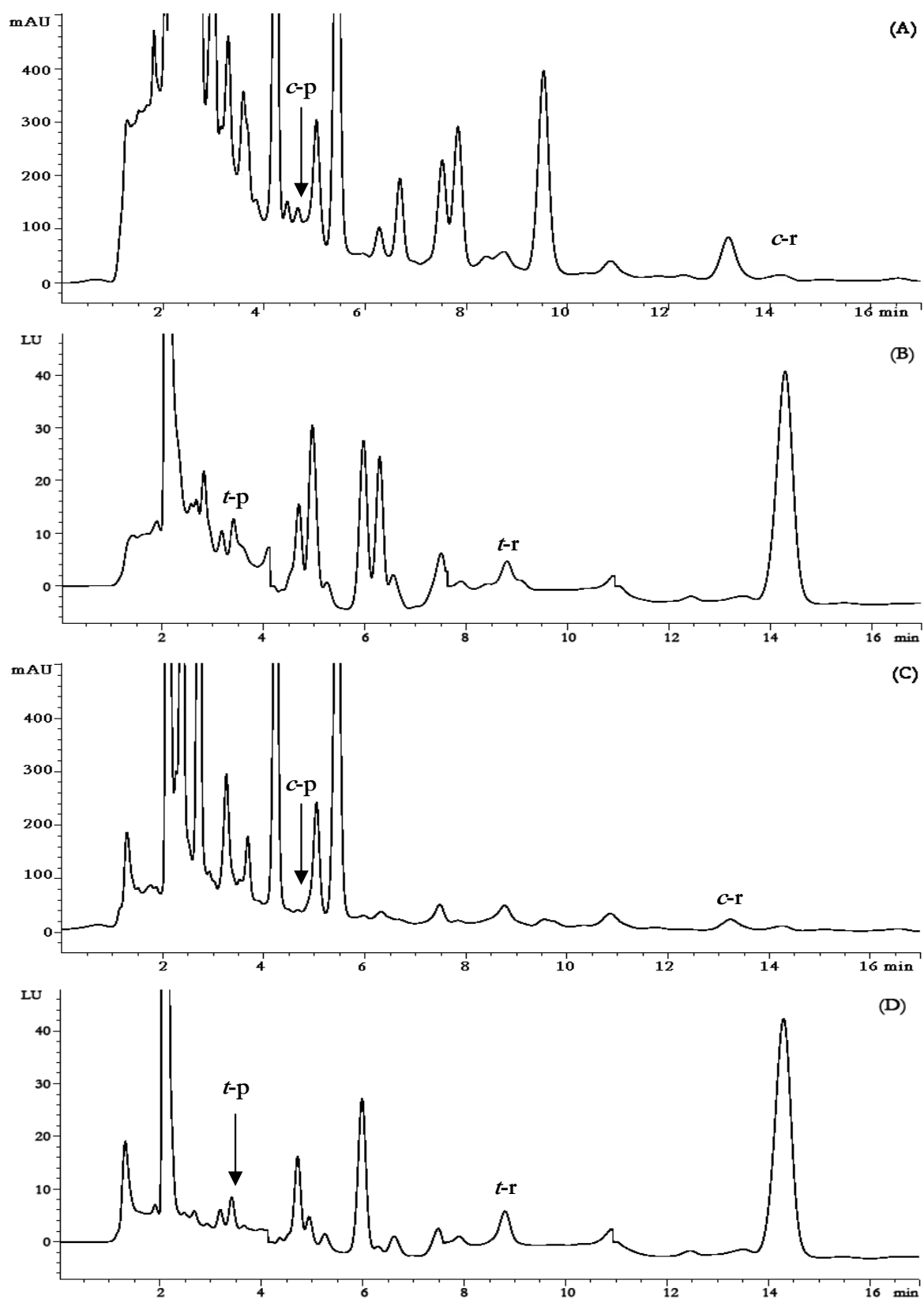


Figura 12. Cromatogramas de extractos de miel adicionada con 0.8 mgkg^{-1} usando como líquido de lavado MeOH 10% con (A y B) ácido fórmico y (C y D) amoniaco por DAD y FLD, respectivamente

Se ensayaron diferentes volúmenes de metanol desde 2 mL hasta 10 mL, ya que volúmenes mayores no mejoraban el porcentaje de recuperación. Inicialmente se hicieron pasar 2 mL, se recogió el extracto y se inyectó, posteriormente se pasó 1 mL más y se inyectó, comprobándose que aún seguía habiendo compuestos retenidos en el sorbente. Se continuaron estas pruebas haciendo pasar mayor cantidad de metanol, deduciéndose que a partir de 10 mL no se lograba arrastrar una cantidad apreciable de compuestos, dichos resultados se presentan en la Tabla 9. Ese volumen implicaba añadir al tratamiento de muestra, una etapa de concentración para conseguir rebajar los límites de detección.

Tabla 9. Porcentajes de recuperación según el volumen de elución de metanol

Volumen MeOH (mL)	<i>t</i> -piceido	<i>c</i> -piceido	<i>t</i> -resveratrol	<i>c</i> -resveratrol
2	2	3	5	4
5	21	22	23	25
10	75	82	88	77
15	76	81	89	78

La evaporación del eluyente se realizó utilizando bien el rotavapor o bajo corriente de N₂, obteniéndose con ambos procedimientos resultados similares, por lo que se decidió utilizar el rotavapor, pues permitía reducir el tiempo de evaporación y no implicaba pérdida de los analitos.

Para la reconstitución del residuo seco se probó utilizar agua, ácido fórmico 1% (v/v), formiato amónico 30 mM y fase móvil (ácido fórmico 1%/acetonitrilo 75:25), empleando en todos los casos 1 mL, observándose una redisolución total del residuo con la fase móvil, que fue la finalmente elegida, siendo necesario establecer el volumen de fase móvil, que permitiera por un lado la disolución total del residuo seco y por otro no incrementara los límites de detección. Los volúmenes variaron desde 0.5 hasta 2 mL, observándose a partir de 1 mL la redisolución total del residuo.

Tratamiento de muestra propuesto

Después de estas experiencias el proceso de extracción en fase sólida con cartucho C_{18} polimérico Strata™ X, quedó establecido con las condiciones que se resumen en la Figura 13.

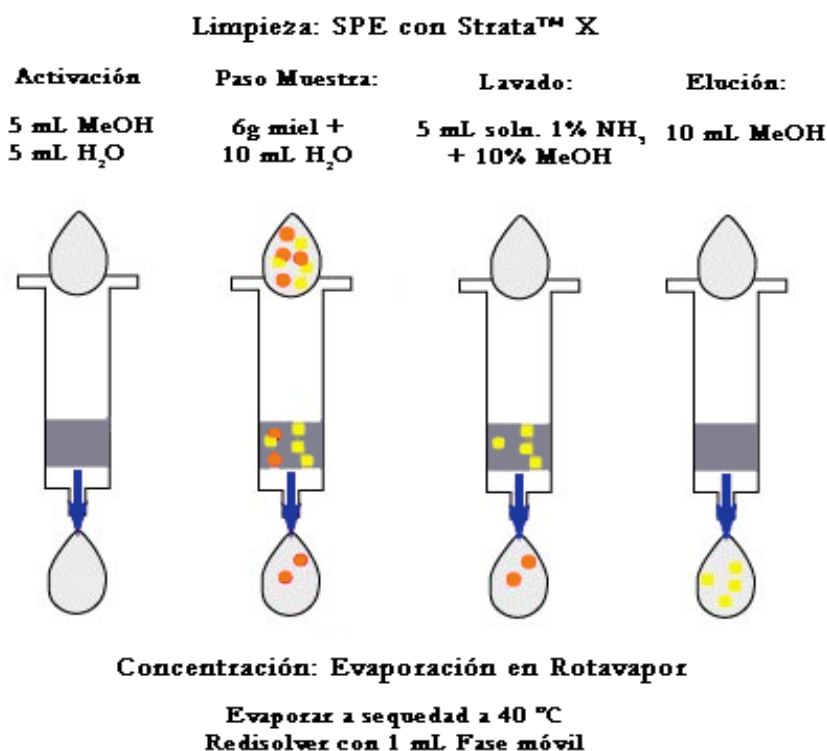


Figura 13. Esquema del procedimiento de SPE desarrollado

Aplicando este procedimiento de extracción, se analizaron muestras de miel de diferentes orígenes botánicos (romero, milflores y brezo), obteniéndose los cromatogramas para el detector de MS mostrados en la Figura 14.

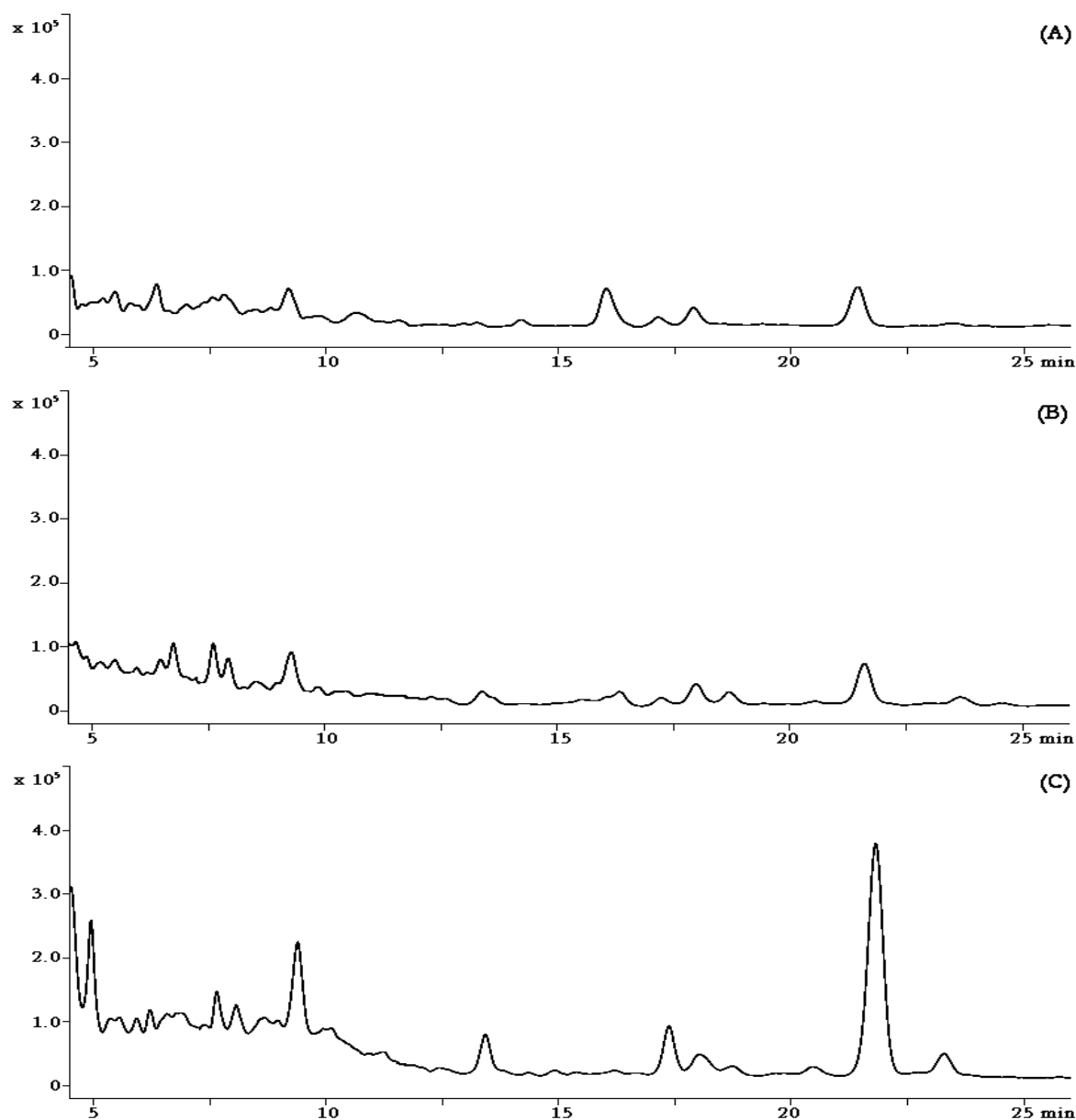


Figura 14. Cromatogramas de extractos de miel (A) romero, (B) multifloral y (C) brezo por LC-MS

Como se observa en la figura el perfil de los cromatogramas es ligeramente distinto, siendo más marcada esta diferencia en la miel de brezo, mientras que para la miel de romero y multifloral son un poco más parecidos, en el apartado de validación se han explicado las implicaciones de estas diferencias.

V.3.5. Validación de la Metodología Analítica

La validación del método se llevó a cabo siguiendo las directrices marcadas por las guías VICH GL1 y GL2 ^[177,178], el informe técnico de la IUPAC ^[179] y el documento SANCO/10476/2003 ^[180]. Se evaluó la selectividad, límites de detección y cuantificación, precisión, linealidad y exactitud para la metodología analítica propuesta con los tres detectores que se han empleado.

Selectividad

Para comprobar la selectividad en los tres tipos de mieles, se aplicó el método desarrollado para obtener extractos de miel a los que no se adicionó ningún compuesto y extractos de miel a los que se adicionó los analitos en una concentración de 0.1 mgkg^{-1} . En la Figura 15 se muestran los cromatogramas de los extractos de miel obtenidos.

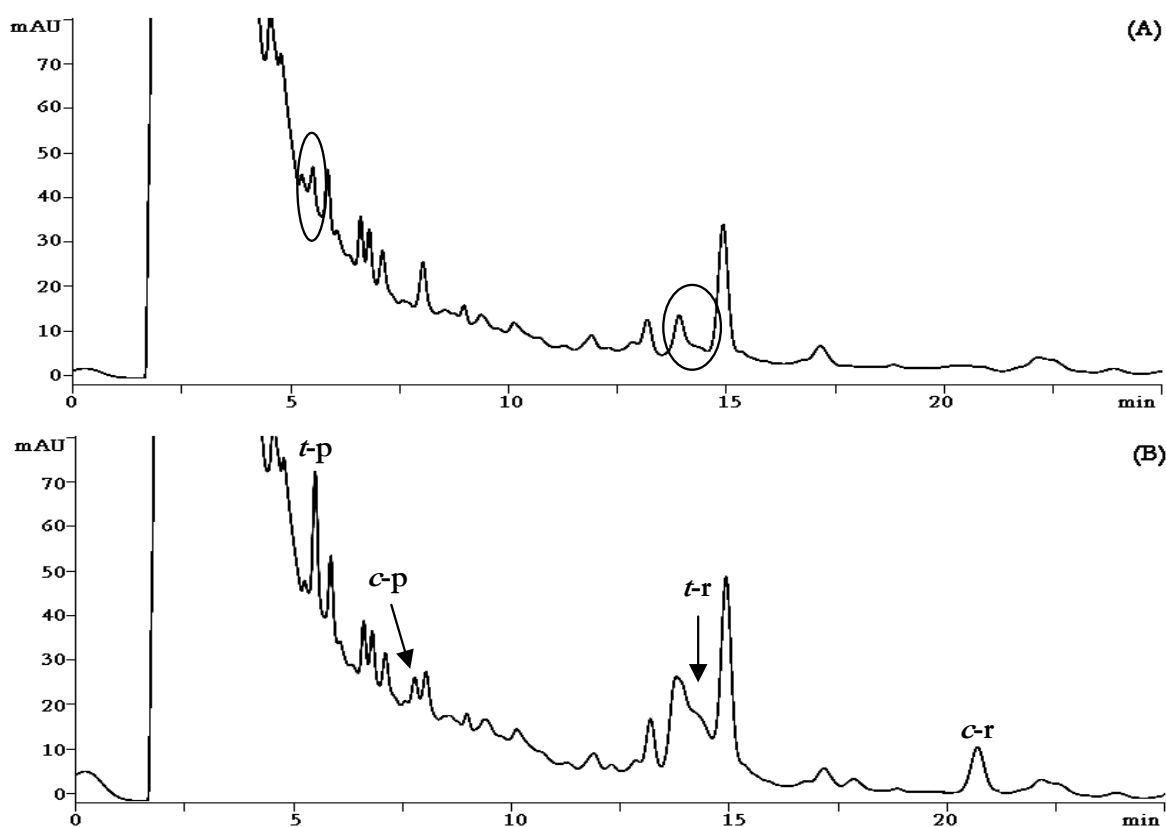


Figura 15. Cromatogramas de extractos de miel mil flores, empleando DAD: (A) miel sin adicionar y (B) miel adicionada con patrones 0.1 mgkg^{-1}

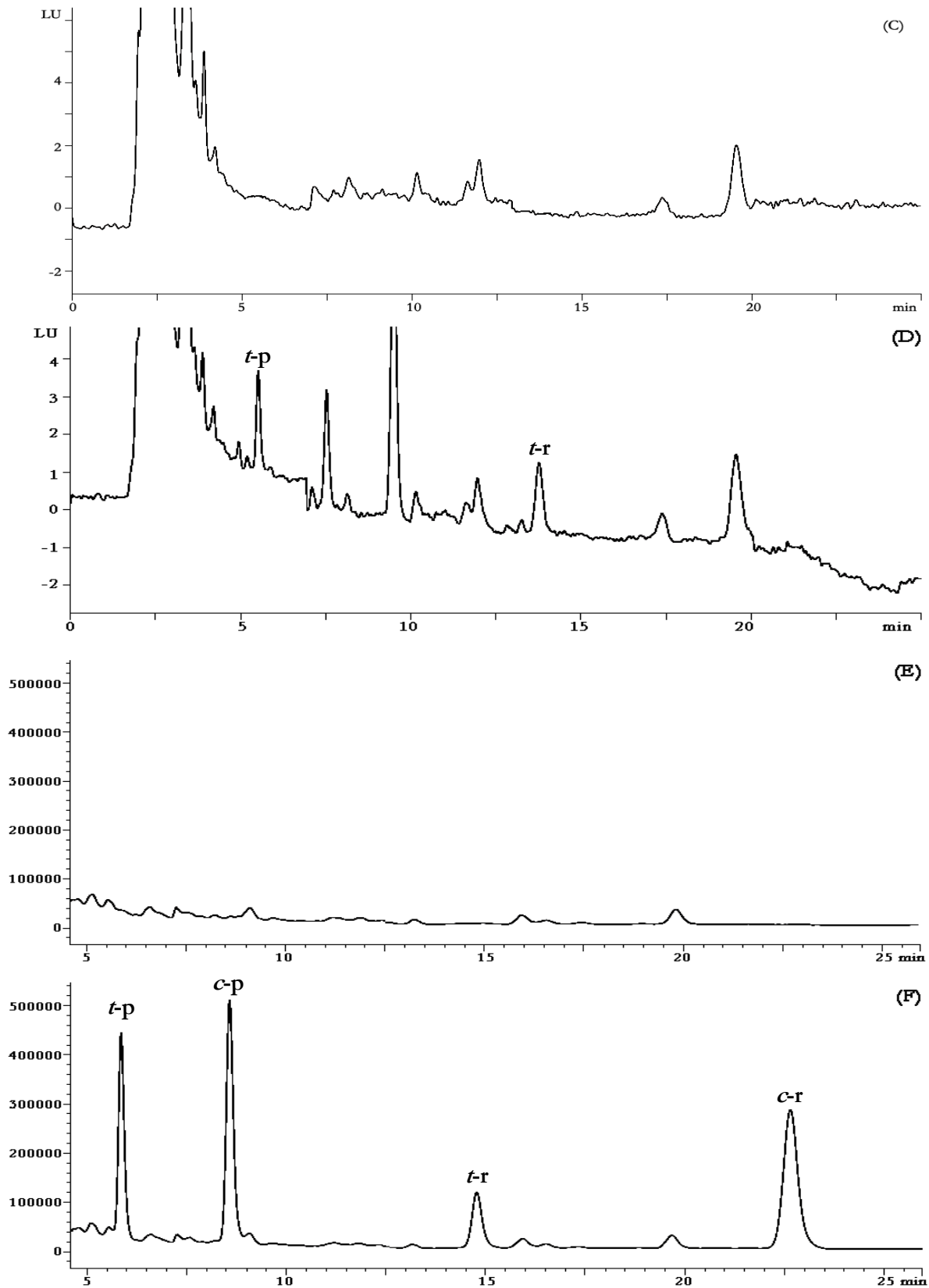
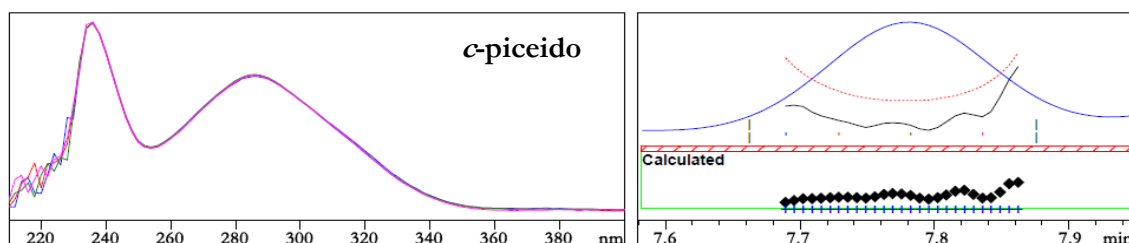


Figura 15. (Cont.) Cromatogramas de extractos de miel mil flores, empleando FLD: (C) miel sin adicionar y (D) miel adicionada con patrones 0.1 mgkg^{-1} ; empleando MS-ESI: (E) miel sin adicionar y (F) miel adicionada con patrones 0.1 mgkg^{-1}

Se puede observar en la Figura 15 A y B, en la señal del DAD, la presencia de una serie de picos que eluyen en la zona del *t*-resveratrol y *t*-piceído que interfieren en el análisis, no así en el caso de los *c*-isómeros, lo que nos permite usar este detector para su correcta cuantificación. En cambio en los cromatogramas (C y D) empleando FLD no eluye ningún compuesto al tiempo de retención de los *t*-isómeros en ningún tipo de miel, por lo tanto esto justifica la combinación de DAD/FLD para la cuantificación simultánea de los compuestos de interés, quedando así demostrada la selectividad para este conjunto de detectores.

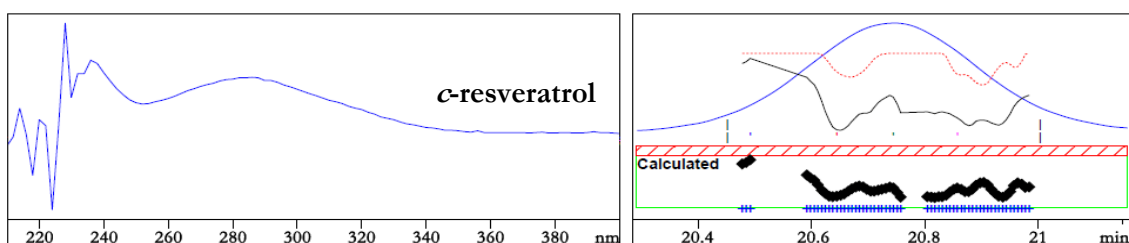
En la Figura 15 (E y F) los cromatogramas obtenidos empleando la detección por MS-ESI al extraer el correspondiente ion, no se observó ningún pico a los tiempos de retención de los analitos, comprobándose la selectividad para LC-MS.

Otro factor estudiado como complemento a la selectividad ha sido la pureza de pico para cada uno de los analitos. En el caso de los *cis*-isómeros se empleó el DAD, evaluándose en extractos de miel adicionada con los compuestos de interés. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 16.



-> The purity factor is within the calculated threshold limit. <-

Purity factor : 992.152 (27 of 27 spectra are within the calculated threshold limite.)
Threshold : 962.587 (Calculated with 27 of 27 spectra)



-> The purity factor is within the calculated threshold limit. <-

Purity factor : 981.139 (24 of 27 spectra are within the calculated threshold limite.)
Threshold : 951.909 (Calculated with 24 of 27 spectra)

Figura 16. Purezas del pico cromatográfico de α -piceído y α -resveratrol en miel

Los resultados obtenidos han permitido concluir que no coeluye ningún compuesto con los analitos, ya que el grado de similitud espectral o coincidencia frente al tiempo, durante la elución del pico cromatográfico, presenta un perfil próximo a 980, lo cual indica que el compuesto es puro. Resultados similares se obtuvieron para la forma *trans* de ambos compuestos, lo que se evaluó mediante el barrido de excitación y emisión en el FLD.

También se obtuvieron los espectros de masas para cada compuesto en los extractos de miel, para verificar la aparición de algún fragmento nuevo, con respecto a los espectros de patrones en disolvente de la Figura 7. En la Figura 17 se muestran los espectros de extracto de miel mil flores adicionada con los analitos.

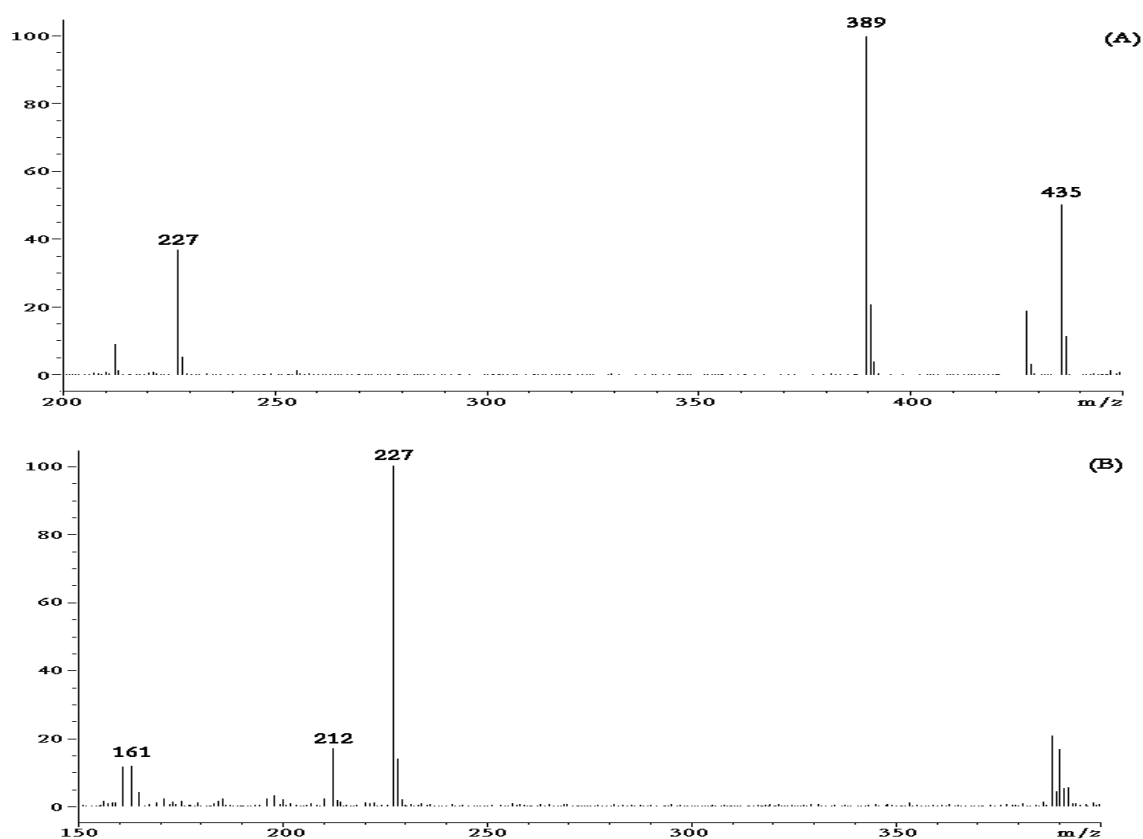


Figura 17. Espectros obtenidos por MS-ESI de (A) *t/c*-piceído y (B) *t/c*-resveratrol en miel

Como se puede observar en las figuras, los iones característicos son los mismos en ambos casos, únicamente se diferencian en pequeños fragmentos que aparecen en el espectro obtenido sobre miel, pero no son significativos. A partir de esto se puede deducir que el compuesto es puro y que no existen interferentes debidos a algún compuesto de la matriz.

Límite de detección y de cuantificación

El límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) se determinaron de manera experimental mediante la inyección de una serie de extractos de miel que no contenían los compuestos de interés, blancos, midiéndose el valor de la señal analítica al tiempo de retención que eluían los analitos (ruido).

A continuación se inyectaron extractos de miel que contenían los analitos por diluciones sucesivas hasta obtener una señal de 3 y 10 veces la relación S/N para el LOD y LOQ, respectivamente. Los valores obtenidos para los diferentes orígenes botánicos estudiados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. LOD y LOQ (μgkg^{-1}) para ambos sistemas de detección

Compuesto		LC-DAD/FLD		LC-MS-ESI-	
		LOD	LOQ	LOD	LOQ
<i>t</i> -piceído	Patrón	3 ^a	10 ^a	0.6	1.9
	Romero	19 ^a	63 ^a	1.3	5.2
	Mil Flores	26 ^a	87 ^a	1.4	1.4
	Brezo	28 ^a	93 ^a	3.2	3.2
<i>c</i> -piceído	Patrón	3 ^b	10 ^b	0.4	1.2
	Romero	44 ^b	147 ^b	1.4	5.3
	Mil Flores	55 ^b	183 ^b	1.5	5.6
	Brezo	60 ^b	200 ^b	1.4	5.4
<i>t</i> -resveratrol	Patrón	4 ^a	13 ^a	0.3	1.1
	Romero	20 ^a	67 ^a	1.1	3.4
	Mil Flores	25 ^a	83 ^a	1.3	5.1
	Brezo	30 ^a	100 ^a	1.5	5.4
<i>c</i> -resveratrol	Patrón	5 ^b	17 ^b	0.7	2.3
	Romero	50 ^b	167 ^b	2.2	7.4
	Mil Flores	55 ^b	183 ^b	2.4	7.3
	Brezo	60 ^b	200 ^b	1.0	3.1

^a FLD;

^b DAD

En la tabla se puede observar que los valores obtenidos de LOD y LOQ en DAD/FLD son superiores a los obtenidos por MS-ESI, siendo el uso de aquellos detectores una alternativa más económica cuando no se requiere mucha sensibilidad.

Precisión

Para llevar a cabo el estudio de precisión se sometió a la metodología desarrollada réplicas de miel adicionada con los analitos en tres niveles de concentración, en el caso de la repetibilidad durante el mismo día y de la precisión intermedia en 3 días consecutivos. Se inyectaron los diferentes extractos de miel evaluando los coeficientes de variación (%CV) del área (A) de pico. En las Tabla 11 y Tabla 12 se presentan los resultados obtenidos para los niveles de concentración ensayados en DAD/FLD y MS, respectivamente.

Tabla 11. Valores de los coeficientes de variación en el estudio de precisión para la detección DAD/FLD (n=3)

Compuesto	Concentración (μgkg^{-1})	Repetibilidad	Precisión intermedia
		%CV	%CV
<i>t</i> -piceido	100	2.21	3.54
	417	1.23	3.67
	1700	2.31	3.68
<i>cis</i> -piceido	200	5.18	5.62
	417	1.45	2.91
	1700	2.31	3.66
<i>t</i> -resveratrol	100	1.05	3.46
	417	3.83	4.87
	1700	3.51	5.00
<i>cis</i> -resveratrol	200	2.91	3.29
	417	2.25	2.75
	1700	2.12	2.50

Tabla 12. Valores de los coeficientes de variación en el estudio de precisión para la detección MS (n=3)

Compuesto	Concentración (μgkg^{-1})	Repetibilidad	Precisión intermedia
		%CV	%CV
<i>t</i> -piceído	100	2.3	4.8
	417	5.3	3.4
	1700	6.4	3.2
<i>c</i> -piceído	200	5.78	6.5
	417	2.5	2.9
	1700	3.1	4.0
<i>t</i> -resveratrol	100	5.7	6.0
	417	3.5	4.3
	1700	2.1	4.4
<i>c</i> -resveratrol	200	4.7	5.5
	417	1.9	3.2
	1700	3.6	5.1

Del análisis de los valores obtenidos se observa que el método cromatográfico cumple los requisitos de precisión porque en todos ellos los CV son inferiores al 6%. Debido a los valores de CV obtenidos en MS, se desestimo el uso de patrón interno.

Linealidad y efecto matriz

Con el fin de llevar a cabo la determinación cuantitativa de los analitos para los tres detectores, se realizó un calibrado utilizando el método de patrón externo, cuantificándose en base al área del pico. Para realizar el estudio de linealidad, se preparó una mezcla de los diferentes analitos en fase móvil, a partir de esta se realizaron las correspondientes diluciones en un intervalo de concentración de 10 a 1000 μgkg^{-1} para el MS, de 100 a 1700 para el FLD y de 200 a 1700 para el DAD, las que se utilizaron para añadir en los tres tipos de mieles. En la Tabla 13 se recogen los parámetros estadísticos de las líneas obtenidas.

Tabla 13. Parámetros de las líneas de calibrado para cada compuesto por DAD, FLD y MS

Compuesto	Intervalo (μgkg^{-1})	a	s_a	b ($\times 10^{-2}$)	s_b ($\times 10^{-2}$)	r^2	$s_{y/x}$
<i>t</i> -piceído ^a	Patrón	1.13	0.52	3.214	0.082	0.9995	0.77
	Romero	-1.05	0.52	3.317	0.049	0.9990	0.77
	Mil flores	0.54	0.81	3.155	0.052	0.9996	0.66
	Brezo	-0.14	0.52	2.109	0.028	0.9998	0.42
<i>c</i> -piceído ^b	Patrón	0.76	0.48	7.736	0.154	0.9999	0.71
	Romero	-16.41	2.51	7.863	0.115	0.9990	2.05
	Mil flores	-21.33	6.39	7.819	0.122	0.9991	5.28
	Brezo	-9.27	2.75	5.590	0.137	0.9964	3.22
<i>t</i> -resveratrol ^a	Patrón	-1.76	0.55	4.996	0.094	0.9997	0.82
	Romero	4.25	0.49	5.132	0.050	0.9996	0.72
	Mil flores	2.32	1.05	5.096	0.062	0.9993	1.55
	Brezo	8.86	0.30	3.892	0.035	0.9998	0.44
<i>c</i> -resveratrol ^b	Patrón	-2.77	1.79	12.020	0.229	0.9991	2.65
	Romero	68.24	4.36	11.810	0.146	0.9970	5.10
	Mil flores	35.92	9.68	11.740	0.762	0.9923	7.90
	Brezo	26.84	2.02	9.822	0.130	0.9991	2.36
<i>t</i> -piceído ^c	Patrón	-2.73	3.72	4.453	0.252	0.9988	549213
	Romero	-6.28	0.99	4.171	0.128	0.9989	147778
	Mil flores	2.89	2.3	4.072	0.045	0.9989	305056
	Brezo	-4.45	1.57	2.665	0.057	0.9995	231360
<i>c</i> -piceído ^c	Patrón	-7.29	2.84	5.563	0.078	0.9996	418776
	Romero	-2.38	1.27	5.539	0.071	0.9995	188746
	Mil flores	-1.14	2.26	5.501	0.059	0.9997	299169
	Brezo	-0.02	3.05	3.709	0.041	0.9993	450754
<i>t</i> -resveratrol ^c	Patrón	-11.06	6.9	11.247	0.231	0.9994	1019624
	Romero	-11.33	2.82	10.620	0.064	0.9993	419766
	Mil flores	10.88	7.7	11.116	0.210	0.9987	1020847
	Brezo	11.76	6.18	8.239	0.132	0.9989	913502
<i>c</i> -resveratrol ^c	Patrón	-23.51	5.14	8.706	0.230	0.9994	758570
	Romero	-15.59	3.44	8.485	0.186	0.9993	512141
	Mil flores	-10.92	2.31	8.239	0.044	0.9999	306353
	Brezo	0.83	4.26	6.690	0.054	0.9993	629241

^a DAD ^b FLD ^c MS

Se aplicó la prueba t para verificar la tendencia de la regresión y para asumir una tendencia lineal se ha de cumplir que t_{exp} sea superior a la t_{tab} , obteniéndose la t_{exp} mediante el cociente entre el valor de la pendiente (b) de la recta y la desviación estándar de la misma (s_b). La t_{tab} es la t -Student obtenida para $n-2$ grados de libertad y una probabilidad de 0.95. En todos los casos se cumple que la $t_{\text{exp}} > t_{\text{tab}}$, por lo tanto se acepta que el método es lineal y la ausencia de bias. Los valores del coeficiente de regresión (r^2) eran para todos los casos mayores de 0.99.

Por otra parte, para verificar el efecto matriz se realizó la comparación de las pendientes del calibrado de patrones en fase móvil y en los tres tipos de miel, cuyos resultados indicaron que los valores de pendiente en romero y mil flores se encuentran dentro del mismo intervalo de confianza de la pendiente ($p=0.95$) en fase móvil. Esto no fue así en brezo, por lo que se hace necesario para su de empleo del calibrado sobre esta miel. Quedando de esta manera demostrada la ausencia de efecto matriz en la miel de romero y milflores.

Exactitud

La evaluación de este parámetro se realizó mediante el cálculo del porcentaje de error relativo (%RE), para lo cual se han analizado réplicas de extractos de miel adicionada con patrones a tres niveles de concentración durante tres días consecutivos.

Las concentraciones experimentales se determinaron a partir de la correspondiente línea de calibrado. En la Tabla 14 se presentan los valores calculados para DAD/FLD y en la Tabla 15 se presentan los valores de error relativo calculados para MS-SIM.

Tabla 14. Porcentaje de error relativo obtenido para la detección DAD/FLD

Compuesto	Concentración (μgkg^{-1})	% Error relativo		
		Romero	Mil flores	Brezo
<i>t</i> -piceido ^a	200	3.9	4.1	5.2
	417	2.8	4.0	4.7
	1667	1.9	1.7	3.5
<i>c</i> -piceido ^b	417	5.6	5.2	5.3
	1667	4.3	5.8	4.9
	3333	5.1	4.5	3.2
<i>t</i> -resveratrol ^a	200	3.9	3.3	5.1
	417	4.8	3.7	3.8
	1667	2.7	1.9	2.6
<i>c</i> -resveratrol ^b	417	5.2	5.2	5.8
	1667	4.1	3.4	4.1
	3333	3.2	2.9	2.7

Tabla 15. Porcentaje de error relativo obtenido para la detección MS-ESI-

Compuesto	Concentración añadida (μgkg^{-1})	% Error relativo		
		Romero	Mil flores	Brezo
<i>t</i> -piceido	50	4.8	5.0	5.6
	200	2.3	3.1	3.4
	833	1.8	1.3	2.0
<i>c</i> -piceido	50	3.9	4.1	5.2
	200	2.5	3.7	4.3
	833	1.6	2.0	2.2
<i>t</i> -resveratrol	50	3.9	4.1	5.2
	200	4.1	5.8	4.8
	833	3.8	3.6	3.9
<i>c</i> -resveratrol	50	6.2	5.8	6.5
	200	4.3	4.7	5.1
	833	3.4	2.9	3.1

Se observa en ambas tablas que el %RE para todos los analitos es inferior al 6% en todos los casos para DAD/FLD y al 7% para MS, valor considerado adecuado para la exactitud en el caso del análisis con este tipo de detectores.

V.3.6. Ensayos de Eficacia

Antes de dar y comentar los resultados de la aplicación conviene indicar cómo se han realizado los ensayos en el CAR de Marchamalo.

Evaluación en laboratorio (CAR) la actividad frente a *Nosema spp.* del resveratrol y sus isómeros

Para evaluar la acción del resveratrol y su isómeros frente a *Nosema apis* y *Nosema ceranae*, se han realizado infecciones experimentales según la metodología descrita [37], en resumen se basa en la obtención de lotes homogéneos de abejas de la misma edad obtenidas en estufa de incubación a partir de cuadros de cría operculada de edad conocida y procedentes de colmenas libres de cualquier patógeno. Una vez transcurrida una semana desde el nacimiento de las abejas, las cuales han sido alimentadas ad libitum con un jarabe de agua y miel, adicionado de un sustitutivo del polen, las abejas están preparadas para ser utilizadas en los ensayos. A partir de este momento se pueden utilizar lotes homogéneos de abejas de diferentes edades, que se mantienen en jaulas en número de 15-30 abejas por lote y jaula.

Para la inoculación se han utilizado esporas viables obtenidas de abejas afectadas por *Nosema apis* y *Nosema ceranae*, una vez purificadas por filtración y método del percoll [25].

Cada lote de abejas se inocula vía oral de manera individual con 3-5 dosis diferentes de esporas de *N. apis* o *N. ceranae* (cada dosis se aplica a las abejas de cuatro lotes diferentes), según el estudio, y se mantienen posteriormente en estufa a 33-35°C todo el tiempo que las abejas permanezcan vivas (alimento y agua ad libitum). En cada caso se han utilizado cuatro lotes control que no recibirán esporas. A las 48 horas de la infección, cada abeja recibe una dosis concreta de resveratrol o sus isómeros, utilizando como referencia las dosis indicadas por Maitrello y col [45]. Por cada dosis de esporas de *Nosema* que reciba cada lote de abejas, se evalúa la eficacia de 5 dosis crecientes del producto a testar. A los 7 días, se extraen los ventrículos y

se fijan para su posterior estudio histológico bien por microscopía óptica o microscopía electrónica de transmisión ^[25,37]. Diariamente se anotan las abejas muertas en cada lote. De esta manera se puede observar si realmente el tratamiento inhibe o no el ciclo biológico del parásito y en qué fase se produce.

Las abejas no utilizadas para el estudio histopatológico se evalúan por PCR cuantitativa ^[181] en tiempo real, para determinar si existe o no aumento/disminución en el número de copias de DNA de los microsporidios estudiados, en las abejas tratadas, frente a los controles no tratados.

Evaluación en campo de la actividad frente a *Nosema spp.* de resveratrol y sus isómeros. Determinación de la posología adecuada (CAR)

Se ha realizado la comprobación a través de ensayos de campo de la eficacia y actividad residual de distintos tratamientos con resveratrol (e isómeros en su caso) en diversas condiciones simulando realidad. Para ello se ha seguido la metodología descrita por Higes y col. ^[24,25] para ensayos de eficacia en campo efectuados con fumagilina. Para detectar la posible presencia de efectos tóxicos del tratamiento sobre las abejas, se ha seguido la metodología recomendada por la Agencia Europea del Medicamento, en lo referido a ensayos clínicos de acaricidas frente a *Varroa destructor*, evaluándose la presencia de abejas adultas muertas en cantidades superiores a la mortalidad fisiológica y/o alteraciones en el comportamiento social, al igual que posibles alteraciones en la cría.

También se tienen en cuenta los factores ambientales, geográficos, flora, etc., que puedan influir en el resultado del ensayo clínico. Estos ensayos se han realizado en diferentes épocas del año, preferentemente otoño y primavera.

Todos los datos epidemiológicos (clima, flora, etc.) y sanitarios (presencia ausencia de *Nosema spp.*, tras los tratamientos, evolución de la colonia de abejas y la cría etc.) son valorados y relacionados epidemiológica y estadísticamente aplicando los

correspondientes test estadísticos (paramétricos y no paramétricos). Para ello se utiliza el paquete estadístico SPSS 15.1

Con toda la información obtenida, se establecerá la posología más adecuada en condiciones de campo, haciendo las correcciones oportunas en cuanto a dosis y forma de aplicación.

Una vez realizados estos ensayos se ha procedido a tomar muestras de la cámara de cría y analizar en ellos la presencia del resveratrol y sus análogos, también y como se comentará en el apartado siguiente se ha recogido polen.

V.3.7. Aplicación a muestras provenientes de ensayos de campo

El método propuesto se ha aplicado a muestras de miel obtenidas de distintas colmenas del apiario experimental del CAR de Marchamalo (Guadalajara, España), en un primer momento, se ensayó la dosis recomendada por Maistrello et al.^[45] Se administró 0.001 mg de resveratrol por 1 mL de jarabe (azúcar y agua en igual proporción). En marzo a cada colmena se le dio 250 mL (0.25 mg de resveratrol) de la mezcla y el tratamiento fue repetido semanalmente durante 4 semanas. Las muestras de miel se recolectaron en septiembre.

En todas las muestras recogidas, que pertenecían al tipo multifloral, no se han encontrado residuos de los compuestos por encima de los límites de detección del método propuesto. También hay que señalar que el tratamiento aplicado no ha resuelto correctamente la infección por *Nosema*, por lo que se realizaron más experimentos modificando la dosis y la forma de aplicación. En la Figura 18 se presenta un EIC de una muestra analizada por LC-MS-SIM, haciendo una comparación con la Figura 14 se observa que el perfil del cromatograma es parecido al de los extractos de miel sin adicionar los analitos.

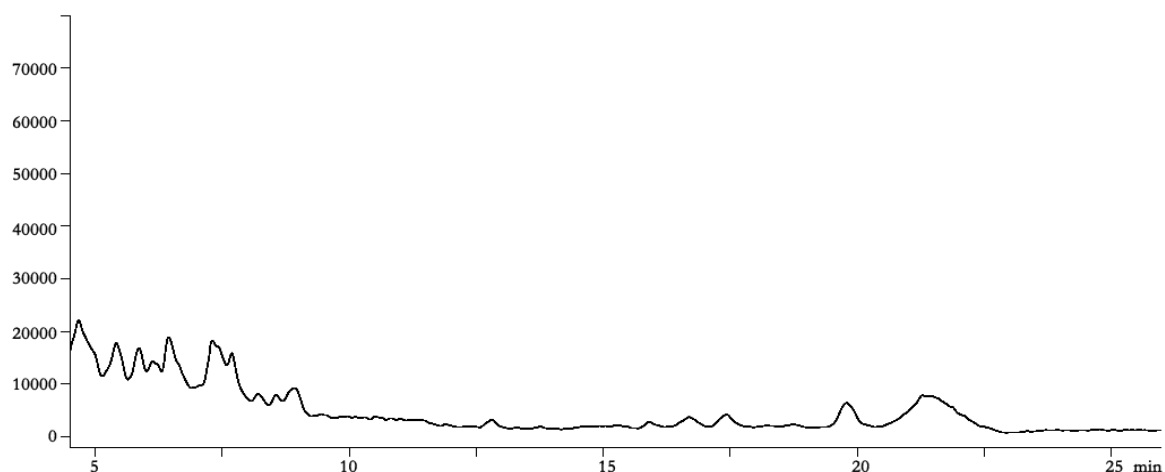


Figura 18. Cromatograma de extracto de miel con primer tratamiento aplicados a las colmenas obtenido por LC-MS

Después de varias pruebas de campo llevadas a cabo por el equipo técnico del CAR, el nuevo el tratamiento consistió en una dosis más elevada de resveratrol, la cual fue administrada en dos preparados que contenían el compuesto comercial de mayor pureza. El primero, jarabe, se elaboró con azúcar comercial y agua destilada en proporción 1:1 y el segundo, candy, contenía 60% de glucosa, 20% de fructosa y 20% de agua, a estas mezclas se les añadió 7 mg de resveratrol del 99% por cada mililitro.

Ambos alimentos se administraron a dos colmenares, uno denominado PR al que o se administró placebo (candy y jarabe sin resveratrol) o no se alimentó con dichos preparados; y el otro TN alimentado con el candy y jarabe con resveratrol comercial, después de este segundo tratamiento se recogieron de la cámara de cría un total 60 muestras provenientes de PR y 40 muestras procedentes de TN, las muestras fueron tomadas en dos muestreos, los datos obtenidos se presentan en la Tabla 16.

Tabla 16. Relación de muestras analizadas

Código	Tratamiento	Primer Muestreo		Segundo Muestro	
		02/12/2011	06/12/2011	09/01/2012	10/01/2012
TN-03	Candy R	X			X
TN-07	Candy R	X			X
TN-09	Candy R	X			X
TN-27	Candy R	X		X	
TN-31	Candy R	X		X	
TN-35	Candy R	X		X	
TN-13	Candy R		X	X	
TN-23	Candy R		X	X	
TN-16	Candy R	X	X	X	
TN-19	Candy R	X	X	X	
TN-01	Jarabe R		X		X
TN-04	Jarabe R		X		X
TN-08	Jarabe R		X		X
TN-11	Jarabe R		X		X
TN-14	Jarabe R		X	X	
TN-17	Jarabe R		X	X	
TN-21	Jarabe R		X	X	
TN-25	Jarabe R		X	X	
TN-29	Jarabe R	X		X	
TN-33	Jarabe R	X		X	
PR-11-03	No		X		X
PR-11-06	No		X		X
PR-11-10	No		X		X
PR-11-13	No		X		X
PR-09	No		X		X
PR-11-18	No		X		X
PR-11-20	No	X			X
PR-11-22	No	X			X
PR-11-31	No	X			X
PR-11-34	No	X			X
PR-11-01	Candy		X		X
PR-11-04	Candy		X		X
PR-11-07	Candy		X		X
PR-11-11	Candy		X		X
PR-11-14	Candy	X			X
PR-10	Candy	X			X
PR-11-25	Candy	X			muerta
PR-11-28	Candy	X			X
PR-11-32	Candy		X		X

Tabla 16. (Cont.) Relación de muestras analizadas

Código	Tratamiento	<u>Primer Muestreo</u>		<u>Segundo Muestro</u>	
		02/12/2011	06/12/2011	09/01/2012	10/01/2012
PR-11-28	Candy	X			X
PR-11-02	Jarabe	X			X
PR-11-05	Jarabe	X			X
PR-11-09	Jarabe	X			X
PR-11-12	Jarabe	X			X
PR-11-15	Jarabe		X		X
PR-11-17	Jarabe		X		X
PR-11-21	Jarabe		X		X
PR-11-30	Jarabe		X		X
PR-11-33	Jarabe		X		X
PR-11-35	Jarabe	X			X

Candy R: candy adicionado con resveratrol comercial

Jarabe R: jarabe adicionado con resveratrol comercial

Previo al análisis las muestras de miel bruta, de tipo multifloral, se centrifugaron a 1000 r.p.m. por 10 min a 10 °C. Las muestras se sometieron al proceso de extracción desarrollado. Hay que destacar que en las mieles provenientes de las colmenas PR, como era lógico, no se encontraron residuos de resveratrol ni sus análogos, mientras que en las recolectadas de TN, se encontraron cantidades variables de los analitos.

En la Figura 19 se presentan los EICs de extractos de muestras de miel provenientes del colmenar TN, al que se administró con candy o jarabe con resveratrol grado alimenticio.

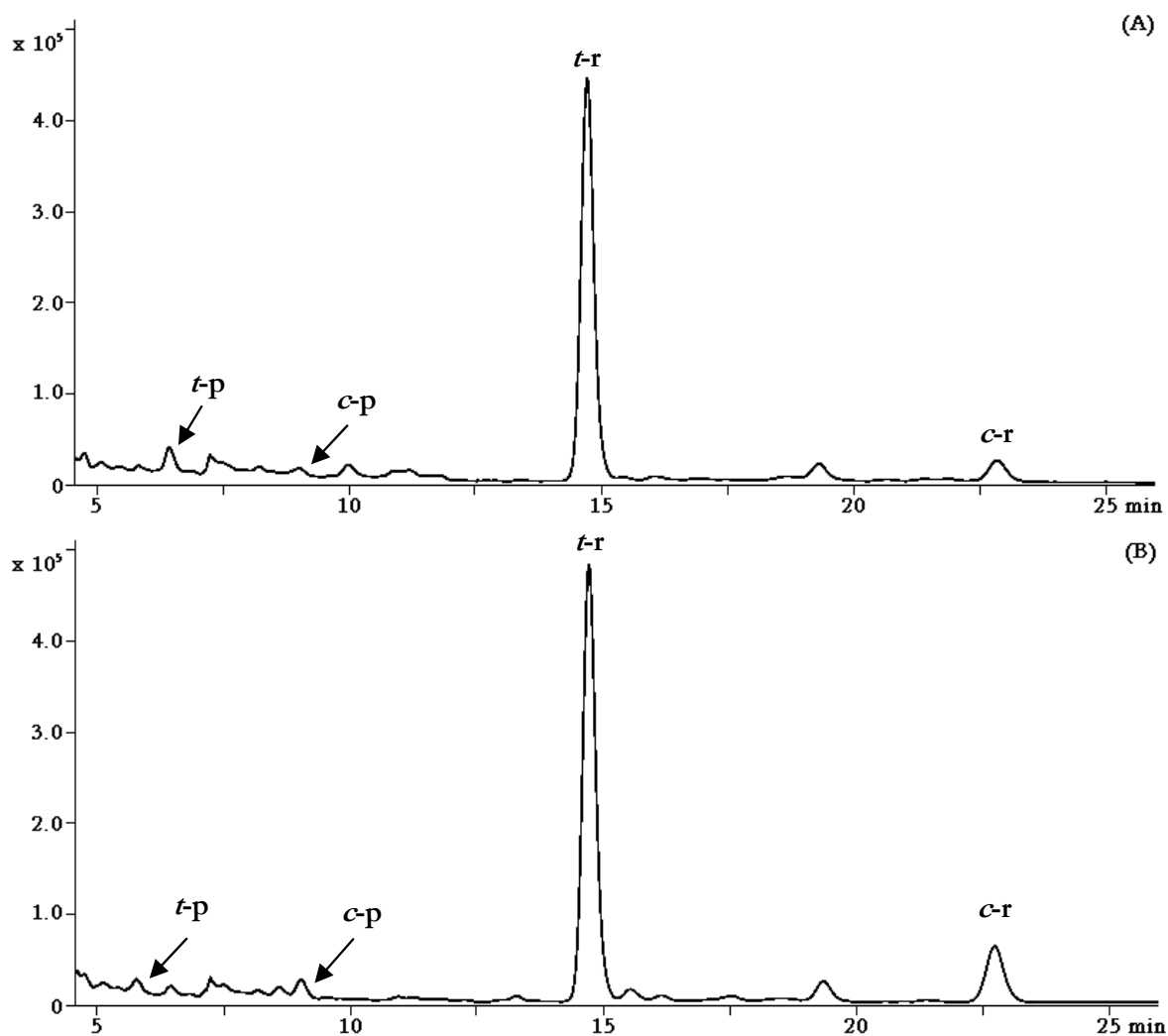


Figura 19. EICs de extractos de muestras de miel proveniente de colmenas TN alimentadas con (A) candy con resveratrol y (B) jarabe con resveratrol

En las muestras de miel extraídas de las colmenas TN se encontraron casi todos los analitos, las concentraciones determinadas mediante LC-MS se muestran en la Tabla 17.

En las muestras provenientes del apiario TN, es destacable el hecho que el *t*-resveratrol y piceído se encuentra presente en todas las mieles del primer muestreo, excepto el *t*-piceído en TN-04 y 35.

Tabla 17. Concentraciones (μgkg^{-1}) en mieles de colmenas TN tratadas con candy R y jarabe R

Muestra	ϵ -piceído		ϵ -piceído		ϵ -resveratrol		ϵ -resveratrol	
	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°
TN-03	874.3	127.7	6.8	ND	32.3 ^a	24.1 ^a	1.2 ^a	135.0
TN-07	19.3	9.3	NQ	NQ	730.9	389.7	363.8	9.5
TN-09	537.4	NQ	17.8	NQ	21.6 ^a	29.2	1.9 ^a	NQ
TN-13	NQ	ND	NQ	ND	318.5	NQ	21.2	ND
TN-16	4.9	NQ	NQ	NQ	211.7	535.2	23.4	NQ
TN-19	250.9	879.0	NQ	15.4	8.6 ^a	93.0 ^a	518.1	1.9 ^a
TN-23	4.6	ND	NQ	ND	738.2	93.0	367.3	NQ
TN-27	657.0	31.9	9.2	NQ	28.3 ^a	11.4 ^a	1.2 ^a	15.0
TN-31	2.1 ^a	365.2	21.5	14.7	114.1 ^a	34.4 ^a	3.2 ^a	403.6
TN-35	ND	213.1	ND	20.1	12.6	16.6 ^a	10.5	1.9 ^a
TN-01	380.1	16.7	NQ	6.2	28.9 ^a	70.8 ^a	431.4	1.0 ^a
TN-04	ND	21.5	ND	5.8	12.0	47.5	ND	NQ
TN-08	NQ	ND	NQ	ND	35.7	7.7	11.2	ND
TN-11	9.7	77.1	NQ	5.4	348.7	3.5 ^a	41.1	34.9 ^a
TN-14	NQ	27.3	NQ	6.9	132.9	62.7 ^a	15.1	1.6 ^a
TN-17	NQ	509.6	NQ	8.5	75.3	151.7 ^a	12.9	1.2 ^a
TN-21	NQ	7.3	NQ	NQ	38.9	209.4	12.4	8.4
TN-25	NQ	ND	ND	ND	30.4	10.1	10.9	ND
TN-29	1.8 ^a	99.0	10.5	NQ	124.6 ^a	12.3 ^a	3.0 ^a	90.7
TN-33	725.5	935.7	NQ	3.2	46.2 ^a	60.7 ^a	488.7	690.8

^a mgkg^{-1}

Como ya se ha señalado previamente (Tabla 16), las muestras de miel se han recogido de la cámara de cría en dos muestreos, en la Tabla 18 se presenta el contenido total que se ha obtenido en función del alimento y el momento del muestreo.

Tabla 18. Contenido total de los compuestos en función de tipo de alimento en que se ha administrado el resveratrol y el muestreo

Alimento	Muestreo	Concentración total (mgkg ⁻¹)			
		<i>t-p</i>	<i>c-p</i> ^a	<i>t-r</i>	<i>c-r</i>
Candy R	1°	4.4	55.3	206.9	8.9
Candy R	2°	4.6	60.7	280.6	10.5
Jarabe R	1°	2.9	10.5	200.4	4.1
Jarabe R	2°	3.2	41.0	362.0	39.6

^a μgkg^{-1}

Resulta obvio en la tabla que el *t-resveratrol* es el compuesto mayoritario en todos los casos, en la Figura 20 se presentan gráficamente estos resultados para facilitar su visualización.

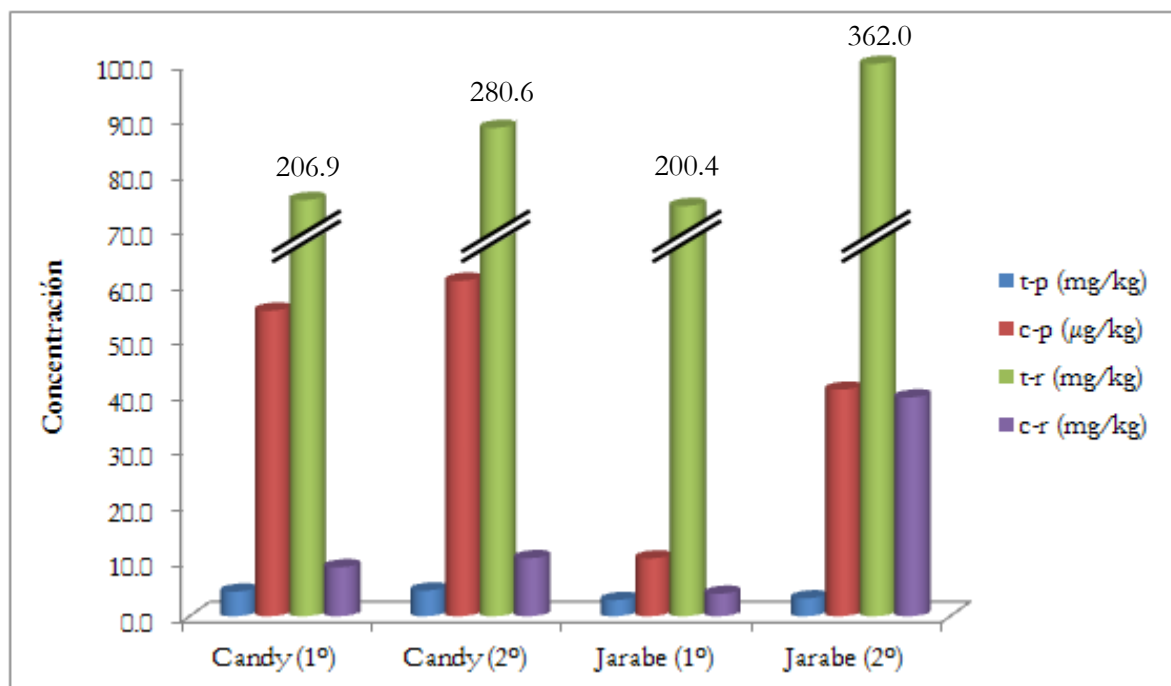


Figura 20. Concentración total de los compuestos según el tipo de alimento al que se adicionó resveratrol-99 y el muestreo

Tal y como se observa en la figura, cuando el resveratrol se ha administrado en el candy, no se presentan diferencias significativas en el contenido de los compuestos de interés en las muestras de ambos muestreos. En cambio cuando se aplicó en forma de jarabe, el contenido total en las muestras es superior para todos los analitos en las mieles del segundo muestro, siendo menos marcada esta diferencia en *t*-piceído.

V.4. Determinación de resveratrol y piceido en alimento

El objeto de este apartado ha sido comprobar la composición del producto comercial, que como se ha mencionado anteriormente se trata de un suplemento alimenticio, y determinar su concentración en los alimentos administrados a las abejas del apiario TN.

En primer lugar se verificó la idoneidad del método cromatográfico, con ambos sistemas de detección (DAD/FLD y MS), desarrollado para el análisis en miel, en la determinación de los compuestos de interés en disoluciones acuosas del producto comercial. Mediante el calibrado de patrones en agua, se ha determinado la concentración, encontrándose que la concentración de *trans*-resveratrol en la disolución preparada del suplemento alimenticio correspondía a la concentración calculada a través del calibrado de patrones. Sin embargo, como se puede observar en el cromatograma de la Figura 21 aparecen pequeños picos a los tiempos de retención del *t*-piceido y *l*-resveratrol.

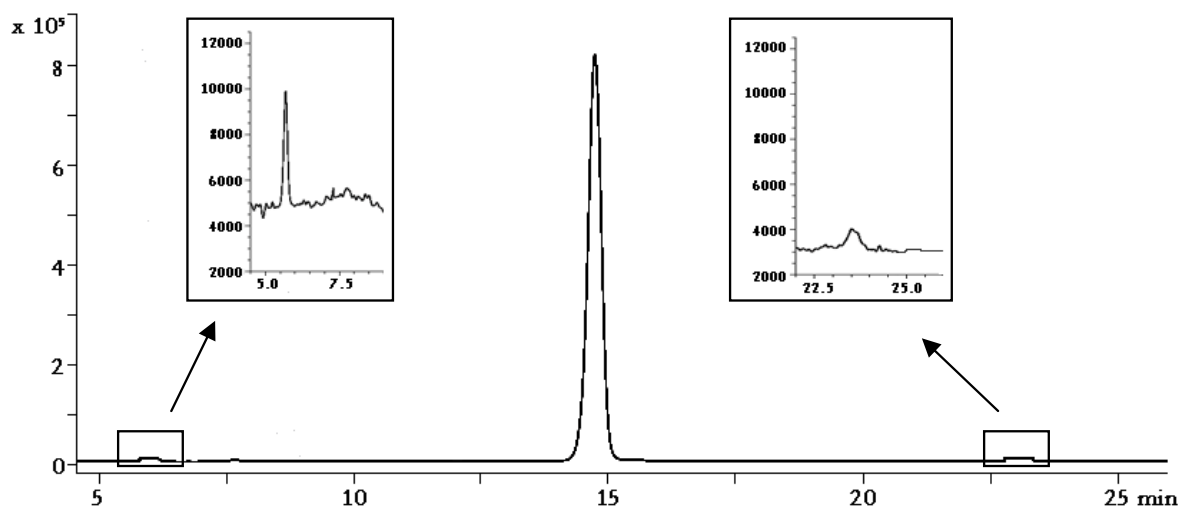


Figura 21. EIC de Mega resveratrol® en disolución acuosa de 2.5 mgL⁻¹

Este hallazgo justificaría la presencia de piceido en las muestras de mieles analizadas en el apartado anterior. De esta manera, se ha comprobado que el método cromatográfico puede aplicarse al análisis de resveratrol en el suplemento alimenticio.

Con el fin de determinar la concentración de los compuestos de interés en los alimentos para las colmenas a los que se había adicionado resveratrol comercial, se han preparado en nuestro laboratorio, siguiendo las directrices del CAR, ambos alimentos, midiéndose la concentración mediante la línea de calibrado en patrones, los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 19.

Tabla 19. Concentración (mgL^{-1}) de *t*-resveratrol y *t*-piceido en candy y jarabe adicionado con resveratrol comercial

Alimento	Concentración (mgL^{-1})	
	<i>t</i> -piceido	<i>t</i> -resveratrol
Candy R	0.19	7.03
Jarabe R	0.14	7.05

En ambos alimentos, solo se ha encontrado la forma *trans* del resveratrol y piceido, como se observa en la tabla el contenido de *t*-resveratrol corresponde a la dosis que el CAR ha administrado a las colmenas. De tal forma, que el calibrado de patrones acuosos es válido para la determinación de los compuestos de interés en jarabe y candy adicionado con resveratrol. Por lo tanto, los parámetros de la validación de la metodología analítica evaluados anteriormente para el análisis en mieles son aplicables a la determinación de los analitos en candy y jarabe.

V.4.1. Aplicación a muestras de alimento administrado a las colmenas

Se obtuvieron muestras de alimento administrado a las colmenas, placebo y con la dosis establecida de resveratrol, las muestras fueron diluidas en agua y analizadas por DAD/FLD, puesto que las cantidades presentes en el alimento, podían determinarse con estos detectores.

En las muestras de jarabe y candy sin adicionar el suplemento alimenticio de resveratrol, no se han encontrado lógicamente residuos de los compuestos. En la

Tabla 20 se presentan los resultados obtenidos en el análisis de diferentes muestras de candy y jarabe a las que se adicionó dicho suplemento.

Tabla 20. Concentración (mgL⁻¹) de los analitos en candy y jarabe

Muestra	Alimento	Concentración (mgL ⁻¹)	
		<i>t</i> -piceido	<i>t</i> -resveratrol
R1	Candy R	0.32	7.94
R2	Candy R	0.28	8.55
R3	Candy R	0.29	6.93
R4	Candy R	0.21	8.49
R5	Candy R	0.17	7.98
R6	Jarabe R	0.21	6.94
R7	Jarabe R	0.18	7.47
R8	Jarabe R	0.24	8.03
R9	Jarabe R	0.20	7.45
R10	Jarabe R	0.18	7.87

De los resultados obtenidos, se dedujo que el contenido de *t*-resveratrol en el alimento administrado a las abejas contenía la concentración establecida por el CAR con un %RE del 15%. Respecto a la concentración de *t*-piceido, solo se puede comentar que el CV (%) fue aproximadamente del 23 %.

V.5. Determinación de resveratrol y piceído en polen

Para el desarrollo del método cromatográfico se ha tomado como punto de partida las condiciones establecidas para la determinación de los compuestos de interés en mieles, en este caso, las experiencias se realizaron con polen comercial en el que se comprobó no se encontraban los analitos.

V.5.1. Condiciones cromatográficas

Columna cromatográfica

Debido a los buenos resultados obtenidos en el análisis de estos analitos en miel, se ha empleado la misma columna, Gemini C₁₈ (150 x 4.6 mm).

Condiciones de detección

Absorción Molecular y Fluorescencia (DAD/FLD)

En la aplicación de estos dos sistemas de detección, no se observaron variaciones en los máximos de absorción de los estilbenos objeto de estudio en presencia de polen, por lo que las longitudes de onda para cuantificación son las mismas que las usadas en mieles, es decir para los *c*-estilbenos por DAD fue de 286 nm y para los *t*-estilbenos por FLD la longitud de onda de excitación fue de 318 y de emisión de 390 nm.

Espectrometría de Masas

Debido a que el objetivo planteado fue determinar residuos de los compuestos de interés en polen, se hizo necesario el empleo de la espectrometría de masas. En este caso, ya se conocían las condiciones óptimas para la detección de los compuestos, se procedió directamente a verificar su validez en la nueva matriz.

Mediante una serie de inyecciones de muestras de polen adicionado con patrones y polen al que no se le había adicionado ningún compuesto, se observó una marcada pérdida de señal para todos los analitos, así como que la fuente de ionización del

MS se ensuciaba. Con el fin identificar las causas de la pérdida de señal, por ejemplo el efecto matriz o los parámetros de detección, se procedió a estudiar los parámetros más críticos del detector de masas de simple cuadrupolo, este estudio se realizó modificando una variable a la vez mientras se mantenían las restantes constantes, en la Tabla 21 se presentan los resultados obtenidos para las condiciones de detección.

Tabla 21. Parámetros de detección para MS-ESI-

Parámetros MS	Intervalo estudiado	Valor óptimo
Voltaje del fragmentador (V)	20 – 380	180(4.5 – 7.2 min) 140 (7.2 – 26 min)
Voltaje del capilar (V)	2000 – 5600	4000
Flujo de gas secante N ₂ (L/min)	2 – 12	12
Temperatura del gas secante (°C)	10 – 350	350
Presión del gas nebulizador (psig)	10 – 60	50
Ganancia	5 – 20	20

Como puede observarse, respecto a los valores óptimos en miel (Tabla 2), que solo la ganancia es la misma, los otros parámetros tienen valores superiores, a excepción del voltaje del fragmentador que para el *t*-piceído es de 180, pero para el resto de los analitos se mantiene en 140 V.

Posteriormente, se inyectaron los analitos en modo SCAN, para corroborar mediante los espectros de masas los iones a ser usados en modo SIM, dichos resultados se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22. Iones (m/z) de cuantificación y de confirmación por MS/MS-ESI-

Compuesto	Ion cuantificación	Ion de confirmación	Ion de confirmación
<i>t</i> -piceído	389	227	437
<i>c</i> -piceído	389	227	437
<i>t</i> -resveratrol	227	212	175
<i>c</i> -resveratrol	227	212	175

Ensayo preliminar con DAD/FLD

Tomando como punto de partida el método desarrollado para mieles, se realizaron ensayos preliminares a fin de comprobar la validez de las condiciones cromatográficas para su aplicación en polen, puesto que en patrones en disolvente ya estaban las condiciones establecidas. Las pruebas se llevaron a cabo con polen al que no se adicionó patrones y polen adicionado con una concentración conocida de los analitos, sometido a un proceso de extracción sólido-líquido empleando como extractante metanol o fase móvil, observándose el solapamiento del pico del *t*-piceído con el frente del cromatograma.

A partir de esto, se dedujo que posiblemente modificando la composición de la fase móvil se podría solucionar este solapamiento, manteniendo iguales el resto de las condiciones cromatográficas.

Composición de la fase móvil

Usando las condiciones establecidas para el análisis en miel, se realizaron una serie de inyecciones para confirmar su idoneidad para la matriz de polen, por lo que se inyectaron extractos de polen blanco y polen al que se añadió patrones, obtenidos mediante extracción sólido-líquido con metanol y posterior concentración en rotavapor; encontrándose interferentes para el *t*-piceído en FLD y en DAD para los *c*-isómeros, en este punto se pensó modificar ligeramente las condiciones cromatográficas, mientras se mejoraba el tratamiento de muestra.

Inicialmente, se ensayó la modificación del porcentaje de modificador orgánico, tanto en isocrático como en régimen de gradiente, en todos los casos no se obtuvieron resultados satisfactorios para la detección DAD/FLD. Ante esta situación se realizaron experiencias para determinar si era necesaria la modificación de la fase móvil.

Como en el caso de la miel, se evaluó la fuerza iónica de la fracción acuosa, por lo que se realizaron experiencias con formiato amónico 30 mM, con el cual se obtuvo una mayor retención tanto de los analitos como de los componentes de la matriz, pues el perfil del cromatograma era muy similar, como se puede observar en la Figura 22. Por lo tanto, se mantuvo el empleo de ácido fórmico 1%.

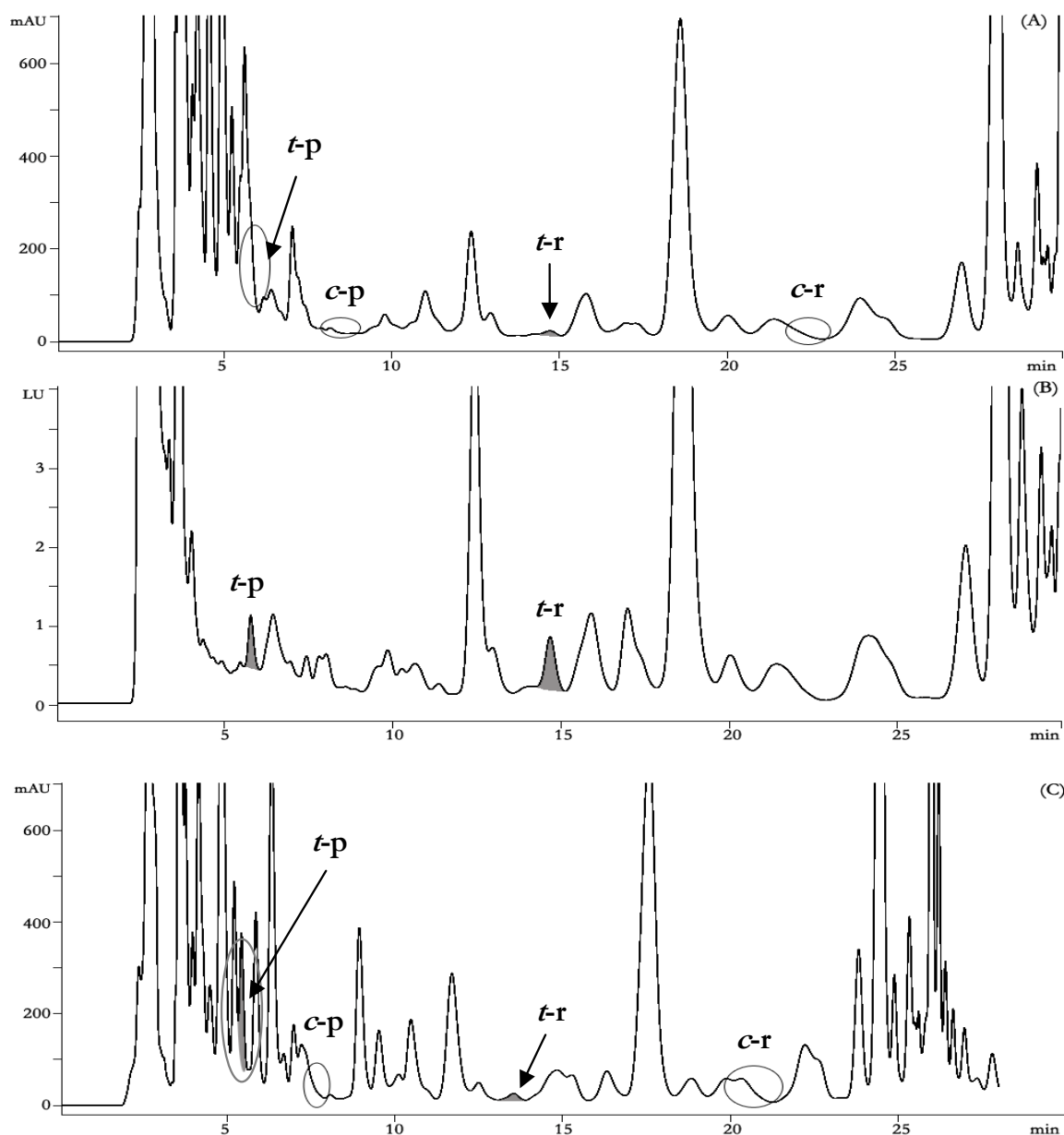


Figura 22. Cromatogramas de polen adicionado con 1.7 mgkg^{-1} con (A y B) formiato de amonio 30 mM y (C y D) ácido fórmico 1% como componente acuoso de la fase móvil, por LC-DAD/FLD

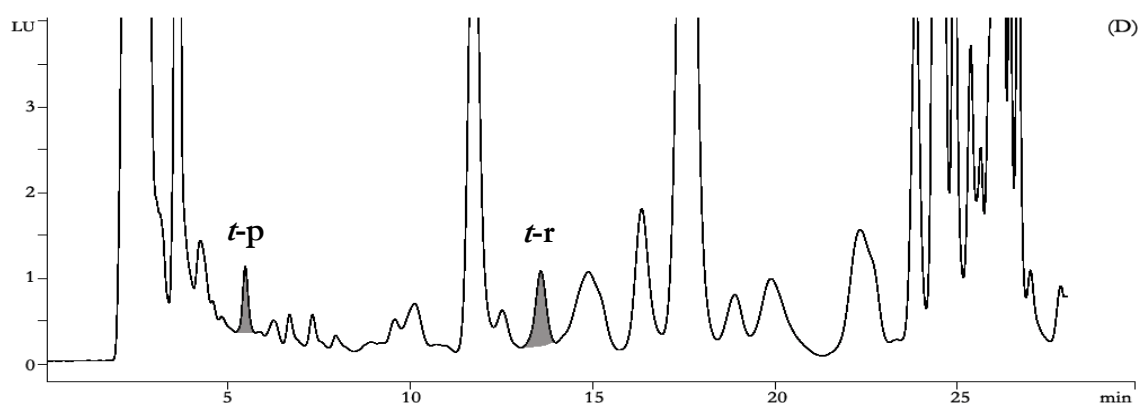


Figura 22. (Cont.) Cromatogramas de polen adicionado con 1.7 mgkg^{-1} con (A y B) formiato de amonio 30 mM y (C y D) ácido fórmico 1% como componente acuoso de la fase móvil, por LC-DAD/FLD

Debido a que las variaciones en el porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil junto con el ácido fórmico 1%, se realizaron iguales experiencias empleando metanol en sustitución de acetonitrilo, sin obtenerse resultados satisfactorios, por lo que se decidió mantener las mismas condiciones cromatográficas empleadas para la determinación en mieles y centrar todos los esfuerzos por mejorar el tratamiento de muestra.

Cabe señalar, que durante las experiencias realizadas se observó que la fuente de ionización se ensuciaba mucho, por lo que se incluyó un gradiente de limpieza después de la separación cromatográfica, después de varias pruebas, el gradiente quedó establecido como aparece en la Tabla 23.

Tabla 23. Gradiente de limpieza empleando ácido fórmico 1% (A) y acetonitrilo (B) en la fase móvil para la separación

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0	75	25
24	75	25
27	40	60
30	40	60
33	75	25

Las condiciones de separación de los analitos siguió siendo isocrática al igual que en mieles, a partir de la elución del último analito se incrementó la cantidad de acetonitrilo hasta el 60%, lográndose de esta manera que la fuente de ionización no se ensuciara. Señalar el hecho de que el cuadrupolo recogió señal durante el tiempo que tardaron en eluir todos los analitos, como quedó reflejado en la Tabla 21. El tiempo de equilibrio entre inyecciones fue estudiado estableciéndose, después de varias experiencias, en 10 min.

Condiciones cromatográficas empleadas

El método cromatográfico propuesto para la separación del *t*-piceido, *c*-piceido, *t*-resveratrol y *c*-resveratrol en polen implica la utilización de una columna Gemini C₁₈ 110 Å (250 x 4.6 mm, 5 µm) y una fase móvil compuesta por ácido fórmico 1% en agua y acetonitrilo en régimen de gradiente, con un flujo de fase móvil de 1 mLmin⁻¹, termostataando la columna a 30 °C y utilizando un volumen de inyección de 20 µL y un detector de espectrometría de masas con analizador simple cuadrupolo, con los parámetros establecidos en la Tabla 21. En la Figura 23 se muestra el cromatograma correspondiente a la inyección de 20 µL de una solución patrón de los 4 analitos.

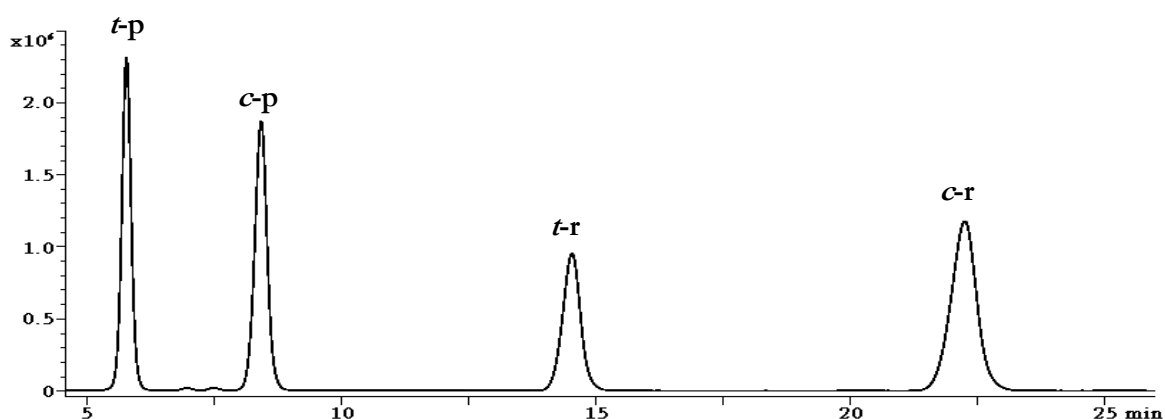


Figura 23. EIC de mezcla de patrones de 5 mgL⁻¹ en las condiciones cromatográficas finales

La comparación de las condiciones para determinar los analitos en miel y en polen, mostró que para la cuantificación a nivel de residuo en ambas matrices es necesario el empleo de LC-MS, siendo las condiciones de detección prácticamente iguales, con la salvedad que en polen se incluyó un gradiente para mantener limpia la fuente de ionización.

V.5.2. Tratamiento de muestra

En las referencias bibliográficas consultadas no se encontró ninguna metodología analítica para la determinación de los compuestos de interés en polen, sin embargo con la experiencia adquirida con la miel y tomando en cuenta la naturaleza de la muestra se pensó en empezar la experimentación con extracción sólido-líquido.

Pruebas preliminares

Se empleó como blanco el polen de flores disponible comercialmente, previamente se comprobó que el utilizado no contenía los analitos. Se pulverizó este polen en un molinillo y se almacenó en estufa a 45°C, dicha temperatura no afecta la estabilidad de los analitos, en todas las experiencias se empleó 1 g de polen.

Para la extracción sólido-líquido se empleó la agitación en Vibromatic a 950 oscilaciones por minuto durante 15 min, usando 10 mL de varios extractantes, a saber, metanol, fase móvil, acetato de etilo y etanol, cada uno de los extractos fue centrifugado y evaporado a sequedad en rotavapor y reconstituidos en 1 mL de fase móvil, a excepción del extracto de fase móvil que no se evaporó a sequedad pero cuyo volumen final fue igualmente de 1 mL. Todos los extractos se filtraron con filtros de jeringa de membrana de acetato de celulosa, e inyectados en el sistema cromatográfico, en la Tabla 24 se presentan los porcentajes de recuperación obtenidos.

Tabla 24. Porcentajes de recuperación en función del extractante empleado (n=3)

Extractante	Porcentajes de recuperación (%R)			
	<i>t</i> -piceído	<i>ε</i> -piceído	<i>t</i> -resveratrol	<i>ε</i> -resveratrol
Acetato de etilo	2	ND	4	ND
Etanol	50	ND	58	ND
Fase móvil	1	ND	1	ND
Metanol	80	ND	78	ND

A partir de los porcentajes de recuperación obtenidos, los mejores extractantes fueron los alcoholes empleados aunque los cromatogramas obtenidos presentaban interferentes al tiempo de retención de los *ε*-isómeros. Cabe señalar también, que los extractos obtenidos a partir de metanol y fase móvil, incluso después del filtrado fueron turbios. Por lo que el siguiente paso fue incluir una etapa de limpieza, para lo que se plantearon dos opciones: extracción en fase sólida y extracción sólido-líquido con disolventes menos polares que los alcoholes preseleccionados como extractante.

Tipo de extracción

Para la SPE se empleó el mismo cartucho de extracción que con las mieles, Strata™ X. El polen fue extraído usando como disolvente mezclas hidroalcohólicas que no superaban el 15% de alcohol (metanol o etanol) mediante agitación en el Vibromatic durante 15 min. Posteriormente, se sometió el extracto al mismo tratamiento establecido para las mieles, también se probó eliminando la etapa de lavado. Los resultados no fueron alentadores, ya que los porcentajes de recuperación no superaron en ningún caso el 15%, descartándose de esta manera la SPE.

La siguiente opción a evaluar fue el uso de disolventes, para lo cual se emplearon hexano, éter etílico y diclorometano, siguiendo el mismo procedimiento inicial de agitación en Vibromatic a 950 oscilaciones por minuto, en este caso se obtuvieron cromatogramas un poco más limpios cuando se utilizaba hexano o éter etílico

como disolvente de limpieza. Por lo tanto se prosiguió la experimentación con estos disolventes.

También se evaluó la naturaleza de la fuente de agitación, se ensayó la agitación magnética aplicando calor (45°C) y por ultrasonidos, en la Tabla 25 se presentan los resultados para las tres modalidades de extracción sólido-líquido estudiadas.

Tabla 25. Recuperación (%) según la fuente de agitación para la extracción sólido-líquido

Extracción sól.-líq.	<i>t-p</i>	<i>i-p</i>	<i>t-r</i>	<i>i-r</i>
Agitación magnética	42	1	52	ND
Baño ultrasónico	43	3	50	4
Vibromatic	50	8	58	17

Los mejores resultados se obtuvieron con el Vibromatic, por lo que fue con este agitador vibrador a 950 oscilaciones por minuto con el que se realizaron el resto de las experiencias.

Limpieza

A partir de los datos obtenidos en la etapa de selección del tipo de extracción, se dedujo que con hexano o éter etílico los cromatogramas eran más limpios, de tal manera que para establecer la etapa de limpieza se hicieron una serie extracciones consecutivas con 15 mL para el caso del hexano y éter etílico, en este caso se observaron cromatogramas más limpios con hexano, por lo que se decidió emplear extracciones consecutivas con hexano. Mediante diferentes experiencias en las que se variaron el volumen, tiempo de agitación y número de extracciones, se estableció como etapa de limpieza tres extracciones consecutivas con 10 mL de hexano durante 10 min, siendo los extractos de hexano descartados.

Extractante

Una vez establecida la etapa de limpieza del polen, se procedió a seleccionar el extractante, según los resultados de las pruebas preliminares (Tabla 24), éste debía tener naturaleza alcohólica, es decir metanol o etanol. Para lo cual se evaluaron diferentes opciones, en primer lugar se probó la influencia del pH del extractante, para lo cual se probaron disoluciones de ambos alcoholes aciduladas con ácido clorhídrico (0.1%), obteniéndose el mismo perfil de cromatogramas y porcentajes de recuperación para los *t*-isómeros del 20 y 1% para el metanol y etanol acidulados, respectivamente.

A continuación se realizaron varias experiencias con mezclas hidroalcohólicas, en las que el porcentaje de agua no fue superior al 50%, en todos los caso el volumen fue de 20 mL y el tiempo de agitación de 30 min, en la Figura 24 se presentan los porcentajes de recuperación obtenidos.

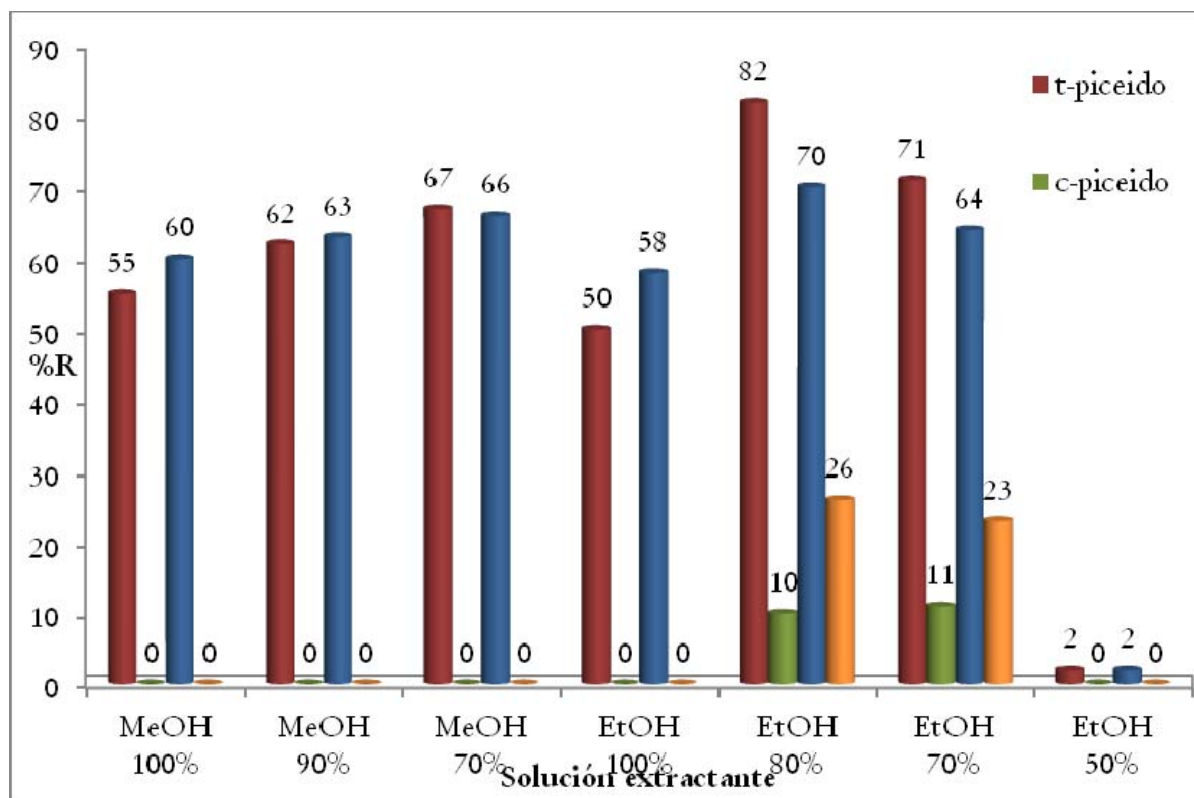


Figura 24. Recuperación (%) en función de la solución extractante por LC-DAD/FLD

Resulta evidente que los mejores resultados se han obtenido con las disoluciones que contenían etanol, pues con ellas se logró extraer pequeñas cantidades de los isómeros *cis* de ambos estilbenos, siendo la mejor la disolución de etanol/agua 80:20, v/v. En este punto, con las experiencias realizadas no fue posible obtener buenos resultados para la determinación de los *cis*-isómeros por DAD, ya que aún había mucho fondo atribuible a la matriz, lo que elevaba los límites de detección, siendo incompatible con los objetivos planteados, aunque para el FLD los resultados son buenos como puede observarse en los cromatogramas de extractos de polen adicionado con 10 mgkg^{-1} de *trans*- y 20 mgkg^{-1} de *cis*-isómeros de la Figura 25.

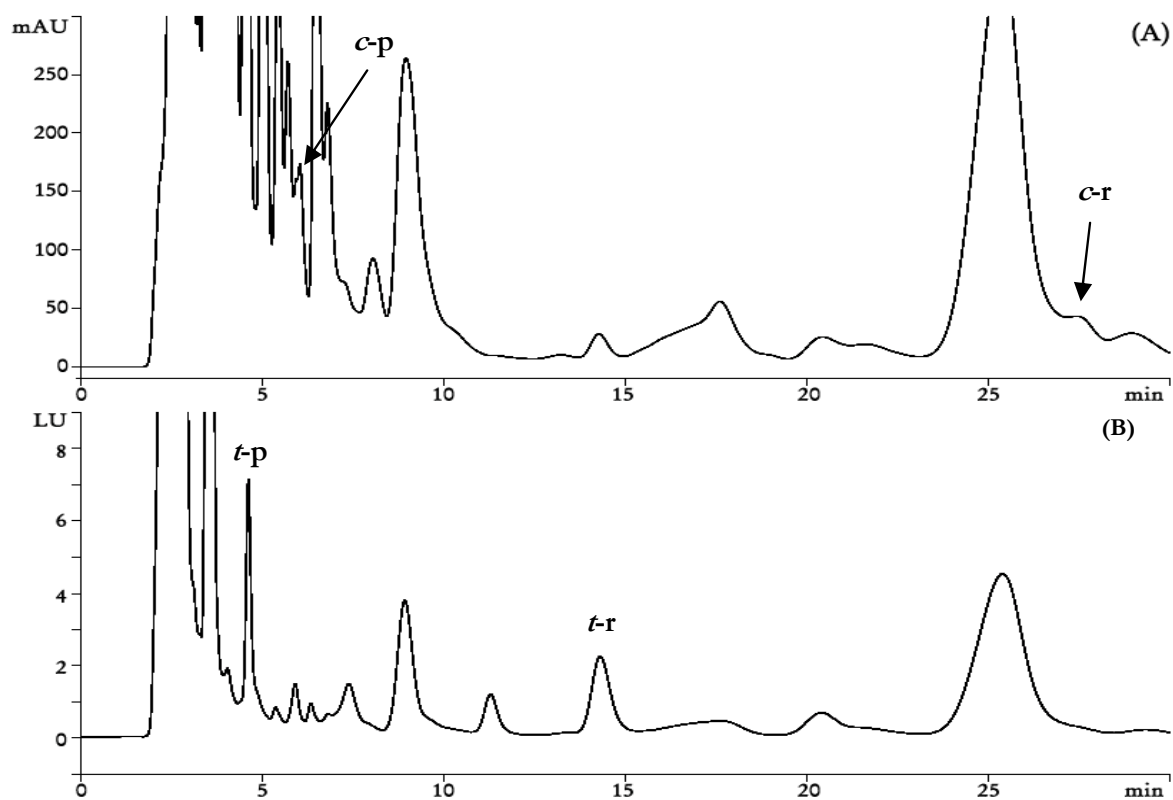


Figura 25. Cromatogramas de extractos de polen adicionados con (A) 20 mgkg^{-1} de *cis*-isómeros por DAD y (B) 10 mgkg^{-1} de *trans* isómeros por FLD

Ante esta situación se tomó la decisión de llevar a cabo la puesta a punto del método únicamente para la detección por espectrometría de masas. A continuación, las muestras extraídas con las disoluciones acuosas de etanol fueron analizadas en el LC-MS, obteniéndose los resultados que se presentan en la Tabla 26.

Tabla 26. Porcentajes de recuperación en función de la solución extractante por HPLC-MS

Extractante	<i>t</i> -piceído	<i>l</i> -piceído	<i>t</i> -resveratrol	<i>l</i> -resveratrol
EtOH 100%	47	55	59	58
EtOH 80%	90	93	91	90
EtOH 70%	83	93	88	91

A la vista de los resultados obtenidos, se seleccionó como solución extractante la mezcla etanol/agua 80:20, v/v. Posteriormente, se estudió el volumen necesario de esta disolución y el tiempo de agitación.

Tiempo de agitación

Se ensayó un intervalo de 30 a 5 min, para lo cual se realizaron dos extracciones consecutivas, sin unir los extractos, para cada tiempo evaluado, de esta manera se estableció además del tiempo, el número de extracciones necesarias, los resultados se muestran en la Tabla 27.

Tabla 27. Porcentajes de recuperación según el número extracciones consecutivas y el tiempo de agitación por LC-MS (n=3)

Nº de extracción	Tiempo de agitación (min)	Porcentajes de recuperación (%R)			
		<i>t</i> -piceído	<i>l</i> -piceído	<i>t</i> -resveratrol	<i>l</i> -resveratrol
1 ^a	30	90	93	91	88
2 ^a		1	1	1	1
1 ^a	20	85	85	80	78
2 ^a		6	7	5	5
1 ^a	10	88	88	84	82
2 ^a		3	4	5	4
1 ^a	5	76	75	82	71
2 ^a		6	7	5	6

Para seleccionar el tiempo de agitación se evaluó el coeficiente de variación porcentual (CV%), encontrándose que entre 30 y 10 min, tuvo un valor 4%, por lo que se seleccionó una extracción de 10 min, para no alargar innecesariamente el procedimiento.

Volumen de extractante

El volumen necesario para la extracción de los analitos se evaluó desde 10 hasta 30 mL, con variaciones de 10 mL, los porcentajes de recuperación obtenidos se presentan en la Tabla 28.

Tabla 28. Porcentajes de recuperación según el volumen de extractante empleado

Volumen (mL)	<i>t</i> -piceido	<i>c</i> -piceido	<i>t</i> -resveratrol	<i>c</i> -resveratrol
30	88	89	87	87
20	86	87	86	85
10	80	71	74	79

Los resultados indicaron que no había una marcada diferencia entre emplear 30 ó 20 mL de disolución extractante, se decidió usar 20 mL, a fin de disminuir el tiempo de evaporación en el rotavapor.

Tratamiento de muestra desarrollado

En resumen, el procedimiento de tratamiento de muestra se divide en tres etapas, limpieza-extracción-concentración, cuyos detalles se muestran en la Figura 26.

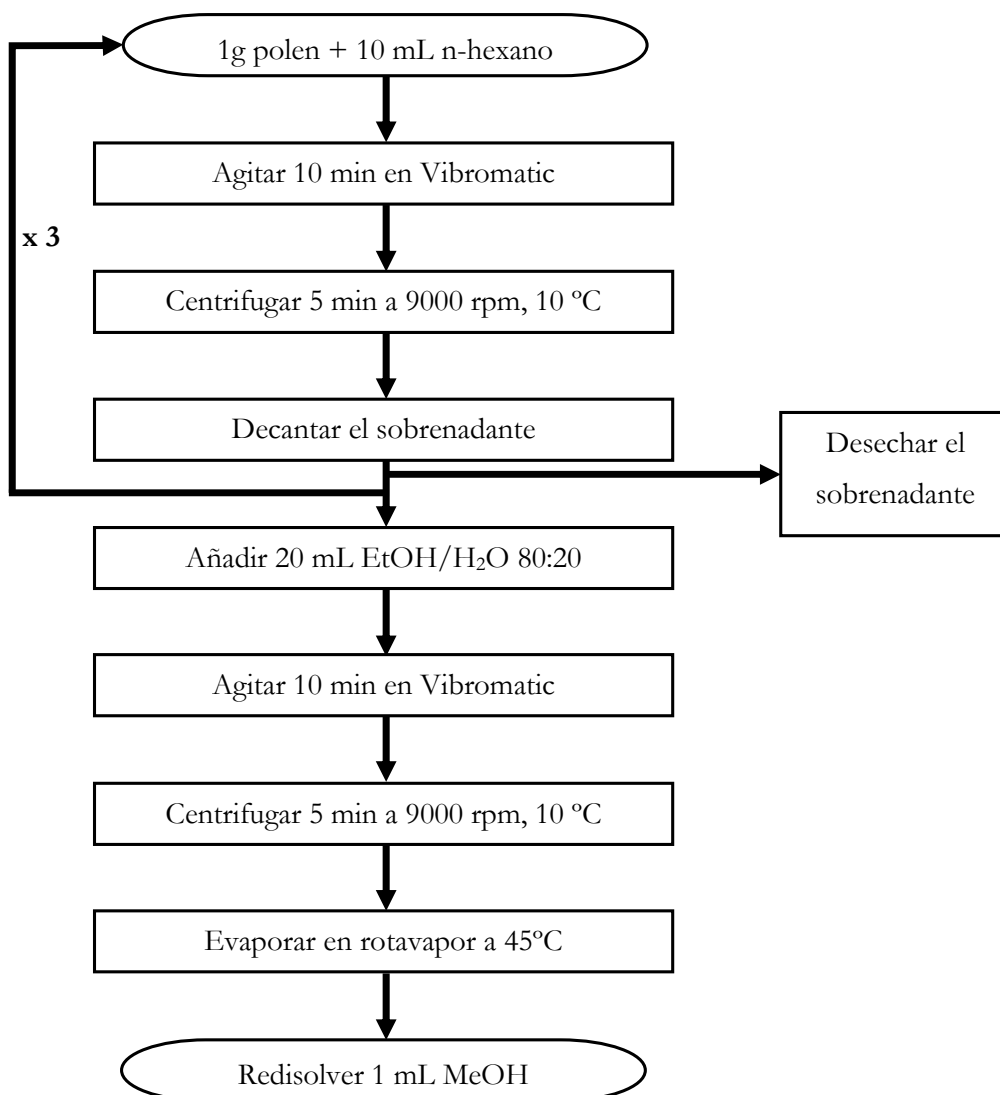


Figura 26. Proceso de extracción de los estilbenos en polen

V.5.3. Validación del método

La validación de la metodología analítica, al igual que en miel, se llevó a cabo siguiendo las directrices marcadas por las guías VICH ^[177,178], el informe técnico de la IUPAC ^[179] y el documento SANCO/10476/2003 ^[180], evaluando selectividad, precisión, límites de detección y cuantificación, linealidad y exactitud para el método propuesto.

Selectividad

Aplicando el método analítico desarrollado se comprobó que en la zona de elución de los analitos de interés no eluía ningún compuesto que pudiera interferir en su cuantificación. Para ello, se inyectaron en el sistema cromatográfico extractos de polen comercial a los que no se había adicionado ningún compuesto y polen a los que se habían adicionado *t/c*-piceído y *t/c*-resveratrol en concentración de 1 mgkg^{-1} . En la Figura 27 se presentan los cromatogramas de los extractos obtenidos en LC-MS.

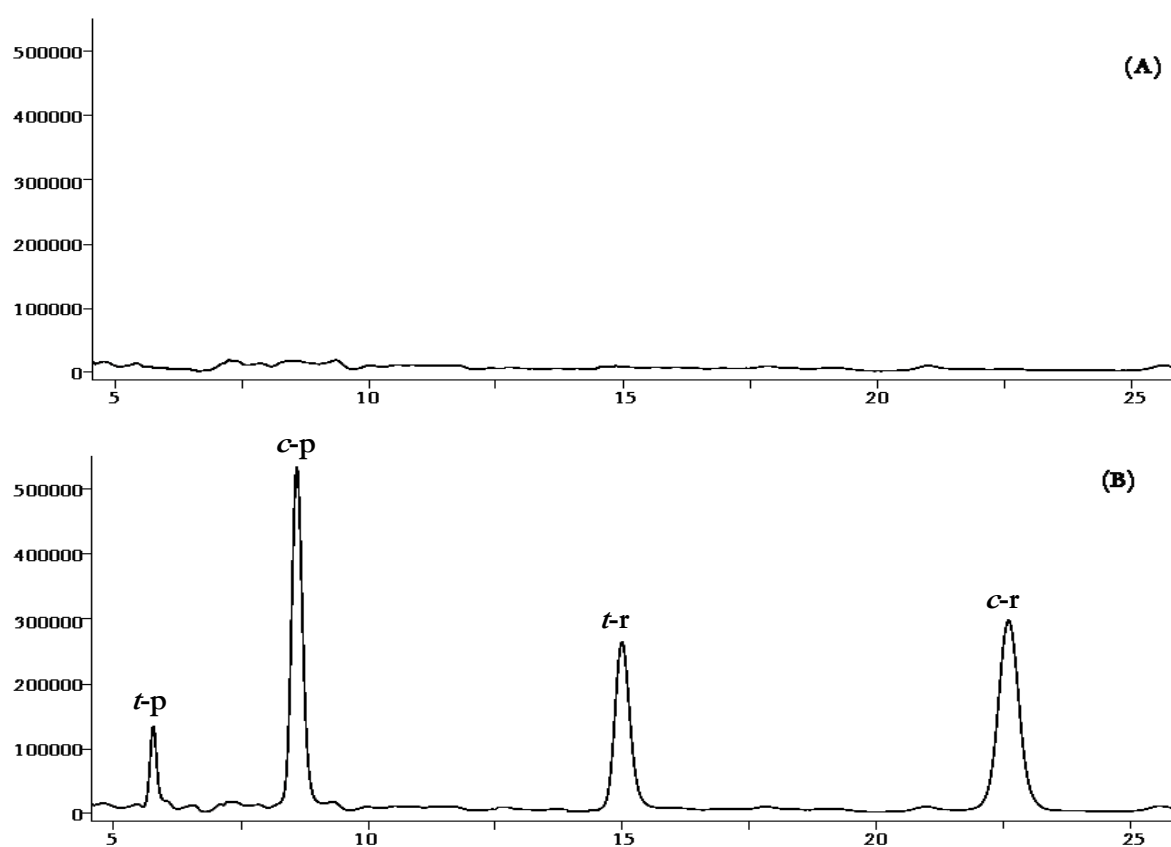


Figura 27. EICs de polen (A) sin añadir y (B) añadido con 1.0 mgkg^{-1} por LC-ESI-MS

En la figura, se puede observar en los cromatogramas obtenidos extrayendo el ion correspondiente a cada analito (A) extracto sin adicionar y (B) extracto adicionando los analitos, no eluye ningún compuesto al tiempo de retención de los analitos, por lo que en estas condiciones podrían determinarse y cuantificarse de modo selectivo.

Precisión

La precisión se estableció en términos de repetibilidad y precisión intermedia. Para evaluar la repetibilidad se sometió a extractos de polen a los cuales se adicionó los analitos de interés en tres niveles de concentración a todo el proceso por triplicado durante el mismo día, para la precisión intermedia en 3 días consecutivos. En la Tabla 29 se muestran los coeficientes de variación del área obtenidos para cada uno de los niveles de concentración.

Tabla 29. Coeficientes de variación en el estudio de precisión del método (n=3)

Compuesto	Concentración (μgkg^{-1})	Repetibilidad	Precisión intermedia
		%CV	%CV
<i>t</i> -piceído	100	4.4	4.8
	250	2.8	3.4
	1000	4.1	4.8
<i>c</i> -piceído	30	4.8	5.0
	125	2.5	2.9
	500	3.1	4.0
<i>t</i> -resveratrol	60	3.7	5.0
	250	3.5	4.3
	1000	2.1	4.4
<i>c</i> -resveratrol	30	4.7	5.5
	125	2.9	3.2
	500	3.6	4.6

Se observa que los coeficientes de variación para ambos parámetros son inferiores al 5%, valor adecuado para la precisión en el caso de análisis de trazas.

Límite de detección y de cuantificación

Se fijó el límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) de forma experimental, de manera análoga al caso del estudio realizado en los extractos de miel. En la Tabla 30 se muestran los resultados obtenidos expresados en μgkg^{-1} .

Tabla 30. LOD y LOQ (μgkg^{-1}) en polen

Compuesto	LOD (μgkg^{-1})	LOQ (μgkg^{-1})
<i>t</i> -piceido	29.9	99.8
<i>c</i> -piceido	9.0	29.9
<i>t</i> -resveratrol	14.1	46.9
<i>c</i> -resveratrol	9.1	30.0

Linealidad y efecto matriz

Con el fin de llevar a cabo la determinación cuantitativa de los analitos y evaluar la existencia de efecto matriz, se procedió de igual modo que en el estudio de los extractos en miel. En Tabla 31 se presentan los parámetros estadísticos de los calibrados de los analitos en metanol y de extractos de polen adicionado al polen en los intervalos de concentración estudiados.

Tabla 31. Parámetros de regresión para los tres tipos de calibrados en los intervalos de concentración (μgkg^{-1}) estudiados

Comp.	Concentrac ión	A $\times 10^5$	s_a $\times 10^5$	b $\times 10^5$	s_b $\times 10^5$	r^2	$s_{y/x}$ $\times 10^5$	
<i>t</i> -p	Patrón	100 – 1000	2.5	2.6	37.9	0.5	0.9995	3.8
	Polen		-0.6	1.0	3.5	0.02	0.9999	0.1
<i>c</i> -p	Patrón	30 – 500	4.6	3.9	42.6	0.8	0.9991	5.7
	Polen		2.4	1.9	21.9	0.4	0.9992	2.7
<i>t</i> -r	Patrón	60 – 1000	1.6	2.9	24.0	0.6	0.9984	4.3
	Polen		1.8	1.4	12.1	0.3	0.9984	2.1
<i>c</i> -r	Patrón	30 – 500	1.6	3.2	43.7	0.6	0.9994	4.6
	Polen		-0.3	4.2	26.7	0.8	0.9972	6.2

Un análisis de los valores de la pendiente obtenidos indica la presencia del efecto matriz, que en este caso se evidencia como la supresión iónica de los compuestos. Por lo tanto, la cuantificación se llevó a cabo por el método patrón externo en polen adicionado con los analitos. Además, puede observarse que la supresión en la intensidad de la señal es del 90% para el *t*-piceido, del 50% para el *c*-piceido y *t*-resveratrol y del 40% para el *c*-resveratrol.

En todos los caso se verificó la tendencia lineal de los calibrados mediante la prueba t, encontrándose en todos los casos que la $t_{\text{experimental}}$ es mayor que la t_{tabulada} , por lo tanto se acepta que el método es lineal con un nivel de confianza del 95% y los coeficientes de regresión (r^2) eran para todos superiores a 0.99.

Exactitud

Se realizó este estudio por triplicado, con polen al cual se le adicionó la cantidad correspondiente de cada uno de los estilbenos en tres niveles de concentración y se sometieron al tratamiento de muestra desarrollado y se calcularon a través de la línea de calibrado. En la Tabla 32 se muestran los porcentajes de error relativo obtenidos.

Tabla 32. Porcentajes de error relativo en el estudio de exactitud (n=3)

Compuesto	Concentración (μgkg^{-1})	% Error relativo (%RE)
<i>t</i> -piceido	100	3.9
	250	2.8
	1000	1.9
<i>c</i> -piceido	30	4.6
	125	4.3
	500	3.1
<i>t</i> -resveratrol	60	3.9
	250	4.8
	1000	2.7
<i>c</i> -resveratrol	30	4.5
	125	4.1
	500	3.2

Se observa que el porcentaje de error relativo para todos los analitos es inferior al 5%, valor que se considera adecuado para la exactitud en este tipo de detector.

V.5.4. Aplicación del método propuesto a muestras de polen comercial

El método desarrollado se aplicó a muestras de polen de diferentes marcas comerciales de origen español. En la Tabla 33 se presentan el intervalo de concentración en μgkg^{-1} encontrado en cinco muestras de polen sometidas al procedimiento establecido.

Tabla 33. Intervalo de concentraciones (μgkg^{-1}) en polen (n=5)

Compuesto	Intervalo de Concentración (μgkg^{-1})
<i>t</i> -piceído	<LOD - <LOQ
<i>c</i> -piceído	<LOD - 43
<i>t</i> -resveratrol	<LOD - 1458
<i>c</i> -resveratrol	<LOD - <LOQ

Los resultados obtenidos indican que en algunas muestras de polen se encuentran presentes los analitos, en el caso del *t*-piceído y *c*-resveratrol la concentración era menor que el LOQ, en cambio el *t*-resveratrol se encontró en concentraciones muy variables. Por lo tanto se puede afirmar que el polen es una posible fuente natural de este compuesto con propiedades tan beneficiosas para el ser humano y la colmena.

V.5.5. Aplicación del método propuesto a muestras de polen de colmenas tratadas con resveratrol

El CAR al igual que en el caso de la miel ha proporcionado las muestras de polen de las colmenas alimentadas con candy o jarabe con resveratrol y con placebo (candy o jarabe sin resveratrol), en total se han analizado 16 muestras: 6 provenientes de colmenas alimentadas con placebo y 10 con candy o jarabe con resveratrol. Las muestras de polen de colmenas alimentadas con placebo se sometieron al procedimiento de extracción establecido, con el fin de comprobar la ausencia de los compuestos de interés y su idoneidad para emplearlo como blanco en la preparación del calibrado sobre matriz adicionada con analitos; los resultados mostraron que las muestras de polen extraído de colmenas alimentadas con placebo

no contenían, con era de esperar, residuos de ninguno de los estilbenos. En la Tabla 34 se presentan los resultados para las muestras polen de colmenas alimentadas con jarabe o candy con resveratrol comercial.

Tabla 34. Concentraciones (mgkg^{-1}) encontradas de los analitos en muestras de polen de colmenas tratadas con resveratrol añadido en candy o jarabe

Tratamiento	Muestra	t-p	c-p	t-r	c-r
Candy R	TN-03	ND	ND	0.44	ND
Candy R	TN-09	ND	ND	0.07	ND
Candy R	TN-19	ND	ND	5.38	0.11
Candy R	TN-23	ND	ND	0.91	ND
Candy R	TN-27	ND	ND	10.29	0.05
Jarabe R	TN-08	ND	ND	0.43	ND
Jarabe R	TN-11	ND	ND	0.23	ND
Jarabe R	TN-14	ND	ND	0.03	ND
Jarabe R	TN-17	ND	ND	1.91	0.05
Jarabe R	TN-29	ND	ND	1.82	0.09

Candy R: candy con resveratrol

Jarabe R: jarabe con resveratrol

En las muestras de polen analizadas no se han detectado residuos de los estereoisómeros *trans/cis* del piceido, mientras que el contenido de resveratrol corresponde mayoritariamente al *t*-resveratrol y en cantidad mucho menor se encontró *c*-resveratrol.

Desde el punto de vista del alimento administrado a las colmenas y en el contenido total de resveratrol en las muestras de polen, se ha realizado una representación gráfica en la Figura 28.

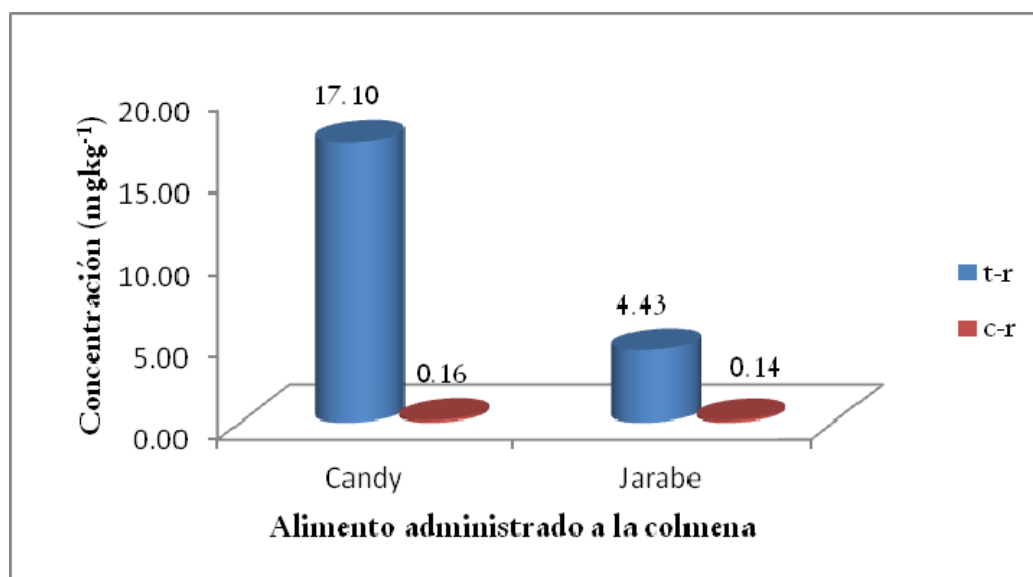


Figura 28. Contenido total de resveratrol (mgkg⁻¹) en polen según el alimento con resveratrol administrado a la colmena

Resulta evidente que se ha encontrado mayor cantidad de *t*-resveratrol en el polen extraído de las colmenas alimentadas con candy adicionado con resveratrol, mientras que el contenido de *c*-resveratrol ha sido del mismo orden independientemente del alimento dado a las colmenas.

Bibliografía

80. A. Liazid, M. Palma, J. Brigui, C.G. Barroso, Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *J. Chromatogr. A*, 1140 (2007) 29–34
81. Aggarwal, Bharat B. and Shishodia, Shishir, Resveratrol in health and disease. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2006
82. M.T. Ribeiro de Lima, P. Waffo-Téguo, P.L. Teissedre, A. Pujolas, J. Vercauteren, J.C. Cabanis, J.M. Mérillon, Determination of stilbenes (trans-astringin, cis- and trans-piceid, and cis- and trans-resveratrol) in portuguese wines. *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 2666-2670
83. G. Likhtenshtein, Stilbenes. Applications in chemistry, life sciences and materials science. Wiley-VCH Germany 2009

84. B. Sun, A.M. Ribes, M.C. Leandro, A.P. Belchior, M.I. Spranger, Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. *Anal. Chim. Acta* 563 (2006) 382-390
85. H. Amira-Guebailia, J. Valls, T. Richard, X. Vitrac, J.P. Monti, J.C. Delaunay, J.M. Mérillon, Centrifugal partition chromatography followed by HPLC for the isolation of cis- ϵ -viniferin, a resveratrol dimer newly extracted from a red Algerian wine. *Food Chem.* 113 (2009) 320–324
86. I. Iliya, Z. Ali, T. Tanaka, M. Iinuma, M. Furusawa, K.I. Nakaya, J. Murata, D. Darnaedi, Stilbenoids from the stem of *Gnetum latifolium* (Gnetaceae). *Phytochemistry* 61 (2002) 959-961
87. I. Iliya, Z. Ali, T. Tanaka, M. Iinuma, M. Furusawa, K.I. Nakaya, J. Murata, D. Darnaedi, N. Matsuura, M. Ubukata, Stilbene derivatives from *Gnetum gnemon* Linn. *Phytochemistry* 62 (2003) 601-606
88. A. Roldán, V. Palacios, I. Caro, L. Pérez Evolution of resveratrol and piceid contents during the industrial winemaking process of sherry wine. *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 4268-4273
89. E. Fagone, E. Conte, E. Gili, M. Fruciano, M.P. Pistorio, D. Lo Furno, R. Giuffrida, N. Crimi, C. Vancheri, Resveratrol inhibits transforming growth factor-beta-induced proliferation and differentiation of *ex vivo* human lung fibroblasts into myofibroblasts through ERK/Akt inhibition and PTEN restoration. *Exp. Lung Res.* DOI: 10.3109/01902148.2010.524722
90. C. Dani, L.S. Oliboni, F. Agostini, C. Funchal, L. Serafini, J.A. Henriques, M. Salvador, Phenolic content of grapevine leaves (*Vitis labrusca* var. Bordo) and its neuroprotective effect against peroxide damage. *Toxicol. Vitro* 24 (2010) 148-153
91. C.J. Weng, C.F. Wu, H.W. Huang, C.H. Wu, C.T. Ho, G.C. Yen, Evaluation of Anti-invasion Effect of Resveratrol and Related Methoxy Analogues on Human Hepatocarcinoma Cells. *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 2886-2894
92. J.M. Leiro, M. Varela, M.C. Piazzon, J.A. Arranz, M. Noya, J. Lamas, The anti-inflammatory activity of the polyphenol resveratrol may be partially related to inhibition of tumour necrosis factor- α (TNF- α) pre-mRNA splicing. *Mol. Immunol.* 47 (2010) 1114-1120
93. K. Szkudelska, T. Szkudelski, Resveratrol, obesity and diabetes. *Eur. J. Pharmacol.* 635 (2010) 1-8

94. S. Paul, C.S. Mizuno, H.Jin Lee, X. Zheng, S. Chajkowisk, J.M. Rimoldi, A. Conney, N. Suh, A.M. Rimando, *In vitro* and *in vivo* studies on stilbene analogs as potential treatment agents for colon cancer. *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 3702-3708
95. U. Stervbo, O. Vang, C. Bonnesen, A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chem.* 101 (2007) 449–457
96. J. Chong, A. Poutaraud, P. Hugueneu, Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Sci.* 177 (2009) 143–155
97. J.P. Roggero, Study of the ultraviolet irradiation of resveratrol and wine. *J. Food Compos. Anal.* 13 (2000) 93-97
98. S.K. Lee, Z.H. Mbwambo, H.S. Chung, L. Luyengi, E.J.C. Gamez, R.G. Mehta, A.D. Kinghorn, J.M. Pezzuto, Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Comb. Chem. High T. Scr.* 1 (1998) 35-46
99. C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga, Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Sci.* 2 (1997) 152-159
100. M.S. Jang, E.N. Cai, G.O. Udeani, K.V. Slowing, C.F. Thomas, C.W.W. Beecher, H.H.S. Fong, N.R. Farnsworth, A.D. Kinghorn, R.G. Mehta, R.C. Moon, J.M. Pezzuto, Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275 (1997) 218-220
101. H.J. Jung, I.A. Hwang, W.S. Sung, H. Kang, B.S. Kang, Y.B. Seu, D.G. Lee, Fungicidal effect of resveratrol on human infectious fungi. *Arch. Pharm. Res.* 28 (2005) 557-560
102. İ. Gülçin, Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 11 (2010) 210–218
103. S. Fabris, F. Momo, G. Ravagnan, R. Stevanato, Antioxidant properties of resveratrol and piceid on lipid peroxidation in micelles and monolamellar liposomes. *Biophy. Chem.* 135 (2008) 76-83
104. M.E. Juan, I. Alfaras, J.M. Planas, Colorectal cancer chemoprevention by trans-resveratrol. *Pharm. Res.* 65 (2012) 584– 591
105. S. Daniells, Science: Resveratrol’s miraculous promise Revisado el 28/09/2009 <http://www.nutraingredients.com/Research/Science-Resveratrol-s-miraculous-promise>

106. V.C.J. de Boer, M. de Goffau, I. Arts, P. Hollman, J. Keijer, SIRT1 stimulation by polyphenols is affected by their stability and metabolism. *Mech. Ageing Dev.* 127 (2006) 618–627
107. D. Sinclair, Sirtuins for healthy neurons. *Nat. Genet.* 37 (2005) 339–340.
108. M. Higes, M.J. Nozal, A. Alvaro, L. Barrios, A. Meana, R. Martín-Hernández, J.L. Bernal, J. Bernal, The stability and effectiveness of fumagillin in controlling *Nosema ceranae* (Microsporidia) infection in honey bees (*Apis mellifera*) under laboratory and field conditions. *Apidologie* 42 (2011) 364–377
109. Mega Resveratrol, Resveratrol Benefits, Health benefits of *trans* resveratrol supplements <http://megaresveratrol.net/Resveratrol-health-benefits.html>, revisado el 20 enero de 2012
110. I. Durán-Merás, T. Galeano-Díaz, D. Airado-Rodríguez, Post-column on-line photochemical derivatization for the direct isocratic-LC-FLD analysis of resveratrol and piceid isomers in wine. *Food Chem.* 109 (2008) 825-833
111. M.V. Martínez-Ortega, M.C. García-Parrilla, A.M. Troncoso, Changes in phenolic composition of wines submitted to in vitro dissolution test. *Food Chem.* 73 (2001) 11-16
112. L. Mercolini, M.A. Saracino, F. Bugamelli, A. Ferranti, M. Malaguti, S. Hrelia, M.A. Raggi, HPLC-F analysis of melatonin and resveratrol isomers in wine using an SPE procedure. *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1007-1014
113. A.B. Cerezo, W. Tesfaye, M.J. Torija, E. Mateo, M.C. García-Parrilla, A.M. Troncoso, The phenolic composition of red wine vinegar produced in barrels made from different woods. *Food Chem.* 109 (2008) 606-615
114. T. Galeano-Díaz, I. Durán-Merás, D. Airado-Rodríguez, Determination of resveratrol in wine by photochemically induced second-derivative fluorescence coupled with liquid–liquid extraction. *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1999-2007
115. J. López-Hernández, P. Paseiro-Losada, A.T. Sanches-Silva, M.A. Lage-Yusty, Study of the changes of *trans*-resveratrol caused by ultraviolet light and determination of *trans*- and *cis*-resveratrol in Spanish white wines. *Eur. Food Res. Technol.* 225 (2007) 789-796
116. R.M. Lamuela-Raventos, A.I. Romero-Pérez, A.L. Waterhouse, M.C. de la Torre-Boronat, Direct HPLC analysis of *cis*- and *trans*-resveratrol and piceid isomers in spanish red *Vitis vinifera* wines. *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995) 281-283

117. L. Gambelli, G.P. Santaroni, Polyphenols content in some italian red wines of different geographical origins. *J. Food Compos. Anal.* 17 (2004) 613-618
118. M.A. Rodríguez-Delgado, G. González, J.P. Pérez-Trujillo, F.J. García-Montelongo, Trans-resveratrol in wines from the Canary Islands (Spain). Analysis by high performance liquid chromatography. *Food Chem.* 76 (2002) 371-375
119. L. Arce, M.T. Tena, A. Rios, M. Valcárcel, Determination of trans-resveratrol and other polyphenols in wines by a continuous flow sample clean-up system followed by capillary electrophoresis separation. *Anal. Chim. Acta* 359 (1998) 27-38
120. A.V. Sakkiadi, M. N. Stavrakakis, S. A. Haroutounian, Direct HPLC assay of five biologically interesting phenolic antioxidants in varietal Greek red wines. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 34 (2001) 410-413
121. T. Galeano-Díaz, I. Durán-Merás, D. Airado-Rodríguez, Isocratic chromatography of resveratrol and piceid after previous generation of fluorescent photoproducts: Wine analysis without sample preparation. *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 3110-3119
122. C. Domínguez, D.A. Guillén, C.G. Barroso, Automated solid-phase extraction for sample preparation followed by high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection for the analysis of resveratrol derivatives in wine. *J. Chromatogr. A* 918 (2001) 303-310
123. A.A. Souto, M.C. Carneiro, M. Seferin, M.J.H. Senna, A. Conz, K. Gobbi, Determination of trans-resveratrol concentrations in brazilian red wines by HPLC. *J. Food Compos. Anal.* 14 (2001) 441-445
124. P. Viñas, C. López-Erroz, J.J. Marín-Hernández, M. Hernández-Córdoba, Determination of phenols in wines by liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 871 (2000) 85-93
125. J.A.B. Baptista, J.F.daP. Tavares, R.C.B. Carvalho, Comparison of polyphenols and aroma in red wines from Portuguese mainland versus Azores Islands. *Food Res. Int.* 34 (2001) 345-355
126. M.A. Rodríguez-Delgado, S. Malovaná, Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. *J. Chromatogr. A* 912 (2001) 249-257
127. S. Navarro, M. León, L. Roca-Pérez, R. Boluda, L. García-Ferriz, P. Pérez-Bermúdez, I. Gavidia, Characterisation of Bobal and Crujidera grape cultivars, in comparison with Tempranillo and Cabernet Sauvignon: Evolution of leaf

- macronutrients and berry composition during grape ripening. *Food Chem.* 108 (2008) 182-190
128. J.B. Jean-Denis, R. Pezet, R. Tabacchi, Rapid analysis of stilbenes and derivatives from downy mildew-infected grapevine leaves by liquid chromatography–atmospheric pressure photoionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1112 (2006) 263-268
129. J.B. Jiménez Sánchez, E. Crespo Corral, M.J. Santos Delgado, J.M. Orea, A. González Ureña, Analysis of trans-resveratrol by laser ionization mass spectrometry and HPLC with fluorescence detection Comparison between both techniques. *J. Chromatogr. A* 1074 (2005) 133-138
130. S.Y. Wang, C.T. Chen, C.Y. Wang, P. Chen, Resveratrol content in strawberry fruit is affected by preharvest conditions. *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 8269-8274
131. I. Nicoletti, A. De Rossi, G. Giovinazzo, D. Corradini, Identification and quantification of stilbenes in fruits of transgenic tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.) by reversed phase HPLC with photodiode array and mass spectrometry detection. *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 3304-3311
132. G. Chiva-Blanch, M. Urpi-Sarda, M. Rotchés-Ribalta, R. Zamora-Ros, R. Llorach, R.M. Lamuela-Raventós, R. Estruch, C. Andrés-Lacueva, Determination of resveratrol and piceid in beer matrices by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 698–705
133. P. Viñas, N. Campillo, M. Hernández-Pérez, M. Hernández-Córdoba, A comparison of solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction coupled to liquid chromatography for the rapid analysis of resveratrol isomers in wines, musts and fruit juices. *Anal. Chim. Acta* 611 (2008) 119-125
134. S.S. Lee, S.M. Lee, M. Kim, J. Chun, Y.K. Cheong, J. Lee, Analysis of trans-resveratrol in peanuts and peanut butters consumed in Korea. *Food Res. Int.* 37 (2004) 247–251
135. Y. Chukwumah, L. Walker, B. Vogler, M. Verghese, Changes in the phytochemical composition and profile of raw, boiled, and roasted peanuts. *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 9266-9273
136. C. Counet, D. Callemien, S. Collin, Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid. *Food Chem.* 98 (2006) 649-657
137. Z. Kerem, I. Bilkis, M.A. Flaishman, L. Sivan, Antioxidant activity and inhibition of α -glucosidase by trans-resveratrol, piceid, and a novel trans-

- stilbene from the roots of israeli *Rumex bucephalophorus* L. *J. Agric. Food Chem.* 56 (2006) 1243-1247
138. P. Montoro, S. Piacente, W. Oleszek, C. Pizza, Liquid chromatography/tandem mass spectrometry of unusual phenols from *Yucca schidigera* bark: comparison with other analytical techniques. *J. Mass Spectrom.* 39 (2004) 1131–1138
139. B. Shao, H.Z. Guo, Y.J. Cui, A.H. Liu, H.L. Yu, H. Guo, M. Xu, D.A. Guo, Simultaneous determination of six major stilbenes and flavonoids in *Smilax china* by high performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 737–742
140. L.L. Lin, C.Y. Lien, Y.C. Cheng, K.L. Ku, An effective sample preparation approach for screening the anticancer compound piceatannol using HPLC coupled with UV and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B* 853 (2007) 175-182
141. M. Vaheer, M. Koel, Separation of polyphenolic compounds extracted from plant matrices using capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 990 (2003) 225–230
142. L. Le Corre, A. Léger-Enreille, N. Chalabi, L. Delort, Y.J. Bignon, D.J. Bernard-Gallon, HPLC analysis of trans-resveratrol in human plasma after red wine consumption. *The open chemical and biomedical methods journal* 1(2008) 7-10
143. M. Zhou, X. Chen, D. Zhong, Simultaneous determination of trans-resveratrol-3-O-glucoside and its two metabolites in rat plasma using liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B* 854 (2007) 219-223
144. M.V. Martínez-Ortega, M.C. García-Parrilla, A.M. Troncoso, Comparison of different sample preparation treatments for the analysis of wine phenolic compounds in human plasma by reversed phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* 502 (2004) 49-55
145. D.J. Boocok, K.R. Patel, G.E.S. Faust, D.P. Normolle, T.H. Marczylo, J.A. Crowell, D.E. Brenner, T.D. Booth, A. Gescher, W.P. Steward, Quantitation of trans-resveratrol and detection of its metabolites in human plasma and urine by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 848 (2007) 182-187
146. H. He, X. Chen, G. Wang, J. Wang, A.K. Davey, High-performance liquid chromatography spectrometric analysis of trans-resveratrol in rat plasma. *J. Chromatogr. B* 832 (2006) 177-180

147. G.J. Soleas, J. Yan, D.M. Goldberg, Ultrasensitive assay for three polyphenols (catechin, quercetin and resveratrol) and their conjugates in biological fluids utilizing gas chromatography with mass selective detection. *J. Chromatogr. B* 757 (2001) 161-172
148. H. Zhang, L. Xu, J. Zheng, Anodic voltammetric behavior of resveratrol and its electroanalytical determination in pharmaceutical dosage form and urine. *Talanta* 71 (2007) 19–24
149. A.M. Gómez-Caravaca, M. Gómez-Romero, D. Arráez-Román, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1220-1234
150. P. Viñas, N. Martínez-Castillo, N. Campillo, M. Hernández-Córdoba, Directly suspended droplet microextraction with in injection-port derivatization coupled to gas chromatography–mass spectrometry for the analysis of polyphenols in herbal infusions, fruits and functional foods. *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 639–646
151. Y. Wenli, S. Bo, Z. Yaping, Supercritical CO₂ extraction of resveratrol and its glycoside piceid from chinese traditional medicinal herb *Polygonum cuspidatum*. *J. Sci. Food Agric.* 85(2005)489-492
152. B. Beňová, M. Adam, P. Pavlíková, J. Fischer, Supercritical fluid extraction of piceid, resveratrol and emodin from Japanese knotweed. *J. Supercrit. Fluids* 51 (2010) 325-330
153. M.C. Pascual-Martí, A. Salvador, A. Chafer, A. Berna, Supercritical fluid extraction of resveratrol from grape skin of *Vitis vinifera* and determination by HPLC. *Talanta* 54 (2001) 735-740
154. T. Vatai, M. Škerget, Z. Knez, Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. *J. Food Eng.* 90 (2009) 246–254
155. L. Casas, C. Mantell, M. Rodríguez, E.J. Martínez de la Ossa, A. Roldán, I. De Ory, I. Caro, A. Blandino, Extraction of resveratrol from the pomace of Palomino fino grapes by supercritical carbon dioxide. *J. Food Eng.* 96 (2010) 304–308
156. Z. Piñeiro, M. Palma, C.G. Barroso, Determination of trans-resveratrol in grapes by pressurised liquid extraction and fast high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1110 (2006) 61-65

157. F.Y. Du, X.H. Xiao, G.K. Li, Application of ionic liquids in the microwave-assisted extraction of trans-resveratrol from *Rhizoma Polygoni Cuspidati*. *J. Chromatogr. A* 1140 (2007) 56-62
158. J.X. Wang, X.H. Xiao, G.K. Li, Study of vacuum microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds and pigment from chinese herbs. *J. Chromatogr. A* 1198–1199 (2008) 45-53
159. Ö. Tokuşoğlu, M. Kemal Ünal, F. Yemiş, Determination of the Phytoalexin Resveratrol (3,5,4'-Trihydroxystilbene) in Peanuts and Pistachios by High-Performance Liquid Chromatographic Diode Array (HPLC-DAD) and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 5003-5009
160. G.J. Soleas, J. Yan, D.M. Goldberg, Ultrasensitive assay for three polyphenols (catechin, quercetin and resveratrol) and their conjugates in biological fluids utilizing gas chromatography with mass selective detection. *J. Chromatogr. B* 757 (2001) 161-172
161. T. Luan, G. Li, Z. Zhang, Gas-phase postderivatization following solid-phase microextraction for rapid determination of trans-resveratrol in wine by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 424 (2000) 19-25
162. X. Gu, Q. Chu, M. O'Dwyer, M. Zeece, Analysis of resveratrol in wine by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 471-481
163. S. Orlandini, I. Giannini, S. Pinzauti, S. Furlanetto, Multivariate optimisation and validation of a capillary electrophoresis method for the analysis of resveratrol in a nutraceutical. *Talanta* 74 (2008) 570-577
164. J. Woraratphoka, K.O. Intarapichet, K. Indrapichate, Phenolic compounds and antioxidative properties of selected wines from the northeast of Thailand. *Food Chem.* 104 (2007) 1485-1490
165. Q.F. Zhang, S.C. Li, W.P. Lai, H.Y. Cheung, β -Cyclodextrin facilitates simultaneous analysis of six bioactive components in *Rhizoma Smilacis Glabrae* by capillary zone electrophoresis. *Food Chem.* 113 (2009) 684-691
166. J. Pazourek, D. Gajdošová, M. Spanilá, M. Farková, K. Novotná, J. Havel, Analysis of polyphenols in wines: Correlation between total polyphenolic content and antioxidant potential from photometric measurements Prediction of cultivars and vintage from capillary zone electrophoresis fingerprints using artificial neural network. *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 48-54
167. M. Spanilá, J. Pazourek, M. Farková, J. Havel, Optimization of solid-phase extraction using artificial neural networks in combination with experimental

- design for determination of resveratrol by capillary zone electrophoresis in wines. *J. Chromatogr. A* 1084 (2005) 180-185
168. P. Jáč, M. Polášek, M. Pospíšilová, Recent trends in the determination of polyphenols by electromigration methods. *J. Pharmaceut. Biomed.* 40 (2006) 805-814
169. F. Enguo, H. Xiaojing, Z. Kai, B. Yuhua, G. Ruyu, Y. Chao, Comparison of Micellar Electrokinetic Chromatography and Microcolumn High Performance Liquid Chromatography for Resveratrol Analysis. *Chin. J. Chromatogr.* 25 (2007) 319-321
170. L. Gao, Q. Chu, J. Ye, Determination of trans-Resveratrol in wines, herbs and health food by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chem.* 78 (2002) 255-260
171. Y.H. Chen, Y.L. Chung, C.H. Lin, Ultra-low-temperature non-aqueous capillary electrophoretic separation–77 K fluorescence spectroscopic detection for the on-line identification of photo-converted analytes of trans-resveratrol. *J. Chromatogr. A* 943 (2002) 287-294
172. A.M. Gil, I.F. Duarte, M. Godejohann, U. Braumann, M. Maraschin, M. Spraul, Characterization of the aromatic composition of some liquid foods by nuclear magnetic resonance spectrometry and liquid chromatography with nuclear magnetic resonance and mass spectrometric detection. *Anal. Chim. Acta* 488 (2003) 35–51
173. I. Kolouchová-Hanzlíková, K. Melzoch, V. Filip, J. Šmidrkal, Rapid method for resveratrol determination by HPLC with electrochemical and UV detections in wines. *Food Chem.* 87 (2004) 151-158
174. J. Zhou, H. Cui, G. Wan, H. Xu, Y. Pang, C. Duan, Direct analysis of trans-resveratrol in red wine by high performance liquid chromatography with chemiluminescent detection. *Food Chem.* 88 (2004) 613-620
175. J.J. Ren, H.Y. Liu, Y.H. Hao, P.G. He, Y.Z. Fang, Determination of resveratrol in red wine by solid phase extraction-flow injection chemiluminescence method. *Chin. Chem. Lett.* 18 (2007) 985-988
176. S.K. Babu, K.V. Kumar, G.V. Subbaraju, Estimation of trans-Resveratrol in Herbal Extracts and Dosage Forms by High-Performance Thin-Layer Chromatography. *Chem. Pharm. Bull.* 53 (2005) 691—693
177. VICH Topic GL1: Validation of analytical procedures: Definitions and terminology. London, 10 december 1998.

178. VICH Topic GL2: Validation of analytical procedures: Methodology. London, 10 december 1998.
179. M. Thompson, S.L.R. Ellison, R. Wood, Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl. Chem.* 74 (2002) 835-855
180. European Commission, Directorate General for Health and Consumer Affairs. (5 February 2004). Quality control procedures for pesticide residues analysis (Document No. SANCO/10476/2003) Brussels; Belgium
181. R. Martín-Hernández, A. Meana, P. García-Palencia, P. Marín, C. Botías, E. Garrido-Bailón, L. Barrios, M. Higes, Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. *App. Environ. Microbiol.* 75 (2009) 2554–2557

VI. DETERMINACIÓN DE TRIPTÓFANO Y METABOLITOS EN MIEL

VI.1. Mieles monoflorales

La miel es un alimento natural de gran interés por su alto valor nutricional así como por sus propiedades terapéuticas y medicinales ^[182]. La apiterapia está ganando popularidad en medicina preventiva en diversas condiciones y enfermedades sin olvidar sus efectos de promotora de la salud y bienestar. Debido a su poder edulcorante, color y aroma, la miel también se emplea en lugar del azúcar y como conservante en multitud de alimentos. La composición y propiedades de una miel concreta dependen primordialmente del tipo de flora visitada por las abejas, las condiciones climáticas y la actividad de los apicultores.

Desde el punto de vista químico la miel es una matriz compleja constituida por una mezcla concentrada de azúcares y con un contenido amplio de componentes minoritarios de muy diversa naturaleza química. Muchos de esos componentes son responsables de sus propiedades beneficiosas, así tenemos desde los compuestos de muy alto peso molecular (proteínas), sustancias excretadas por las abejas en la miel (glucosa-oxidasa, invertasa, sacarasa, distasa y catalasa), a compuestos peculiares y particularmente abundantes como metabolitos secundarios de las plantas, tal es el caso del ácido kinurénico (KYNA) en mieles de castaño ^[59,63] con las anotaciones que ya se han realizado en el Capítulo II al respecto. Todo ello dentro de una pléyade de componentes minoritarios entre los que cabe resaltar el grupo de los compuestos fenólicos ^[183].

El ácido kinurénico es un producto derivado de la degradación del triptófano, junto al ácido xanturénico y la kinurenina, con propiedades medicinales muy diferentes entre ellos, de ahí el interés creciente en su determinación para, en nuestro caso, hacerles responsables de la identificación de algún origen botánico o confirmar su presencia natural en determinadas mieles no consideradas hasta ahora, como posibles indicadores de alguna adulteración y por supuesto para tener información acerca de la seguridad alimentaria de ese producto.

VI.2. Antecedentes bibliográficos para el análisis de triptófano y sus metabolitos

Ya se ha comentado el interés que existe sobre los compuestos que nos ocupan en la búsqueda de marcadores de origen floral así como la inquietud por evaluarlos en diferentes matrices biológicas relacionadas con enfermedades desgraciadamente muy actuales, por ello aquí vamos a resumir aquellos aspectos más significativos en cuanto a la metodología analítica a emplear. Obviamente hay innumerables propuestas, algunas con equipamiento realmente sofisticado, nosotros hemos intentado llevarlo a cabo con instrumentación ya considerada habitual en la mayoría de los laboratorios.

En relación con el análisis de estos compuestos en la miel, en algunas publicaciones recientes relacionadas con la búsqueda de marcadores del origen botánico, se está dando más importancia a la evaluación de KYNA, para lo que se han empleado como técnicas de detección la espectrometría de masas (MS), o la resonancia magnética nuclear (NMR) ^[56-60,62-65,184]. El análisis por cromatografía de líquidos (en modo de gradiente con columna C₁₈) con detección de diodos en fila y espectrometría de masas con ionización electrospray (LC-DAD-MS-ESI), generalmente implica la dilución y centrifugación de las muestras, que luego son sometidas a extracción en fase sólida ^[58,62,63,65]. Resulta sorprendente el hecho de que en ningún caso, cuando se emplea esta técnica, se haga referencia a alguna influencia de la miel como matriz, si se toma en cuenta que como ya se ha señalado la miel es una matriz muy compleja, cuya composición depende fuertemente del néctar o mielato del que procede, y por lo tanto hay diferencias importantes en términos de la matriz entre las mieles de diversos orígenes botánicos.

El hecho de no considerar el efecto de la matriz podría explicar las grandes diferencias en las cantidades de KYNA detectado en los distintos estudios, con valores máximos que van de 2 gkg⁻¹ ^[62] a 5 mgkg⁻¹ ^[66] en muestras del mismo origen botánico, aunque también hay que señalar que la estabilidad del analito, que

siempre es de gran importancia, con frecuencia no se considera en este tipo de análisis ^[185]. Además, las conclusiones generales se basan a menudo en el análisis de una o pocas muestras ^[62,66], lo cual es problemático desde el punto de vista analítico, sobre todo si las muestras se han obtenido en el mercado sin conocer realmente su origen y procesado.

Como ya se ha apuntado anteriormente y debido a su implicación en varias enfermedades, se han propuesto un gran número de métodos cromatográficos para analizar estos compuestos en matrices biológicas. Existen varios enfoques que incluyen la determinación de la KYN, el KYNA y en ocasiones el XA mediante detección UV o de fluorescencia ^[186]. En el caso de la detección por fluorescencia, usualmente se añade acetato de zinc en post-columna para mejorar la señal ^[187-190], aunque en otro método se empleó la detección de fluorescencia inducida por láser ^[191]. El KYNA también ha sido analizado directamente por espectrofluorimetría previa derivatización con peroxidasa de rábano (HRP) en presencia de peróxido de hidrógeno ^[192-194], o por reacción fotoquímica post-columna con peróxido de hidrógeno ^[195]. También se ha determinado KYNA por detección UV ^[196,197], o espectrofotometría después de la derivación con ácido sulfanílico diazotizado ^[198], y con menor frecuencia usando NMR ^[199], o la espectrometría de masas ^[77,200-202].

En general, cuando se emplea cromatografía líquida se prefiere una combinación de detectores UV y fluorescencia, y con frecuencia las fases móviles propuestas no son compatibles con los detectores de espectrometría de masas ^[203]. Los cuatro compuestos de interés en nuestro estudio, han sido determinados por detección electroquímica sin emplear ningún proceso de derivatización debido a la selectividad de este detector ^[74]. En diferentes especies de setas se han determinado triptófano, kinurenina y ácido kinurénico empleando HPLC-UV previa extracción sólido-líquido y purificación por TLC ^[204].

En resumen, en la revisión de la literatura existente, se han encontrado muchas propuestas para la determinación de KYNA, algunas menos para KYN, pocas de XA y muy pocas para la medición simultánea de TRP, KYN, KYNA y XA, y por supuesto no se ha propuesto un método para la determinación simultánea de los cuatro compuestos en la miel.

Dada la falta de estudios sobre la determinación simultánea de estos compuestos en miel, y que la mayoría de los trabajos se realizan en matrices biológicas^[77,187-203], se ha desarrollado un método de cromatografía de líquidos con detección de diodos en fila y fluorescencia (LC-DAD/FLD) previa extracción en fase sólida (SPE) para el análisis simultáneo de TRP, KYNA, KYN y XA en muestras de miel de distintos orígenes botánicos, prestando especial atención al efecto matriz que puede ejercer una fuerte influencia en la cuantificación en mieles. También se ha empleado LC-MS/MS con el fin de identificar los compuestos mediante el espectro de masas y para cuantificar ciertos analitos presentes en niveles de trazas en algunos tipos de miel cuando no fue posible por DAD-FLD.

VI.3. Desarrollo de la Metodología Analítica

Debido a que, como se ha señalado, no se encontraron referencias a métodos en los cuales se analizaran simultáneamente los analitos en mieles, se han probado en primer lugar condiciones cromatográficas favorables para la detección por espectrometría de masas, compatibles con los detectores más clásicos.

VI.3.1. Disoluciones

Los patrones de triptófano y de los ácidos xanturénico y kinurénico se prepararon por pesada en una concentración de 1000 mgL⁻¹ en hidróxido de sodio 0.1 M, mientras que la disolución patrón de kinurenina se disolvió en agua. Todas se almacenaron a 4°C y protegidas de la luz. Estas soluciones permanecieron estables por un período de 6 meses.

Las disoluciones de trabajo de 100 mgL^{-1} se prepararon por dilución en agua de la disolución madre de patrones. Estas se utilizaron para elaborar la mezcla de patrones empleadas para todas las pruebas posteriores.

VI.3.2. Condiciones cromatográficas

Condiciones para la detección

En esta parte del trabajo se han empleado dos sistemas de detección, uno compuesto por diodos en fila/fluorescencia (DAD/FLD) y el otro por espectrometría de masas con analizador de trampa de iones (MS/MS). Se hicieron las pruebas con una fase móvil compuesta por metanol-formiato de amonio 20 mM pH 6.8, en proporción 5:95 (v/v), con una columna Synergi Hydro ($30 \times 4.6 \text{ mm}$ i.d.) con flujo 1 mLmin^{-1} a 30°C .

DetECCIÓN DAD/FLD

Las primeras experiencias se realizaron con el sistema de detección LC-DAD/FLD, donde se inyectaron disoluciones individuales de patrones de 10 mgL^{-1} en agua para obtener los espectros de KYN, XA y KYNA en el DAD en un intervalo de 200 a 400 nm. Para el TRP se obtuvieron los espectros de excitación (entre 200 y 300 nm) y emisión (entre 300 y 500 nm) con el detector de fluorescencia.

En la Figura 29 se pueden observar los máximos de absorción para la kinurenina de 226 y 258 nm, el ácido xanturénico de 244 nm y el ácido kinurénico 244 y 216, el primer valor corresponde al de máxima absorción, siendo estos los valores los seleccionados para la cuantificación de estos tres analitos.

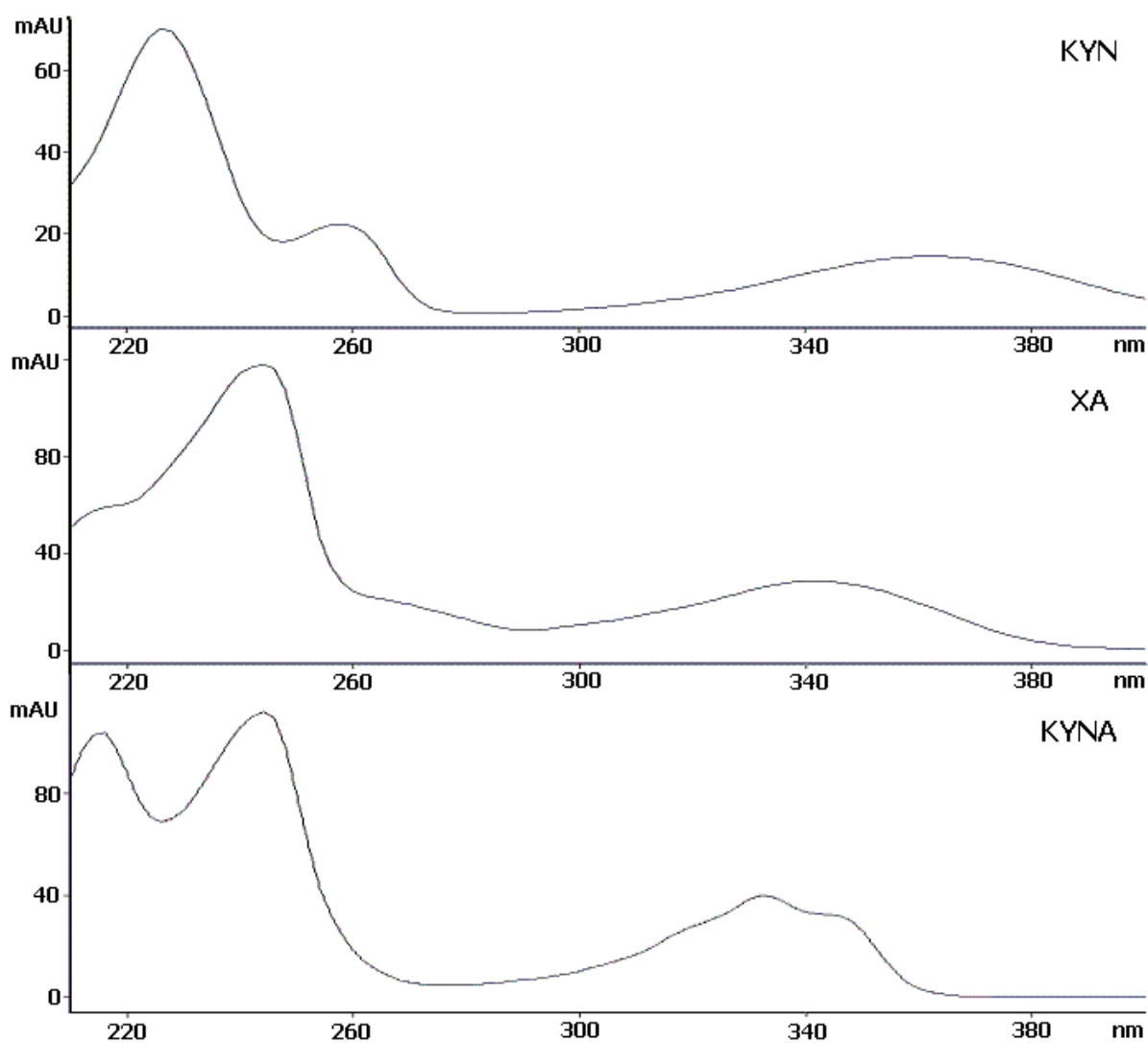


Figura 29. Espectros de absorción UV-Visible de disoluciones de KYN, XA y KYNA de 5 mgL⁻¹

En la Figura 30 se muestran los espectros de emisión y excitación del triptófano con máximos de emisión y excitación de 272 y 354 nm, respectivamente. Se decidió utilizar la detección por fluorescencia para la determinación del triptófano debido a la mayor selectividad que presentaba frente a la absorción molecular, puesto que la matriz contiene muchos componentes que presentan señal en el DAD.

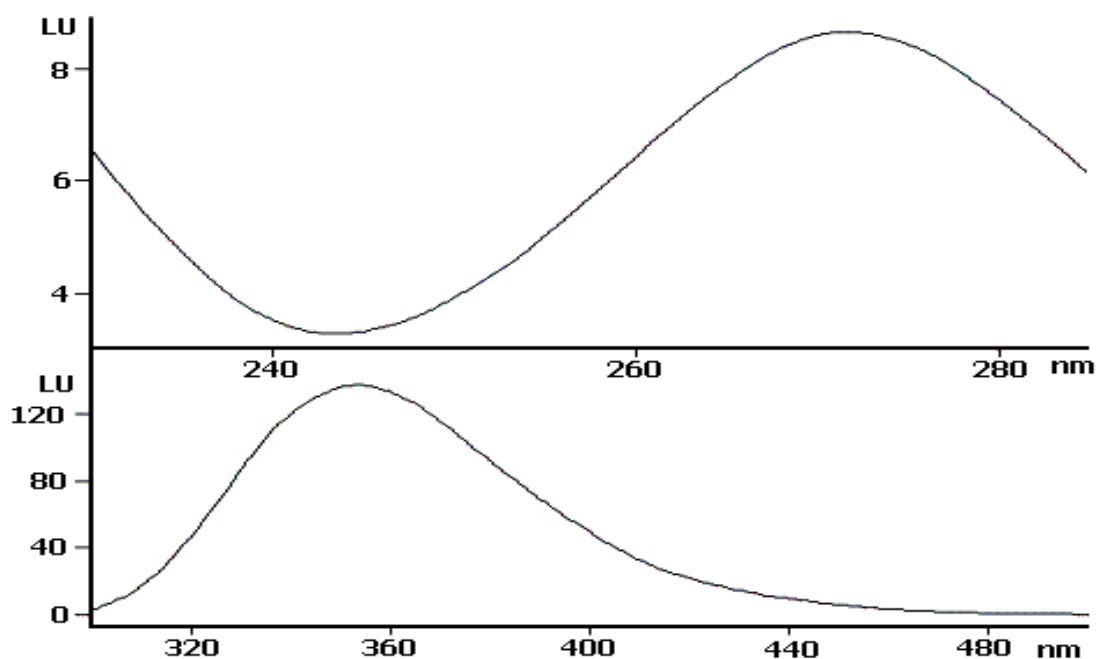


Figura 30. Espectros de excitación y emisión del triptófano en disolución de 5 mgL⁻¹

Espectrometría de masas

Para la detección por espectrometría de masas se ha utilizado una trampa de iones. Para establecer las condiciones adecuadas se introdujeron directamente en el MS/MS disoluciones individuales de los patrones (1 mgL⁻¹) en modo infusión, empleando una bomba de infusión con jeringa a un flujo de 5 μLmin⁻¹. En APCI-MS, los espectros obtenidos para cada compuesto presentaban como ion mayoritario el correspondiente [M + H]⁺, con la excepción del TRP para el que la señal más intensa fue la del [M + H-NH₃]⁺. Estos iones se seleccionaron como iones precursores para obtener iones producto en modo MRM. Las transiciones MRM que proporcionaron la señal más alta se utilizaron para la cuantificación, mientras que la siguiente transición MRM con mayor señal se empleó para la confirmación.

Se estudiaron de manera univariada los parámetros que más influyen en la detección en la trampa de iones, como son corona, voltaje del capilar, temperatura de vaporización, flujo del gas secante, presión del nebulizador y amplitud del fragmentador.

El estudio de la corriente en la corona se llevó a cabo desde 4000 a 6000 nA, manteniendo el voltaje del capilar en 4000V, el flujo del gas secante en 5 Lmin⁻¹, la temperatura del gas secante en 350°C y la temperatura de vaporización en 350°C, los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 35.

Tabla 35. Estudio de la influencia de la corriente en de aguja corona en la S/N, área (A) e intensidad (I) de los iones mayoritarios de cada analito

Ion, m/z	Corriente, μA	S/N	A ($\times 10^7$)	I ($\times 10^6$)
209	4.0	957	1.56	1.70
	4.5	1112	1.76	2.10
	5.0	1015	1.76	1.99
	6.0	9131	1.84	1.98
188	4.0	2732	5.20	3.10
	4.5	3330	5.56	3.30
	5.0	3091	5.40	3.10
	6.0	3056	5.76	3.63
206	4.0	1875	3.50	1.70
	4.5	3204	3.87	2.10
	5.0	2521	3.70	1.23
	6.0	2791	4.28	2.18
190	4.0	6134	15.10	6.70
	4.5	8191	15.80	7.20
	5.0	8124	16.10	7.20
	6.0	7853	17.80	7.91

Éstos resultados indican que la corriente en la corona no tiene un efecto muy marcado en el área e intensidad de los picos, pero sí se nota que se obtienen S/N más altas como una corriente de corona de 4.5 μA , por lo que se seleccionó este valor.

El voltaje del capilar se varió desde 3500 hasta 4500 V, en este caso se observó que este parámetro no tiene ninguna influencia por lo que se decidió usar 3500V que es el valor habitualmente empleado para este equipo. A continuación, se procedió a estudiar la temperatura de vaporización en el rango de 350 a 500°C, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 36.

Tabla 36. Estudio de la influencia de la temperatura de vaporación sobre la S/N, área (A) e intensidad (I) de los iones mayoritarios de cada analito

Ion, m/z	T_{vap} , °C	S/N	A ($\times 10^7$)	I ($\times 10^6$)
209	350	1112	1.76	2.10
	400	1320	3.28	3.40
	450	1386	5.10	5.14
	500	1238	6.10	5.90
188	350	3330	5.56	3.30
	400	4932	10.50	5.80
	450	5963	17.70	8.89
	500	6219	22.80	11.00
206	350	3204	3.87	2.10
	400	4096	7.10	3.50
	450	4097	9.57	4.44
	500	3231	9.50	4.57
190	350	8191	15.80	7.20
	400	8951	23.00	9.49
	450	7100	25.00	9.85
	500	5457	22.30	8.50

Tomando en cuenta el área e intensidad de los picos obtenidos, se seleccionaron 500°C para el KYN, TRP y XA y 450°C para el KYNA como temperaturas de vaporización.

Con los valores seleccionados de corriente en la corona, voltaje del capilar y temperatura de vaporización, se procedió a estudiar la influencia del flujo del gas secante, en un rango de 4 a 7 Lmin^{-1} .

Tabla 37. Estudio de la influencia del flujo del gas secante (N_2) en la S/N, área (A) e intensidad (I) de los iones mayoritarios de cada analito

Ion, m/z	Flujo, Lmin^{-1}	S/N	A ($\times 10^7$)	I ($\times 10^6$)
209	4.0	1386	5.35	5.79
	5.0	1238	6.10	5.90
	7.0	1454	5.66	5.70
188	4.0	7479	19.40	9.95
	5.0	6219	22.80	11.00
	7.0	7904	20.00	10.00
206	4.0	3230	8.10	3.69
	5.0	3231	9.50	4.57
	7.0	4061	9.00	4.00
190	4.0	6416	0.20	7.62
	5.0	7100	25.00	9.85
	7.0	7259	23.00	9.00

A la vista de los resultados obtenidos, se eligió un flujo de gas secante de 5 Lmin⁻¹ pues se obtenían mayores áreas e intensidades. Por último se examinó la influencia de la amplitud del fragmentador, en un intervalo de 0.5 y 3.0, obteniéndose diferentes valores óptimos para cada analito, los valores seleccionados en cada caso se presentan en la Tabla 38, en la que observamos que los valores óptimos de algunas condiciones de detección son diferentes para cada compuesto, tal es el caso de la temperatura de vaporización (T_{vap}) y ciertos parámetros de fragmentación.

Tabla 38. Parámetros seleccionados para APCI-MS/MS

Analito	Transición de cuantificación	Transición de confirmación	T_{vap} , °C	Amplitud del fragmentador, V	Fragmentación Cut off
KYN	209.1>192.1	209.1>146.1	500	1.0	52
TRP	188.0>146.0	188.0>144.0	500	2.6	46
XA	206.0>178.0	206.0>188.0	500	1.6	52
KYNA	190.0>162.0	190.0>146.0	450	1.6	47

Los restantes parámetros para el análisis APCI-MS, por monitorización por reacciones múltiples (MRM) en modo de ultra barrido en un intervalo de 100 a 500 m/z, se relacionan a continuación:

Temperatura del gas de secado (N_2)	350°C
Corriente de la aguja corona	4.5 μ A
Voltaje del capilar	3500 V
Flujo del gas de secado (N_2)	5 Lmin ⁻¹
Presión del nebulizador	60 psi
Trap drive	35
Separador	40 V
Amplitud del octopolo	130 V
Salida del capilar	105.0
Amplitud de inicio	30%
Amplitud final	200%
Tiempo de acumulación máximo	200 ms
Control de la carga del ion (ICC)	200000
Tiempo de espera	5 ms

Una vez establecidos los parámetros de detección, se obtuvieron los espectros de masas de los analitos en disolución, que se presentan en la Figura 31.

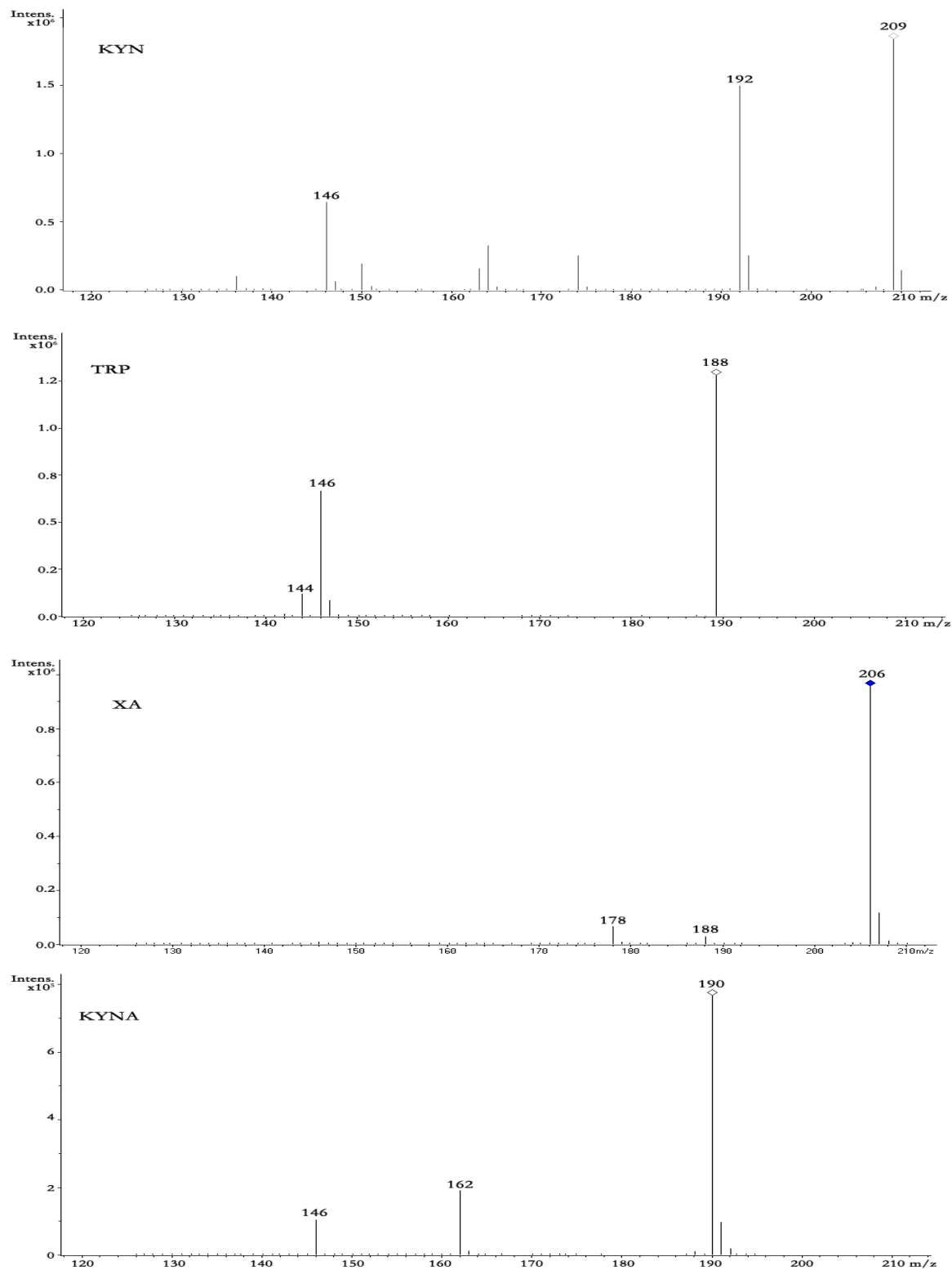


Figura 31. Espectros de masas de disoluciones acuosas de patrones de 0.6 mgL⁻¹

La fragmentación que se ha obtenido para cada compuesto se presenta a continuación:

KYN	209.1 m/z	$[M+H]^+$
	192.1 m/z	$[M+H-NH_3]^+$
	146.1 m/z	$[M+H-NH_3-H_2O-CO]^+$
TRP	188.0 m/z	$[M+H-NH_3]^+$
	146.0 m/z	$[M+H-NH_3-CH_2CO]^+$
	144.0 m/z	$[M+H-NH_3-CO_2]^+$
XA	206.0 m/z	$[M+H]^+$
	178.0 m/z	$[M+H-CO]^+$
	188.0 m/z	$[M+H-H_2O]^+$
KYNA	190.0 m/z	$[M+H]^+$
	162.0 m/z	$[M+H-CO]^+$
	146.0 m/z	$[M+H-CO_2]^+$

Columna cromatográfica

Este estudio se ha realizado con diferentes columnas. En las columnas Eclipse los compuestos eran poco retenidos, incluso cuando se ensayaron pequeñas cantidades de modificadores orgánicos, obteniéndose una baja resolución de los analitos y tiempos de análisis excesivamente cortos que coelúan con el frente del cromatograma, por lo que se descartó su empleo, en el caso de la HILIC los compuestos no fueron retenidos en la columna.

Posteriormente, los ensayos se realizaron con las Synergi 4 μ m Hydro-RP 80Å de 30 y 150 mm, en ambos casos se logró la separación de los compuestos. Sin embargo, con la columna más corta se producía un pequeño solapamiento algunos de los analitos con el frente, por lo que optó por emplear la de 150 mm.

Composición de la fase móvil

Como ya se ha mencionado, no se encuentran métodos de análisis de los compuestos de interés en mieles, por lo que para las primeras experiencias, en el sistema de detección DAD/FLD, se eligió una fase móvil compatible con la espectrometría de masas, constituida por formiato amónico 20 mM a pH 6.0 y metanol (95:5 v/v), con un volumen de inyección de 20 μL y flujo de 1 mLmin^{-1} , con lo cual se obtuvo un tiempo de análisis de 23 min. Sin embargo, como flujos elevados pueden afectar la ionización de los compuestos en la detección MS/MS, se realizaron diferentes experiencias a fin de obtener unos tiempo de análisis aceptables pero empleando un flujo menor (0.5 mLmin^{-1}), más compatible con MS/MS.

Modificador orgánico

Para optimizar el porcentaje de metanol se examinó en un intervalo de 1 a 15%, y como era previsible, el incremento en el porcentaje de modificador orgánico produjo una disminución en la retención de los analitos, observándose que porcentajes de metanol superiores al 12% producían un solapamiento de los picos correspondientes al triptófano y al ácido xanturénico, mientras que porcentajes menores de metanol daban lugar a elevados tiempos de retención y poca simetría de los picos. Por lo tanto, se utilizó un 12% de metanol.

Influencia del pH

Se hicieron ensayos para comprobar la influencia del pH sobre la retención de los analitos, en un intervalo de 2 a 7 como consecuencia de las especificaciones de la columna cromatográfica. Para ello, el pH del formiato amónico se ajustó con ácido fórmico (para pH ácido) y amoniaco acuoso (para pH básico). A valores de pH ácido se incrementó la retención de los compuestos, y a pH básico, aparte de empeorar la resolución, se produjo un solapamiento entre el ácido xanturénico y la kinurenina, por lo que se optó por trabajar a pH de 4 ya que tanto la resolución como el tiempo de análisis eran adecuados.

Flujo

Debido al empleo de la trampa de iones ya se ha indicado que era conveniente disminuir el flujo de fase móvil, para hacerlo más acorde con los flujos típicamente empleados en dicha técnica. La disminución en el flujo implica tiempos de análisis más largos, por lo tanto paralelamente se fue variando el porcentaje de modificador orgánico. De los resultados que se obtuvieron, se seleccionó un porcentaje de metanol del 12% y un flujo de 0.5 mLmin^{-1} , que proporcionaban resultados similares a los obtenidos en el sistema DAD/FLD.

Temperatura

El siguiente parámetro que se estudió fue la influencia que la temperatura ejercía sobre la separación, por ello se realizaron distintas inyecciones de una mezcla patrón, variando la temperatura de la columna entre 25 y 45°C, en intervalos de 5°C. De los resultados que se obtuvieron se pudo observar que el aumento de temperatura provocaba una disminución lógica en los tiempos de retención de los analitos y un solapamiento con los picos de componentes de la miel, por esto se seleccionó una temperatura de 30°C.

Volumen de inyección

Por último, se abordó la influencia del volumen de inyección sobre la forma y simetría de los picos. A medida que se aumentó el volumen de inyección se produjo un aumento del tamaño de los picos, sin provocar pérdida de simetría, hasta un volumen de inyección de 50 μL ; volúmenes superiores provocaron deformidades en los picos, no obstante en las pruebas con mieles oscuras, se obtenían solapamientos con picos de la matriz a partir de volúmenes superiores a los 20 μL , por lo que aunque se perdía un poco en cuanto a límites de detección, en aras a la selectividad se escogió como volumen de inyección 20 μL para todos los tipos de mieles.

Condiciones cromatográficas seleccionadas

Como consecuencia final de todo el estudio de las condiciones cromatográficas, el método analítico que se propone para la determinación de KYN, TRP, XA y KYNA en mieles emplea una columna Synergi Hydro de 150 mm, a 30°C, con una fase móvil compuesta por 88% de formiato amónico a pH 4 y 12% de metanol a un flujo de 0.5 mLmin⁻¹, inyectándose 20 µL en ambos sistemas de detección. En las Figura 32 y Figura 33 se presentan los cromatogramas obtenidos para la mezcla de patrones en las condiciones cromatográficas seleccionadas.

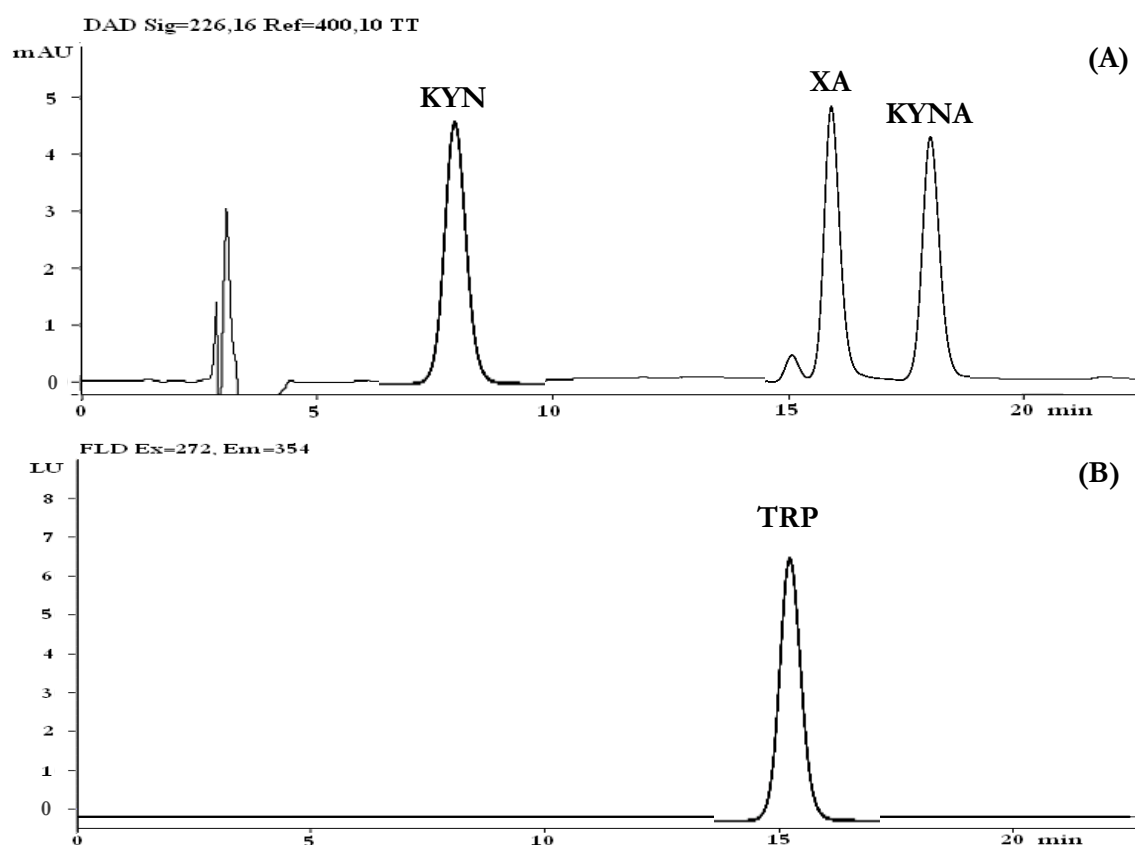


Figura 32. Cromatogramas de mezcla de patrones en disolución acuosa de 0.6 mgL⁻¹ en las condiciones cromatográficas finales para la detección (A) DAD, (B) FLD

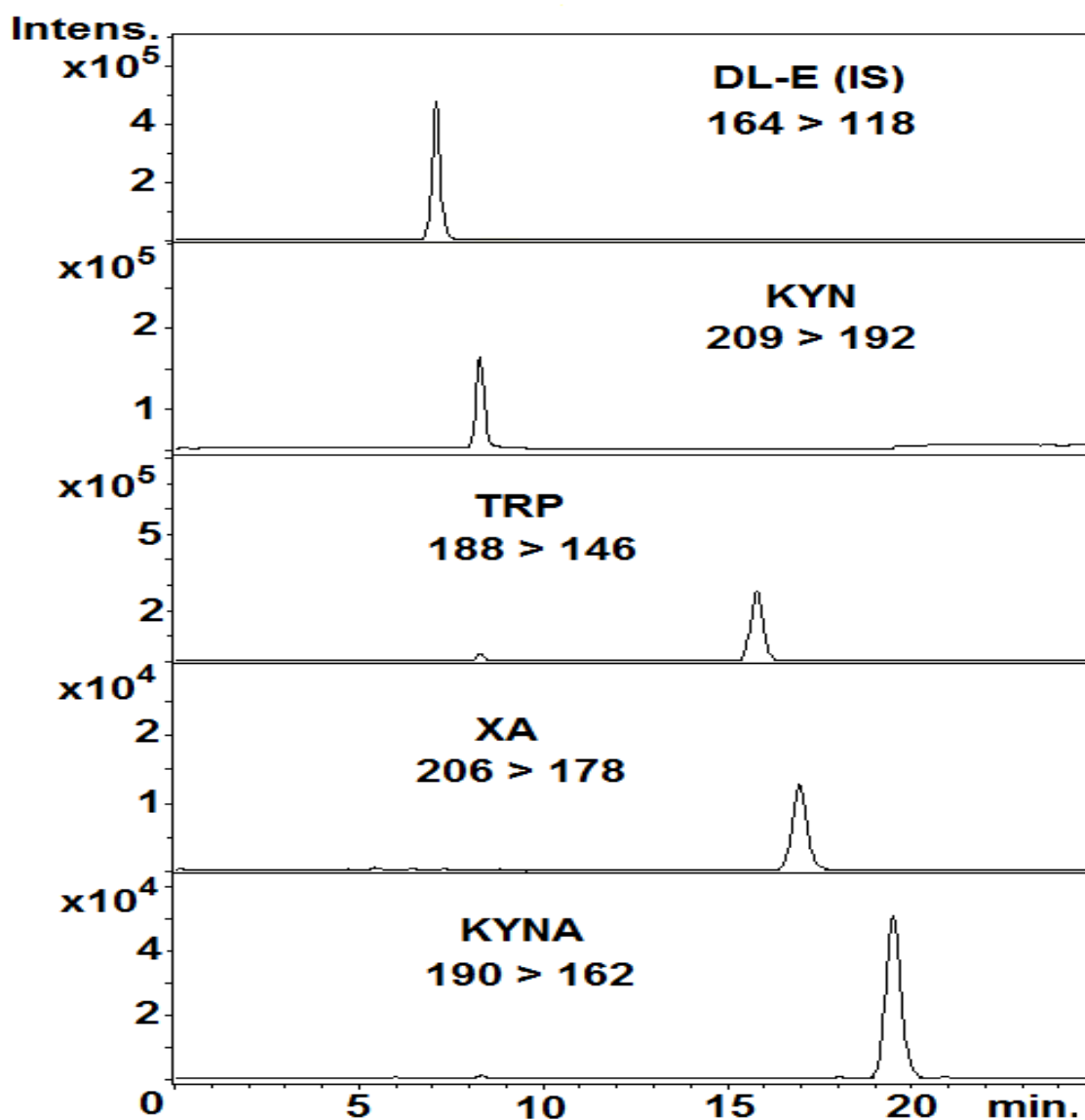


Figura 33. Cromatogramas de patrones en disolución acuosa de 0.6 mgL⁻¹ obtenidos en LC-MS/MS

VI.3.3. Tratamiento de la muestra

El siguiente paso fue desarrollar un procedimiento que eliminara la mayor cantidad de interferencias posibles y, a la vez, concentrara los analitos de tal manera que permitiese bajar los límites de detección y cuantificación en miel.

Por estas razones, se decidió utilizar la extracción en fase sólida (SPE), para lo cual se realizaron experiencias con los cartuchos poliméricos MCX 30 μ m, 3 mL y 60 mg, que combinan las técnicas de fase inversa e intercambio catiónico para bases y

los HLB 30 μm , 3 mL y 60 mg, que contienen un adsorbente de fase reversa con balance hidrofílico–lipofílico, ambos de la serie Oasis[®] que son humectables, sin efectos de secado del adsorbente, ofreciendo de esta manera recuperaciones reproducibles.

Se hicieron pruebas a tres niveles de concentración distintos para cada cartucho con el fin de obtener los porcentajes de recuperación (Tabla 39).

Tabla 39. Porcentajes de recuperación y precisiones obtenidas en mieles añadidas con los analitos a tres niveles de concentración en función del cartucho de extracción (n=3)

Compuesto	Concentración (mgkg^{-1})	Recuperaciones de recuperación, %R (%CV)	
		OASIS [®] HLB	OASIS [®] MCX
KYN	0.12	42.4 (2.5)	65.2 (3.2)
	0.50	51.2 (4.0)	66.8 (2.1)
	1.00	52.5 (5.3)	68.7 (5.5)
TRP	0.12	48.8 (2.4)	54.1 (2.5)
	0.50	38.4 (3.6)	61.2 (3.7)
	1.00	32.2 (5.3)	65.2 (2.6)
XA	0.12	64.1 (2.1)	75.6 (2.3)
	0.50	54.1 (3.5)	78.4 (2.6)
	1.00	58.3 (5.2)	79.9 (3.5)
KYNA	0.12	29.7 (2.3)	72.5 (1.2)
	0.50	48.4 (3.4)	76.4 (1.5)
	1.00	67.7 (5.0)	77.3 (1.9)

Los porcentajes de recuperación, como se observa en la tabla, son menores para los cartuchos HLB, por lo que fue con los MCX que se decidió realizar la optimización de las restantes etapas del procedimiento de extracción–concentración.

Se estudió el tipo de disolvente para las muestras que condujera a la máxima retención de los analitos en el lecho de adsorbente. Se realizaron diferentes ensayos utilizando agua, disoluciones de hidróxido de sodio 0.1 M y disoluciones de ácido clorhídrico 0.1 M. De dichas experiencias, se dedujo que el mejor disolvente era el ácido clorhídrico, ya que se obtenían cromatogramas más limpios. Posteriormente, se evaluó la influencia de la concentración de dicho ácido sobre la retención, deduciéndose que la concentración más adecuada era la de partida, ya que a

concentraciones inferiores los porcentajes de recuperación eran menores, y concentraciones superiores no conducían a un aumento en la retención, estas experiencias se realizaron tanto con patrones acuosos como con muestras de miel fortificadas.

Las etapas de activación y acondicionamiento, se realizaron haciendo pasar 5 mL de metanol y 5 mL de agua, respectivamente. Para la etapa de retención, donde las interacciones entre las moléculas de la muestra y la fase estacionaria controlan la retención en el adsorbente de SPE, se ensayaron diferentes cantidades de muestra a tratar manteniendo siempre constante el volumen de 10 mL. De los resultados que se obtuvieron, se seleccionó una cantidad de 5 g, ya que cantidades superiores provocaban la saturación del relleno.

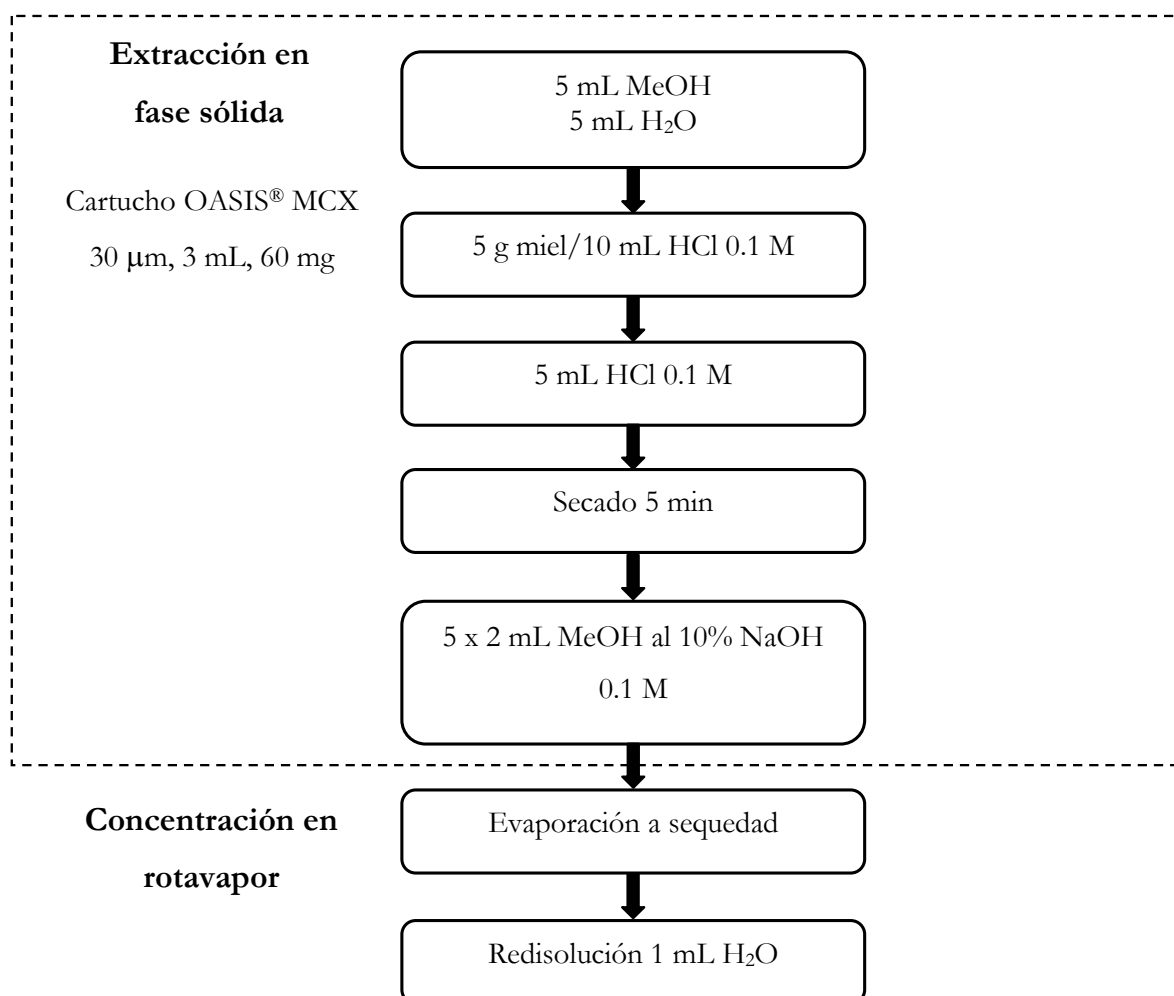
Posteriormente, para la etapa de lavado, se realizaron una serie de experiencias utilizando diferentes disoluciones acuosas conteniendo: 1% de metanol, 10% de ácido clorhídrico 0.01 M, 10% de hidróxido sódico 0.01 M, y ácido clorhídrico 0.1 M. De los resultados que se obtuvieron, se dedujo que la mayor eliminación de interferentes sin pérdida de los analitos se alcanzaba utilizando como disolución de lavado ácido clorhídrico 0.1M. También se realizaron pruebas para establecer el volumen necesario de esta disolución que se debía hacer pasar, resultando que 5 ml de esta solución eran suficientes para obtener altas recuperaciones y cromatogramas limpios, para todas las muestras estudiadas, la eliminación completa del líquido de lavado se realizó haciendo pasar una corriente de aire.

Por último, para la etapa de elución se probaron distintas disoluciones y volúmenes. Las disoluciones de elución ensayadas fueron: metanol, metanol al 10% de hidróxido sódico 0.01M y metanol al 10% de hidróxido sódico 0.1M. De los resultados que se obtuvieron, se dedujo que los mayores porcentajes de recuperación se obtenían mediante la utilización del metanol al 10% de hidróxido sódico 0.1M. Posteriormente, para conocer el volumen adecuado de dicha

disolución, se realizaron una serie de experiencias variándolo entre 1 y 20 mL, a intervalos de 5 mL. De los resultados que se obtuvieron, se pudo deducir que el volumen más adecuado era de 10 mL totales, pasando cada vez 2 mL recogiendo el eluido en un mismo recipiente.

Para lograr una mayor concentración de los analitos fue necesario un paso posterior en el cual se concentraron los 10 mL en un rotavapor, hasta sequedad a 40 °C y posteriormente el residuo se reconstituyó en 1 mL de agua, que fue trasvasado a un vial ámbar para su posterior análisis.

El tratamiento de muestra establecido mediante extracción en fase sólida y concentración en rotavapor, se resume a continuación:



VI.3.4. Validación del método analítico

La validación del método analítico establecido se realizó siguiendo las directrices de Commission Decision 2002/657/EC ^[205] y del documento SANCO/825/00 ^[206].

Los parámetros estudiados fueron: selectividad, precisión, recuperación, linealidad y límites de detección y cuantificación para los dos sistemas de detección empleados.

Selectividad

La selectividad como la capacidad de medir inequívocamente el analito en presencia de los componentes que se espera que estén presentes. Normalmente, estos pueden incluir, impurezas, productos de degradación, la matriz, etc.

Para el estudio de la selectividad del método analítico, además de tomar como referencia el tiempo de retención, se compararon los cromatogramas de mieles a las que no se le añadieron los compuestos de interés, con extractos de miel a los que se le habían añadido los analitos, para comprobar que el pico cromatográfico era puro y no coelucía con ningún compuesto de la matriz. Debido a que no se disponía de una matriz “blanco”, puesto que las mieles contienen triptófano y en algunos casos el resto de los metabolitos analizados, la confirmación de la pureza del pico cromatográfico se realizó mediante la evaluación de los respectivos espectros de masas. En las Figura 34 a Figura 36 se presentan a modo de ejemplo los cromatogramas de mieles de romero y brezo sin adicionar y adicionada con mezcla de patrones.

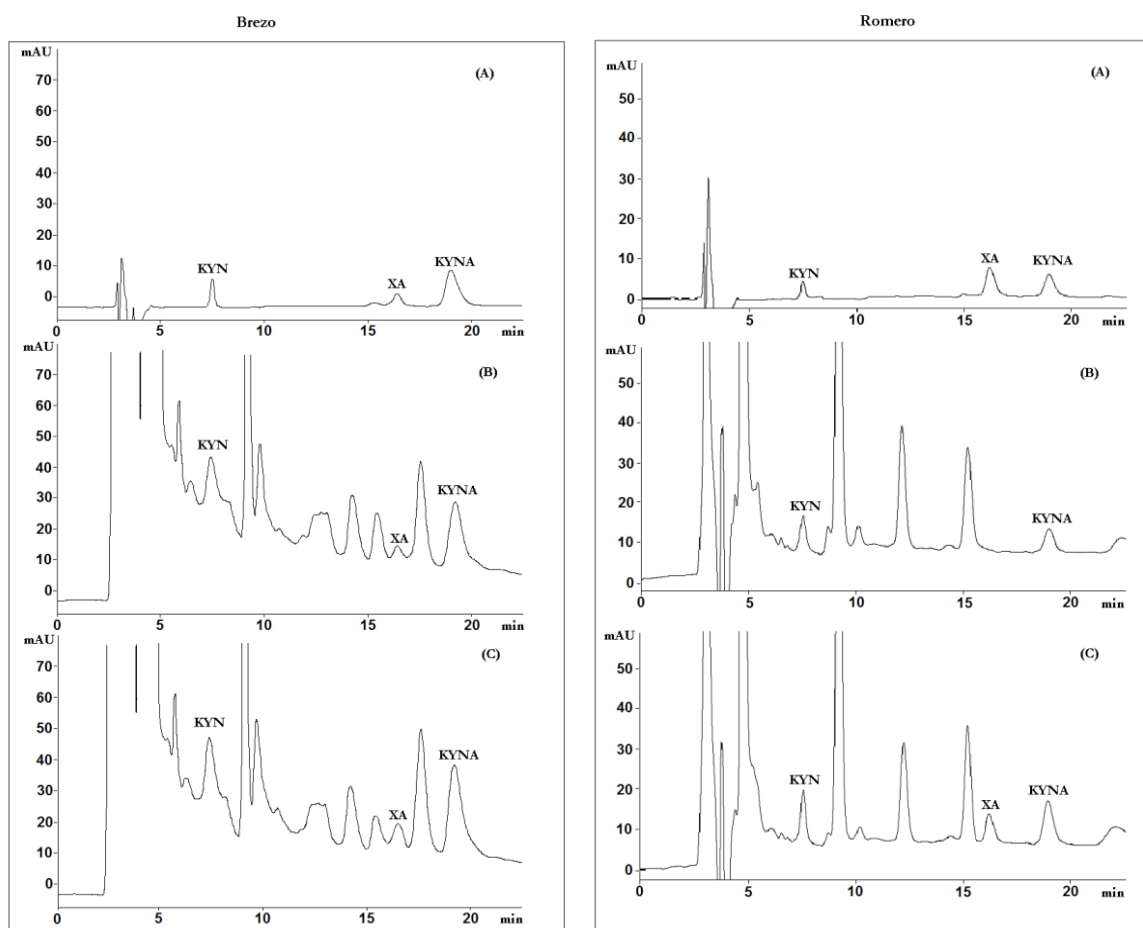


Figura 34. Cromatogramas obtenidos por DAD: (A) patrones en disolución acuosa de de 0.6 mgL⁻¹; (B) extractos de miel sin adicionar y (C) extractos de miel adicionados con analitos en concentración de 0.6 mgL⁻¹

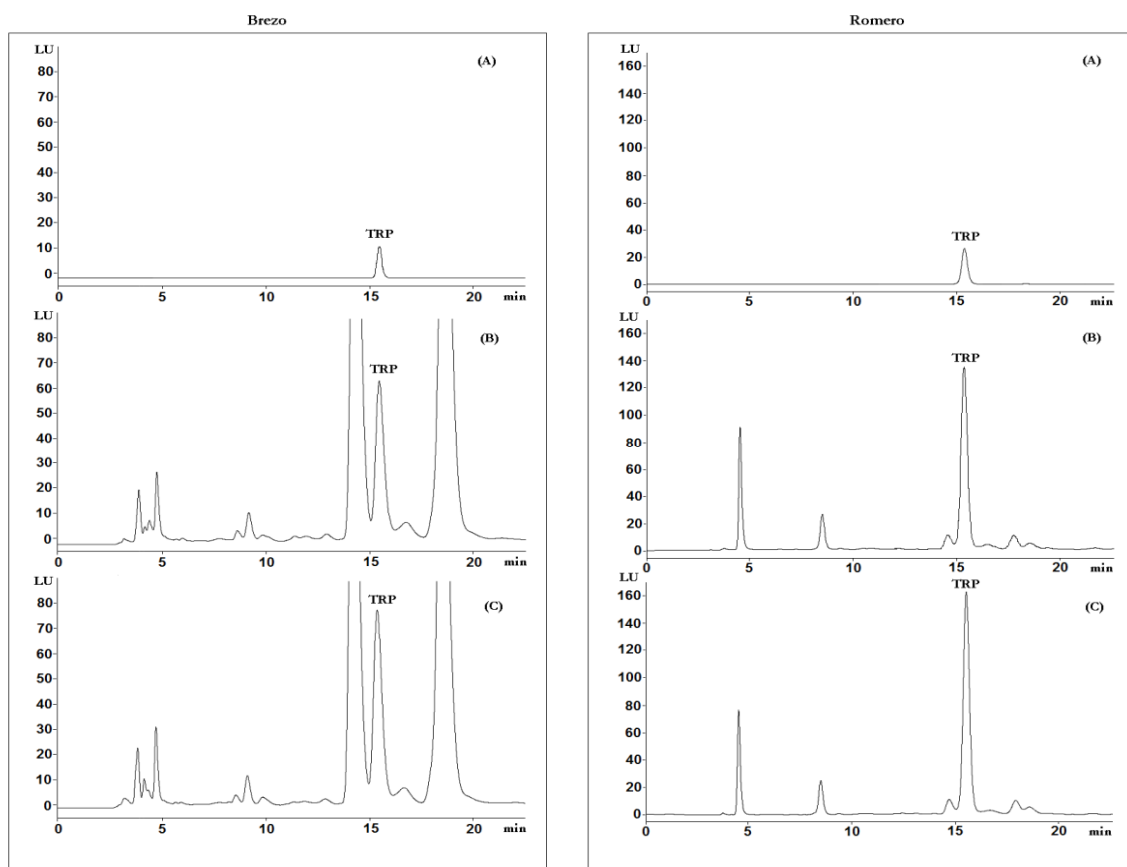


Figura 35. Cromatogramas obtenidos por FLD: (A) patrones en disolución acuosa de de 0.6 mgL^{-1} ; (B) extractos de miel sin adicionar y (C) extractos de miel adicionados con analitos en concentración de 0.6 mgL^{-1}

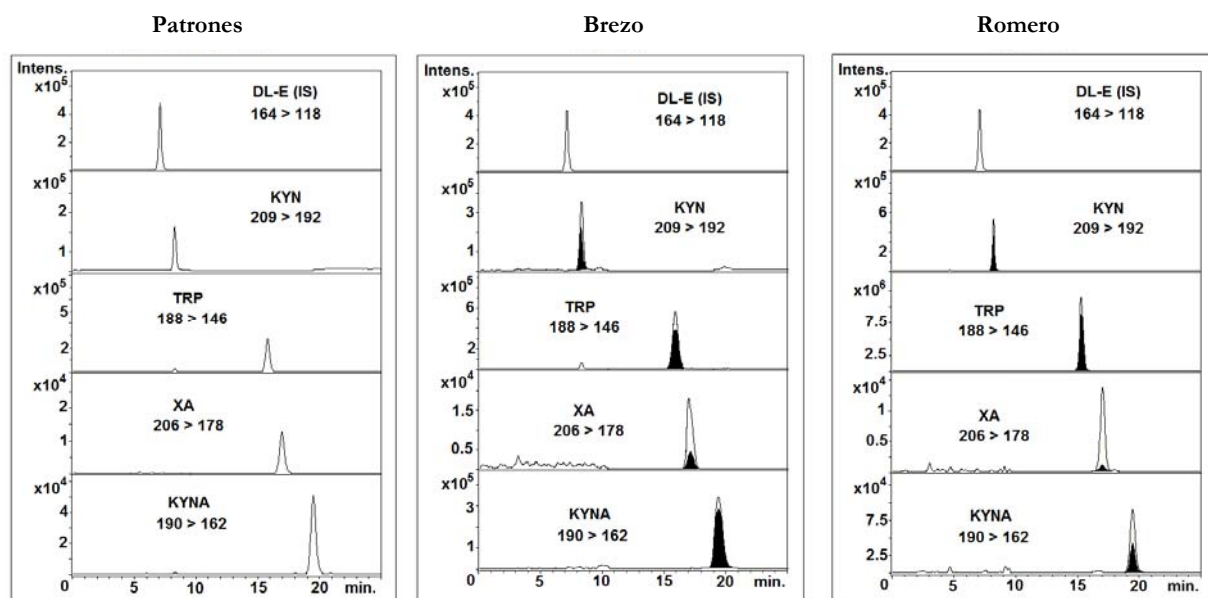


Figura 36. Cromatogramas obtenidos por LC-MS/MS de patrones en disolución acuosa de 0.6 mgkg^{-1} , extractos de miel de romero y brezo sin añadir y añadida con 0.6 mgL^{-1} de mezcla de patrones

A partir de estos resultados, se puede aseverar que el pico asignado a cada uno de los analitos en las mieles es puro y no hay presencia de interferentes de la matriz y por tanto el método cumple con el requisito de selectividad.

Precisión

La precisión del método fue evaluada en términos de la repetibilidad y la precisión intermedia.

Para estudiar la repetibilidad se sometieron al procedimiento de análisis muestras de miel replicadas ($n=5$) en el intervalo de concentraciones de las líneas de calibrado, empleándose 3 niveles de concentración para la detección DAD/FLD y 4 niveles para MS/MS, esto debido a que los LOD era menores para éste detector. Los extractos obtenidos se inyectaron por triplicado en el sistema cromatográfico. Los resultados expresados en términos de %RSD, se detallan en la Tabla 40.

Tabla 40. Estudio de la repetibilidad del método ($n=5$)

Compuesto	Concentración (μgkg^{-1})	DAD/FLD		MS/MS	
		%RSD (t_R)	%RSD (Área)	%RSD (t_R)	%RSD (Área)
KYN	10			1	15
	150	1	3	2	10
	600	1	3	3	11
	1800	2	2	3	12
TRP	10			2	12
	150	2	4	2	9
	600	2	3	3	10
	1800	2	3	3	13
XA	10			2	10
	150	1	3	3	10
	600	1	3	3	9
	1800	1	2	3	9
KYNA	10			3	11
	150	3	5	4	10
	600	2	5	4	11
	1800	2	4	4	9

Como se puede observar la variabilidad de los tiempos de retención en los dos sistemas de detección es pequeña (<5%), igual situación se presenta con el área en la detección DAD/FLD, sin embargo con la trampa de iones la variabilidad fue mayor del 15%. Este hecho se puede atribuir a las características del detector, razón por la cual se hizo necesario el empleo de un patrón interno (PI).

Se ensayaron diferentes sustancias que podían actuar como tal, para lo cual se disolvieron en NaOH 0.1M para preparar las disoluciones “madres”, a partir de las cuales por dilución con agua se obtuvieron las disoluciones de trabajo que se inyectaron en el equipo en las condiciones cromatográficas establecidas, en la Tabla 41 se recogen los tiempos de retención obtenidos.

Tabla 41. Tiempos de retención para diferentes sustancias

Compuesto	Masa molecular	Tiempo de retención (min)
Norvalina	117.15	3.8
<i>t</i> -piceido	390.38	33.0
Niacinamida	122.12	9.8
DL-etionina	163.24	7.0
DL-citrulina	175.19	3.1

A la vista de los resultados, se puede decir que la niacinamida y DL-etionina son los compuestos más adecuados, ya que tienen tiempos de retención intermedios entre los analitos, por este motivo se descartan los restantes compuestos estudiados.

Para seleccionar entre las dos alternativas, se realizaron pruebas para determinar si se encuentran presentes en las mieles, inyectándose una serie de extractos de miel sin ningún compuesto añadido, la identificación se realizó mediante el tiempo de retención y el espectro de masas. Como resultado se pudo identificar los iones de la niacinamida en algunas mieles (brezo, zarzamora, castaño), por lo tanto se seleccionó DL-etionina como patrón interno para la cuantificación por MS/MS.

Las condiciones de detección de la DL-etionina se establecieron de manera semejante al resto de los analitos, los resultados se presentan en la Tabla 42.

Tabla 42. Parámetros de detección APCI⁺ para el patrón interno

Compuesto	Transición	Temperatura vaporización, °C	Fragmentación	Amplitud de fragmentación, V
DL-etionina	164.0>118.0	500	40	1.8

Para la cuantificación se siguió la transición del ion precursor 164.0 correspondiente a $[M+H]^+$ al ion 118.0 que corresponde a $[M+H-CO-H_2O]^+$, la estructura química y el espectro de MS obtenido de la etionina se presenta en la Figura 37.

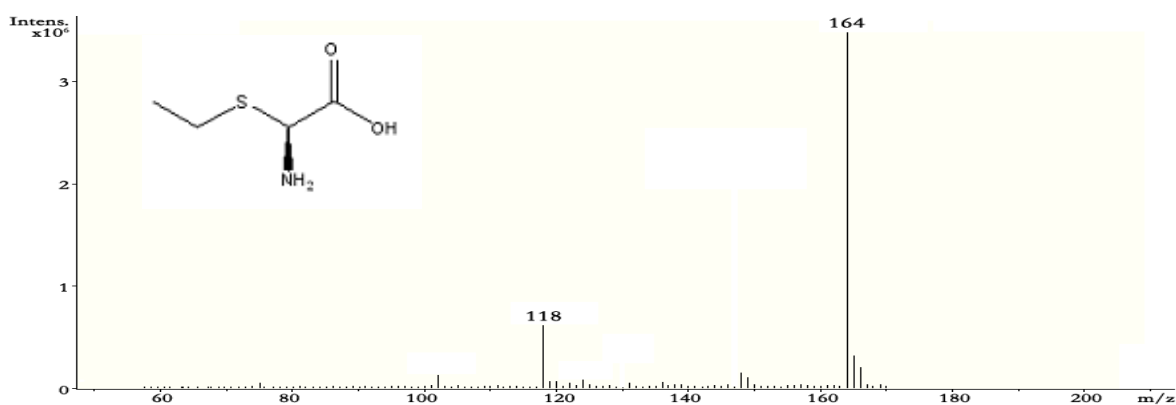


Figura 37. Estructura química y espectro MS de la DL-etionina en disolución acuosa de 1 mgL⁻¹

La precisión intermedia fue evaluada al igual que la repetibilidad pero en días diferentes, los resultados del estudio de precisión en términos de área del pico (A) para DAD/FLD y relación de áreas (A/A_{PI}) para MS/MS, se recogen en la **Tabla 43**.

Tabla 43. Estudio de precisión (n=5)

Compuesto	Concentración (μgkg^{-1})	DAD/FLD		MS/MS	
		Repetibilidad	Precisión intermedia	Repetibilidad	Precisión intermedia
		%RSD (A)	%RSD (A)	%RSD (A/ Δ Pt)	%RSD (A/ Δ Pt)
KYN	10			4	5
	150	3	5	3	5
	600	3	4	2	4
	1800	2	4	2	4
TRP	10			4	6
	150	4	5	4	4
	600	3	3	3	3
	1800	3	3	3	3
XA	10			4	7
	150	3	4	3	5
	600	3	2	2	4
	1800	2	2	2	2
KYNA	10			4	6
	150	5	5	4	5
	600	5	5	4	5
	1800	4	5	4	5

Recuperación

Los porcentajes de recuperación se evaluaron en mieles de diferentes orígenes botánicos, así como miel multifloral y mielatos a tres niveles de concentración con 5 réplicas. En la Tabla 44 se muestran los promedios de los porcentajes de recuperación obtenidos y los RSD obtenidos en cada caso.

Varias pruebas se llevaron a cabo utilizando soluciones estándar y extractos de diferentes tipos de miel que fueron adicionadas con los compuestos de interés para comparar las señales (DAD, FLD, MS/MS) y determinar la recuperación de cada analito. En general, se obtuvieron recuperaciones similares para DAD y FLD, siendo los valores superiores a los obtenidos por MS/MS, aunque para la miel de zarzamora y espliego las recuperaciones fueron mejores por MS/MS, y para algunos compuestos específicos en ciertas muestras (por ejemplo, KYN en el romero, azahar, ajedrea, y castaño, TRP en el azahar, lavandín, ajedrea, castaño, encina y brezo; XA en el romero, azahar, multifloral, lavandín; KYNA de castaño). Estos resultados ponen de manifiesto la influencia del efecto de la matriz, lo que el uso cuantitativo del MS/MS resultó inconveniente para la mayoría de tipos de miel, y demuestra la importancia de dar cuenta de este efecto, que con frecuencia es ignorado. Con la excepción de las muestras de miel en las que algunos de los analitos no estaban presentes, el uso de la calibración en matriz resolvió este problema. En los demás casos, previamente se realizó un análisis semi-cuantitativo, y si los compuestos se detectaban, se aplicó el método de adición patrón. En ambos casos, la eliminación de supresión o parcial de este efecto de la matriz en los compuestos estudiados es un proceso difícil y que conlleva mucho tiempo.

Tabla 44. Porcentajes de recuperación promedio y %RSD en las mieles estudiadas

Origen botánico	Conc. (μgkg^{-1})	KYN			TRP			XA			KYNA		
		DAD	MS/MS	MS/MS	FLD	MS/MS	MS/MS	DAD	MS/MS	MS/MS	DAD	MS/MS	MS/MS
Romero	10		104.5 (5.1)		81.5 (4.1)		113.6 (4.0)						91.6 (4.6)
	150	82.4 (3.3)	103.6 (5.3)	84.8 (2.3)	81.8 (3.9)	76.6 (3.2)	114.3 (3.8)	94.8 (3.5)	91.9 (4.3)				
	600	80.9 (2.7)	105.7(4.9)	85.6 (3.1)	82.6 (4.2)	77.8 (2.9)	113.8 (4.3)	95.3 (2.9)	91.3 (3.8)				
	1800	81.6 (3.1)	104.1(4.3)	84.5 (2.9)	83.1 (4.4)	76.3 (2.7)	113.2 (3.9)	95.5 (3.0)	92.5 (5.4)				
Espaliego	10		90.8 (4.2)		133.5 (4.8)		93.9 (3.8)						96.0 (4.4)
	150	75.8 (3.9)	91.6 (3.9)	77.7 (2.9)	135.1 (5.1)	76.8 (3.5)	94.3 (4.0)	94.2 (3.7)	95.5 (4.1)				
	600	76.3 (4.2)	89.7 (4.5)	78.5 (3.5)	131.6 (4.2)	77.2 (4.2)	94.8 (4.5)	94.7 (3.9)	96.2 (4.7)				
	1800	76.9 (3.5)	90.6 (5.1)	77.4 (3.2)	137.3 (5.4)	77.5 (3.7)	95.2 (4.9)	93.6 (3.1)	94.8 (5.0)				
Azahar	10		102.6 (4.5)		87.5 (3.9)		92.8 (4.4)						83.9(4.1)
	150	75.9 (3.1)	102.3 (4.2)	79.9(3.0)	88.0 (3.7)	74.3(4.1)	92.5(3.9)	93.6(3.7)	83.6 (3.9)				
	600	77.1 (3.8)	100.9 (3.7)	78.6 (3.5)	87.4 (4.1)	73.8 (3.9)	92.1 (4.6)	94.1(4.1)	84.2 (4.5)				
	1800	76.4 (4.1)	103.5 (4.9)	80.2 (3.2)	88.6 (3.3)	73.2 (3.6)	91.6 (4.1)	93.2 (3.5)	84.8 (3.8)				
Eucalipto	10		42.6 (5.7)		70.5 (4.3)		63.6 (5.1)						88.4 (6.1)
	150	79.3 (4.9)	43.0 (6.0)	80.6 (4.7)	71.5(4.8)	72.4(3.7)	64.0(6.1)	100.9 (3.9)	88.2 (5.8)				
	600	78.1 (4.1)	44.6 (5.2)	80.1 (4.1)	72.4 (4.1)	71.6 (3.9)	63.1 (5.3)	99.7 (4.3)	87.3 (6.2)				
	1800	78.3 (3.8)	42.7 (5.5)	81.3 (4.8)	70.8 (5.0)	72.9 (4.3)	64.3 (5.7)	100.3 (3.8)	87.6 (5.4)				
Tomillo	10		66.0 (3.9)		75.5 (4.3)		57.2 (5.3)						50.0 (4.2)
	150	73.9 (3.1)	65.7 (3.7)	90.4(2.4)	76.3(4.1)	83.6(3.9)	57.7(4.6)	100.1 (3.4)	50.2 (4.5)				
	600	74.5 (3.7)	66.2 (4.6)	91.3 (2.9)	75.8 (4.6)	85.1 (3.6)	56.9 (4.8)	100.8 (3.7)	49.5 (4.2)				
	1800	75.1 (3.0)	64.8 (4.3)	89.9 (3.1)	75.4 (4.2)	84.6 (2.9)	58.2 (5.1)	101.4 (3.2)	49.1 (3.9)				

Tabla 45. (Cont.) Porcentajes de recuperación promedio y %RSD en las mieles estudiadas

Origen botánico	Conc. (μkg^{-1})	KYN			TRP			XA			KYNA		
		DAD	MS/MS	FLD	MS/MS	DAD	MS/MS	DAD	MS/MS	DAD	MS/MS	DAD	MS/MS
Miflores	10		65.8 (4.7)		82.5 (4.1)		74.6 (5.1)		80.0 (4.9)				
	150	80.5 (4.1)	66.8 (5.3)	86.5 (3.4)	82.7 (4.7)	64.5 (3.2)	73.4 (4.9)	92.4 (3.5)	80.2 (4.3)				
	600	81.3 (3.5)	65.9 (4.1)	84.7 (3.7)	83.3 (4.3)	65.1 (4.0)	73.7 (4.3)	92.1 (3.3)	79.5 (4.8)				
	1800	80.9 (3.2)	65.3 (5.3)	85.6 (2.9)	83.8 (5.1)	64.2 (3.5)	74.3 (4.6)	91.5 (4.0)	78.8 (5.2)				
Cantueso	10		43.1 (3.9)		47.6 (4.1)		54.7 (3.8)		51.1 (3.6)				
	150	118.4 (4.6)	42.4 (3.6)	76.7 (3.5)	46.8 (3.8)	62.9 (3.8)	55.1 (4.2)	85.0 (3.8)	51.8 (4.2)				
	600	116.9 (3.9)	44.2 (4.1)	78.1 (4.4)	47.5 (3.6)	63.6 (4.3)	54.3 (4.4)	84.6 (4.3)	51.5 (3.9)				
	1800	119.1 (3.7)	43.5 (4.4)	78.3 (3.9)	46.2 (4.3)	64.1 (3.8)	53.9 (3.9)	85.4 (3.5)	51.0 (3.2)				
Girasol	10		46.9 (4.8)		46.9 (4.5)		50.9 (4.8)		50.1 (4.6)				
	150	77.6 (4.9)	47.8 (5.1)	79.4 (4.8)	47.3 (4.9)	82.7 (4.8)	50.6 (5.4)	99.7 (4.1)	49.3 (4.7)				
	600	79.1 (4.2)	47.7 (4.3)	80.5 (4.4)	45.9 (4.4)	81.8 (4.3)	51.3 (4.9)	98.6 (4.3)	49.8 (5.1)				
	1800	78.3 (4.7)	46.2 (5.4)	80.1 (4.1)	46.5 (4.1)	81.5 (4.6)	50.2 (5.1)	100.2 (4.9)	50.8 (5.2)				
Mielato de acacia	10		45.5 (4.5)		43.6 (4.5)		47.7 (4.2)		42.6 (4.0)				
	150	74.2 (3.9)	44.1 (3.8)	82.5 (4.1)	42.8 (4.1)	75.8 (4.5)	46.8 (4.3)	92.6 (4.1)	42.0 (4.4)				
	600	74.9 (4.1)	44.5 (4.2)	83.4 (3.9)	44.5 (4.4)	76.7 (3.9)	47.5 (3.7)	93.3 (4.6)	41.2 (4.3)				
	1800	75.3 (4.3)	45.2 (4.7)	83.1 (3.7)	45.2 (3.9)	75.3 (4.2)	48.2 (4.3)	93.8 (3.8)	42.4 (3.7)				
Lavandín	10		31.5 (5.4)		105.4 (5.2)		81.5 (4.7)		87.0 (4.8)				
	150	68.3 (4.9)	32.3 (5.2)	68.8 (4.5)	106.8 (4.8)	77.6 (4.2)	79.8 (4.8)	96.9 (4.4)	87.2 (4.9)				
	600	69.4 (4.1)	31.7 (4.5)	70.1 (4.1)	104.7 (5.1)	76.2 (4.8)	80.7 (4.2)	96.4 (4.8)	86.5 (4.6)				
	1800	67.6 (4.8)	32.9 (4.4)	69.2 (4.9)	105.3 (5.3)	77.1 (4.7)	81.2 (4.9)	95.7 (4.9)	85.9 (5.1)				

Tabla 46. (Cont.) Porcentajes de recuperación promedio y %RSD en las mieles estudiadas

Origen botánico	Conc. (μgkg^{-1})	KYN			TRP			XA			KYNA		
		DAD	MS/MS	FLD	MS/MS	FLD	MS/MS	DAD	MS/MS	FLD	MS/MS	DAD	MS/MS
Ajedrea	10		77.9 (4.7)		116.3 (4.3)		59.6 (4.5)		78.4 (5.0)		59.6 (4.5)		78.4 (5.0)
	150	59.1 (4.9)	78.2 (3.8)	72.5 (4.7)	115.9 (4.4)	66.4 (4.6)	59.8 (4.3)	97.5 (4.2)	76.9 (4.1)		59.8 (4.3)	97.5 (4.2)	76.9 (4.1)
	600	60.7 (4.1)	76.9 (4.5)	73.6 (4.1)	116.7 (4.8)	67.2 (4.3)	60.6 (4.7)	98.3 (4.7)	77.6 (4.7)		60.6 (4.7)	98.3 (4.7)	77.6 (4.7)
	1800	58.5 (4.3)	77.6 (5.1)	72.1 (3.9)	114.8 (4.1)	67.5 (3.9)	61.1 (3.9)	98.9 (3.9)	78.2 (5.2)		61.1 (3.9)	98.9 (3.9)	78.2 (5.2)
Castaño	10		67.4 (3.8)		68.1 (3.3)		83.2 (4.1)		134.2 (4.5)		83.2 (4.1)		134.2 (4.5)
	150	55.6 (3.7)	67.9 (3.5)	60.2 (3.4)	67.5 (3.9)	113.5 (3.9)	84.8 (4.5)	82.3 (4.3)	132.4 (4.3)		84.8 (4.5)	82.3 (4.3)	132.4 (4.3)
	600	57.1 (4.2)	67.2 (4.1)	61.5 (3.1)	68.3 (3.4)	114.1 (4.3)	84.2 (3.9)	83.5 (3.9)	131.1 (4.7)		84.2 (3.9)	83.5 (3.9)	131.1 (4.7)
	1800	56.2 (4.5)	68.5 (3.9)	60.6 (3.9)	67.0 (3.7)	112.9 (4.5)	83.7 (3.4)	82.6 (3.5)	133.7 (3.8)		83.7 (3.4)	82.6 (3.5)	133.7 (3.8)
Encina	10		75.5 (5.5)		105.9 (5.6)		71.7 (5.2)		83.4 (6.1)		71.7 (5.2)		83.4 (6.1)
	150	87.3 (4.7)	74.8 (5.2)	81.4 (3.9)	106.1 (5.4)	77.9 (4.2)	71.4 (5.8)	90.2 (4.8)	83.0 (5.9)		71.4 (5.8)	90.2 (4.8)	83.0 (5.9)
	600	88.1 (4.2)	75.9 (6.1)	82.5 (4.4)	106.7 (5.1)	78.3 (4.6)	72.1 (5.3)	89.6 (4.5)	82.8 (6.3)		72.1 (5.3)	89.6 (4.5)	82.8 (6.3)
	1800	89.1 (4.9)	73.7 (5.8)	83.1 (4.7)	105.4 (5.7)	79.2 (4.9)	71.1 (5.0)	88.9 (4.1)	84.1 (5.7)		71.1 (5.0)	88.9 (4.1)	84.1 (5.7)
Zarzamora	10		142.5 (6.4)		100.1 (5.9)		78.9 (6.1)		126.0 (5.9)		78.9 (6.1)		126.0 (5.9)
	150	70.3 (4.2)	138.4 (7.1)	74.6 (4.6)	99.4 (5.7)	50.9 (4.6)	79.5 (6.3)	65.3 (4.7)	125.3 (6.2)		79.5 (6.3)	65.3 (4.7)	125.3 (6.2)
	600	69.2 (4.8)	144.3 (6.5)	75.5 (4.4)	100.3 (6.4)	51.7 (4.9)	78.6 (6.1)	64.8 (4.9)	127.4 (5.1)		78.6 (6.1)	64.8 (4.9)	127.4 (5.1)
	1800	68.7 (4.6)	140.7 (6.9)	74.1 (4.1)	100.7 (6.1)	50.7 (4.7)	78.3 (5.7)	66.1 (4.3)	126.7 (5.5)		78.3 (5.7)	66.1 (4.3)	126.7 (5.5)
Roble	10		53.8 (4.4)		40.3 (4.2)		57.9 (5.1)		88.0 (4.8)		57.9 (5.1)		88.0 (4.8)
	150	85.6 (4.9)	53.3 (4.7)	95.1 (4.4)	39.8 (4.9)	89.3 (4.0)	58.3 (5.3)	89.6 (4.5)	87.3 (5.3)		58.3 (5.3)	89.6 (4.5)	87.3 (5.3)
	600	87.1 (4.9)	52.7 (3.9)	94.2 (3.9)	38.3 (4.8)	90.1 (4.3)	58.7 (4.9)	90.3 (4.4)	87.9 (4.9)		58.7 (4.9)	90.3 (4.4)	87.9 (4.9)
	1800	85.9 (4.5)	54.1 (5.1)	93.8 (4.9)	40.2 (4.3)	90.6 (4.7)	59.2 (4.6)	89.1 (4.0)	88.3 (4.5)		59.2 (4.6)	89.1 (4.0)	88.3 (4.5)

Tabla 47. (Cont.) Porcentajes de recuperación promedio y %RSD en las mieles estudiadas

Origen botánico	Conc. (μgkg^{-1})	KYN			TRP			XA			KYNA		
		DAD	MS/MS	FLD	MS/MS	DAD	MS/MS	DAD	MS/MS	DAD	MS/MS	DAD	MS/MS
Brezo	10		52.2 (4.6)		81.6 (4.7)		77.6 (4.9)						88.4 (5.0)
	150	78.9 (4.8)	52.9 (4.3)	64.3 (4.3)	82.1 (4.4)	84.3 (4.4)	78.0 (5.1)	95.0 (4.7)	87.4 (4.9)				
	600	77.3 (4.5)	52.4 (5.1)	63.1 (4.9)	83.0 (5.2)	83.7 (4.7)	77.5 (5.5)	96.1 (4.2)	86.9 (5.1)				
	1800	78.1 (4.9)	51.8 (5.4)	63.7 (4.8)	81.7 (4.8)	84.8 (4.8)	78.6 (4.9)	96.3 (4.9)	88.1 (5.6)				
Bosque	10		82.4 (3.9)		75.9 (4.3)		53.2 (4.3)						66.7 (3.9)
	150	90.1 (4.2)	82.8 (3.5)	95.6 (4.5)	74.8 (4.1)	87.5 (4.1)	53.9 (4.2)	106.1 (4.3)	66.0 (4.0)				
	600	91.2 (3.7)	83.7 (4.3)	94.7 (3.9)	75.7 (4.6)	88.2 (4.4)	53.6 (3.9)	105.3 (4.1)	67.1 (4.5)				
	1800	90.5 (4.4)	81.9 (4.2)	96.3 (4.2)	76.2 (3.9)	86.8 (3.8)	52.8 (4.5)	106.5 (3.9)	66.2 (3.8)				

Límite de detección y límite de cuantificación

En el estudio de selectividad, se observó que casi todas las muestras contenían los analitos, por lo que no se disponía de un blanco de matriz, así que se procedió a la dilución de las muestras para determinar experimentalmente los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) en cada detector. Para la cuantificación de los compuestos se emplearon las correspondientes líneas de calibrado, que como se explica en el apartado de linealidad, fue necesario emplear líneas de calibrado sobre cada tipo de miel. El procedimiento consistió en la dilución de las muestras de miel el número de veces que fue necesario, hasta obtener un cromatograma en el que no fue posible identificar los analitos. A pesar de la dilución, el efecto de la matriz aun era apreciable, por lo que se midió el ruido de fondo en este tipo de cromatograma y la concentración de la muestra calculada, teniendo en cuenta las diluciones efectuadas, de esta manera fue posible calcular el LOD y LOQ como 3 y 10 veces la relación señal/ruido (S/N), respectivamente. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 48**.

Como se puede observar los valores de LOD y LOQ para cada tipo de miel fueron menores cuando se utiliza MS/MS, obteniéndose valores similares para todos los compuestos en este detector, contrario a lo que ocurre con los otros detectores. Los valores obtenidos por FLD para el TRP se asemejan a los obtenidos por el DAD para XA y KYNA, mientras que para la KYN, presenta mayores LOQ en todos los casos. Además se evaluó la variabilidad en los límites, obteniéndose resultados similares a los obtenidos en el estudio de repetibilidad (**Tabla 43**), es decir para la detección DAD/FLD un RSD <5% y para MS/MS fue más alto, RSD <10%.

Tabla 48. LOD y LOQ (μgkg^{-1}) para KYN, TRP, XA y KYNA en mieles

Origen botánico	KYN			TRP			XA			KYNA						
	DAD	MS/MS	FLD	MS/MS	DAD	MS/MS	DAD	MS/MS	DAD	MS/MS						
	LOD LOQ	LOD LOQ	LOD LOQ	LOD LOQ	LOD LOQ	LOD LOQ	LOD LOQ	LOD LOQ	LOD LOQ	LOD LOQ						
Romero	21	63	0.6	2.1	5	15	0.2	0.7	5	16	0.6	1.9	4	13	0.6	1.9
Espliego	20	65	0.6	2.0	6	19	0.2	0.8	6	20	0.6	2.0	4	14	0.5	1.6
Azahar	19	60	0.5	1.9	5	16	0.2	0.8	5	16	0.6	1.8	5	17	0.5	1.5
Eucalipto	18	58	0.5	1.9	5	17	0.2	0.7	5	17	0.7	2.3	4	13	0.6	2.0
Tomillo	24	75	0.7	2.3	6	18	0.2	0.7	6	20	0.6	2.0	5	16	0.5	1.6
Milflores	22	76	0.7	2.4	5	16	0.4	1.4	7	22	0.8	2.6	6	19	0.7	2.2
Cantueso	23	68	0.6	2.2	6	19	0.2	0.6	6	18	0.6	1.9	6	18	0.6	1.9
Girasol	25	79	0.7	2.5	7	22	0.2	0.8	6	19	0.6	2.0	7	23	0.8	2.5
Mielato de acacia	21	68	0.6	2.2	7	21	0.3	1.1	10	31	0.9	3.0	8	26	0.8	2.6
Lavandín	24	74	0.6	2.6	5	17	0.2	0.7	8	26	0.6	1.9	7	15	0.5	1.6
Ajedrea	28	88	0.7	3.0	8	25	0.3	1.0	11	34	0.7	2.3	9	27	0.8	2.4
Castaña	36	95	0.8	3.2	9	30	0.4	1.4	13	41	1.0	3.4	9	29	0.9	2.8
Encina	29	86	0.7	2.8	6	20	0.2	0.7	14	44	0.8	2.6	12	37	0.6	2.0
Zarzamora	32	94	0.8	3.2	8	26	0.3	1.1	7	23	0.6	2.0	6	19	0.9	2.9
Roble	24	76	0.6	2.3	7	23	0.4	1.3	16	51	0.6	1.9	14	45	0.7	2.3
Brezo	32	97	0.8	3.5	9	27	0.4	1.2	16	52	0.7	2.4	18	57	0.9	3.0
Bosque	31	95	0.8	3.4	8	25	0.5	1.7	15	46	0.6	1.9	16	49	0.8	2.5

Linealidad y efecto matriz

La cuantificación se llevó a cabo en función del detector utilizado y el origen botánico de la miel, de tal manera que para los análisis por DAD/FLD, la determinación de los analitos se realizó mediante las líneas de calibrado de patrones independientemente del origen botánico de la miel. En este caso, los rangos lineales estudiados oscilaron entre el LOQ de cada analito y tipo de miel hasta 20 mgkg⁻¹. Para el análisis por MS/MS, las líneas de calibrado en matriz se obtuvieron mediante el método de adición patrón para cada tipo de miel, debido a que se observó un efecto de la matriz, aquí los rangos lineales estuvieron entre el LOQ de cada analito y tipo de miel y 5 mgkg⁻¹, los extractos de miel adicionados contenían también el patrón interno, DL-etionina, en una concentración de 200 mgkg⁻¹. Se aplicó el análisis de regresión lineal con un factor de ponderación de 1/x², siendo la variable dependiente la señal de los analitos (área del pico para DAD/FLD y relación de áreas del pico del analito y patrón interno para MS/MS).

Para la detección por DAD/FLD, se obtuvo un ajuste al modelo lineal ($p < 0.05$) en el intervalo de concentraciones estudiado. Por otra parte, la comparación de las pendientes del calibrado de patrones y el calibrado sobre matriz para cada tipo de miel reveló que se encontraban dentro del mismo intervalo de confianza, lo cual demostró la inexistencia de efecto matriz y por lo tanto la validez de la cuantificación de los analitos mediante el método de patrón externo sin la presencia de matriz, lo que conlleva una mayor rapidez en el análisis cuando los analitos se encuentran en valores por encima de los límites de detección. Por lo tanto, para este sistema de detección se presentan en la Tabla 49 los parámetros de regresión obtenidos para el calibrado de patrones.

Tabla 49. Parámetros de regresión para la cuantificación por DAD/FLD

Compuesto	a	s _a	b	s _b	r ²	S _{y/x}
KYN	-22.24	10.05	570.26	6.86	0.9988	25.98
TRP	-15.35	12.35	420.77	6.77	0.9990	22.43
XA	-15.50	22.35	1350.08	15.88	0.9988	60.21
KYNA	-4.92	5.14	1410.35	2.73	0.9999	9.04

En todos los casos se verificó la tendencia lineal de los calibrados mediante la prueba t , encontrándose en todos los casos que la $t_{\text{experimental}}$ era mayor que la t_{tabulada} , por lo tanto se acepta que el método es lineal con un nivel de confianza del 95% y los coeficientes de regresión (r^2) fueron para todos superiores a 0.99.

En el caso del análisis por MS/MS, previamente se había observado discrepancias entre los resultados obtenidos en los sistemas de detección estudiados (**Tabla 44**), lo que hacía sospechar sobre la presencia de efecto matriz, ya que es de sobra sabido que el análisis por LC-MS/MS puede verse altamente afectado debido a la competencia en la ionización de los compuestos que coeluyen en el sistema cromatográfico que puede causar la supresión o aumento iónico.

Debido a lo antes expuesto, se obtuvieron los parámetros de regresión de las líneas de calibración realizadas para MS/MS mediante el método de adición patrón y cuantificadas con patrón interno en los diferentes orígenes botánicos estudiados, que se presentan en **Tabla 50**. La comparación de las pendientes de los calibrados sobre miel adicionada, confirmaron la presencia de un marcado efecto matriz independiente del origen botánico, además tampoco se presentaba una tendencia que permitirá la agrupación de las mieles en función del color.

Por lo tanto, la utilización de MS/MS se ve limitada como técnica de confirmación o cuando las cantidades presentes en la miel no pueden ser cuantificadas por DAD/FLD, donde resulta más fácil y rápida la determinación de los compuestos de interés.

Tabla 50. Parámetros de regresión del calibrado en matriz por MS/MS

Origen Botánico	KYN			TRP			XA			KYNA						
	b	s _b	r ²	s _{y/x}	b	s _b	r ²	s _{y/x}	b	s _b	r ²	s _{y/x}	b	s _b	r ²	s _{y/x}
Romero	5.626	0.046	0.9985	0.185	12.234	0.756	0.9982	2.080	0.090	0.003	0.9979	0.005	2.510	0.564	0.9990	1.250
Espiego	3.448	0.056	0.9972	0.086	8.964	0.456	0.9991	0.047	0.083	0.002	0.9987	0.004	2.390	0.325	0.9987	0.954
Azahar	5.188	0.084	0.9981	0.047	8.713	0.458	0.9986	0.958	0.039	0.001	0.9986	0.001	1.720	0.412	0.9992	0.657
Eucalipto	3.536	0.015	0.9976	0.025	13.876	0.450	0.9987	0.991	0.066	0.004	0.9984	0.017	1.843	0.254	0.9994	0.458
Tomillo	1.915	0.026	0.9989	0.142	2.102	0.640	0.9988	1.258	0.019	0.001	0.9985	0.028	0.570	0.013	0.9989	0.035
Multifloral	3.754	0.049	0.9990	0.186	4.584	0.245	0.9984	0.458	0.024	0.002	0.9989	0.005	0.395	0.012	0.9995	0.598
Cantueso	0.146	0.005	0.9987	0.147	4.710	0.785	0.9986	0.245	0.023	0.001	0.9990	0.004	0.775	0.009	0.9995	0.145
Girasol	1.792	0.065	0.9965	0.197	5.092	0.874	0.9992	1.357	0.021	0.003	0.9997	0.005	0.805	0.008	0.9979	0.842
Mielato de acacia	0.187	0.003	0.9997	0.045	0.145	0.133	0.9989	0.204	0.084	0.019	0.9962	0.024	4.580	0.442	0.9969	0.611
Lavandín	0.567	0.012	0.9991	0.035	0.875	0.000	0.9997	1.651	0.025	0.001	0.9984	0.009	0.754	0.007	0.9989	0.465
Ajedrea	0.912	0.086	0.9995	0.066	0.487	0.351	0.9993	1.593	0.015	0.001	0.9974	0.007	0.895	0.008	0.9994	0.487
Castaño	2.670	0.098	0.9978	0.079	1.568	0.054	0.9987	1.482	0.080	0.020	0.9981	0.007	5.451	0.458	0.9991	0.645
Encina	0.778	0.079	0.9994	0.109	12.896	0.359	0.9985	0.497	0.007	0.001	0.9996	0.002	0.669	0.016	0.9999	0.022
Zarzamora	1.234	0.078	0.9985	0.687	2.540	0.254	0.9984	0.675	0.035	0.001	0.9965	0.009	3.245	0.235	0.9992	0.445
Roble	1.022	0.082	0.9988	0.123	20.884	0.665	0.9988	0.997	0.010	0.011	0.9957	0.017	1.253	0.200	0.9981	0.307
Brezo	1.286	0.042	0.9990	0.054	35.902	0.292	0.9993	0.377	0.003	0.005	0.9984	0.007	0.142	0.311	0.9967	0.402
Bosque	3.376	0.076	0.9997	0.116	105.228	0.946	0.9993	1.221	0.001	0.006	0.9993	0.009	1.079	0.069	0.9998	0.106

VI.4. Aplicación en mieles monoflorales

El método analítico validado fue aplicado a 17 tipos diferentes de mieles de origen floral o arbóreo, provenientes de diferentes regiones de España, gentilmente donadas por el Centro Apícola Regional (CAR) de Marchamalo (Guadalajara, España), después de confirmar el origen botánico por análisis melisopalinológico. De cada tipo de miel se analizaron 5 muestras, en la Tabla 51 se presenta el intervalo de concentraciones encontradas en las mieles.

Tabla 51. Intervalo de concentraciones de los analitos en mieles comerciales (n=5)

Origen botánico	Concentración (mgkg ⁻¹)			
	KYN	TRP	XA ^a	KYNA
Romero	0.33-0.89	4.88-14.64	<LOD-0.02	0.12-1.17
Espliego	3.50-5.37	2.73-6.68	<LOD-0.02	0.29-0.37
Azahar	1.07-1.32	0.95-1.10	0.01-0.10	0.02-0.08
Eucalipto	2.14-4.47	1.57-1.78	0.03-0.60	0.49-0.54
Tomillo	2.04-3.51	0.14-3.50	0.02-0.34	0.40-2.12
Mil flores	4.68-5.47	1.86-2.16	0.02-0.03	3.01-3.24
Cantueso	0.84-0.98	2.51-2.87	0.04-0.28	0.20-0.26
Castaño	0.10-0.15	0.07-0.12	0.23-0.34	103.50-141.15
Girasol	3.13-3.77	0.45-0.53	0.05-0.10	0.31-0.37
Mielato de acacia	0.30-0.36	0.69-0.78	0.05-0.28	0.11-0.15
Lavandín	0.04-0.23 ^a	0.63-0.74	0.01-0.04	0.60-0.71
Ajedrea	0.14-0.23	0.18-1.07	0.01-0.08	0.26-0.32
Encina	0.02-0.06 ^a	1.04-1.26	< LOD	0.45-0.50
Zarzamora	0.18-0.24	0.28-0.35	<LOD-0.02	11.65-12.35
Roble	0.13-0.31	1.10-1.35	0.01-0.03	1.01-1.05
Brezo	0.03-0.09 ^a	0.03-0.11	0.01-0.35	1.01-1.07
Bosque	0.14-0.18	9.56-9.94	<LOD-0.02	1.15-1.18

^a Se empleó MS/MS debido a las bajas cantidades presentes

Los resultados fueron obtenidos empleando DAD y MS/MS para KYN y KYNA; FLD o MS/MS para el TRP, como se indica en la tabla anterior. El XA y algunos analitos específicos se cuantificaron por MS/MS debido a los bajos niveles en que se encontraban en las muestras.

En la miel de castaño se encontraron grandes cantidades de KYNA ($>100 \text{ mgkg}^{-1}$), lo que difería significativamente de lo descrito en las referencias^[62,66]. Igualmente se observaron altos niveles de KYNA en muestras de miel de zarzamora ($>10 \text{ mgkg}^{-1}$) y multifloral ($>3 \text{ mgkg}^{-1}$), en contraste con los niveles mucho más bajos observados en las otras muestras de miel. Cabe señalar que el KYNA se detectó en los 17 tipos de miel estudiados, incluyendo las mieles de origen floral, lo que no había sido detectado en otros estudios^[58-62]. Sin embargo, el origen geográfico y el procedimiento de recogida de las muestras impidieron comprobar la presencia de contaminación. Basándose en estos hallazgos, no se recomienda usar el KYNA como marcador específico de la miel de castaño.

Los niveles más altos de KYN ($>1 \text{ mgkg}^{-1}$) se encontraron en 6 tipos de miel (multifloral, girasol, espliego, azahar, eucalipto y tomillo). En cuanto al TRP los valores más altos se detectaron en muestras de miel de bosque y romero ($>4 \text{ mgkg}^{-1}$), aunque se encontraron cantidades apreciables en muestras de espliego y cantueso ($>2.5 \text{ mgkg}^{-1}$).

En comparación con los otros compuestos determinados, se encontraron cantidades significativamente menores del XA en las muestras de miel estudiadas, con valores inferiores a 0.4 mgkg^{-1} .

De manera general, se puede afirmar que la kinurenina, el triptófano y los ácidos kinurénico y xanturénico se encontraron en todas las muestras estudiadas, con excepción de la miel de encina en la que no se detectó el ácido xanturénico.

Bibliografía

182. S. Bogdanov, T. Jurendic, R. Sieber, P. Gallman, Honey for nutrition and health: a review. *J. Am. Coll. Nutr.* 27 (2008) 677-689
183. G. Beretta, P. Fermo, R. Maffei, Simple and rapid simultaneous profiling of minor components of honey by size exclusion chromatography (SEC) coupled

- to ultraviolet diode array detection (UV-DAD) combined with chemometric methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 58 (2012) 193-199
184. J.A. Donarski, S.A. Jones, A.J. Charlton, Application of Cryoprobe ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Multivariate Analysis for the Verification of Corsican Honey. *J. Agric. Food. Chem.* 56 (2008) 5451-5456
185. F. Geeraerts, L. Schimpfessel, R. Crokaert, The Stability of Tryptophan Metabolites prior to Urine Analysis. *Clin. Chim. Acta* 102 (1980) 247-251
186. A.A.B. Badawy, C.J. Morgan, Rapid Isocratic Liquid Chromatographic Separation and Quantification of tryptophan and six kynurenine metabolites in biological samples with ultraviolet and fluorimetric detection. *Int. J. Tryp. Res.* 3 (2010) 175–186
187. T. Fukushima, S. Mitsuhashi, M. Tomiya, M. Iyo, K. Hashimoto, T. Toyo'oka, Determination of kynurenic acid in human serum and its correlation with the concentration of certain amino acids. *Clin. Chim. Acta* 377 (2007) 174-178
188. K.J. Swartz, W.R. Matson, U. MacGarvey, E.A. Ryan, M.F. Beal, Measurement of Kynurenic Acid in Mammalian Brain Extracts and Cerebrospinal Fluid by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorometric and Coulometric Electrode Array Detection. *Anal. Biochem.* 185 (1990) 363-376
189. S. Mitsuhashi, T. Fukushima, J. Kawai, M. Tomiya, T. Santa, K. Imai, T. Toyo'oka, Improved method for the determination of kynurenic acid in rat plasma by column-switching HPLC with post-column fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta* 562 (2006) 36-43
190. L.-D. Xiao, X.-B. Luo, L.-G. Pi, A.-G. Tang, Simultaneous determination of kynurenine and kynurenic acid concentrations in human serum by HPLC with dual wavelengths fluorescence detection. *Clin. Chim. Acta* 395 (2008) 178-180
191. D.K. Hansen, S.M. Lunte, Determination of kynurenic acid by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 781 (1997) 81-89
192. J. Odo, Y. Sogawa, M. Inoguchi, A. Hirai, Fluorescent Derivatization of Xanthurenic Acid and Nicotinic Acid with Horseradish Peroxidase in the Presence of Excess Hydrogen Peroxide. *Anal. Sci.* 27 (2011) 105-109
193. J. Odo, M. Inoguchi, A. Hirai, Fluorometric determination of quinolinic acid using the catalytic activity of horseradish peroxidase. *J. Health Sci.* 55 (2009) 242-248

194. J. Odo, T. Funai, A. Hirai, Spectrofluorometric Determination of Kynurenic Acid with Horseradish Peroxidase in the Presence of Hydrogen Peroxide. *Anal. Sci.* 23 (2007) 317-320
195. K. Mawatari, F. Inuma, M. Watanabe, Fluorometric Determination of Kynurenic Acid By Photochemical Reaction With Hydrogen Peroxide. *Anal. Sci.* 7 (1991) 783-784
196. S.A. Williams, J.A. Monti, L.R. Boots, P.E. Cornwell, Quantitation of xanthurenic acid in rabbit serum using high performance liquid chromatography. *Am. J. Clin. Nutr.* 40(1984) 159-167
197. C. Hervé, P. Beyne, H. Jamault, E. Delacoux, Determination of tryptophan and its kynurenine pathway metabolites in human serum by high-performance liquid chromatography with simultaneous ultraviolet and fluorimetric detection. *J. Chromatogr. B* 675 (1996) 157-161
198. I.A.J. Cavill, Estimation of the tryptophan metabolites xanthurenic acid, 3-hydroxykynurenine and kynurenine. *Clin. Chim. Acta* 18 (1967) 285-289
199. W.A. Turski, M. Nakamura, W.P. Todd, B.K. Carpenter, W.O. Whetsell Jr., R. Schwarcz, Identification and quantification of kynurenic acid in human brain tissue. *Brain Res.* 454 (1988) 164-169
200. Y.-Z. Ouyang, Y.-Z. Liang, S. Li, X. Luo, L. Zhang, Z. Tang, Q. Wang, X. Xu, Interpretation of the characteristic fragmentation mechanisms through determining the initial ionization site by natural spin density: A study on the derivatives of tryptophan and tryptamine. *Int. J. Mass Spectrom.* 286 (2009) 112-121
201. B. Crow, M. Bishop, E. Paliakov, D. Norton, J. George, J. Alexander Bralley, Analysis of urinary aromatic acids by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* 22 (2008) 1346-1353
202. K. Yamada, T. Miyazaki, T. Shibata, N. Hara, M. Tsuchiya, Simultaneous measurement of tryptophan and related compounds by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 867 (2008) 57-61
203. U. Caruso, B. Fowler, G. Minniti, C. Romano, Determination of tryptophan and ten of its metabolites in a single analysis by high-performance liquid chromatography with multiple detection. *J. Chromatogr. A* 661 (1994) 101-104
204. B. Muszynska, K. Sulkowska-Ziaja, H. Ekiert, Indole compounds in fruiting bodies of some edible Basidiomycota species. *Food Chem.* 125 (2011) 1306-1308

205. The Commission of the European Communities. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC.
206. EC, SANCO/825/00 rev.7: Guidance Document on Residue Analytical Methods, European Commission Directorate General Health and Consumer Protection, Brussels, 2004.

VII. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un método para análisis de resveratrol (*cis/trans*) y piceído (*cis/trans*) en miel, polen y alimento para abejas, basado en el empleo de la cromatografía líquida con detectores de diodos en fila, fluorescencia y espectrométrico de masas (cuadrupolo simple)

- La mejor separación se consigue empleando una columna Gemini C₁₈ 110Å de 250 mm, a 30°C, con una fase móvil constituida por una mezcla de ácido fórmico al 1% en agua y acetonitrilo(85:25), operada en régimen isocrático para miel y alimento para abejas mientras que para polen es más adecuado en gradiente.
- Teniendo en cuenta la matriz se aconseja el empleo combinado de la detección UV (*cis*) y fluorescente (*trans*), pudiéndose evaluar los cuatro compuestos al utilizar el detector de cuadrupolo.
- Las características analíticas del método lo hacen útil para evaluar las concentraciones muy diferentes que pueden contener las muestras. Ahora bien el origen botánico de la miel y por tanto su composición diferente afectan a dichas características siendo peores para el caso de las mieles oscuras.
- Para la preparación de muestra en el análisis de miel se basa en el empleo, sobre diluciones acuosas, de cartuchos de extracción en fase sólida tipo C₁₈ polimérico. Para las muestras de alimento para abejas se realiza la inyección directa de las diluciones acuosas. Para las muestras de polen se hace preciso una limpieza repetida con hexano seguida de una extracción sólido-líquido con disolución etanólica y posterior concentración del extracto hidroalcohólico.

La metodología propuesta se ha aplicado al seguimiento de la eficacia del tratamiento de colmenas afectadas por nosemosis, analizando los residuos encontrados en muestras recogidas en la cámara de cría después de aplicar tratamientos con alimentos suplementados con *trans*-resveratrol

- El tratamiento, con la dosis sugerida por la bibliografía en experimentos *in vitro*, resultó ineficaz
- El segundo tratamiento muestra una gran eficacia contra *Nosema spp*, si bien las cantidades residuales en miel son muy variables y en varios casos elevadas lo que implica una optimización de dosis y posología.
- Aunque el candy suplementado se consume mejor parece que la eficacia es mayor con la aplicación del compuesto en el jarabe. Las concentraciones residuales en las muestras procedentes del tratamiento con candy son bastante similares mientras que con jarabe la variación es mucho mayor
- En todas las muestras analizadas obviamente el compuesto que siempre aparece en mucha mayor concentración es el *trans*-resveratrol
- Se han encontrado muestras de polen comercial con cantidades residuales de *trans*-resveratrol

Se propone por vez primera un método para análisis de triptófano y sus principales metabolitos en mieles empleando cromatografía líquida con detectores de diodos en fila, fluorescencia y espectrométrico de masas (trampa de iones).

- La separación se ha conseguido empleando una columna Synergi™ 4µm Hydro-RP 80 Å de 150 mm, a 30°C, con una fase móvil constituida por formiato amónico a pH 4 y metanol (88:12) en régimen isocrático
- Aunque la combinación LC-DAD-FLD resulta útil para la mayoría de las muestra, las bajas cantidades de ácido xanturénico exigen el empleo del detector de masas, de este modo se aconseja:
LC-DAD (MS/MS) para kinunerina y ácido kinurénico.
LC-FLD (MS/MS) para triptófano.
LC-MS/MS para ácido xanturénico.
- La preparación de muestra propuesta consiste en pasar las diluciones acuosas por cartuchos poliméricos MCX que combinan fase inversa e intercambio catiónico.

El método se ha aplicado al análisis de muestras de mieles de 17 orígenes botánicos diferentes

- Aunque efectivamente se encuentran grandes cantidades de ácido kinurénico en la miel de castaño hay otros orígenes botánicos donde también se detecta el compuesto por lo que no se debería considerar ese ácido como marcador específico de la miel de castaño
- El triptófano es más abundante en las mieles de bosque, romero, espliego y cantueso.
- Las mieles de girasol, espliego, cantueso, eucalipto, romero y multifloral presentan los mayores contenidos en kinurenina
- Las cantidades de ácido xanturénico son muy pequeñas en las mieles en las que aparece, incluso no está presente en cantidades detectables en las mieles de romero, espliego, encina, zarzamora y bosque.

VIII. ABREVIATURAS Y SIGLAS

ACN	Acetonitrilo
APCI	Ionización Química a Presión Atmosférica
BSTFA	bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CAR	Centro Apícola Regional
CCD	Síndrome de Despoblamiento de las Colmenas
CE	Electroforesis Capilar
<i>c-p</i> ó <i>c-pic</i>	<i>cis</i> -piceido
<i>c-r</i> ó <i>c-res</i>	<i>cis</i> -resveratrol
CV%	Coefficiente de variación porcentual
CZE	Electroforesis Capilar en Zona
DAD	Detector de diodos en fila
DL-E	DL-Etionina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EIC	Cromatograma de ion extraído
ESI	Ionización por Electrospray
EtOH	Etanol
FDA	Agencia de Medicamentos y Alimentos
FIA	Análisis de inyección de flujo
FLD	Detector de fluorescencia
GC	Cromatografía de Gases
HRP	peroxidasa de rábano, proviene del inglés: horseradish peroxidase
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
KYN	Kinurenina
KYNA	Ácido kinurénico
LC ó HPLC	Cromatografía de Líquidos
LLE	Extracción líquido-líquido
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
MAE	Extracción asistida por microonda
MEKC	Electroforesis Capilar Electrocinética Micelar
MeOH	Metanol
MRM	Monitorización de reacciones múltiples
MS	Espectrometría de Masas

ND	No detectado
NMR	Resonancia magnética nuclear
NQ	No cuantificable
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI	Patrón interno
PLE	Extracción con fluidos presurizados
PO	Producto de oxidación
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RE%	Porcentaje de error relativo
RSD%	Porcentaje de desviación estándar relativa
SFE	Extracción con Fluidos Supercríticos
SIM	Monitorización selectivo de iones
SPE	Extracción en fase sólida
TLC	Cromatografía de capa fina
<i>t-p</i> ó <i>t-pic</i>	<i>trans</i> -piceido
<i>t-r</i> ó <i>t-res</i>	<i>trans</i> -resveratrol
TRP	Triptófano
T _{vap}	Temperatura de vaporización
UAE	Extracción asistida por ultrasonidos
USA	Estados Unidos de Norteamérica
UV	Ultravioleta
VICH	Conferencia Internacional sobre Armonización en Veterinaria
XA	Ácido xanturénico