

Desarrollo de un método de extracción por la técnica de MEPS para polifenoles en miel.

Cobos Cervantes Paola¹, Armijo Martínez Samantha¹, Cavazos Rocha Norma¹, Paniagua Vega David¹ y Portillo Castillo Omar J.^{1,*}

¹ Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina, Departamento de Química Analítica, Av. Francisco I. Madero y Dr. Eduardo Aguirre Pequeño s/n, Col. Mitras Centro, C.P. 64460, Monterrey, Nuevo León; México.

*oportillo.me0207@uanl.edu.mx.

RESUMEN

Se desarrolló y validó un método mediante la técnica de microextracción con sorbente empacado (MEPS) para la extracción de polifenoles en miel y su análisis mediante cromatografía de líquidos de alta resolución. El cartucho C18 resultó ser el más adecuado para la extracción simultánea de un mayor número de polifenoles, tales como ácido protocatechuico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido *trans*-ferúlico, ácido rosmarínico, quercetina, luteolina, apigenina y kaempferol. Para la optimización del volumen y tipo de disolvente en el paso de elución, se trabajó con un diseño de experimentos mediante el modelo D-Optimal, siendo 50 µL de metanol al 100 % la condición adecuada para la recuperación de los analitos. Bajo las condiciones seleccionadas como óptimas, el método resultó ser lineal, preciso y exacto con límites de detección y cuantificación de 0.039 hasta 0.071 µg/mL y de 0.131 hasta 0.238 µg/mL respectivamente. La aplicación del método se llevó a cabo mediante el análisis de una muestra de miel, el cual resultó ser preciso, encontrando factores de enriquecimiento de 2.64 y 2.86 para kaempferol y apigenina, respectivamente.

Palabras clave: Miel, polifenoles, miel, MEPS, sorbente, optimización.

ABSTRACT

A method was developed and validated using the microextraction with packed sorbent (MEPS) technique for the extraction of polyphenols in honey and their analysis by high performance liquid chromatography. The C18 cartridge turned out to be the most suitable for the simultaneous extraction of a greater number of polyphenols, such as protocatechuic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, *trans*-ferulic acid, rosmarinic acid, quercetin, luteolin, apigenin and kaempferol. To optimize the volume and type of solvent in the elution step, a design of experiments was used using the D-Optimal model, with 50 µL of 100% methanol being the appropriate condition for recovering the analytes. Under the conditions selected as optimal, the method turned out to be linear, precise and accurate with detection and quantification limits of 0.039 to 0.071 µg/mL and 0.131 to 0.238 µg/mL, respectively. The application of the method was carried out through the analysis of a honey sample, which turned out to be accurate, finding enrichment factors of 2.64 and 2.86 for kaempferol and apigenin, respectively.

Key words: Honey, polyphenols, MEPS, sorbent, optimization

INTRODUCCIÓN

La miel es un alimento elaborado por las abejas para que estas puedan sobrevivir durante el invierno, ya que provee la energía y los nutrientes necesarios para ellas. (Lynne Chepulis, 2008). Es una mezcla altamente concentrada de azúcares, aunque también contiene enzimas, vitaminas, aminoácidos, antioxidantes naturales y compuestos aromáticos (Alqarni et al., 2014). Se cree que el polen de las plantas y las condiciones climáticas tienen el mayor efecto sobre las propiedades y la composición fitoquímica de la miel (Khalil et al., 2011). Este alimento es rico en polifenoles (antioxidantes naturales) (Alqarni et al., 2014), los cuales son un grupo químicamente heterogéneo de compuestos provenientes del metabolismo secundario de las plantas.

Los polifenoles se agrupan en diferentes clases según su estructura química básica, pudiéndose dividir en ácidos fenólicos y flavonoides, y se les han atribuido diversas actividades biológicas (Wilfred Vermerris & Ralph Nicholson, 2009). Actualmente, la miel es considerada un alimento nutraceutico, ya que se ha evidenciado que el consumo a largo plazo de alimentos ricos en polifenoles puede prevenir y ofrecer protección frente al desarrollo de enfermedades como cáncer, diabetes, osteoporosis, etc. (Cardona et al., 2013; Gašić et al., 2017; Khurana et al., 2013; Rasouli et al., 2017). Por otra parte, la identificación de compuestos polifenólicos individuales, así como el perfil polifenólico completo, puede ayudar a diferenciar mieles de diferentes orígenes botánicos y geográficos; además los datos obtenidos de estos análisis pueden servir como un parámetro para el control de calidad de la miel (Gašić et al., 2017). Sin embargo, el aislamiento de estos compuestos, debido a la complejidad de esta matriz de muestra es un paso crítico. Debido a lo anterior, se utilizan técnicas de preparación de muestra para su análisis, las más comúnmente empleadas son la extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida (Pascual-Maté et al., 2018).

En la actualidad, existe una tendencia global al uso de técnicas de microextracción, las cuales se definen como técnicas de extracción donde la cantidad de fase extractante es muy pequeña en relación a la cantidad de muestra utilizada, además la extracción de los analitos no es exhaustiva (Lord & Pawliszyn, 2000). Dentro de estas técnicas podemos mencionar a la microextracción con sorbente empacado (MEPS), siendo una forma miniaturizada de la técnica de extracción en fase sólida (SPE), la cual se ha aplicado al análisis de una gran diversidad de analitos en una amplia diversidad de muestras (Abdel-Rehim, 2004). El diseño típico de la MEPS es en formato de jeringa de vidrio, en donde el sorbente se acomoda en un pequeño recipiente situado en el cilindro de la jeringa (Abdel-Rehim, 2010). La ventaja más importante es el pequeño volumen de disolvente y cantidad de sorbente utilizado, por lo tanto, es considerada como una técnica respetuosa con el medio ambiente. Los sorbentes pueden utilizarse muchas veces, por lo que el costo es mucho menor que con otras técnicas. El procedimiento de MEPS consta de cuatro pasos (acondicionamiento, carga de la muestra, lavado y elución), es un proceso rápido y sencillo. Hoy en día puede llevarse a cabo de forma manual, semiautomatizada y completamente automatizada. En este trabajo se utilizará un sistema semiautomático de MEPS, el cual proporciona mejoras en el flujo de trabajo, ahorro de recursos y una programación personalizada donde se controla la velocidad y el volumen de cada paso de la extracción (Mendes et al., 2013).

Hasta nuestro conocimiento, no existen reportes en la literatura del uso de MEPS en extracción de polifenoles en miel, sin embargo, se ha utilizado para la determinación de polifenoles en otras matrices, por ejemplo, en un estudio analizaron dieciséis polifenoles en vinos (Gonçalves et al., 2012) y en otro analizaron diez ácidos fenólicos en la misma matriz (Gonçalves et al., 2013); en ambos trabajos el sorbente C8 fue el óptimo para la extracción de dichos compuestos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue desarrollar un método para la extracción de polifenoles en miel mediante la técnica de MEPS y evaluar la aplicabilidad del procedimiento previamente desarrollado en muestra reales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Como sorbentes de extracción se evaluaron cinco cartuchos con distintas características y modos de separación, los cuales fueron el C18, M1, DVB, APS y SIL, todos con diámetro de partícula de 45 μm , superficie de 500 m^2/g y aproximadamente 4 mg de empaque, todos fueron adquiridos de SGE Analytical Science. Las extracciones se realizaron mediante un sistema semiautomático de jeringa analítica MEPS eVol[®] de SGE Analytical Science. Para el análisis cromatográfico se utilizó un cromatógrafo de líquidos Waters 2695 con detector de arreglo de diodos y un HP-1100 con detector UV de longitud de onda variable. Ambos equipos cuentan con bomba cuaternaria, desgasificador en línea, automuestreador y horno de columna. El análisis se llevó a cabo en una columna Hypersil GOLD PFP (2.1 x 150 mm, 3 μm) de Thermo Fisher Scientific.

Reactivos

Los estándares de los polifenoles seleccionados como analito diana para la extracción por MEPS fueron ácido gálico (97.5-102.5%), Hidrato de (+)-catequina ($\geq 98\%$), ácido cafeico ($\geq 98\%$), galato de epigallocatequina ($\geq 80\%$), ácido *p*-cumárico ($\geq 98\%$), miricetina ($\geq 96\%$), ácido trans-ferúlico ($\geq 99\%$), ácido rosmarínico ($\geq 98\%$), ácido elágico ($\geq 95\%$), quercetina ($\geq 95\%$), luteolina ($\geq 98\%$), kaempferol ($\geq 97\%$) y apigenina ($\geq 95\%$), todos de Sigma Aldrich, mientras que el ácido protocatechuico (99.8%) fue de HWI pharma services GmbH. Para las fases móviles se utilizó ácido fórmico (98-199 %) de Merck, metanol grado HPLC de J.T Baker y agua desionizada, la cual se obtuvo a través de un sistema de filtración Elga Veolia II. Las fases móviles fueron filtradas al vacío y sonicadas en un baño de ultrasonido para su desgasificación.

Optimización del procedimiento de MEPS

Para la selección del sorbente fueron preparadas soluciones madre de todos los polifenoles individuales a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en metanol, se guardaron en oscuridad a 4 °C hasta su uso. Las soluciones de trabajo se prepararon a partir de las soluciones madre, fueron estándares acuosos a 0.2 y 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los polifenoles en mezcla. Las condiciones de partida para la extracción fueron las siguientes: acondicionamiento del cartucho con 100 μL de metanol seguido de 100 μL de ácido fórmico al 0.1% (un ciclo cada uno), el volumen de la muestra fue de 250 μL a un pH de 2 (10 ciclos), la elución fue con 100 μL de ácido fórmico al 0.1 % y metanol a una proporción 95:5 durante un ciclo, la velocidad se estableció a 20 $\mu\text{L}/\text{s}$ para todos los pasos de la extracción y el secado se realizó entre cada paso, estas condiciones fueron seleccionadas en base a reportes de la literatura (Casado et al., 2019). Para el análisis cromatográfico se utilizó un método previamente establecido dentro del grupo de trabajo, las condiciones se muestran en la Tabla I. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y para evaluarla la precisión de las extracciones se calculó la desviación estándar relativa de las respuestas de las señales obtenidas.

Para la optimización de la elución se construyó un diseño de experimentos mediante el programa MODDE 12 en el modo D-Optimal. Las variables que se optimizaron fueron el porcentaje (50% y 100%) y el volumen de metanol (50 y 100 μL), el set de experimentos resultantes se muestra en la Tabla II. Las condiciones de extracción fueron las mismas que se utilizaron en la selección del sorbente, solo que se agregó un paso de lavado con ácido fórmico al 0.1% antes de la elución. Todos los extractos resultantes fueron analizados a través del método cromatográfico antes mencionado y se trabajó con la suma de áreas de todos los picos cromatográficos.

Tabla I. Condiciones cromatográficas para la determinación de polifenoles.

Fase móvil	A: ácido fórmico 0.15% y B: metanol		
Gradiente	Tiempo	Fase A	Fase A
	0	90	10
	5	90	10
	40	10	90
	45	10	90
	50	90	10
	65	90	10
Flujo	0.2 mL/min		
Temperatura de columna	35° C		
Volumen de inyección	5 µL		
Longitud de onda de monitoreo	260 nm		

Tabla II. Diseño de experimentos para la optimización de la elución.

Número de experimento	Nombre del experimento	Orden de corrida	Porcentaje de Metanol	Volumen de elución (µL)
1	N1	2	50	50
2	N2	14	100	50
3	N3	6	50	100
4	N4	1	100	100
5	N5	3	50	60
6	N6	4	50	80
7	N7	10	100	60
8	N8	8	60	50
9	N9	13	80	50
10	N10	11	60	100
11	N11	7	70	70
12	N12	9	70	70
13	N13	5	70	70
14	N14	12	70	70

Validación del sistema cromatográfico.

Se construyó una curva de calibración por estándar externo a 6 niveles de concentración (0.25, 0.5, 1, 2, 4 y 10 µg/mL) por triplicado para todos los analitos extraídos. Se realizó una regresión lineal por el método de mínimos cuadrados para obtener la ecuación de la recta y observar la relación de linealidad mediante el coeficiente de determinación ($r^2 \geq 0.99$). La precisión se evaluó con el porcentaje de desviación estándar relativa (%DER) de las respuestas de los estándares de calibración en todos los niveles de concentración. Por otro lado, la exactitud se evaluó mediante la correlación entre la concentración calculada para los estándares de calibración y su concentración real. Se realizó un análisis de regresión por mínimos cuadrados y se analizaron los valores de la pendiente y el coeficiente de determinación de las curvas de regresión, considerando como criterios de aceptación valores de $m \approx 1$ y $r^2 \geq 0.99$ (Swartz y Krul, 2005; Burke, 2001). Los límites de detección y

cuantificación se determinaron utilizando los cromatogramas de los estándares del nivel más bajo de la curva de calibración y se calculó 3 y 10 veces la relación de la señal-ruido para el límite de detección y de cuantificación, respectivamente.

Evaluación del del método desarrollado.

Se analizaron muestras sin adición y con adición de los polifenoles, la muestra fue miel de flor de aguacate del estado de Michoacán en México. Las muestras adicionadas, fueron enriquecidas con una mezcla de los polifenoles a una concentración de 3 $\mu\text{g/mL}$. Después se realizó la extracción por triplicado con MEPS bajo las condiciones seleccionadas como óptimas y los extractos fueron analizados en el cromatógrafo de líquidos Agilent 1100. Se evaluó la precisión de las extracciones calculando el %DER de las concentraciones y de los tiempos de retención (t_R) de cada analito. También se evaluó el factor de enriquecimiento (FE) para la evaluación del desempeño de la extracción por MEPS (Jafari et al., 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Optimización del procedimiento de MEPS

Los polifenoles que se analizaron fueron seleccionados en base a los polifenoles comúnmente encontrados en miel. Por otra parte, seleccionar el sorbente apropiado para la extracción por MEPS es un paso importante para poder obtener una buena limpieza de la muestra y un adecuado rendimiento de extracción (Gonçalves et al., 2012). Se evaluaron diferentes tipos de sorbentes con distinto modo o principio de separación o extracción, debido a la gran diversidad estructural y la gran variedad de propiedades físicas y químicas de los polifenoles seleccionados como analitos diana en el presente trabajo. Cuando se trabajó con el estándar de 0.02 $\mu\text{g/mL}$ solo el cartucho de C18 presentó capacidad de extraer polifenoles, los otros cartuchos no extrajeron ningún compuesto. Por lo que se decidió aumentar la concentración del estándar utilizado (0.2 $\mu\text{g/mL}$) para evaluar si este efecto se debía a la baja concentración del estándar empleado. Cuando se trabajó con el estándar de mayor concentración, se observó que con todos los cartuchos se podía extraer al menos un compuesto. Sin embargo, los cartuchos C18 y el M1 extrajeron un mayor número de polifenoles compuestos, como puede verse en la Figura 1. Los polifenoles extraídos con ambos sorbentes fueron los mismos: ácido protocatechuico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido *trans*-ferúlico, ácido rosmarínico, quercetina, luteolina, apigenina y kaempferol. Con el cartucho APS se extrajeron seis polifenoles, los cuales fueron el ácido protocatechuico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido *trans*-ferúlico, ácido rosmarínico y apigenina. Mientras que con el cartucho SIL, solo se extrajo la apigenina.

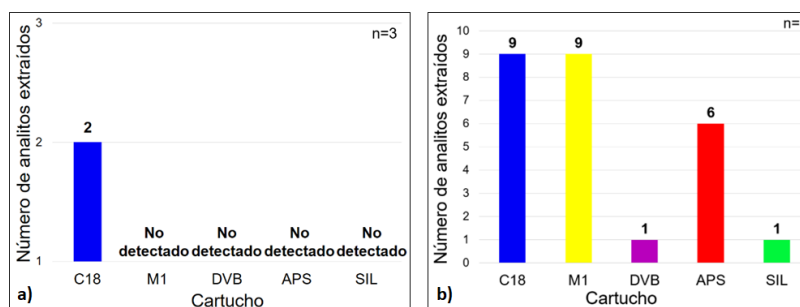


Figura 1. Comparación del número de analitos extraídos utilizando diferentes cartuchos de MEPS a partir de a) un estándar de 0.02 $\mu\text{g/mL}$ y b) un estándar de 0.2 $\mu\text{g/mL}$ de los polifenoles estudiados.

Considerando que las moléculas de los analitos se encuentran no ionizados gracias al pH del medio y a los valores de pKa de estos; tendrán una polaridad baja y por lo tanto una afinidad por algo parecido a ellos (Gonçalves et al., 2013). Debido a esto fue que los sorbentes que presentan modo de separación de fase inversa (C18 y M1), fueron los que mostraron mayor capacidad de extracción para los

polifenoles. (Pereira et al., 2013). De los resultados obtenidos se evaluó la precisión mediante el cálculo del %DER de las áreas de los picos cromatográficos obtenidos. La evaluación fue de acuerdo con la AOAC, ya que indica como aceptable un valor de %DER menor al 15 %. Los resultados obtenidos con el estándar de menor concentración no cumplieron con este criterio. En el caso del estándar de 0.2 µg/mL, con el cartucho C18 la mayoría de los %DER obtenidos fueron aceptables, como puede verse en la Tabla III. Con el cartucho M1 cinco de los analitos extraídos (ácido protocatechuico, ácido *p*-cumárico, ácido *trans*-ferúlico, apigenina y kaempferol) presentaron %DER superiores al 15 %. Por lo tanto, el cartucho C18 se consideró el más adecuado para la extracción de polifenoles, puesto que, fue el único que pudo extraer los compuestos del estándar de menor concentración, en el de mayor concentración fue uno de los sorbentes con mayor número de señales y la mayoría de los %DER de las áreas obtenidas fueron aceptables. A pesar de lo anterior no se extrajo ácido gálico y elálgico, hidrato de catequina, galato de epigalocatequina y miricetina con ningún sorbente, lo cual puede deberse a que las condiciones de extracción seleccionadas no eran las óptimas o que los compuestos o sorbentes no muestran afinidad entre ellos.

Tabla III. Precisión de las extracciones con los distintos sorbentes utilizando un estándar de 0.2 µg/mL.

Compuesto	Sorbente				
	C18	M1	DVB	APS	SIL
Ácido gálico	-	-	-	-	-
Ácido protocatechuico	20.47	25.12	9.60	26.41	-
Hidrato de catequina	-	-	-	-	-
Ácido cafeico	8.88	14.84	-	21.53	-
Epigalocatequina galato	-	-	-	-	-
Ácido <i>p</i> -cumárico	6.83	15.43	-	8.02	-
Miricetina	-	-	-	-	-
Ácido <i>trans</i> -ferúlico	4.01	20.56	-	8.41	-
Ácido rosmarínico	9.97	14.86	-	28.77	-
Ácido elálgico	-	-	-	-	-
Quercetina	3.91	14.43	-	-	-
Luteolina	8.88	3.00	-	-	-
Kaempferol	8.86	18.11	-	-	-
Apigenina	1.71	16.08	-	17.00	25.74

Para optimizar el paso de elución, primero se realizó un modelo de predicción a partir de las condiciones iniciales de extracción. Esto se realizó para evaluar si los analitos de los cuales no se observó señal (no extraídos) se debía a que no se recuperaban por efecto del disolvente de elución. El análisis de los factores mediante el diagrama de superficie indicó que el único factor significativo, bajo las condiciones experimentales evaluadas, era el porcentaje de metanol en el disolvente de elución y que, a mayor porcentaje de metanol, mayor es el área de los picos cromatográficos obtenidos como puede verse en la Fig. 4a. A partir de los resultados obtenidos se construyeron los gráficos de coeficiente, los cuales estadísticamente mostraron la relevancia de cada factor evaluado. Como puede verse en la Fig. 4b, a un mayor porcentaje de metanol se obtendría mayor área de los picos cromatográficos de los polifenoles, mientras que los demás factores, así como sus interacciones no fueron significativos. Se decidió seleccionar un volumen de elución óptimo de 50 µL, para poder tener capacidad de concentración y no diluir la muestra por efecto del volumen. Aún bajo estas

condiciones, no pudieron extraerse el ácido gálico, hidrato de catequina, galato de epigallocatequina, miricetina y ácido elálgico, probablemente estos compuestos no muestren afinidad hacia el sorbente seleccionado. En la Tabla IV se resumen las condiciones de extracción seleccionadas como óptimas para la extracción de polifenoles.

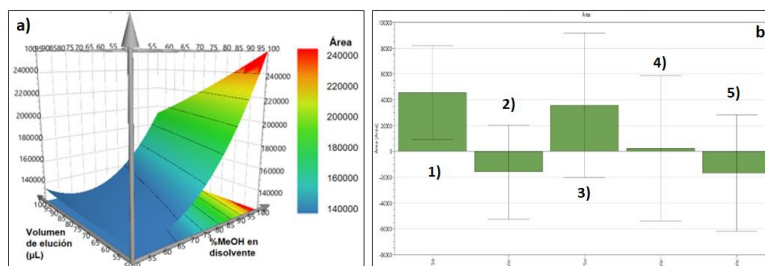


Figura 4. a) Diagrama de superficie de interacciones de las variables en el diseño de experimentos y b) Gráficos de coeficiente para el efecto estandarizado de los factores evaluados. 1) Porcentaje de metanol, 2) Volumen de elución, 3) Interacción entre el porcentaje de metanol y el mismo, 4) Interacción entre el volumen de elución y el mismo y 5) Interacción entre el volumen de elución y el porcentaje de metanol.

Tabla IV. Condiciones óptimas para la extracción de polifenoles con MEPS

Factor		Valor
Sorbente		C18
Acondicionamiento		100 µL de metanol (un ciclo) 100 µL H ₂ O con ácido fórmico al 0.1% (un ciclo)
Volumen de la muestra		250 µL
pH		2
Ciclos de la muestra		10
Lavado		100 µL ácido fórmico al 0.1% (un ciclo)
Elución	Volumen	50 µL
	Porcentaje de metanol	100% de metanol
Velocidad		20 µL/s para cada paso de la extracción
Secado		Entre cada paso

Validación del sistema cromatográfico

La validación del sistema cromatográfico se llevó a cabo el cromatógrafo HP-1100, el cual tiene un detector UV de longitud de onda variables, el monitoreo de todos los analitos se hizo a 260 nm. En cuanto a la quercetina, no fue posible detectar los primeros dos niveles de la curva de calibración, debido a la baja absorptividad molar que presenta esta molécula a la longitud de detección, por lo que fue descartada de los análisis posteriores. La validación fue de acuerdo con la guía de la AOAC. Para todos los analitos el método fue lineal ya que se obtuvieron coeficientes de determinación mayores a 0.995. En todos los casos los porcentajes de desviación estándar relativa de las respuestas y de los tiempos de retención fueron menores al 15 %, por lo que el método es preciso. El método también fue exacto ya que, en el análisis de regresión de las concentraciones calculadas de los estándares vs. las concentraciones reales, se obtuvieron valores de pendiente igual a 1 y r^2 superiores a 0.995. Mientras que los límites de detección y de cuantificación de este método van desde 0.039 hasta 0.071

µg/mL y de 0.131 hasta 0.238 µg/mL respectivamente. Un resumen de los resultados se muestra en la Tabla V.

Tabla V. Validación del sistema cromatográfico para el análisis de polifenoles.

Analito	Linealidad		Precisión		Exactitud	LD (µg/mL)	LC (µg/mL)
	Ecuación de regresión	r ²	% DER de respuestas	% DER de t _R			
Ácido protocatechuico	y = 85.1867x + 7.9503	0.997	0.36 - 14.22	0.21 - 1.65	m=1 r ² = 0.997	0.068	0.227
Ácido cafeico	y = 33.8231x + 0.1703	0.999	0.90 - 4.15	0.08 - 0.32	m=1 r ² = 0.999	0.067	0.224
Ácido p-cumárico	y = 46.5776x - 6.2295	0.998	0.20 - 3.96	0.08 - 0.23	m=1 r ² = 0.998	0.062	0.208
Ácido trans-ferúlico	y = 36.8683x - 5.5130	0.995	0.30 - 6.71	0.06 - 0.19	m=1 r ² = 0.995	0.063	0.208
Ácido rosmarínico	y = 25.1819x - 0.6729	0.997	1.16 - 10.14	0.06 - 0.13	m=1 r ² = 0.997	0.071	0.238
Luteolina	y = 81.5624x - 5.5736	0.997	1.61 - 9.52	0.05 - 0.34	m=1 r ² = 0.997	0.041	0.138
Kaempferol	y = 142.6849x + 9.8472	0.997	0.06 - 14.16	0.05 - 0.08	m=1 r ² = 0.997	0.047	0.158
Apigenina	y = 153.4256x - 7.5848	0.999	0.44 - 2.57	0.05 - 1.32	m=1 r ² = 0.999	0.039	0.131

Evaluación del método desarrollado

Se analizaron muestras de miel sin adicionar y con adición de polifenoles a 3 µg/mL, todos los análisis fueron por triplicado. La muestra de miel se seleccionó debido a la disponibilidad de la muestra en el laboratorio. Dicha muestra proviene de flor de aguacate (es unifloral) y es del estado de Michoacan, México. En el análisis de las extracciones de las muestras de miel sin adicionar (Fig. 5 inciso 1) se observaron señales correspondientes a los ácidos protocatechuico, cafeico, p-cumárico, rosmarínico, trans-ferúlico y la luteolina. En base a lo anterior se procedió a evaluar solo la eficiencia de extracción de los analitos no encontrados en las muestras (kaempferol y apigenina), ya que los otros mediante el método de cuantificación por estándar externo, no es posible realizar una correcta cuantificación. Para los compuestos no encontrados en las muestras de miel, se evaluó la precisión de la concentración encontrada después de la adición, la cual fue de 7.23 µg/mL para kaempferol y de 8.49 µg/mL para apigenina, mostrando %DER de 5.01 y de 4.47 para el kaempferol y apigenina, respectivamente. También se evaluó la precisión de los tiempos de retención y se obtuvieron %DER de 0.38 para el kaempferol y de 1.26, para la apigenina. Ambos criterios cumplen con lo establecido en la AOAC. Por otra parte, es importante mencionar que el procedimiento presentó la capacidad de concentrar a ambos analitos, obteniendo factores de enriquecimiento de 2.64 para kaempferol y de 2.86 para apigenina. Esto es un buen resultado, ya que la preconcentración es uno de los objetivos de las técnicas de preparación de muestra. En la Fig. 5 se muestran unos cromatogramas representativos obtenidos a partir de la extracción de una muestra de miel sin adicionar y con adición de polifenoles.

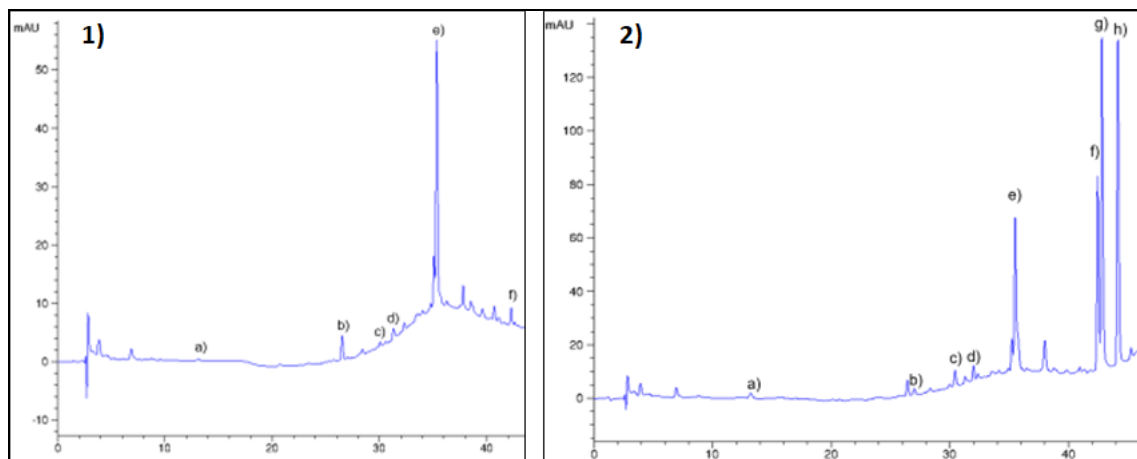


Figura 5. 1) Cromatograma obtenido de la extracción de una muestra de miel sin adición de polifenoles y 2) Cromatograma obtenido de la extracción de una muestra de miel adicionada a 3 $\mu\text{g/mL}$ de polifenoles. Polifenoles: a) ácido protocatecuico, b) ácido cafeico, c) ácido *p*-cumárico, d) ácido *trans*-ferúlico e) ácido rosmarínico, f) luteolina, g) kaempferol y h) apigenina.

CONCLUSIONES

Se desarrolló un método rápido, sencillo y semiautomatizado para el análisis simultáneo de polifenoles en miel mediante la técnica de MEPS. El cartucho C18 mostró ser el más adecuado para la extracción de un mayor número de compuestos, tales como los ácidos protocatecuico, cafeico, *p*-cumárico, *trans*-ferúlico y rosmarínico, así como también para quercetina, luteolina, apigenina y kaempferol. El método cromatográfico previamente establecido resultó ser lineal, preciso y exacto, con límites de detección y cuantificación de 0.039 hasta 0.071 $\mu\text{g/mL}$ y de 0.131 hasta 0.238 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Se aplicó el método desarrollado para la extracción de polifenoles a una muestra de miel resultando ser preciso y con capacidad de concentrar a apigenina y kaempferol.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Rehim, M. (2004). New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications. *Journal of Chromatography B*, 801(2). <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.11.042>
- Abdel-Rehim, M. (2010). Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis. *Journal of Chromatography A*, 1217(16). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.053>
- Alqarni, A. S., Owayss, A. A., Mahmoud, A. A., & Hannan, M. A. (2014). Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. *Journal of Saudi Chemical Society*, 18(5). <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2012.11.009>
- Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F. J., & Queipo-Ortuño, M. I. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(8). <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.05.001>
- Casado, N., Perestrelo, R., Silva, C. L., Sierra, I., & Câmara, J. S. (2019). Comparison of high-throughput microextraction techniques, MEPS and μ -SPEed, for the determination of polyphenols in baby food by ultrahigh pressure liquid chromatography. *Food Chemistry*, 292. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.038>
- Gašić, U. M., Milojković-Opsenica, D. M., & Tešić, Ž. L. (2017). Polyphenols as Possible Markers of Botanical Origin of Honey. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 100(4). <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0144>
- Gonçalves, J., Mendes, B., Silva, C. L., & Câmara, J. S. (2012). Development of a novel microextraction by packed sorbent-based approach followed by ultrahigh pressure liquid

- chromatography as a powerful technique for quantification phenolic constituents of biological interest in wines. *Journal of Chromatography A*, 1229. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.01.023>
- Gonçalves, J., Silva, C. L., Castilho, P. C., & Câmara, J. S. (2013). An attractive, sensitive and high-throughput strategy based on microextraction by packed sorbent followed by UHPLC-PDA analysis for quantification of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in wines. *Microchemical Journal*, 106. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.05.037>
- Jafari, M. T., Saraji, M., & Yousefi, S. (2012). Negative electrospray ionization ion mobility spectrometry combined with microextraction in packed syringe for direct analysis of phenoxyacid herbicides in environmental waters. *Journal of Chromatography A*, 1249, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.06.024>
- Khalil, M. I., Alam, N., Moniruzzaman, M., Sulaiman, S. A., & Gan, S. H. (2011). Phenolic Acid Composition and Antioxidant Properties of Malaysian Honeys. *Journal of Food Science*, 76(6). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02282.x>
- Khurana, S., Venkataraman, K., Hollingsworth, A., Piche, M., & Tai, T. (2013). Polyphenols: Benefits to the Cardiovascular System in Health and in Aging. *Nutrients*, 5(10). <https://doi.org/10.3390/nu5103779>
- Lord, H., & Pawliszyn, J. (2000). Microextraction of drugs. *Journal of Chromatography A*, 902(1). [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00836-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00836-0)
- Lynne Chepulis. (2008). *Healing Honey: A Natural Remedy for Better Health and Wellness* (BrownWalter Press (ed.)).
- Mendes, B., Silva, P., Mendonça, I., Pereira, J., & Câmara, J. S. (2013). A new and fast methodology to assess oxidative damage in cardiovascular diseases risk development through eVol-MEPS–UHPLC analysis of four urinary biomarkers. *Talanta*, 116. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.04.064>
- Moein, M. M., Abdel-Rehim, A., & Abdel-Rehim, M. (2015). Microextraction by packed sorbent (MEPS). *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 67. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.12.003>
- Pascual-Maté, A., Osés, S. M., Fernández-Muiño, M. A., & Sancho, M. T. (2018). Analysis of Polyphenols in Honey: Extraction, Separation and Quantification Procedures. *Separation & Purification Reviews*, 47(2). <https://doi.org/10.1080/15422119.2017.1354025>
- Pereira, J., Gonçalves, J., Alves, V., & Câmara, J. S. (2013). Microextraction using packed sorbent as an effective and high-throughput sample extraction technique: Recent applications and future trends. *Sample Preparation*, 1. <https://doi.org/10.2478/sampre-2013-0005>
- Rasouli, H., Farzaei, M. H., & Khodarahmi, R. (2017). Polyphenols and their benefits: A review. *International Journal of Food Properties*. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1354017>
- SGE Analytical Science. (n.d.). *MEPS™ – Fast Miniaturized SPE*. SGE Analytical Science. Retrieved October 7, 2021, from https://chromatec.ru/downloads/BR-0439-M_eVol MEPS.pdf
- Wilfred Vermerris, & Ralph Nicholson. (2009). *Phenolic Compound Biochemistry* (Springer Science (ed.)).