



Universidad de Valladolid

# DETERMINACIÓN DE CIS- /TRANS- ESTILBENOS EN CERA DE PANAL DE ABEJA

**Yolanda González Cámara**

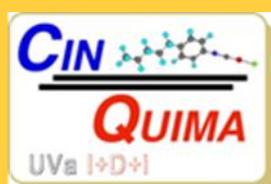
Máster de Técnicas Avanzadas en Química

Curso 2012-2013

Departamento de Química Analítica

Facultad de Ciencias

Universidad de Valladolid





**Universidad de Valladolid**



D<sup>ª</sup>. María Jesús del Nozal Nalda, Profesora del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valladolid.

CERTIFICA: Que la presente memoria, **“Determinación de cis-/trans- estilbenos en cera de panal de abeja”** ha sido realizada bajo su dirección en el grupo de investigación TESEA, perteneciente al Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valladolid, en el Instituto CINQUIMA, por **D<sup>ª</sup>. Yolanda González Cámara** y constituye su Trabajo Fin de Máster para optar al título de *Máster en Técnicas Avanzadas en Química*.

Valladolid, a 1 de Julio de 2013

*A toda mi familia y mis amigos, en especial a Borja y Álvaro*

Esta investigación ha sido llevada a cabo en el Instituto CINQUIMA (Parque Científico de la Universidad de Valladolid) bajo la dirección de la Dra. M<sup>a</sup> Jesús del Nozal Nalda y la colaboración de la Dra. M<sup>a</sup> Teresa Martín Gómez, a quienes expreso mi gratitud.

Por último, hago extensivo este agradecimiento al resto de miembros del grupo de investigación TESEA, en especial a Karen Yañez y a mis compañeras del Máster por su inestimable ayuda.

Para la realización de la investigación recogida en esta memoria se ha contado con la ayuda económica aportada por el Ministerio de Economía y Competitividad - INIA en el proyecto RTA-2012-00076-CO2-O2 a quienes expresamos nuestro agradecimiento.

## ÍNDICE

---

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>I.1. Resveratrol y piceido.....</b>	<b>9</b>
<b>I.2. Antecedentes bibliográficos.....</b>	<b>10</b>
<b>I.3. Cera de abeja.....</b>	<b>11</b>
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
<b>III. MATERIALES Y REACTIVOS.....</b>	<b>14</b>
<b>III.1. Instrumentación.....</b>	<b>15</b>
<b>III.2. Equipo adicional y consumibles.....</b>	<b>15</b>
<b>III.3. Reactivos y disolventes.....</b>	<b>15</b>
<b>III.4. Columnas analíticas.....</b>	<b>16</b>
<b>IV. DETERMINACIÓN DE RESVERATROL Y PICEIDO EN CERA DE ABEJA.....</b>	<b>17</b>
<b>IV.1. Condiciones cromatográficas.....</b>	<b>18</b>
<b>IV.2. Tratamiento de muestra.....</b>	<b>20</b>
<b>IV.3. Validación de la Metodología Analítica.....</b>	<b>26</b>
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>37</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>39</b>

# **I.INTRODUCCIÓN**

Las abejas juegan un papel fundamental no solo en lo relacionado con la producción de la colmena sino también en la polinización de plantas. Por todo ello, lo que las afecte negativamente, tendrá sin duda una gran repercusión en la Agricultura y el Medio Ambiente <sup>[1-4]</sup>.

La investigación sobre el tema se centra actualmente en la búsqueda de compuestos naturales o sintéticos alternativos al uso de antibióticos prohibidos actualmente para el tratamiento de infecciones.

Un ejemplo claro es el uso de fitoalexinas, más en concreto de resveratrol que ha estado presente desde hace siglos en la medicina tradicional.

### 1.1. Resveratrol y Piceido

El resveratrol es una fitoalexina producida por las angiospermas en respuesta a las infecciones microbianas, daños, radiación UV, ataque de microorganismos, etc. Presenta dos isómeros geométricos que aparecen de forma natural siendo generalmente el *trans* el predominante, aunque también aparecen sus glucósidos, piceidos, con propiedades similares <sup>[4-9]</sup>.

Son compuestos polifenólicos que presentan entre otras, actividades anticancerígenas, antiinflamatorias, antitrombóticas, inmunomoduladoras, antioxidantes, etc. <sup>[10-12]</sup>

Desde el punto de vista químico, son estilbenos cuyo esqueleto estructural consta de un puente vinílico, que sirve de unión entre dos anillos aromáticos. Presentan entre otras, reacciones reversibles de isomerización *cis/trans*, ciclaciones y dimerizaciones <sup>[9]</sup>.

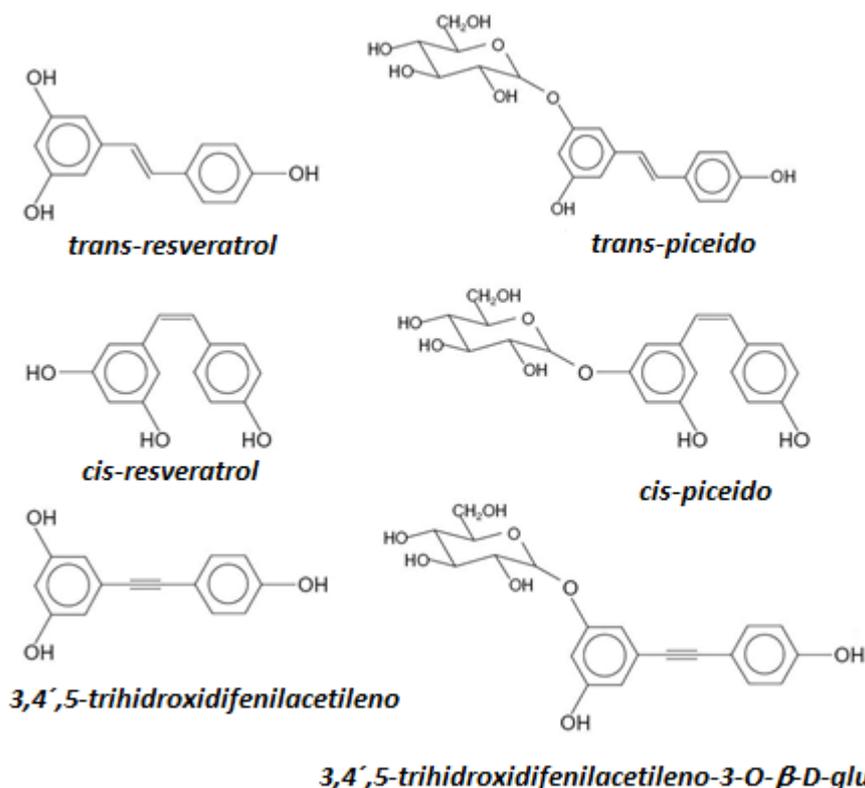


Figura 1. Estructuras químicas de los isómeros geométricos del resveratrol y piceido y posibles productos de oxidación

Diversos estudios han demostrado que los estilbenos en general y el resveratrol en particular presentan efectos beneficiosos para la salud, por lo que su introducción en la dieta tanto humana como animal es de gran interés <sup>[13-15]</sup>.

Además de su efectivo papel como antioxidante y de su acción inhibitoria del apelmazamiento de plaquetas, varios estudios han demostrado su eficacia en la prevención del cáncer, inhibiendo la iniciación y desarrollo de tumores. Además destacan entre otras sus propiedades estrogénicas, antivirales y neuroprotectoras <sup>[16-17]</sup>.

En cuanto a la apicultura, los estudios realizados se centran en la eficacia del resveratrol frente al microsporidio *Nosema ceranae*. Éste, altera el metabolismo de las abejas disminuyendo la digestión de proteínas que disminuye la longevidad y afecta a la esterilidad de la reina y origina parálisis en las alas.

En la mayoría de los países está prohibido el uso de antibióticos en el tratamiento de colmenas, sobre todo por la falta de control en su administración. Por lo tanto es necesario buscar tratamientos preventivos como alternativa. El resveratrol es uno de estos tratamientos siendo actualmente objeto de estudios llevados a cabo en esta área y otros campos de investigación.

## 1.2. Antecedentes bibliográficos para el análisis de *cis*-/*trans*-estilbenos

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 principalmente en muestras de vino y derivados, uvas, fresas, tomates, cervezas, zumos de frutas, pistachos, cacahuetes, chocolates, plantas, fluidos biológicos y preparados farmacéuticos. En cuanto a productos derivados de la colmena, en el grupo de investigación se ha desarrollado una metodología para analizar estos compuestos en miel y polen en un estudio anterior <sup>[18-22]</sup>.

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, 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 <sup>[23-25]</sup>.

Las metodologías usando cromatografía de líquidos son las que mayor aceptación han tenido, empleándose principalmente el modo de separación en fase inversa, utilizando principalmente columnas C<sub>18</sub> aunque también se ha hecho uso de columnas tipo ciano en algún estudio.

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. Otras propuestas son la detección por RMN/MS, electroquímica y quimioluminiscente <sup>[26]</sup>.

### **I.3. Cera de abeja**

La cera de abeja es un producto graso producido por las abejas para la construcción de los panales principalmente. Se obtiene a partir de la alimentación de las abejas con miel después de su transformación dentro de su organismo. Para la formación de la cera, las abejas necesitan total oscuridad y una temperatura de unos 34-36 °C que consiguen por rozamiento entre ellas.

Principalmente está formada por ester de ácidos grasos y alcoholes de peso molecular elevado. La proporción de los componentes en la cera es: monoésteres (35%), hidrocarburos (14%), diésteres (14%), ácidos libres (12%), hidróxido poliésteres (8%), hidróxido monoésteres (4%), triésteres (3%), ácidos poliestéricos (2%), ácidos estéricos (1%), alcoholes libres (1%), sin identificar (6%).

En cuanto a sus características, es altamente insoluble en medios acuosos y es sólida y dura a temperatura ambiente. A medida que se calienta se va reblandeciendo hasta fundirse a una temperatura aproximada de 60°C.

Hay varios métodos utilizados por los apicultores para la extracción de la cera de los panales: mediante agua caliente, mediante vapor de agua o mediante fundidores de cera solares.

Los principales tratamientos de muestra con cera como matriz se basan en fundir la cera previamente para la extracción de los compuestos de interés. <sup>[30-32]</sup>

Otros tratamientos alternativos son la congelación y molienda de la cera o su disolución en disolventes como cloroformo, hexano o éter de petróleo. <sup>[29,31,33]</sup>

Finalmente cabe destacar el hecho de que no se ha encontrado, en la revisión bibliográfica, ningún trabajo en el que se aborde la determinación de los estilbenos en cera.

## **II.OBJETIVO**

El objeto de este estudio es desarrollar un método para determinar y cuantificar el resveratrol y derivados que podrían quedar como residuo después de usarse como tratamiento preventivo en las colmenas, así como la validación del mismo. De esta manera, podría determinarse junto con un estudio anteriormente realizado dentro del grupo de investigación en miel y polen, la distribución de estos compuestos en los productos derivados de la colmena.

### **III. MATERIALES Y REACTIVOS**

### III.1. Instrumentación

Para la realización de esta investigación se han empleado dos equipos de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), el uso de cada uno ellos se debe a las finalidades establecidas en cada caso. Los equipos utilizados se describen a continuación:

- 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, compartimento 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, compartimento termostatado de columna, detector de diodos en fila (DAD) y detector de espectrometría de masas con analizador cuadrupolar (MS), todo ellos controlado por el software HPLC/MSD ChemStation Rev.A.10.02.

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

### III.2. Equipo adicional y consumibles

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)

Centrifuga 5810R de Eppendorf (Hamburg, Alemania)

Filtros de jeringa con membrana de acetato de celulosa 0.45  $\mu\text{m}$  x 13 mm de Advantec MFS (Dublin, CA, USA)

Filtros de jeringa con membrana de nylon 0.45  $\mu\text{m}$  x 13 mm de Advantec MFS

Filtros de membrana de nylon 0.45  $\mu\text{m}$  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)

### III.3. Reactivos y disolventes

Acetonitrilo, gradiente HPLC de PANREAC (Barcelona, España)

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

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

Formiato de amonio grado reactivo, 97% de Sigma-Aldrich  
 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)  
 Cloroformo grado Pestican de Lab Scan  
 Etanol absoluto grado gradiente HPLC de PANREAC  
 Diclorometano grado HPLC de Lab Scan  
*trans*-Piceido (trans-resveratrol-3-O-D-glucopiranosido), 97% de Sigma-Aldrich  
*trans*-Resveratrol (3,4'-5-trihidroxi-trans-estilbeno) ,99% de Sigma-Aldrich

Las disoluciones de ambos compuestos *trans*, se preparan por pesada en MeOH y se almacenan a 4°C protegidos de la luz para evitar la fotoisomerización.

Los isómeros *cis*, se obtienen por exposición a radiación ultravioleta del respectivo *trans*-estilbeno siguiendo las indicaciones establecidas en el trabajo ya citado anteriormente. Se obtuvo una conversión del 92% para ambos estilbenos.

Una vez obtenidos los cuatro analitos, *t*-resveratrol, *c*-resveratrol, *t*-piceido y *c*-piceido, se prepara una mezcla de los cuatro en MeOH de 100 mgL<sup>-1</sup> a partir de la cual se preparan, por dilución en metanol, las diluciones necesarias para el desarrollo del trabajo.

### III.4. Columna analítica

La columna utilizada para llevar a cabo este trabajo es una Gemini C<sub>18</sub> de Phenomenex:

Longitud	250 mm
Diámetro Interno	4.6 mm
Tamaño partícula	5 µm
Mecanismo de separación	Fase inversa
Soporte	Organosílica porosa
Fase estacionaria	C <sub>18</sub> , recubrimiento con trimetilsililo (TMS)
Tamaño de poro	110 Å
Área superficial	375 m <sup>2</sup> /g
Carga de C	14%
Intervalo de pH	1-12
Precolumna:	Gemini C <sub>18</sub> de Phenomenex

#### **IV. DETERMINACIÓN DE RESVERATROL Y PICEIDO EN CERA DE PANAL DE ABEJA**

## IV.1. Condiciones cromatográficas

Para este estudio, se seleccionaron como condiciones cromatográficas de partida aquellas establecidas en un trabajo anterior realizado por el grupo que consistía en la determinación de *cis*-/*trans*- estilbenos en miel, polen y alimento para las abejas mediante HPLC. Las condiciones que se establecieron son las que se exponen a continuación:

- **Condiciones para la detección:** Para cada uno de los tres tipos de detectores que se utilizan:
  - Absorción molecular: Utilizada para la detección de los *cis*-isómeros que presentan su máximo de absorción a una longitud de onda de 286 nm.
  - Fluorescencia molecular: Para la detección de los *trans*-isómeros que son los que presentan fluorescencia se estableció una longitud de excitación y de emisión de 318 y 390 nm respectivamente.
  - Espectrometría de masas: Utilizando ESI como fuente de ionización en modo negativo:

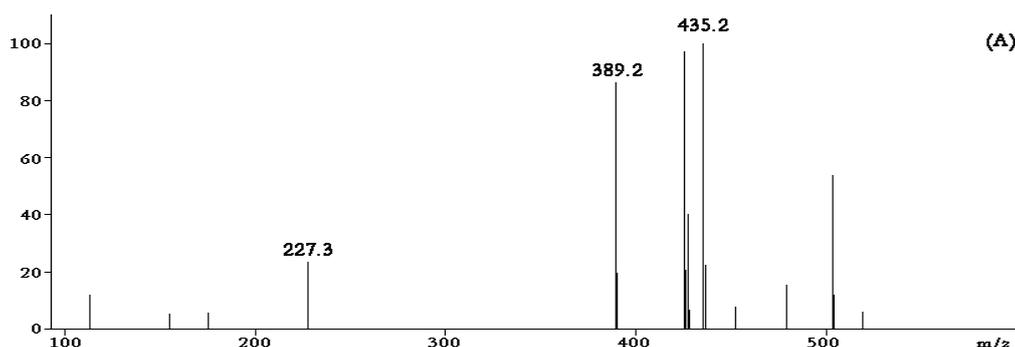
Tabla 1. Parámetros de MS-ESI en modo negativo

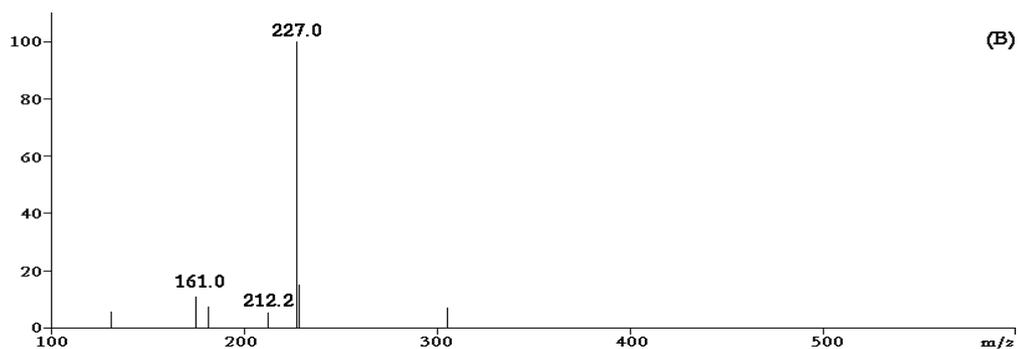
Parámetros MS	Intervalo estudiado	Valor óptimo
Voltaje del fragmentador (V)	20 – 380	140
Voltaje del capilar (V)	2000 – 5600	3500
Flujo de gas secante N <sub>2</sub> (L/min)	2 – 12	10
Temperatura del gas secante (°C)	10 – 350	300
Presión del gas nebulizador (psig)	10 – 60	30
Ganancia	5 – 20	20

Tabla 2. Iones (m/z) para la cuantificación y confirmación por 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

Los espectros de masas se muestran en la figura 2.





**Figura 2. Espectros de masas de disoluciones acuosas de (A) piceido y (B) resveratrol en concentración de 5 ppm**

- **Composición de la fase móvil:** La composición de partida es Ácido Fórmico 1%/ACN 75:25 (v/v) trabajando en régimen isocrático.
- **Temperatura:** La temperatura de partida para la separación de los analitos es de 30°C.
- **Volumen de inyección:** 20  $\mu$ L

Para optimizar las condiciones cromatográficas, se coge una cantidad de cera a la que se le adiciona los cuatro analitos de interés. Con las condiciones cromatográficas de partida se observa que la matriz interfiere con los analitos por lo que es necesario realizar distintas modificaciones:

- **Fase móvil:** Utilizando distintos porcentajes de los constituyentes de la fase móvil en régimen isocrático no fue posible la separación de los compuestos de interés. Para conseguirlo fue necesario, en primer lugar, cambiar el ácido fórmico por formiato amónico, como componente acuoso de la fase móvil, en una concentración 20 mM. Como modificador orgánico se mantuvo el ACN.

Se estudió la influencia que el pH ejercía sobre la retención de los analitos, de las experiencias que se realizaron se dedujo que si bien la variación del pH modificaba muy poco la retención de los analitos si afectaba a la retención de algunos de los otros componentes de la cera, obteniéndose la mayor resolución cuando el pH del formiato amónico se llevaba a un valor de 8.

Como con este cambio no se logró el valor necesario de la resolución para poder realizar la identificación y cuantificación de los analitos, utilizando como sistema de detección DAD/FLD, se pensó en cambiar el régimen de separación a gradiente. Se ensayaron distintos gradientes, hasta conseguir la separación completa de los mismos, lo cual se consiguió con el gradiente que se muestra a continuación en la tabla 3.

Tabla 3. Gradiente para la separación de los analitos

Tiempo	% ACN
0	25
6	25
8	30
9	25
13	25
15	40
20	60
22	80
25	100
28	100
30	80
32	60
34	40
36	25

Fue necesario aumentar la fuerza de la fase móvil hasta un 100% de acetonitrilo para conseguir eluir completamente todos los componentes de la matriz que eran fuertemente retenidos por la fase estacionaria, aunque los compuestos de interés eluían con una fuerza de la fase móvil inferior, por lo que se hizo necesario establecer un tiempo (post- time) necesario para estabilizar la columna y obtener reproducibilidad en la retención de los analitos, el cual se estableció en 5 min.

• **Temperatura:** También se estudió la influencia que la temperatura de separación ejercía sobre la retención y resolución, para lo cual se realizaron una serie de experiencias en las que se inyectó en el sistema cromatográfico, en las condiciones establecidas, un extracto de cera a la que se había adicionado una cantidad conocida de los cuatro analitos, variando la temperatura de separación entre 25 y 50°C, a intervalos de 5°C. De los resultados que se obtuvieron se estableció como temperatura más adecuada la de 40°C, pues a dicha temperatura se conseguía una adecuada resolución y al mismo tiempo se reducía el tiempo de análisis.

Se comprobó también que tanto las condiciones de detección como el volumen de inyección establecidos como punto de partida y ya citados en la memoria eran los adecuados para la determinación de los compuestos en cera.

### III.2. Tratamiento de muestra

Según la bibliografía encontrada, la mayor parte de los tratamientos de cera, se llevan a cabo en caliente para que la cera esté fundida. La cera, como ya se ha indicado, funde a unos 60°C aproximadamente.

Para establecer el tratamiento de muestra más adecuado, siempre se realizaron las experiencias por triplicado y sobre muestras de: 1 g de cera sin adición de los analitos, para que actuara como blanco, y 1 g de cera con una concentración adicionada conocida de los compuestos de interés.

◆ **Dopado de ceras:** Para realizar este estudio, fue necesario añadir los analitos de interés a la matriz. Para ello, se llevó una determinada cantidad de cera y se calentó a 60°C hasta que quedó completamente fundida. Entonces se añadió una mezcla de patrones de los compuestos, previamente estudiada su estabilidad térmica. Se homogenizó bien la cera con los patrones y se dejó a temperatura ambiente para que solidificara por completo.

◆ **Extracción de los compuestos:** Ya que se trataba de extraer los compuestos de la cera, se pensó en primer lugar en solubilizarla, para lo cual se pensó en utilizar hexano. La forma de operar consistió en añadir a 1 g de los dos tipos de muestra anteriormente mencionada, dopada y sin dopar, 10 ml de hexano y se llevaron a una placa calefactora a 60°C, para provocar su fusión y facilitar su disolución. Una vez fundida se procedió a la extracción de los compuestos, en la misma placa con agitación, durante 10 minutos, para lo cual se ensayaron distintos disolventes y en distintas proporciones, los cuales se detallan a continuación: Alcoholes (EtOH, MeOH, iPrOH), mezclas alcohol-agua, ACN, EtOH/Fórmico 1%, EtOH/NH<sub>3</sub> y hexano/iPrOH. En todos los ensayos iniciales que se realizaron se empleó el mismo volumen del extractante que se estudiaba. Posteriormente se llevó a un embudo de decantación para facilitar la separación de las fases, este paso debe ser rápido para evitar que la cera solidifique, y la fase acuosa se llevó al congelador durante 10 min para que la cera que pudiera estar fundida en la fase acuosa solidificara. A continuación se filtró y se desechó el sólido y el extracto era concentrado a sequedad en rotavapor. El residuo sólido se reconstituyó con 1 ml de metanol, se filtró, utilizando filtros de acetato de celulosa, y posteriormente se inyectó en el cromatógrafo. En todas las experiencias se realizaba el mismo procedimiento con la muestra sin adicionar.

A partir de los cromatogramas que se obtuvieron, y teniendo en cuenta el área de los picos correspondientes a la inyección de un patrón de la misma concentración que la de la muestra adicionada, se calcularon los porcentajes de recuperación para cada extractante utilizado, encontrándose que eran superiores en el caso de la utilización de la mezcla EtOH/H<sub>2</sub>O 80:20 (v/v).

Una vez establecida la naturaleza del extractante, se realizaron una serie de experiencias con el fin de establecer el volumen de extractante que proporcionara la máxima recuperación de los compuestos, de los resultados que se obtuvieron se observó que el porcentaje de recuperación para todos los compuestos aumentaba significativamente a medida que aumentaba el volumen de extractante empleado hasta 30 ml, volúmenes superiores implicaban un incremento mínimo en la recuperación, por lo que se estableció como volumen de extractante 30 ml.

También se estudió la influencia que ejercía el tiempo de agitación sobre el rendimiento en la extracción de los compuestos. De los resultados que se obtuvieron se comprobó que tiempos de

agitación superiores a 5 minutos no conducían a mayores porcentajes, por lo que se estableció este tiempo como el más adecuado.

Por último se procedió a estudiar la influencia del disolvente empleado para la solubilización de los compuestos del residuo seco que se obtenía después de concentrar el extracto en rotavapor. Se ensayaron los siguientes disolventes: fase móvil, EtOH, MeOH y ACN obteniéndose los mejores resultados con el empleo de MeOH.

Con el tratamiento de muestra descrito se obtuvieron para cada analito, los porcentajes de recuperación junto con sus coeficientes de variación, a tres niveles de concentración, para los dos sistemas de detección, que se muestran en la tabla 4.

**Tabla 4. % Recuperación tratamiento de muestra en caliente mediante DAD/FLD**

	Concentración/ mgkg <sup>-1</sup>	% Recuperación (medio)	%CV
<b>t-piceido<sup>a</sup></b>	1,25	90	5,1
	5,00	88	4,8
	10,0	91	2,1
<b>c-piceido<sup>b</sup></b>	1,25	94	1,2
	5,00	91	2,3
	10,0	91	4,0
<b>t-resveratrol<sup>a</sup></b>	1,25	92	1,1
	5,00	95	4,6
	10,0	90	3,4
<b>c-resveratrol<sup>b</sup></b>	1,25	89	2,5
	5,00	89	3,2
	10,0	91	2,1

<sup>a</sup>FLD; <sup>b</sup>DAD

**Tabla 5. % Recuperación tratamiento de muestra en caliente mediante MS-ESI**

	Concentración/ mgkg <sup>-1</sup>	% Recuperación (medio)	%CV
<b>t-piceido</b>	0,15	90	2,5
	0,60	91	1,2
	2,50	91	2,2
<b>c-piceido</b>	0,15	92	2,3
	0,60	92	4,6
	2,50	89	5,7
<b>t-resveratrol</b>	0,15	89	1,2
	0,60	89	3,1
	2,50	91	5,4
<b>c-resveratrol</b>	0,15	93	5,9
	0,60	93	5,2
	2,50	91	5,1

Como se desprende de la observación de la tabla, los resultados de la aplicación del método desarrollado, son buenos ya que el mínimo porcentaje de recuperación es del 89 % .

Sin embargo debido a que este tratamiento de muestra es bastante tedioso y complicado en cuanto al control que se necesita sobre todo de la temperatura, se pensó en utilizar otro procedimiento basado en una extracción sólido- líquido en lugar de la líquido- líquido ya establecida, que evitara tener que realizarla a 60°C.

Para poder realizar un tratamiento de muestra basado en la extracción sólido- líquido es necesario disminuir el tamaño de partícula, para favorecer el contacto de las fases. Tras varias pruebas se llegó a la conclusión que la mejor manera de obtener finas partículas de cera de abeja era cortándola en láminas, lo más finas posibles. Posteriormente las láminas se mantuvieron en el congelador durante 24 h aproximadamente y posteriormente se molieron con un molinillo de café en pequeñas cantidades y evitando largos tiempos de molienda ya que con el calor que se generaba la cera se reblandecía. La cera molida se mantuvo en el congelador hasta su uso.

Para el desarrollo de este nuevo tratamiento de muestra se operó, como en el caso anterior, utilizando en todos los ensayos muestras de cera dopada y sin dopar.

◆ **Dopado de ceras:** A 1g de muestra, se le añadió un volumen suficiente de la mezcla de patrones en MeOH para cubrir toda la cera. Se dejó evaporar el disolvente y se transfirió a un tubo de centrifuga. Posteriormente se añadió 10 ml de extractante y se sometió a agitación mecánica en un Vibromatic durante 10 minutos. A continuación las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 9000 rpm y finalmente se decantó el líquido, el cual fue concentrado a sequedad en rotavapor y el residuo se reconstituyo con 1 ml de MeOH, y previa filtración 20 µl de los cuales se inyectaron en el sistema cromatográfico en las condiciones establecidas.

El siguiente paso consistió en optimizar todos aquellos parámetros que pudieran influir en la extracción sólido-líquido.

◆ **Naturaleza del extractante:** Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con el anterior tratamiento de muestra descrito, se procedió a establecer la naturaleza del extractante más adecuado realizando una serie de experiencias con los disolventes que mejores rendimientos en la recuperación de los analitos habían proporcionado. Los disolventes que se probaron fueron: EtOH/H<sub>2</sub>O, en proporciones 80:20 y 70:30 (v/v) y EtOH/Fórmico 1% 70:30.

Como en el anterior tratamiento, los mejores resultados se obtuvieron con el empleo como extractante de la mezcla EtOH/H<sub>2</sub>O en proporción 80:20 (v/v).

Para establecer el volumen del extractante seleccionado se realizaron pruebas variando el mismo en el intervalo de 5 a 40 ml. De los resultados que se obtuvieron se pudo observar que la recuperación

de los compuestos aumentaba, a medida que se aumentaba el volumen utilizado hasta 30 ml, la utilización de volúmenes superiores a 30 no conducían a la obtención de mejoras en la recuperación. Por lo que se estableció un volumen de 30 ml.

A continuación se realizaron una serie de experiencias para establecer el tiempo de agitación. Para lo cual se varió en un intervalo entre 5 y 30 minutos, a intervalos de 5 minutos, estableciéndose un tiempo de 20 minutos por ser el tiempo mínimo necesario que proporcione mayor recuperación.

◆ **Redisolución:** Una vez evaporado en el rotavapor a sequedad se realizaron distintos ensayos con el fin de determinar la naturaleza del disolvente que condujera a la disolución completa del residuo sólido. Se probó: Fase Móvil (Formiato amónico pH (8)/ACN), MeOH, MeOH/Fórmico 1% 80:20 (v/v). A la vista de los porcentajes de recuperación que se obtuvieron para los cuatro analitos, los mejores resultados se corresponden con la utilización de MeOH.

También se probaron diferentes volúmenes de MeOH para realizar la resolución, en este caso se varió entre 1 y 3 ml a intervalos de 1 ml. Se observó que al utilizar un 2º ml los porcentajes de recuperación incrementaban, en el mejor de los casos, en un 7 % y dado que las recuperaciones que se obtenían utilizando 1 ml eran elevados se estableció este valor por ser el que conduciría a menores límites de detección y cuantificación.

Los porcentajes de recuperación obtenidos por el tratamiento de muestra finalmente establecido se muestran en la tabla 6, para tres niveles de concentración y para los dos sistemas de detección:

**Tabla 6. % Recuperación tratamiento de muestra sólido- líquido mediante DAD/FLD**

	Concentración/ mgkg <sup>-1</sup>	% Recuperación (medio)	%CV
<b>t-piceido<sup>a</sup></b>	1,25	92	2,9
	5,00	90	2,9
	10,0	89	3,6
<b>c-piceido<sup>b</sup></b>	1,25	96	5,3
	5,00	92	4,3
	10,0	91	3,5
<b>t-resveratrol<sup>a</sup></b>	1,25	90	2,8
	5,00	90	3,4
	10,0	91	4,2
<b>c-resveratrol<sup>b</sup></b>	1,25	92	2,9
	5,00	92	2,3
	10,0	87	5,6

<sup>a</sup>FLD; <sup>b</sup>DAD

Tabla 7. % Recuperación tratamiento de muestra sólido- líquido mediante MS-ESI

	Concentración/ mgkg <sup>-1</sup>	% Recuperación (medio)	%CV
<b>t-piceido</b>	0,15	94	5,5
	0,6	92	1,3
	2,5	93	5,9
<b>c-piceido</b>	0,15	95	1,6
	0,6	89	1,9
	2,5	89	1,9
<b>t-resveratrol</b>	0,15	92	6,6
	0,6	92	3,3
	2,5	90	3,3
<b>c-resveratrol</b>	0,15	91	4,4
	0,6	90	2,9
	2,5	90	5,1

Como se puede observar en la tabla las recuperaciones que se obtienen son elevadas, comparables a los que se obtuvieron con el tratamiento establecido que se realiza en caliente, sin embargo se seleccionó, para el resto del trabajo, este 2º tratamiento por ser más sencillo y sobre todo porque proporciona menos material que lavar.

El procedimiento final para el tratamiento de muestra queda reflejado en el siguiente esquema:

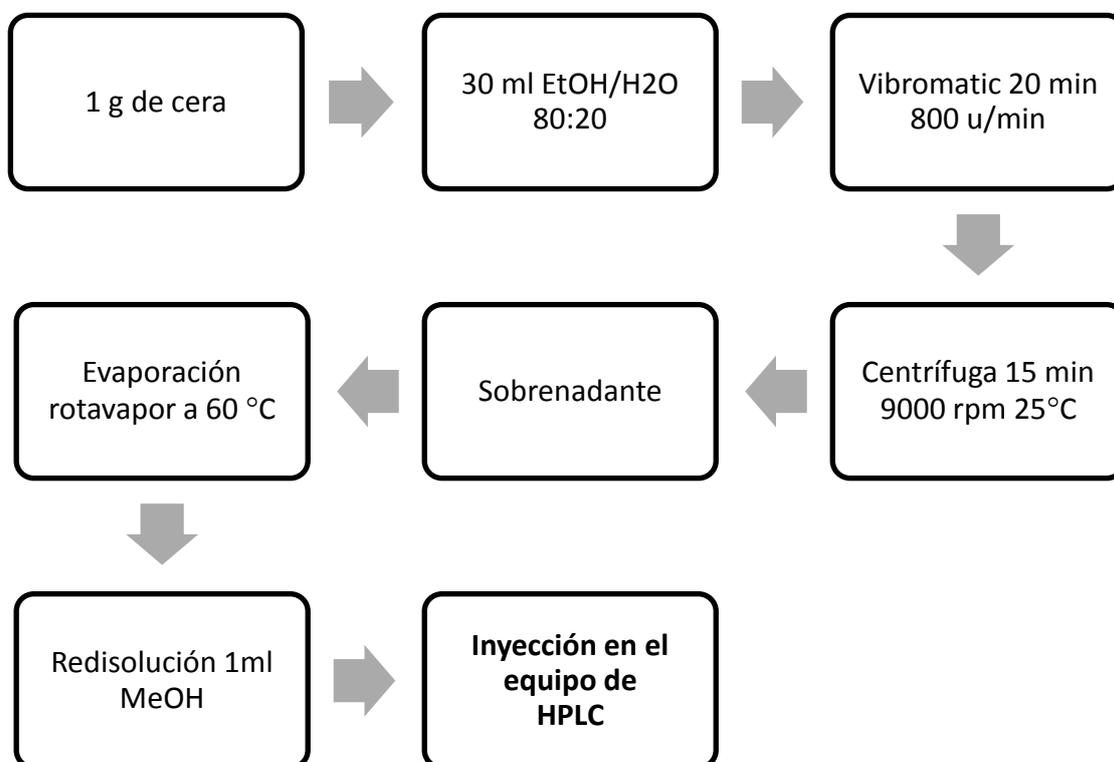


Figura 3. Esquema del tratamiento de muestra

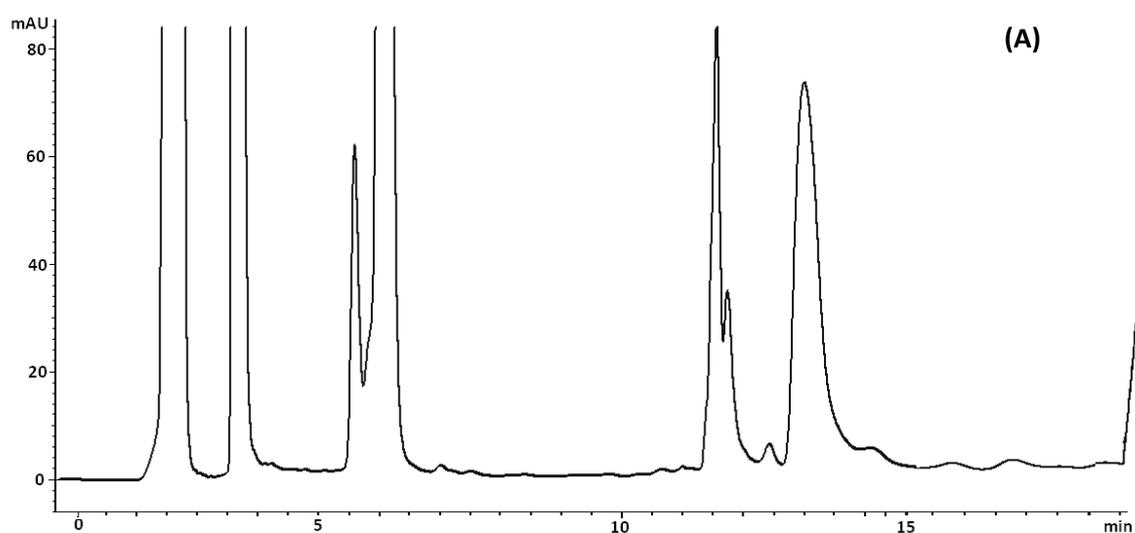
Una vez establecido el tratamiento de muestra, se pensó en la posibilidad de realizar una limpieza de los extractos que permitiera la eliminación de los componentes de la matriz, menos polares, que se solubilizaban en el extractante y que eran los responsables de tener que utilizar ACN puro en el gradiente de fase móvil, para conseguir su elución de la columna cromatográfica. Se realizaron una serie de ensayos utilizando en la extracción líquido- líquido distintos disolventes, en concreto se utilizó: hexano, cloroformo y diclorometano, no obteniéndose, en ningún caso, ninguna limpieza, por lo que se desestimó llevarla a cabo

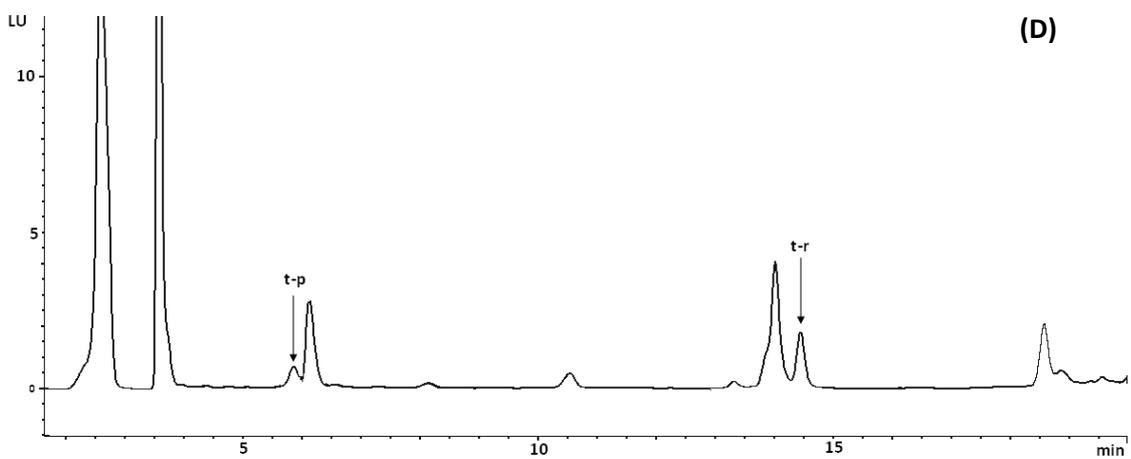
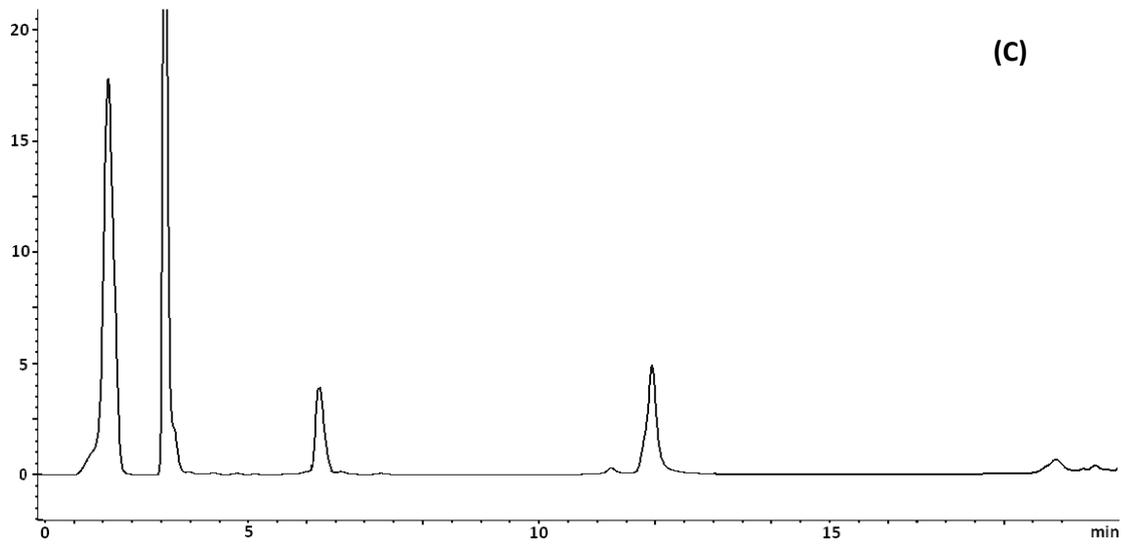
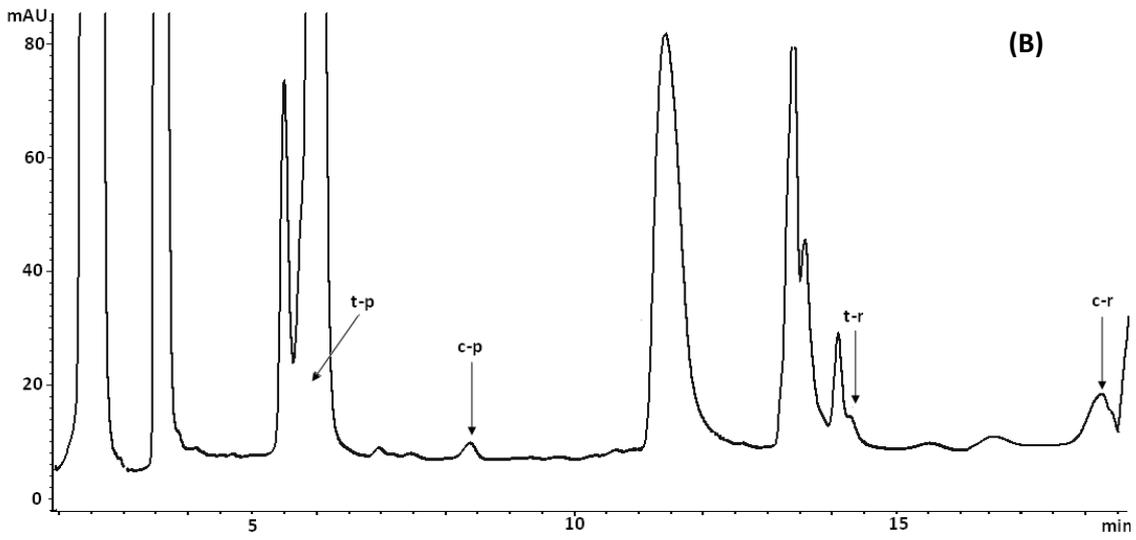
### IV.3. Validación del Método:

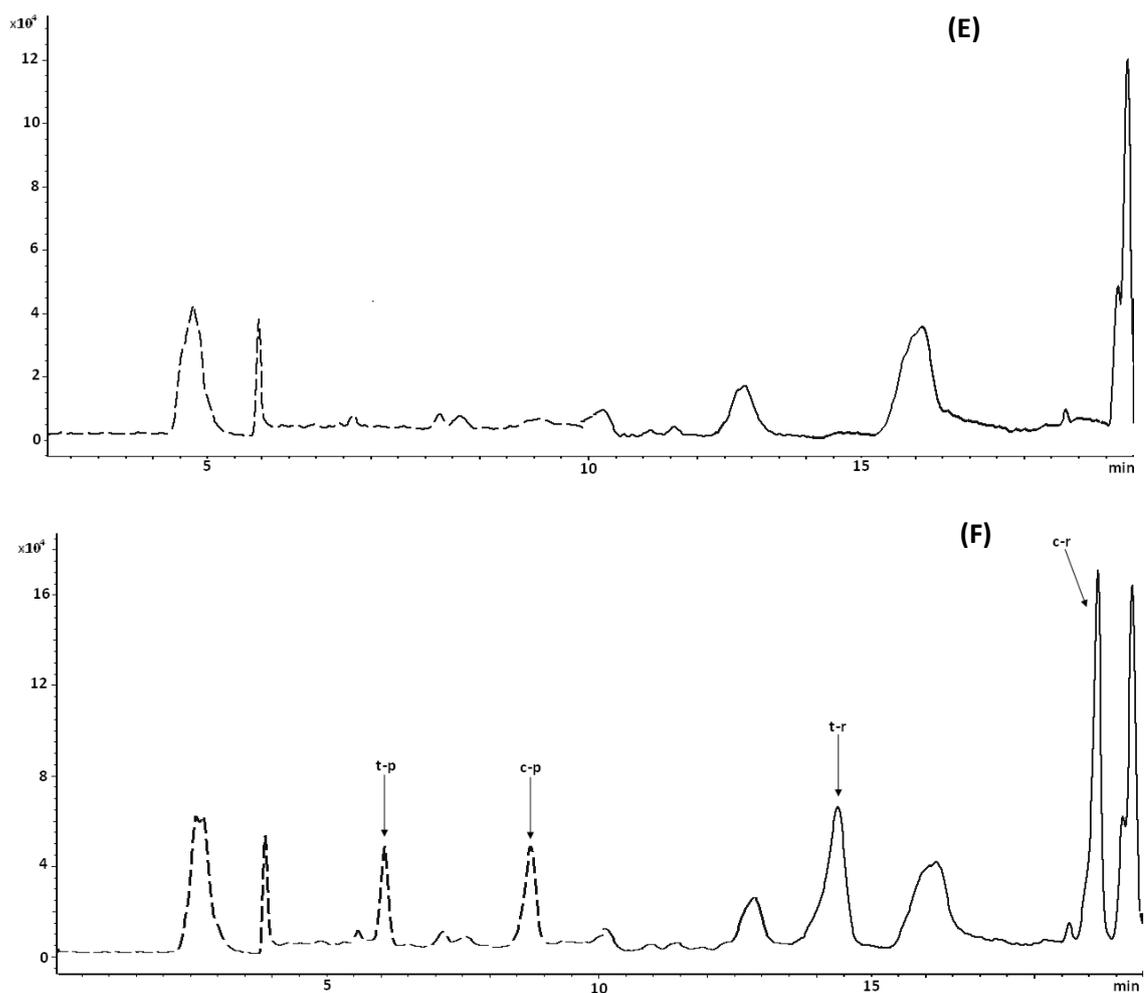
La validación del método que se propone se llevó a cabo siguiendo las directrices marcadas por las guías VICH GL1 y GL2 <sup>[34,35]</sup>, el informe técnico de la IUPAC <sup>[36]</sup> y el documento SANCO/10476/2003 <sup>[37]</sup>. Se evaluó la selectividad, linealidad, efecto matriz, precisión, límites de detección y cuantificación, exactitud y se realizó el método de adiciones patrón para la metodología analítica propuesta con los dos detectores que se han empleado.

#### Selectividad

Para comprobar la selectividad, se aplicó el método desarrollado tanto a una muestra de cera sin adicionar como a una muestra con los 4 analitos adicionados en una concentración conocida. En la figura 4 se muestran los cromatogramas obtenidos.







**Figura 4. Cromatogramas de cera: (A) Cera sin adicionar DAD; (B) Cera adicionada DAD; (C) Cera sin adicionar FLD; (D) Cera adicionada FLD; (E) Cera sin adicionar MS-ESI; (F) Cera adicionada MS-ESI**

Como se puede observar en la figura 4 A y B el *t*-piceido y el *t*-resveratrol quedan solapados con picos de la matriz por lo que su cuantificación con este detector no es posible. Sin embargo los dos compuestos *cis* se pueden cuantificar perfectamente por DAD, En los cromatogramas C y D se observa que empleando FLD como detector ambos compuestos *trans* aparecen en regiones donde no eluye ningún pico de la matriz. Debido a esto, se justifica el uso combinado de DAD/FLD para la determinación de los cuatro compuestos y se demuestra que el método que se propone es selectivo.

En los cromatogramas E y F correspondientes a la detección por MS-ESI en modo SIM, para los dos piceidos se ha extraído el ion mayoritario con una relación  $m/z$  de 389.2 y para los dos resveratroles su ion mayoritario con una relación  $m/z$  de 227. En ninguno se observa interferencia alguna por parte de la matriz por lo que se justifica la selectividad para LC-MS.

### Línea de calibrado

Para la determinación cuantitativa de los analitos con los dos tipos de detectores, se realiza un calibrado utilizando el método de patrón externo cuantificándose en base al área de pico. El intervalo de concentraciones en el caso de la detección por DAD/FLD fue de 1.25-10 mgkg<sup>-1</sup> y mediante MS-ESI de 0.15-2.5 mgkg<sup>-1</sup>.

En la tabla 8 se reflejan las características de las líneas de calibrado obtenidas por LC-DAD/FLD y en la tabla 9 los resultados obtenidos por LC-MS.

Tabla 8. Línea de calibrado para los analitos por DAD/FLD

Compuesto	Matriz	Concentración (mgkg <sup>-1</sup> )	a	s <sub>a</sub>	b	s <sub>b</sub>	r <sup>2</sup>	s <sub>y/x</sub>
<b>t-piceido</b> <sup>a</sup>	Patrón	1.25-10	-0.517	0.163	5.145	0.028	0.9999	0.190
	Cera adicionada		-0.196	0.209	4.826	0.036	0.9999	0.243
<b>c-piceido</b> <sup>b</sup>	Patrón	1.25-10	1.304	2.754	22.922	0.478	0.9991	3.203
	Cera adicionada		3.992	0.995	16.964	0.173	0.9998	1.158
<b>t-resveratrol</b> <sup>a</sup>	Patrón	1.25-10	-1.087	0.331	11.325	0.057	0.9999	0.384
	Cera adicionada		-1.016	2.934	25.394	0.509	0.9992	3.413
<b>c-resveratrol</b> <sup>b</sup>	Patrón	1.25-10	-1.087	0.331	11.325	0.057	0.9999	0.384
	Cera adicionada		6.196	5.370	33.078	0.932	0.9984	6.246

<sup>a</sup>FLD; <sup>b</sup>DAD

Tabla 9. Línea de calibrado para los analitos por MS-ESI

Compuesto	Matriz	Concentración (mgkg <sup>-1</sup> )	a (x10 <sup>5</sup> )	s <sub>a</sub> (x10 <sup>5</sup> )	b (x10 <sup>6</sup> )	s <sub>b</sub> (x10 <sup>6</sup> )	r <sup>2</sup>	s <sub>y/x</sub> (x10 <sup>6</sup> )
<b>t-piceido</b>	Patrón	0.15-2.50	-5.765	1.679	2.852	0.130	0.998	0.248
	Cera adicionada		-2.488	1.691	1.782	0.131	0.999	0.251
<b>c-piceido</b>	Patrón	0.15-2.50	-4.591	2.285	2.261	0.177	0.997	0.337
	Cera adicionada		-1.883	0.698	1.533	0.541	0.998	0.103
<b>t-resveratrol</b>	Patrón	0.15-2.50	-7.10	5.094	10.21	0.395	0.999	0.752
	Cera adicionada		-5.729	4.873	4.648	0.377	0.998	0.721
<b>c-resveratrol</b>	Patrón	0.15-2.50	-14.37	5.048	9.493	0.391	0.997	0.746
	Cera adicionada		-11.18	6.437	5.442	0.489	0.997	0.953

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  $t_{exp} > t_{tab}$ , por lo tanto se acepta que el método es lineal y la ausencia de bias. Como se puede observar en las tablas, los valores del coeficiente de determinación ( $r^2$ ) eran para todos los casos mayores de 0.99, lo que indica la bondad del ajuste del calibrado.

### Efecto matriz

Para evaluar el efecto matriz se comparan las pendientes del calibrado de los patrones en MeOH con las de la línea de calibrado realizada en presencia de la matriz. Es de señalar el hecho de que en la memoria solo se presentan los datos obtenidos mediante la detección con MS-ESI, los cuales se muestran en la tabla 10.

**Tabla 10. Comparación de pendientes para evaluar el efecto matriz mediante MS-ESI**

Compuesto		Intervalo Pendiente	
t-piceido	MeOH	1.80E+06	2.32E+06
	Matriz	1.71E+06	2.12E+06
c-piceido	MeOH	3.34E+06	3.86E+06
	Matriz	2.88E+06	3.90E+06
t-resveratrol	MeOH	8.47E+06	1.19E+07
	Matriz	5.69E+06	8.46E+06
c-resveratrol	MeOH	5.44E+06	6.70E+06
	Matriz	5.54E+06	7.41E+06

Como se muestra en la tabla, los valores de la pendiente de cada compuesto en cera se encuentran dentro del intervalo de confianza de la pendiente ( $p=0.95$ ) de los patrones en MeOH, por lo tanto queda demostrado la ausencia de efecto matriz.

### Precisión

Para llevar a cabo el estudio de la precisión se aplica la metodología desarrollada a réplicas de cera adicionada con los cuatro 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 la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos de los coeficientes de variación (%CV) del área (A) del pico para DAD/FLD. Para la detección mediante MS-ESI los datos obtenidos se reflejan en la tabla 12.

**Tabla 11. Valores de los coeficientes de variación para la detección por DAD/FLD (n=3)**

Compuesto	Concentración (mgkg <sup>-1</sup> )	Repetibilidad (%CV)	Precisión intermedia (%CV)
t-piceido <sup>a</sup>	1.25	3.125	3.587
	2.50	2.856	1.254
	5.00	1.002	0.989
c-piceido <sup>b</sup>	1.25	2.125	4.198
	2.50	0.931	4.045
	5.00	0.249	4.301
t-resveratrol <sup>a</sup>	1.25	7.764	7.860
	2.50	7.262	7.542
	5.00	0.615	1.973
c-resveratrol <sup>b</sup>	1.25	5.932	5.671
	2.50	3.355	4.438
	5.00	1.957	7.623

<sup>a</sup>FLD; <sup>b</sup>DAD

**Tabla 12. Valores de los coeficientes de variación para la detección por MS-ESI (n=3)**

Compuesto	Concentración (mgkg <sup>-1</sup> )	Repetibilidad (%CV)	Precisión intermedia (%CV)
t-piceido	1.25	2.212	3.888
	2.50	1.820	3.137
	5.00	2.993	2.184
c-piceido	1.25	3.383	2.647
	2.50	2.795	2.529
	5.00	0.780	1.545
t-resveratrol	1.25	4.003	6.925
	2.50	4.636	3.820
	5.00	3.439	4.074
c-resveratrol	1.25	6.593	4.480
	2.50	6.519	3.812
	5.00	7.976	7.348

A la vista de los valores obtenidos se concluye que el método cumple los requisitos de precisión siendo todos ellos inferiores al 8 % admitido.

### Método de adiciones patrón (MAP)

Se realizó un método de adiciones para comprobar la correcta cuantificación de los compuestos mediante la utilización del método del patrón externo, mucho más simple, pero incapaz de detectar la presencia de interferencias debidas a la matriz, cosa que en nuestro caso no es probable ya que los valores de las pendientes de los calibrados en cera se encuentran dentro del intervalo de confianza de las pendientes de los calibrados en patrones.

Para la realización del método, y al no disponer de ceras procedentes de colmenas tratadas con resveratrol, se adiciona a 5 muestras de cera pulverizada, el mismo volumen de una solución patrón de los cuatro compuestos en concentración  $0.3 \text{ mgkg}^{-1}$ . Una vez homogeneizado y evaporado el disolvente, a una de las muestras no se le añade nada más y se trata según el método establecido, y a las cuatro muestras restantes se las adiciona concentraciones crecientes de los compuestos, para a continuación tratarlas.

A continuación se inyectan  $20 \mu\text{l}$  en el sistema cromatográfico midiéndose el área de los picos. Al representar el área para cada pico correspondiente a cada compuesto y extrapolando a cero, obtendríamos la concentración para cada analito que si no existen interferencias debiera de coincidir con la concentración que se obtendría por el método del patrón externo.

Los resultados que se obtuvieron mediante MS-ESI aparecen en la tabla 13, donde se refleja la concentración para cada compuesto para los dos métodos de cuantificación empleados.

**Tabla 13. Comparación de concentraciones obtenidas por MAP y Línea de Calibrado externo  $\text{mgkg}^{-1}$**

Compuesto	MAP/ $\text{mgkg}^{-1}$	LC / $\text{mgkg}^{-1}$
t-piceido	0.302	0.319
c-piceido	0.282	0.310
t-resveratrol	0.308	0.329
c-resveratrol	0.317	0.323

De la tabla anterior se puede deducir que los resultados que se obtienen por los dos métodos de cuantificación son comparables, por lo que se concluye que no es necesario utilizar el método de adiciones patrón para la determinación de los analitos en cera de abeja. La determinación y cuantificación puede realizarse mediante el uso de la línea de calibrado obtenida mediante el método de patrón externo.

### Límites de detección y de cuantificación

El límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) se determina de manera experimental mediante una serie de inyecciones de blancos (ceras que no tienen los compuestos de interés) midiendo el valor de la señal en los intervalos de tiempo a los que eluyen los analitos (ruido).

A continuación se inyectaron extractos de cera a los que se habían previamente adicionado los 4 analitos, realizando 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 compuestos quedan reflejados en la tabla 14.

Tabla 14. LOD y LOQ para ambos sistemas de detección

Compuesto	LC-DAD/FLD (mgkg <sup>-1</sup> )		LC-MS-ESI (µgkg <sup>-1</sup> )	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
t-piceido	0.010 <sup>a</sup>	0.034 <sup>a</sup>	2.271	7.571
c-piceido	0.202 <sup>b</sup>	0.674 <sup>b</sup>	0.146	0.486
t-resveratrol	0.502 <sup>a</sup>	1.674 <sup>a</sup>	0.532	1.772
c-resveratrol	0.645 <sup>b</sup>	2.151 <sup>b</sup>	2.173	7.244

<sup>a</sup>FLD; <sup>b</sup>DAD

Los valores para los límites obtenidos mediante la detección por DAD/FLD, como es lógico, son superiores que en el caso de la detección por MS-ESI. Sin embargo la utilización del DAD/FLD es una alternativa más económica cuando no se requiera una alta sensibilidad.

### Exactitud

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

Las concentraciones experimentales se determinaron a partir de la correspondiente línea de calibrado. En la tabla 15 se presentan los valores calculados para el sistema de detección DAD/FLD y en la tabla 16 para el MS-ESI.

Tabla 15. %RE obtenidos para la detección con DAD/FLD

Compuesto	Concentración	%Error relativo
t-piceido <sup>a</sup>	0.5	1.8
	1.1	1.5
	5.0	0.8
c-piceido <sup>b</sup>	0.5	2.8
	1.1	1.6
	5.0	0.3
t-resveratrol <sup>a</sup>	0.5	5.7
	1.1	1.9
	5.0	0.2
c-resveratrol <sup>b</sup>	0.5	4.8
	1.1	3.9
	5.0	0.9

<sup>a</sup>FLD; <sup>b</sup>DAD

Tabla 16. %RE obtenidos mediante MS-ESI

Compuesto	Concentración (mgkg <sup>-1</sup> )	%Error relativo
t-piceido	0.5	6.0
	1.1	6.8
	2.5	1.6
c-piceido	0.5	-2.0
	1.1	4.4
	2.5	5.9
t-resveratrol	0.5	5.9
	1.1	5.2
	2.5	3.2
c-resveratrol	0.5	-2.2
	1.1	5.3
	2.5	3.3

En todos los casos el % de error relativo no supera el 6 % para ninguno de los sistemas de detección por lo que se considera adecuada esta metodología.

## **V.CONCLUSIONES**

Se ha desarrollado un método para el análisis de resveratrol y piceido, ambos isómeros, en cera proveniente de panales de abeja mediante cromatografía líquida con detectores de diodos en fila, fluorescencia y espectrometría de masas (cuadropolo simple).

- La mejor separación de los cuatro analitos se consigue con una fase móvil constituida por una mezcla de formiato amónico 20 mM (pH=8) y acetonitrilo en régimen en gradiente.
- Se emplea la detección combinada de DAD/ FLD para la determinación de los cuatro compuestos, los isómeros *trans* mediante FLD y los *cis* mediante DAD. Siendo posible la evaluación de todos al utilizar detección por MS.
- Se han desarrollado dos tratamientos de la cera que permiten la extracción de los cuatro compuestos con elevadas recuperaciones, en torno al 90 %.
- El primero de los tratamientos se realiza a una temperatura de 60 °C y solubilización de la cera en hexano, seguida de una extracción líquido- líquido, empleando como extractante 30 ml de una mezcla de EtOH: H<sub>2</sub>O (80:20, v/v), agitando en caliente durante 5 minutos. La fase acuosa posteriormente se concentra a sequedad en rotavapor y el residuo seco se disuelve con 1 ml de MeOH.
- El segundo tratamiento desarrollado se realiza a temperatura ambiente y requiere un tratamiento previo de la cera consistente en obtenerla finamente pulverizada. Para la extracción de los compuestos se realiza una extracción sólido- líquido empleando el mismo volumen y extractante que en el anterior método. A continuación se somete a agitación mecánica durante 20 minutos y posteriormente se centrifuga. Se decanta el líquido, se concentra a sequedad y el residuo se disuelve con 1 ml de MeOH.
- El método que se propone como más adecuado para determinar los cuatro estilbenos en cera de abeja se valida mediante la evaluación de la selectividad, linealidad, efecto matriz, repetitividad, precisión, exactitud y se calculan los límites de detección y cuantificación.

## **VI. BIBLIOGRAFÍA**

1. J.P. Faucon, L. Mathieu, A.C. Ribi re, P. Drajnudel, S. Zeggane, C. Aurieres, M. Aubert, Honey bee winter mortality in France in 1999 and 2000. *Bee World* 83 (2002) 14–
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. 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
5. 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
6. 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
7. 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
8. G. Likhtenshtein, *Stilbenes: Applications in chemistry, life sciences and materials science.* Wiley-VCH, Germany 2009
9. 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
10. V. Filip, M. Plockov , J.  midrkal, Z.  ih kov , K. Melzoch,  . Schmidt, Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness. *Food Chem.* 83 (2003) 585–593
11. Aggarwal, Bharat B. and Shishodia, Shishir, *Resveratrol in health and disease.* CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL 2006
12. M.T. Ribeiro de Lima, P. Waffo-T guo, P.L. Teissedre, A. Pujolas, J. Vercauteren, J.C. Cabanis, J.M. M rillon, 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
13. . S.K. Lee, Z.H. Mbwambo, H.S. Chung, L. Luyengi, E.J.C. Gómez, 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
14. C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga, Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Sci.* 2 (1997) 152–159

15. 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
16. İ. Gülçin, Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 11 (2010) 210–218
17. M.E. Juan, I. Alfaras, J.M. Planas, Colorectal cancer chemoprevention by trans-resveratrol. *Pharm. Res.* 65 (2012) 584– 591
18. 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
19. 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
20. I. Nicoletti, A. De Rossi, G. Giovino, 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
21. 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
22. 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
23. P. Montoro, A. Skhirtladze, C. Bassarello, A. Perrone, E. Kemertelidze, C. Pizza, S. Piacente, Determination of phenolic compounds in *Yucca gloriosa* bark and root by LC–MS/MS. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 47 (2008) 854–859
24. 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
25. 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
26. 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

27. 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
28. 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
29. S. Bogdanov, A. Imdorf, V. Kilchenmann, Residues in wax and honey after Apilife VAR treatment. *Apidologie* 29 (1998) 513-524
30. M.E. Malacaza, N.H. Mouteira, M.C. Silva, R. y D'Alessandro, Transferencia de furazolidona de cera a miel. *Revista Argentina de Producción Animal* 27 (2) (2007) 83-89
31. J.J. Jiménez, J.L. Bernal, S. Aumente, L. Toribio, J. Bernal Jr. Quality assurance of comercial beeswax II. Gas chromatography-electron impact ionization mass spectrometry of alcohols and acids. *Journal Of Chromatography A*, 1007 (2003) 101-116
32. M. Lodesani, C. Costa, G. Serra, R. Colombo, A.G. Sabatini, Acaricide residues in beeswax after conversion to organic beekeeping methods. *Apidologie* 39 (2008) 324-333
33. S. Adamczyk, R. Lázaro, C. Pérez-Arquillué, A. Herrera, Determination of synthetic acaricides residues in beeswax by high-performance liquid chromatography with photodiode array detector. *Analytica Chimica Acta* 581 (2007) 95-101
34. London, England. The European Agency for the Evaluation of Medical Products (EMA). Veterinary International Conference on Harmonization, Topic GL1: Guideline on validation of analytical procedures: definitions and terminology. 10 December 1998
35. London, England. The European Agency for the Evaluation of Medical Products (EMA). Veterinary International Conference on Harmonization, Topic GL2: Guideline on validation of analytical procedures: methodology. 10 December 1998
36. 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
37. Brussels, Belgium. European Commission. Directorate General for Health and Consumer Affairs, Quality control procedures for pesticide residues analysis (Document No. SANCO/10476/2003). 5 February 2004

