

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CC. QUÍMICAS



**DESARROLLO DE TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA
LÁSER Y SU APLICACIÓN AL ANÁLISIS QUÍMICO DE
ALIMENTOS**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR Carlos Montero Catalina**

Bajo la dirección de los Doctores:
José María Orea Rocha
Ángel González Ureña

Madrid, 2001

ISBN: 84-669-1834-5

CARLOS MONTERO CATALINA

**DESARROLLO DE TÉCNICAS
DE ESPECTROSCOPIA LÁSER
Y SU APLICACIÓN AL ANÁLISIS QUÍMICO
DE ALIMENTOS**

TESIS DOCTORAL

Directores:

ANGEL GONZÁLEZ UREÑA
JOSE MARÍA OREA ROCHA

Instituto Pluridisciplinar
Unidad de Láseres y Haces Moleculares
Universidad Complutense de Madrid

*A mis Padres, Hermanos
y Ana*

Agradecimientos

Quiero dar las gracias a todas las personas que me han hecho posible la realización de esta tesis:

En primer lugar quiero agradecer a mi Director el Prof. Dr. Ángel González Ureña el haber sembrado en mí, al igual que en el resto de sus alumnos, una inquietud por el mundo de la investigación, abriéndome las puertas de este Instituto y brindándome de manera incondicional, un apoyo humano, científico y económico, imprescindibles para la realización de esta tesis.

A mi otro Director, el Dr. José María Orea Rocha, agradezco las incontables horas de dedicación a la dirección de esta tesis, su disponibilidad constante en el plano científico y su apoyo también incondicional en lo personal, sin el cual, nunca hubiera acabado esta tesis.

A ambos Directores, por quienes siento gran admiración y respeto, debo agradecer el gran esfuerzo que han realizado a lo largo de los últimos 4 años para forjar en mí un carácter científico e investigador, y que espero algún día vean recompensado.

Debo del mismo modo agradecer al Prof. Dr. Luis María Polo Díez el aceptar ser mi tutor en esta tesis, así como los conocimientos que a través de sus clases he adquirido en el campo de la química analítica.

Agradezco a mi compañero Jorge Jiménez toda la ayuda que tan generosamente me ha brindado a lo largo del último año de esta tesis, por compartir conmigo tantas horas de experimentos, de ciencia y de humanidad.

A los profesores, doctores y doctorandos de la Unidad de Láseres y Haces Moleculares: Taieb Gasmi, Jorge Cáceres, Jesús Tornero, Khaled Gasmi, Stefan Skowronek, Belén Bescós, Cristina González, Miguel de Castro y Luis Miguel

Agradecimientos

Gamo agradezco su disponibilidad para resolver cualquier duda en lo científico y su disponibilidad también para compartir sus experiencias conmigo y con el resto de esta unidad investigadora.

Quiero agradecer a Asunción García su trabajo en lo profesional, y sobre todo su esfuerzo diario por conseguir que esta Unidad de Láseres y Haces Moleculares sea además de unidad investigadora, un grupo de “personas” en el que todos podamos apoyarnos.

A D. Segundo García agradezco sus buenos consejos en el diseño y su maestría en la realización de los trabajos del taller mecánico que han sido necesarios para la realizar esta tesis. Igualmente en lo personal le agradezco siempre su buena disposición y la amistad que me ha brindado a lo largo de estos años.

Al personal de Administración del Instituto, M^a José, Pilar, Germán, Lidia, Nines, Manuela, Manolo, Mar, Carmen, Carlos, etc., y al resto de amigos y compañeros de otras unidades investigadoras agradezco su buena disposición para resolver cualquier trámite durante mi periodo como doctorando en este Instituto.

A mis amigos y compañeros de Cruz Roja, Jose Ramón Delgado, Teresa Fernandez, M^a Luisa Ingargiola, Javier García, Raul Muñoz, Vanesa Losa, Ofelia García y tantos otros que han sido grandes compañeros, grandes amigos, y que han sabido siempre hacerme ver el lado humano de las cosas.

Dentro de los buenos y grandes amigos que he encontrado en Cruz Roja quiero agradecer al Dr. D. Carlos Payá Riera, por quien siento gran admiración en lo personal y lo profesional, sus sabios consejos que me animaron a realizar este doctorado.

Agradecimientos

A mis amigos Manuel, Laura, Chelo, Elisa, Belén, Jesús G, Cristina, Gema, Belén, Yolanda, Marita, Noelia, Jose Antonio, Pili, Nines, Fernando, Mónica, Carlos, Jesús y María agradezco su apoyo incondicional en los malos momentos, por lo que se han convertido en auténticos merecedores de mi respeto y amistad.

A Ana por haber sido y ser la persona con quien deseo compartir todos mis logros, penas y sobre todo alegrías, y por su amor sin límites.

A mis sobrinos Guillermo y Paula, por ser una de las mayores alegrías de mi vida, y a los que espero servir de apoyo en su crecimiento.

A mis padres Antonio y Ascensión, y a mis hermanos Toño, Maite, Angel Manuel, Jose Ignacio y Susana por haberme educado, apoyado y amado como nadie más lo ha hecho a lo largo de toda mi vida, por eso y desde lo más profundo de mi ser, gracias.

Agradezco la financiación aportada para el desarrollo de esta tesis a la Unión Europea (CT98-4211) y al Ministerio de Ciencia y Tecnología (PB97-0272).

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Justificación y objetivos de este trabajo.....	2
1.2. Antecedentes Bibliográficos.....	7
• Pesticidas naturales.....	7
• Los compuestos estudiados.....	13
• Determinación analítica del trans-resveratrol.....	25
• La técnica LD+REMPI+TOFMS.....	33
2. SISTEMA EXPERIMENTAL Y MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	42
2.1. Descripción del sistema experimental.....	43
2.2. Preparación de la muestra.....	55
2.2.1. Triturado de la muestra.....	57
2.2.2. Prensado de la muestra.....	60
2.3. Condiciones de medida.....	61
3. RESULTADOS: Caracterización y Validación de la técnica.....	63
3.1. Caracterización y optimización de la técnica.....	64
3.1.1. Calibración.....	64
3.1.2. Resolución.....	71
3.1.3. Desorción.....	74
• Desarrollo de los procesos de desorción (MEPED).....	77
• Variación intensidad de señal con la energía de desorción..	82

Índice

3.1.4. Ionización.....	85
• Espectroscopía del trans-resveratrol (REMPI).....	85
• Variación intensidad de señal con la energía de ionización.....	94
3.2. Validación de la técnica.....	97
3.2.1. Repetibilidad.....	97
3.2.2. Reproducibilidad.....	101
3.2.3. Linealidad.....	103
3.2.4. Selectividad.....	104
3.2.5. Exactitud.....	105
3.2.6. Límite de Detección.....	107
3.2.7. Límite de Cuantificación.....	109
4. RESULTADOS: Aplicaciones Analíticas.....	110
4.1. Análisis de trans-resveratrol.....	111
4.1.1. Experimentos MPI.....	111
4.1.2. Estudio del contenido de trans-resveratrol en las distintas partes de la uva.....	116
4.1.3. Extracción del trans-resveratrol por prensado en frío.....	118
4.1.4. Cuantificación del contenido de trans-resveratrol en distintas variedades de uva.....	120
4.1.5. Cuantificación del trans-resveratrol en hoja de vid.....	125
4.1.6. Cuantificación del trans-resveratrol en cacahuete.....	128
4.2. Evolución de trans-resveratrol en uvas infectadas por <i>Botrytis Cinerea</i> ..	129
4.3. Evolución de quercitrina en uvas infectadas por <i>Botrytis Cinerea</i>	135
4.4. Aplicación exógena de trans-resveratrol.....	136
4.5. Caracterización de especies transgénicas.....	144

Índice

5. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	153
5.1. Caracterización y optimización de la técnica.....	154
5.2. Validación.....	166
5.3. Aplicaciones Analíticas.....	170
6. RESUMEN Y CONCLUSIONES	183
7. PUBLICACIONES, PATENTES, PRESENTACIONES EN CONGRESOS	190
8. BIBLIOGRAFÍA	194

INDICE DE FIGURAS

Índice de figuras.

Figura 1.1 -.	Fórmula estructural de los isómeros trans y cis- resveratrol.....	13
Figura 1.2 -.	Contenido de trans-resveratrol en uvas blancas y rojas.....	17
Figura 1.3 -.	Contenido de trans-resveratrol en diferentes tipos de uvas de 1994.....	19
Figura 1.4 -.	Fórmula estructural de la molécula de quercitrina.....	21
Figura 1.5-.	Fórmula estructural de la molécula de licopeno.....	23
Figura 1.6 -.	Estudio sobre las principales técnicas de separación empleadas para el análisis de trans-resveratrol.....	26
Figura 1.7 -.	Estudio sobre los principales métodos de preparación de muestra empleados en el análisis de trans-resveratrol.....	27
Figura 1.8 -.	Estudio sobre los principales detectores empleados para el análisis de trans-resveratrol.....	29
Figura 1.9 -.	Esquema del proceso de ionización resonante y no resonante de una molécula.....	37
Figura 1.10 -.	Esquema de un proceso de absorción bifotónica (1+1) adaptado de Jacobs y Zare (1986).....	38
Figura 2.1 -.	Vista esquematizada del sistema experimental LD+REMPI+TOFMS.....	44

Índice de figuras.

Figura 2.2 -.	Detalle de la dispersión del haz de moléculas desorbidas.....	45
Figura 2.3 -.	Detalle de las distancias recorridas por la molécula desde que es ionizada hasta que llega al detector MPC.....	48
Figura 2.4 -.	Sistema de entrada de gases en la cámara de ionización.....	50
Figura 2.5 -.	Esquema del proceso de desorción frontal a la muestra.....	53
Figura 2.6 -.	Sistema dispersor de la muestra sobre el disco de pyrex.....	57
Figura 2.7 -.	Morfología de la deposición de muestra sobre el disco pyrex.....	59
Figura 2.8 -.	Sistema de prensa y dispersor de las muestras.....	60
Figura 3.1 -.	Espectro de absorción UV-Vis de tolueno.....	67
Figura 3.2 -.	Espectros de tiempo de vuelo del tolueno ionizado a 266 nm, donde R es la Resolución en masas del sistema.....	69
Figura 3.3 -.	Espectro de fluorescencia inducida por láser del disco de pyrex.....	70
Figura 3.4 -.	Espectro de masas de trans-resveratrol puro depositado sobre el disco de vidrio pyrex y calibrado con el pico de Hierro (masa 56)....	71
Figura 3.5 -.	Espectro de tiempo de vuelo de trans-resveratrol puro en el que se ha calculado la resolución en masas del sistema.....	73

Índice de figuras.

Figura 3.6 -.	Dos espectros de piel de uva, en los que se evalúa la aplicación de voltajes pulsados o continuos sobre la placa aceleradora de iones V1.....	75
Figura 3.7 -.	Arriba espectro de masas de una muestra de 0,1 µg de piel de uva. Abajo espectro de masas de una cantidad 10 veces menor.....	76
Figura 3.8 -.	Comparativa de la vaporización de trans-resveratrol cuando se desorbe: (1) en su estado puro, (2) desorbido junto a una matriz cromófora de Rodamina590 y (3) desorbido con Zn en polvo.....	79
Figura 3.9 -.	Espectros de masas de trans-resveratrol puro desorbido a 532 nm (arriba) y a 1064 nm (abajo).....	81
Figura 3.10 -.	Intensidad de señal de trans-resveratrol en función de la energía de desorción a 532 nm.....	82
Figura 3.11 -.	Area de la señal registrada de trans-resveratrol frente a la variación de la energía de desorción en el caso en el que se desorbe piel de uva a 532 nm.....	83
Figura 3.12 -.	Area de la señal registrada de trans-resveratrol frente a la variación de la energía de desorción a 1064 nm.....	84
Figura 3.13 -.	Espectro de absorción del trans-resveratrol en etanol.....	87
Figura 3.14 -.	Espectro de masas de trans-resveratrol puro ionizado por MPI a 266 nm.....	88

Índice de figuras.

Figura 3.15 -.	Espectro de emisividad del colorante Rodamina 640 en metanol.....	89
Figura 3.16 -.	Espectro REMPI de trans-resveratrol medido entre 300 y 308 nm, las condiciones experimentales quedan reflejadas en el gráfico.....	90
Figura 3.17 -.	Espectro REMPI de trans-resveratrol puro promediado por transformada de Fourier y pasado a cm^{-1}	92
Figura 3.18 -.	Espectro de masas de trans-resveratrol puro obtenido a la longitud de onda resonante 302,1 nm (abajo) y fuera de resonancia a 301.1 nm (arriba).....	93
Figura 3.19 -.	Representación doble-logarítmica de la intensidad de señal de trans-resveratrol en función de la energía de ionización manteniendo constante el resto de los parámetros experimentales.....	95
Figura 3.20 -.	(Arriba) variación de la energía de ionización láser durante el experimento. (Abajo) Repetibilidad de la señal de tiempo de vuelo del trans-resveratrol corregida por la energía del láser durante 50 medidas consecutivas.....	99
Figura 3.21 -.	Reproducibilidad para el análisis de trans-resveratrol en 7 alícuotas de una solución 10^{-3} M de trans-resveratrol en acetona.....	102
Figura 3.22 -.	Area de Pico .vs. Concentración de trans-resveratrol.....	103
Figura 3.23 -.	Experimento de exactitud de una muestra que contiene 25 μg de trans-resveratrol.....	106

Índice de figuras.

Figura 3.24 .-	Espectro de masas de una muestra que contiene 5 µg de trans-resveratrol; Se indican la intensidad de señal y el ruido medio empleados para calcular el LoD y el LoQ.....	108
Figura 4.1 .-	Espectro de masas de trans-resveratrol ionizado a 266 nm.....	112
Figura 4.2 .-	Isomerización de una muestra trans-resveratrol a cis-resveratrol por exposición a luz blanca durante 1 hora.....	113
Figura 4.3 .-	Espectro de masas de vino tinto ionizado a 266 nm.....	114
Figura 4.4 .-	Espectro de masas de un colorante alimenticio ionizado por MPI a 266 nm.....	115
Figura 4.5 .-	Espectro de masas de pulpa y semilla depositadas sobre el pyres y de la piel de uva.....	117
Figura 4.6 .-	Espectros de aceite esencial extraído de la piel de la uva y del residuo de la piel una vez prensada.....	119
Figura 4.7 .-	Espectro de masas de la piel de uva de la variedad Ideal desorbida mediante la técnica Meped e ionizada mediante REMPI a 302,1 nm.....	120
Figura 4.8.-	Determinación del contenido de trans-resveratrol en piel de uva de la variedad Ideal por el método de adiciones estándar.....	121

Índice de figuras.

Figura 4.9 -. Espectro de masas de piel de uva de origen sudafricano desorbida con la técnica Meped a 1064 nm e ionizada a 302,1 nm mediante REMPI.....	123
Figura 4.10 -. Comparativa del contenido de trans-resveratrol en distintos tipos de uva determinado por el método de adiciones estándar.....	124
Figura 4.11 -. Espectro del aceite esencial de hoja de la variedad Aledo desorbida con la técnica Meped a 1064 nm e ionizada a 302,1 nm mediante REMPI.....	125
Figura 4.12 -. Determinación del contenido de trans-resveratrol en hojas de la variedad Aledo por el método de adiciones estándar.....	126
Figura 4.13 -. Comparativa del contenido de Trans-resveratrol determinado por el método de adiciones estándar en hojas de distintas variedades de vides.....	127
Figura 4.14 -. Espectro de masas del aceite esencial del fruto de cacahuete desorbido mediante Meped a 1064 nm e ionizado resonantemente a 302,1 nm.....	129
Figura 4.15 -. Evolución temporal del contenido de trans-resveratrol registrado durante 72 horas en el aceite esencial de piel de uva infectada por <i>Botrytis Cinerea</i>	132

Índice de figuras.

Figura 4.16 -. Comparativa de la evolución temporal del trans-resveratrol en tres grupos de un mismo tipo de uva: frente a la inoculación con <i>Botrytis</i> , inoculación con tampón y sin inocular	133
Figura 4.17 -. Fotografía comparativa de dos grupos de uvas 24 días después de: rociar sobre un grupo esporas muertas de <i>Botrytis Cinerea</i> y en el otro grupo de uvas rociar únicamente agua.....	134
Figura 4.18 -. Evolución temporal de la quercitrina frente a la infección de <i>Botrytis Cinerea</i> registrada durante 216 horas.....	136
Figura 4.19 -. Fotografías comparativas de dos grupos de uvas Aledo 10 días después de haber tratado un grupo con trans-resveratrol y otro grupo sólo con agua.....	138
Figura 4.20 -. Fotografías comparativas de dos grupos de pimientos California 37 días después de haber tratado un grupo con trans-resveratrol y otro grupo sólo con agua.....	140
Figura 4.21 -. Fotografías comparativas de dos grupos de pimientos Lamuyo 8 días después de haber tratado un grupo con trans-resveratrol y otro grupo sólo con agua.....	141
Figura 4.22 -. Fotografías comparativas de dos grupos de aguacates Hass 15 días después de haber tratado un grupo con trans-resveratrol y otro grupo sólo con agua.....	142

Índice de figuras.

Figura 4.23 .-	Fotografías comparativas de dos grupos de tomates Rambo 32 días después de haber tratado un grupo con trans-resveratrol y otro grupo sólo con agua.....	143
Figura 4.24 .-	Fotografías comparativas de dos grupos de manzanas golden 75 días después de haber tratado un grupo con trans-resveratrol y otro grupo sólo con agua.....	144
Figura 4.25 .-	Fotografías de tomate silvestre y otras dos variedades de tomates manipulados genéticamente a partir de la variedad silvestre para desarrollar mayor contenido endógeno de trans-resveratrol.....	146
Figura 4.26 .-	Espectros de absorción ultravioleta-visible de la piel de los tomates silvestres y las variedades manipuladas genéticamente.....	147
Figura 4.27 .-	Espectros de masas de tomates silvestre y transgénicos sin inocular.....	148
Figura 4.28 .-	Espectro de fluorescencia inducida por un láser de tomate silvestre.....	149
Figura 4.29 .-	Comparativa de los espectros de masas de tomate silvestre y sus variedades transgénicas infectados por <i>Botrytis Cinerea</i>	151
Figura 4.30 .-	Comparativa de los valores de CH ₃ y licopeno en los tomates sin infectar e infectados con <i>Botrytis Cinerea</i>	152

Índice de figuras.

Figura 5.1.-	Espectro de masas del vidrio pyrex desorbido a 1064 nm e ionizado a 302,1 nm.....	154
Figura 5.2 -.	Representación esquemática de las distintas formas de producir la desorción láser.....	155
Figura 5.3.-	Espectro de Absorción de trans-resveratrol en etanol de 450 a 1100 nm.....	160
Figura 5.4.-	Espectro REMPI de trans-resveratrol en el que se han asignado varias transiciones vibro-electrónicas.....	163
Figura 5.5 -.	Representación esquemática de una transición electrónica teórica en una molécula en la que la distancia de equilibrio internuclear del nivel electrónico excitado es mayor que la del nivel electrónico fundamental.....	164

INDICE DE TABLAS

Índice de tablas.

Tabla 1.1 -. Resumen de los mejores límites de detección publicados para el análisis de trans-resveratrol por cromatografía de gases.....	30
Tabla 1.2 -. Resumen de los mejores límites de detección publicados para el análisis de trans-resveratrol por HPLC.....	31
Tabla 1.3 -. Resumen de los mejores límites de detección publicados para el análisis de trans-resveratrol con las técnicas de electroforesis capilar.....	32
Tabla 3.1 -. Propiedades físicas del tolueno.....	65
Tabla 3.2 -. Energías óptimas de desorción para el trans-resveratrol desorbido en distintas matrices.	85
Tabla 5.1-. Resumen de los valores obtenidos de los experimentos de validación del sistema para la determinación de trans-resveratrol.	167
Tabla 5.2-. Comparativa del límite de detección para la determinación de trans-resveratrol mediante distintas técnicas analíticas.....	168
Tabla 5.3 -. Resumen de los experimentos de aplicación exógena de trans-resveratrol en frutas y verduras.....	174

LISTADO DE ABREVIATURAS

Abreviaturas

ADV	Adenovirus.
BSTFA	Bis-trimetilsilano-trifluoracetamida.
CE	Capillary Electrophoresis (Electroforesis Capilar).
CCD	Charge-Coupled Device. (Cámara por Acoplamiento de Carga).
CZE	Capillary Zone Electrophoresis (Electroforesis Capilar de Zona).
EBPM	Ecologically Based Pest Management (Estrategias de Control de Plagas).
E_d	Energía de desorción.
E_i	Energía de ionización.
EC	Electrochemical Detection (Detección Electroquímica).
FAB	Fast Atom Bombardment (Bombardeo con Átomos Rápidos).
FAO	Food and Agriculture Organization (Organización para la Agricultura y la Nutrición).
FD	Field Desorption (Desorción por Campo Eléctrico).
Fluor.	Fluorometry (Fluorimetría).
FWHM	Full Weight Half Medium (Anchura a la altura media).

Abreviaturas

GC	Gas Chromatography (Cromatografía de Gases).
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución).
HSV	Herpes Simplex Viruses (Virus de Herpes Simple).
IC	Integrated Control (Control Integrado).
IPM	Integrated Pest Management (Gestión Integrada de Plagas).
LD	Laser Desorption (Desorción Láser).
LoD	Limit of Detection (Límite de Detección).
L-L	Liquid Extraction (Extracción Líquido – Líquido).
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (Desorción e Ionización Láser Asistida por una Matriz).
MECC	Micellar Electrokinetic Capillary Electrophoresis (Cromatografía Micelar Electrocinética por Electroforesis Capilar).
MCP	Micro Chanel Plate (Placa Microcanal).
MEPED	MEtal Powder Enhancement Desorption (Desorción Mejorada por Polvo Metálico).
MPI	Multi Photon Ionization (Ionización Multifotónica).

Abreviaturas

MS	Mass Spectrometry (Espectrometría de Masas).
N	Noise (Ruido).
OAD	One Atom Detection (Detección de un sólo Átomo).
PCD	Programed Cell Death (Muerte Celular Programada).
PDMS	Plasma Desorption Mass Spectrometry (Desorción de Plasma acoplada a la Espectrometría de Masas).
PHM	Plant Health Management (Estrategías para la Salud de la Plantas).
Ppb	Partes por billon.
Ppm	Partes por millón.
PTFE	Poli-(tetrafluoroetileno).
R2PI	Resonant two Photon ionization (Ionización Bifotónica Resonante).
REMPI	Resonant Enhancement Multi Photon Ionization (Ionización aumentada por Resonancia Multifotónica).
Rh	Rhodamine (Rodamina).
RSD	Relative Standar Deviation (Desviación estándar relativa).

Abreviaturas

S	Signal (Señal).
SFE	Super Fluid Extraction (Extracción con Fluido Supercrítico).
SIMS	Secondary Ions Mass Spectrometry (Espectrometría de masas de Iones Secundarios).
SPE	Solid Phase Extraction (Extracción en Fase Sólida).
SPME	Solid Phase Micro-Extraction (Microextracción en Fase Sólida).
TOFMS	Time Of Flight Mass Spectrometry (Espectrometría de Masas por Tiempo de Vuelo).
u.m.a	Unidad de masa atómica.
UFP	Ultra Fine Powder (Polvo Ultra-fino).
ULHM	Unidad de Láseres y Haces Moleculares.

1. INTRODUCCIÓN

1.1.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

El presente trabajo ha sido desarrollado dentro de la nueva línea de investigación acometida por la Unidad de Láseres y Haces Moleculares del Instituto Pluridisciplinar, con el desarrollo y optimización de técnicas de espectroscopía láser aplicadas al campo del análisis químico medioambiental y de alimentos. Son objetivos prioritarios de esta línea investigadora el estudio, desarrollo y optimización de los procesos de interacción entre la radiación láser y la materia, así como una incesante búsqueda de aplicaciones que puedan derivarse de dichos procesos.

El análisis químico de sustancias traza contenidas tanto en muestras sólidas como en disoluciones plantea una serie de problemas de difícil solución mediante las técnicas convencionales de análisis, especialmente en lo que concierne a tiempo de análisis, costes, sensibilidad, selectividad, precisión, reproducibilidad, etc. Estos puntos son de mayor importancia en el caso del análisis químico de moléculas orgánicas en alimentos, debido entre otros factores al gran número de los compuestos y de sus productos de degradación presentes en la muestra. Este hecho, sumado al bajo nivel de la concentración de los analitos, genera gran complejidad en las matrices a analizar.

En muchas regiones del globo terraqueo las frutas y verduras sólo pueden crecer y conservarse de forma natural durante un pequeño periodo de tiempo, mientras que la demanda sobre las mismas se extiende a lo largo de todo el año. Debido a este hecho, en muchas ocasiones frutas y verduras deben ser almacenadas por largos periodos de tiempo antes de ser puestas en el mercado, lo cual implica considerables pérdidas debido al ataque de agentes patógenos así como a la maduración natural de frutas y verduras. En las uvas por ejemplo, el principal agente patógeno es la *Botrytis Cinerea*, causante del conocido moho gris ^{1}. La fase más destructiva de este proceso es la infección de la planta

Introducción

cuando el fruto ya está maduro, lo cual puede ocurrir tanto en el campo como en el periodo de almacenamiento.

Estos problemas requieren el planteamiento de estrategias que reduzcan el deterioro de frutas y verduras aumentando la resistencia natural de la fruta a través de sus propios metabolitos antifúngicos. Dos líneas claras de trabajo serían la aplicación exógena de pesticidas naturales y el enriquecimiento de la concentración endógena de dichos compuestos en los cultivos ^{2-4}. Por lo tanto, para lograr estos objetivos se requiere el desarrollo de técnicas analíticas que permitan la identificación de estos compuestos responsables de producir la respuesta inmunológica natural en las plantas, deduciendo a su vez los mecanismos utilizados para producir dicha respuesta.

De entre los posibles mecanismos por los cuales la planta se defiende de la infección fúngica para el caso concreto de la vid, el más importante es la producción de fitoalexinas derivadas del estilbeno ^{5}. La comparación cuantitativa entre dichas fitoalexinas hace destacar a una de ellas como la principal responsable de la respuesta inmunológica, el trans-resveratrol. El trans-resveratrol o 3, 5, 4'-trihydroxiestilbeno es acumulado en las partes leñosas de la vid, las hojas y la piel de las uvas como respuesta a la infección fúngica de diversos patógenos, o bien por la estimulación de la planta tras irradiación ultravioleta o tratamientos químicos ^{6, 7}. Desde que se publicó la acción elicitoria del trans-resveratrol por parte de la *Botrytis* en la vid ^{8}, han sido muchos los estudios llevados a cabo, su mayoría *in vitro*, para describir la interacción entre el hongo y la planta y de forma indirecta obtener una vía para aumentar la resistencia de la vid frente a este y otros patógenos ^{6, 9-12}.

En una breve revisión de los métodos analíticos empleados en el análisis de esta fitoalexina, los primeros estudios realizados para la determinación de trans-resveratrol empleaban la Cromatografía de Gases (GC), utilizando bis-

Introducción

(trimetilsilano) trifluoracetamida para aumentar su volatilización. Pese a proporcionar límites de detección por debajo de las ppm, los procesos de extracción y derivación requieren mucho tiempo y provocan en muchos casos la isomerización del trans-resveratrol en cis-resveratrol. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es en la actualidad el método más empleado para el análisis cuantitativo de trans-resveratrol, sin embargo esta técnica requiere de etapas previas de extracción antes de la separación en el cromatógrafo.

La electroforesis capilar (CE) es una técnica relativamente reciente y representa un método alternativo a los anteriormente mencionados aunque la gran complejidad de los cromatogramas para el análisis de alimentos hace necesaria, al igual que en el método anterior, la aplicación de procesos de extracción tales como extracción líquido-líquido (L-L), la extracción en fase sólida (SPE) o la extracción por fluido supercrítico (SFE). No existe en cualquier caso un consenso sobre cual de los métodos mencionados, y que más adelante estudiaremos con mayor detenimiento, es el más adecuado para la determinación cuantitativa de trans-resveratrol.

La espectrometría de masas es ampliamente usada en nuestros días para realizar la identificación de estos compuestos no volátiles, la dificultad para esta técnica radica en la vaporización de dichos compuestos antes de ser introducidos en el analizador. Son muchas las técnicas que, como más adelante veremos, tratan de solventar este problema ^{13}, aunque en todas ellas se produce la vaporización e ionización molecular conjuntamente por lo que ambas etapas no pueden ser optimizadas de forma independiente, lo cual se hace especialmente necesario cuando se trata del análisis de sustancias térmicamente lábiles como es el trans-resveratrol.

Para superar estas limitaciones se ha desarrollado un método que permite el análisis rápido, directo y con gran sensibilidad de compuestos no volátiles,

Introducción

basado en la desorción láser (LD) acoplada con la espectroscopía de ionización multifotónica resonante (REMPI) y la espectrometría de masas por tiempo de vuelo (TOFMS), centrándonos básicamente y por las razones anteriormente descritas en el análisis de trans-resveratrol.

La desorción láser posibilita la vaporización de moléculas térmicamente lábiles sin necesidad de procesos previos de extracción o separación de muestra. La ionización REMPI permite la ionización altamente selectiva y eficaz de un analito en una matriz compleja. La espectrometría de masas posibilita el análisis simultáneo de alta resolución de compuestos de distinta masa en una misma matriz. En su conjunto la LD + REMPI + TOFMS se perfila como una técnica universal para el análisis directo de trazas en matrices complejas.

El trabajo desarrollado en esta tesis doctoral se plantea por lo tanto dos objetivos generales:

- i.- El desarrollo y puesta a punto de métodos para la detección en tiempo real, mediante técnicas láser, de las distintas moléculas producidas por las plantas como respuesta a agresiones externas como el estrés, las infecciones fúngicas, etc. La técnica desarrollada es la desorción láser acoplada a la espectroscopía de ionización resonante y posterior detección por espectrometría de masas por tiempo de vuelo, aplicada para los compuestos no volátiles.
- ii.- Aplicación de estos pesticidas naturales y/o mejora de la concentración endógena de dichos compuestos, con la consiguiente mejora de la resistencia natural de las plantas.

La importancia de esta tesis radica no sólo en los innegables beneficios económicos que puede producir (en algunos cultivos las pérdidas por deterioro durante el almacenamiento puede llegar hasta el 30% de la cosecha) ^{14} sino

Introducción

también, en el valor añadido que supone obtener vegetales más saludables. Además es necesario tener en cuenta los beneficios que, de conseguir los objetivos propuestos, se lograrán desde el punto de vista medioambiental y para la salud pública.

Desde el punto de vista de la protección medioambiental, es indudable que la mejora de la resistencia de los vegetales, mediante la propia generación endógena de pesticidas naturales es la mejor estrategia para la disminución del uso de fertilizantes y pesticidas sintéticos en la producción agrícola, con la consiguiente disminución del impacto ambiental de estos compuestos. Dicha disminución es una de las mayores preocupaciones de la Política Agrícola Común, reflejada en la legislación en vigor.

Por último debemos señalar el importante efecto que tendría sobre la salud pública la consecución de productos naturalmente enriquecidos en trans-veratrol, uno de los pesticidas naturales que hemos estudiado. Como se detalla más adelante, se ha demostrado que este compuesto presenta efectos beneficiosos en la prevención de enfermedades cardiovasculares, así como una importante actividad quimiopreventiva de la carcinogénesis.

1.2.- ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.

- **PESTICIDAS NATURALES.**

El control y la mejora de la calidad de los alimentos que consumimos es una de las mayores preocupaciones de nuestra sociedad. Para responder a esta preocupación es necesario pensar en estrategias que hagan a las plantas nutricionalmente mejores para el consumo humano y que sean a su vez más resistentes a plagas e imprevistos medioambientales.

Durante años se ha politizado el término “pérdidas de cultivo”, por ejemplo en 1960 se estimaba que las pérdidas de producción en cultivos debidas a plagas fue de un 35 %, y en 1999 el porcentaje era exactamente el mismo. A priori podría pensarse que en 39 años de desarrollo no se ha avanzado nada ^{15}. Este argumento ha sido esgrimido por los detractores del desarrollo de estrategias encaminadas al diseño de nuevos pesticidas o la manipulación genética con el fin de mejorar los cultivos; sin embargo, esas pérdidas de cultivos no contemplan el aumento de producción que el desarrollo de plantas más resistentes ha logrado en ciertas cosechas (arroz, maíz, trigo, etc.,) así como el aprovechamiento de suelos que antes se considerarían valdíos. Por todo ello sería más correcto emplear el término pérdidas de cultivo cuando se hable de las pérdidas en los cultivos durante su periodo de almacenamiento y transporte hasta los consumidores. Los estudios realizados por la FAO muestran que dichas pérdidas presentan gran variabilidad (de 0 al 100%) en función del país y el cultivo seleccionado.

Se define como PHM (Plant Health Management) a la ciencia que estudia los procesos y factores implicados en el desarrollo de la salud de las plantas ^{2} tratando de generar las estrategias necesarias que lo posibiliten. Con el fin de afrontar esta meta, se han dado desde los últimos 100 años y de manera

Introducción

simultanea cuatro grandes líneas de trabajo. Estas son (a) el uso de semillas de alta pureza y calidad, (b) optimización de los suelos cultivados, (c) riego de los cultivos con agua limpia de alta calidad y (d) optimización de prácticas agrícolas, y reforzamiento de los cultivos frente a las agresiones externas traídas por el aire.

El desarrollo y aplicación de pesticidas es una de las principales líneas de actuación para frenar el ataque de agentes patógenos, así como la manipulación genética de plantas para incrementar su resistencia a dicho ataque. El conjunto de estrategias encaminadas al control biológico de plagas y epidemias se conoce generalmente por sus siglas en inglés IPM (Integrated Pest Management) ^{16}. Este término (IPM) fue usado por primera vez con un sentido entomológico por R.F. Smith y R Van den Bosch en 1967 ^{17}, y estaba basado a su vez en el de IC (integrated control) introducido por Stern y otros entomólogos de la Universidad Berkeley en California en 1959 ^{18}. Las estrategias desarrolladas en esa primera época se enfocaban prioritariamente en frenar las pérdidas de la cosecha provocadas por insectos y en consecuencia se basaban principalmente en el desarrollo de insecticidas eficaces minimizando su impacto posterior sobre el medio ambiente y la salud humana.

Con el paso del tiempo el término IPM se ha transformado en el de EBPM (Ecologically Based Pest Management) ^{19} en cuyo concepto se han ido recogiendo otras estrategias hasta llegar en la actualidad a integrar el control de plagas (insectos, virus, hongos, etc..) mediante la combinación de herramientas biológicas, físicas, químicas y culturales en aras de minimizar los costes económicos de producción agrícola así como los riesgos para la salud y el medio ambiente.

La efectividad de las estrategias elegidas para el control de plagas depende de múltiples factores y únicamente la integración de todos ellos en una única

Introducción

estrategia global obtendrá como resultado la minimización de las pérdidas de las cosechas.

Dada la resistencia adquirida que muestran muchas especies patógenas como respuesta a los pesticidas sintéticos, una de las líneas actuales de investigación contempladas dentro de la nueva evolución del IPM es la caracterización de los componentes activos en la planta responsables de producir la respuesta inmunológica frente a agresiones externas. Múltiples investigaciones muestran cada vez mayores evidencias de la elicitación de la defensa activa de las plantas como resultado del reconocimiento de agentes patógenos a través de interacciones proteína–proteína entre la planta y el patógeno. Del mismo modo la destrucción de la estructura terciaria y cuaternaria de estas proteínas provoca la desaparición de su actividad elicitora ^{20}.

Cuando una planta es infectada por un agente patógeno la primera respuesta está localizada en las células que entran en contacto con dicho agente. Estas células, en proximidad con el patógeno, reconocen su estructura o como en el caso de virus algunas de las moléculas fundamentales para el desarrollo de la actividad vírica. La respuesta primaria más frecuente de la planta es la reacción por necrosis en la que las células infectadas por el agente patógeno mueren, fenómeno conocido como PCD (Programed Cell Death). Otra respuesta, conocida como respuesta secundaria, se da en las células adyacentes a la célula infectada, reconociendo las moléculas difundidas desde la célula primaria atacada y producidas en la interacción primaria. Estas moléculas que alertan a las células adyacentes de la infección reciben el nombre de moléculas elicitoras ^{21, 22}. El tercer tipo de respuesta defensiva es la asociada con una resistencia adquirida sistémicamente e inducida hormonalmente en la planta ^{23}, y a través de la cual la planta forma compuestos (fitoalexinas) que tratarán de frenar la actividad patógena.

Introducción

Estas vías de defensa implican que las células de las plantas poseen sistemas permanentes de vigilancia, alojados en distintas partes de la célula, capaces de detectar los estímulos generados por el agente patógeno elicitando de este modo la respuesta defensiva en la planta ^{24}.

Muchas plantas producen metabolitos secundarios con funciones antifúngicas, entendiendo como metabolito secundario aquel que no está involucrado en las reacciones metabólicas vitales para la planta (metabolismo primario o principal). Estos compuestos antifúngicos pueden encontrarse en plantas saludables que no han sufrido infección patógena alguna, actuando como mecanismo de barrera frente a las mismas y recibiendo en este caso el nombre de fitoancipinas. En otras ocasiones los metabolitos secundarios antifúngicos son sintetizados en respuesta al ataque patógeno con el fin de cesar su invasión y recibiendo en este caso el nombre de fitoalexinas ^{25}.

En general las fitoalexinas podrían definirse como moléculas antimicrobianas de bajo peso molecular acumuladas en las plantas como resultado de una infección patógena o haber sido sometidas a condiciones de estrés ^{26}. Los primeros estudios sobre fitoalexinas se remontan a los años 40, cuando Müller y Borger ^{27} demostraron que tejidos de tubérculos que no poseen sustancias específicas de defensa frente a cierto tipo de hongos (*Phytophthora infestans*), desarrollan sustancias de acción no específica (fitoalexinas) que inhibían el crecimiento de dichos hongos y protegían los tejidos frente a nuevas infecciones de hongos del tipo de la *Phytophthora*.

Existen varios métodos de evaluar la acción y propiedades de las fitoalexinas en el sistema defensivo de la planta. Una de ellas sería la creación de plantas mediante modificación genética que no produzcan una fitoalexina en concreto y comparar la respuesta defensiva de estas plantas con aquellas que no han sido modificadas genéticamente ^{28}. Esta vía de estudio es en general

Introducción

compleja ya que las plantas suelen potenciar otros sistemas defensivos enmascarando así en cierta medida la acción atribuible a la presencia de la fitoalexina. Otra manera de evaluar este potencial defensivo sería la de manipular genéticamente la planta para que sobreproduzca fitoalexinas y comparar su comportamiento con el de las plantas no alteradas cuando son inoculadas con un agente patógeno ^{29}. Sin embargo estas dos vías de estudio no están exentas de riesgos dada la posibilidad de que las plantas generen nuevas vías de síntesis para compuestos no esperados *a priori* tras haber sido modificadas genéticamente.

Otra de las maneras de evaluar la eficacia de una fitoalexina es la probar su acción *in vitro* frente a un agente patógeno en un medio que propicie su crecimiento. De esta manera se evitan riesgos como los ya mencionados y puede a su vez evaluarse la contribución aislada de la fitoalexina en cuestión al sistema defensivo de la planta.

Se desconocen aun los mecanismos específicos a través de los cuales las fitoalexinas llegan a paralizar al agente patógeno que infecta un tejido, sin embargo son múltiples las evidencias de su acción antifúngica tales como: su elicitación tras la infección del patógeno, su rápida acumulación en los tejidos infectados y el freno de la actividad patógena tras su elicitación en ensayos *in vivo* e *in vitro*. Otra evidencia clara es el aumento de la resistencia de la planta a infecciones fúngicas tras haberla sometido a condiciones de estrés que elicitan la producción de fitoalexinas. Estudiaremos más adelante procesos para el caso concreto del trans-resveratrol cuyo carácter fitoalexínico ha sido demostrado.

Este carácter antifúngico convierte a las fitoalexinas en candidatos idóneos como pesticidas naturales. Ya se mencionó la importancia del desarrollo de pesticidas naturales como una de las estrategias para frenar las pérdidas en los cultivos. Cada vez más un mayor número de especies patógenas desarrollan inmunidad a los pesticidas sintéticos. Si unimos este hecho a la toxicidad de

Introducción

dichos pesticidas y a los largos tiempos necesarios para su degradación, el desarrollo de pesticidas naturales se perfila como una solución alternativa a todos estos problemas.

No debe olvidarse que un compuesto natural no tiene por que estar exento de riesgos toxicológicos para el ser humano, ya que los mayores venenos son productos naturales producidos por plantas o animales. Sin embargo, para algunas fitoalexinas como el trans-resveratrol no sólo se ha demostrado la ausencia de carácter tóxico sino que presenta grandes beneficios para la salud como más adelante estudiaremos en el apartado de esta tesis que se dedica a este compuesto.

En resumen las líneas de investigación a desarrollar para la obtención de pesticidas naturales eficaces son: por un lado hallar las condiciones óptimas de crecimiento en los cultivos que favorecen la producción de metabolitos secundarios que posean carácter antifúngico, y por otro explorar la eficacia de la aplicación exógena de las fitoalexinas en los cultivos para de este modo aumentar su resistencia.

- **LOS COMPUESTOS ESTUDIADOS.**

El Resveratrol.

El resveratrol es un compuesto fenólico derivado del estilbeno (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) que presenta los isómeros *cis* y *trans*, representados en la siguiente figura:

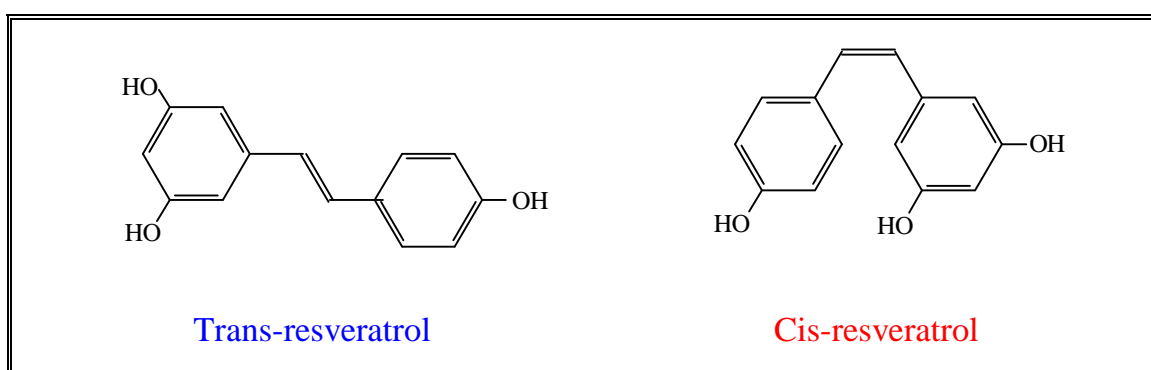


Figura 1.1 -. Fórmula estructural de los isómeros trans y cis- resveratrol (masa molecular 228 u.m.a).

Se dispone comercialmente del isómero trans (Sigma-Aldrich, 99%). Como otros compuestos de esta familia, el resveratrol se produce de forma natural en un amplio número de familias vegetales, encontrándose ampliamente distribuido tanto en gimnospermas como en dicotiledóneas ^{30}. El trans-resveratrol se ha encontrado en 72 especies vegetales (distribuidas en 31 géneros y 12 familias), algunas de las cuales constituyen productos empleados en la dieta humana, como los cacahuets ^{31, 32} o las moras. En 1976 ^{8} se descubrió la existencia de este compuesto en la vid, *Vitis vinifera*, comprobándose posteriormente que su síntesis se produce principalmente en la piel de las uvas y en muy baja concentración en el resto del fruto ^{33 - 35}.

Introducción

Para tratar de ubicar el trans-resveratrol a nivel celular en las plantas, debe considerarse en primer lugar cómo y por qué se genera esta molécula. El metabolismo intermediario puede definirse como la suma total de todas las reacciones enzimáticas que tienen lugar en la célula ^{36}. Las funciones de dicho metabolismo serían cuatro: 1) la obtención de energía química de las moléculas combustibles o de la luz solar absorbida, 2) la conversión de los principios nutritivos exógenos en sillares de construcción o precursores de los componentes macromoleculares de la célula, 3) el ensamblaje de estos materiales para formar proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otros componentes celulares, y 4) la formación y degradación de de las biomoléculas necesarias para las funciones especializadas de las células. Pueden especificarse además 2 fases claramente diferenciadas del metabolismo, por un lado la fase en la que intervienen todos los procesos degradativos y que es conocida como catabolismo y por otro lado la fase constructiva o biosintética del metabolismo conocida como anabolismo. De esta definición puede deducirse que el trans-resveratrol es un anabolito generado en las células de las plantas con el objeto de cumplir una misión específica, ser un pesticida natural a través del cuál y junto con otros anabolitos defiendan a la planta de agresiones externas.

Para el caso concreto de las uvas recientemente se ha estudiado *in vivo* que el contenido de trans-resveratrol es mayor en la planta cuando surgen los primeros brotes y alcanza su máximo de almacenamiento en el periodo comprendido entre la 1ª y la 5ª semana después de la floración, decreciendo rápidamente a partir de la 10ª semana ^{37}, para ser prácticamente nulo al final de su maduración ^{38, 39}. Una vez recolectada la uva, durante su almacenamiento en frío se ha observado como la mayoría de los derivados polifenólicos presenta una concentración constante ^{40} mientras que los compuestos derivados del trans-resveratrol incrementan su concentración a aproximadamente el doble de la inicial.

Introducción

Diversos estudios demuestran el carácter fitoalexínico del trans-resveratrol, es decir su producción se genera como respuesta de la planta a las condiciones ambientales o a determinadas infecciones fúngicas, como la *Botrytis Cinerea* ^{12, 41 - 45}, la *Plasmopara Vitícola* ^{46}, la *Phomopsis Vitícola* ^{47} o la *Rhizopus Stonifer* ^{38}. La infección de los tejidos por parte de la *Botrytis* provoca la dimerización del trans-resveratrol, oxidándose y formando otros anabolitos secundarios como el trans-dehidromero, el leachinol F y el Pallidol ^{44}, metabolitos todos ellos con capacidad antifúngica.

Se han investigado otra serie de mecanismos químico-físicos para producir dicha elicitación. Entre los mecanismos químicos destacan los tratamientos con sales como el tricloruro de Aluminio ($AlCl_3$) ^{48} o con Ozono (O_3) ^{49} y entre los físicos los tratamientos por exposición de la planta a luz ultravioleta. Hasta el momento los tratamientos más efectivos son los de irradiación de las uvas con luz ultravioleta UVC y UVB ^{37, 40, 50, 51}, llegándose a incrementar la concentración del trans-resveratrol y sus derivados desde 2 ^{40} y 7 ^{52} veces más que la inicial en uvas, y hasta 200 ^{50} veces en hojas. Los tratamientos por irradiación con láseres pulsados sólo se han aplicado hasta el momento en uvas, conseguido elicitar 11 veces la concentración inicial de trans-resveratrol ^{53}.

Un estudio de la aplicación de luz ultravioleta (4-8 horas) en uvas recolectadas en diferentes semanas después de producirse la floración ^{37} muestra como en uvas recolectadas entre la 1-5 semana se produce un máximo en la elicitación del trans-resveratrol 24-48 horas después de la irradiación, mientras que para las uvas recolectadas después de la semana 16 no se registra ningún aumento significativo del trans-resveratrol ni siquiera 72 horas después de la irradiación.

Aunque el metabolismo intermediario comprende a centenares de reacciones diferentes, las rutas centrales metabólicas son notablemente

Introducción

semejantes en la mayor parte de las formas de vida, por lo que se ha tratado de trasladar con éxito la elicitación del trans-resveratrol en las uvas por irradiación de luz ultravioleta a otros cultivos como por ejemplo la patata ^{54}, registrándose resultados similares en los que se observa la mayor acumulación de trans-resveratrol en torno a los 2 días después de la irradiación, decreciendo a partir de ese momento. La manera de trasladar este carácter fitoalexínico a otros cultivos es mediante el aislamiento del gen responsable de la aparición del trans-resveratrol en cepas de *vitis vinifera* y su posterior injertación en otros cultivos como kiwis ^{55} o tomates ^{28}; posteriormente estos cultivos presentan la elicitación del trans-resveratrol cuando son atacados por la *Botrytis Cinerea*.

La concentración de trans-resveratrol en la piel de la uva depende como se ha visto de diversos factores, y que se ven reflejados principalmente en: la variedad de uva cultivada, la climatología, el tipo de tierra en la que ha crecido, la época de recolección, etc; como puede apreciarse en la Figura 1.2 en general dicha concentración varía entre 1 y 15 $\mu\text{g/g}$ ^{56-63}.

Puede observarse como la concentración media en uvas blancas y rosadas (4,1 y 3,9 ppm respectivamente) son muy similares por lo podemos deducir que éste no es uno de los factores de mayor peso.

Un número reducido de autores encuentran valores superiores para la concentración de trans-resveratrol en piel de uva. En uno de los casos se registran valores que varían entre los 9 y 78 $\mu\text{g/g}$ ^{64} y en otro los valores obtenidos varían entre los 30 a 170 $\mu\text{g/g}$ ^{65}.

Introducción

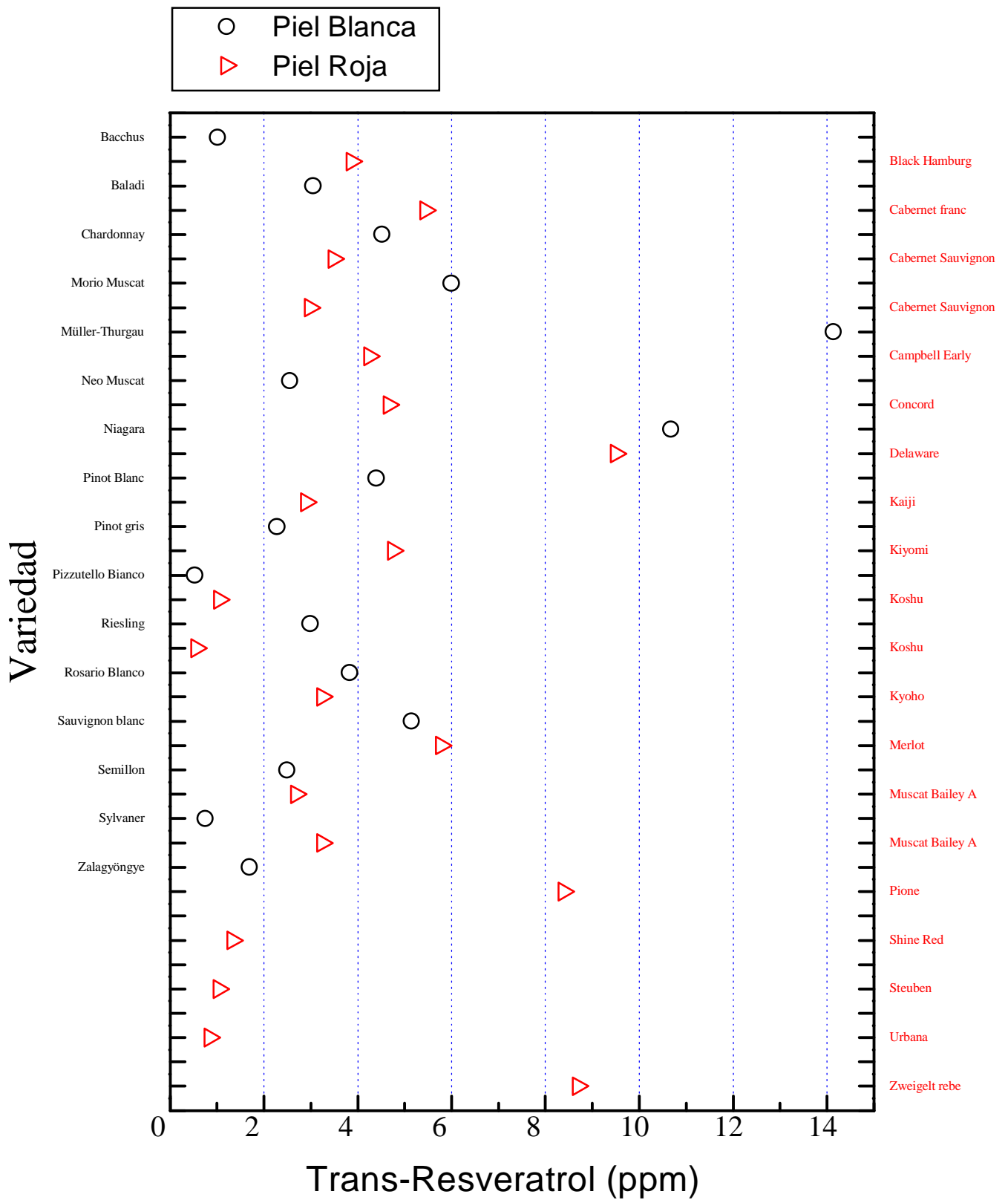


Figura 1.2 -. Contenido de trans-resveratrol en uvas blancas y rojas.

Introducción

Estas diferencias en la concentración de trans-resveratrol se hacen notables incluso cuando se trata de cosechas recolectadas el mismo año como así muestra la Figura 1.3 donde se expone la concentración de trans-resveratrol para distintas variedades de uva recolectadas en 1994 ^{57}.

El contenido de trans-resveratrol hallado en las hojas de vid es aún mayor que el encontrado en la piel de la uva oscilando de forma general entre las 50 y 400 ppm ^{66}.

Debido a la presencia de trans-resveratrol en la piel de las uvas, se ha detectado igualmente la existencia de este compuesto en aquellos vinos cuya fermentación se ha producido con el hollejo ^{67 - 69}. Los diversos estudios realizados ^{35, 68, 60 - 72} muestran que la concentración es mayor en los vinos tintos (entre 1.5 y 3 mg/L), y menor en blancos y rosados debido principalmente a los procesos de vinificación empleados y no a que la uva de la que se obtienen sea blanca o rosada.

A diferencia de en la vid, en la que sólo se encuentra el isómero *trans*, en el vino aparecen ambos isómeros ^{72, 73}. El contenido de resveratrol en vinos, así como la relación entre ambos isómeros, depende, además de los factores anteriormente citados, de las prácticas enológicas empleadas, variando de forma importante de una cosecha a otra ^{56, 70, 72, 74, 75}.

Sólo se observan contenidos similares de trans-resveratrol para el caso de vinos que partiendo de un mismo tipo de uva procedan de una misma región y además hayan sido recolectados en un mismo año ^{70, 72}.

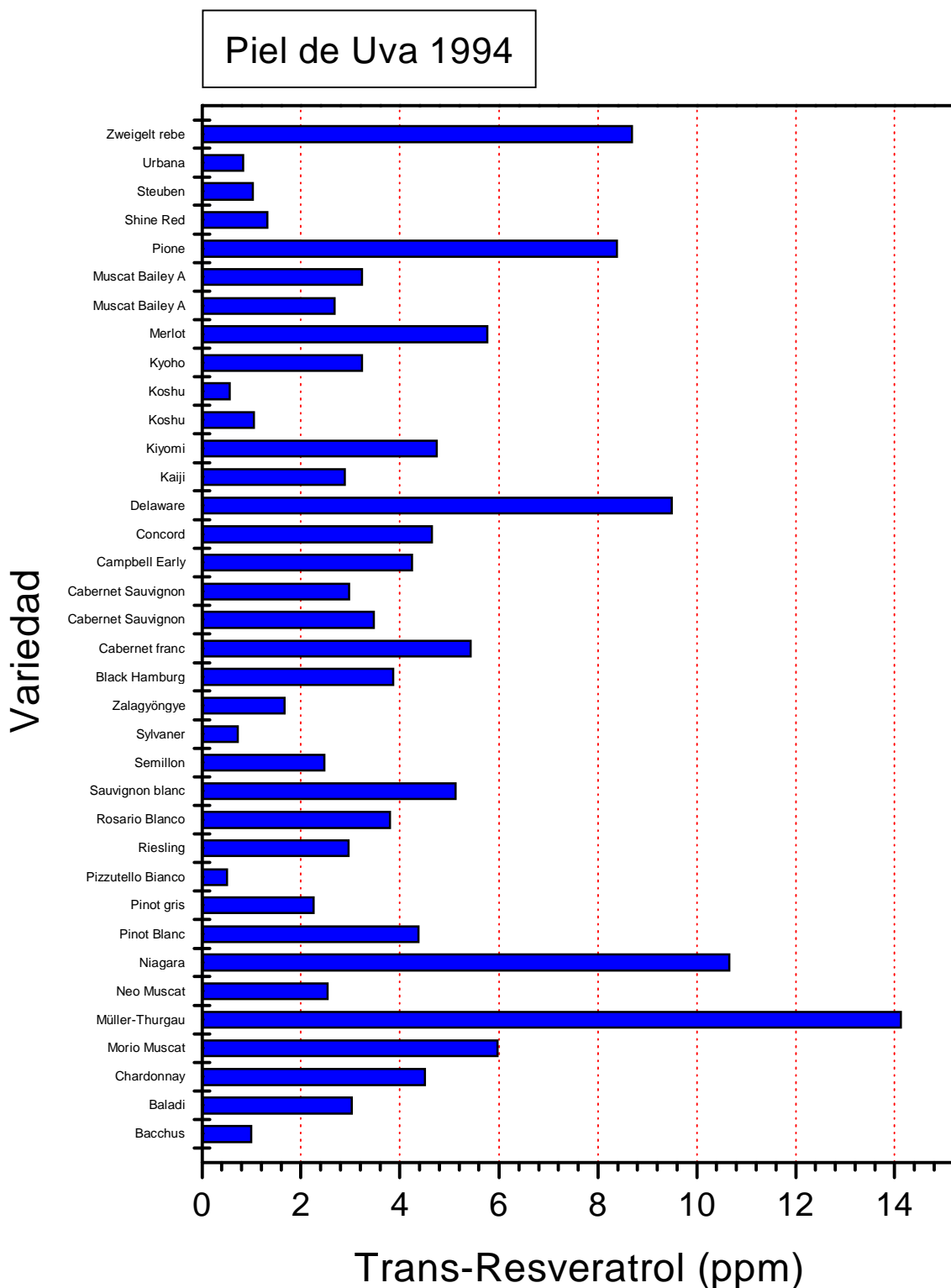


Figura 1.3 -. Contenido de trans-resveratrol en diferentes tipos de uvas de 1994.

Introducción

El principal interés analítico del trans-resveratrol, además de por ser una fitoalexina con un alto potencial como pesticida natural, radica en las propiedades beneficiosas para la salud que presenta, especialmente el isómero *trans* que es el que ha sido más estudiado. Los primeros estudios realizados ^{76, 77} mostraron la actividad fisiológica de plantas poligonáceas que contienen este compuesto y son utilizadas en China y la India ^{78} como remedio tradicional antifúngico, antibacteriano y antiinflamatorio. En estudios epidemiológicos más recientes se sugirió la relación entre el consumo moderado de vino y la prevención de enfermedades cardiovasculares, demostrándose el efecto de dicho consumo en la disminución de la mortalidad por enfermedades coronarias ^{79}. Este efecto es mayor en el vino que en otras bebidas alcohólicas, sugiriéndose que dicho efecto estaba causado principalmente por la presencia de derivados fenólicos procedentes de la uva, entre los que se encuentra el trans-resveratrol.

Los diferentes estudios realizados han demostrado que el trans-resveratrol inhibe la agregación plaquetaria ^{80, 81}, protege al hígado de la peroxidación lipídica ^{76, 82}, e inhibe la oxidación y modula el metabolismo de las lipoproteínas de baja densidad ^{83}, factores todos ellos relacionados con la prevención de las enfermedades cardiovasculares.

Por otra parte ha sido ampliamente demostrada la actividad quimiopreventiva del trans-resveratrol en ensayos que representan las tres fases principales de la carcinogénesis química: la iniciación, la promoción y la progresión ^{84, 85}. Aunque la actividad fisiológica del cis-resveratrol ha sido descrita sólo en una ocasión, se demostró que inhibía la actividad kinasa, factor igualmente relacionado con la aparición del cáncer ^{86}.

Estos datos experimentales, junto con los estudios epidemiológicos realizados, sugieren que el trans-resveratrol, constituyente natural común en la dieta humana, puede contribuir al descenso de la incidencia de enfermedades

Introducción

cardiovasculares y disminuir el riesgo de carcinogénesis ^{35}. Surgen desde este punto de vista estudios encaminados a incrementar la bioasimilación del trans-resveratrol así como de aumentar la producción natural de dicho compuesto; así por ejemplo se sabe que la presencia de flavonoides naturales evita la sulfatación hepática del trans-resveratrol lo cual aumenta la capacidad de organismo para absorberlo en el torrente sanguíneo ^{87}.

La Quercitrina.

La quercitrina (3, 3',4', 5, 7 – Pentahidroxi flavona 3-L ramnopyranoxido) es un compuesto fenólico perteneciente al grupo de los flavonoides, los cuales están presentes en las plantas y se les atribuyen acciones farmacológicas al actuar como antipiréticos, analgésicos y antiinflamatorios ^{88} y acciones antioxidantes al inhibir en ensayos in vitro la peroxidación de los lípidos y las enzimas lipooxigenasas ^{89}. Aproximadamente 4000 flavonoides diferentes han sido identificados en la naturaleza, clasificándose en base a su estructura química en flavonoles, catequinas, flavononas, antocianinos e isoflavonoides.

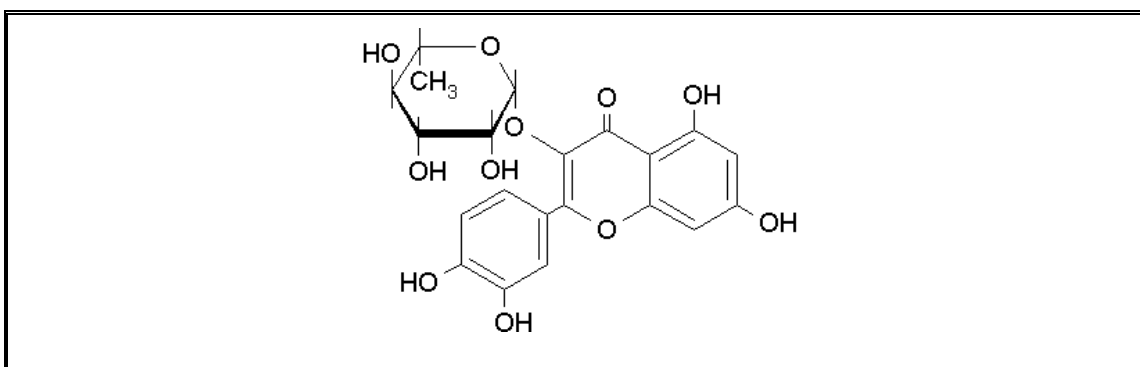


Figura 1.4 -. Fórmula estructural de la molécula de quercitrina (masa molecular 448 u.m.a).

Introducción

La quercitrina, flavonol presente en muchas hortalizas y frutas, sobre todo en cebolla, tomate, uvas y sus derivados como el vino ^{90}, ha mostrado una fuerte actividad antioxidante en estudios realizados in vitro para enfermedades coronarias ^{91 - 93}.

Los bioflavonoides son muy importantes para la salud humana ^{94, 95}, pero desafortunadamente para el hombre no pueden ser sintetizados por el cuerpo humano y en consecuencia han de ser suministrados mediante la dieta.

La quercitrina presenta gran capacidad antioxidante ejerciendo control sobre los radicales libres, al igual que lo hace su precursor presente en uvas y vinos ^{96, 97} la Quercetina (3, 3',4', 5, 7 – Pentahidroxiflavona), cuyos efectos beneficiosos para la salud han sido ampliamente demostrados en el tratamiento del cáncer debido también a sus propiedades altamente antioxidantes ^{98}.

En las frutas, el principal flavonoide presente es la quercitrina, encontrándose un alto contenido en manzanas (36 mg/Kg.) ^{89, 99}.

Al igual que otros flavonoides, la quercitrina posee la propiedad de mejorar lesiones en células renales. Además inhibe herpes simples como los virus tipo 1 (HSV-1), y adeno virus tipo 3 (ADV3) en células ^{100}. Y sus propiedades se hacen más manifiestas en los organismos vivos cuando actúa de forma aislada de otros flavonoides.

El Licopeno.

El licopeno (ψ, ψ -caroteno) es un carotenoide insaturado de estructura abierta que imparte el color rojo a los tomates, la guayaba, el melón de agua o las uvas rosadas entre otros alimentos.

Introducción

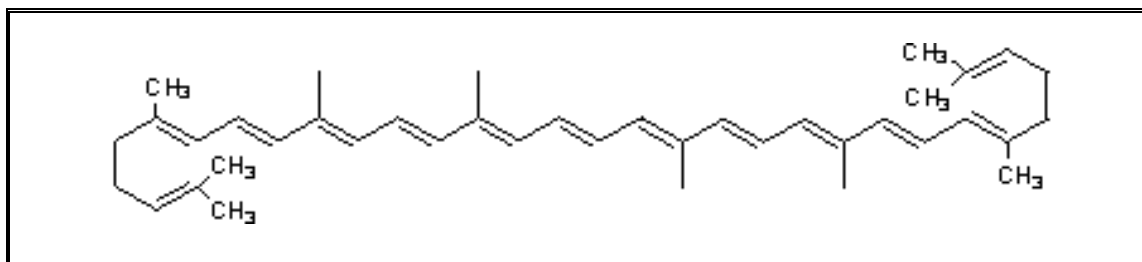


Figura 1. 5 -. Fórmula estructural de la molécula de licopeno (masa molecular 537 u.m.a).

Los carotenoides ^{ 36} son largas moléculas poliisoprenoides que poseen dobles enlaces conjugados; cada extremo de la molécula contiene un anillo de ciclohexeno sustituido insaturado. Existen dos clases principales de pigmentos carotenoides en los cloroplastos vegetales, los carotenos, que son hidrocarburos isoprenoides y no contienen oxígeno, y las xantofilas, que son muy semejantes en su estructura pero contienen oxígeno en sus anillos terminales.

La función principal del licopeno en frutas y vegetales es la de “pigmento accesorio” proporcionando la función fotosintética a la planta al ser utilizado como receptor de energía lumínica. Después de absorber la energía luminosa, el licopeno debe transferirla como energía de excitación a las moléculas de clorofila de la planta en cuestión antes de que pueda utilizarse para la fotosíntesis ^{ 36}.

La presencia mayoritaria del licopeno se produce en los tomates; a pesar de su pronta introducción en Europa (en España en 1523), en los primeros momentos esta hortaliza no fue consumida, al pensar que podría ser venenosa; sin embargo, era utilizada con fines ornamentales y medicinales. No fue hasta el siglo XVIII cuando comenzó a utilizarse como alimento; en la actualidad, esta hortaliza ha pasado a ser la más consumida por las familias europeas, debido principalmente a su alto contenido en vitaminas.

Introducción

El tomate, perteneciente al género *Lycopersicon esculentum*, de la familia de las solanáceas, es un cultivo que día a día adquiere mayor importancia en el escaparate del comercio mundial; según la FAO, es la hortaliza más cultivada del mundo. Es una hortaliza que ha alcanzado una variedad de tipos muy extensa, por aspecto exterior y por características interiores, por su destinación final (en fresco o para procesado industrial), etc. Así mismo, las preferencias por un tipo determinado son muy variadas en función del país, uso al que se destina, etc.

Durante el III Congreso Mundial de las Industrias Conservadoras de Tomate, que se celebró recientemente en Pamplona, la atención giró alrededor de una palabra clave: el licopeno.

El licopeno es un probado antioxidante que disminuye el riesgo de defunción por cáncer. En el cuerpo humano, el licopeno es depositado en el hígado, los pulmones, la próstata, el colon y la piel, y su concentración suele ser mayor que la de cualquier otro carotenoide. Un estudio reciente del Colegio Médico de Harvard y del Instituto para la Salud Pública de Harvard ^{ 101}, muestra que cuando el consumo de productos derivados del tomate aumenta en el organismo humano, los niveles de licopeno en sangre aumentan, y el riesgo de contraer cáncer de próstata disminuye. El mismo estudio, muestra como el procesado de los tomates para la obtención de productos manufacturados incrementa la bioabsorción del licopeno en los seres humanos ^{ 102}.

Los últimos descubrimientos indican que el licopeno puede reducir el riesgo de degeneración celular, y presenta unas propiedades más efectivas en el caso del cáncer de pulmón, vejiga, útero y de piel ^{ 103}.

Introducción

La legislación española autoriza el uso de carotenoides (E-160) sin límites para colorear la mantequilla y la margarina, 0,1 g/kg. en el yogur, 200 mg/kg. en conservas de pescado, 300 mg/kg. en los productos derivados de huevos, conservas vegetales y mermeladas, y hasta 600 mg/kg. en quesos. En sus aplicaciones en bebidas refrescantes, helados y productos cárnicos no tiene limitaciones.

• DETERMINACIÓN ANALÍTICA DEL TRANS-RESVERATROL.

Debido a las propiedades como fitoalexina y los efectos beneficiosos para la salud del trans-resveratrol se han desarrollado diversas técnicas analíticas para su detección, centradas principalmente en uvas y vinos, aunque de forma minoritaria se extienden al análisis de zumos, cacahuets y sangre.

Los métodos generalmente empleados para su análisis son la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) ^{56, 58, 68, 104 - 110}, HPLC ^{42, 57, 59 - 65, 70 - 72, 78, 110 -126}, y en menor grado y más recientemente la electroforesis capilar (CE, CZE, MECC) ^{73, 127-130}. Haciendo un estudio de las 45 publicaciones más relevantes sobre análisis de trans-resveratrol en piel de uva y vinos desde el año 1993 al 2001, encontramos que el 69 % de los análisis de trans-resveratrol son llevados a cabo empleando como técnica la cromatografía de líquidos de alta resolución, un 22 % usan la cromatografía de gases y el 9% emplea la electroforesis capilar.

Técnica de Separación

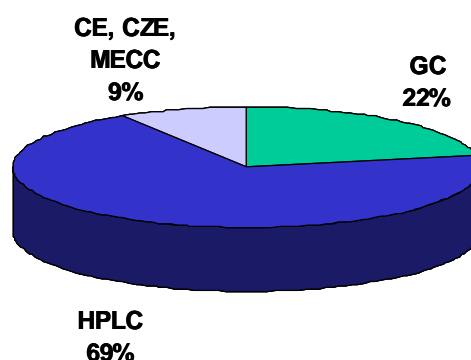


Figura 1.6 .- Estudio sobre las principales técnicas de separación empleadas para el análisis de trans-resveratrol.

Un estudio comparativo de 170 vinos analizados por HPLC con fase normal (columna Lichrospher 100 CN) y fase reversa (columna OSD Hypersil) ^{110}, ambos por inyección directa, mostró niveles similares del contenido de trans-resveratrol en dichos vinos analizados por uno y otro método. Sólomente se apreciaron variaciones de un 15 % en el contenido de cis-resveratrol atribuible a que el método de HPLC con fase normal se basaba en la detección de la absorción a 306 nm de trans y cis resveratrol, sin embargo el máximo de absorción del cis-resveratrol está situado en torno a 280 nm por lo que este método muestra valores algo inferiores para este compuesto comparado con los valores medidos con HPLC en fase reversa, que emplea una red de diodos para la determinación de ambos isómeros. En cualquier caso se concluye en dicho estudio que es preferible emplear HPLC en fase reversa por la posibilidad que este método brinda para la determinación simultanea de múltiples polifenoles presentes en el vino, mientras que un análisis multidimensional por HPLC en fase normal requeriría el empleo de técnicas de separación previas al análisis.

Independientemente de la técnica de separación empleada, el análisis de trans-resveratrol en piel de uva y vinos requiere en muchos casos el uso de técnicas de preconcentración y /o extracción con varios disolventes previamente

Introducción

al análisis debido a la complejidad de las matrices que lo contienen y a la baja concentración del analito. El 40 % de los métodos revisados emplean la extracción en fase sólida (SPE) tanto para GC como para HPLC con fase normal y CZE. Un 12 % de dichos métodos combina la SPE con la derivación con bis-trimetilsilano-trifluoracetamida (BSTFA) asociada posteriormente al análisis por GC principalmente. El caso de inyección directa es aplicado en HPLC con fase reversa y representa un 22 % del total de los casos estudiados, posibilitando el análisis simultáneo de varios polifenoles además del trans-resveratrol. Un 9 % del total requiere de métodos de filtración previos a la inyección directa en HPLC también con fase reversa, siendo los filtros de poli(tetrafluoroetileno) (PTFE) de 0,45 µm los más usados. La extracción líquido líquido (L-L) representa el 7 % de los casos cuando se combina con HPLC y MECC y un 4 % cuando se asocia a procesos de filtración o derivación (BSTFA) aplicada posteriormente a GC. Por último el 6% restante lo componen los métodos de micro extracción en fase sólida (SPME) y la extracción con fluido supercrítico (SFE).

Preparación de Muestra

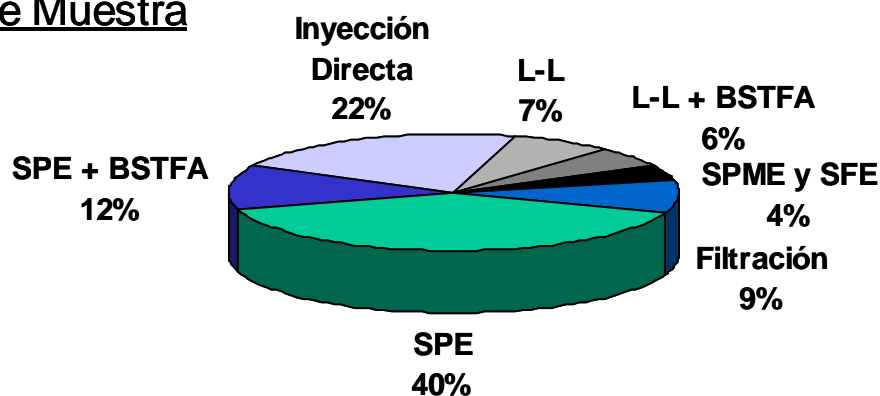


Figura 1.7 .- Estudio sobre los principales métodos de preparación de muestra empleados en el análisis de trans-resveratrol.

Existe un estudio realizado sobre el contenido de trans y cis-resveratrol aplicado a 90 vinos medidos con GC-MS con la aplicación previa de SPE seguido de inyección directa en un caso, y en otro aplicando SPE y derivación

Introducción

con BSTFA ^{110}. En él se observa que los valores hallados para el isómero cis son similares en ambos casos pero para el trans-resveratrol son en promedio un 67% mayores cuando se emplea la SPE con inyección directa. Se atribuye este aumento a dos motivos, por un lado los procesos de isomerización e hidrólisis térmica de los glucósidos de trans-resveratrol presentes en el vino y por otro a la isomerización de trans a cis-resveratrol que ocurre durante la derivatización con BSTFA.

Un estudio similar en el que se compara la SPE con la extracción L-L aplicadas a HPLC en la determinación simultánea de trans-resveratrol y otros polifenoles en vino, desaconseja la inyección directa de la muestra por la complejidad que presentan los cromatogramas ^{131}. El estudio compara la extracción L-L con dietil-éter, etilacetato y una mezcla de ambos frente a la SPE; se concluye que es preferible la extracción L-L con dietil-éter sobre la SPE y sobre la extracción L-L con los demás disolventes, por ser la extracción L-L con dietil-éter el método que menos variabilidad presenta en los resultados.

En lo que se refiere a los detectores utilizados en el análisis de trans-resveratrol un 58 % de los artículos revisados emplean una red de diodos como detector acoplado mayoritariamente a la cromatografía HPLC. El 24 % de los trabajos emplean un detector selectivo de masas (MS) acoplado en su mayoría a GC y en menor número a HPLC. Un 7% de los estudios acoplan detectores fluorimétricos a la cromatografía HPLC y un 4% utilizan el acoplamiento de éstos detectores con las redes de diodos también con HPLC. El 7% de los estudios restantes lo conforman trabajos que emplean detectores que miden la absorción UV y la detección electroquímica (EC) acoplados en ambos casos con HPLC.

Un estudio comparativo de la eficacia del empleo de distintos detectores basados en la fluorimetría frente a la detección de UV por una red de diodos ^{62},

Introducción

aplicada al análisis de trans-resveratrol en uvas, refleja que la detección fluorimétrica es mucho más sensible y selectiva que la realizada con la detección UV. Lo cual se traduce en cromatogramas más resueltos con menor número de interferencias, pudiendo simplificarse en cierto grado los métodos de preparación de muestra.

Detectores

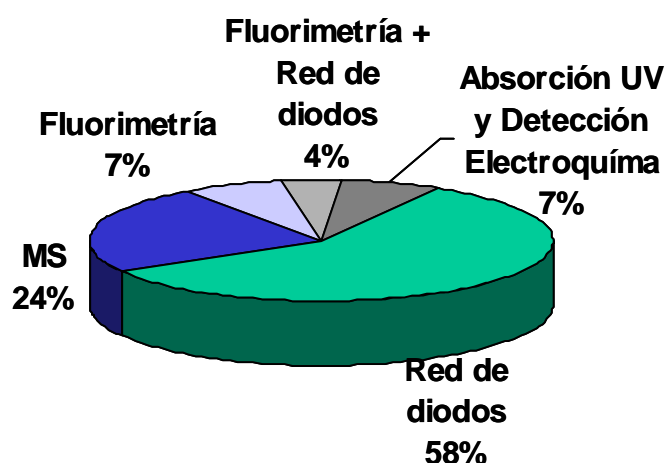


Figura 1.8 .- Estudio sobre los principales detectores empleados para el análisis de trans-resveratrol.

Entre otros muchos parámetros, pueden compararse los distintos métodos analíticos en función del límite de detección (LoD) que éstos alcanzan. Para el caso de la cromatografía de gases los mejores LoD se sitúan entre las 8 y las 50 ppb en su mayoría publicados en estudios basados en la extracción en fase sólida SPE previa al análisis. En uno de los trabajos más recientes con esta técnica se ha publicado un LoD de 5 ppt para el análisis de trans-resveratrol, la variación aplicada con respecto a los anteriores métodos también por GC es que en este caso se combina la microextracción en fase sólida SPME con la derivación con BSTFA. Pese a ser el mejor LoD obtenido son muchos los autores que, como ya hemos mencionado anteriormente, han demostrado durante estos procesos las reacciones de isomerización, hidrólisis y oxidación que sufren los glucósidos de trans-resveratrol enmascarando el contenido real del mismo.

Introducción

Muestra	Preparación	Técnica	Detector	LoD	LoD (ppb)	Año	Ref.
Vino	SPE + BSTFA	GC	MS	0,0084 mg / L	8	1997	107
Zumo	SPE + BSTFA	GC	MS	10 mg / L	10	1995	56
Vino	SPE	GC	MS	10 mg / L	10	1997	110
Vino	SPE + BSTFA	GC	MS	10 mg / L	10	1997	110
Sangre	L-L + BSTFA	GC	MS	0,01 mg / L	10	2001	58
Vino	SPE	GC	MS	50 mg / L	50	1994	105
Vino	SPME + BSTFA	GC	MS	5 ng / L	0,005	2000	106

Tabla 1.1 .- Resumen de los mejores límites de detección publicados para el análisis de trans-resveratrol por cromatografía de gases.

Para la cromatografía de líquidos de alta resolución los valores del LoD publicados van desde 1 a 900 ppb. No es raro encontrar valores elevados en el LoD en publicaciones recientes, ya que en esos casos se prefiere trabajar con un LoD mayor pero que permita a la técnica realizar el análisis simultáneo de varios polifenoles además del trans-resveratrol. Para el caso específico del análisis de trans-resveratrol en vinos y zumos de uva se han desarrollado diversos métodos de inyección directa ^{62, 63, 113, 132} en sistemas HPLC, aunque en la mayoría de los casos producen cromatogramas excesivamente complejos, lo que imposibilita la identificación y cuantificación de los picos ^{131}.

Al igual que ocurría con la cromatografía de gases las revisiones de estos métodos ^{110} sugieren que los métodos aplicados a la HPLC producen valores demasiado elevados para la concentración de trans-resveratrol debido a que durante las etapas previas al análisis se produce la fragmentación térmica de los diferentes glucósidos de trans-resveratrol, dando lugar a isómeros libres que posteriormente son detectados, por lo cual siguen hasta la fecha desarrollándose

Introducción

nuevos métodos de extracción y purificación que puedan aplicarse a dicho compuesto ^{133}.

Muestra	Preparación	Técnica	Detector	LoD	LoD (ppb)	Año	Ref.
Vino	SPE	HPLC	EC	1 mg / L	1	1994	112
Piel de Uva	SPE	HPLC	Red de diodos	1 mg / L	1	2000	59
Vino	Filtración (PTFE)	HPLC	Red de diodos	0,003 mg / L	3	1995	72
Plasma	SPE	HPLC	Red de diodos	7 mg / L	7	1999	117
Piel de Uva	SPE	HPLC	Fluorimetría	0,01 ng / mL	10	1994	62
Cacahuetes	SPE	HPLC	Red de diodos	0,01 mg / g	10	1999	116
Vino	L-L	HPLC	Fluorimetría	0,02 mg / L	20	2001	118
Vino	Inyección Directa	HPLC	Red de diodos	0,11 mmol/ L	25	1995	111
Vino	Inyección Directa	HPLC	Absorbancia UV	25 mg / L	25	1997	110
Vino	Inyección Directa	HPLC	Red de diodos	30 mg / L	30	1996	119
Vino	Inyección Directa	HPLC	Red de diodos	30 mg / L	30	1997	110
Zumos	Inyección Directa	HPLC	Red de diodos	0,03 mg / L	30	1999	63
Vino	L-L + PTFE	HPLC	Red de diodos	0,05 mg / L	50	1993	120
Piel de Uva	SPE	HPLC	Red de diodos	0,08 mg / g	80	1994	64
Piel de Uva	SPE	HPLC	Red de diodos	0,1 mg / g	100	1997	115
Piel de Uva	SFE	HPLC	Red de diodos	0,1 mg / L	100	2001	65
Piel de Uva	SPE	HPLC	Red de diodos	0,5 ng / mL	500	1994	62
Vino	SPE	HPLC	MS	0,9 mg / L	900	2001	121
Vino	SPE	HPLC	MS	200 pg	-	1999	126

Tabla 1.2.- Resumen de los mejores límites de detección publicados para el análisis de trans-resveratrol por HPLC.

Introducción

En general las técnicas basadas en la electroforesis capilar presentan un LoD entre 50 y 280 ppb, este límite de detección es mayor que el obtenido por otros métodos, sin embargo la mayoría de ellos permiten, al igual que ocurría con HPLC, el análisis simultáneo de varios polifenoles en las muestras analizadas. En 1998 fue desarrollado un método de análisis directo de trans-resveratrol en vinos por MECC, aunque presenta una pérdida clara de sensibilidad lo cual es atribuido por los autores del método al empleo necesario de técnicas de preconcentración de muestra ^{127}.

Muestra	Preparación	Técnica	Detector	LoD	LoD (ppb)	Año	Ref.
Vino	SPE	CE	Red de diodos	0,05 mg /L	50	1998	129
Vino	SPE	CZE	Absorción UV	0,064 mg / L	64	1999	130
Vino	Filtración	MECC	Absorción UV	1,25 mM	285	1998	127

Tabla 1.3 .- Resumen de los mejores límites de detección publicados para el análisis de trans-resveratrol con las técnicas de electroforesis capilar.

A modo de resumen puede concluirse que es aceptado de forma general que el proceso de preparación de la muestra es la etapa limitante para el análisis de trans-resveratrol, no sólo por los requerimientos de coste y tiempo empleados, sino también por ser la mayor fuente de error en el análisis. Esto ha provocado importantes controversias entre los distintos laboratorios en lo que se refiere al método de preparación empleado: la extracción en fase sólida provoca la disminución de las intensidades y áreas de los picos cromatográficos ^{134}; usando fases móviles orgánicas se hace inevitable tener pérdidas significativas ^{111}; la evaporación por rotavapor a vacío provoca la inestabilidad del trans-resveratrol en la piel de la uva ^{62}; etc. Como ya hemos mencionado, las revisiones sobre

Introducción

estos métodos de análisis de trans-resveratrol ^{135, 136} incluyendo los basados en HPLC ^{ 131} muestran una gran variabilidad en los valores publicados.

Estos problemas podrían ser solventados mediante la realización del análisis directo del trans-resveratrol por LD acoplado con REMPI-TOFMS ^{137}.

- **LA TÉCNICA LD + REMPI + TOFMS.**

Desde que T. Maiman descubriese el láser de rubí en 1960, y Javan, Bennet y Herriott el láser de helio-neón, la aplicación del láser en procesos químicos ha constituido una auténtica revolución científica. Sin embargo es a partir de la década de los setenta cuando se genera una gran aplicabilidad del láser en los procesos químicos debido a el desarrollo de láseres sintonizables y de infrarrojos de alta energía. La versatilidad del láser reside en la combinación de sus cualidades de direccionalidad, monocromaticidad, potencia y coherencia temporal.

El desarrollo de la tecnología láser en el campo de la investigación ha posibilitado abordar problemas que tan sólo unas décadas atrás se consideraban irresolubles. Gracias al láser hoy en día es posible preparar especies químicas en estados cuánticos bien definidos e incluso inducir y/o catalizar procesos químicos donde es imprescindible el concurso del láser. Se consiguen por tanto objetivos tan deseados por los químicos tales como romper enlaces específicos, separar especies isotópicas, formar moléculas en estados cuánticos específicos o la detección del “estado de transición” en una reacción química ^{ 138, 139}.

La aplicación de estos descubrimientos en el campo analítico ^{140, 141, 142} ha posibilitado el desarrollo de nuevas técnicas capaces de llegar a límites de detección del orden de partes por trillón (ppt) ^{143 - 145}, o de la detección de un

Introducción

átomo en un medio gaseoso contenido en 10^{19} átomos o moléculas mediante la técnica de OAD (“*one atom detection*”) ^{146, 147}.

Dos de las principales áreas de aplicación del láser en el campo del análisis químico son la desorción por láser y la ionización por láser. En la Unidad de Láseres y Haces Moleculares (ULHM) del Instituto Pluridisciplinar de la Universidad Complutense, hemos puesto a punto un sistema experimental que combina ambas aplicaciones mediante el acoplamiento de la Desorción por Láser (LD) con la Ionización Multifotónica Resonante (REMPI) y la detección por Espectrometría de Masas por Tiempo de Vuelo (TOFMS).

La desorción por láser es el proceso por el que las moléculas son eyectadas de una superficie mediante la irradiación con un láser pulsado, lo que permite la transferencia de especies no volátiles de la fase sólida a la gaseosa, permitiendo su posterior ionización y análisis por espectrometría de masas. La desorción por láser es una técnica que ha sido ampliamente empleada para producir moléculas neutras, iones, vaporizar toda clase de moléculas ^{148 - 153} así como realizar análisis químico a través de la emisión de plasma ^{154 - 157}.

Una de las principales ventajas de la desorción por láser es el análisis de muestras que contengan sustancias lábiles: el pulso láser comunica una gran energía en un tiempo muy corto (del orden de ns), lo que favorece la vaporización de la molécula sobre la descomposición térmica ^{158}. Para ello es necesario controlar cuidadosamente la energía del láser de desorción, pero de forma general se puede decir que usando densidades de potencia por debajo de $10^6 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ la desorción se produce sin fragmentación molecular ^{159}. Por otra parte, el enfriamiento producido por la expansión de las moléculas en el vacío tras la desorción, minimiza igualmente dicha fragmentación.

Introducción

Otra de las principales ventajas de la desorción por láser es la ausencia de preparación de la muestra, lo que facilita el análisis evitando largas y tediosas operaciones que además son una de las principales fuentes de error de las técnicas analíticas convencionales ^{137, 160}. Abordaremos en el presente trabajo algunas de las distintas formas de producir esta desorción de los analitos, observando en cada caso las ventajas e inconvenientes de dicho proceso.

En nuestros días, la espectrometría de tiempo de vuelo es ampliamente utilizada para la determinación de dichos compuestos, aunque en esta técnica la dificultad radica en la volatilización e inyección de nuestros compuestos en el analizador, especialmente para el caso de moléculas térmicamente lábiles como el trans-resveratrol.

Son muchas las técnicas aplicadas a la resolución del problema del análisis de compuestos no volátiles, en lo que concierne a su vaporización e ionización, tales como el bombardeo con átomos rápidos (FAB) ^{161 - 163}, la desorción por campo eléctrico (FD) ^{164 - 170}, la desorción láser (LD) ^{155, 157, 171}, la desorción de plasma acoplada a la espectrometría de masas (PDMS) ^{172} y la espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS) ^{173 - 176}. El principal inconveniente de estos métodos son las limitaciones derivadas de la imposibilidad de optimizar de forma separada los procesos de desorción e ionización. A pesar de este hecho, otra técnica similar en la que los procesos de desorción e ionización se producen simultáneamente y que posiblemente ha sido la más extendida y desarrollada durante los últimos años es la desorción e ionización asistida por una matriz (MALDI) ^{177, 178}; en esta técnica se mezclan los analitos con una matriz cromófora para así incrementar los procesos de desorción e ionización, lo cual es de gran utilidad en el caso del análisis de contaminantes ^{179}, proteínas ^{154, 180 - 182}, polímeros (de hasta 100 kDa) ^{183} e incluso bacterias ^{184, 185}. Pese a no ser siempre sencilla la elección de la matriz adecuada, existe un sistema análogo llamado matriz de metal ultrafino (UFP) ^{186}, el cual posibilita trabajar con iones

Introducción

moleculares de mayor masa así como aumentar sus tiempos de producción. Un estudio sobre el empleo de radiaciones resonantes con los analitos estudiados en la técnica MALDI demuestra como la resolución espectral es mayor cuando se trabaja con longitudes de onda fuera de resonancia ^{187}.

Más recientemente los métodos de desorción desarrollados son aquellos en los cuales los procesos de desorción e ionización están separados, para así poder ser optimizados de forma independiente. Los estudios encaminados a descubrir los mecanismos que intervienen en los procesos de desorción, evidencian una fuerte dependencia con el estado físico de la superficie sobre la que se deposita la matriz a desorber ^{188}, así como con la estructura de la molécula desorbida ^{189}. Han de ser evaluados por lo tanto múltiples factores que nos ayuden a entender este proceso ^{190}, como por ejemplo: (i) la posibilidad de absorción multifotónica que provoque la disociación e ionización de la molécula, (ii) la competición entre los procesos de fotólisis y la desorción pura, (iii) la relación entre los procesos inducidos por la excitación del adsorbato y el sustrato, (iv) la influencia de la fotoactivación de las moléculas colindantes con la molécula desorbida, (v) la importancia de las colisiones producidas entre las especies desorbidas en competición con la expansión a vacío de las mismas ^{191}.

Una vez llevadas las moléculas que se pretenden analizar al estado de vapor se procede a su ionización por láser. La ionización simple de una molécula consiste en la extracción de un electrón; dicha extracción electrónica puede producirse mediante la absorción de uno o varios fotones que, a su vez, pueden tener la misma longitud de onda, es decir la misma energía, o por el contrario poseer distinta longitud de onda. La Figura 1.9 muestra un esquema de este proceso.

Introducción

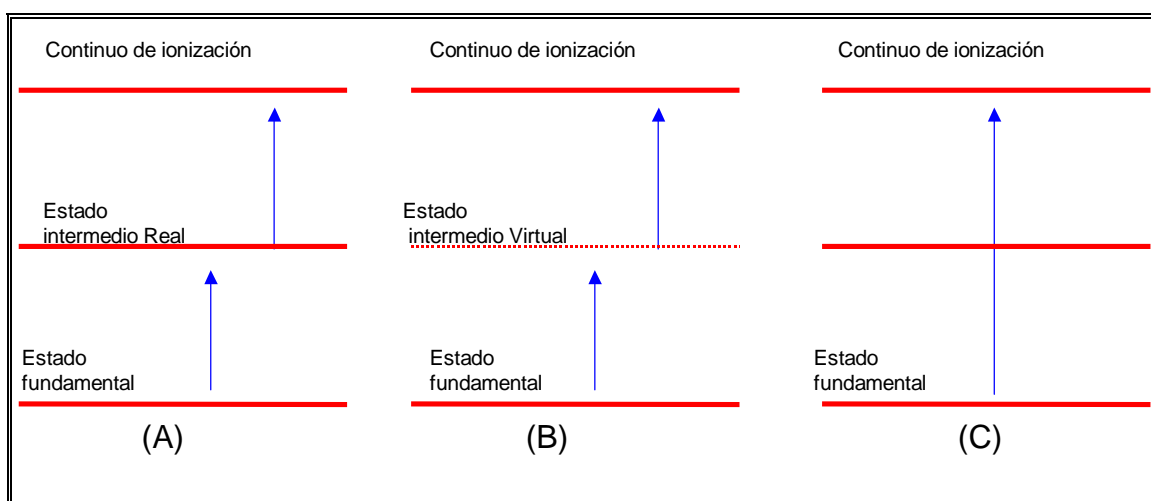


Figura 1.9 -. (A) Proceso de ionización resonante bifotónico a través de un estado intermedio real. (B) Proceso de ionización bifotónico no resonante a través de un estado intermedio virtual. (C) Proceso de ionización directa por un sólo fotón.

Este proceso no lineal es posible gracias a la alta intensidad de la radiación láser. Un proceso de absorción multifotónica puede, en principio, transcurrir a través de niveles reales o de niveles virtuales de la molécula. La vida media de un nivel virtual está en torno a 10^{-15} segundos, mientras que la de un nivel real lo está en torno a 10^{-9} y 10^{-6} segundos. Por este motivo, la probabilidad de absorción de más de un fotón es mayor si se hace a través de un estado real ^{192}, conociéndose dicho proceso como ionización multifotónica resonante (REMPI), frente a la no-resonante (MPI) que transcurre a través de estados virtuales. Esta mayor probabilidad de absorción hace que mientras la irradiancia requerida en procesos MPI es del orden de $1\text{GW}/\text{cm}^2$, para un proceso REMPI basta con irradiancias inferiores a $1\text{MW}/\text{cm}^2$. La menor irradiancia necesaria para producir el proceso de ionización, permite igualmente minimizar la fragmentación molecular durante dicho proceso.

Introducción

La principal ventaja de la técnica REMPI es la ionización selectiva de una molécula determinada en una mezcla compleja: evidentemente los estados electrónicos son diferentes para cada molécula, aún cuando éstas sean estructuralmente similares. Variando la longitud de onda del láser es posible determinar aquella que es resonante con el compuesto de interés, pero no con el resto de compuestos presentes en la muestra. Si se tiene en cuenta que para producir un proceso REMPI es necesario mucha menor irradiancia que para procesos MPI, como se indicó anteriormente, seleccionando la longitud de onda adecuada y disminuyendo la energía del láser es posible obtener un espectro simple que contenga únicamente el pico del ión molecular que se pretende analizar. Mediante esta técnica es posible, por tanto, eliminar los efectos de matriz presentes en la mayoría de las técnicas analíticas convencionales.

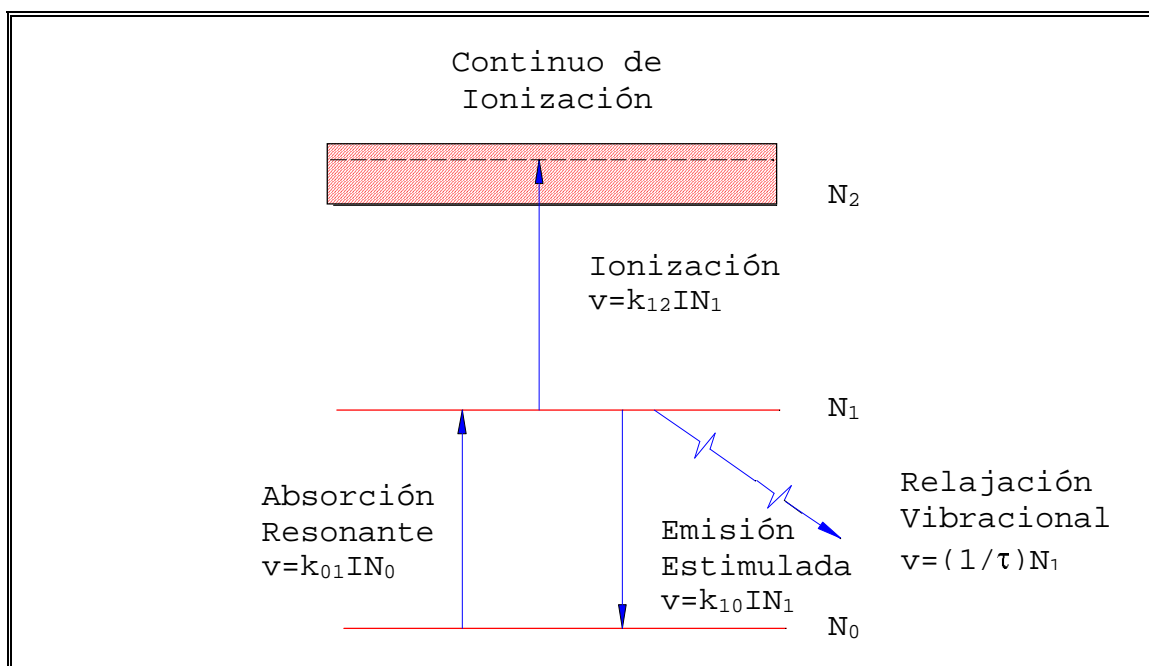


Figura 1.10 -. Esquema de un proceso de absorción bifotónica (1+1) adaptado de Jacobs y Zare (1986).

Como muestra la Figura 1.10 puede hacerse que una molécula pase de su estado fundamental al continuo de ionización por absorción de varios fotones que

Introducción

posean la energía adecuada. La ecuación cinética para un proceso de absorción multifotónica vendrá dada por:

$$\frac{d[N_2]}{d[t]} = K_n [h\nu_1]^{n_1} [h\nu_2]^{n_2} \dots [N_0] \quad [1.1]$$

donde K_n es la constante cinética del proceso de absorción multifotónica, y los exponentes n_1, n_2, \dots, n_i , son el número de fotones absorbidos de frecuencias $\nu_1, \nu_2, \dots, \nu_i$ respectivamente.

De la ecuación 1.1, puede deducirse, que si se toman logaritmos a ambos lados de la ecuación, y se representan esos valores, es decir, la representación doble logarítmica de la intensidad de señal registrada en función de la energía de ionización empleada, se obtendrá una recta cuya pendiente será igual al número de fotones empleados para que transcurra el proceso o dicho de otro modo, el número de fotones necesarios para que la molécula alcance el continuo de ionización, lo cual se conoce como orden de ionización.

Otras de las ventajas inherentes a la técnica REMPI son la gran sensibilidad, rapidez y una mayor eficiencia en la ionización si se compara con otros métodos convencionales de ionización.

En 1955 Wiley y Mc-Laren ^{193} diseñaron un analizador de tiempo de vuelo TOFMS que fue poco utilizado durante mucho tiempo debido a que su resolución en masas se encontraba limitada por el tipo de ionización empleada, generalmente ionización por impacto electrónico. Sin embargo en los últimos años la espectrometría de masas por tiempo de vuelo ha demostrado ser una de las técnicas que se adapta más fácilmente a los métodos de análisis basados en la utilización de láseres de alta potencia ^{194}. La combinación de la técnica REMPI

Introducción

con la detección por TOFMS ha sido ampliamente utilizada para la detección de elementos traza en muestras complejas ^{146, 192, 195 - 201}.

A las ventajas ya señaladas anteriormente de la ionización por láser, la detección por TOFMS añade la alta resolución y la posibilidad de realizar análisis simultáneo de varios compuestos en una muestra compleja, ya que con la técnica de tiempo de vuelo no es necesario hacer un barrido en masas, sino que se registra de forma directa todo el espectro de masas en una sólo medida. Estas ventajas hacen que la técnica REMPI-TOFMS sea ampliamente aplicada en el campo de la investigación fundamental ^{202 - 205} así como en aquellas aplicaciones analíticas que requieren alta sensibilidad y selectividad en la detección de compuestos traza en matrices complejas ^{206 - 209}, por lo que es considerada como uno de los mayores avances en el campo del análisis químico en los últimos años ^{210 - 218}.

Por otra parte, como las etapas de desorción e ionización están separadas temporal y espacialmente, es posible caracterizar estos procesos y realizar estudios dinámicos sobre ambos factores, lo cual es aplicado en la optimización de la señal registrada y por lo tanto en mejorar el límite de detección.

El sistema que hemos puesto a punto en la ULHM del Instituto Pluridisciplinar Complutense mediante el acoplamiento de la Desorción por láser de la muestra y el análisis por Ionización Multifotónica Resonante con un segundo láser con posterior detección por Espectrometría de Masas de Tiempo de vuelo, constituye por tanto un método versátil de análisis que va a permitir el estudio tanto de muestras sólidas como gaseosas en matrices complejas ^{192, 204, 212, 219 - 224}, con las ventajas detalladas anteriormente ^{13}.

Introducción

Por lo tanto a modo de concluir esta introducción, dados estos antecedentes y las necesidades expuestas, los objetivos que nos hemos propuesto en este trabajo han sido, a modo de resumen, los siguientes:

- 1) Desarrollar y optimizar una técnica de análisis por desorción e ionización láser de moléculas térmicamente lábiles como el trans-resveratrol.
- 2) Realizar el estudio espectroscópico del trans-resveratrol para optimizar el proceso de ionización selectiva de este compuesto en una matriz compleja.
- 3) Validar la técnica LD+REMPI+TOFMS para el análisis de trans-resveratrol según la norma EN-ISO-17025 ^{225} para controles analíticos en alimentos.
- 4) Estudiar el carácter fitoalexínico del trans-resveratrol en uvas infectadas por el agente patógeno *Botrytis Cinerea*.
- 5) Aumentar la resistencia natural de frutas y verduras, mediante la aplicación exógena de pesticidas naturales, sin alterar sus propiedades organolépticas ni su valor nutricional.

Como se verá en el desarrollo de este trabajo, estos objetivos han sido satisfactoriamente alcanzados.

2. SISTEMA EXPERIMENTAL Y MÉTODOS DE ANÁLISIS

2.1. DESCRIPCIÓN DE LOS SISTEMAS

El sistema experimental que se describe a continuación posibilita el acoplamiento de tres técnicas como son la Desorción Láser (LD), la Ionización Multifotónica Resonante (REMPI) y la Espectrometría de Tiempo de Vuelo (TOFMS).

El sistema empleado está compuesto por dos cámaras de alto vacío, dos láseres pulsados de alta energía sincronizados y equipos electrónicos como muestra la Figura 2.1.

Las dos cámaras de alto vacío son de acero AISI 304 y fueron construidas en el taller mecánico del Instituto Pluridisciplinar. En la primera cámara, tiene lugar la desorción de la muestra, la ionización de las moléculas desorbidas y la aceleración de los iones hacia la segunda cámara, la cual es el tubo de tiempo de vuelo donde se realiza la detección de los iones.

Las dos cámaras están unidas mediante una válvula de guillotina (Varian 6'') y poseen sistemas independientes de vacío compuesto cada uno de ellos por una bomba turbomolecular conectada a una rotatoria (Varian V250 + Telstar RD 18 y Varian V70 + Telstar 2P-3 respectivamente).

Durante los experimentos la presión se mantuvo siempre por debajo de 10^{-6} mbar en el interior de la cámara de ionización, y de 5×10^{-7} mbar en la cámara de TOF. La presión es registrada mediante dos medidores (BALZERS IKR 250), independientes para cada cámara, conectados a un lector digital (BALZERS TPG 252). La presión en los sistemas previos de vacío está controlada por dos medidores de tipo Pirani (BALZERS TPR 250).

Sistema experimental y métodos de análisis

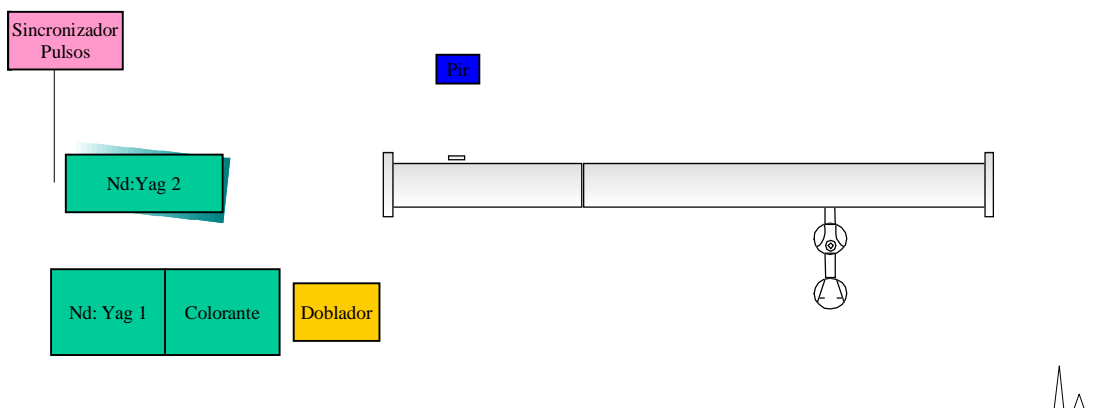


Figura 2.1 -. Vista esquematizada del sistema experimental.

En la salida de las bombas rotatorias de ambas cámaras se instalaron dos trampas de nitrógeno de capacidad aproximada de 1L para evitar que los vapores de las sustancias analizadas, así como el aceite del motor que hace girar la placa donde se deposita la muestra retornen a las cámaras.

La muestra es depositada sobre un disco de pyrex ($\phi = 50$ mm) que se sitúa en paralelo a la primera placa aceleradora, distando de ella 2 mm aproximadamente. Un motor paso a paso (CROUZET) hace girar el disco durante el análisis posibilitando así que la desorción se produzca sobre una superficie nueva de la muestra. Este sistema está acoplado a un desplazador (Varian 304) en la dirección del eje Z perpendicular al láser de desorción por lo que se incrementa el número de medidas realizables con una misma muestra.

Para desorber la muestra se emplea un láser de Nd:YAG (Continuum Surelite) en su 1^{er} (1064 nm) o 2^o armónico (532 nm), con un pulso de 5 ns de duración y trabajando en un rango de energías que oscila entre 2 y 100 mJ por pulso. El haz de moléculas desorbidas se expande dentro de la zona de aceleración donde son ionizadas por el 4^o armónico de un segundo láser de

Sistema experimental y métodos de análisis

Nd:YAG (Continuum ND81) o por un láser de colorante (Continuum ND60) acoplado al anterior y doblado en frecuencia mediante un sistema doblador (INRAD-AT-III-UV). El sistema doblador INRAD lleva incorporado un cristal doblador tipo BBO-TST que permite trabajar en un intervalo de longitudes de onda desde 235 nm hasta 730 nm. Se presenta además una ventaja adicional ya que el sistema INRAD puede buscar de forma automatizada el haz doblado óptimo mientras se realiza un barrido en frecuencia con el láser de colorante. El láser de ionización intercepta perpendicularmente el haz de moléculas desorbidas (Figura 2.2), pudiendo variarse la distancia entre las zonas de desorción e ionización entre 5 y 30 mm mediante un tornillo micrométrico.

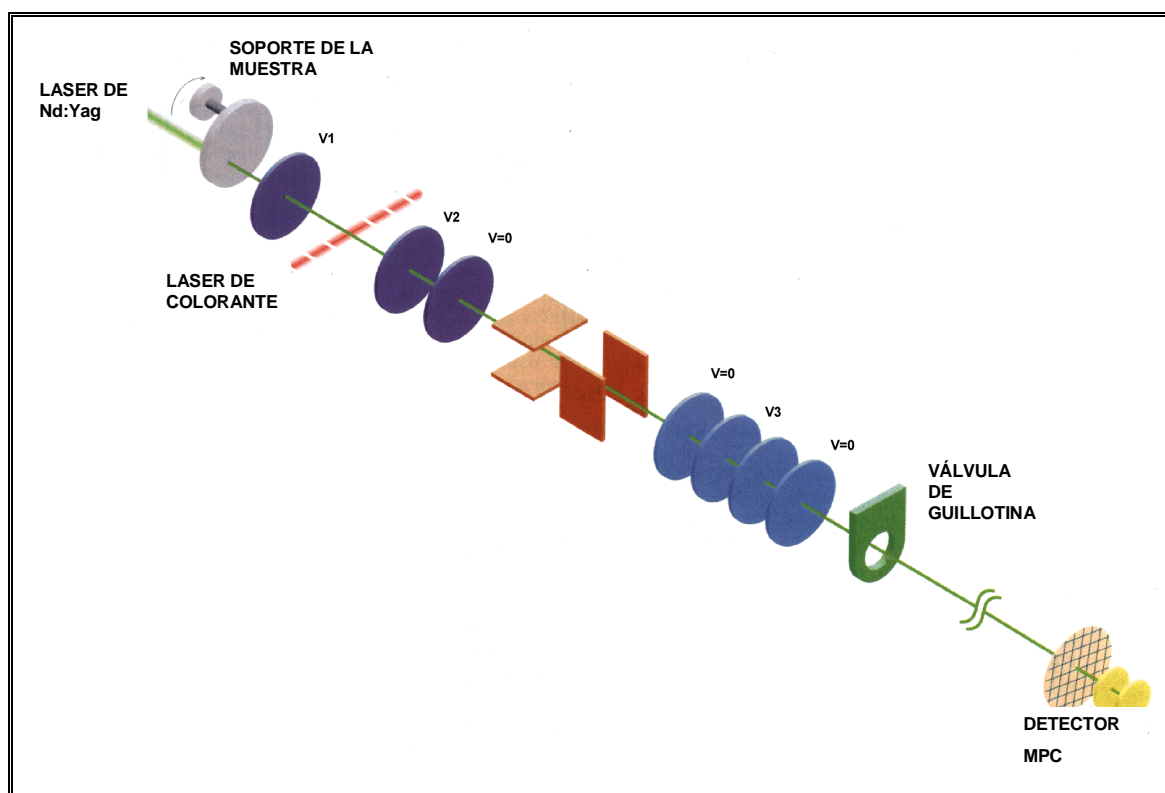


Figura 2.2 -. Detalle de la dispersión del haz de moléculas desorbidas.

El retraso entre el láser de desorción y el de ionización se controla mediante un generador de pulsos diseñado y construido en la Unidad de Láseres

Sistema experimental y métodos de análisis

y Haces Moleculares (ULHM); la frecuencia de ambos láseres es de 10 Hz, y su energía se mide utilizando un detector piroeléctrico (Gentec De-100) para las bajas energías en el intervalo de 0 a 10 mJ/pulso o con un detector calorimétrico (Coherent Fieldmaster) para energías mayores en el intervalo de 10 a 1000 mJ/pulso. El sistema cuenta además con diafragmas regulables para controlar las áreas de desorción e ionización.

Los iones producidos por el segundo pulso láser son acelerados hacia la cámara de TOF. El sistema acelerador de los iones es del tipo Wiley-McLaren. Como puede apreciarse en la Figura 2.2 está compuesto por un conjunto de placas circulares con un orificio en su centro y conectadas cada una de ellas a una fuente de alto voltaje (Stanford Research System Inc., PS325 y PS350); la aceleración se realiza en dos etapas: $V_1 \rightarrow V_2$ y $V_2 \rightarrow V_3=0$. El sistema también incluye dos deflectores en las direcciones Y y Z, perpendiculares a la trayectoria del TOF y una lente iónica Einzel que colima los iones en la dirección del detector. Una vez atravesada $V_3=0$ los iones entran en la cámara de TOF en ausencia de campo eléctrico, separándose así en función de su masa. Los iones son detectados mediante un detector de platos microcanales (Comstock CP-625C/50F) situado al final de la cámara y acoplados a 3 amplificadores de señal en serie Stanford Research System (SRS445) para aumentar aun más la resolución vertical ya que en una adquisición promediada de las señales ^a, la amplificación del ruido se minimiza frente al incremento de las señales estudiadas y se mejora así el límite de detección del sistema. Finalmente la señal es registrada por un osciloscopio digital Lecroy LC334AM que posibilita trabajar con 2 Gs/s a 500 MHz, permitiendo obtener gran resolución horizontal y vertical (20 μ V) en los espectros, y promediando dicha señal sobre 400 disparos del láser. El espectro de TOF es entonces transferido a un PC (Pentium) a través de una interfase GPIB (Nationals Instruments).

^a Hablaremos de Intensidad de señal refiriéndonos a la intensidad integrada en la anchura temporal del pulso láser.

La adquisición de datos en el PC se lleva a cabo mediante un programa diseñado por nuestro grupo investigador. Este programa, comunica por un lado al PC con el osciloscopio mediante la interfase tipo GPIB y por otro, al láser de colorante a través del puerto de serie (RS-232). Se consigue así realizar barridos en frecuencia de forma automatizada siempre y cuando el doblador INRAD esté en modo de seguimiento automático. Por lo tanto, gracias al desarrollo de este sistema es posible obtener espectros REMPI de un analito de forma automatizada. Además el programa permite recoger al mismo tiempo el espectro TOF y la energía del láser de ionización, lo que permitirá hacer las correcciones necesarias en caso de que se produzcan pequeñas fluctuaciones en la energía del láser.

En un modelo ideal el tiempo que tarda en llegar al detector un ion de masa M formado en una posición X_1 con una energía V , y acelerado por las placas V_1 y V_2 será la suma de los tiempos que tarda en recorrer las dos zonas de aceleración y la zona de vuelo libre ($V=\text{constante}$) ^{197}.

$$t_1 = 2 \cdot X \cdot C \cdot \sqrt{\frac{M}{V - V_2}} \quad [2.1]$$

$$t_2 = 2 \cdot \frac{X_2}{V_2} \cdot C \cdot \sqrt{M} \cdot (\sqrt{V} - \sqrt{V - V_2}) \quad [2.2]$$

$$t_3 = X_3 \cdot C \cdot \sqrt{\frac{M}{V}} \quad [2.3]$$

Sistema experimental y métodos de análisis

donde $C = 0.71986 \mu\text{s V}^{1/2} \text{ cm}^{-1}$ es una constante, V es la energía del ion en voltios, V_2 es el voltaje en voltios de la segunda placa aceleradora, M es la masa del ion en u.m.a, y las variables X_1 , X_2 , y X_3 en cm son las distancias que recorre el ion en cada una de las zonas según se muestra en la Figura 2.3. El tiempo de vuelo t es la suma del tiempo que tarda el ion en atravesar estas tres zonas:

$$t = t_1 + t_2 + t_3 \quad [2.4]$$

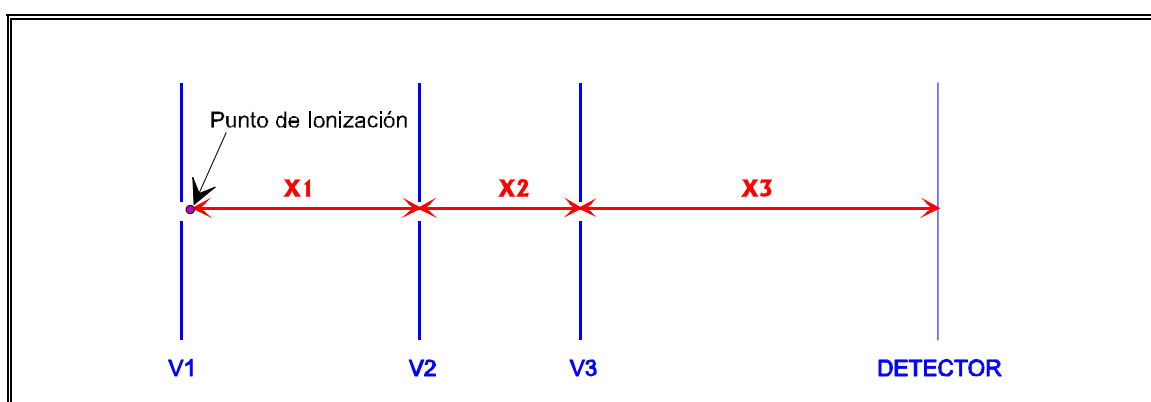


Figura 2.3 -. Detalle de las distancias recorridas por la molécula desde que es ionizada.

Basándonos en este planteamiento ideal, para conseguir el enfoque óptimo de los iones es necesario que las derivadas primera y segunda del tiempo con respecto a la energía del ión se anulen, es decir:

$$\frac{\partial t}{\partial V} = 0 \quad \frac{\partial t^2}{\partial V} = 0$$

[2.5]

Estas fórmulas utilizadas para calcular el punto focal de los iones se conocen como fórmulas de Wiley-McLaren ^{193}, según las cuales se consigue

Sistema experimental y métodos de análisis

una mayor resolución para un foco de segundo orden, es decir cuando la segunda derivada del tiempo con respecto a la energía es cero.

La obtención de una primera aproximación a los voltajes de las placas aceleradoras se realizó empleando una simulación con el programa SIMION diseñado por el “Idaho National Engineering Laboratory”. El programa SIMION permite calcular la intensidad de campo eléctrico en cada punto de un sistema de electrodos de distinto tamaño y voltaje, así como las trayectorias de los iones formados en distintos puntos espaciales para diferentes energías cinéticas de los iones y ángulos de salida iniciales.

Los parámetros a tener en cuenta en la simulación son la posición de partida del ion en el eje x del tiempo de vuelo, el tamaño de los agujeros de paso en las placas aceleradoras, la distribución inicial de energía cinética de los iones, los voltajes empleados así como el tamaño del área de ionización.

La distancia del punto de ionización respecto a la primera placa aceleradora V_1 está situada a aproximadamente 5 mm (como ya hemos comentado) para garantizar que la densidad de moléculas sea elevada en ese punto y al mismo tiempo evitar la incidencia del láser en la placa evitando así ionizaciones por impacto electrónico no deseadas.

Los voltajes obtenidos empleando este método son $V_1= 1840$ voltios, $V_2= 1580$ voltios, $V_3= 230$ voltios. En la obtención de los voltajes de nuestro modelo real se deben considerar las inhomogeneidades de los campos eléctricos aceleradores debido a efectos como el tamaño finito de las placas aceleradoras (efectos de borde), distorsiones debidas a los orificios centrales de las placas, etc., por lo que una vez obtenidos los voltajes mediante la simulación se procede a su variación experimental hasta obtener la mayor intensidad de señal posible.

Sistema experimental y métodos de análisis

Como ya se ha mencionado el sistema está diseñado para desorber muestras sólidas y posteriormente producir la ionización selectiva del analito en estado gaseoso. Para las ocasiones en las que la muestra esté en estado gaseoso, y que por lo tanto no requiera del proceso de vaporización, existe una entrada de gases mediante una válvula de aguja (WHITEY 316) en la parte superior de la cámara de ionización, posibilitando así la ionización directa del gas introducido sin necesidad de desorber. El sistema consiste en una varilla conectada a la válvula de aguja mediante un conducto Swagelok; la varilla posee a su vez un pequeño orificio ($\phi = 0,5$ mm) de salida de gases en su extremo inferior, que se sitúa orientado en el centro del agujero de la primera placa aceleradora. La inserción de este elemento sin necesidad de desmontar el soporte del motor ni el mismo motor, ayuda a preservar las condiciones de medida minimizando las perturbaciones del campo eléctrico introducidas en el sistema.

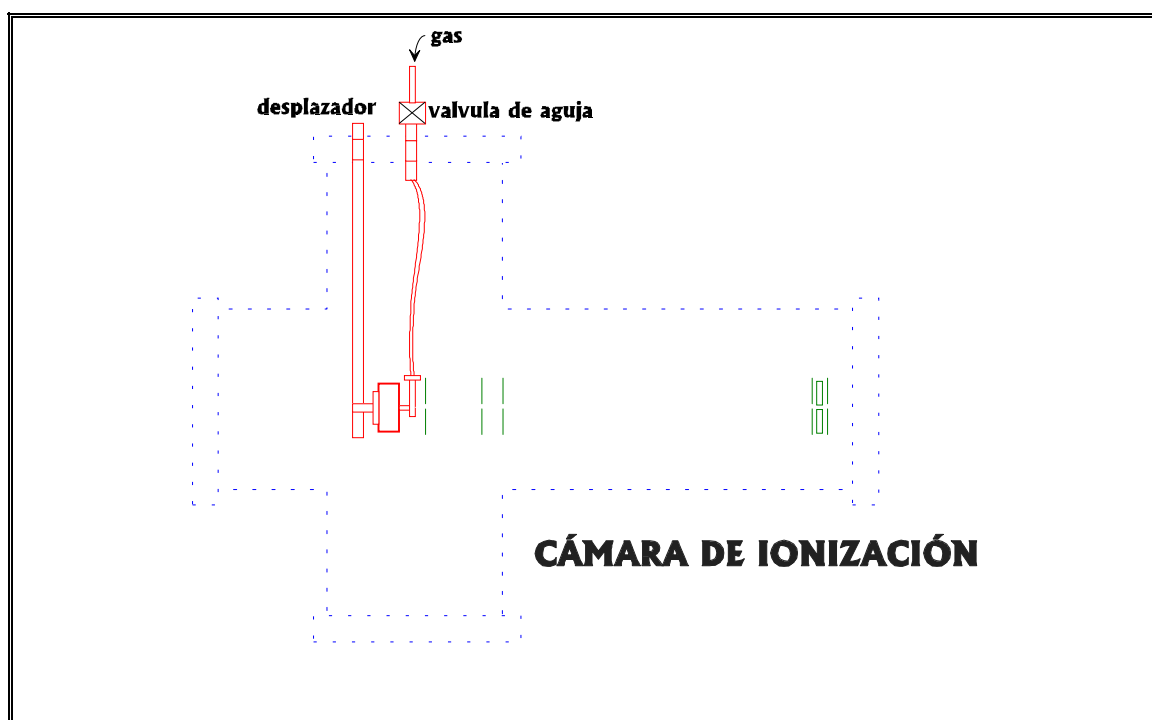


Figura 2.4 -. Sistema de entrada de gases en la cámara de ionización.

Sistema experimental y métodos de análisis

La configuración anteriormente descrita, en la que el láser de desorción incide en la parte posterior del disco pyrex sobre el que se ha depositado previamente la muestra que se va a analizar, conlleva una serie de inconvenientes inherentes a dicha configuración.

El primero de los inconvenientes es que algunas moléculas requieren para ser desorbidas eficazmente altas fluencias del láser de desorción (Nd:Yag en su 2º armónico), y eso implica el introducir una alta densidad de fotones dentro de la cámara de ionización. Durante el proceso de desorción, se producen reflexiones en las paredes de dicha cámara y algunos fotones impactan sobre las placas aceleradoras de iones, lo cual produce la emisión de iones directos procedentes de estas placas y que en última instancia interfieren en nuestro espectro de tiempo de vuelo distorsionando la señal del analito estudiado. Por otra parte es difícil evitar que el haz del láser de desorción llegue a la zona activa del detector microcanal, produciendo igualmente interferencias en el espectro de tiempo de vuelo.

Para resolver este problema se estudió la utilización de un equipo (DEI, GRX-3) que posibilita pulsar el alto voltaje suministrado a la primera placa aceleradora. Esto provoca que los iones formados en las placas del sistema acelerador, por las reflexiones de la radiación láser, no sean focalizados hacia el detector de placas microcanales y de este modo las señales obtenidas son más limpias y libres de distorsión.

Aún con la aplicación de los campos pulsados cuando se requieren energías de desorción muy altas, se producen reflexiones que afectan a otras placas aceleradoras y en consecuencia distorsionan las señales registradas, por lo que sólo resulta eficaz su aplicación en el caso de energías medias, unos 20 mJ/pulso.

Otro de los inconvenientes de la desorción trasera es su escaso rendimiento para muestras de gran espesor tal que la opacidad óptica al láser hace ineficaz dicho proceso. Aunque este nunca fue el caso en los estudios llevados a cabo en esta tesis, ello motivó en gran medida el desarrollo y puesta a punto de la desorción delantera.

DESORCIÓN DELANTERA.

Dado que la aplicación de campos pulsados para acelerar los iones no sirve para evitar el efecto del espesor de la muestra depositada ni para eliminar las distorsiones en la señal cuando se requieren altas energías de desorción (más de 20 mJ/pulso), se diseñó un esquema de desorción delantera en el que por un lado el láser de desorción incide perpendicularmente con respecto al eje del tiempo de vuelo, minimizando así los impactos fotónicos en el sistema de placas aceleradoras de iones; y por otro lado la radiación impacta frontalmente sobre la muestra para de ese modo eliminar los efectos adversos de densidad óptica en la deposición de la muestra sobre el pyrex.

Para poder aplicar dicha configuración se adquirió un nuevo motor paso a paso (RS 235-5403) de menores dimensiones que el empleado para la desorción trasera, lo cual permite variar la posición del pyrex con respecto al eje Z sin chocar contra las paredes de la cámara de ionización. Con el mismo fin se aumentó la distancia entre la primera y la segunda placa aceleradora, para de ese modo poder insertar el motor entre ambas. Las prolongaciones de los ejes que soportan las placas aceleradoras y el motor paso a paso fueron revestidos de teflón para minimizar las perturbaciones introducidas en el sistema acelerador de iones.

Sistema experimental y métodos de análisis

Gracias a esta nueva disposición se consiguen salvar los problemas planteados para el caso de la desorción trasera. Como ya veremos más adelante, se mejora notablemente la reproducibilidad del sistema con un importante descenso de la desviación estándar relativa de las medidas.

En la Figura 2.5 puede verse un esquema de cómo se produce la desorción en esta nueva configuración.

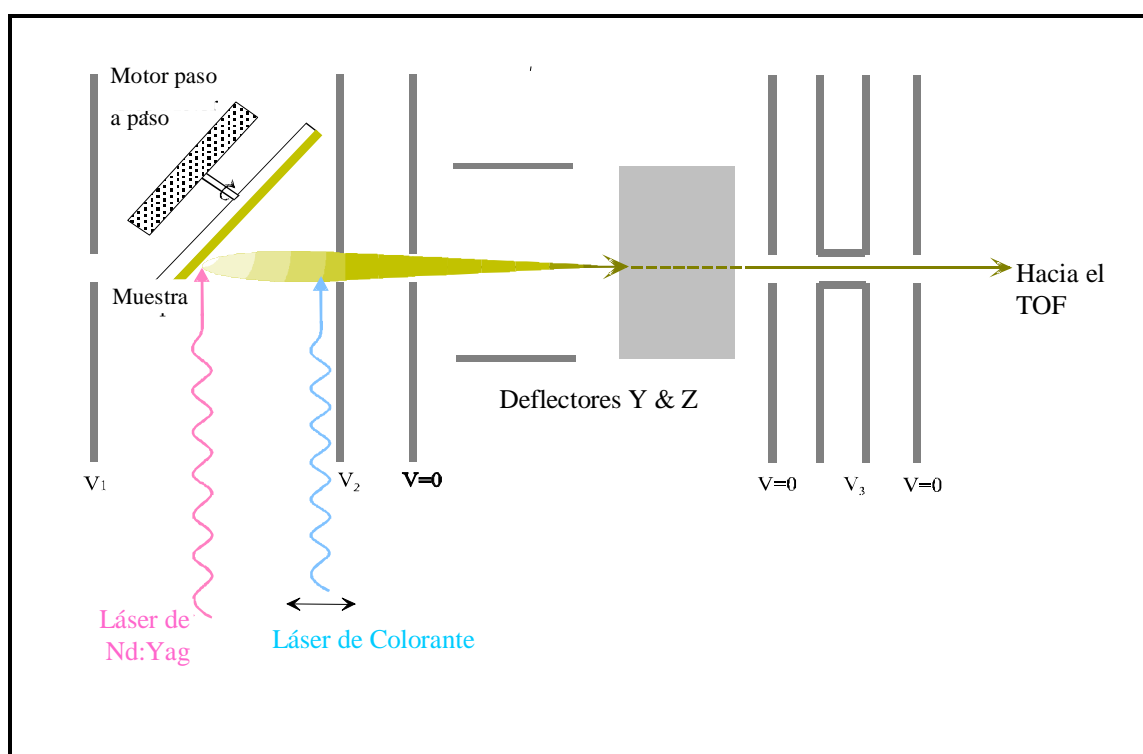


Figura 2.5 -. Esquema del proceso de desorción frontal a la muestra.

Una característica a destacar del sistema experimental es la separación espacial y temporal de los procesos de desorción e ionización, ya que permite variar el retraso temporal entre la desorción y la ionización y así ionizar moléculas que posean diferente energía cinética estudiando de ese modo la distribución de velocidades de las moléculas desorbidas. Otro método para realizar este estudio de la distribución de velocidades sería fijar un retraso

Sistema experimental y métodos de análisis

temporal entre los procesos de desorción e ionización y hacer la deconvolución de la señal registrada en el osciloscopio siempre y cuando se fije un área concreta para la ionización ya que aseguramos de este modo la ionización de moléculas en un intervalo espacial determinado. Consecuentemente las moléculas en ese espaciado poseen energías cinéticas diferentes ^{226}. Sin embargo, este último método conlleva un arduo y tedioso tratamiento matemático en el que pesan de manera importante los errores experimentales.

Otra ventaja, es el corto tiempo de análisis requerido por el sistema. Un espectro de tiempo de vuelo es promediado durante 40 segundos; si consideramos que la frecuencia de repetición de nuestro láser es de 10 Hz, eso hace que obtengamos un promedio sobre 400 vaporizaciones de nuestra muestra, es decir, el proceso de desorción y la posterior ionización del analito se repite 400 veces en un periodo de 40 segundos. Podemos reducir aún más este tiempo de análisis aunque a costa de una pérdida de precisión, como es evidente. No debe olvidarse para evaluar estos costes de tiempo, que se requiere un periodo de entre 5 a 10 minutos cada vez que se introduce la muestra para alcanzar el vacío adecuado en la cámara de ionización. Las cámaras de alto vacío están separadas por una válvula de guillotina que posibilita no perder el vacío en la cámara de tiempo de vuelo mientras se abre o cierra la cámara de ionización para introducir o sacar la muestra, haciendo posible la recuperación del vacío en un breve periodo de tiempo. Los procesos de deposición de la muestra, una vez optimizados tienen una duración de unos 4 minutos para el triturado y de 15 minutos cuando trabajamos con el aceite esencial (deposición y secado a temperatura ambiente) por lo que en un tiempo total de 25 minutos podemos realizar una determinación cualitativa de trans-resveratrol.

2.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

Los procesos de preparación de muestras juegan un importante papel en todos los métodos analíticos pudiendo establecerse distintas fases en este proceso; una primera llamada *muestreo primario* consistente en la toma la muestra de su entorno natural, una fase posterior de transporte y conservación de esa muestra hasta el laboratorio, otra fase llamada comúnmente *muestreo secundario* consistente en una nueva selección de las muestras recogidas y posteriormente una última fase conocida como *pretratamiento* para acondicionar las muestras seleccionadas de tal manera que puedan ser sometidas al proceso de análisis.

El objetivo principal de las fases de muestreo primario y secundario es la de conseguir una reducción de la cantidad o el volumen de la muestra a analizar asegurando que las muestras recogidas sean representativas de la población que queremos estudiar para que en última instancia los resultados obtenidos en el proceso de análisis proporcionen una información fiable de la población estudiada. No deben descuidarse tampoco las etapas de transporte y conservación de la muestra desde que se produce el muestreo primario hasta que se efectúa el muestreo secundario, asegurando para ello las condiciones físico-químicas necesarias para que los analitos estudiados no sufran deterioro alguno. En esta línea de actuación las muestras han de transportarse en recipientes adecuados, a baja temperatura si es que pueden sufrir riesgo de descomposición térmica, incluso pudiendo ser necesario su transporte adsorbidos en una fase sólida o estabilizados con aditivos adecuados según el tipo de muestra.

Dependiendo del estado inicial de la muestra y de la técnica de análisis empleada son muchos los procesos que pueden ser necesarios en la fase de pretratamiento tales como la filtración, dilución, ajuste de pH, evaporación, concentración, centrifugación, derivación, calentamiento, precipitación,

Sistema experimental y métodos de análisis

digestión, homogeneización, enfriamiento, liofilización, diálisis, extracción en fase líquida, etc.,. Para hacernos una idea, en general los procesos de pretratamiento ocupan un 61% del tiempo de análisis, frente a un 6% del tiempo requerido en los muestreos primarios y secundarios, al 6% del proceso de medida de los analitos en cuestión y al 27 % del empleado en para el tratamiento de datos y presentación de resultados^{227}.

No debe olvidarse que, además de ser los responsables del mayor consumo de tiempo, estos procesos de preparación de muestra constituyen una de las mayores fuentes de error del proceso de análisis, llegando a ser la causa de un tercio de los errores propagados en los métodos típicamente cromatográficos, contribuyendo con un 20% el analista al error total, por lo que de manera generalizada la automatización de estas etapas puede en general llegar a reducir hasta en un 50% el error total de un método en base a los estudios realizados para estas técnicas^{227}.

Para la aplicación de la técnica de análisis LD + REMPI + TOFMS (Desorción Láser + Ionización Multifotónica Resonante + Espectrometría de Tiempo de Vuelo) a frutas y verduras se utilizó uno de los dos procesos de pretratamiento siguientes: un proceso de triturado de la las muestras o bien el prensado de las misma para extraer su aceite esencial. El objetivo principal de la aplicación de uno u otro proceso es conseguir una mejor homogeneización de la muestra en la placa pyrex. Por este motivo se diseñó, con el propósito de minimizar las inhomogeneidades en la cantidad de muestra depositada sobre el pyrex, un sistema de dispersión de muestras sólidas.

2.2.1. TRITURADO DE LA MUESTRA.

La mayoría de las muestras agrícolas de interés son proporcionadas en su estado natural (uva, tomate, pepino, pimiento, uva, etc.), por lo que se procede a su dispersión, entendiéndose como tal al proceso de división y distribución de la fase sólida en un disolvente volátil. Se emplea un disolvente volátil en el que no sean solubles los analitos para facilitar el proceso de eyección mediante el cual se evapora el disolvente mientras que la muestra queda depositada sobre el pyrex.

La dispersión sobre el disco se realiza mediante un dispersor-homogeneizador (ULTRA-TURRAX T25 IKA) con una varilla S25N-25F la cual asegura un tamaño de partícula de 5 a 25 μm . Como agente dispersante se emplea acetona, ya que servirá a su vez como vehículo portador de las partículas en su posterior pulverización mediante un aerógrafo (ROTRING-255004) con una boquilla de 0,4 mm de diámetro.

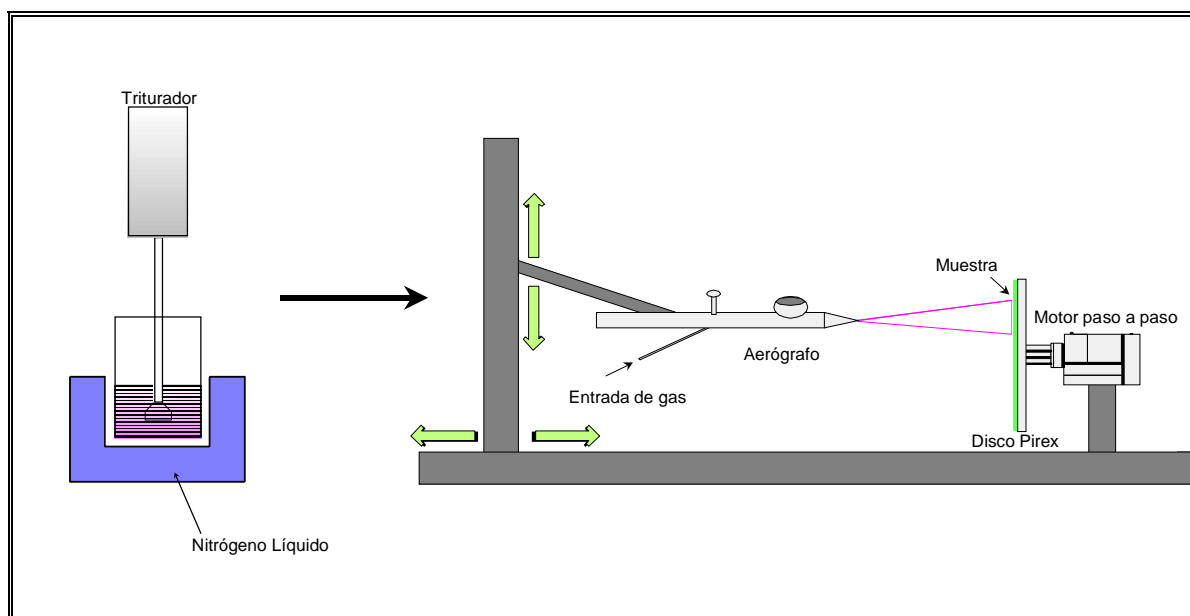


Figura 2.6 -. Sistema dispersor de la muestra sobre el disco de pyrex.

Sistema experimental y métodos de análisis

Como muestra la Figura 2.6, el sistema de homogeneización consta de un motor (CO LTD MICRO G2), que hace girar la placa pyrex a velocidad constante. Frente a la placa y a una distancia regulable se sitúa el aerógrafo que trabaja de modo continuo impulsando la muestra mediante un gas inerte (N_2) a una presión aproximada de 2 bar. La acetona empleada como disolvente se evapora rápidamente de la superficie del disco pyrex quedando así uniformemente distribuida sobre éste la muestra a analizar. De esta forma se asegura una muy buena homogeneidad de la deposición.

Como es bien sabido salvo algunas excepciones importantes como la del agua, la mayoría de los materiales se contraen cuando se enfrían y se hacen más quebradizos. Tomando como base este principio físico se realizó el proceso de triturado empleando nitrógeno líquido para enfriar la muestra, y los resultados fueron los esperados ya que se obtiene un tamaño de partícula menor a la vez que se minimiza el riesgo de descomposición térmica debido al calentamiento de la muestra durante el triturado ^{228}. Las deposiciones obtenidas empleando $N_2(\text{liq})$ presentan un mayor grado de homogeneización.

Para comparar la homogeneidad superficial de las placas de pyrex y poder así optimizar los parámetros experimentales como la presión empleada para eyectar la muestra o la distancia del aerógrafo a la placa, se desarrolló un sistema basado en la medida de la luz reflejada por la superficie de la película de muestra depositada sobre el pyrex. Se sitúa el disco pyrex con la muestra depositada sobre él en una caja oscura, se ilumina el disco frontalmente y se registra la luz reflejada mediante una cámara CCD. Las imágenes registradas son tratadas mediante un programa que mide las variaciones de intensidad de luz recogida por la cámara y nos proporciona un mapa de la morfología de la capa superior de la muestra depositada. Dicho método puede mejorarse empleando un láser como fuente emisora de la luz, aunque el sistema descrito en su conformación original nos permitió la optimización del sistema de deposición.

Sistema experimental y métodos de análisis

Una muestra de las imágenes tomadas se presenta en la Figura 2.7, en la que puede apreciarse como la homogeneidad de la deposición es mayor si se mide de manera concéntrica en el disco con respecto a la misma deposición medida en uno de los diámetros del disco. Por este motivo, y dado que el láser desorbe en la dirección concéntrica del disco, las medidas registradas corresponden a la media de 3 promedios medidos en 3 anillos distintos de la placa y correspondiendo cada uno de ellos a su vez al promedio de 400 vaporizaciones de muestra.

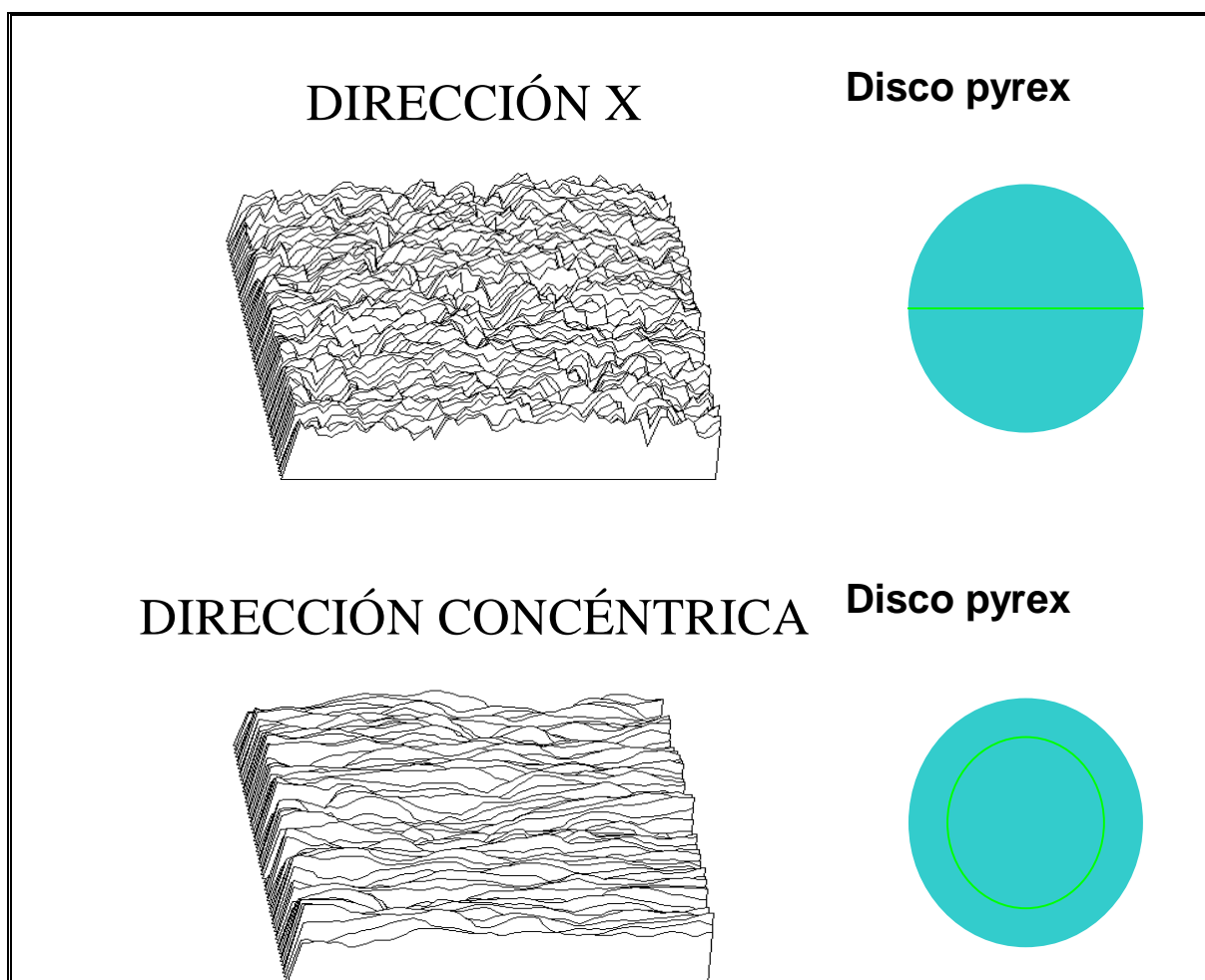
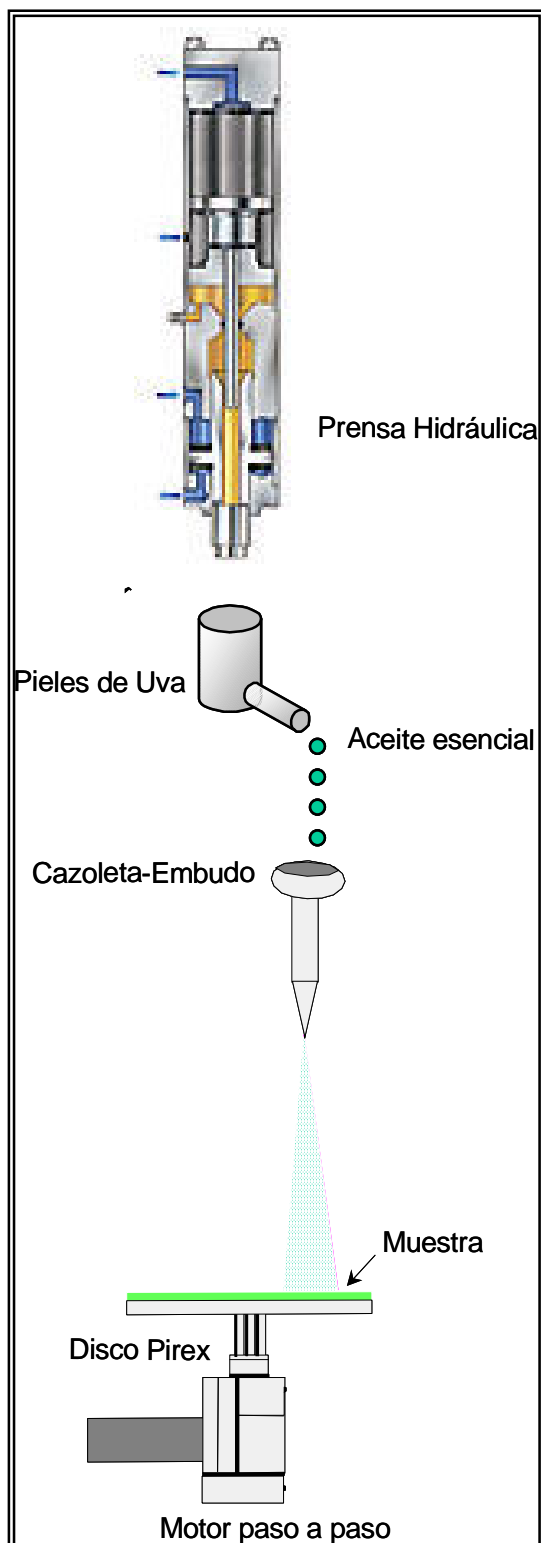


Figura 2.7 -. Morfología de la deposición de muestra sobre el disco pyrex.

2.2.2. PRENSADO DE LA MUESTRA.



Para evitar el proceso de triturado de la muestra y aumentar la cantidad de trans-resveratrol depositado sobre la placa, se decidió acometer un tratamiento inicial aún más directo de la muestra, consistente en el prensado en frío de la muestra y la deposición sobre el pyrex del aceite esencial obtenido a partir de dicha muestra.

Este nuevo sistema de prensado es empleado de forma tradicional para obtener los principios activos de flores y plantas en multitud de culturas. Plantea con respecto al método del triturado una forma más directa, sencilla y rápida de preparar la muestra a la vez que posibilita partir de un mayor volumen de muestra inicial. Utilizamos para el prensado una prensa hidráulica (Rogen) a 100 kg /cm^2 tal y como se recoge en la Figura 2.8. Se debe, en cualquier caso, demostrar que los restos de la matriz inicialmente empleada no contiene niveles significativos del analito estudiado, para poder así aplicar dicho método de preparación.

Figura 2.8 -. Sistema de prensa y dispersor de las muestras.

2.3. CONDICIONES DE MEDIDA

Existen parámetros experimentales ajustables en función de la molécula estudiada tales como la longitud de onda en la que se produce el REMPI o el retraso del láser de ionización con respecto al láser de desorción, etc.

La presión de medida en ambas cámaras oscila entre 1×10^{-7} y 1×10^{-8} mbares, evitando que el detector de platos microcanales opere a presiones superiores en valor absoluto de 3×10^{-6} mbares.

Los voltajes de las placas aceleradoras son:

- Para la configuración de desorción trasera $V_1=1580$ voltios, $V_2=1350$ voltios, $V_{\text{lente}}=230$ voltios.
- Para la configuración de desorción delantera $V_1=2600$ voltios, $V_2=2500$ voltios, $V_{\text{lente}}=850$ voltios.

El voltaje del detector fue en ambos casos $V_{\text{MCP}} = - 2000$ voltios.

La distancia entre el punto de ionización respecto al de desorción es de 5 mm teniendo en cuenta que una variación en esta distancia debe ser compensada con la modificación del retraso entre ambos láseres para optimizar la señal.

El retraso entre ambos láseres optimizado experimentalmente es de 25 μs .

La duración de un pulso láser oscila entre los 4 y los 6 ns, y la frecuencia de repetición para ambos láseres es de 10 Hz. En general, las medidas se realizan promediando 400 espectros (400 vaporizaciones) con el osciloscopio Lecroy LC334AM (500 Mhz 2 GS/s).

Sistema experimental y métodos de análisis

La longitud de onda del láser de desorción es de 532 nm en el caso de la configuración de desorción trasera y de 1064 nm en la configuración de desorción delantera.

La energía de desorción es un parámetro experimental cuyo valor se fija al obtener la máxima intensidad de señal con la mínima fragmentación de la masa estudiada. En el caso del trans-resveratrol dependiendo de la configuración experimental empleada y la matriz en la que esté contenido:

$$\lambda = 532 \text{ nm}$$

- Para la desorción trasera con trans-resveratrol puro $E_d = 20 \text{ mJ / pulso}$.
- Para la desorción trasera con piel de uva $E_d = 35 \text{ mJ / pulso}$.

$$\lambda = 1064 \text{ nm}$$

- Para la desorción delantera con trans-resveratrol puro $E_d = 20\text{-}60 \text{ mJ / pulso}$.
- Para la desorción delantera con piel de uva $E_d = 40 \text{ mJ / pulso}$.
- Para la desorción delantera con aceite esencial de uva $E_d = 50 \text{ mJ / pulso}$.

La longitud de onda resonante para el caso del Trans-resveratrol es $\lambda=302.1 \text{ nm}$ y la energía de ionización empleada varía entre 150 y 550 $\mu\text{J / pulso}$.

3. RESULTADOS

Caracterización y Validación de la técnica

3.1. CARACTERIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA.

Previamente a los estudios necesarios para validar la técnica analítica será necesario caracterizar algunos de los parámetros experimentales específicos de este nuevo método, tales como la manera de calibrar el sistema, conocer la resolución experimental en masas del espectrómetro de tiempo de vuelo, las energías óptimas de desorción e ionización empleadas durante el proceso de análisis y la validez del método de preparación de muestra escogido.

3.1.1. CALIBRACIÓN EN MASAS.

De forma genérica, se entiende por calibración al conjunto de operaciones que permiten establecer, en condiciones específicas, la relación existente entre los valores indicados por un sistema de medida y los valores correspondientes a una magnitud obtenidos mediante un patrón de referencia ^{229, 230}.

El resultado de una calibración permite la estimación de los errores de indicación del sistema de medida, o la asignación de valores a las marcas de escalas arbitrarias. En nuestra técnica de análisis, una vez que la muestra ha sido vaporizada e ionizada, se trata de asignar a qué masas corresponden las moléculas detectadas en el espectro de tiempo de vuelo, por lo que es necesario en primer lugar realizar la calibración del sistema para conocer la correspondencia entre tiempos de vuelo y masas moleculares.

La calibración se realiza mediante la introducción de tolueno a través de la válvula de aguja de la cámara de ionización. Las propiedades físicas del tolueno se hallan recogidas en la siguiente tabla:

Resultados

Tolueno: C₇H₈
Masa: 92 uma
Punto de ebullición: 384 K
Presión de vapor: 38 mbar
Potencial de ionización: 8,82 ev

Tabla 3.1 -. Propiedades físicas del tolueno.

Además de poseer una presión de vapor elevada, se empleó tolueno por ser fácilmente ionizable a 266 nm ^{231}. En el espectro de la Figura 3.1 puede apreciarse la absorción de radiación entre 200 y 290 nm. Se usó tolueno desgasificándolo previamente mediante ciclos de congelación y descongelación por contacto del matraz que lo contiene con nitrógeno líquido a la vez que se conecta el matraz a vacío. Posteriormente el vapor de tolueno se introduce dentro de la cámara de ionización a través de la válvula de aguja.

Una vez obtenido el espectro de tiempo de vuelo, si se desprecian los efectos de diferente velocidad inicial podría considerarse que todos los iones poseen la misma energía cinética al llegar a la cámara de TOF, o lo que es lo mismo, para dos iones de diferente masa m_1 y m_2 :

$$E_c(m_1) = E_c(m_2) \quad [3.1]$$

y considerando la dependencia de la energía cinética con el cuadrado de la velocidad:

$$E_c = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 \quad [3.2]$$

$$v = \frac{ds}{dt} \cong \frac{\Delta s}{\Delta t} \quad [3.3]$$

Resultados

$$E_c = \frac{1}{2} \cdot m \cdot \left(\frac{\Delta s}{\Delta t} \right)^2 \quad [3.4]$$

así pues para estas dos masa m_1 y m_2 podemos encontrar una relación en función de sus respectivos tiempos de vuelo:

$$\frac{m_2}{m_1} = \left(\frac{t_2}{t_1} \right)^2 \quad [3.5]$$

Del mismo modo es posible calibrar el equipo conociendo el incremento de masa de dos señales cualesquiera de nuestro espectro:

$$m_2 = m_1 + \Delta m \quad [3.6]$$

que sustituyendo en la ecuación 3.5 obtenemos:

$$m_1 = \frac{\Delta m}{\left[\left(\frac{t_2}{t_1} \right)^2 - 1 \right]} \quad [3.7]$$

ambas expresiones, 3.5 y 3.7, servirán para la calibración de masas de nuestro espectro.

Resultados

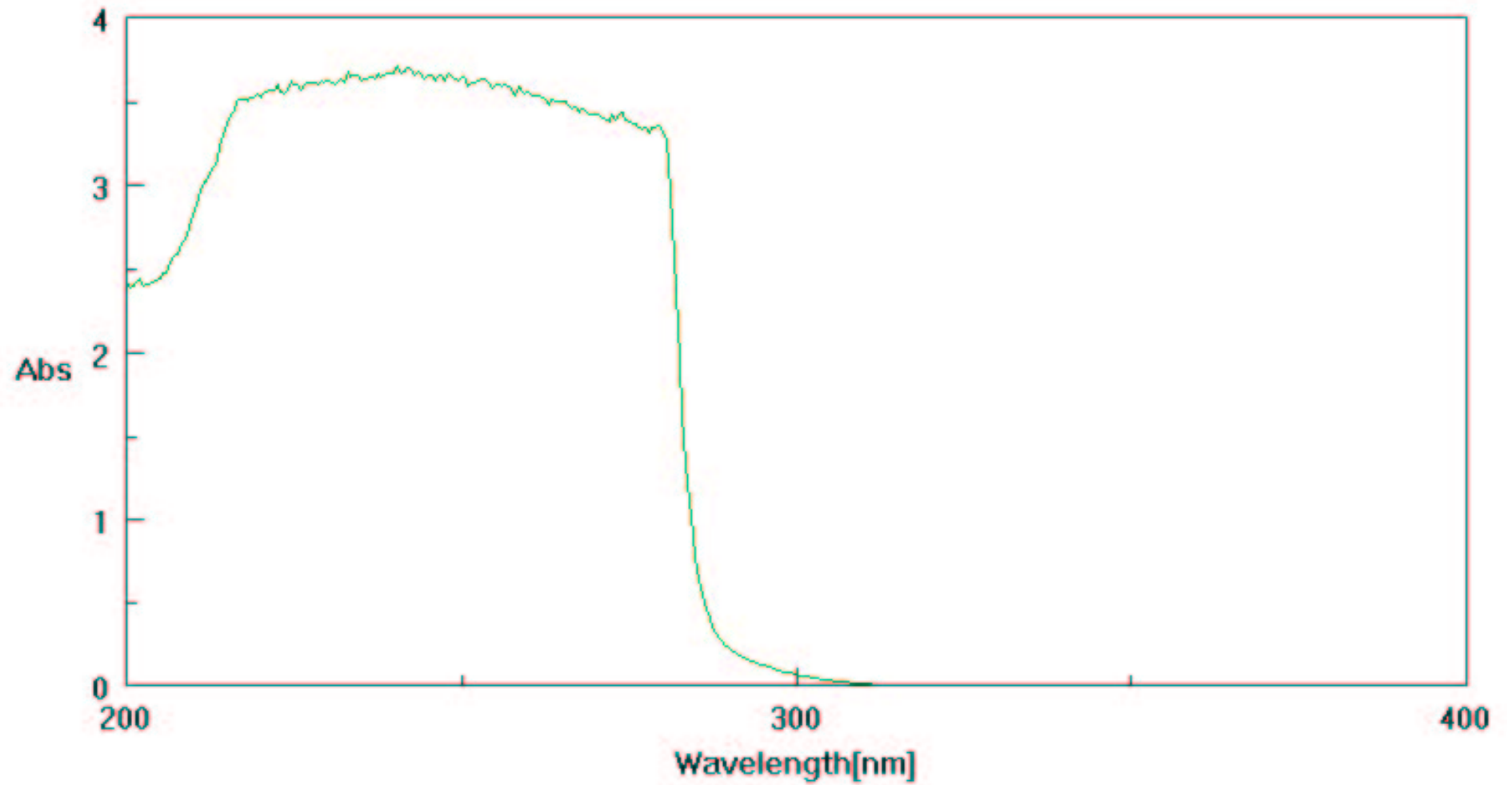


Figura 3.1 -. Espectro de absorción UV-Vis de tolueno.

Resultados

Al introducir tolueno en la cámara de ionización, éste es ionizado y detectado, sirviéndonos el pico de la señal de tolueno para calibrar en masas el resto del espectro empleando únicamente la ecuación 3.5.

En la Figura 3.2 pueden observarse varios espectros de tiempo de vuelo de dicho compuesto; el vapor de tolueno fue ionizado con el 4º Armónico del láser de Nd:YAG (266 nm) con una fluencia baja del láser para evitar posibles fragmentaciones. Se aprecian en estos espectros como en función de los distintos parámetros experimentales empleados, el tolueno aparece a distintos tiempos de vuelo, sin embargo, gracias a su referencia podemos calibrar en cada uno de los casos la masa a la que correspondería cualquier otro compuesto presente en el espectro de tiempo de vuelo.

Resultados

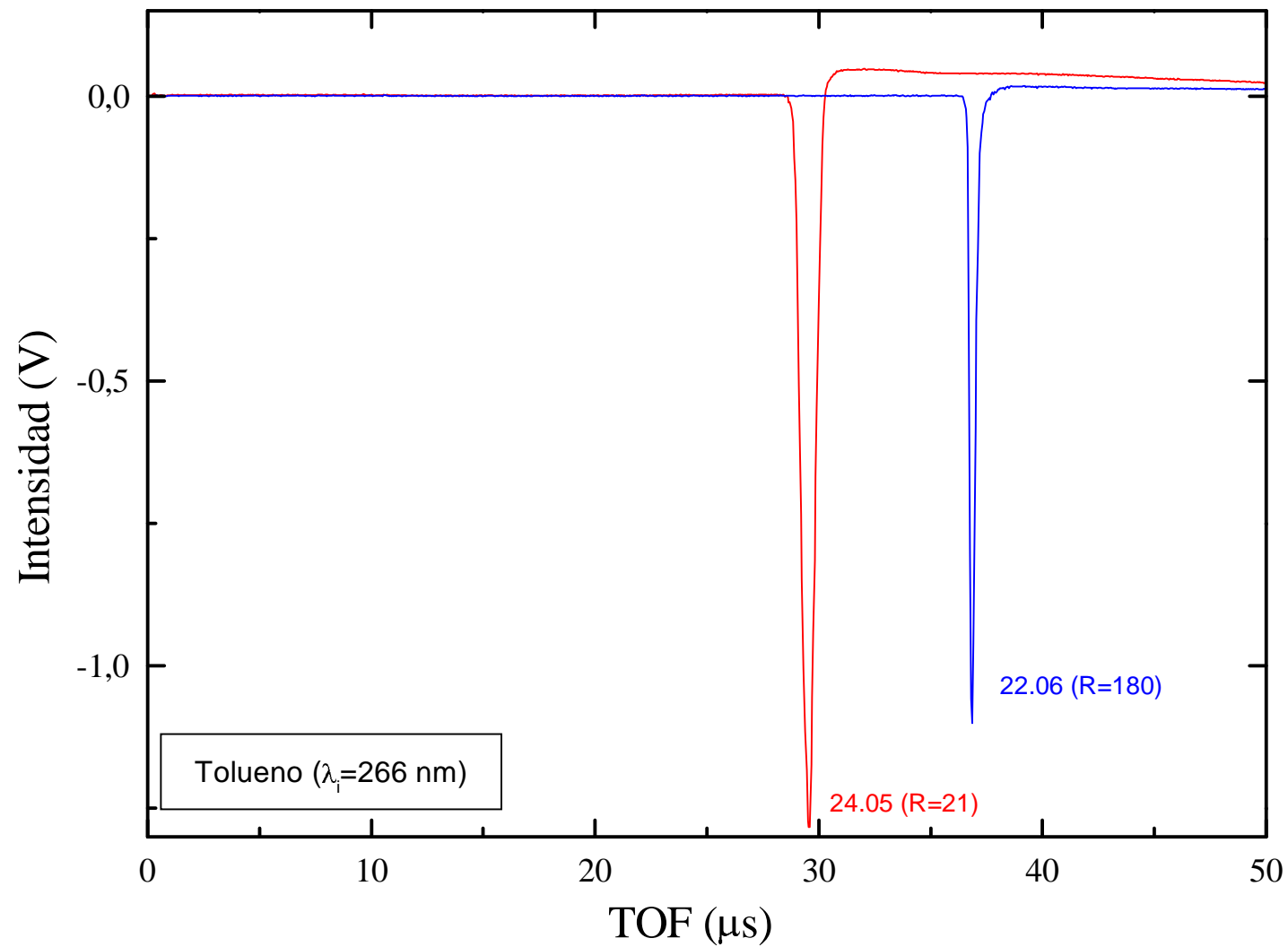


Figura 3.2 -. Espectros de tiempo de vuelo del tolueno ionizado a 266 nm, donde R es la Resolución en masas del sistema.

Resultados

En el caso específico del análisis de trans-resveratrol, la muestra es depositada sobre la superficie de un disco de vidrio pyrex. Algunos de los elementos constituyentes del pyrex son el Hierro y el Cromo, cuya presencia fue corroborada mediante el estudio de la emisión atómica en el plasma desorbido de la superficie del pyrex, como se muestra en la Figura 3.3.

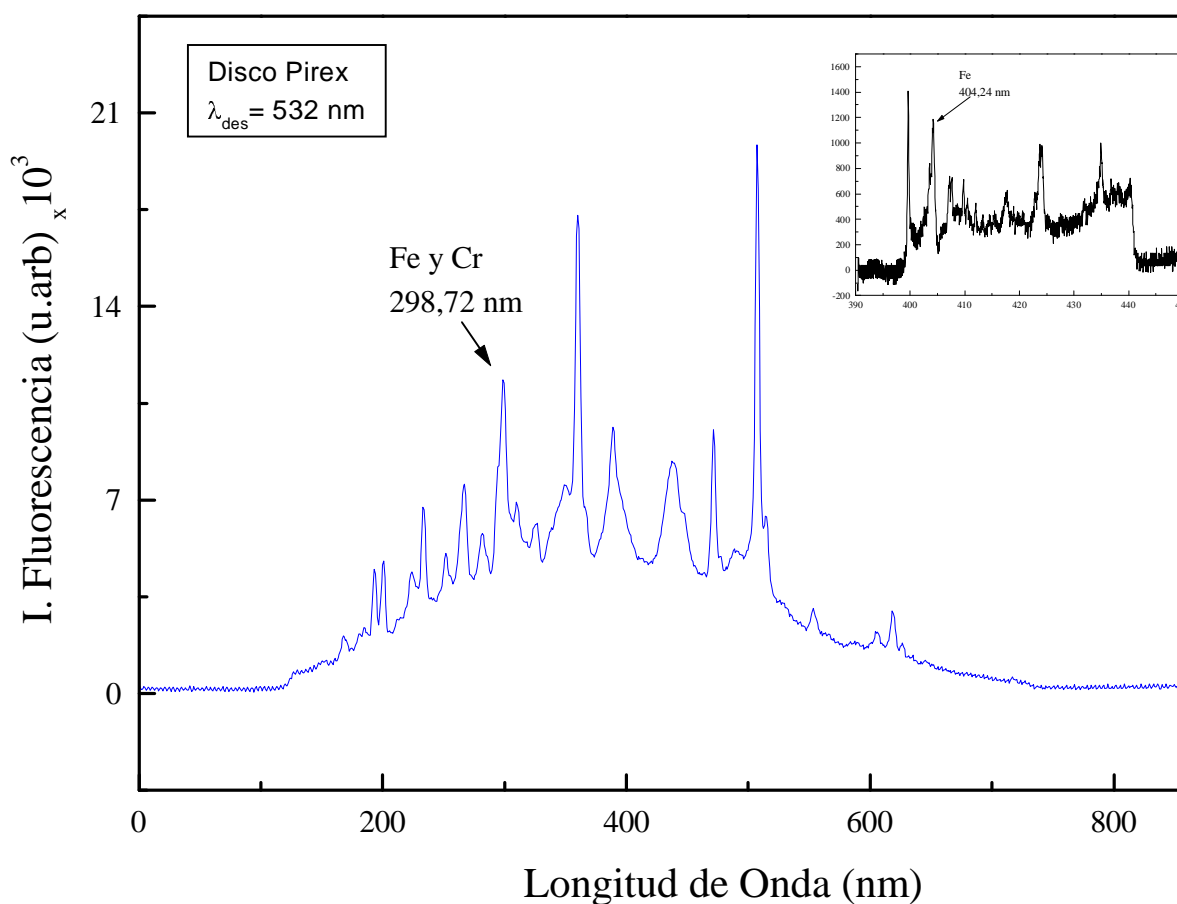


Figura 3.3 -. Espectro de fluorescencia inducida por láser del disco de pyrex.

Estos dos elementos presentan una fuerte absorción en la longitud de onda empleada para ionizar el trans-resveratrol (302,1 nm), por lo que pueden emplearse para calibrar los espectros de tiempo de vuelo empleando como patrón el Hierro y el Cromo, un ejemplo de esta calibración puede observarse en la Figura 3.4.

Resultados

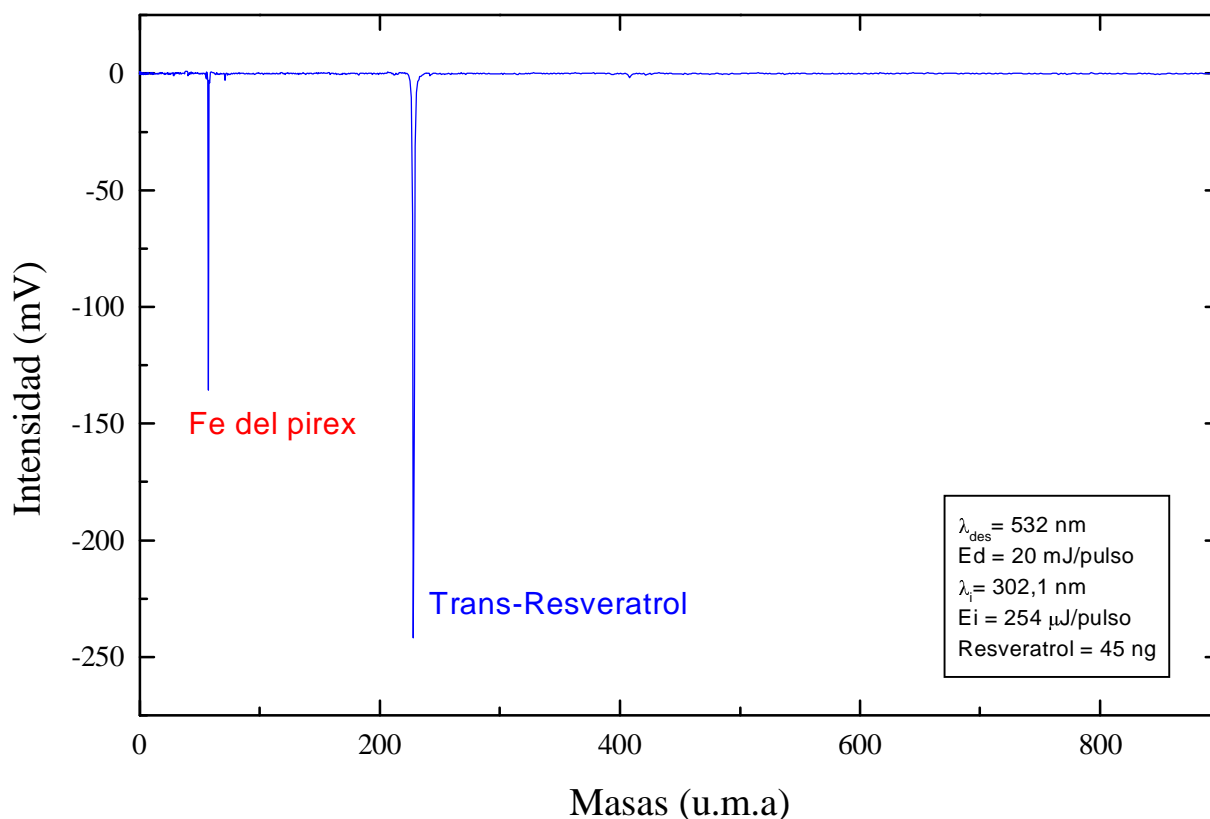


Figura 3.4 -. Espectro de masas de trans-resveratrol puro depositado sobre el disco de vidrio pyrex y calibrado con el pico de Hierro (masa 56).

3.1.2. RESOLUCIÓN.

Se define la resolución instrumental para una señal determinada como el cociente de la masa y Δm , siendo Δm la anchura de la señal medida en la altura media de la señal (FWHM: Full Width Half Maximum). En el caso concreto de medida de tiempo de vuelo puede encontrarse una expresión equivalente para la resolución de nuestro sistema.

Las moléculas desorbidas una vez ionizadas poseen distinta energía potencial en función de la posición en que se encuentran en el campo eléctrico

Resultados

respecto de las placas aceleradoras. Cuando los iones llegan a la posición $V_3=0$, toda la energía potencial se ha transformado en energía cinética, de tal forma que cada ion adquiere una velocidad diferente en función de su masa.

Si se considera la ecuación:

$$E_c = \frac{1}{2}mv^2 \quad [3.8]$$

donde m es la masa del ión y v su velocidad, puede de la ecuación 3.8 despejarse la masa:

$$m = \frac{2 \cdot E}{v^2} = \frac{2 \cdot E \cdot t^2}{s^2} \quad [3.9]$$

donde s es la distancia recorrida por el ion. Puede observarse la relación entre la masa del ion y t su tiempo de llegada al detector. Derivando la expresión 3.9 calcularemos el incremento de masas Δm :

$$\Delta m = \frac{4 \cdot E}{s^2 \cdot t \cdot \Delta t} \quad [3.10]$$

por lo que nuestra resolución espectral vendrá dada como:

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{t}{2 \cdot \Delta t} \quad [3.11]$$

Δt se define como la anchura de la señal medida en la altura media del pico de tiempo de vuelo, por tanto:

Resultados

$$R = \frac{t}{2 \cdot (\Delta t)_{FWHM}} \quad [3.12]$$

El estudio para la determinación de R se realizó directamente sobre las moléculas de interés analítico. Para ello se optimizó la energía de desorción del láser de tal forma que maximizamos la señal sin llegar a fragmentar la molécula (20 mJ/pulso), mientras que la energía de ionización empleada estaba comprendida entre 1 mJ y 3 mJ. En la Figura 3.2 se muestra un espectro del trans-resveratrol en el que se obtuvo una resolución de $R=715$ u.m.a. es decir puede distinguirse inequívocamente una masa de 714 u.m.a. de otra de 715 u.m.a.

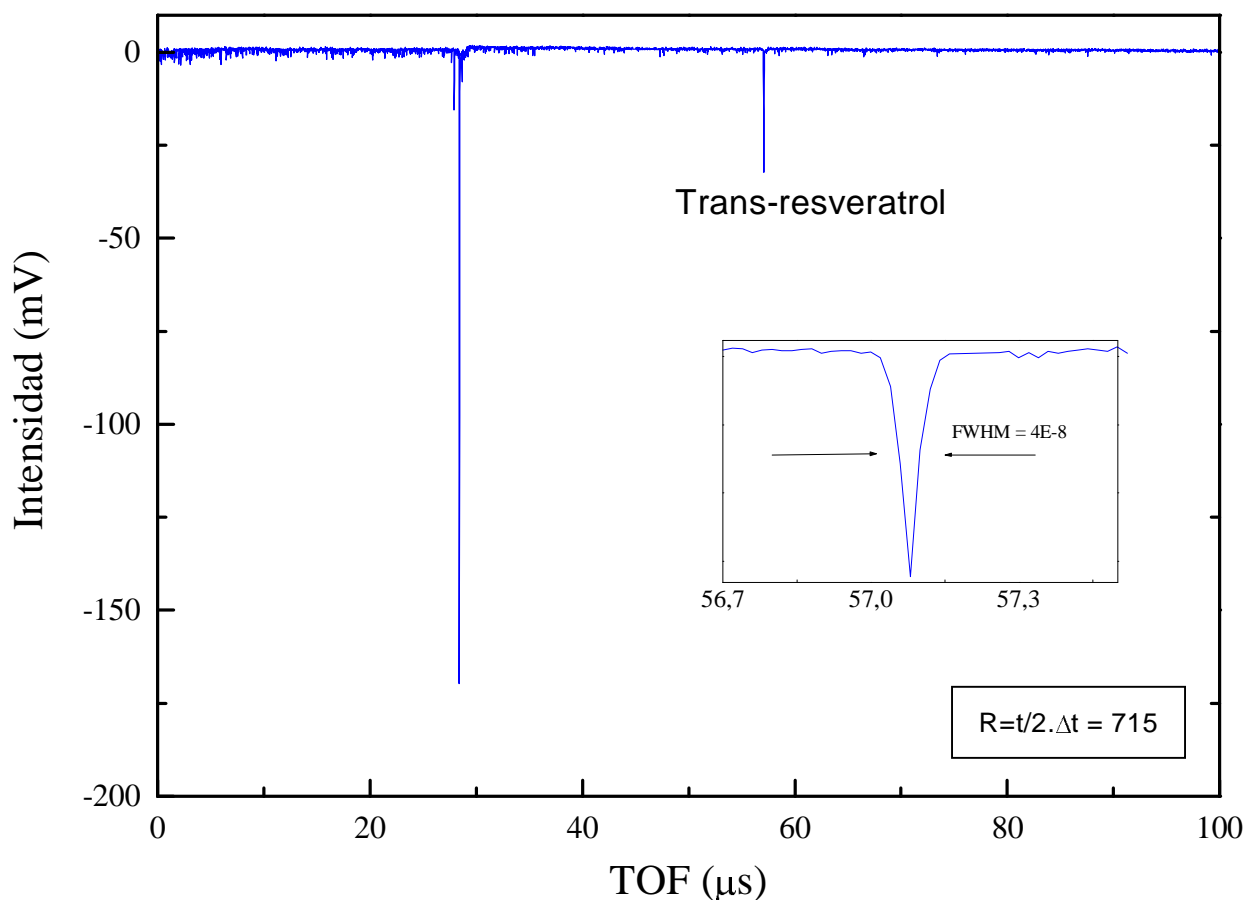


Figura 3.5 -. Espectro de tiempo de vuelo de trans-resveratrol puro en el que se ha calculado la resolución en masas del sistema.

Resultados

Considerando que las masas de los analitos estudiados se encuentran en el orden de 200 a 400 u.m.a, una resolución de 715 u.m.a es más que suficiente para satisfacer nuestras necesidades analíticas.

3.1.3. DESORCIÓN.

Como ya se mencionó en la introducción del presente trabajo, uno de los principales problemas en el desarrollo de nuevos métodos analíticos, especialmente en el caso de alimentos, es la detección e identificación de compuestos orgánicos no volátiles presentes en bajas concentraciones, que requiere generalmente someter a las muestras a procesos de extracción y derivación para hacer una separación previa de los analitos. Para el caso concreto del análisis de trans-resveratrol han sido desarrollados en este trabajo varios métodos con el fin de incrementar la eficiencia en su vaporización y así mejorar del mismo modo el límite de detección de la técnica

Recordando la descripción de las distintas configuraciones experimentales de nuestro sistema, en la primera de ellas el láser de desorción incide traseralemente sobre la muestra que va a ser desorbida. Esta forma de producir la desorción presenta dos grandes inconvenientes, el primero de ellos es que dada la alta fluencia del láser de desorción (Nd:Yag en su 2º Armónico) se producen reflexiones en el interior de la cámara que provocan la creación de iones directos procedentes de las placas metálicas del sistema acelerador de iones y que producen interferencias en el espectro de tiempo de vuelo. Este inconveniente podría salvarse si la posición de la placa pyrex sobre la que se deposita la muestra fuese distinta, tal que se situase la superficie de la placa pyrex sobre la que se deposita la muestra en paralelo con el eje del tiempo de vuelo, de tal forma que el láser de desorción no incidiría en ningún caso sobre el sistema de placas aceleradoras. Otro método para minimizar las interferencias producidas

Resultados

por los iones directos generados en el sistema de placas aceleradoras es pulsar los campos eléctricos que aceleran los iones y los focalizan hacia el detector de placas microcanales. La Figura 3.6 muestra dos espectros de masas, en el espectro superior se han forzado las condiciones experimentales para resaltar la interferencia producida por los iones procedentes de las placas del sistema acelerador, mientras que en el espectro inferior se han pulsado los campos aceleradores para tratar de acelerar y focalizar exclusivamente los iones formados en el momento en el que el láser desorbe la matriz depositada sobre el pyrex.

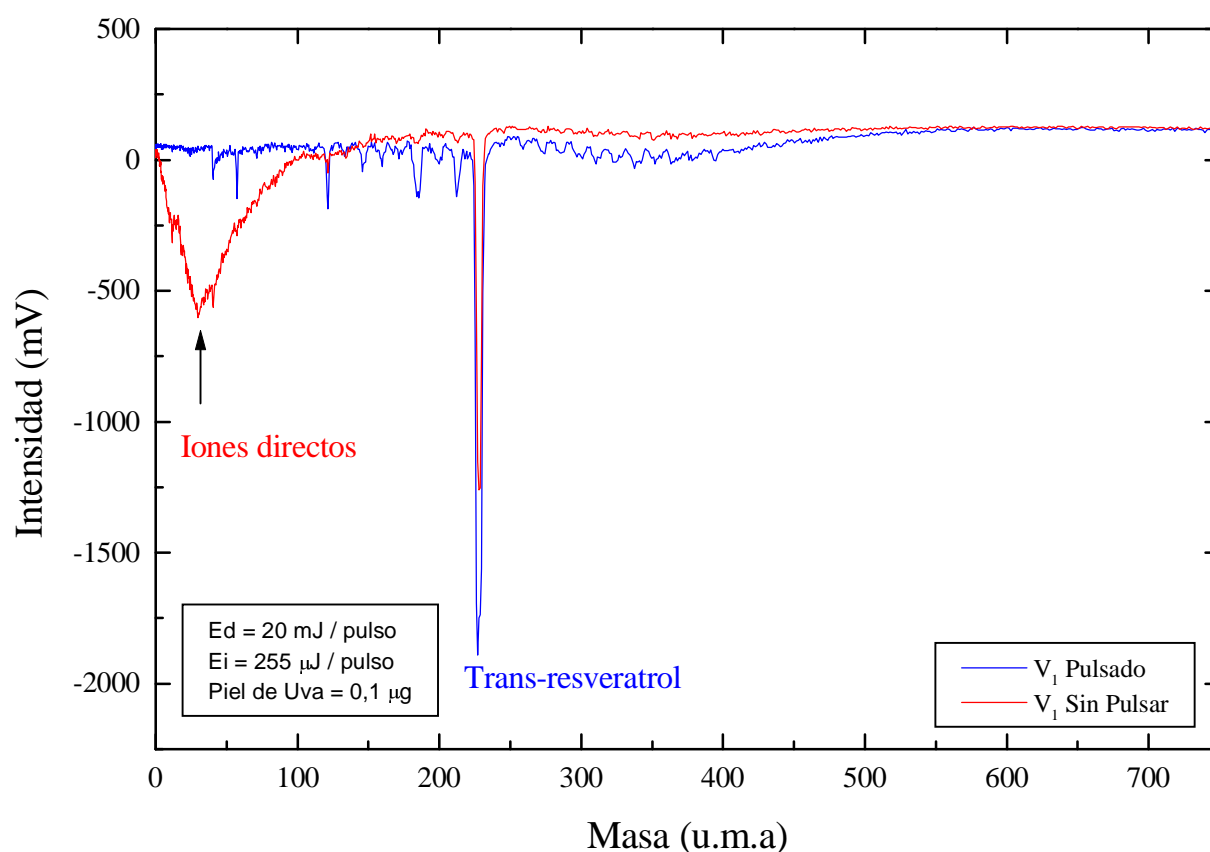


Figura 3.6 -. Dos espectros de piel de uva, en rojo sin pulsar la placa aceleradora de iones V_1 y en azul con V_1 pulsada.

Resultados

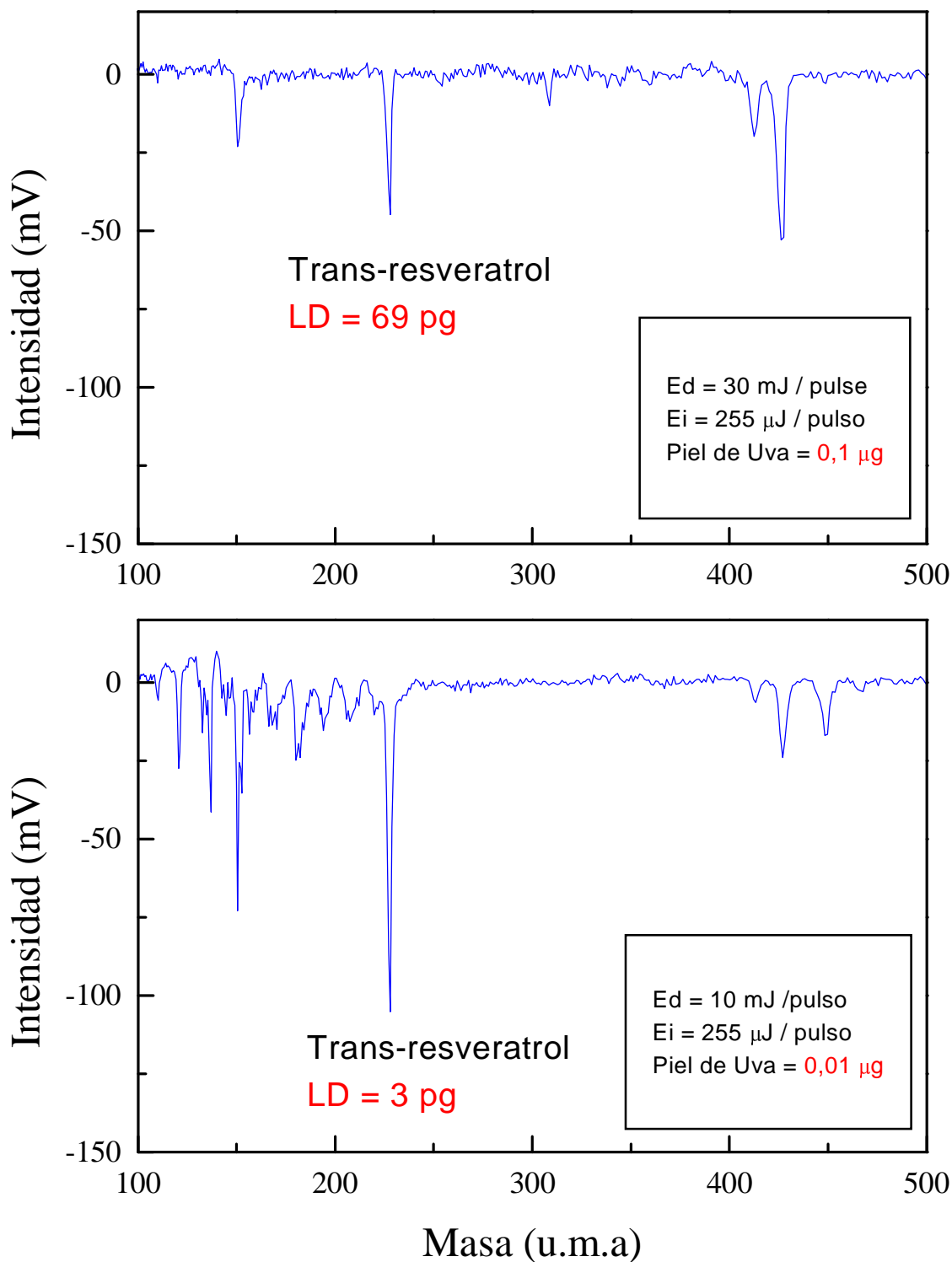


Figura 3.7 -. Arriba espectro de masas de una muestra de 0,1 µg de piel de uva.
Abajo espectro de masas de una cantidad 10 veces menor de piel de uva.

Resultados

La Figura 3.7 muestra dos espectros de masas. El espectro superior corresponde a una muestra de 0,1 μg de trans-resveratrol mientras que el espectro inferior corresponde a una muestra de 0,01 μg ; las condiciones experimentales son las mismas para ambos espectros excepto por el espesor de la película de trans-resveratrol depositada que en el caso del espectro inferior es 10 veces menor y la energía de desorción es 3 veces menor. En consecuencia podemos deducir que una variación en el espesor de la matriz depositada genera fluctuaciones en la señal registrada.

Este inconveniente es inherente a la desorción trasera y sólo salvable modificando la forma de producir la vaporización de la matriz a desorber. Por lo tanto debe emplearse un sistema en el que el láser de desorción incida frontalmente sobre la matriz, de tal manera que los efectos del espesor de la película depositada no afecten a la vaporización. Gracias a esta configuración el láser siempre incide sobre una superficie nueva de muestra. Debido a estos motivos se optó por modificar el sistema experimental y usar una conformación en la que la desorción fuese frontal, y que evitase en la medida de lo posible que el láser de desorción incidiese directa o indirectamente sobre las placas metálicas del sistema acelerador de iones como así se describió en el capítulo 2 de esta tesis. Un esquema de como se produce la desorción en esta nueva disposición puede observarse en la Figura 2.5.

• OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE DESORCIÓN (MEPED).

Una vez fijada la configuración experimental idónea para producir la vaporización de la muestra, se decidió abordar estudios encaminados a mejorar el proceso de desorción desde un punto de vista fundamental, es decir, mejorar en la medida de lo posible la interacción entre la radiación láser y la muestra a desorber para así incrementar el rendimiento del proceso de vaporización. Como

Resultados

ya se explicó en la introducción de esta tesis, en la técnica MALDI se mezcla la muestra con una matriz cromófora para mejorar el proceso de desorción e ionización al mismo tiempo, especialmente cuando se trata de moléculas grandes, no volátiles y térmicamente inestables. Si se considera que en nuestra técnica las etapas de desorción e ionización están separadas y pueden ser optimizadas de manera independiente, podemos usar una matriz cromófora para mejorar el primer paso, es decir, la etapa de la desorción.

Como ya se ha mencionado anteriormente, el proceso de desorción está regido por múltiples factores, de entre los que podemos destacar dos componentes: por una parte una componente relacionada con la absorción fotónica por parte de la muestra, y por otra una componente térmica relacionada con el equilibrio térmico local en la superficie de la muestra durante el proceso de desorción ^{232}.

Es bien sabido que los colorantes del tipo Rodaminas se usan frecuentemente en los experimentos de desorción láser. Dado que en nuestro caso empleamos para desorber la muestra radiación láser con una longitud de onda de 532 nm, la Rodamina-590 parecía ser el mejor de los candidatos posibles como matriz cromófora, ya que presenta un máximo de absorción centrado en 530 nm. Sin embargo y pese a que gracias al empleo de la Rodamina-590 la señal de trans-resveratrol fué mayor que la obtenida con trans-resveratrol puro, este incremento no fue suficiente para satisfacer nuestras necesidades analíticas.

El paso posterior fue mejorar la vaporización empleando otro tipo de matriz, una en la que la componente resonante no fuese tan importante sino que se primase la componente térmica del proceso de desorción. Para ello se pensó que un metal finamente dividido podría ser un medio idóneo para conseguir este objetivo, por lo que se utilizó polvo de Zn con un diámetro medio de partícula de 10 μm para mezclarlo con la muestra. El resultado fué que la señal de trans-

Resultados

resveratrol registrada al emplear Zn como matriz es 20 veces mayor que la obtenida con trans-resveratrol puro sin el Zn, como se muestra en la Figura 3.8.

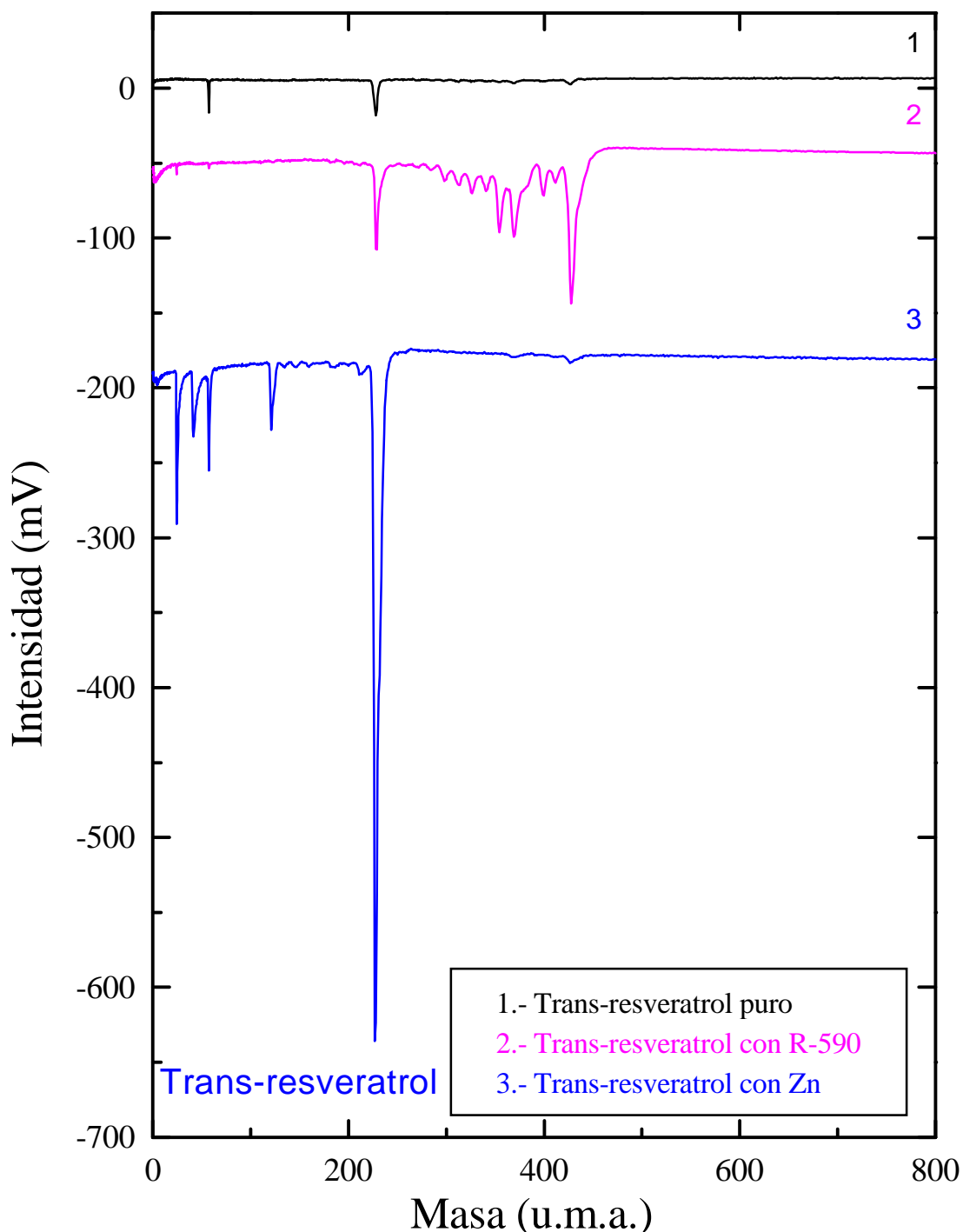


Figura 3.8 -. (1) Espectro de masas de trans-resveratrol puro obtenido con una E_d de 20 mJ / pulso a una $\lambda_i = 532,1$ nm, y una E_i de 245 μ J / pulso a una $\lambda_i = 302,1$ nm. (2) Igual que arriba pero con 0,17 mg a\u00f1adidos de Rodamina 590. (3) Igual que arriba pero con 0,02 mg de polvo de Zn a\u00f1adidos. Los dos \u00faltimos espectros han sido desplazados para mayor claridad.

Resultados

Se observan en esta figura tres espectros de masas, el espectro superior corresponde a la ionización resonante de trans-resveratrol puro obtenido con una energía de desorción de 20 mJ/pulso a 532 nm y una energía de ionización de 254 μ J/pulso a 302,1 nm; la señal corresponde a una cantidad máxima de 2,13 μ g de trans-resveratrol, que es la la cantidad presente en el area de desorción asumiendo que el láser desorbe la muestra completamente en este área. El espectro intermedio muestra la desorción e ionización de la misma cantidad de trans-resveratrol mezclado con 0,17 mg de Rodamina-590 en el área de desorción bajo las mismas condiciones experimentales. El espectro inferior corresponde a la misma cantidad de trans-resveratrol con polvo de Zn (0,02 mg en el área de desorción) sin cambiar el resto de las condiciones. Para poder comparar los efectos producidos por el empleo de la Rodamina y el Zn, las cantidades de ambos compuestos son equimoleculares. Los espectros intermedio e inferior han sido desplazados en ambos casos para que puedan ser observados con mayor claridad. Comparando los tres espectros puede apreciarse la notable mejoría al usar la técnica de desorción asistida por un polvo metálico (MEPED), ya que mientras que la Rodamina-590 aumenta un factor de 2,5 veces la señal de trans-resveratrol, el polvo de Zn lo hace en un factor de 20.

Además del incremento de la señal obtenido mediante la técnica MEPED, debemos resaltar otro factor importante, y es el de que la relación señal ruido en los espectros de la Figura 3.8 mejoran en un factor de 10, es decir, el cociente señal-ruido en el espectro en el que se emplea la técnica MEPED es 10 veces mayor que el obtenido cuando se desorbe sólo trans-resveratrol puro, lo cual mejora el límite de detección de nuestra técnica.

Por último, se ha estudiado la influencia de la longitud de onda del láser de desorción en el proceso de vaporización. En nuestro caso y hasta el momento se había empleado el segundo armónico (532nm) de un láser de Nd:Yag, y dado que la emisión fundamental de este láser es 1064 nm, se decidió comprobar si

Resultados

desorbiendo en esta zona del infrarrojo se favorecería o no el proceso de desorción. Para ello se prepararon 2 alícuotas de 50 μg de trans-resveratrol puro que fueron depositadas a su vez en 2 placas de pyrex que posteriormente serían analizadas, aplicando en ambos casos, una energía de ionización de 0,5 mJ/pulso a 302,1 nm.

Los resultados de este experimento son mostrados en la Figura 3.9, donde se recogen dos espectros de masas en los que claramente puede apreciarse como para el caso de la desorción producida a 1064 nm representada en el espectro inferior, la intensidad de señal registrada de trans-resveratrol es 4 veces mayor que cuando se emplea radiación a 532 nm. Ambos espectros fueron registrados con una energía de desorción de 20 mJ/pulso, energía a partir de la cual comienzan a aparecer procesos de fragmentación en el trans-resveratrol empleando radiación de 532 nm.

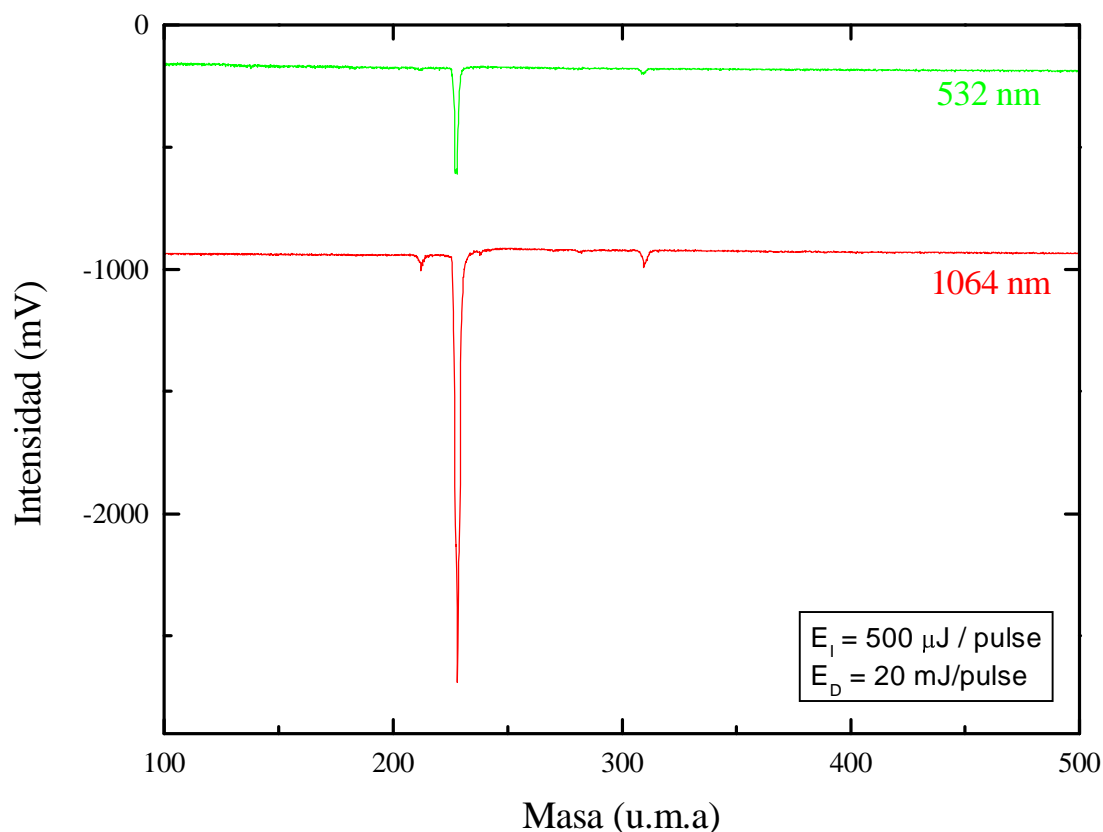


Figura 3.9 -. Espectros de masa de trans-resveratrol puro desorbido a 532 nm (arriba) y a 1064 nm (abajo).

Resultados

• VARIACIÓN DE LA SEÑAL CON A LA ENERGÍA DE DESORCIÓN.

El estudio de la variación de la señal con la energía de desorción, se realizó manteniendo invariantes el resto de condiciones de medida, con una energía de ionización de 1 mJ/pulso.

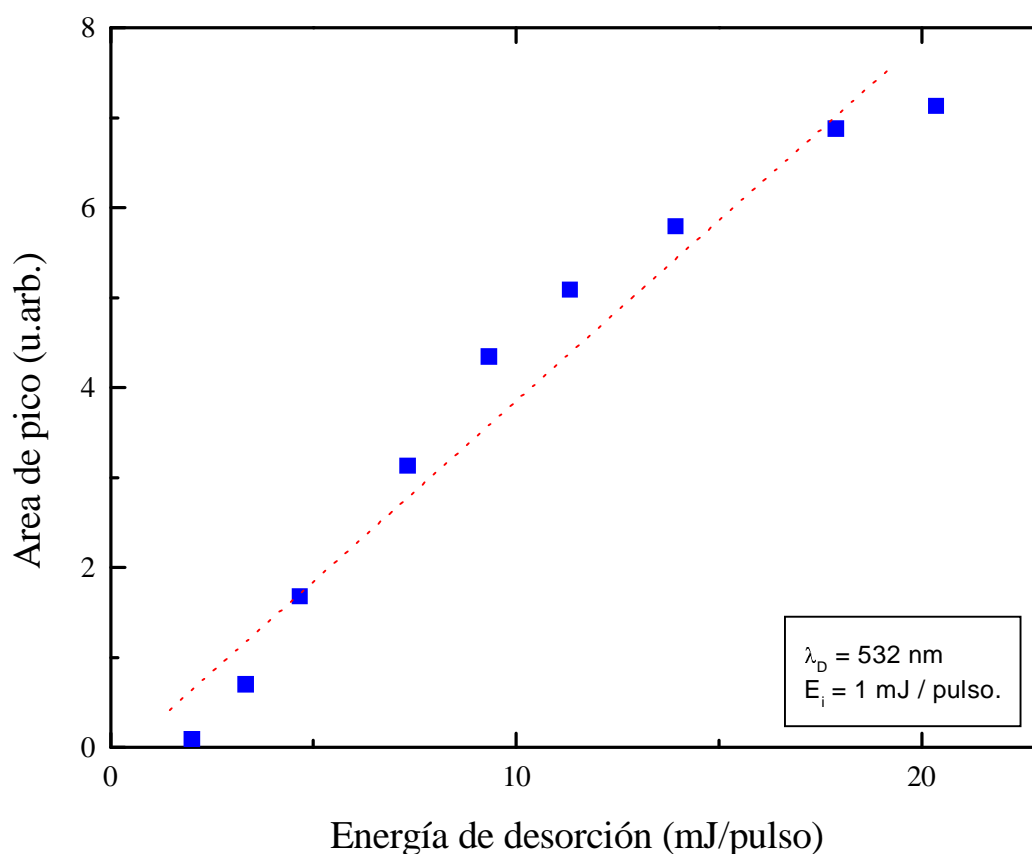


Figura 3.10 -. Intensidad de señal de trans-resveratrol en función de la energía de desorción a 532 nm.

En la Figura 3.10, representa la variación de la intensidad de señal de trans-resveratrol frente a la energía de desorción para dos tipos distintos de matrices desorbidas en una configuración de desorción trasera a 532 nm. En ella puede observarse como para el caso del trans-resveratrol puro, la intensidad de la señal aumenta linealmente a medida que la energía de desorción crece hasta un valor de 20 mJ; a partir de este valor la intensidad de señal disminuye al iniciarse

Resultados

un proceso de fragmentación molecular como puede apreciarse por la aparición de diversos picos en el espectro. Del mismo modo, en la Figura 3.11 puede obtenerse la energía óptima de desorción empleada en los análisis de piel de uva en torno a 35 mJ/pulso, apareciendo la fragmentación molecular a partir de este valor de energía. Esta evidencia experimental es coherente con las diferentes fuerzas involucradas en los procesos de adsorción y absorción del trans-resveratrol, ya que se requiere menor energía para desorber el trans-resveratrol adsorbido sobre el pyrex, que para desorber el trans-resveratrol absorbido dentro una matriz.

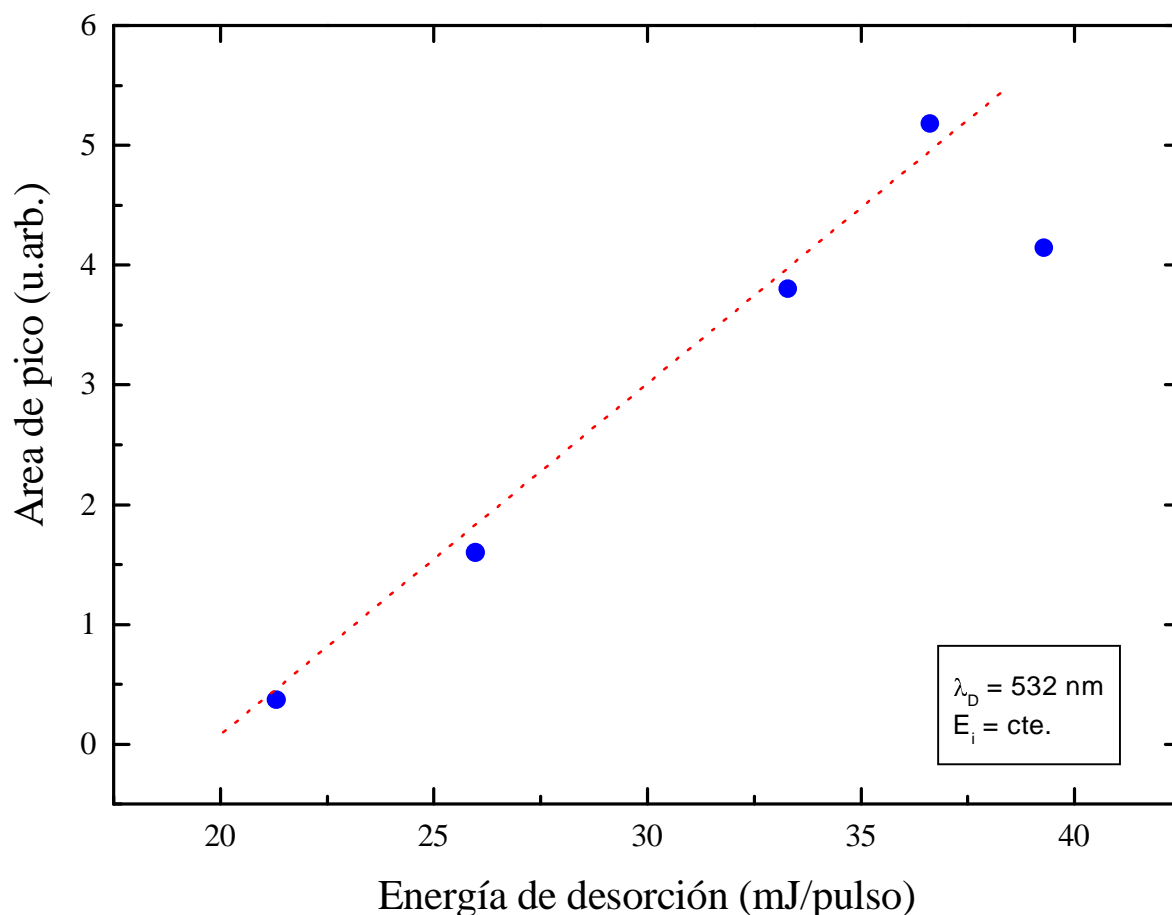


Figura 3.11 -. Área de la señal registrada de trans-resveratrol frente a la variación de la energía de desorción en el caso en el que se desorbe piel de uva a 532 nm.

Resultados

Este mismo ensayo fue realizado para la configuración en la cual la muestra es desorbida empleando radiación láser de 1064 nm, es decir, aplicando la desorción frontal de la muestra, sin embargo como puede apreciarse en la Figura 3.12, no se llega a alcanzar el límite de fragmentación ni siquiera a energías próximas a 70 mJ/pulso, aunque por motivos de seguridad se trabaja en el rango de energías inferiores. Esta ausencia de fotofragmentación posibilita en caso de ser necesario un aumento en la energía de desorción utilizada; es decir, trabajar a energías superiores aumentando así nuestra señal y obteniendo en última instancia una mejor relación señal ruido lo que conduce a su vez a un mejor límite de detección.

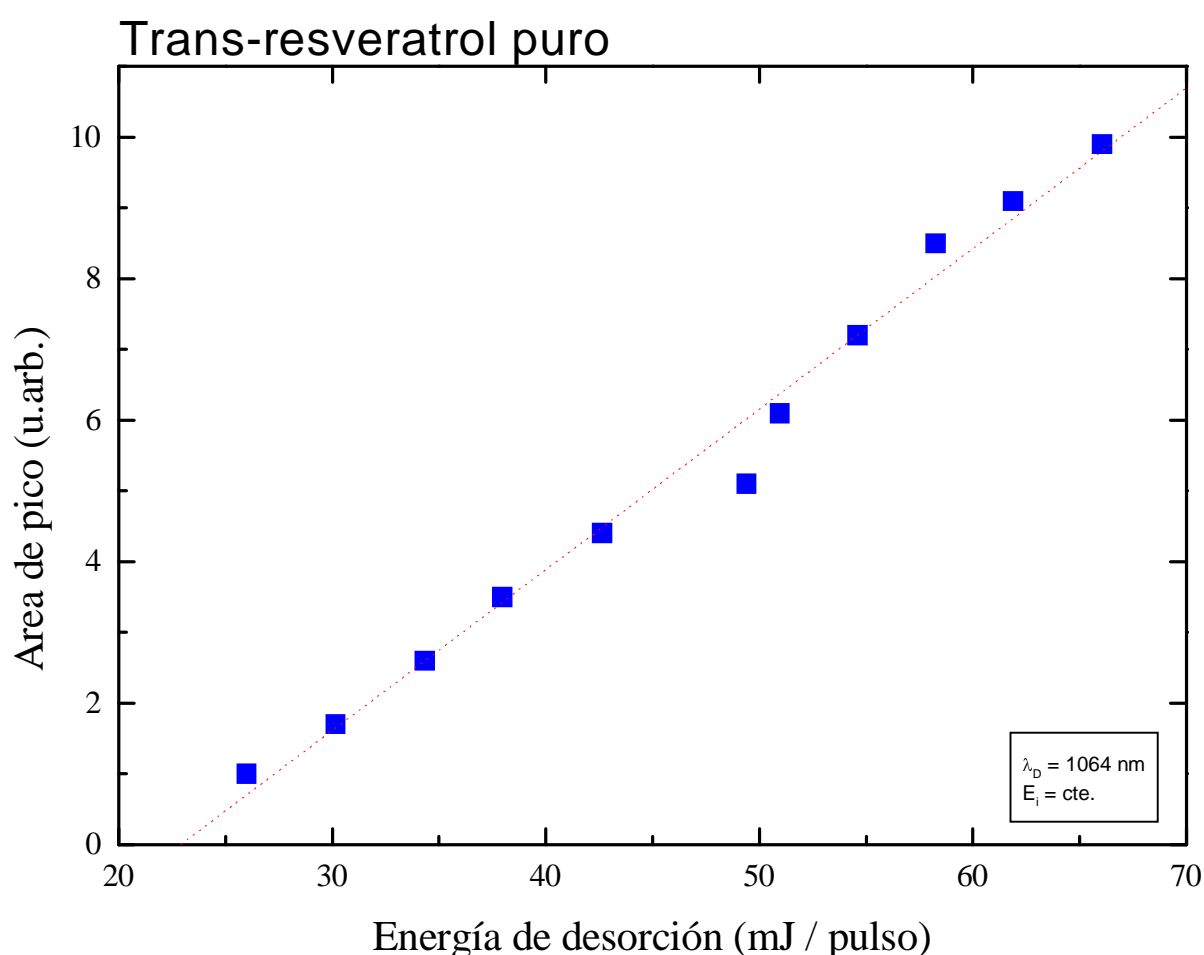


Figura 3.12 -. Área de la señal registrada de trans-resveratrol frente a la variación de la energía de desorción a 1064 nm.

Resultados

A modo de resumen, se recogen en la siguiente tabla las energías óptimas que debemos emplear para el análisis en función de la longitud de onda y la configuración utilizada en el proceso de desorción. En el caso en el que se emplea radiación a 1064 nm en la que no llega a alcanzarse la fragmentación del trans-resveratrol, la energía empleada es aquella, a partir de la cual se obtiene una relación señal ruido acorde con nuestras necesidades analíticas. Se evita de ese modo, por motivos de seguridad, trabajar a altas energías.

<i>ENERGÍAS ÓPTIMAS DE DESORCIÓN (mJ / pulso).</i>		
<i>TIPO DE MATRIZ</i>	<i>DESORCIÓN TRASERA $\lambda = 532 \text{ nm}$</i>	<i>DESORCIÓN DELANTERA $\lambda = 1064 \text{ nm}$</i>
<i>TRANS-RESVERATROL</i>	20	30
<i>PIEL DE UVA</i>	35	40
<i>ACEITE ESENCIAL</i>	--	50

Tabla 3.2 -. Energías óptimas de desorción para el trans-resveratrol desorbido de distintas matrices.

3.1.4. IONIZACIÓN.

• ESPECTROSCOPIA REMPI DEL RESVERATROL.

Para maximizar la eficacia de la ionización del trans-resveratrol es imprescindible conocer cual es su espectro REMPI o conocer su primer potencial de ionización, a partir del cual podría determinarse la longitud de onda adecuada

Resultados

para producir una ionización resonante, pero estos datos no se encuentran registrados en la bibliografía. En la Figura 3.13 se muestra el espectro de absorción UV-Vis del trans-resveratrol en etanol, en el que puede observarse una banda ancha de absorción en el UV con un máximo de absorción situado a 306 nm. Esta banda de absorción nos servirá como primera aproximación para buscar la longitud de onda óptima a la que producir la ionización resonante y en consecuencia la longitud de onda adecuada para realizar el análisis del trans-resveratrol.

Como ya se describió en la introducción existen distintas maneras de provocar la ionización de una molécula. Una de ellas es aquella en la que se aplica una radiación muy energética con una alta densidad fotónica para, a través de los niveles virtuales creados por el campo de radiación, acceder al continuo de ionización mediante la absorción de uno o varios fotones. Sabemos además que, si la energía del láser es suficientemente grande, este proceso no es selectivo e ioniza casi todas las moléculas presentes en la muestra que se quiera analizar. El primer ensayo realizado fue la Ionización Multifotónica del trans-resveratrol empleando el 2º armónico del láser de Nd:YAG (532 nm) en la desorción e ionizando con otro Nd:YAG en su 4º armónico (266 nm). En el espectro de la Figura 3.14 podemos observar un pico intenso a 228 u.m.a correspondiente a la molécula de trans-resveratrol. La calibración de este espectro fue realizada introduciendo tolueno en la cámara de ionización y aplicando la ecuación 3.5. En el espectro se ha empleado trans-resveratrol puro, por lo que no aparece ninguna otra especie en el mismo; la radiación empleada a 266 nm es lo suficientemente energética para producir el proceso MPI.

Resultados

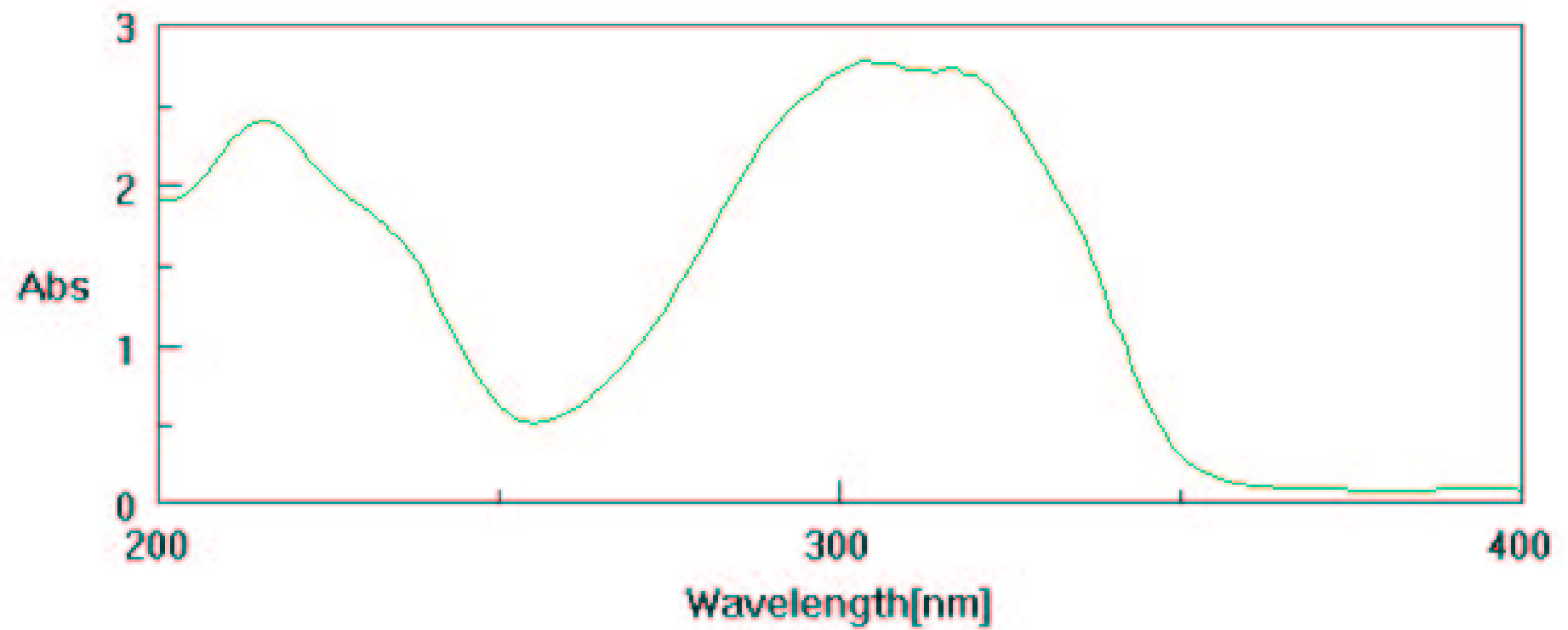


Figura 3.13 -. Espectro de absorción del trans-resveratrol en etanol.

Resultados

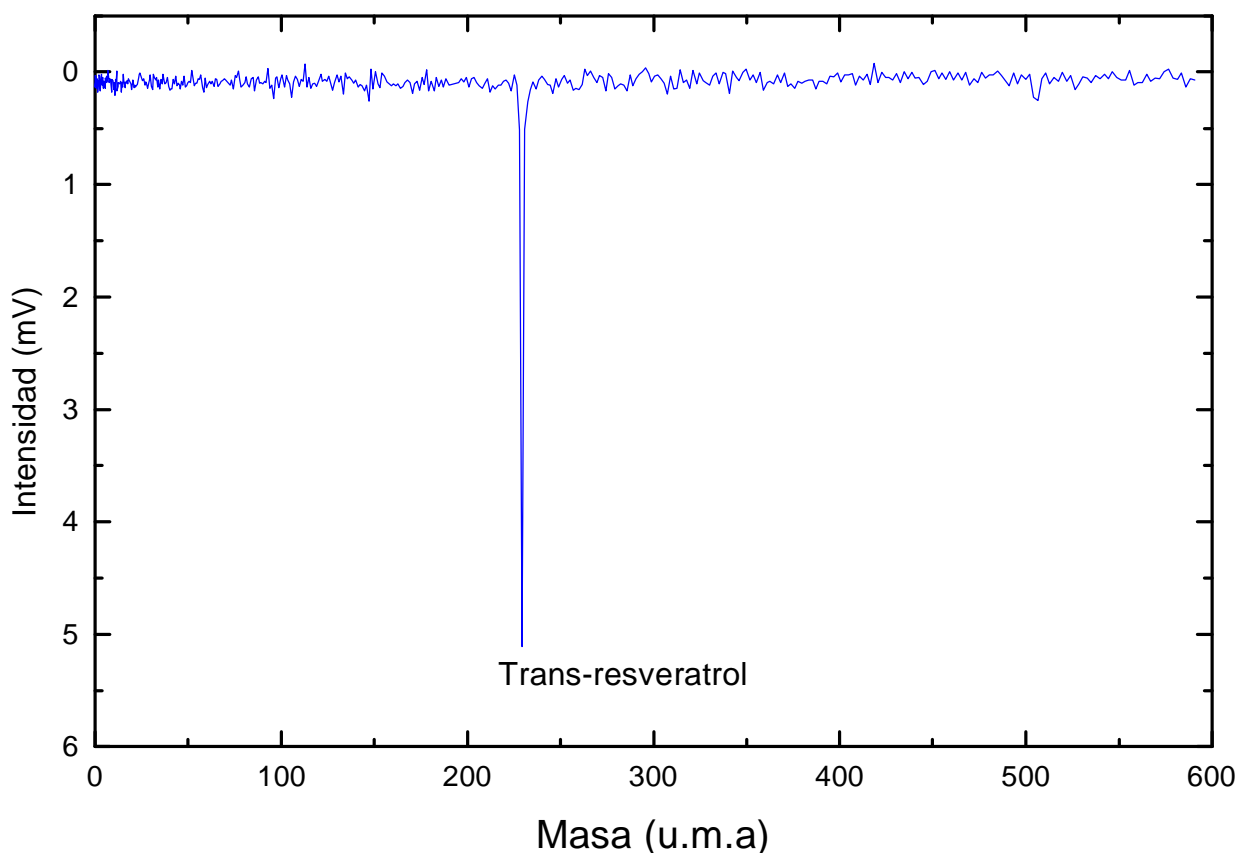


Figura 3.14 -. Espectro de masas de trans-resveratrol puro ionizado por MPI a 266 nm.

Sin embargo si se desean ionizar trazas de trans-resveratrol en una muestra compleja como puede ser la piel de uva, en la que hay presentes cientos de moléculas distintas, se requiere por una parte que el proceso de ionización sea altamente selectivo, y por otra, altamente eficaz. Estas dos necesidades pueden ser satisfechas empleando la ionización REMPI del trans-resveratrol ya que aplicando una radiación láser cuya longitud de onda esté en resonancia con algún nivel real de la molécula de trans-resveratrol, se podrá ionizar selectivamente esta molécula. Dicho proceso puede provocarse a través de los distintos niveles reales de la molécula de trans-resveratrol, pero debido a los diferentes factores que rigen la absorción fotónica, como las distancias de equilibrio del estado

Resultados

electrónico fundamental y el estado electrónico excitado a través del cual se pasa al continuo de ionización, los factores de Frank-Condon, etc., hacen que algunas de las transiciones sean más eficaces que otras, por lo que fué nuestro propósito encontrar cual de entre todas las posibles transiciones es la más eficaz para producir la ionización selectiva del trans-resveratrol.

La primera aproximación para buscar el espectro REMPI del trans-resveratrol se basó en su espectro de absorción UV en el que aparece la banda de absorción más intensa centrada entre 260 y 350 nm. Es necesario elegir un colorante adecuado en el láser de ionización que nos permita barrer en frecuencia esta amplia banda de absorción, y que en este caso concreto fue la Rodamina 640 (Exciton, INC.) con un máximo de emisividad centrado en torno a los 613 nm y cuya curva de emisividad se observa en la Figura 3.15.

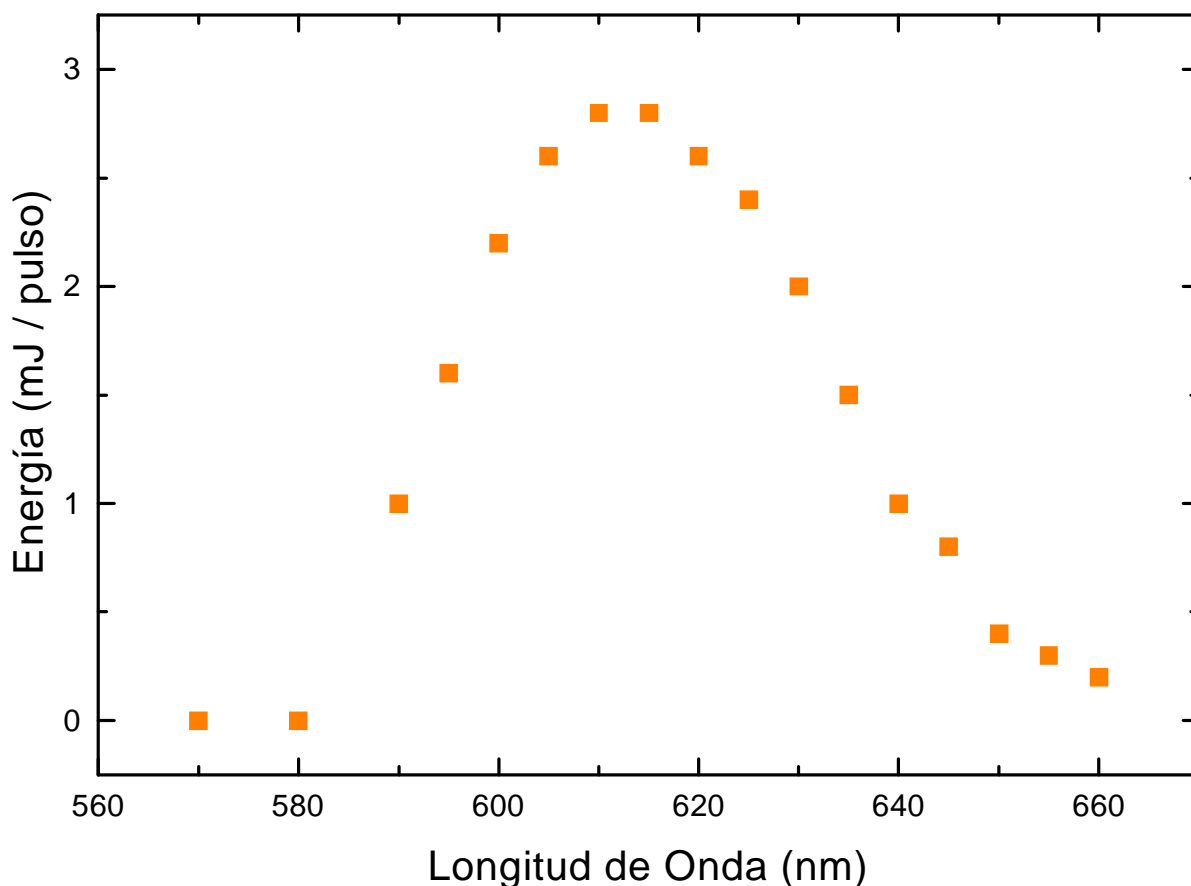


Figura 3.15 -. Espectro de emisividad del colorante Rodamina 640 con una concentración de $3,6 \cdot 10^{-4} M$ en metanol para el sistema oscilador del láser y de $1,9 \cdot 10^{-4} M$ en metanol el sistema amplificador.

Resultados

Para obtener la longitud de onda indicada en el UV, la radiación láser emitida por el colorante ha de ser posteriormente doblada en frecuencia para lo que se utilizó el sistema INRAD-AT-III-UV el cual lleva incorporado un cristal doblador BBO-TST, con lo que es posible obtener el intervalo de longitud de onda (235 - 730 nm) adecuado para buscar la zona resonante del trans-resveratrol. En el caso de necesitar trabajar en otros intervalos del espectro puede utilizarse el mismo sistema cambiando únicamente el cristal doblador por otro.

Con nuestro sistema experimental se ha barrido la longitud de onda con un espaciado de 0,1 nm en el intervalo situado entre 294 y 312 nm en el que aparece la mencionada banda de absorción. Se observa en el espectro registrado una banda ancha desde los 300 hasta los 307 nm, con el máximo a 302,1 nm como se muestra en la Figura 3.16.

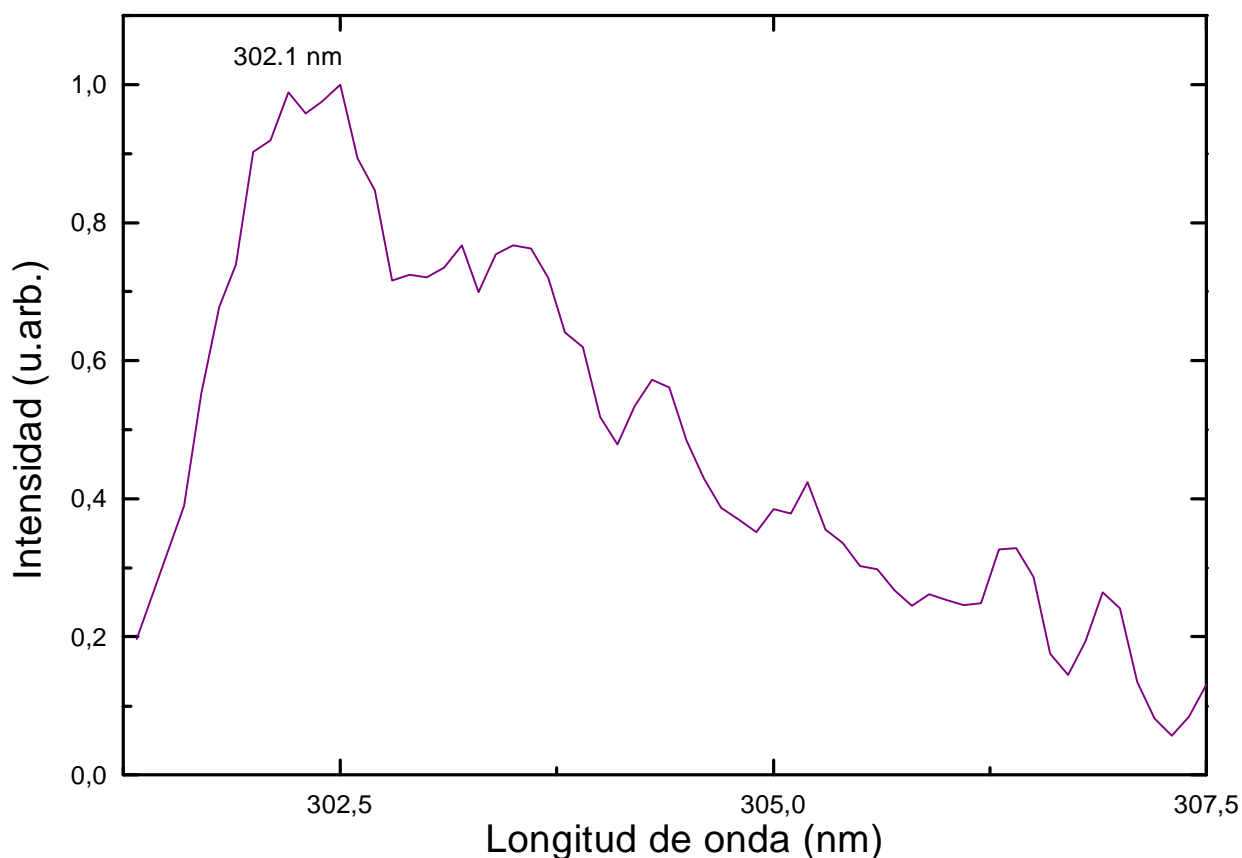


Figura 3.16 -. Espectro REMPI de trans-resveratrol medido entre 300 y 308 nm, desorbido a 532 nm con una energía de desorción de 10 mJ / pulso.

Resultados

Como se observa en el espectro REMPI del trans-resveratrol mostrado en la Figura 3.16, la intensidad de señal va aumentando a medida que disminuye la longitud de onda hasta llegar a un máximo a 302,1 nm, que será la longitud de onda más adecuada para producir la ionización resonante de esta molécula. Del espectro puede obtenerse información sobre la estructura vibracional y rotacional de la molécula, aunque dado el gran número de átomos que la componen ($C_{14}H_{12}O_3$) sólo en vibración presenta 81 modos normales ($3N-6$), por lo que si se suman a estos todas las transiciones rotacionales posibles conforman una estructura de difícil interpretación. Para proceder al estudio espectroscópico de la molécula es necesario primeramente simplificar la estructura rotacional del espectro y englobar estas bandas de rotación dentro de sus respectivas bandas de vibración, por lo que para ello hacemos la convolución de dichas bandas mediante un tratamiento por transformada de Fourier.

La Figura 3.17 muestra el resultado de este tratamiento, tras el cual pueden apreciarse con claridad 6 bandas entre los 32200 y los 32500 cm^{-1} correspondientes a 2 modos distintos de vibración que de forma genérica se denominaron A y B y que corresponden a 2 progresiones de tránsitos electrónicos que se estudian con más detalle en el capítulo 5.

Una vez conocido el espectro REMPI del trans-resveratrol se preparó un colorante específico que tuviese su máxima emisión centrada en 605 nm, es decir, una vez se dobla esta frecuencia el máximo de emisión se encuentra muy próximo a 302,1 nm. Dicha emisión se consiguió con la mezcla de Rh640 + Rh620 en metanol con las siguientes concentraciones: para el oscilador del láser de $3,6 \cdot 10^{-5}$ M de Rh640 + $7,9 \cdot 10^{-5}$ M de Rh610, y para el amplificador del láser de $1,8 \cdot 10^{-5}$ M de Rh640 + $3,9 \cdot 10^{-5}$ M de Rh610.

Resultados

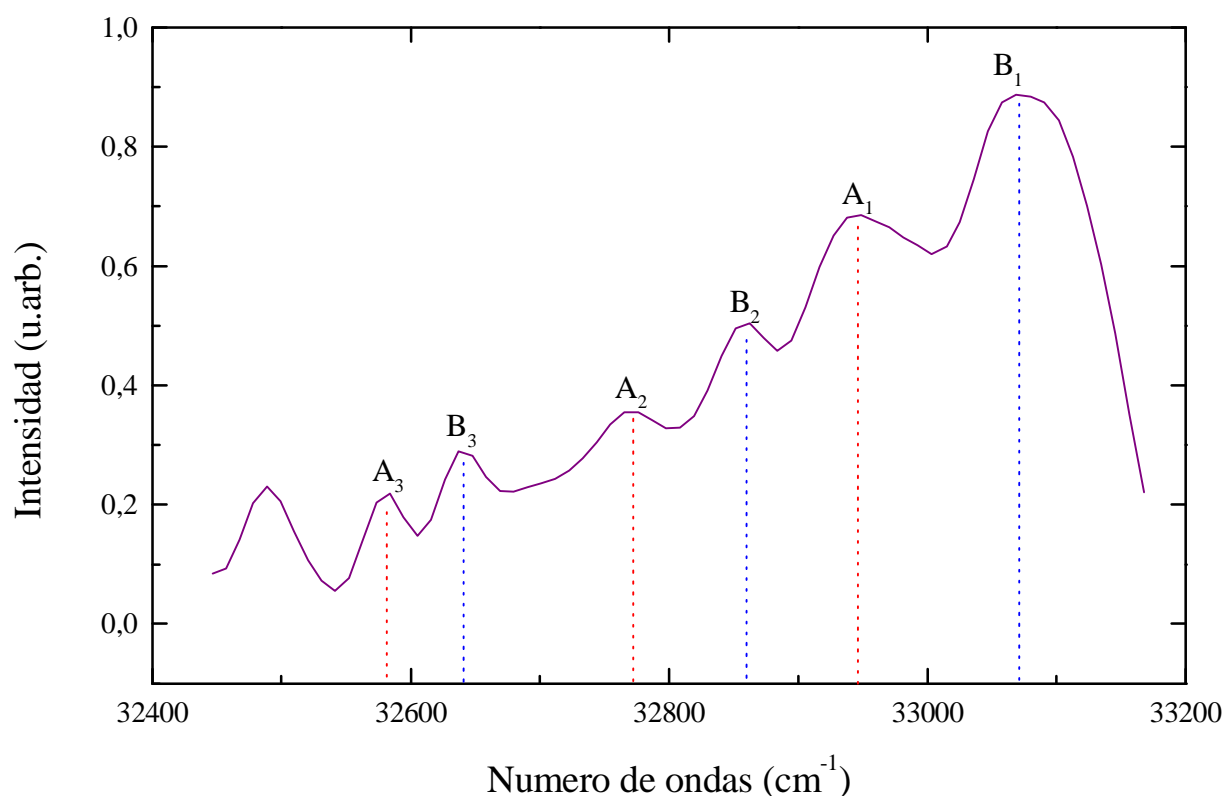


Figura 3.17 -. Espectro REMPI de *trans-resveratrol* puro promediado por transformada de Fourier y pasado a cm^{-1} .

En la Figura 3.18 se demuestra la eficacia de la ionización resonante frente a la ionización no resonante para una misma muestra de *trans-resveratrol* puro.

Comparando los dos espectros mostrados en la Figura 3.18 para una misma cantidad de *trans-resveratrol*, se aprecia claramente una importante mejora de la intensidad de señal en el espectro inferior el cual se diferencia del superior únicamente en la longitud de onda empleada para producir la ionización, resonante (302,1 nm) para el espectro inferior y no resonante (301,1 nm) para el espectro superior. Tenemos que tener en cuenta cómo, además de esta mejora en la eficacia con la que se produce la ionización, aumentamos a la vez la selectividad de dicho proceso, ya que si desorbemos una matriz compleja sólo se ionizarán aquellas moléculas que posean tránsitos electrónicos en resonancia con la longitud de onda empleada.

Resultados

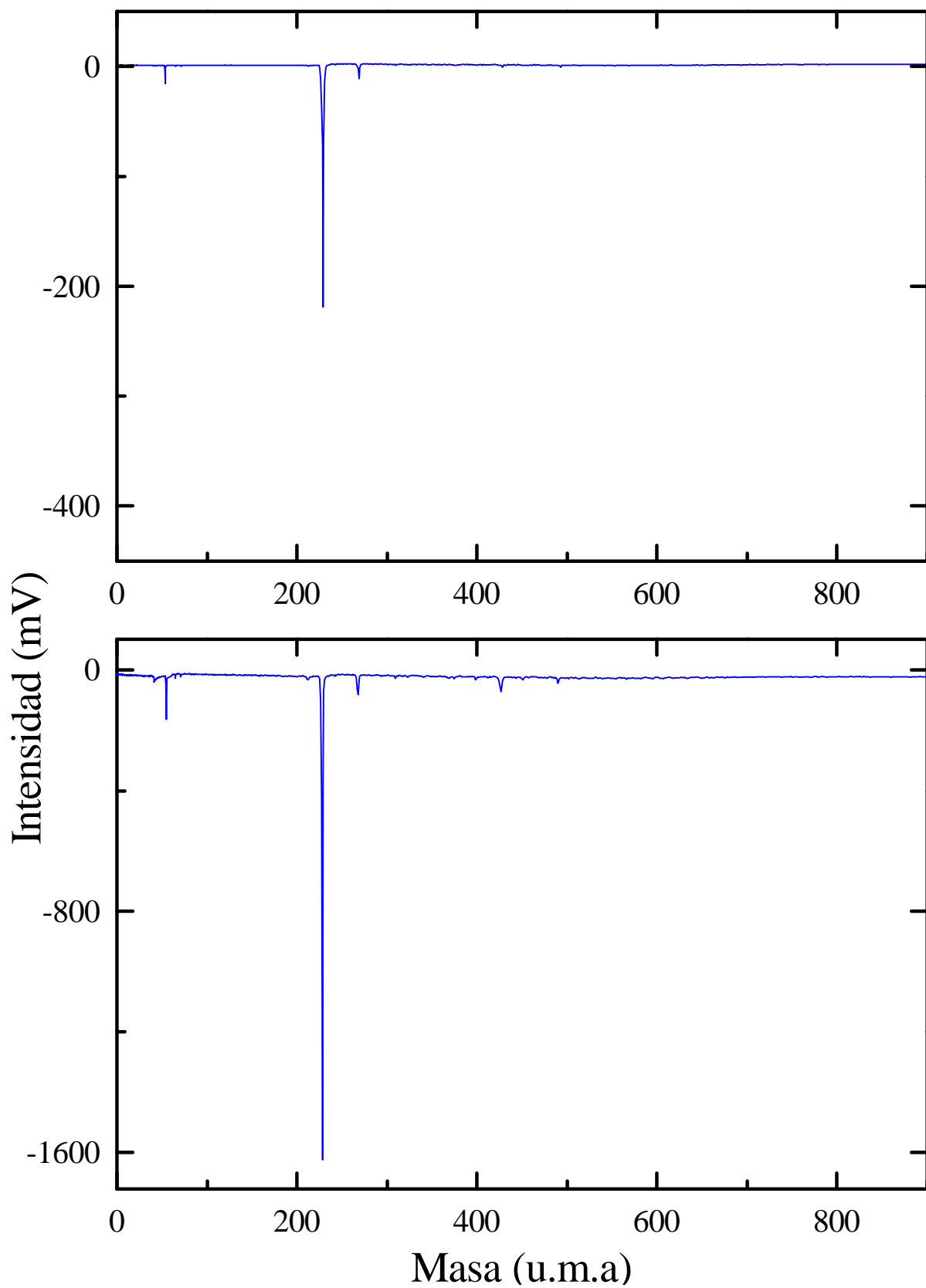


Figura 3.18 -. Espectro de masas de *trans*-resveratrol puro obtenido a la longitud de onda resonante 302,1 nm (abajo) y fuera de resonancia a 301.1 nm (arriba).

• VARIACIÓN DE LA SEÑAL CON LA ENERGÍA DE IONIZACIÓN.

Además de conocer cual es la longitud de onda más adecuada para producir la ionización resonante del trans-resveratrol, otro de los parámetros específicos a caracterizar es el orden de fotoionización del proceso. Como ya se describió a través de la ecuación 1.1, en un proceso de ionización multifotónica para alcanzar el continuo de ionización desde el estado electrónico fundamental, la intensidad de señal registrada es proporcional al número de fotones absorbidos ($I \approx \Phi^n$), donde n es el número de fotones absorbidos por molécula y se denomina orden de fotoionización.

Esta caracterización, requiere conocer la variación de la intensidad de la señal con la energía de ionización, para lo que se realizó un estudio variando la energía de ionización y manteniendo constante el resto de parámetros experimentales. Se empleó para el estudio aplicado al trans-resveratrol un valor para la energía de desorción de 10 mJ/pulso, valor inferior al máximo de 20 mJ/pulso para minimizar procesos de fragmentación molecular.

Para determinar el número de fotones necesarios para la ionización del trans-resveratrol se estudió la variación de la señal iónica con respecto a la energía de ionización en un intervalo entre 80 y 270 μ J. Dada la alta eficiencia de la ionización cuando se utiliza la longitud de onda resonante (302,1 nm), podríamos fácilmente llegar a saturar el proceso, es decir, alcanzar una fluencia del láser de ionización a partir de la cual ya estamos ionizando todas las moléculas neutras desorbidas de trans-resveratrol y por lo tanto aunque aumentásemos dicha fluencia no registraríamos mayor intensidad de señal. Por este motivo en este experimento se empleó una longitud de onda de 299,5 nm, ligeramente alejada de la longitud de onda resonante evitando así estos procesos de saturación en la ionización.

Resultados

La Figura 3.19 muestra la variación del logaritmo de la intensidad de señal frente al logaritmo de la energía de ionización para una muestra de trans-resveratrol puro.

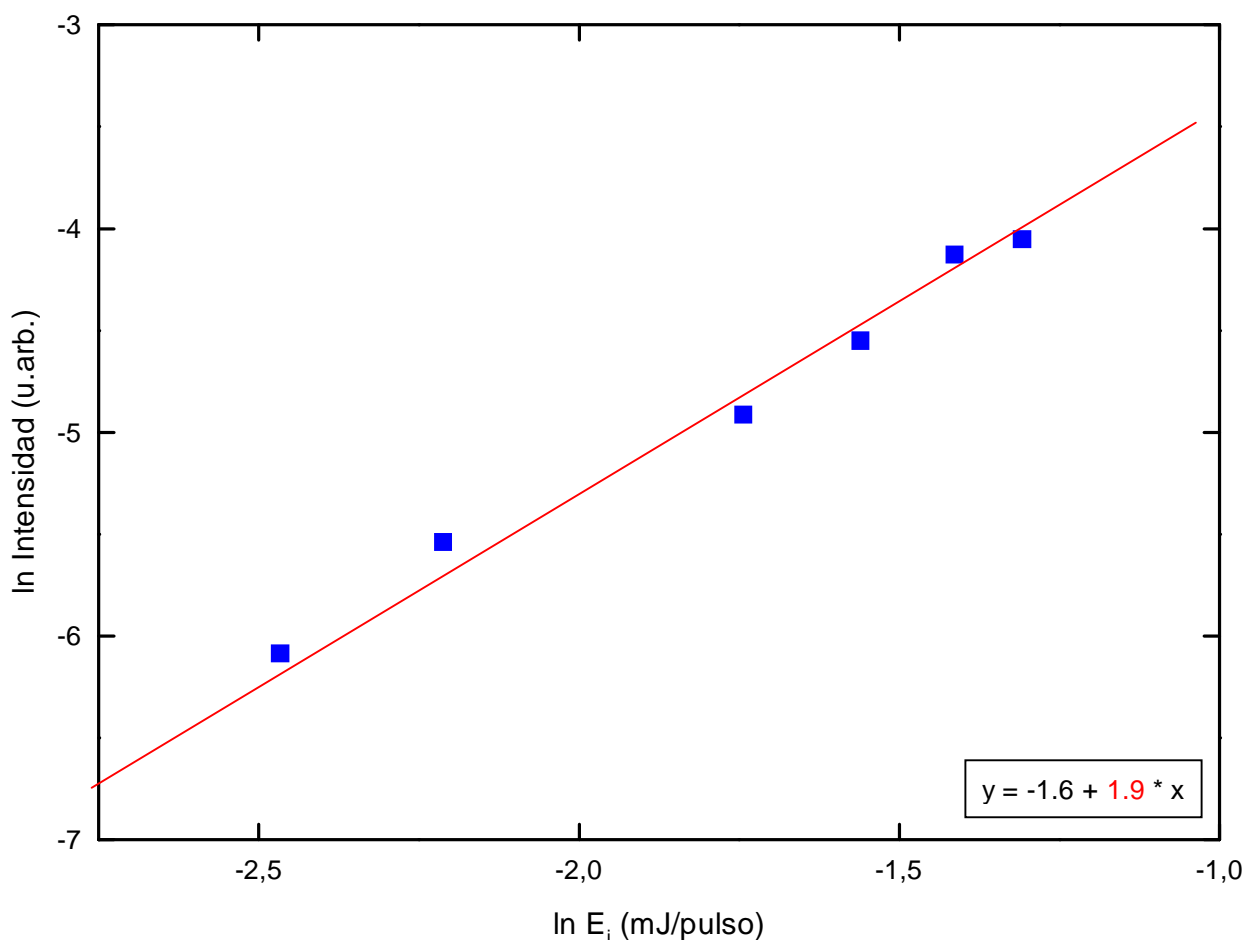


Figura 3.19 -. Representación doble-logarítmica de la intensidad de señal de trans-resveratrol en función de la energía de ionización manteniendo constante el resto de los parámetros experimentales.

Como puede observarse en la figura, la intensidad de señal aumenta al hacerlo la energía del láser; teniendo en cuenta la ecuación 1.1 la pendiente de la representación doble-logarítmica de la intensidad de señal registrada frente a la fluencia de la ionización nos proporcionará el orden de ionización. Del ajuste lineal de los resultados experimentales representados se optiene para el caso del trans-resveratrol un valor en la pendiente de 1.9 ± 0.1 , es decir 2 fotones. Este

Resultados

resultado indica que la ionización del trans-resveratrol se produce mediante un proceso de ionización bifotónica resonante R2PI (Resonant-two-photons-ionisation) de un sólo color.

Dado que nuestro sistema experimental permite registrar al mismo tiempo las moléculas ionizadas y la energía aplicada para producir esa ionización; el conocer el orden de ionización es una ventaja práctica ya que la fluencia (n° de fotones / cm^2) del láser de colorante puede presentar fluctuaciones del orden de un 1%, por lo tanto, y teniendo en cuenta la ecuación 1.1 podemos corregir dicha fluctuación dividiendo la intensidad de señal registrada en nuestros espectros por la energía elevada al orden de ionización. Esta normalización fue practicada sobre el espectro REMPI del trans-resveratrol y con dicha normalización es como se muestra en la Figura 3.16 y 3.17.

3.2.- VALIDACIÓN

Los laboratorios del sector químico precisan desarrollar procedimientos de ensayo internos para aplicaciones determinadas. La confirmación mediante el examen y la aparición de evidencias objetivas de que se han cumplido los requisitos particulares para una utilización específica de un método se conoce por el nombre de validación ^{233}. La validación del método de ensayo establecerá, mediante estudios sistemáticos de laboratorio, que las características técnicas de dicho método cumplen las especificaciones relativas al uso previsto de los resultados analíticos.

En este sentido la validación de un método analítico es totalmente necesaria, ya que permite el conocimiento de las características de funcionamiento del método a la vez que proporciona un alto grado de confianza y seguridad en el mismo y los resultados obtenidos al aplicarlo. Se realizó por lo tanto este proceso de validación aplicado al análisis del trans-resveratrol determinando: la precisión (repetibilidad y reproducibilidad), linealidad, selectividad /especificidad, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación del método analítico ^{234}.

3.2.1- REPETIBILIDAD.

Una vez optimizadas las condiciones analíticas experimentales, como energía de los láseres, longitud de onda para la ionización, voltajes de las placas aceleradoras, etc., debe estudiarse la precisión de nuestra técnica. Se entiende por precisión, el grado de concordancia entre resultados de mediciones obtenidas independientemente bajo condiciones establecidas ^{235}. La precisión depende sólo de la distribución de errores aleatorios y no tiene ninguna relación con el *valor real* o el *valor especificado*. La medida de la precisión suele expresarse generalmente en términos de imprecisión y se calcula como la desviación

Resultados

estándar de los resultados de las mediciones, es decir, una mayor precisión se refleja por una menor desviación estándar.

El término de mediciones independientes se refiere a los resultados obtenidos sin la influencia de un resultado precedente del mismo material o similar. Las medidas de precisión cuantificadas dependen de manera crítica de las condiciones estipuladas para su cuantificación; de este modo, la repetibilidad y la reproducibilidad serán un conjunto particular de estas condiciones y que a continuación se desarrollan.

Se entiende por repetibilidad del sistema la precisión bajo condiciones en las que los resultados de una medición se obtienen con el mismo método, con el mismo operador, utilizando el mismo instrumento de medida y durante un corto intervalo de tiempo ^{235}.

Para obtener la repetibilidad se empleó una muestra de trans-resveratrol 10^{-3} M depositada sobre el disco pyrex y la velocidad del motor se ajustó de tal forma que tardase aproximadamente 50 segundos en efectuar un giro de 360° por lo que se asegura que el láser de desorción incida siempre sobre una zona de muestra no desorbida con anterioridad.

La Figura 3.20 muestra la repetibilidad de el área del pico de trans-resveratrol tomando 50 espectros y habiéndose obtenido cada uno de ellos con el promedio de 10 disparos del láser (un segundo de tiempo de adquisición en el osciloscopio por cada espectro registrado).

Resultados

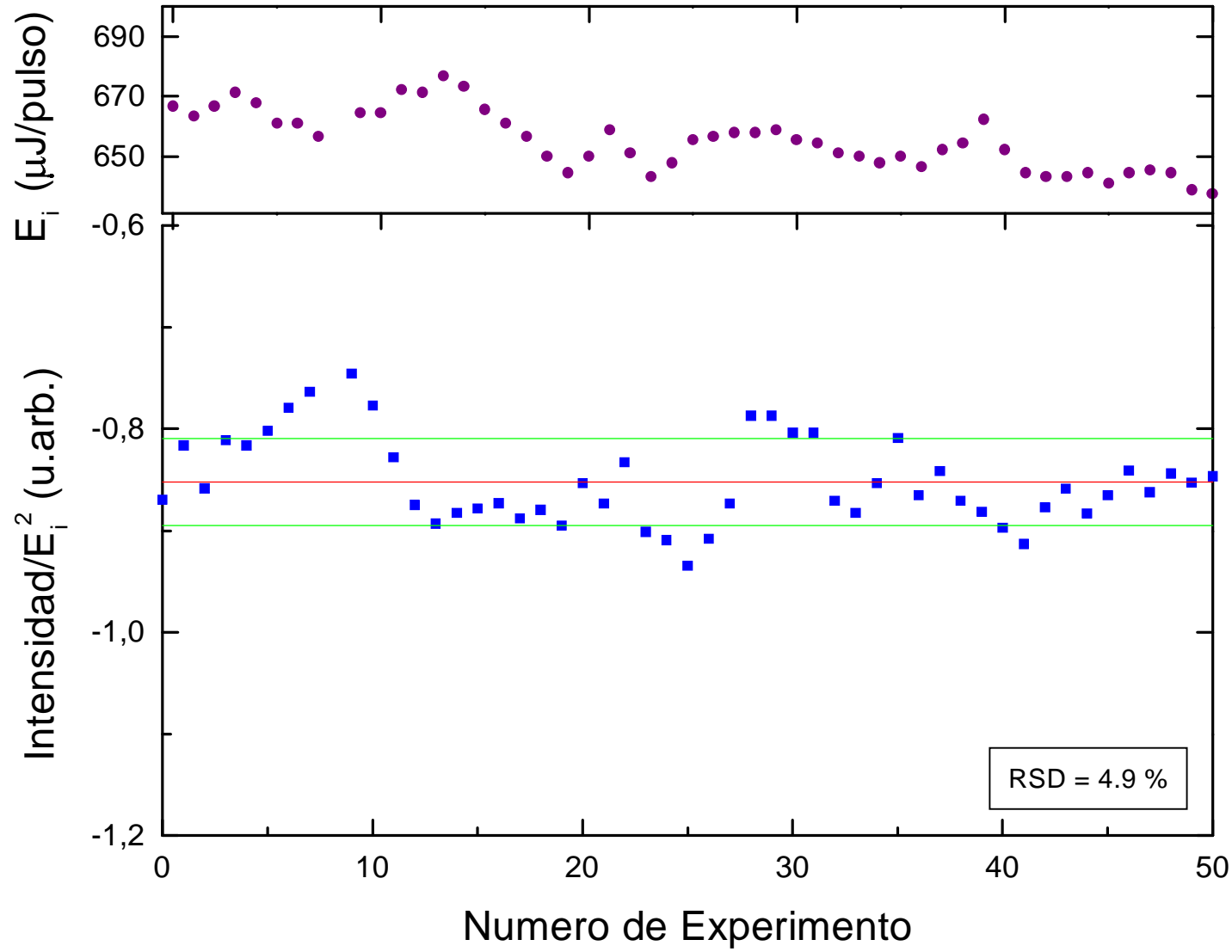


Figura 3.20 -. (Arriba) variación de la energía de ionización láser durante el experimento. (Abajo) Repetibilidad de la señal de tiempo de vuelo del trans-resveratrol corregida por la energía del láser durante 50 medidas consecutivas.

Resultados

En la parte superior de la figura se representa la variación de la energía de ionización medida simultáneamente a la par que el área de trans-resveratrol, de este modo podemos normalizar cada medida dividiendo el área registrada por E^2 ya que, como se demostró, el orden de fotoionización es dos al tratarse de un proceso R2PI. La línea roja representa la media de nuestras medidas y las dos líneas verdes marcan la desviación estándar ($\pm s$).

Para el tratamiento matemático del total de las áreas de las señales registradas en cada uno de los espectros de tiempo de vuelo, debemos considerar como valor medio de nuestras medidas \bar{x} a:

$$\bar{x} = \frac{\sum_i x_i}{n} \quad [3.13]$$

donde n es el número total de medidas y x_i el área de cada una de ellas. Para definir s , la desviación estándar de nuestras medidas, aplicaremos:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}} \quad [3.14]$$

Y finalmente se define la desviación estándar relativa como:

$$RSD = \frac{100 \cdot s}{\bar{x}} \quad [3.15]$$

El análisis matemático de los resultados al aplicar las ecuaciones 3.13, 3.14 y 3.15 muestra una desviación estándar relativa o coeficiente de variación del 4,9 %. Este valor indica la precisión interna de nuestro sistema, y refleja

Resultados

principalmente el grado de homogeneidad en la deposición de la muestra sobre la placa de pyrex, pequeñas variaciones en la energía del láser de desorción y oscilaciones en la posición del pyrex durante la rotación.

3.2.2.- REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad es la precisión del sistema bajo condiciones en las que los resultados de una medición se obtienen con el mismo método, sobre el mismo analito, con diferentes operadores, en diferentes tiempos, etc., ^{235}.

Se preparó una disolución de partida disolviendo 500 µg de trans-resveratrol puro en 20 ml de acetona. Posteriormente se tomaron siete alícuotas de esta disolución de trans-resveratrol 10^{-3} M y fueron depositadas en días diferentes sobre la placa de vidrio pyrex utilizando el sistema mostrado en la Figura 2.7. La deposición de la muestra sobre el pyrex fue realizada de forma alterna por distintos operadores para cada experimento.

La Figura 3.21 muestra el área de pico de trans-resveratrol medido en las 7 alícuotas preparadas a partir de una misma disolución inicial. Cada punto representa la media de tres medidas calculadas cada una de ellas como el promedio de 400 disparos del láser sobre superficie fresca de la muestra.

El análisis matemático de los resultados análogo al realizado en el apartado anterior muestra una desviación estándar relativa del 4,4 %. Este valor incluye principalmente las variaciones que se pudiesen producir en el sistema por la forma de preparar la deposición de la muestra sobre el pyrex y la colocación de la placa en el interior de la cámara de ionización por el operador, así como variaciones en la energía de ambos láseres.

Resultados

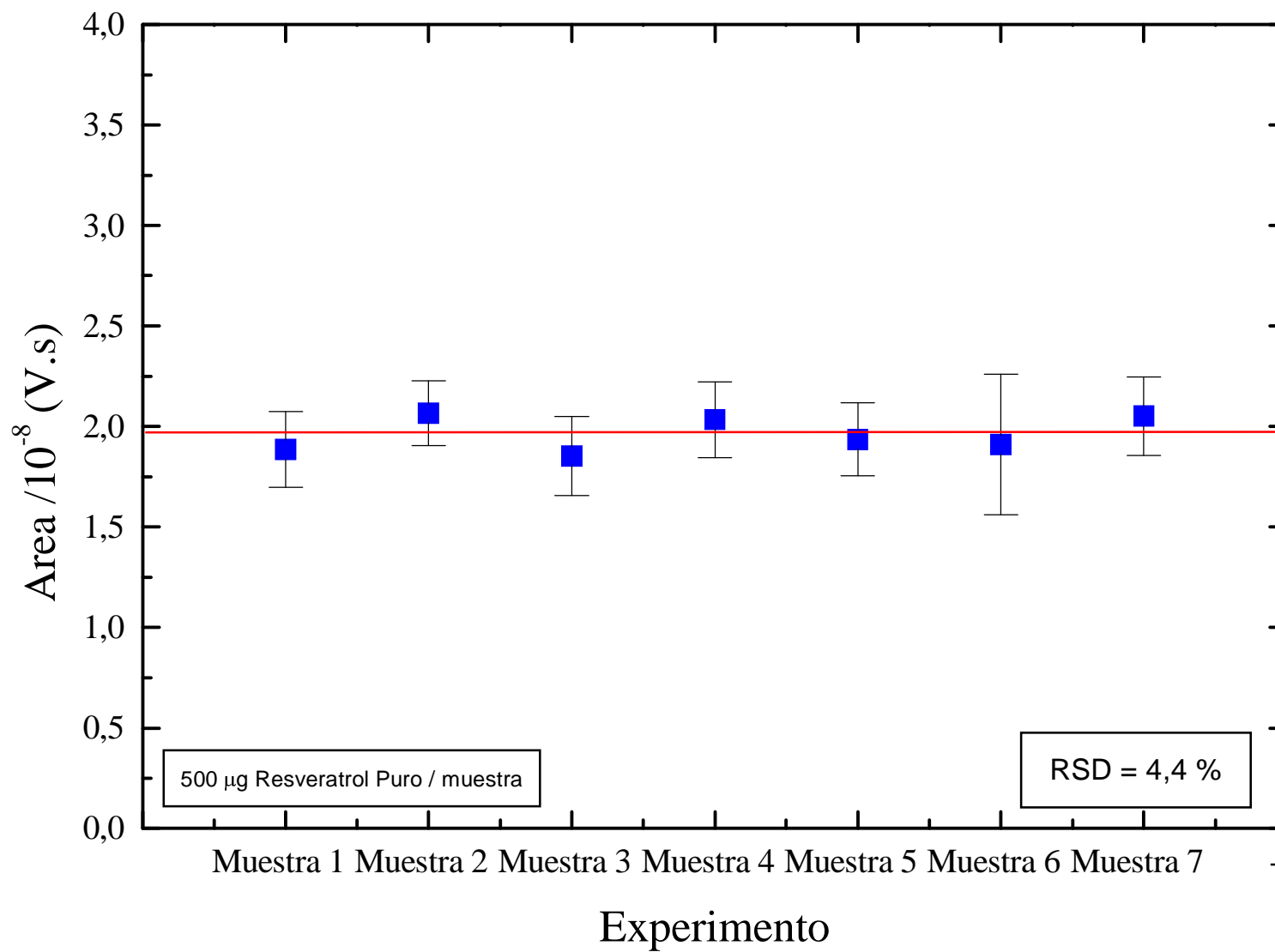


Figura 3.21 - Reproducibilidad para el análisis de trans-resveratrol en 7 alícuotas de una solución 10⁻³ M de trans-resveratrol en acetona.

3.2.3.- LINEALIDAD.

Con el propósito de comprobar que la intensidad de señal es linealmente proporcional a la concentración de analito, se estudió la relación entre ambos factores en el rango de interés analítico. Para ello se prepararon cinco muestras con un intervalo de concentraciones que oscila entre 15 y 40 ppm de trans-resveratrol puro.

Las distintas muestras fueron preparadas disolviendo 50 µg de trans-resveratrol puro en acetona, se añadieron 15 mg de Zn a cada una de ellas, posteriormente y en ensayos separados se dispersa la muestra sobre el pyrex realizando la medida en las condiciones óptimas experimentales.

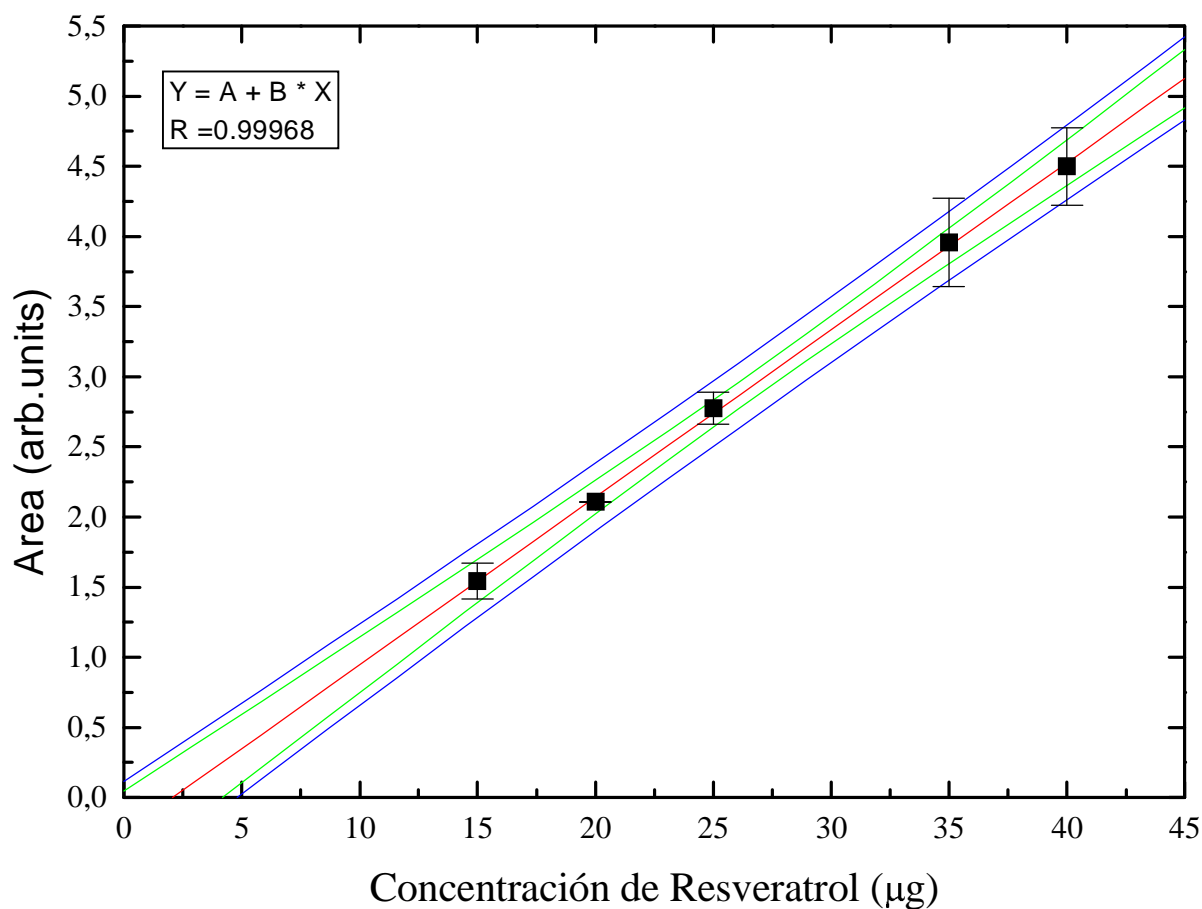


Figura 3.22 -. Variación del área del pico de trans-resveratrol en función de su concentración.

Resultados

La Figura 3.22 representa la intensidad de señal obtenida frente a la concentración de analito. La regresión lineal de los puntos experimental proporciona un coeficiente de correlación de 0.9997, por lo que en conclusión podemos asegurar una buena concordancia entre los valores que obtengamos para muestras problema y la regresión lineal en el intervalo de concentraciones estudiado. Es importante resaltar además que el punto (0,0) queda situado dentro de los límites de confianza para un valor de probabilidad del 99 %.

Cada uno de los puntos representados es la media de tres análisis que a su vez son el promedio 400 disparos del láser, es decir, 1200 vaporizaciones de la muestra analizada; recordando que la frecuencia del láser es de 10 Hz.

3.2.4.- SELECTIVIDAD.

Una etapa común de la validación de métodos analíticos convencionales es la demostración de la especificidad o selectividad del método, es decir, el grado de certeza con que puede determinarse un analito particular dentro de una mezcla compleja sin ser interferido por otros componentes de la mezcla.

Para nuestro caso concreto es bien conocida la especificidad que confiere al análisis el acoplamiento REMPI + TOFMS ^{13, 192, 195, 213, 236, 237}, debido a dos motivos principalmente, el primero es que gracias a la alta eficacia de la ionización REMPI, en una muestra compleja ionizamos selectivamente aquellas moléculas que posean niveles de energía en resonancia con la longitud de onda de los fotones empleados para provocar la ionización.

Una segunda selección se hace mediante la espectrometría de masas, es decir, si una molécula presenta una absorción significativa cercana a la longitud de onda resonante de nuestro analito, sería separada posteriormente en el

Resultados

espectrómetro de tiempo de vuelo en función de su masa. Incluso para el caso de isómeros conformacionales que poseen la misma masa podrían ser detectados de manera específica aplicando en el análisis la longitud de onda que estuviese en resonancia con cada uno de ellos ^{214}. Por todo ello no se ha considerado necesario realizar ensayos de selectividad.

3.2.5.- EXACTITUD.

Se define exactitud como el grado de concordancia entre el resultado de una medición y su valor de referencia aceptado. Cuando se aplica a un conjunto de resultados de mediciones implica la combinación de los componentes aleatorios y de un error sistemático común ^{235}.

El método más general para calcular la exactitud consiste en analizar una muestra de concentración conocida y comparar el valor obtenido con el *valor real*, para lo cual es necesario emplear un material de referencia certificado ^{229}. Éste método no es viable ya que no se han encontrado patrones certificados de trans-resveratrol. Un segundo método para determinar la exactitud del sistema es comparar el resultado de un método nuevo con el obtenido por una técnica de exactitud conocida. El trans-resveratrol es analizado generalmente por métodos cromatográficos, pero como ya se indicó en la introducción, existe una gran controversia sobre la mayor o menor exactitud de los distintos métodos publicados para su análisis.

Por lo tanto, para determinar la exactitud del método desarrollado se preparó con la mayor precisión posible una disolución patrón de trans-resveratrol de concentración conocida ($25 \pm 1 \mu\text{g}$) y posteriormente se comparó dicho valor con el obtenido al calcular la concentración de la disolución preparada usando una curva de calibrado, como se muestra en la Figura 3.23.

Resultados

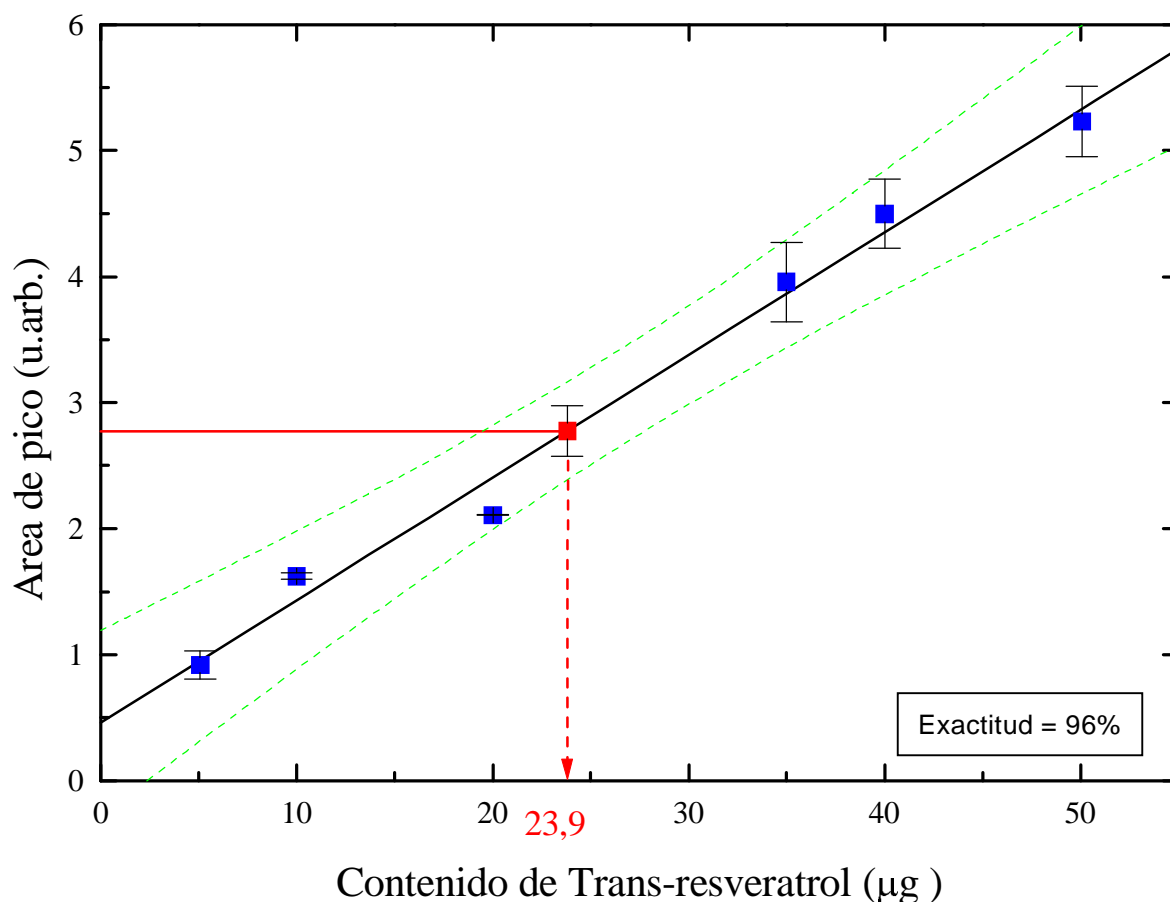


Figura 3.23 -. Experimento de exactitud de una muestra que contiene $25 \mu\text{g}$ de trans-resveratrol.

La Figura 3.23 presenta la recta de calibrado obtenida entre los valores de 5 y $50 \mu\text{g}$ de trans-resveratrol. Se depositaron sobre la placa $25 \pm 1 \mu\text{g}$ de trans-resveratrol para proceder posteriormente a su análisis. La muestra se midió tres veces y la media de estas medidas fue introducida en la recta de calibrado obteniendo un valor de concentración para dicha muestra de $23,9 \mu\text{g}$, lo que comparado con su valor real nos proporciona una exactitud de un 96%.

3.2.6.- LIMITE DE DETECCIÓN.

Se define el límite de detección de una técnica analítica, como la mínima concentración que produce una respuesta detectable por encima del nivel de ruido del sistema, y que generalmente se toma como 3 veces la desviación estándar en el blanco ^{59, 72, 234, 238}.

La Figura 3.24 muestra un espectro de masas para una muestra que contiene 5 µg de Trans-resveratrol puro con 30 mg de Zn depositados sobre el pyrex y promediado por 400 disparos del láser.

En ese espectro la intensidad de señal del trans-resveratrol es $S = -0.535$ V mientras que el promedio del ruido es de $N = 0,020$ mV, por lo que podemos obtener una relación $S/N = 26750$ para esta muestra de 5 µg de trans-resveratrol. Para calcular la cantidad desorbida realmente es necesario tener en cuenta la relación entre el área de desorción y el área del disco; la muestra fue depositada en el disco pyrex de 5 cm de diámetro (área = $19,6$ cm²), y el área de desorción es de 7 mm² ($d = 0,3$ cm); incluso si suponemos que el pulso láser desorbe completamente todo el trans-resveratrol depositado (lo cual está lejos de la realidad), la cantidad de trans-resveratrol desorbida será $[5 \cdot 10^{-6} \text{ g.} \times (7 \text{ mm}^2 / 1963 \text{ mm}^2)] = 1,78 \cdot 10^{-8}$ g. Por lo tanto la cantidad de trans-resveratrol desorbida será menor de 20 ng, lo que quiere decir que tomando el límite de detección como tres veces el nivel de ruido obtendremos un valor para dicho límite de 2 pg.

Resultados

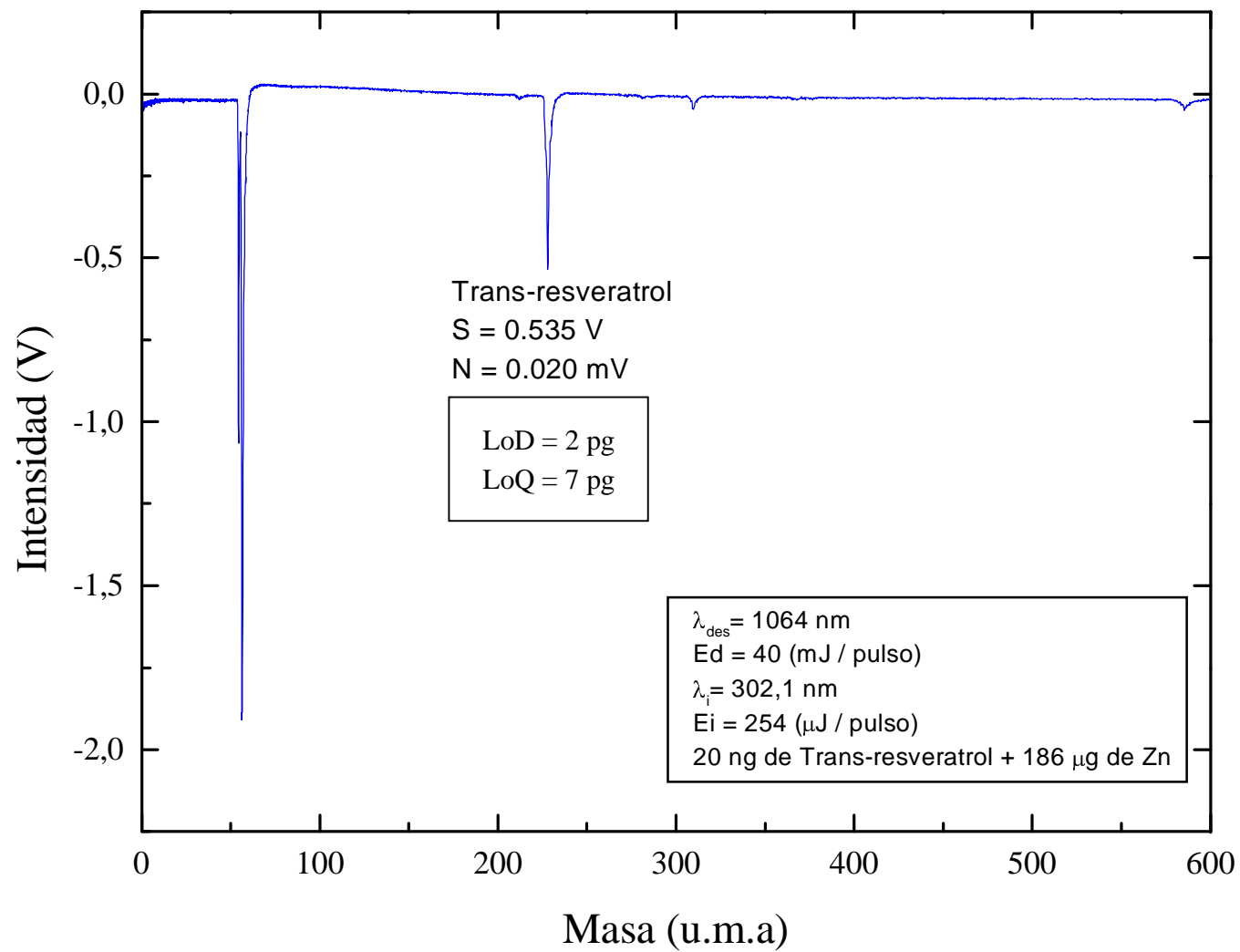


Figura 3.24 .- Espectro de masas de una muestra que contiene 5 μ g de trans-resveratrol; Se indican la intensidad de señal y el ruido medio empleados para calcular el LoD y el LoQ.

3.2.7.- LIMITE DE CUANTIFICACIÓN.

El límite de cuantificación se define como la concentración mínima que puede determinarse de forma exacta y precisa ^{239}. A partir de unos valores concretos de precisión y exactitud puede determinarse el límite de cuantificación reduciendo la concentración de analito y asegurándonos de que estos parámetros se mantienen, lo cual es un método excesivamente tedioso por lo que generalmente se calcula como la concentración de analito que posee un cociente señal ruido $S/N = 10$. Para el espectro mostrado en el apartado anterior (Figura 3.24) se obtiene un límite de cuantificación de 7 pg.

Una vez confirmada la validación de la técnica para el trans-resveratrol puro, se han realizado estudios análogos en diversas matrices con resultados igualmente satisfactorios. Se han obtenido, por ejemplo, límites de detección de 5 ppb y de 2 ppb para la determinación de trans-resveratrol en piel de uva y hoja de vid respectivamente. Dado que dichos resultados son similares a los expuestos, por brevedad se omite su exposición al ser reiterativa.

4. RESULTADOS

Aplicaciones Analíticas

4.1.- ANÁLISIS DE TRANS-RESVERATROL.

La química analítica actual requiere cada vez más de métodos directos de análisis que posibiliten el estudio de compuestos traza en muestras complejas de forma fiable a la par que rápida. Como ya hemos mencionado en la introducción de esta tesis, para el caso de sustancias como el trans-resveratrol, los métodos de análisis convencionales (GC, HPLC, EC, etc.,) requieren largos y tediosos procesos de extracción. Dichos procesos introducen las principales fuentes de error en estos métodos debido a la isomerización e hidrólisis de esta sustancia durante los procesos de preparación de la muestra. Por otra parte no debemos olvidar el carácter térmicamente lábil del trans-resveratrol, sin embargo mediante la desorción láser favorecemos la vaporización de este compuesto frente a posibles procesos de fragmentación, lo cual, acoplado a la alta selectividad y eficacia de la ionización REMPI junto con la espectrometría de tiempo de vuelo hace de esta técnica un recurso eficaz para el análisis de trazas de trans-resveratrol en muestras complejas. A continuación se presentan los estudios preliminares realizados por ionización MPI y posteriormente las aplicaciones realizadas empleando la ionización resonante del trans-resveratrol en determinaciones cuantitativas del mismo, para finalmente y en base a los resultados anteriores mostrar una aplicación de trans-resveratrol como pesticida y conservante natural en frutas y verduras.

4.1.1. EXPERIMENTOS MPI

Uno de los primeros experimentos fue comprobar que el trans-resveratrol, podía ser ionizado mediante un proceso MPI empleando el 4º armónico de un láser Nd:Yag, es decir, radiación con una longitud de onda de 266 nm. La Figura 3.14 del estudio espectroscópico del trans-resveratrol mostró el resultado de este experimento en el que se depositaron 5 mg de trans-resveratrol puro sobre la

Resultados

placa pyrex, por lo que teniendo en cuenta las dimensiones de la placa y las del perfil del láser de desorción, estaríamos desorbiendo en cada pulso láser una cantidad inferior a 15 μg .

Se corroboró mediante la aplicación de la ionización MPI que el trans-resveratrol fuera de la matriz natural que lo contiene produce la formación de glucósidos a temperatura ambiente. Puede apreciarse este fenómeno comparando las Figuras 3.14 y 4.1; en la primera figura se analiza una disolución de trans-resveratrol puro recién preparada mientras que en la Figura 4.1 se realiza el análisis de esa misma disolución 24 horas después habiendo permanecido la disolución analizada a temperatura ambiente en ausencia de luz.

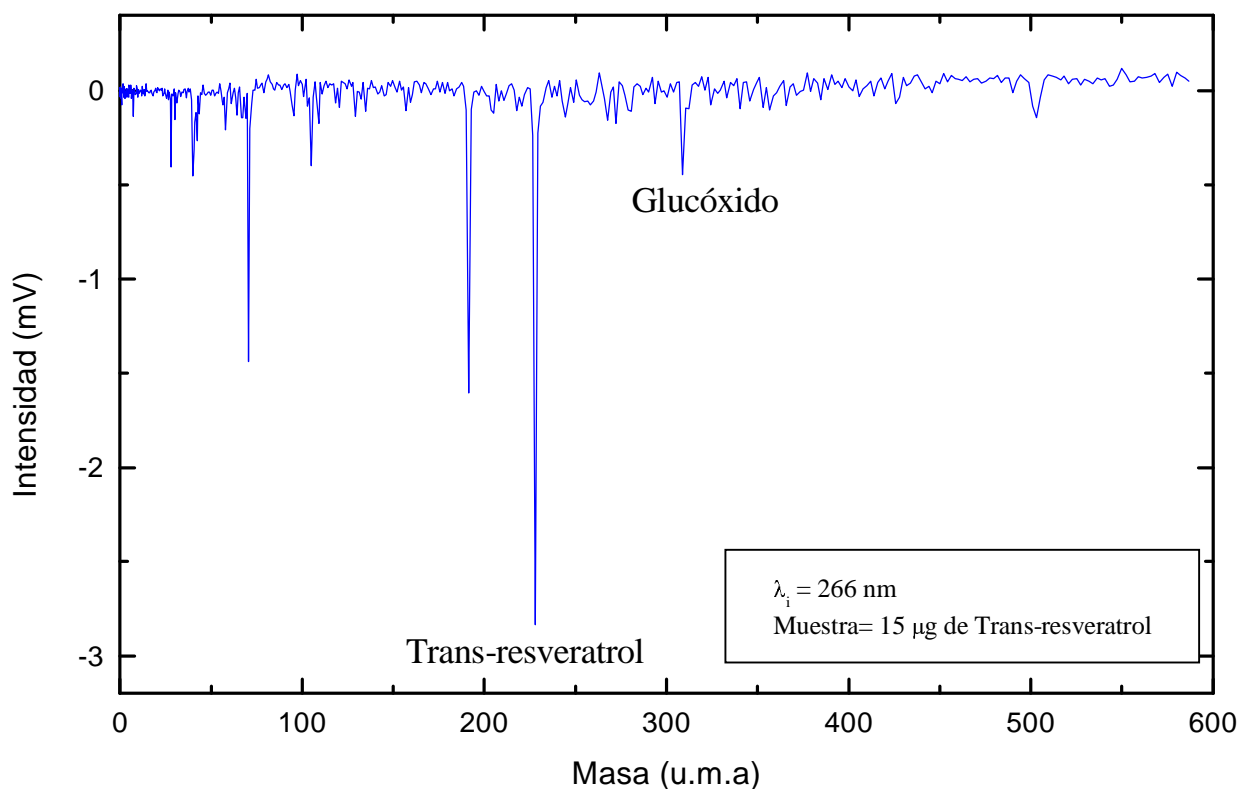


Figura 4.1 -. Espectro de masas de trans-resveratrol ionizado a 266 nm.

Resultados

Del mismo modo puede observarse en los espectros de absorción Uv-Vis mostrados en la Figura 4.2, como el trans-resveratrol se isomeriza a cis-resveratrol, tal y como describimos en la introducción de esta tesis por acción de la luz ultravioleta por lo que, y teniendo en cuenta su labilidad térmica, las disoluciones de trans-resveratrol puro empleadas en los distintos análisis deben ser siempre conservadas en nevera ($\approx 5^{\circ}\text{C}$), y en ausencia de luz.

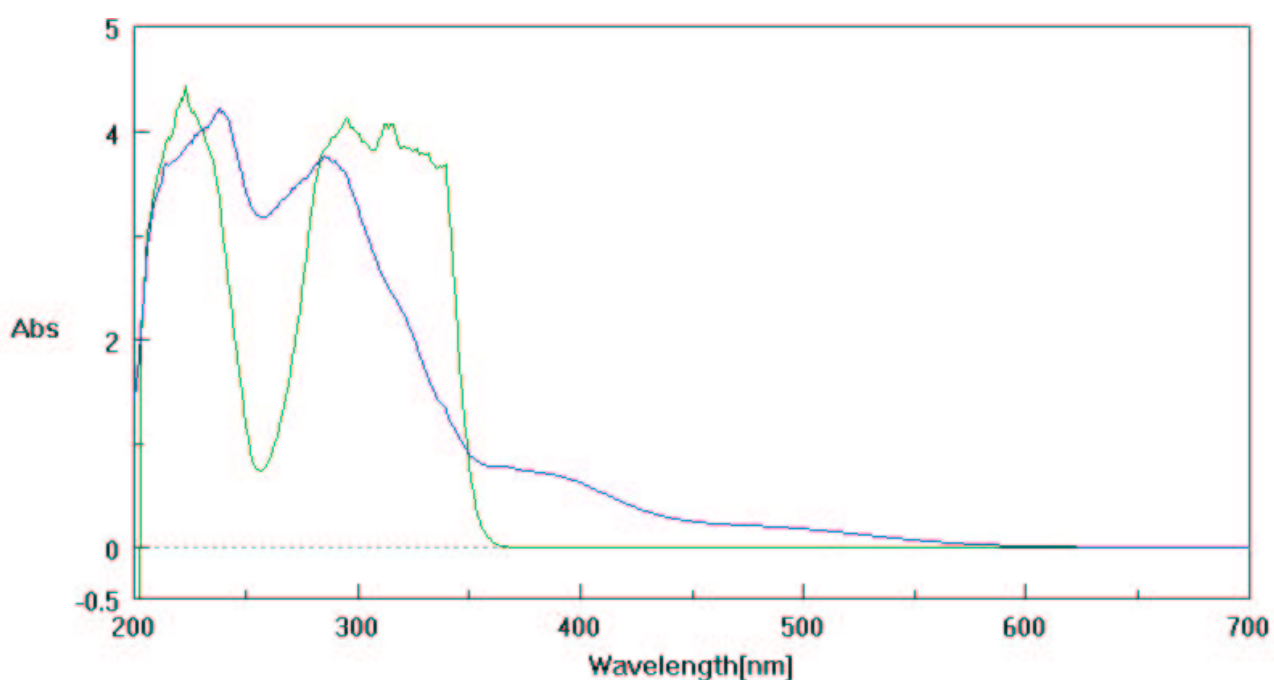


Figura 4.2 -. Espectro de absorción de una muestra trans-resveratrol y la misma muestra expuesta a la luz de una bombilla durante 1 hora, se aprecia en azul la aparición del isómero cis-resveratrol.

Resultados

En la Figura 4.3, se muestra el espectro de un vino ionizado a 266 nm y en cuyo proceso de fermentación no se han separado el mosto y el hollejo de la piel de uva. En este caso debido a la alta fluencia del láser para provocar la ionización MPI no pueden distinguirse los isómeros trans y cis del resveratrol en el espectro.

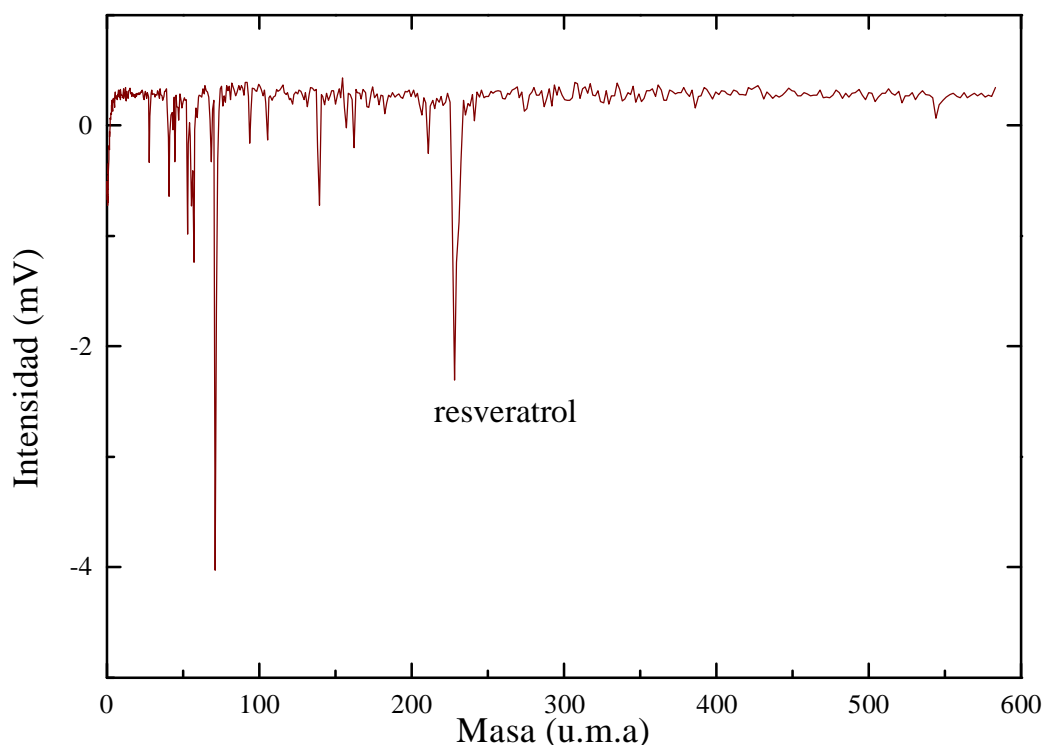


Figura 4.3 -. Espectro de masas de vino tinto ionizado a 266 nm.

Podemos también considerar que el hollejo de la uva posee una gran aplicabilidad potencial en lo que a su contenido de trans-resveratrol se refiere dadas las grandes propiedades antioxidantes beneficiosas para la salud humana ya descritas del mismo, así por ejemplo entre otras se muestra en la Figura 4.4 un colorante alimenticio manufacturado a partir del hollejo de la uva y en el que puede apreciarse la presencia de trans-resveratrol medido a 266 nm (MPI).

Resultados

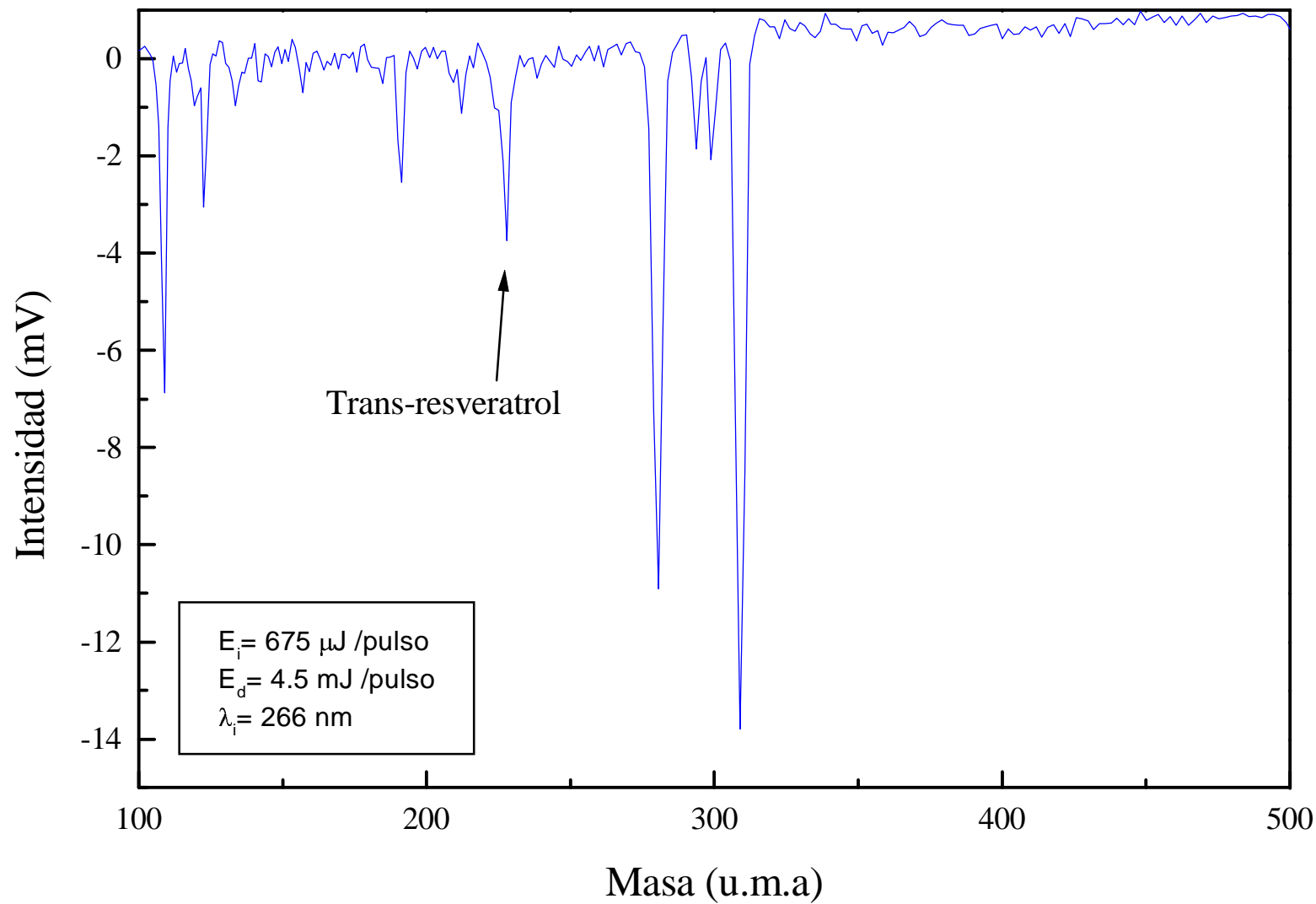


Figura 4.4 -. Espectro en masas de un colorante alimenticio ionizado por MPI a 266 nm.

4.1.2. ESTUDIO DEL CONTENIDO DE TRANS-RESVERATROL EN LAS DISTINTAS PARTES DE LA UVA.

Conocidas las importantes propiedades beneficiosas para la salud de algunos polifenoles, uno de los principales estudios acometidos en este trabajo, es la determinación de trans-resveratrol en frutas, y más concretamente en uvas. Para ello se emplearon distintas formas de deposición de la muestra sobre el pyrex, pero en todos los casos el análisis se centro en la piel de uva y las hojas de la vid. Es sabido que el trans-resveratrol es generado por la planta para actuar como pesticida natural frente a infecciones fúngicas ^{41 -47} por lo que aparece principalmente en la piel del fruto y en las hojas ^{33 -35}. Se desconoce por el momento si su génesis tiene lugar directamente en la piel o si bien se genera en la semilla o pulpa del fruto para después transportarse hasta la piel, en cualquier caso su presencia ha sido descrita principalmente en la piel, lo cual facilita el análisis al ser este fenómeno por sí mismo un método de preconcentración natural del trans-resveratrol en la piel.

Se ha realizado el estudio del contenido de trans-resveratrol en las distintas partes de la uva, para ello se analizó una muestra que contenía 70 mg de piel de uva y posteriormente otra bajo las mismas condiciones pero que contenía esta vez la misma cantidad de pulpa; como se observa en la Figura 4.5 no se detecta ninguna cantidad significativa de trans-resveratrol en los análisis de pulpa; resultados similares se obtuvieron en el análisis de pulpa en distintos tipos de uvas, por lo que se empleó para todos los análisis como muestra de origen la piel de las uvas, desechando la pulpa.

Resultados

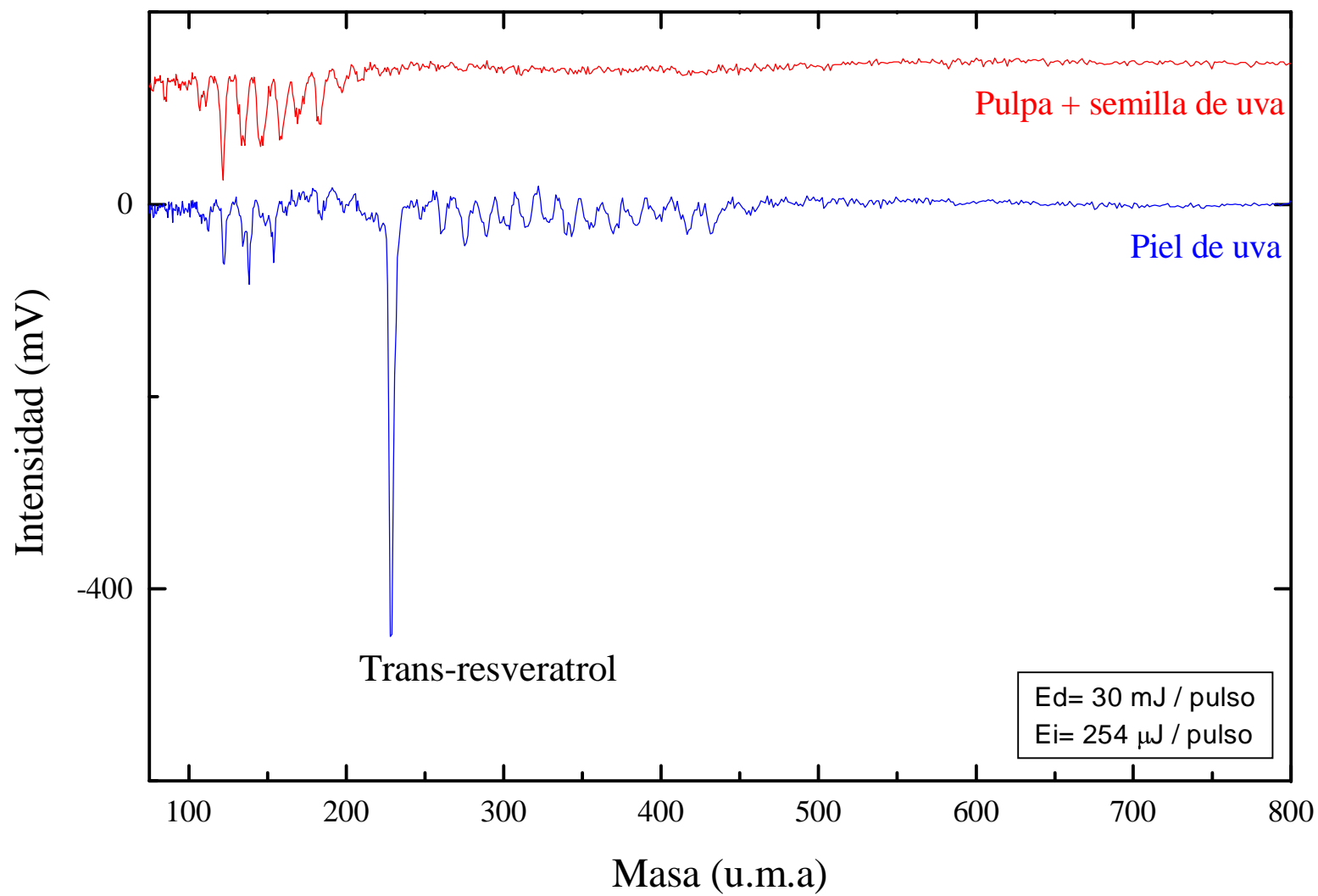


Figura 4.5 -. Espectro en masas de pulpa y semilla depositadas sobre el pires (arriba en rojo) y de la piel de uva (abajo en azul).

4.1.3. EXTRACCIÓN DEL TRANS-RESVERATROL POR PRENSADO EN FRÍO.

Ya se describió anteriormente el sistema experimental empleado para realizar este proceso. Se realizó un estudio análogo al expuesto en el apartado anterior con el fin de demostrar la eficacia de la extracción del trans-resveratrol al prensar en frío las pieles de uva.

El aceite obtenido del prensado de las pieles fue contrastado con el residuo de esas mismas pieles de uva. Para realizar el experimento se pelaron 10 uvas y sus pieles fueron prensadas, obteniendo 0,5 ml de aceite esencial y 580 mg de residuo de piel.

El aceite esencial fue mezclado con 15 mg de Zn en polvo y depositado sobre la placa de pyrex, siendo introducida posteriormente en la cámara de ionización.

El residuo fue triturado y mezclado con otros 15 mg de Zn en polvo y depositado sobre la placa de pyrex.

La Figura 4.6 muestra dos espectros tomados bajo las condiciones óptimas de energía de desorción para cada tipo de muestra, pudiendo corroborarse que en dichos restos no se obtuvo ninguna señal significativa de trans-resveratrol por encima de nuestro límite de detección y ratificando de ese modo la eficacia de este sencillo proceso. Ambos espectros muestran un gran ruido debido a que la energía de ionización ha sido forzada (por encima de 1 mJ /pulso en la desorción) para asegurar que no queda trans-resveratrol en el residuo de la piel.

Resultados

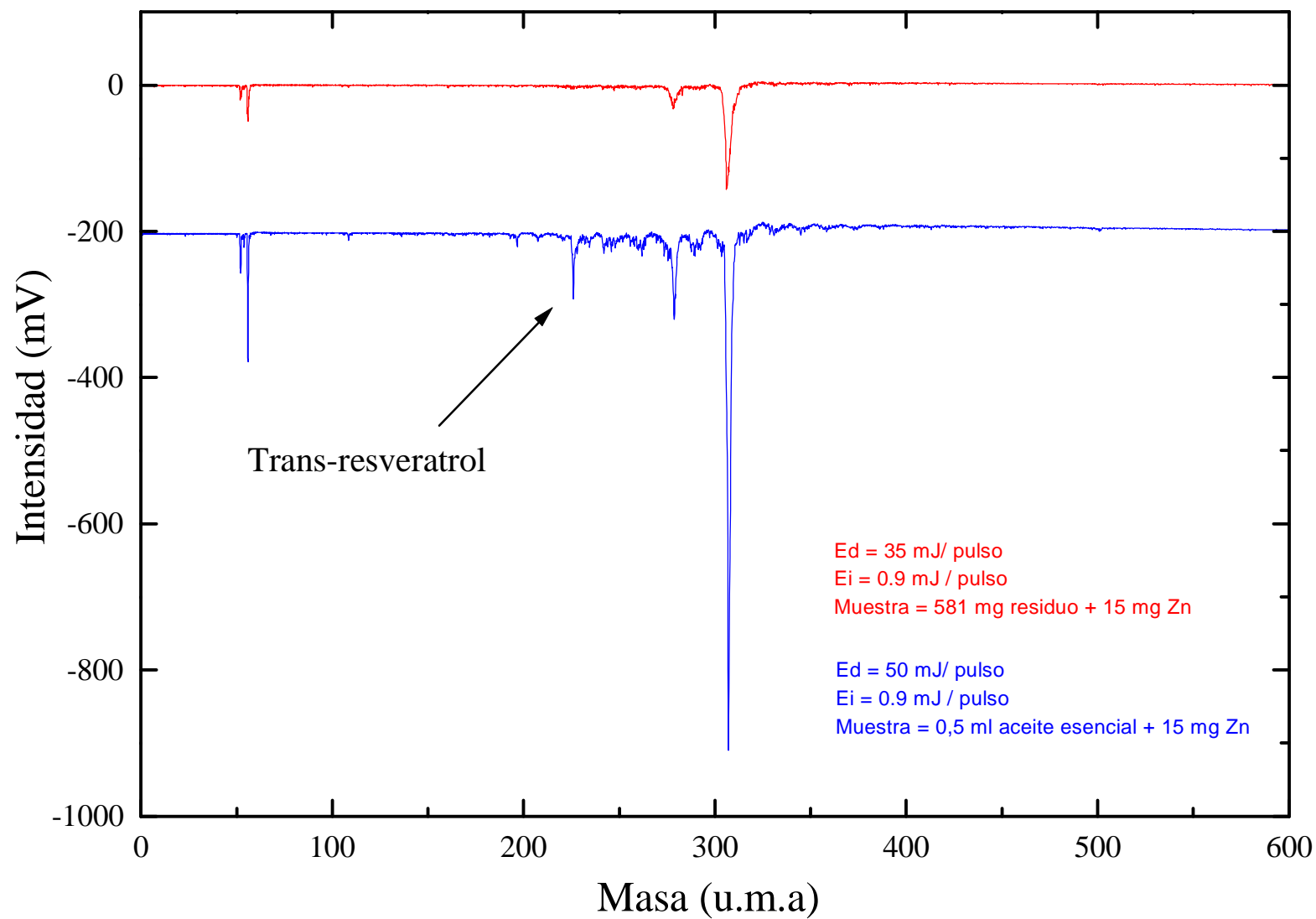


Figura 4.6 -. Espectros de aceite esencial extraído de la piel de la uva (arriba en azul) y del residuo de la piel una vez prensada (abajo en rojo).

4.1.4. CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE TRANS-RESVERATROL EN DISTINTAS VARIEDADES DE UVA.

Uno de los objetivos específicos de esta tesis es la determinación cuantitativa del contenido de trans-resveratrol en uvas, por lo que constituye en sí mismo una de las principales aplicaciones de este trabajo.

La Figura 4.7 muestra el espectro de masas de una muestra de piel de uva blanca española (denominación de origen IDEAL, 1999) desorbida por aplicación de la técnica MEPED e ionizada en la longitud de onda resonante del trans-resveratrol.

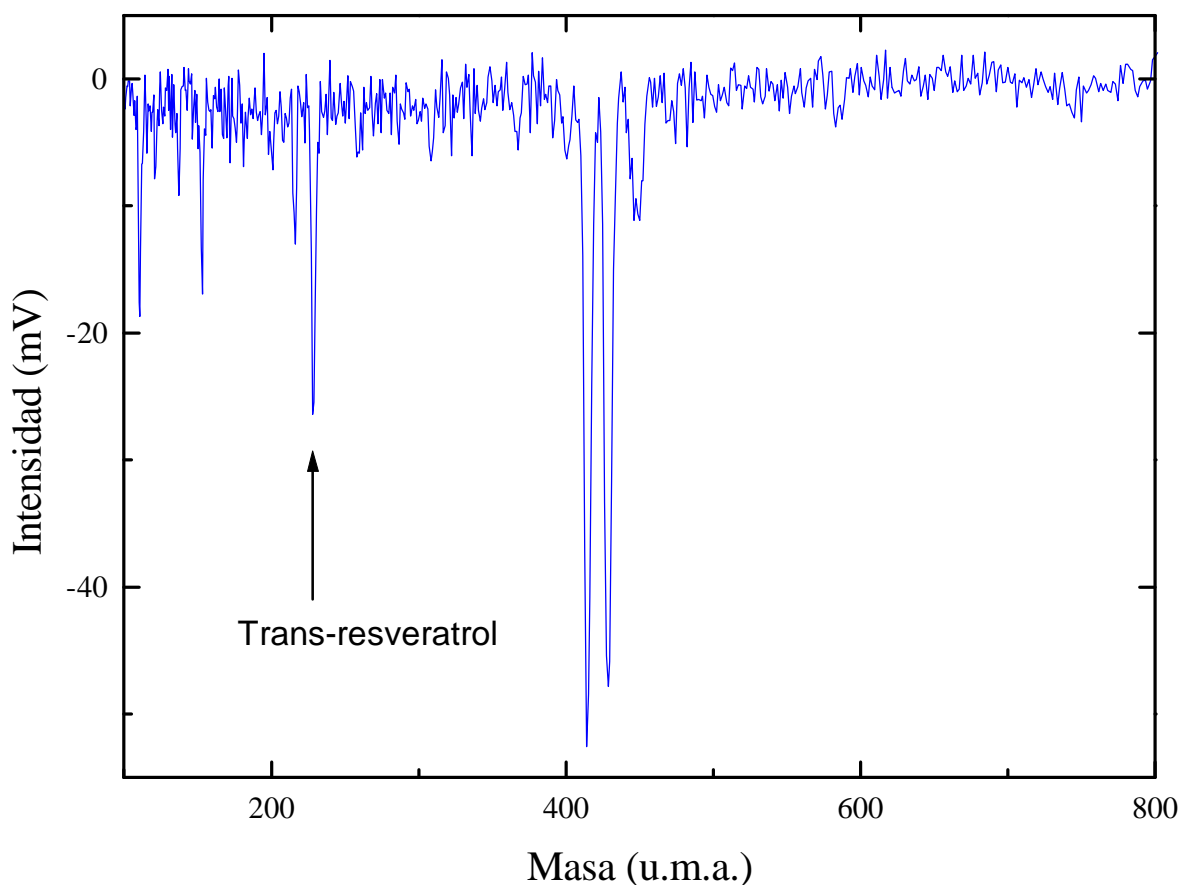


Figura 4.7 -. Espectro de masas de la piel de uva de la variedad Ideal desorbida mediante la técnica MEPED a 532 nm e ionizada mediante REMPI a 302,1 nm.

Resultados

Para la cuantificación del contenido de trans-resveratrol en la piel de esta uva Ideal, se ha utilizado el método de adiciones estándar, en el que cantidades conocidas de trans-resveratrol son añadidas a sucesivas alícuotas que contienen 76 mg de piel de uva.

La Figura 4.8 muestra éste experimento, donde cada punto corresponde a la medida de 5 registros tomados en diferentes zonas del disco pyrex, y correspondiendo cada una de ellas a su vez a la media de 400 vaporizaciones de la muestra.

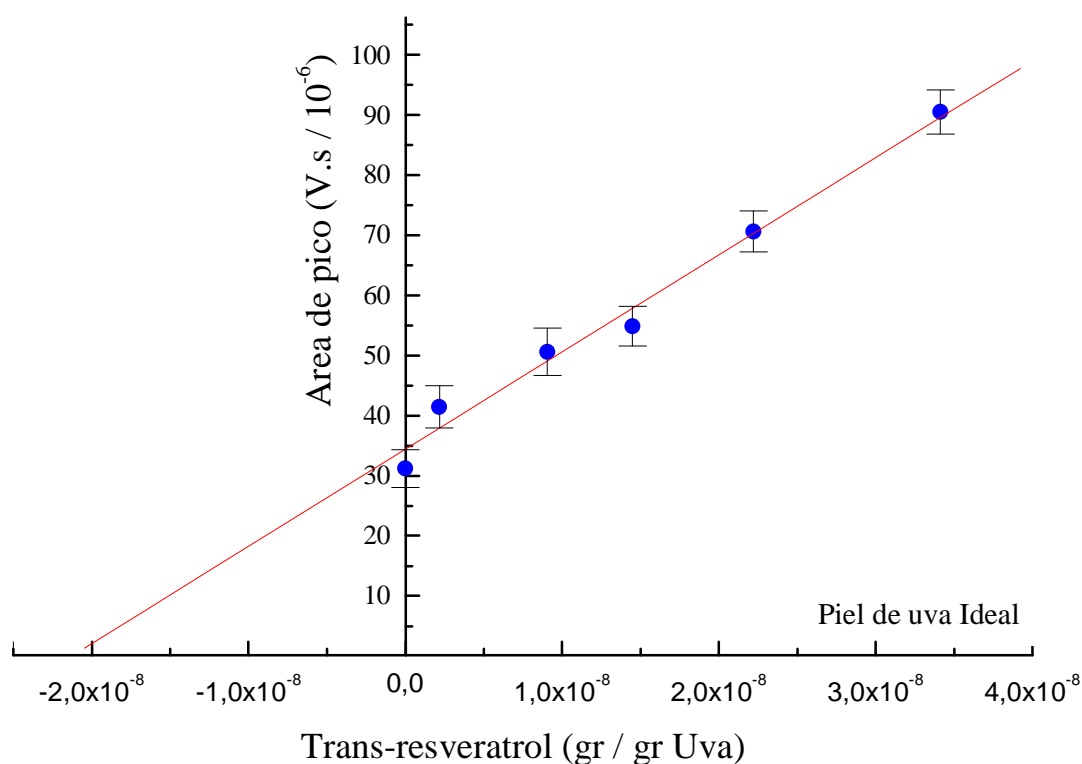


Figura 4.8.- Determinación del contenido de trans-resveratrol en piel de uva de la variedad Ideal por el método de adiciones estándar.

Resultados

El valor obtenido de la intersección con el eje X de la regresión lineal indica un valor de 20 ppb de trans-resveratrol en la piel de la uva. El espectro mostrado en la Figura 4.7 fue desorbido con una energía de 30 mJ/pulso y de 254 μJ / pulso en la ionización en la longitud de onda resonante del trans-resveratrol, para la misma uva empleada en el experimento de adiciones estándar mostrado en la Figura 4.8 y por lo tanto contiene 0,020 μg de trans-resveratrol por gramo de piel. La cantidad de piel depositada en la placa corresponde a 48 μg de piel y 79 μg de polvo de Zn en el área de desorción lo que equivale a 2 pg de trans-resveratrol. Considerando estos valores el límite de detección en este espectro para la piel de uva sería de 5 ppb.

Un estudio similar se muestra en la Figura 4.9, donde se presenta un espectro de masas para una uva roja sudafricana (denominación de origen Cape), y que corresponde a 96 μg de piel de uva y 110 μg de Zn en el área de desorción. Mediante el método de adiciones estándar se ha determinado que dicha uva contiene $0,026 \pm 0,005$ μg de trans-resveratrol / g de piel de uva.

Resultados

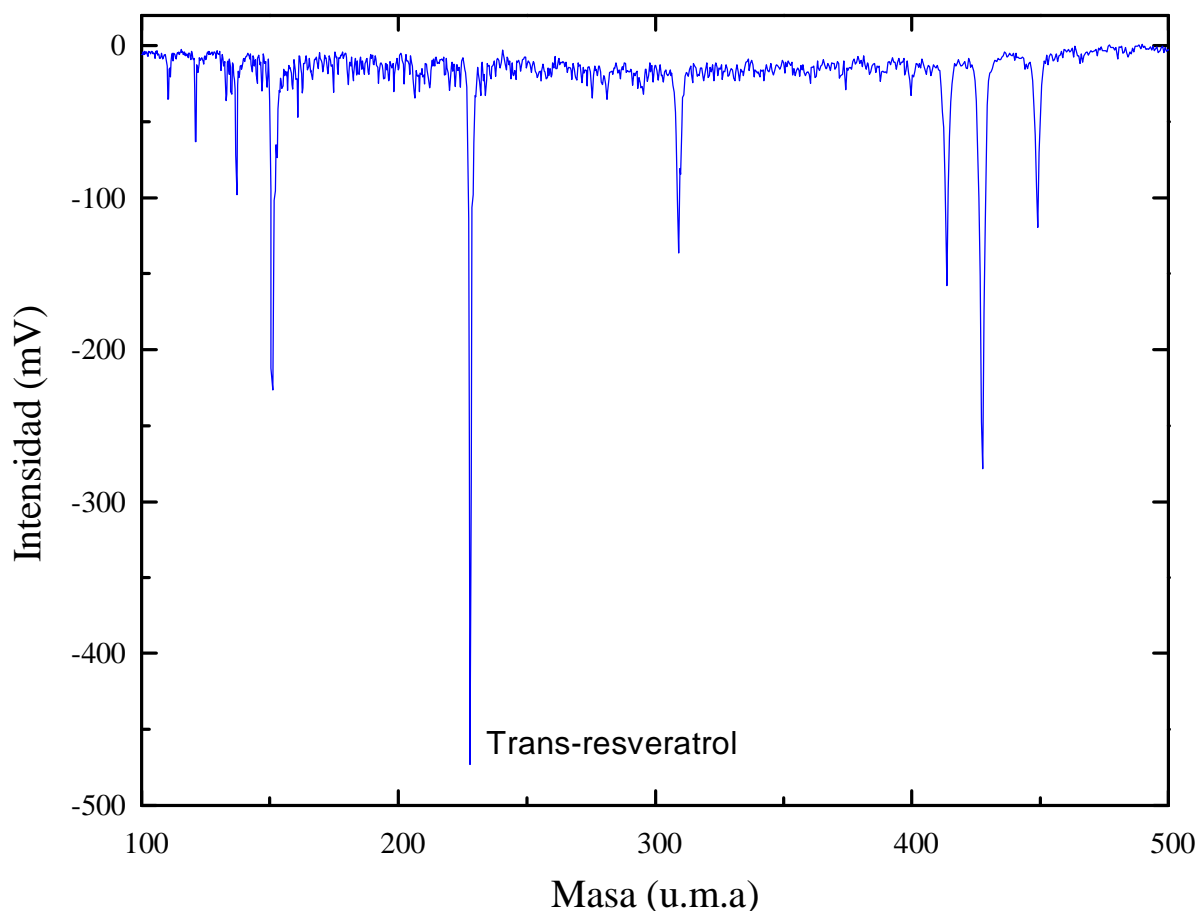


Figura 4.9 -. Espectro de masas de piel de uva de origen sudafricano desorbida con la técnica MEPED a 1064 nm e ionizada a 302,1 nm mediante REMPI.

Una ampliación de este estudio a distintos tipos de uva se recoge en la Figura 4.10, donde puede observarse la gran variabilidad de la concentración de trans-resveratrol dependiendo del tipo de uva: las españolas albedo, ideal o garnacha, la chilena, la sudafricana, o la israelí sin semilla. Dado que la concentración de trans-resveratrol depende también de las prácticas agrícolas empleadas, estado de maduración, etc., no puede concluirse de forma genérica con sólo un experimento en uva israelí sin semilla que dicha uva no posee trans-resveratrol, o que la semilla juega un importante papel en la génesis del trans-resveratrol. Sería necesario para poder sugerir esta hipótesis un estudio más amplio sobre diversos tipos de uvas sin semilla.

Resultados

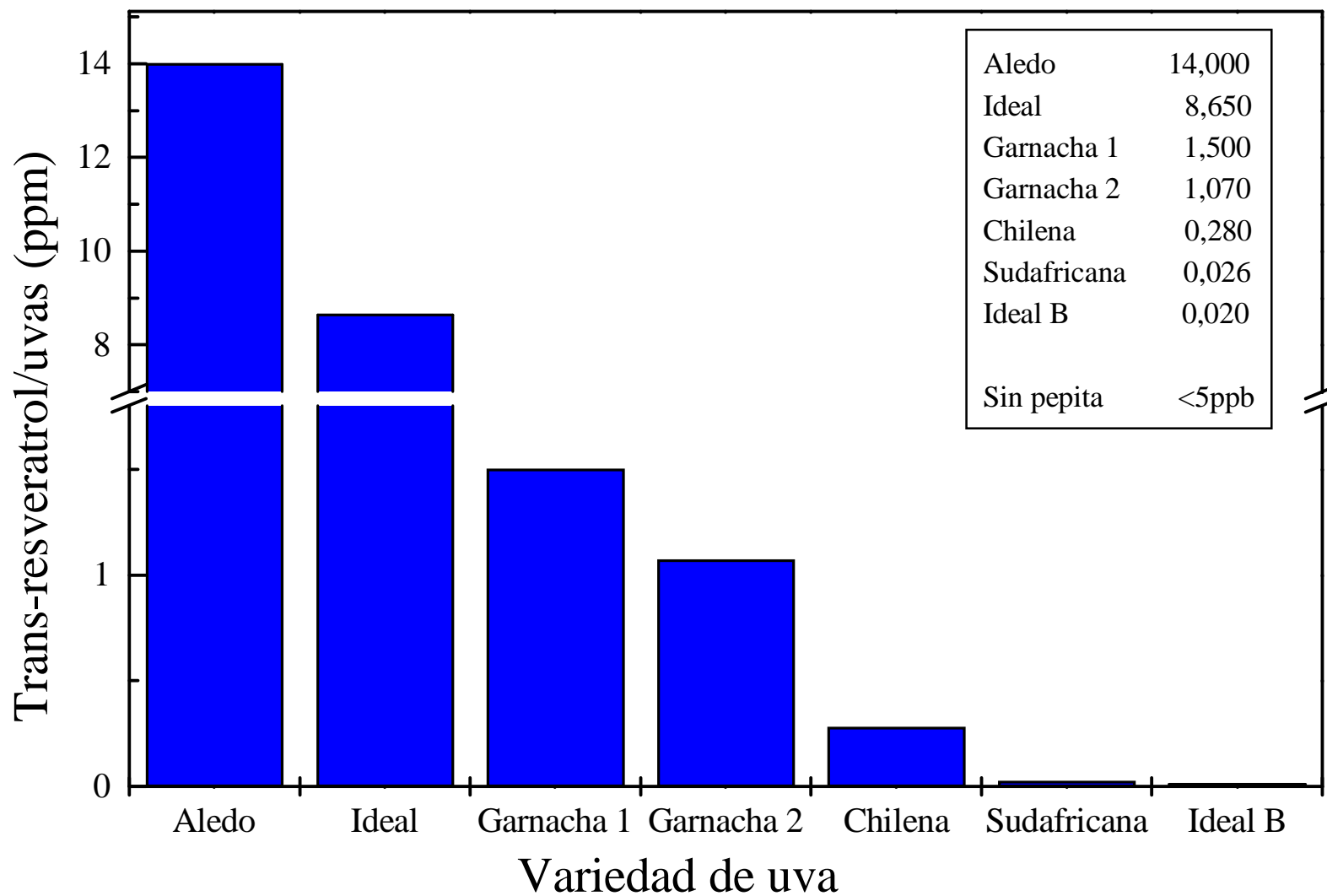


Figura 4.10 -. Comparativa del contenido de trans-resveratrol en distintos tipos de uva determinado por el método de adiciones estándar.

4.1.5. CUANTIFICACIÓN DEL TRANS-RESVERATROL EN HOJA DE VID.

Como ya se mencionó anteriormente el trans-resveratrol se acumula tanto en la piel de la uva como en la hoja de la vid, por lo que otro experimento de interés es la determinación del contenido de este compuesto en las hojas de la vid. La Figura 4.11 muestra el espectro de masas para una muestra de hojas de vid a las que se les ha extraído su aceite esencial y se han medido bajo las condiciones experimentales optimas ya descritas. Puede observarse claramente el pico de trans-resveratrol, lo cual muestra nuevamente como la combinación de la ionización selectiva y la versatilidad de la espectrometría de tiempo de vuelo permite identificar claramente un componente sin interferencias del resto de la muestra compleja, evitando procesos de separación previos.

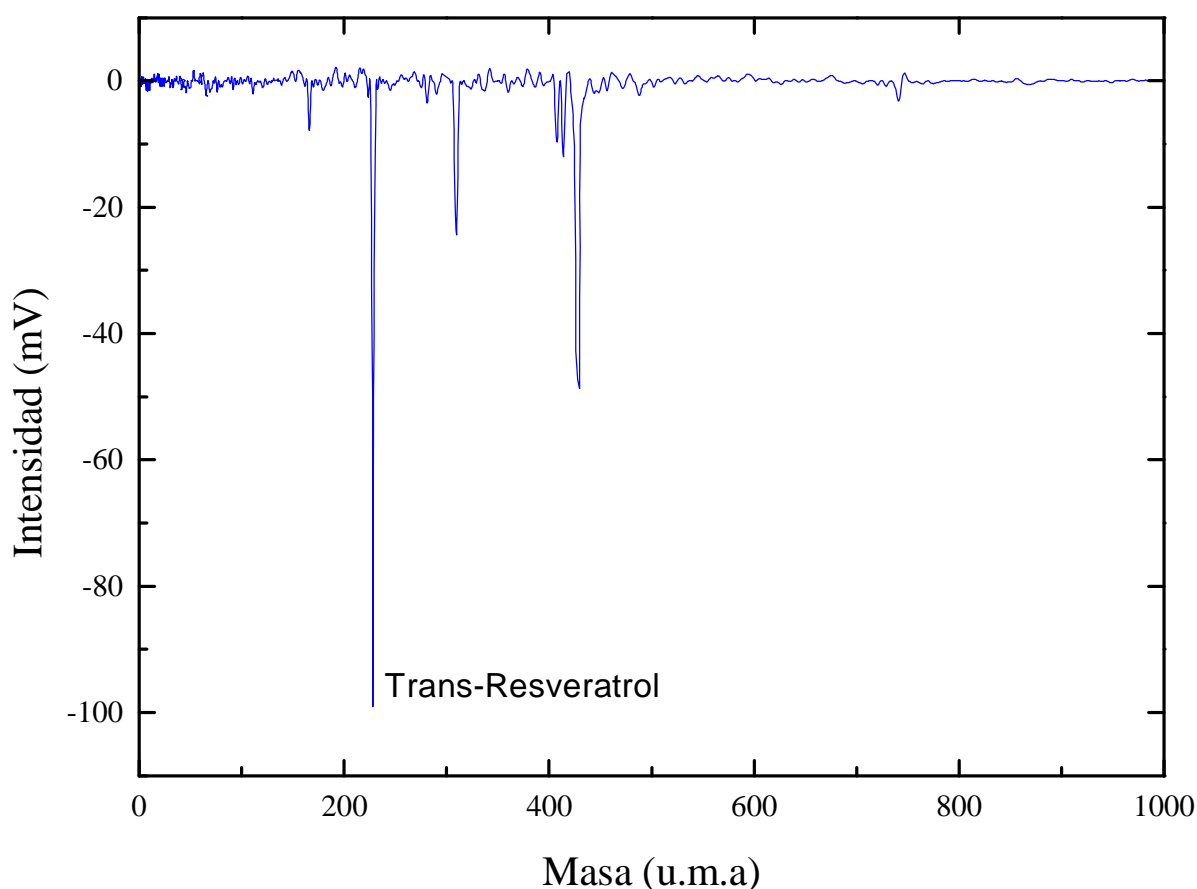


Figura 4.11 -. Espectro del aceite esencial de hoja de la variedad Aledo desorbida con la técnica MEPED a 1064 nm e ionizada a 302,1 nm mediante REMPI.

Resultados

Para esta muestra el contenido de trans-resveratrol ha sido determinado una vez más mediante el método de adiciones estándar tal y como aparece en la Figura 4.12, encontrándose un valor de 3,8 μg de trans-resveratrol por gramo de hoja de la variedad Aledo alicantina.

Adiciones estandar

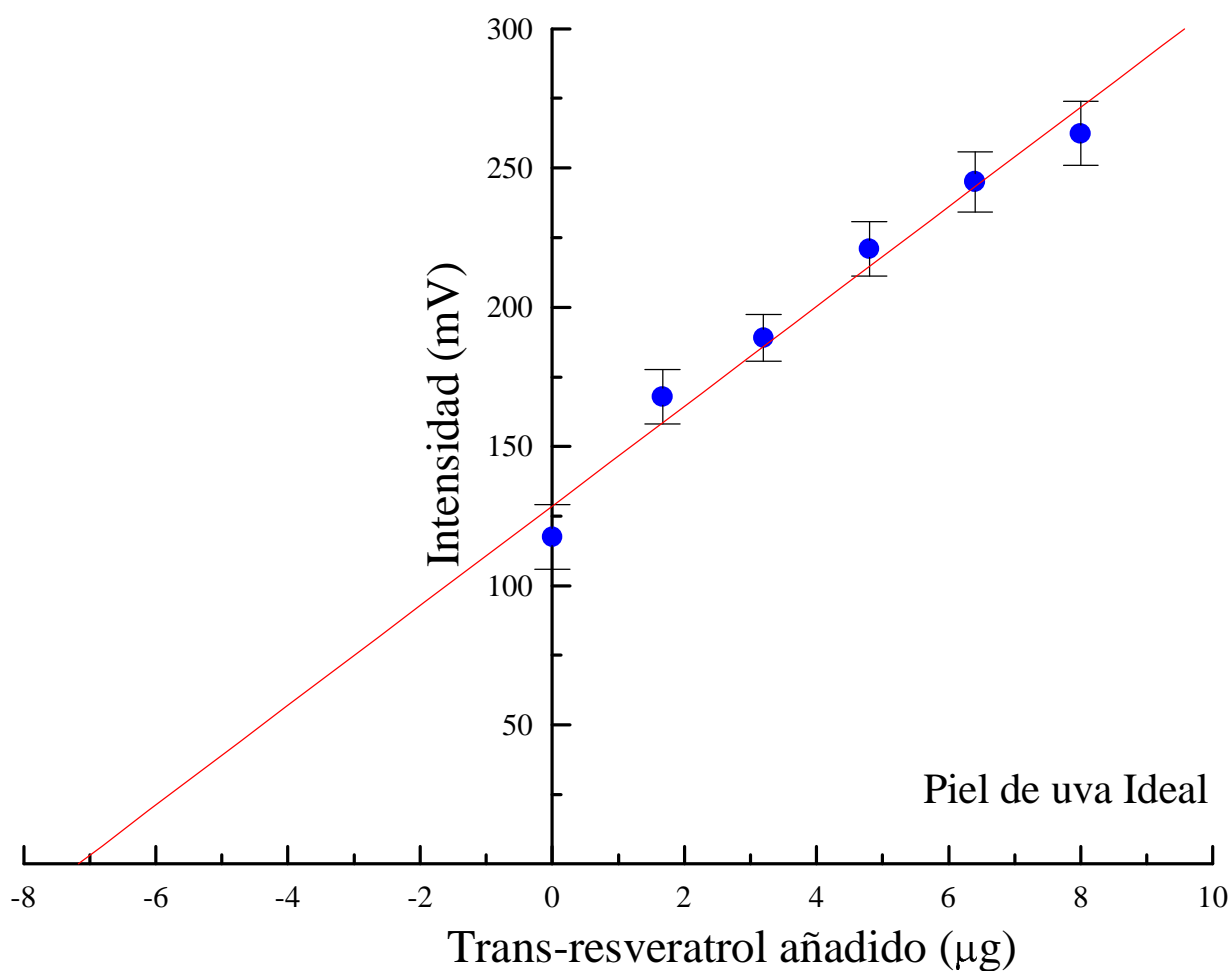


Figura 4.12 -. Determinación del contenido de trans-resveratrol en aceite esencial de las hojas de la variedad Aledo por el método de adiciones estándar.

A partir del valor obtenido de la concentración de trans-resveratrol de las hojas de vid mostradas en el espectro anterior, puede calcularse el límite de

Resultados

detección y que como ya se anticipó en el apartado correspondiente a la validación es de 2 ppb.

En la Figura 4.13 se recoge el estudio de las hojas de dos variedades diferentes de uvas, Aledo e Ideal. Para cada variedad se estudió el contenido de trans-resveratrol en distintas etapas del crecimiento de las hojas. Una primera cuando la hoja es joven y es recolectada del extremo de los sarmientos y otra segunda etapa cuando la hoja ya es vieja para lo que se recolecta de la base de los sarmientos.

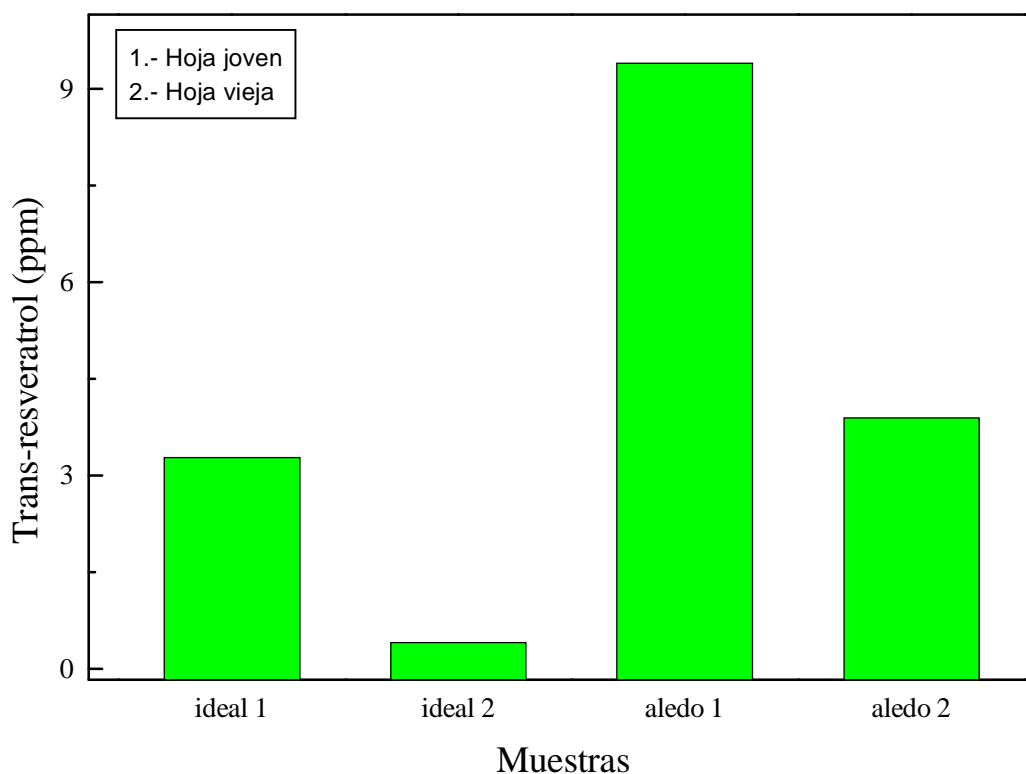


Figura 4.13 -. Comparativa del contenido de Trans-resveratrol determinado por el método de adiciones estándar en hojas de distintas variedades de vides.

Para este estudio las dos variedades de uvas fueron cultivadas en terrenos próximos, sobre el mismo tipo de suelo empleando las mismas prácticas agrícolas y diferenciándose solamente en su variedad Aledo o Ideal.

Resultados

Como puede observarse en la figura, la variedad Aledo presenta una concentración mayor de trans-resveratrol que la variedad Ideal, tanto en el caso de hojas jóvenes como en el de hojas viejas. También puede apreciarse con claridad como en ambas variedades de uva el contenido de trans-resveratrol de las hojas jóvenes es mayor que el de las hojas viejas.

4.1.6. CUANTIFICACIÓN DEL TRANS-RESVERATROL EN CACAHUETE.

Tal y como se mencionó en la introducción, ya se había descrito por varios autores que los cacahuetes poseen un contenido significativo de trans-resveratrol. Por este motivo se eligió el cacahuete como el primer fruto para corroborar la utilización de la técnica en frutos distintos de las uvas, es decir, pretendemos con el siguiente experimento extender el método de análisis a otros alimentos.

Para la realización del experimento se prensaron los cacahuetes por el método de prensado en frío ya aplicado para el caso de la piel de la uva o las hojas de vid. Se prensaron 17 g de cacahuete y al aceite esencial obtenido se le añadieron 15 mg de Zn para posibilitar la desorción MEPED..

La Figura 4.14 muestra el espectro de masas del cacahuete correspondiente al aceite depositado sobre el pyrex. El contenido de trans-resveratrol determinado para en esa cantidad de cacahuete es de 2,4 μg (0,1 ppm).

Resultados

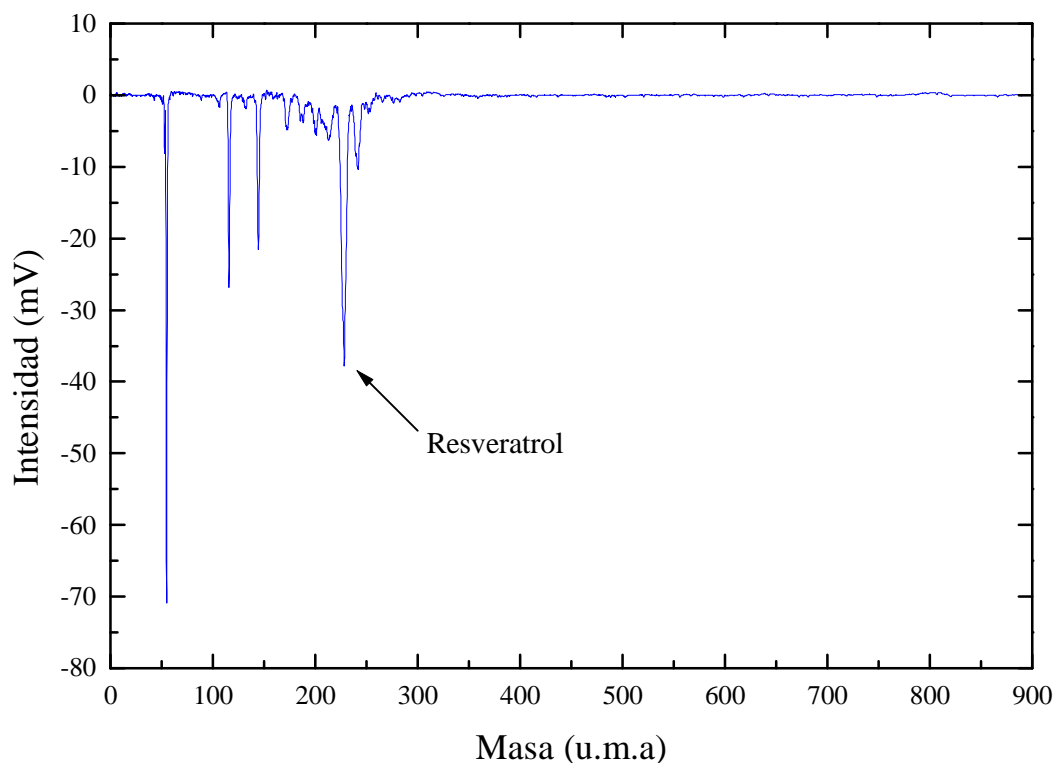


Figura 4.14 -. Espectro de masas del aceite esencial del fruto de cacahuete desorbido mediante Meped a 1064 nm e ionizado resonantemente a 302,1 nm.

4.2.- EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO DE TRANS-RESVERATROL EN UVAS INFECTADAS POR BOTRYTIS CINEREA.

Es sabido que en muchos climas las frutas y verduras sólo pueden crecer y recolectarse durante una pequeña parte del año, mientras que su demanda existe durante todo el año. Esta razón obliga a almacenar y conservar las frutas y verduras durante periodos de distinta duración antes de ser puestos a la venta para los consumidores, lo cual introduce pérdidas considerables debido al ataque de agentes patógenos y a la senescencia natural de la fruta. Las soluciones tradicionales a este problema han sido el almacenamiento controlado de las frutas modificando la composición de la atmósfera de los recintos o cámaras que las

Resultados

contienen y la utilización de pesticidas sintéticos. Sin embargo y a pesar de estas medidas las pérdidas posteriores a la cosecha rondan aproximadamente el 20 % , pudiendo llegar en algunos casos hasta el 50% de la cosecha recolectada.

En esta tesis doctoral se ha realizado el desarrollo y puesta a punto de nuevos sistemas que permiten analizar el estado de salud de la fruta y reducir las pérdidas durante los procesos de almacenamiento reforzando la resistencia natural de las plantas ^{240}. Para ello fue necesario en primer lugar identificar alguno de los componentes responsables de producir la respuesta natural de la planta como defensa frente a las infecciones fúngicas de tal manera que no sólo permita analizar el estado de salud la planta durante su almacenamiento, sino también optimizar su presencia para así incrementar la resistencia de la planta.

El objetivo principal de este estudio concreto, es tratar de establecer si existe o no una relación entre el estado de salud de la fruta y la concentración de estos compuestos no volátiles, dilucidando de este modo su viabilidad como pesticidas naturales. Se eligió como fruta de estudio la uva por los motivos ya expuestos en el apartado 1.2 siendo además su caracterización y estudio un punto importante de interés para muchas empresas viti-vinícolas.

Se necesitó por lo tanto, para alcanzar este objetivo, medir la evolución del concentración de trans-resveratrol en uvas sanas y uvas infectadas por *Botrytis Cinerea*. Desde que Langcake y Price describiesen la elicitación del trans-resveratrol por la acción de la *Botrytis Cinerea* ^{8}, se han realizado muchos estudios tratando de describir su interacción ^{6, 9, 10}, midiendo la concentración de trans-resveratrol principalmente en la hoja de la vid en investigaciones in vitro, sea mediante cultivos celulares o mediante plántulas. Para investigar la evolución del trans-resveratrol tras los periodos de almacenamiento se determinó su contenido en el fruto y no en las hojas, es decir en las uvas infectadas y no infectadas por la *Botrytis Cinerea*.

Resultados

La cepa de *Botrytis Cinerea* se consiguió haciéndola crecer a partir de patata en un medio de dextrosa agar a 24 °C, con un alto grado de humedad e irradiación con luz blanca durante 14 horas. Cuando este cultivo ha esporulado se añaden 2 ml de agua destilada y se filtra tres veces con papel poroso para obtener así una suspensión de esporas de concentración 10^3 Conidias / ml, la disolución resultante se añade a otra compuesta de glucosa 0,11 M y KH_2PO_4 67 mM. En los experimentos un grupo de uvas fueron inoculadas mediante una inyección en el centro de la uva con 5 μl de la disolución que contiene las esporas mientras que otro grupo de control será inoculado sólo con 5 μl de la disolución de glucosa y KH_2PO_4 . Con el fin de que la inoculación fuese homogénea, la punción se realizó mediante una jeringuilla con un “tope” en la aguja para asegurar que la profundidad de la herida fuese la misma en todas las muestras. Los resultados obtenidos se comparan con los del grupo de control, formado por uvas a las que no se les ha realizado tratamiento ni incisión alguna. Todos los grupos de uvas fueron conservados en recipientes de plástico sobre papel de filtro húmedo a una temperatura que oscilaba entre los 15 y 23 °C y una humedad relativa del 80-85 % .

El siguiente experimento muestra el análisis de trans-reveratrol en uvas infectadas por *Botrytis Cinerea*, para ello evidentemente se partió de una uva cuyo contenido de esta molécula era lo suficientemente significativo como para poder apreciar su evolución a medida que la infección progresaba.

La Figura 4.15 recoge cuatro espectros correspondientes al aceite esencial extraído de la piel de las uvas infectadas por *Botrytis*, con una separación temporal de 1 día entre uno y otro espectro, registrados todos ellos en las condiciones óptimas de desorción e ionización ya descritas en el apartado anterior para la desorción MEPED y la ionización REMPI.

Resultados

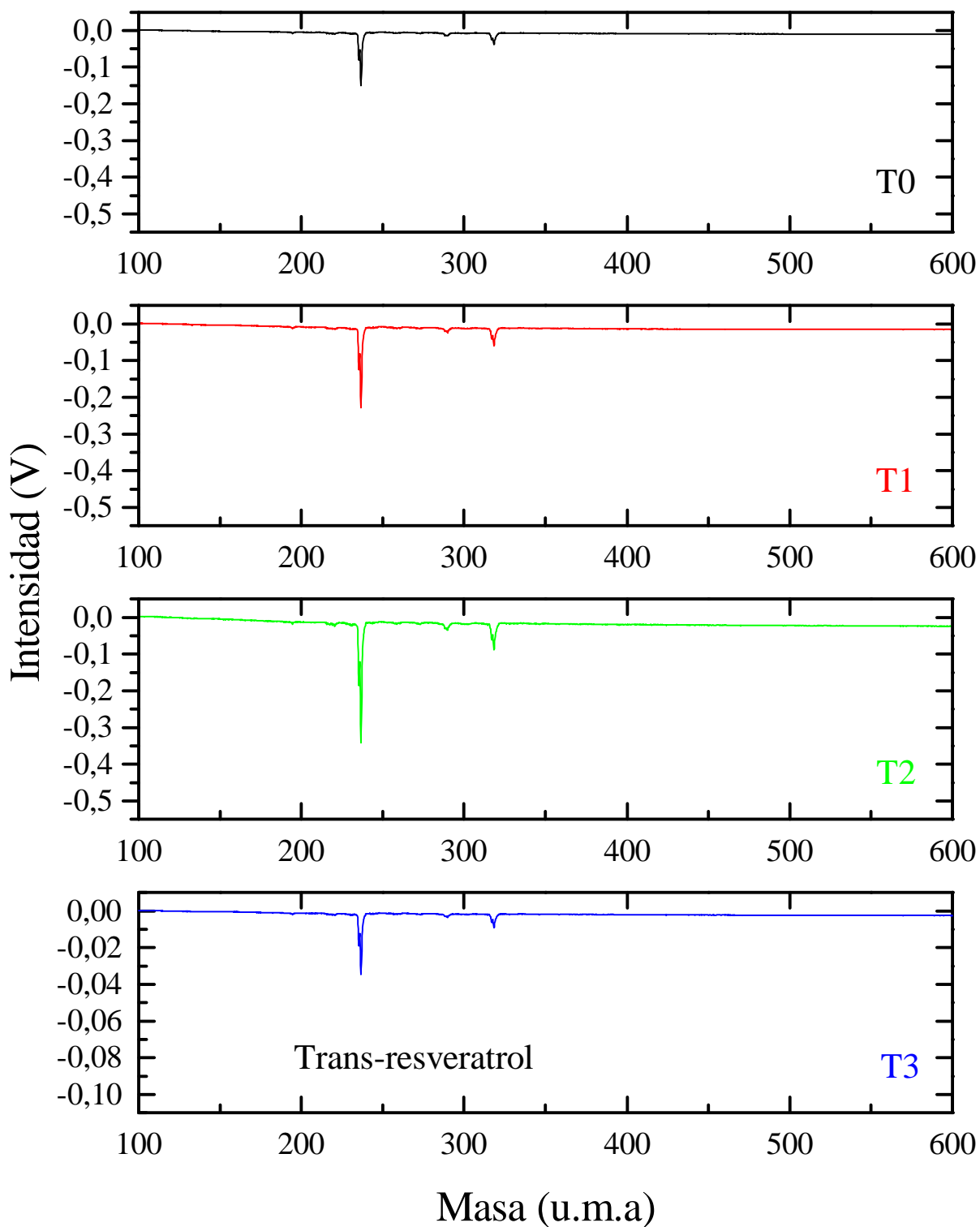


Figura 4.15 -. Espectros de masas del aceite esencial de piel de uva infectada por *Botrytis Cinerea*. T0, T1, T2 y T3 son los días transcurridos tras la inoculación.

Resultados

Este análisis mostrado en la Figura 4.15 fue realizado hasta el 6° día en los tres diferentes grupos de uvas estudiados. Una representación del área de pico para los distintos grupos de uva en función del tiempo transcurrido desde el momento de producir la infección es mostrado en la Figura 4.16.

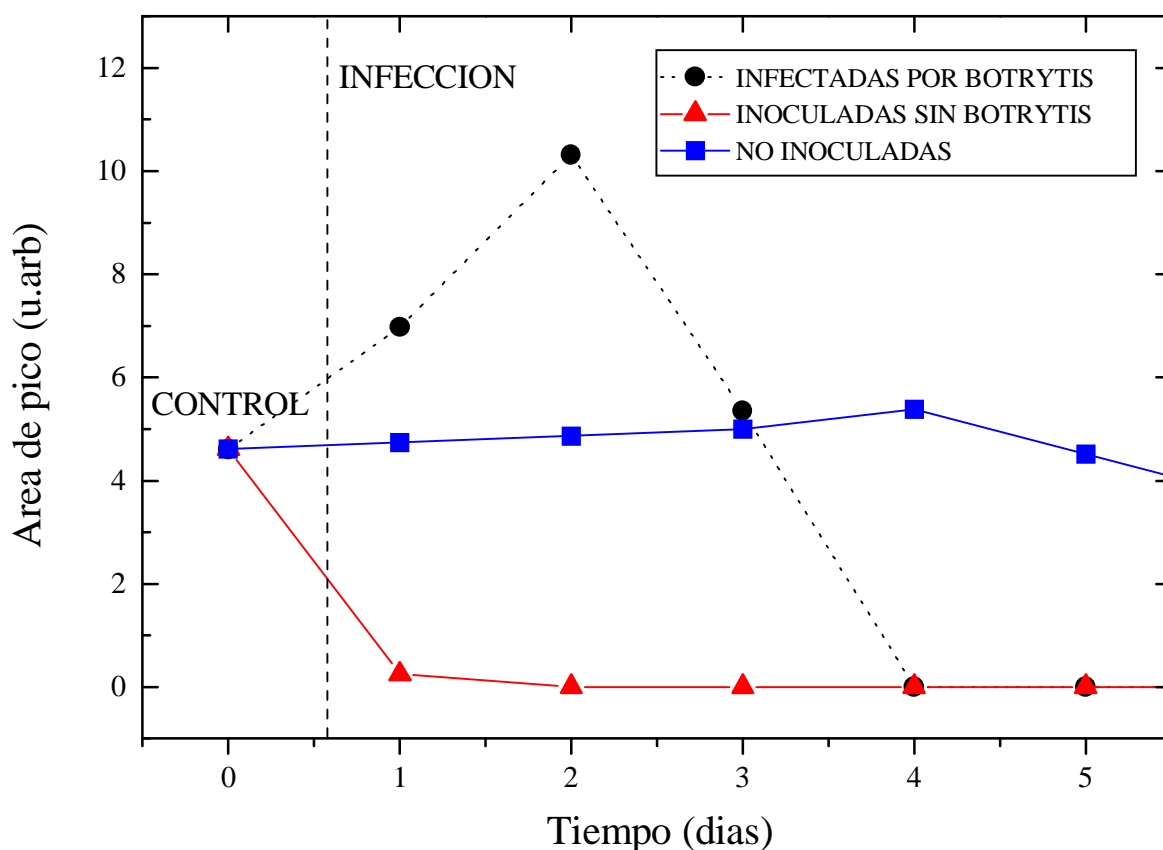


Figura 4.16 -. Evolución temporal de tres grupos de un mismo tipo de uva frente a: inoculación con *Botrytis* (círculos), inoculación con tampón (triángulos), sin inocular (cuadrados).

En esta figura puede apreciarse como el contenido de trans-resveratrol en el grupo de uvas no tratadas es prácticamente constante, aunque muestra una muy ligera subida hasta el cuarto día para finalmente disminuir. El grupo de uvas infectadas con la disolución tampón presenta una rápida caída del contenido de

Resultados

trans-resveratrol tan sólo 12 horas después de la inyección, manteniendo una concentración muy baja en los días sucesivos. Para el grupo inoculado con la *Botrytis* el resultado es totalmente diferente, podemos apreciar como la infección provoca la elicitación del trans-resveratrol en la uva como respuesta a su ataque, alcanzando un máximo en su contenido en torno a las 36 horas después infectar las uvas, y que es 10 veces mayor que el contenido presente en el grupo inyectado con la disolución tampón; después de ese momento el contenido de trans-resveratrol decrece rápidamente en las 48 horas siguientes, estando su contenido por debajo de 5 ppb a partir del quinto día.

Tras este experimento se pensó en la posibilidad de tratar uvas con *Botrytis Cinerea* autoclavada para de ese modo ver si se producía la elicitación del trans-resveratrol endógeno de la uvas y se aumentaba de esta manera su resistencia. Para ello se sometió el caldo de cultivo en el que había crecido la cepa de *Botrytis* a altas temperaturas que aseguraban su muerte y posteriormente dicho exudado fue filtrado para emplearlo como agente de vacunación.



TRATADAS



NO TRATADAS

Figura 4.17 -. Fotografía de uvas 24 días después de haber rociado sobre ellas con esporas muertas de Botrytis Cinerea (izquierda) y un grupo de uvas sobre las que se ha rociado agua (derecha).

Resultados

El experimento fue llevado a cabo para 2 grupos de uvas sudafricanas pertenecientes a la variedad Cape en el mismo estado de maduración, sobre el primer grupo se rociaron 5 ml de la disolución con el exudado de la *Botrytis* muerta, mientras que el segundo fue rociado con la misma disolución pero sin el exudado de *Botrytis*. Como puede apreciarse en la Figura 4.17, 24 días después del tratamiento no se aprecian diferencias significativas entre los dos grupos de uvas.

4.3.- EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO DE QUERCITRINA EN UVAS INFECTADAS POR BOTRYTIS CINEREA.

Como ya se mencionó en la introducción la quercitrina es un poderoso antioxidante al igual que el trans-resveratrol. Aunque el mecanismo de producción en la uva no se ha caracterizado de forma tan exhaustiva como para el trans-resveratrol, sin embargo hemos registrado su presencia en casi todas las variedades de uvas estudiadas, incluso en algunas que no presentaban niveles significativos de trans-resveratrol; esto hace de la quercitrina un candidato adicional al trans-resveratrol para tratar de analizar el estado de salud de las uvas y de ahí nuestro interés en su estudio.

Las uvas fueron inoculadas con la disolución que contiene las esporas de *Botrytis Cinerea* y se registra la evolución del pico de quercitrina en función del tiempo. La Figura 4.18 muestra 4 espectros de masas tomados con un intervalo de 3 días de separación entre uno y otro abarcando un intervalo de 0 a 9 días tras la infección con *Botrytis*. Podemos apreciar en los espectros como la intensidad del pico de quercitrina decrece en relación directa a medida que progresa la infección de la *Botrytis Cinerea* en la uva.

Resultados

Debe observarse que el espectro ha sido tomado en las condiciones óptimas de medida del trans-resveratrol, por lo que dichas condiciones podrían ser optimizadas para la quercitrina y de este modo aumentar aun más la señal registrada.

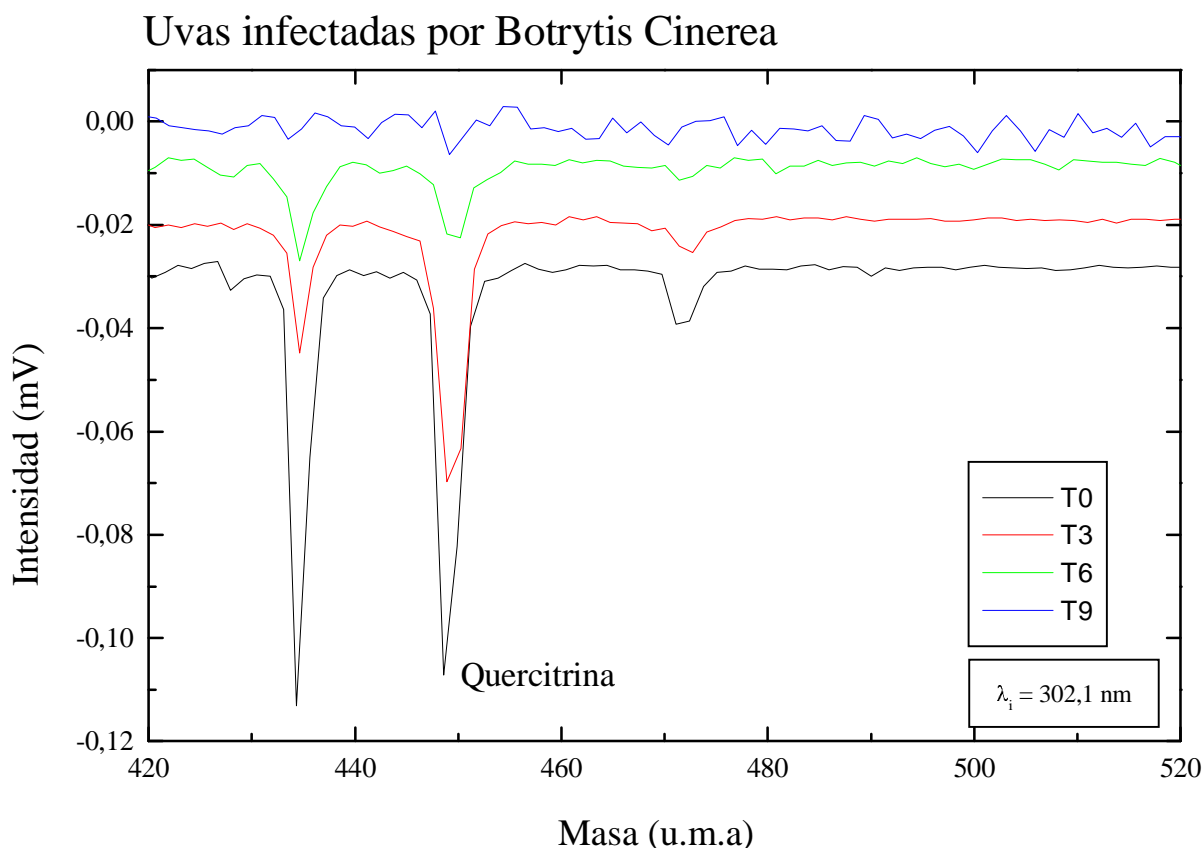


Figura 4.18 -. Evolución temporal de la quercitrina frente a la infección de Botrytis Cinerea.

4.4.- APLICACIÓN EXÓGENA DE TRANS-RESVERATROL

Tal y como se describió en la introducción de esta tesis, uno de los objetivos concretos a alcanzar es aumentar el tiempo de conservación de frutas y verduras mediante dos pasos básicos de actuación. El primero ya lo acometimos en el apartado 4.2 como es la identificación y seguimiento de compuestos

Resultados

responsables de producir la defensa natural de la planta, del tal manera que por una parte obtengamos nuevos parámetros que nos ayuden a determinar el estado de salud de la fruta durante su periodo de almacenamiento y conservación, y por otra nos sirva como indicador de la mejora de la resistencia de los cultivos al introducir variaciones en las prácticas agrícolas.

A raíz de estos resultados obtenidos en el análisis de frutas y para finalizar el cuerpo experimental de esta tesis, se probó la aplicación exógena de trans-resveratrol como pesticida natural para de este modo intentar aumentar el tiempo de vida útil de frutas y verduras.

Como ya fue descrito en la introducción, debe recordarse una propiedad muy importante del trans-resveratrol y es que su carácter antifúngico no es específico para la *Botrytis Cinerea*, sino que también defiende a la vid del ataque de otras especies de hongos. Por lo tanto la elicitación del trans-resveratrol como respuesta antifúngica de la uva hace de él un candidato idóneo como pesticida natural para probar si su aplicación exógena en la uva provoca un aumento de su resistencia. Pese a que ha sido descrito ampliamente este carácter antifúngico en investigaciones in vitro, no encontramos ningún registro bibliográfico sobre su aplicación directa en frutas y verduras para mantener el estado de salud y calidad tras su almacenamiento.

Se comenzaron los experimentos tratando 4 racimos de uva blanca de la variedad Aledo. Las uvas fueron tratadas con una disolución de trans-resveratrol $1,6 \cdot 10^{-4}$ M en agua bidestilada. Para cada tratamiento se eligieron 2 grupos de uvas, un primer grupo compuesto por 2 de los racimos que se denominó “con tratamiento” en el que la fruta se sumerge en la totalidad de su volumen dentro de esa disolución de trans-resveratrol durante un tiempo de 5 segundos. Un segundo grupo formado por los 2 racimos restantes de uvas al que se denominó “sin tratamiento” es sumergido durante 5 segundos en un volumen equivalente al

Resultados

anterior que contiene sólo agua bidestilada y que fue usado como grupo de control. Después de ser tratadas las uvas ambos grupos son dejados al aire a temperatura ambiente.

Después de 10 días se observan diferencias significativas en los dos grupos, con tratamiento y sin tratamiento. Como puede apreciarse en la Figura 4.19, el grupo sin tratamiento presenta claras señales de senescencia por la textura de la piel y color así como el visible desarrollo local de hongos en la primera fase de su ciclo reproductivo (micelio vegetativo); sin embargo los racimos con tratamiento no muestran hongos en las uvas ni en el tronco mostrando un aspecto saludable.



**TRATADAS
10 DIAS**



**NO TRATADAS
10 DIAS**

Figura 4.19 -. Fotografías de las muestras de uvas “Aledo” 10 días después de haber sido tratadas (izquierda) y no tratadas (derecha) con trans-resveratrol.

Resultados

Se realizó un estudio comparativo de la calidad de las uvas tratadas y no tratadas con trans-resveratrol ^[b]. Al igual que en el caso anterior se hicieron 2 grupos de uvas, tratadas y no tratadas, que posteriormente se almacenaron bajo las mismas condiciones de humedad y temperatura (5 – 12 °C). Se analizó en ambos grupos la composición bioquímica de las uvas así como sus propiedades sensoriales en tiempos que recogían el momento inicial del tratamiento, a los 8 y a los 18 días después del tratamiento.

El análisis bioquímico evaluó la composición de macro y micronutrientes del grupo tratado y no tratado. De los macronutrientes se analizó el contenido de proteínas, grasas, carbohidratos (glucosa y fructosa), fibra y calorías. De los micronutrientes se analizaron vitaminas (piridoxina, niacina, ácido ascórbico), ácidos orgánicos (tartárico y maléico), minerales (magnesio y potasio) y el aminoácido Prolina.

En el análisis sensorial realizado por consumidores potenciales se evaluó puntuando de 1 a 5 las propiedades organolépticas de apariencia, textura y sabor de las uvas tratadas y no tratadas así como el grado de satisfacción con ambos grupos de uvas. Este análisis fue realizado según la norma UNE-87-004-79; con 12 evaluadores que realizaron el análisis de forma aislada e independiente.

Para ambos casos, el análisis bioquímico como el sensorial, se evaluó la diferencia de las medias de los valores obtenidos en el grupo tratado y no tratado con un nivel de significación de 0,05 %. El resultado obtenido en todos los casos fue claro: al añadir trans-resveratrol en las uvas no se modifican sus propiedades bioquímicas ni organolépticas.

^b Agradecimiento al Grupo Cayacea por la realización de los análisis bioquímico y sensorial de las frutas.

Resultados

La eficacia del tratamiento demostrada en uvas abre una interesante línea de aplicación ya que la *Botrytis Cinerea*, siendo el principal elicitor en uvas del trans-resveratrol, es un hongo no selectivo que infecta a más de 200 especies tales como fresas, tomates, manzanas, etc., por lo que a priori la aplicación del trans-resveratrol podría extenderse a otros cultivos.

A partir de estos resultados, se decidió abordar el estudio de nuevas frutas y verduras, para determinar, como ya hemos mencionado, si podría usarse el trans-resveratrol en otros sistemas distintos al de la uva.

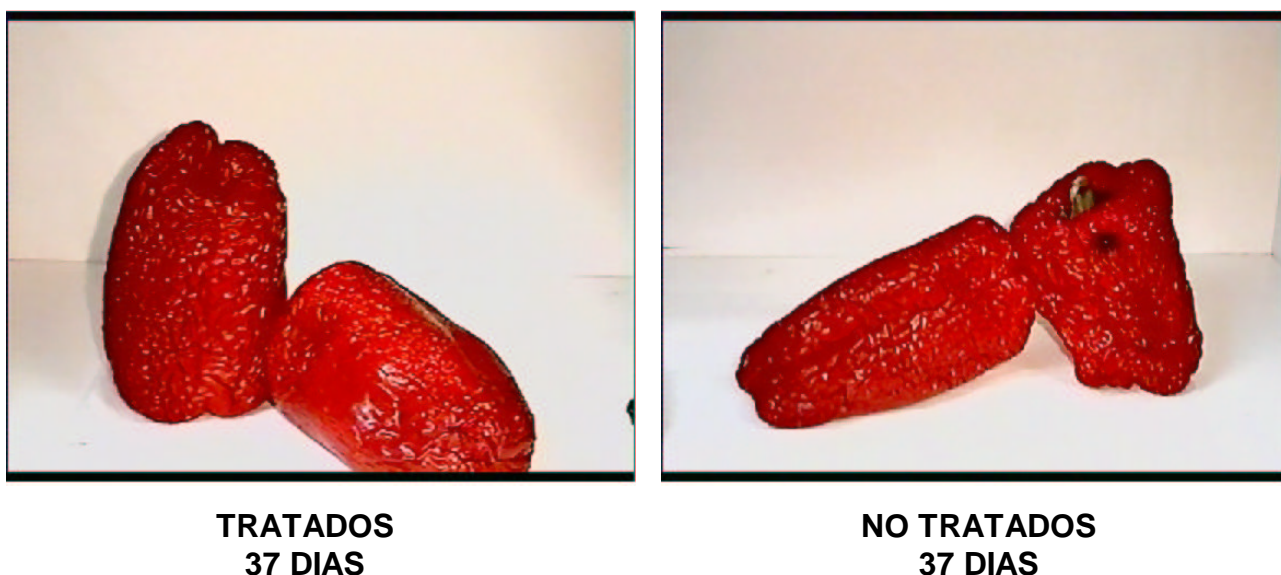


Figura 4.20 - Fotografía de las muestras de pimientos "California" tomada a los 37 días después de haber sido tratados (izquierda) y no tratados (derecha) con trans-resveratrol.

El primero de todos ellos fue pimiento de la variedad California, como puede apreciarse en la Figura 4.20 para dos grupos con y sin tratamiento tomada 37 días después de ser tratados y aunque el grupo de pimientos sin tratamiento presenta un aspecto más rugoso que el tratado, las diferencias no son tan significativas como en el caso de las uvas.

Resultados

Se probó el mismo tratamiento con pimientos de la variedad Lamuyo; la Figura 4.21 muestra como 8 días después de ser tratados con y sin trans-resveratrol se aprecian diferencias muy significativas, los pimientos con tratamiento muestran por la persistencia de su color verde síntomas claros de que su maduración es más lenta que en el caso de los pimientos sin tratamiento. Mientras que en el grupo de pimientos tratados sólo uno ha enrojecido, los no tratados presentan un cambio apreciable de color y una mayor deshidratación en todos los casos; una de las piezas presenta además signos de infección fúngica localizada.



**TRATADOS
8 DIAS**



**NO TRATADOS
8 DIAS**

Figura 4.21 -. Fotografías de las muestras de pimientos “Lamuyo” tomadas 8 días después de ser tratados con trans-resveratrol (izquierda) y no tratados (derecha).

El siguiente experimento fue realizado en aguacate de la variedad Hass con el mismo protocolo mencionado anteriormente. La Figura 4.22 muestra dos aguacates del grupo con tratamiento y sin tratamiento 15 días después de haberse efectuado el mismo apreciándose claras diferencias entre uno y otro. Se observa

Resultados

con claridad como el grupo con tratamiento presenta un aspecto saludable frente al grupo sin tratamiento en el que las hifas de especies fúngicas aparecen en casi toda su superficie.



**TRATADO
15 DIAS**



**NO TRATADO
15 DIAS**

Figura 4.22 -. Fotografías de las muestras de aguacates “Hass”, 15 días después de haber sido tratados (izquierda) y no tratados (derecha) con trans-resveratrol.

Otro resultado interesante fue el experimento realizado en tomates de la variedad Rambo, una vez más las diferencias significativas que muestran la eficacia del trans-resveratrol en su aplicación exógena pueden apreciarse a los 31 días después de haberse aplicado el tratamiento y que siguieron de manifiesto incluso 50 días después del mismo. Se observa claramente en la Figura 4.23 como el grupo no tratado presenta una mayor deshidratación que el grupo tratado con trans-resveratrol. Se aprecia además como los tomates no tratados desarrollan infección fúngica localizada en la parte de unión con la planta.

Resultados

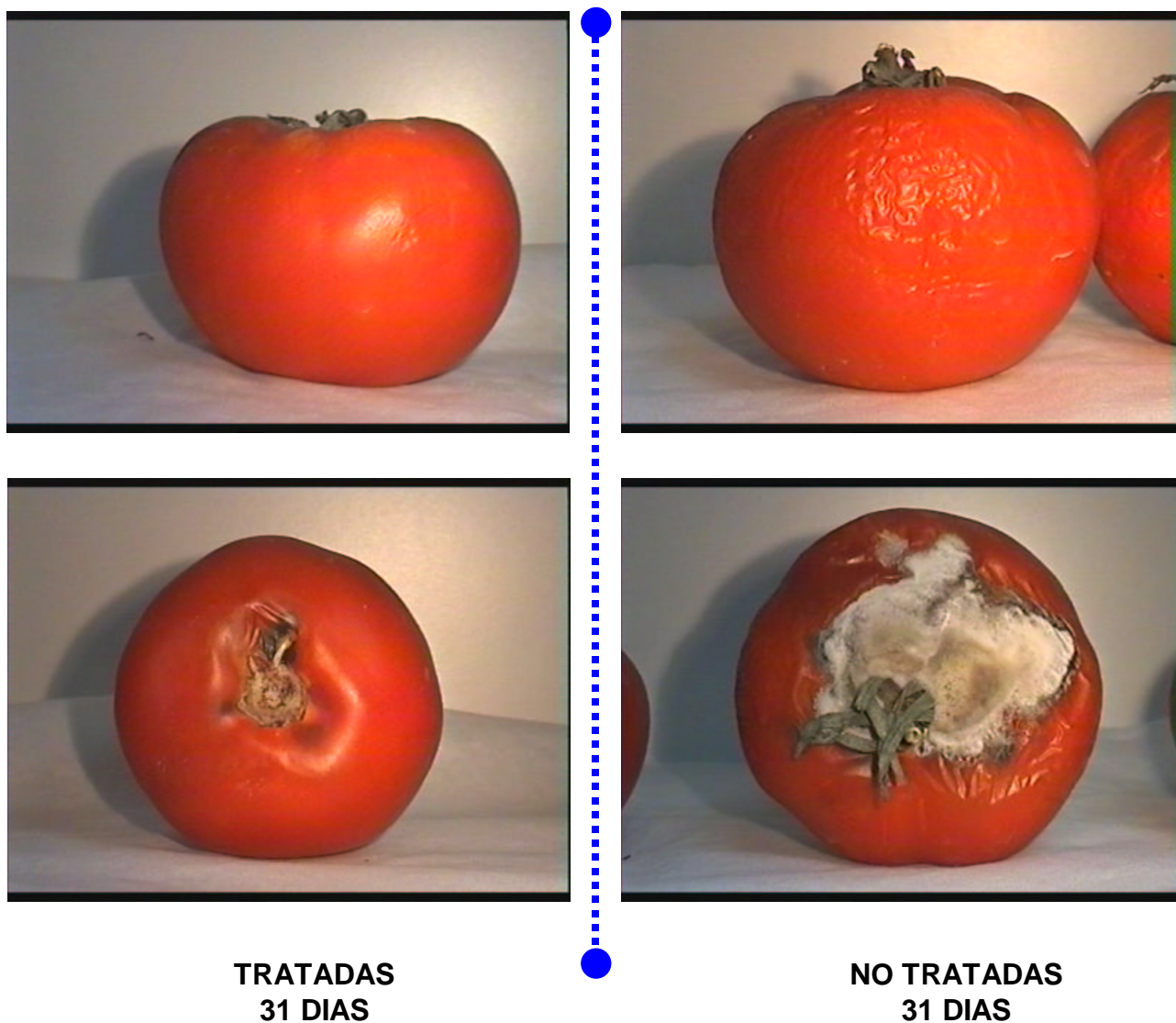


Figura 4.23 .- Fotografías de las muestras de tomates “Rambo” tomadas 31 días después de haber sido tratados (izquierda) y no tratados (derecha) con trans-resveratrol.

El último de los experimentos realizados siguiendo esta línea de estudio se hizo en manzanas de la variedad Golden siguiendo una vez más el protocolo ya descrito. La Figura 4.24 muestra el estado saludable del grupo con tratamiento frente al del deteriorado estado del grupo sin tratamiento 75 días después de haberse producido el mismo.

Resultados

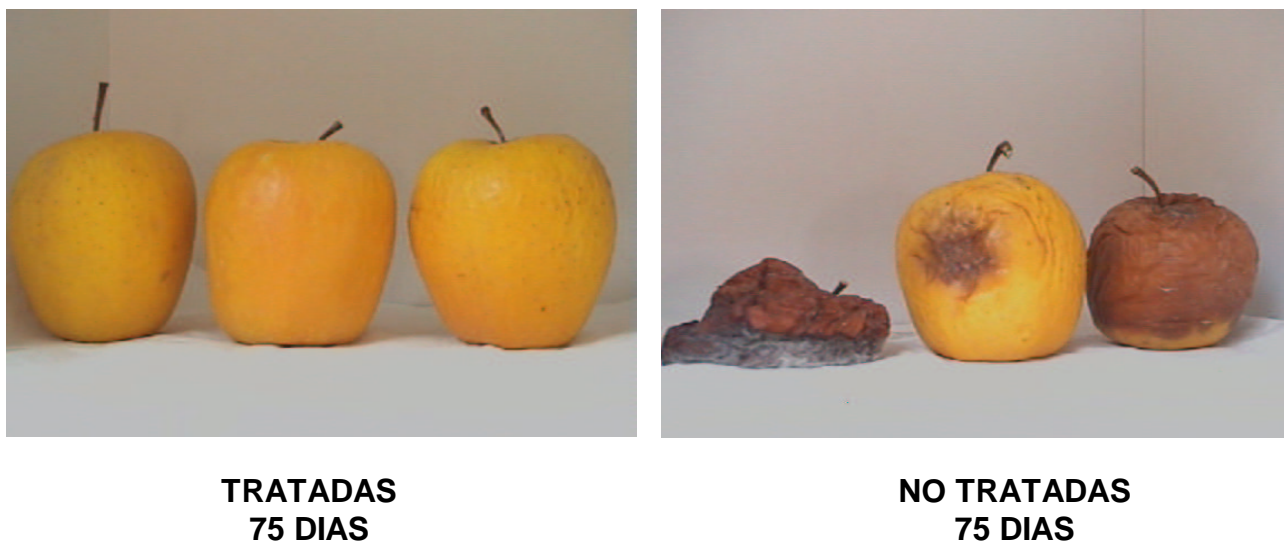


Figura 4.24 -. Fotografías de manzanas tomadas 75 días después de haber sido tratadas (derecha) y no tratadas (izquierda) con trans-resveratrol.

Por último es necesario destacar que, aunque un pesticida sea natural no tiene porque estar exento de riesgo para la salud humana, incluso su toxicidad puede ser mayor que la de un pesticida sintético, no debe confundirse por tanto “natural” con “beneficioso para la salud”. Sin embargo para el caso concreto del trans-resveratrol, tal y como se describe en la introducción ha sido probado por muchos autores no sólo su carácter no tóxico, sino también sus propiedades beneficiosas para la salud humana ^{79 -85}. Entre ellas las más importantes son las relacionadas con la prevención de enfermedades cardiovasculares al modular el metabolismo de lipoproteínas plasmáticas impidiendo de este modo la agregación plaquetaria; y por otra parte su manifiesto carácter quimiopreventivo en la carcinogénesis.

4.5.- CARACTERIZACIÓN DE ESPECIES TRANSGÉNICAS.

La biotecnología puede definirse como la aplicación de nuestros conocimientos y nuestra comprensión de la biología para la satisfacción de necesidades prácticas ^{241}. Según esta definición, la biotecnología es tan antigua como la siembra de cultivos y la elaboración de quesos y vinos. La biotecnología actual se identifica principalmente por sus aplicaciones médicas y agrícolas basadas en nuestro conocimiento acerca del código genético de la vida. Se han utilizado varios términos para describir esta forma de biotecnología, entre los que destacan: ingeniería genética, transformación genética, tecnología transgénica, tecnología de DNA recombinante y tecnología de modificación genética.

La tecnología de modificación genética surgió en la década de 1970. Uno de sus avances más notorios, aparte de las aplicaciones médicas, fue la creación de nuevas variedades de plantas agrícolas transgénicas. Desde entonces hasta la fecha, muchos millones de hectáreas han sido sembradas anualmente con cultivos transgénicos comerciales, como soja, algodón, tabaco, patata y maíz principalmente en países como Estados Unidos, Canadá o Japón. Puede por este sistema incrementarse la resistencia natural de las plantas a ciertas plagas, obtenerse una mayor resistencia a las sequías o aprovechar suelos considerados pobres para la agricultura tradicional.

La normativa que regula las diferentes y rigurosas evaluaciones que deben superar los nuevos alimentos transgénicos introducidos en el mercado comercial en la Unión Europea, es la Directiva EC 258/97, según la cual deben tenerse en cuenta factores tales como: la transferencia génica a otras plantas por hidratación, cambios de virulencia de plagas y patógenos en respuesta al uso de genes de resistencia, invasibilidad de las plantas transgénicas o de su progenie en hábitats silvestres y agrícolas, etc.,. Todas estas pruebas que aseguren que la transgenia no comporta riesgo alguno para la salud humana, así como la necesidad de que el

Resultados

consumidor sepa en todo momento que el alimento que compra es transgénico, hace que en la actualidad prácticamente no se comercialicen estas especies dentro del mercado Europeo. Sin embargo, al igual que en otros países los beneficios potenciales de la transgenia hacen necesario profundizar en su estudio y desarrollo.

Un ejemplo aplicado de esta utilidad fue el realizado en tomate. Partiendo de tomate silvestre (TW) se desarrollaron 2 especies transgénicas ^[c] que se denominaron T25 y T42, con el fin de incrementar la cantidad de trans-resveratrol generado en el tomate y aumentar de ese modo su resistencia a las posibles infecciones fúngicas.

Como puede apreciarse en la Figura 4.25, el aspecto de los tres tipos de tomate es distinto, la intensidad del color rojo de la piel aumenta en el orden TW < T42 < T25. La textura de la piel también es distinta, disminuyendo la dureza según el orden T25 > T42 > TW.

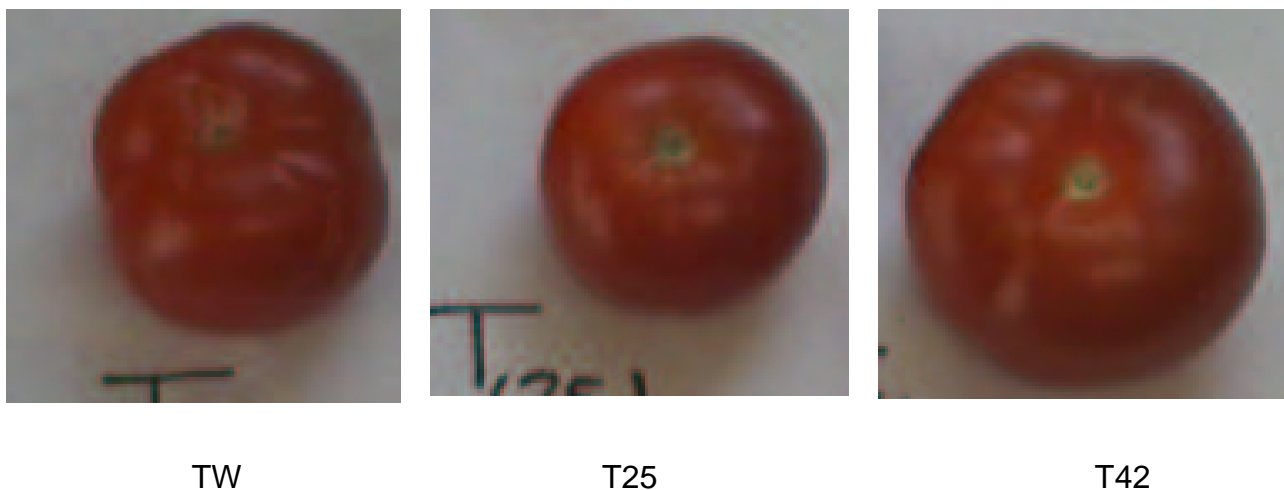


Figura 4.25 -. Fotografías de tomate silvestre (TW) y dos tomates manipulados genéticamente para desarrollar mayor contenido endógeno de trans-resveratrol.

^c Agradecimiento al Profesor C. Kuhlemeier del Instituto de Fisiología de Plantas y Departamento de Ingeniería Genética de la Universidad de Berna (Suiza) por el desarrollo de las especies transgénicas.

Resultados

Esta diferencia de color puede apreciarse también en los espectros de absorción UV-Vis de la piel de los tomates en agua bi-distilada mostrados la Figura 4.26.

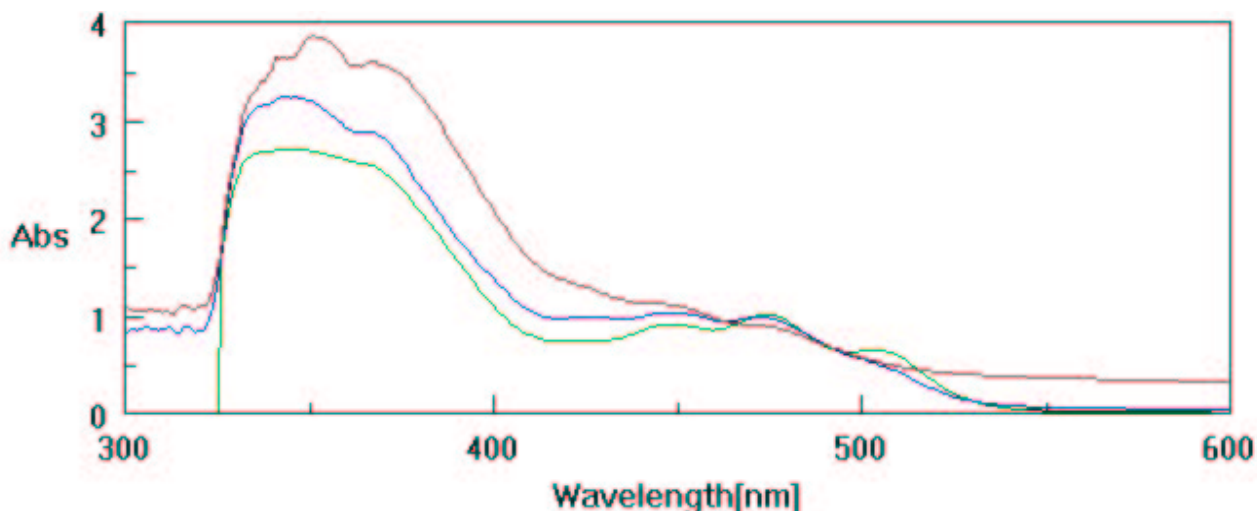


Figura 4.26 -. Espectros de absorción ultravioleta-visible de la piel de los tomates TW, T25 y T42.

En ésta figura puede observarse como la absorción en la zona del azul, es decir, la transmitancia en la zona del rojo es mayor según el orden $T25 > T42 > TW$.

Se hizo un ensayo similar al realizado con las uvas en el apartado anterior. Se analizó primeramente los tres tipos de tomates antes de ser infectados con la disolución que contiene *Botrytis Cinerea*. Podemos observar en la Figura 4.27 los tres espectros de masas correspondientes al Tomate TW, y a las variedades T25 y T42 medidos en las condiciones óptimas de análisis para el trans-resveratrol.

Podemos observar en los tres espectros de esa figura como no aparece señal significativa alguna de trans-resveratrol a la masa del mismo (228 u.m.a), sin embargo un pico intenso correspondiente al grupo metilo aparece en los tres.

Resultados

Es importante notar como la intensidad de este grupo metilo es mayor en el caso del tomate silvestre comparada con la del tomate T25 y el tomate T42.

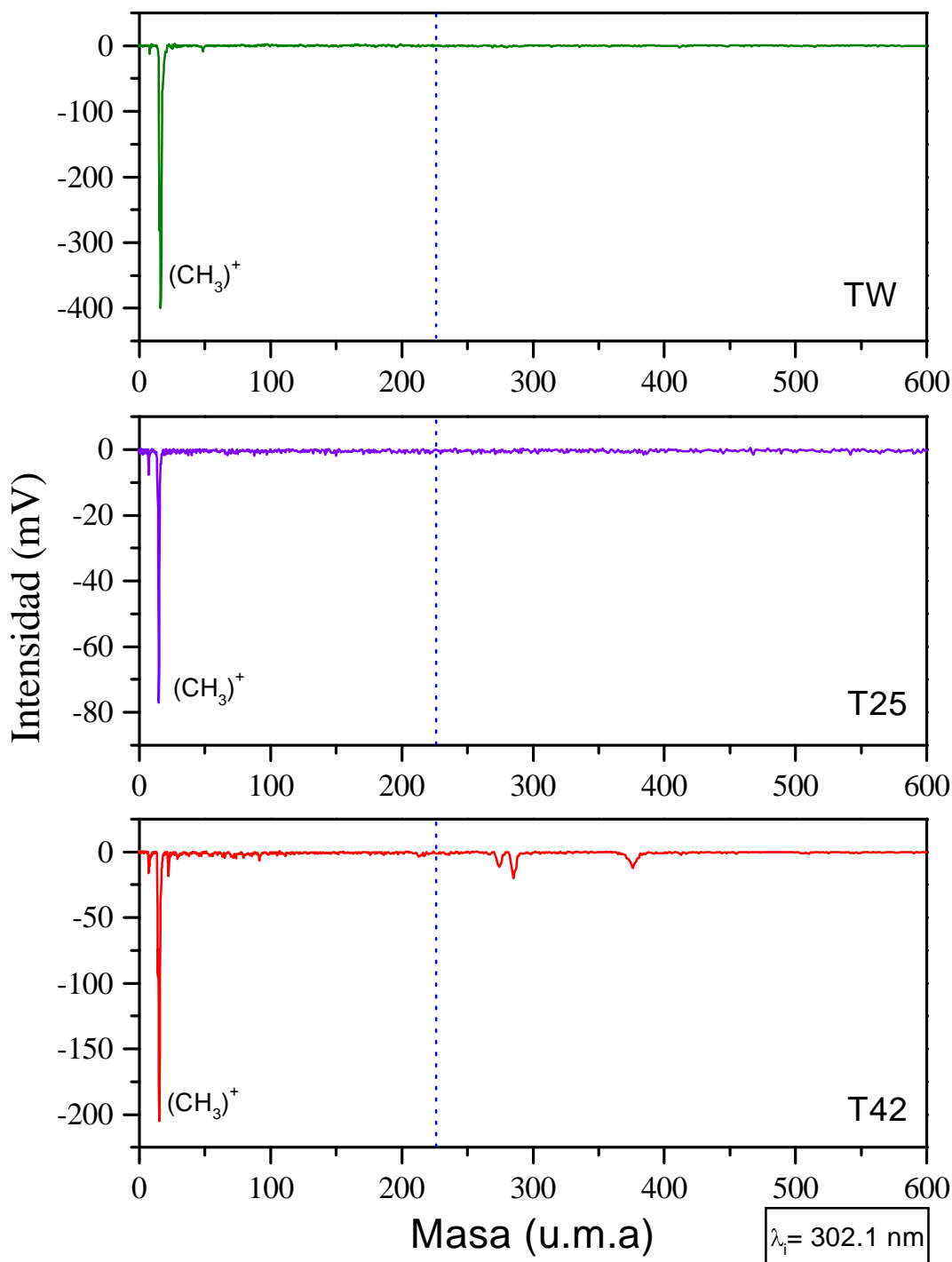


Figura 4.27 -. Espectros de masas de tomates sin inocular TW, T25 y T42.

Resultados

Puede apreciarse también, en los tres espectros mostrados en la Figura 4.27, como además del pico de metilo aparece un pico de masa 7 u.m.a que se pensó correspondía al litio. Corroboramos su presencia mediante un espectro de fluorescencia inducida por láser de la piel de los tomates tal y como refleja la Figura 4.28.

Para registrar dicho espectro se produjo la ablación de la piel del tomate con un láser de CO₂ a una longitud de onda de 10 micras y se recogió la fluorescencia inducida por este láser mediante un analizador óptico multicanal 5 μ s después de la producción del plasma.

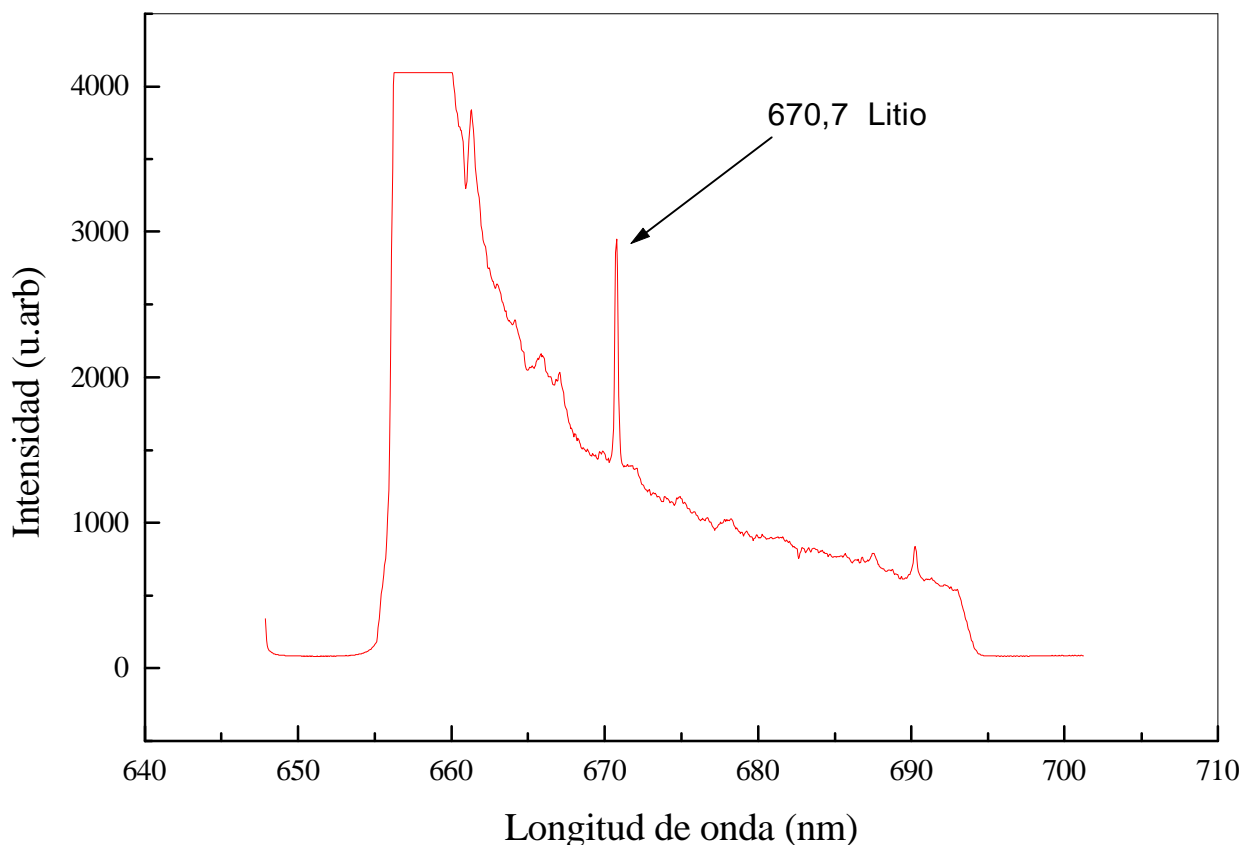


Figura 4.28 -. Espectro de fluorescencia inducida por un láser de tomate silvestre (TW).

Resultados

Al contrario que los átomos de Fe y Cr que en su estado de vapor presentan una transición electrónica a 302,1 nm el Li tiene la transición más cercana a esta longitud de onda en 302,9 nm, valor excesivamente alejado si consideramos la baja anchura espectral de la radiación láser. El grupo metilo posee un potencial de ionización de 9,84 eV, por lo que se requeriría algo más de 2 fotones de longitud de onda 302,1 nm para producir su ionización. Sin embargo en estudios estereodinámicos realizados en la U.L.H.M se ha comprobado como para el caso concreto del Ba...FCH₃ la proximidad del Bario rebaja el potencial de ionización de la molécula Fluoruro de Metilo ^{242, 243}. Suponemos por todo ello que el compuesto presente en el tomate es el organometálico metil-litio, el cual se ioniza y posteriormente se fragmenta produciendo las señales de metilo y litio.

Pese a que no aparecía señal significativa de trans-resveratrol en los tomates no infectados pensamos que quizás la infección con la *Botrytis* podría producir la elicitación del trans-resveratrol por encima de nuestro límite de detección y registrar así su presencia.

La Figura 4.29 muestra tres espectros de masas correspondientes a tomates TW, T25 y T42 respectivamente. Los tomates fueron infectados con 5 µl de la disolución que contiene *Botrytis Cinerea* y que fue preparada según el protocolo descrito en el apartado anterior; los espectros mostrados son los registrados al tercer día después del momento de la inoculación. La línea de puntos en los tres espectros marca la zona en la que debería aparecer la señal del trans-resveratrol, sin embargo no se registra su presencia ni en el caso del tomate silvestre TW ni en las 2 variedades transgénicas T25 y T42.

Resultados

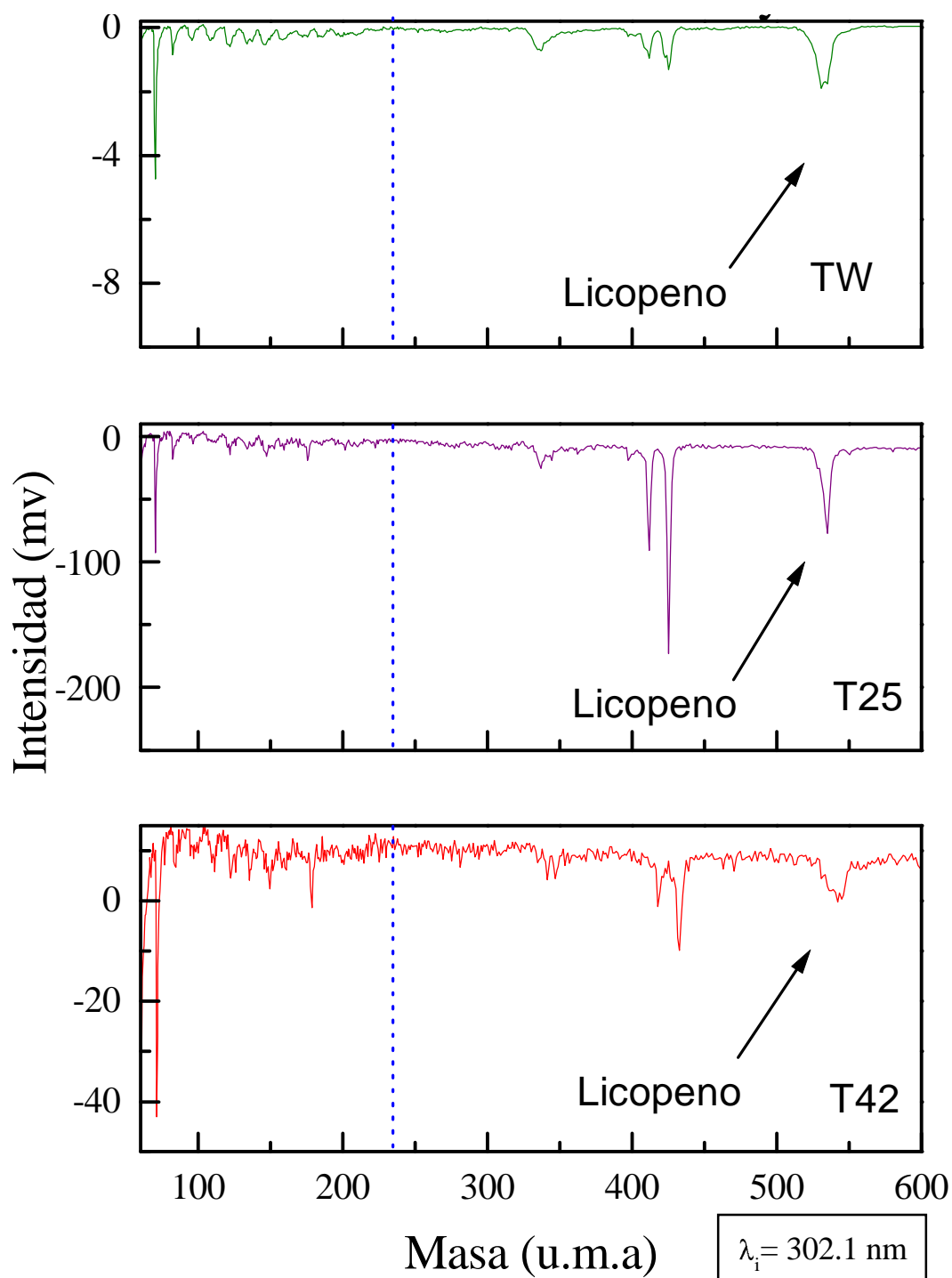


Figura 4.29 -. Espectros de masas de tomate infectado por *Botrytis cinerea* TW arriba, T25 medio y T42 abajo.

Un hecho importante a tener en cuenta fue el aumento del licopeno en las tres variedades de tomate como consecuencia de la infección. Como ya

Resultados

mencionamos en la introducción el licopeno es el responsable de dar la coloración roja a los tomates además de ser un gran antioxidante como el trans-veratrol. El contenido de licopeno registrado es mayor en la variedad transgénica T25 que en la T42 y mayor en ésta última que en el tomate silvestre. En resumen, puede observarse como el Tomate T25 es el que menor contenido de metilo presenta en las condiciones en las que no ha sido infectado y a la vez en el que se produce un mayor aumento de licopeno cuando es infectado por la *Botrytis*.

La Figura 4.30 muestra un gráfico en columnas donde se registra estos dos fenómenos descritos anteriormente para las tres variedades de tomate.

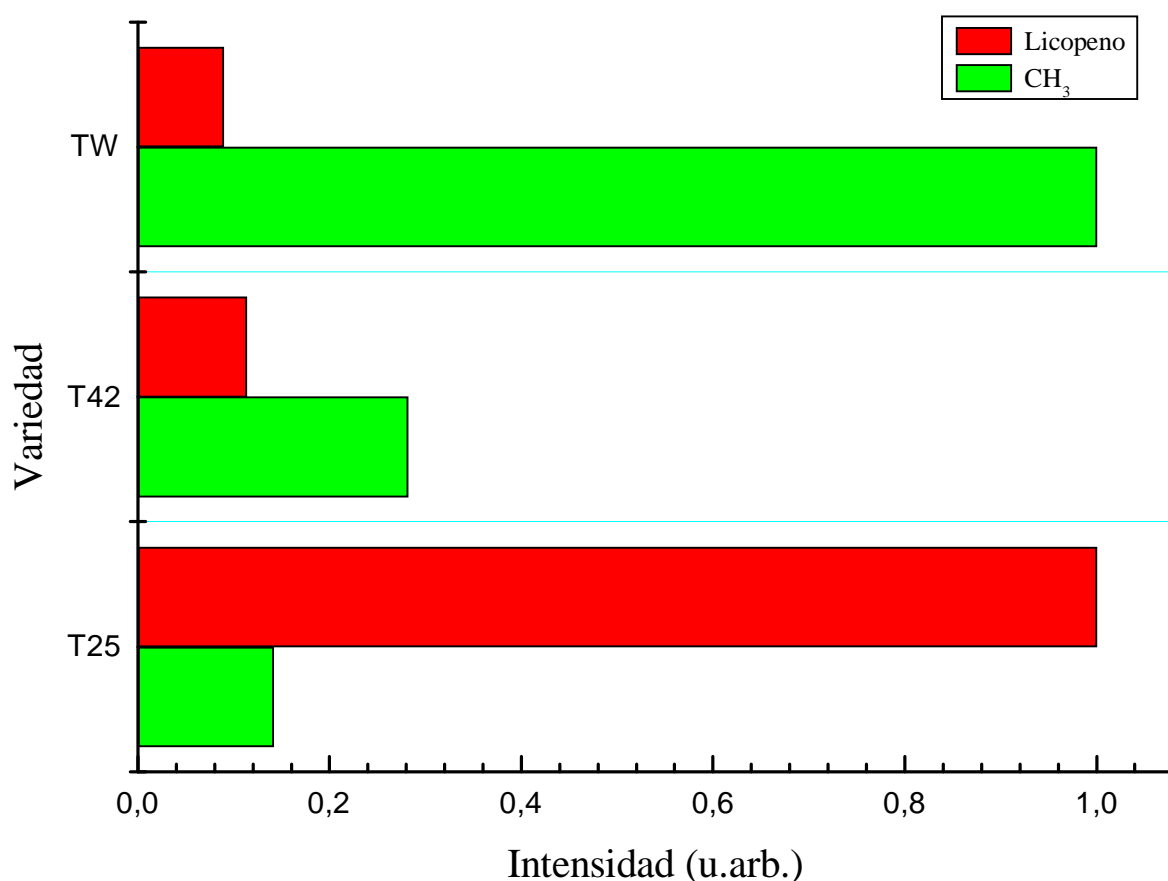


Figura 4.30 -. Comparativa de los valores de CH₃ y licopeno en los tomates sin infectar e infectados con *Botrytis Cinerea*.

5. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

5.1-. CARACTERIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA.

Desorción MEPED

Mediante la calibración del sistema puede conocerse a qué masas corresponden cada uno de los picos de nuestro espectro de tiempo de vuelo, para lo cual es necesario e imprescindible al menos saber cuál es la masa exacta de uno de ellos. Como ya se comentó se utiliza tolueno como elemento de calibración, que al ser introducido a través de la válvula de aguja e ionizado a 266 nm proporciona un referente con el que calibrar el resto del espectro. Sin embargo, en el caso concreto del análisis de trans-resveratrol es preferible emplear el pico de masa 56 procedente de las trazas de hierro presentes en el pyrex. Podemos apreciar en la Figura 5.1 una ampliación de un espectro de masas en el que se observan con claridad los diferentes isótopos de hierro y cromo.

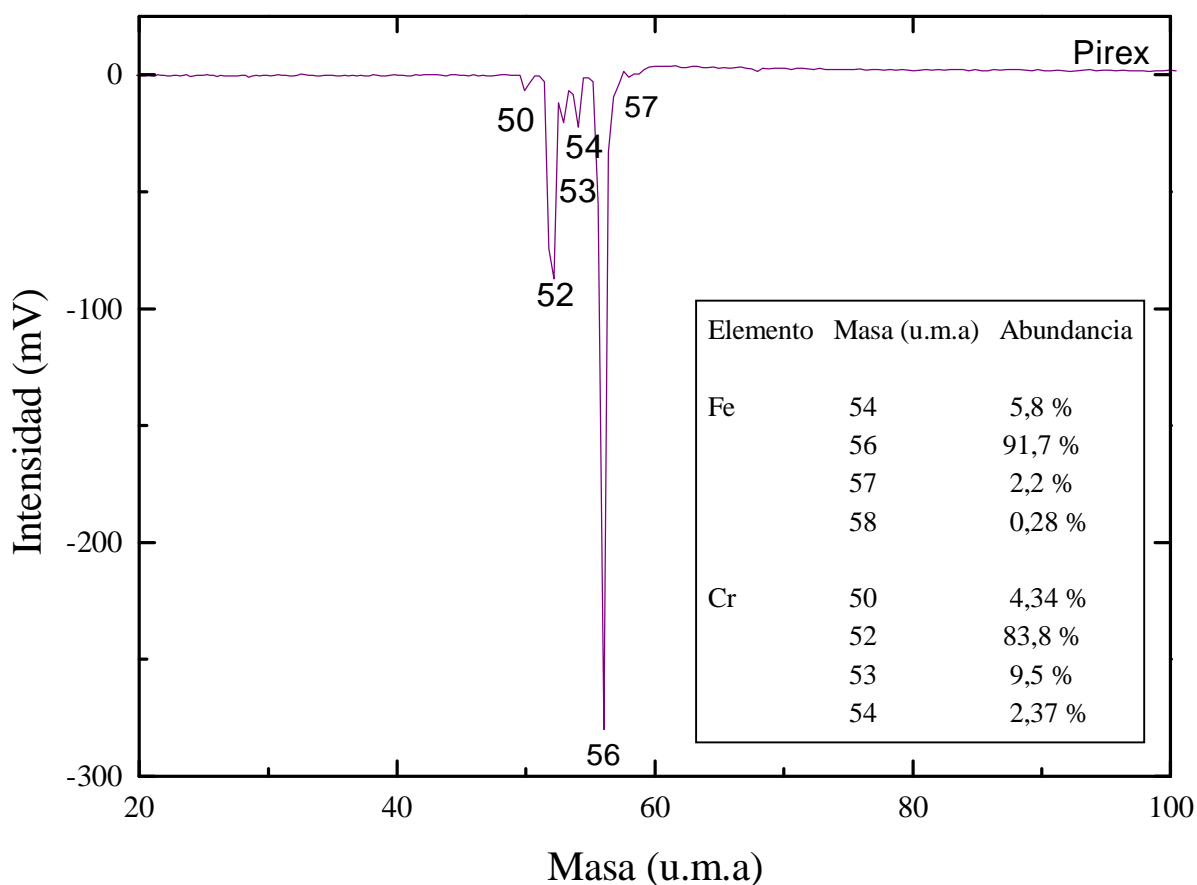


Figura 5.1-. Espectro de masas del vidrio pyrex desorbido a 1064 nm e ionizado a 302,1 nm.

Discusión de los resultados

El emplear el pico de masa 56 para calibrar posee una ventaja adicional sobre el pico de tolueno, y es que al ionizarse en 302,1 nm no es necesario modificar ningún parámetro experimental para trabajar con el sistema a 266 nm, o dicho de otro modo, al contrario que el pico de tolueno, el pico del pyrex estará presente en todos nuestros espectros de tiempo de vuelo estando sometido a cualquier perturbación que puedan sentir nuestros analitos y registrándose a la vez que ellos, por lo que se convierte en una excelente referencia como agente de calibración.

Sobre la resolución en masas de nuestro sistema experimental puede pensarse que las 715 u.m.a obtenidas están por encima de nuestras necesidades analíticas, ya que normalmente se determinan moléculas orgánicas de entre 200 a 500 u.m.a. Partiendo de esta premisa, si se compara la resolución del sistema de tiempo de vuelo construido en los talleres generales de la UCM con la de un equipo comercial (~ 1000 u.m.a), y se sopesa que éste último cuesta del orden de 5 veces más, debe considerarse que nuestro sistema proporciona un importante ahorro en los costes económicos.

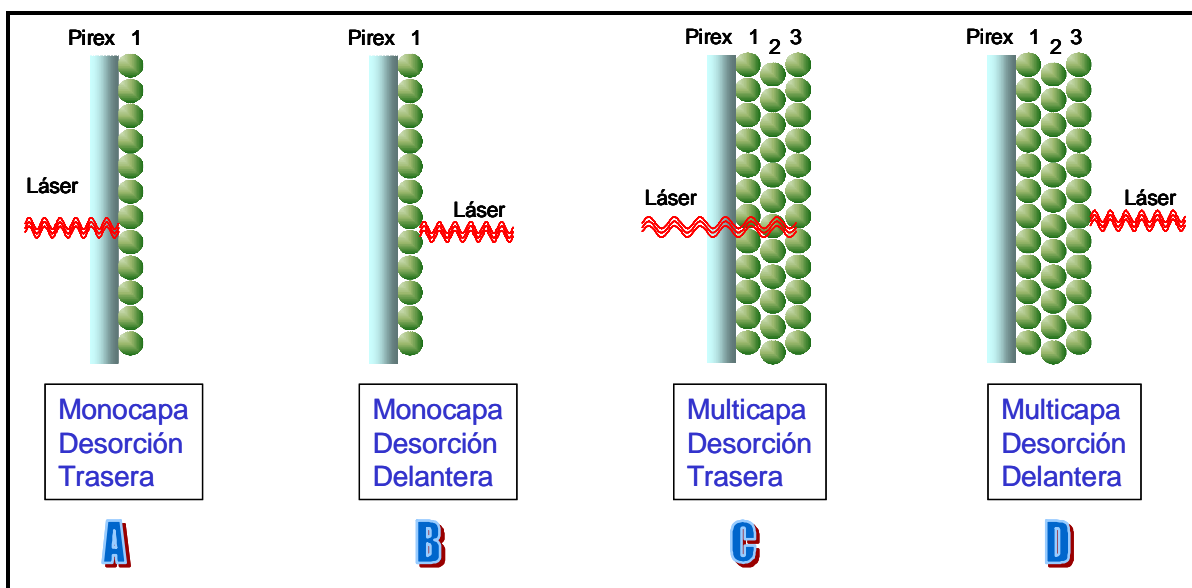


Figura 5.2 -. Representación esquemática de las distintas formas de producir la desorción láser.

Discusión de los resultados

Para la optimización del proceso de desorción deben analizarse varios factores; uno de ellos es el hecho evidente de que en base a los resultados mostrados la desorción frontal de la muestra reporta mayores beneficios analíticos que la desorción trasera sobre todo en lo que a reproducibilidad se refiere.

Experimentalmente al depositar una fina capa de analito en estado puro sobre el disco pyrex y comparando el cociente señal ruido en los dos tipos de desorción, trasera y delantera se obtiene un mejor cociente señal ruido para el caso de la desorción trasera para una energía de desorción baja (5 mJ /pulso); sin embargo, si se trata de aumentar la energía de desorción sin llegar a fragmentar la molécula desorbida, aparecerán en el espectro iones directos formados por la radiación láser que una vez ha atravesado el pyrex impacta sobre las placas metálicas que componen el sistema acelerador de iones. Este problema sería fácilmente salvable cambiando la geometría de nuestro sistema de desorción, es decir, haciendo por ejemplo que la placa de pyrex se situase en paralelo respecto al eje del tiempo de vuelo.

Tómense como referencia los supuestos teóricos A (desorción trasera de una monocapa depositada sobre el pyrex) y B (desorción frontal de una monocapa depositada sobre el pyrex) representados en la Figura 5.2. Sin embargo, al aumentar la concentración de trans-resveratrol, o simplemente cuando se trabaja con un caso real en el que se deposita una matriz compleja que contiene a este analito, la deposición en la placa de pyrex está lejos de ser una monocapa ya que forma una multicapa de moléculas.

Para simplificar el problema podemos pensar en un modelo de 3 capas depositadas como se muestra en la Figura 5.2. En el caso C (desorción trasera de una multicapa depositada sobre el pyrex) entran en juego nuevos factores como son las fuerzas de interacción entre las distintas capas, las colisiones entre las

Discusión de los resultados

especies desorbidas en competición con la expansión a vacío, la influencia de la fotoactivación de las moléculas de las capas colindantes con la molécula desorbida, etc, de tal modo que para desorber una molécula de la capa 3, la radiación láser debe atravesar las capas 1 y 2 por lo que en general requeriremos mayor energía que en el caso de la monocapa, pudiendo incluso llegar a fragmentar moléculas de las capas 1 y 2 antes de desorber la capa 3. Este hecho hace que para una energía determinada el rendimiento del proceso de desorción trasera en multicapas sea mayor cuanto menor sea el espesor de la muestra depositada.

Se requiere por lo tanto trabajar en una disposición similar a la descrita en el caso D de la Figura 5.2, en la que la desorción se produce de modo frontal a la última capa depositada (capa 3) de tal manera que las moléculas de esta capa se encuentran en una situación similar a la del caso B con la salvedad de que en este caso el sustrato sobre el que está depositada la última capa no sería pyrex sino la capa inmediatamente anterior. Al igual que en los casos anteriores, al estar rotando el disco durante todo el proceso de medida, el láser siempre irradia un área de muestra nueva que no ha sido desorbida con anterioridad. Si se tiene en cuenta que la mejora mencionada del cambio de simetría de la placa respecto al eje de tiempo de vuelo puede también realizarse en esta conformación para de ese modo eliminar también los posibles iones directos formados en las placas del sistema acelerador por impactos del láser, se obtiene en resumen un método óptimo para conseguir la vaporización de matrices complejas, sin interferencias en la medida.

Es importante resaltar que las condiciones de medida descritas en el apartado 2.3 han de ser optimizadas siempre que se introduzca cualquier variación en el sistema, sobre todo en lo que se refiere a los voltajes aplicados en el sistema acelerador de iones, ya que un cambio en la geometría interna de la cámara de ionización introduce perturbaciones en el campo eléctrico y debe en

Discusión de los resultados

consecuencia reoptimizarse para cada configuración, lo cual justifica la diferencia de valores óptimos encontrados para las distintas configuraciones de desorción trasera y delantera.

Otro de los factores importantes en los que se profundizó con el estudio de la desorción del trans-resveratrol fue el incrementar su eficacia optimizando los efectos de interacción entre la radiación láser y la muestra. En primer lugar se estudió la eficacia de efecto de tipo resonante, de manera similar a la técnica empleada en la desorción MALDI. Es necesario recordar que en nuestro caso las etapas de desorción e ionización están separadas espacial y temporalmente, es decir, se produce la desorción de las moléculas de la matriz en estado neutro y posteriormente se ioniza el analito mediante la ionización REMPI mientras que en la técnica MALDI se producen a la vez por acción del mismo pulso láser los procesos de desorción e ionización. En MALDI se emplea una matriz cromófora que absorba radiación de tal modo que ayude a transmitir de manera más eficaz la energía de la radiación láser a los analitos que son desorbidos e ionizados. Se realizó el experimento en primer lugar con Rodamina-590 ya que presenta un máximo de absorción de 530 nm, muy cercano a los 532 nm de la radiación láser empleada para producir la desorción en estos experimentos. La Figura 3.8 recoge en tres espectros de masas la comparación entre la desorción de trans-resveratrol puro representada en el caso 1, la de la misma cantidad de trans-resveratrol al que se le ha añadido una matriz cromófora (Rodamina-590) representada en el caso 2. Pese a que con este sistema se obtuvo un incremento de la señal de trans-resveratrol 2,5 veces mayor comparada con la desorción obtenida de una muestra que contiene la misma cantidad de trans-resveratrol puro sin Rodamina-590, el límite de detección proporcionado era insuficiente para nuestras necesidades analíticas ya que se situaba en el orden de las ppm mientras que queríamos trabajar en un intervalo cercano a las ppb.

Discusión de los resultados

Dado que los 2 componentes principales que intervienen en el proceso de desorción de la muestra son el de absorción de luz por una parte y el térmico por otra, la siguiente prueba fue determinar si un agente metálico transmitiría mejor la energía por efecto térmico de lo que lo hacía una matriz cromófora resonante. La Figura 3.8 muestra, en el caso 3, un espectro de masas de la misma cantidad de trans-resveratrol depositada en el disco para los casos 1 y 2 a la que se ha añadido Zn en polvo (10 μm) en una cantidad equimolecular a la de la Rodamina utilizada en el caso 2. Se observa con claridad para este último caso un incremento de la señal de trans-resveratrol de un factor de 20. Además se obtiene un límite de detección 10 veces mejor cuando empleamos Zn mezclado con la matriz compleja a desorber. Aunque no se ha caracterizado el mecanismo físico responsable de este aumento de la señal por el empleo del Zn, es evidente que el Zn posibilita una mejor transmisión de la energía en la matriz aumentando de esa manera la zona efectiva a desorber. Esta mejora podría ser debida al acoplamiento de los electrones del metal con el campo eléctrico de alta intensidad de la radiación láser que consecuentemente produce un rápido y eficiente calentamiento del sustrato a desorber. Esta técnica de desorción ha sido denominada con el acrónimo MEPED (MEtal Powder Enhanced Desorption)^{137}.

Por último, en cuanto al proceso de desorción se refiere, se estudió el efecto de la longitud de onda empleada. En nuestro caso se disponía de un láser de Nd:Yag para producir la radiación por lo que podría trabajarse con su primer armónico, es decir 1064 nm (IR), y compararlo con el segundo armónico del láser a 532 nm (visible). Este experimento es mostrado en la Figura 3.9 y puede apreciarse claramente como el empleo de la radiación infrarroja posibilita registrar una señal de trans-resveratrol 4 veces mayor que la registrada cuando se emplea la radiación visible. El espectro tomado a 532 nm fue realizado en el máximo de energía de desorción posible antes de que aparezcan procesos de fragmentación (20 mJ/ pulso) al igual que el espectro tomado a 1064 nm, sin

Discusión de los resultados

embargo para este último caso la intensidad de señal registrada es tal y como se ha mencionado cuatro veces mayor.

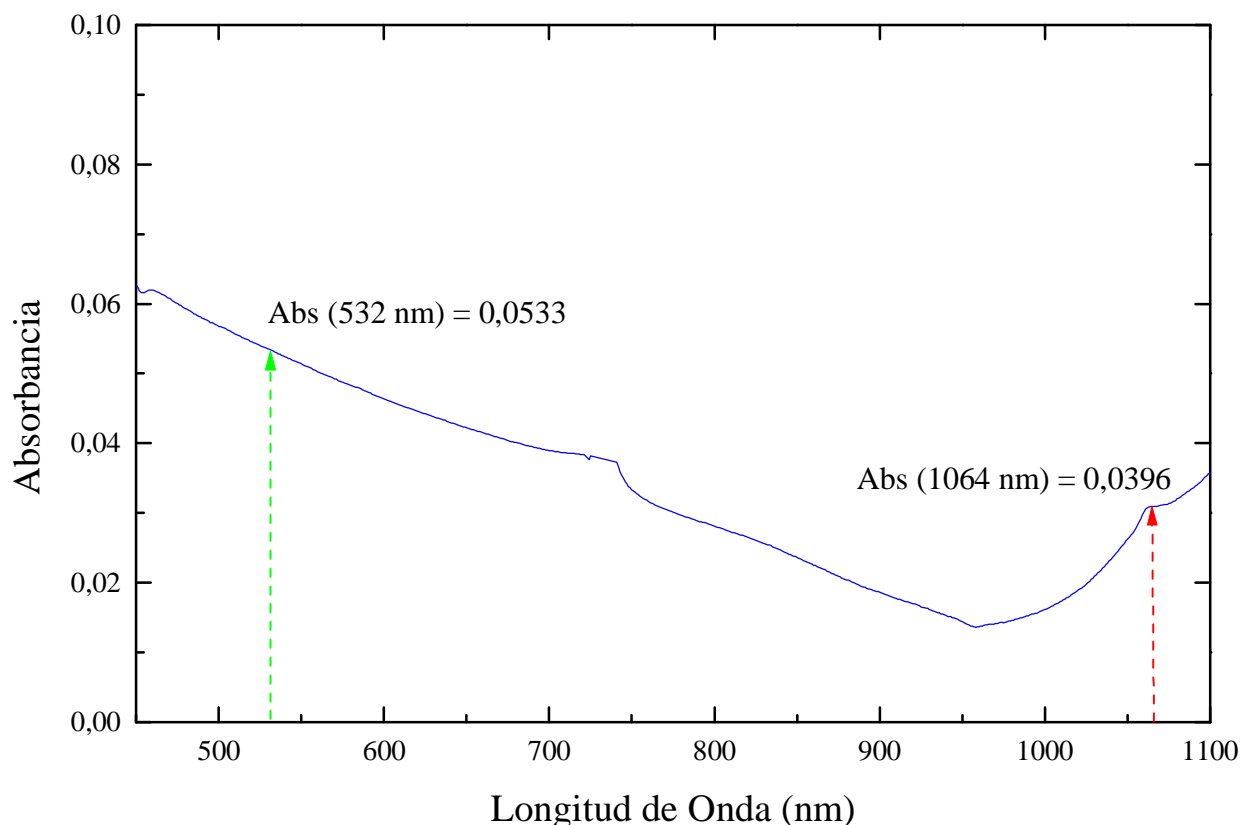


Figura 5.3.- Espectro de Absorción de trans-resveratrol en etanol de 450 a 1100 nm.

Del espectro de absorción del trans-resveratrol en el intervalo de 450 a 1100 nm mostrado en la figura 5.3, puede obtenerse la absorción del trans-resveratrol a 532 nm (0,0533) y a 1064 nm (0,0310). Esta absorción diferente en un factor de aproximadamente 2, sugiere que para una misma fluencia del láser, el trans-resveratrol podría “calentarse” más a 532 nm que a 1064 nm. Ya se observó en el desarrollo de la desorción MEPED que la componente térmica juega un papel esencial en el mecanismo de desorción del trans-resveratrol, por lo que considerando que el origen de la fragmentación del trans-resveratrol parece estar asociada con el calentamiento local que produce la absorción

Discusión de los resultados

fotónica en la molécula, la probabilidad de que la molécula se fragmente será menor para el caso de los fotones infrarrojos, ya que un fotón a 1064 nm posee la mitad de energía que un fotón a 532 nm. Un hecho experimental a favor de este argumento es que cuando se desorbe trans-resveratrol a 532 nm los procesos de fragmentación comienzan a aparecer a partir de los 20 mJ /pulso, mientras que cuando se desorbe con radiación de 1064 nm puede superarse los 70 mJ / pulso sin que se aprecie en el espectro procesos de fragmentación del trans-resveratrol.

Cabe pensar, a modo de conclusión preliminar, que la combinación de estos dos factores, a saber: la mayor energía del fotón a 532 nm y su mayor absorbancia, respecto a 1064 nm favorece la fotofragmentación del trans-resveratrol durante el proceso de desorción, lo que resultaría, por consiguiente, en un menor rendimiento – menos intensidad de señal – de la ionización. Este hecho es recogido en la tabla 3.2 apreciándose cómo para un mismo tipo de muestra el límite de energía a partir del cual comienza la fragmentación molecular del trans-resveratrol es mayor cuando se trabaja con radiación infrarroja. Para el caso del aceite esencial este límite de fragmentación está muy por encima de los 50 mJ/pulso, pero por motivos de seguridad se trabaja normalmente con energías menores.

Un estudio más detallado de la dinámica de desorción y fragmentación en este proceso está fuera de los objetivos básicos de esta tesis y es objeto de otro trabajo de tesis doctoral, actualmente en curso en nuestros laboratorios.

Ionización REMPI

Hallar el espectro REMPI del trans-resveratrol es uno de los resultados más importantes de esta tesis. Conociendo dicho espectro pudo posteriormente seleccionarse la longitud de onda más adecuada para, en una matriz compleja que ha sido vaporizada, ionizar selectivamente el trans-resveratrol. Recordemos que

Discusión de los resultados

puede de este modo accederse al continuo de ionización de esta molécula a través de sus niveles energéticos reales, necesitando para ello una fluencia muy baja en la energía de ionización.

Por lo tanto, los fotones que posean la longitud de onda en resonancia con los niveles reales de la molécula conseguirán excitarla, y dado que trabajamos con una irradiancia muy baja (fotones/s.cm²), la energía no es suficiente como para crear niveles energéticos virtuales en el resto de componentes de la matriz analizada, obteniendo de este modo una ionización selectiva del trans-resveratrol.

La Figura 5.4 muestra el espectro REMPI del trans-resveratrol puro en estado de vapor. Puede verse como se han asignado 2 progresiones que fueron denominadas A y B y que corresponden a transiciones desde el nivel electrónico fundamental a 2 modos vibracionales distintos de un nivel electrónico excitado. La forma del espectro muestra diferentes bandas de absorción que crecen en intensidad a medida que aumenta la frecuencia hasta llegar a la banda de absorción más intensa tras la cual la intensidad de señal registrada decrece bruscamente; de ello se deduce que la distancia internuclear de equilibrio del nivel electrónico excitado (r_e') es mucho mayor que la del nivel electrónico fundamental (r_e''). Si representamos ambas curvas de energía potencial de los estados electrónicos excitado y fundamental, los mínimos de los pozos de energía potencial no estarían situados a la misma distancia, por lo que una transición que partiese del nivel vibracional fundamental dentro del nivel electrónico fundamental no podría acceder al nivel vibracional fundamental del nivel electrónico excitado.

Discusión de los resultados

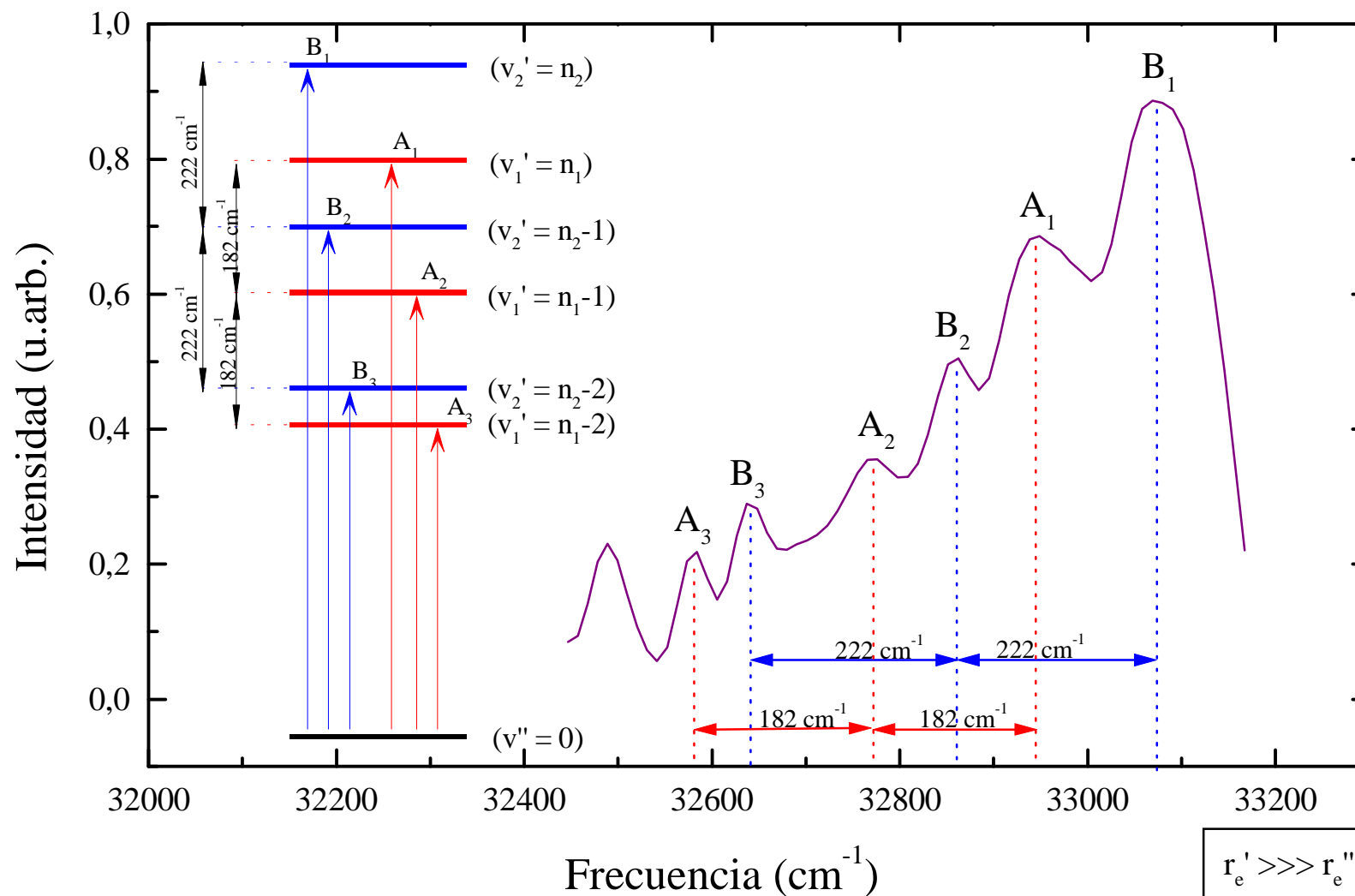


Figura 5.4.- Espectro REMPI de trans-resveratrol en el que se han asignado varias transiciones vibro-electrónicas.

Discusión de los resultados

En la Figura 5.5 se representa este fenómeno simplificado para una única transición electrónica que correspondería con la transición que hemos denominado B_1 en el espectro REMPI; es lógico pensar que el nivel fundamental de vibración es el más poblado dentro del nivel electrónico fundamental y si observamos la figura podemos comprobar como si aumentásemos la energía del fotón que produce la transición B_1 se accedería al continuo de disociación o predisociación del nivel electrónico excitado, lo cual aparece en el espectro REMPI como una caída brusca de la señal de trans-resveratrol a energías superiores a 33.069 cm^{-1} .

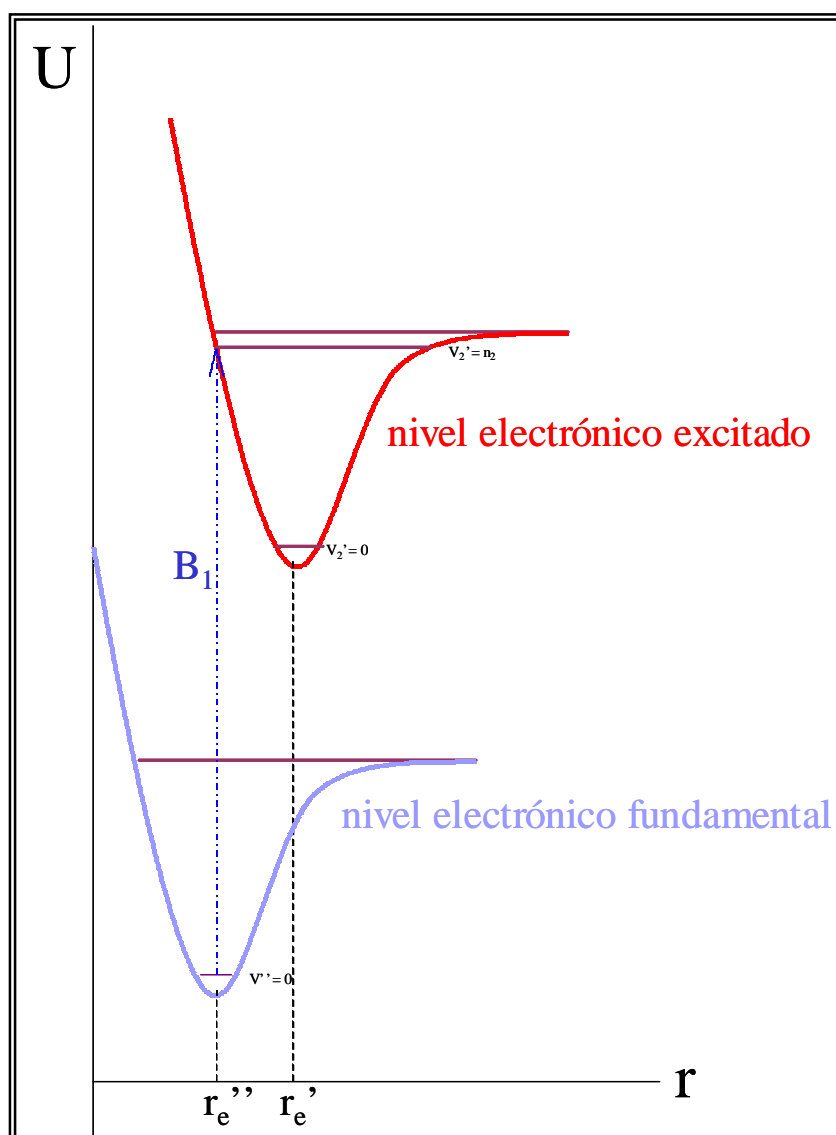


Figura 5.5 -. Representación esquemática de una transición electrónica teórica en una molécula en la que la distancia de equilibrio internuclear del nivel electrónico excitado es mayor que la del nivel electrónico fundamental.

Discusión de los resultados

En el espectro REMPI de trans-resveratrol se observan claramente dos progresiones espectrales que corresponden a tránsitos desde el nivel fundamental de vibración ($v' = 0$) del estado electrónico fundamental hasta los niveles de dos modos de vibración distintos del estado electrónico excitado. Hemos denominado A_n y B_n a las transiciones de cada uno de estos dos modos de vibración. Con la información registrada no puede asignarse a qué niveles concretos de vibración corresponden los estados vibracionales del estado electrónico excitado, sin embargo y por el argumento explicado con anterioridad, si se sabe que tanto B_1 como A_1 corresponden a transiciones próximas al continuo de disociación de dicho estado en cada modo de vibración respectivamente. Dado que la molécula de trans-resveratrol es muy grande puede pensarse que no existen en ella transiciones prohibidas por las reglas de selección, y en consecuencia las bandas inferiores a B_1 y a A_1 corresponden a transiciones de niveles contiguos e inferiores a éstos dentro de cada modo de vibración; de este modo B correspondería a la progresión ($v_0'' \rightarrow v_{n2}'$; $v_0'' \rightarrow v_{n2-1}'$; $v_0'' \rightarrow v_{n2-2}'$) y A a la progresión ($v_0'' \rightarrow v_{n1}'$; $v_0'' \rightarrow v_{n1-1}'$; $v_0'' \rightarrow v_{n1-2}'$). Se ha encontrado una separación para la progresión B de 222 cm^{-1} y para la progresión A de 182 cm^{-1} .

De la representación doble-logarítmica de la energía de ionización empleada frente a la intensidad de señal registrada (Figura 3.19), y teniendo presente la ecuación 1.1, la pendiente de esa representación nos da el número de fotones utilizados para ionizar la molécula y se conoce como orden de fotoionización. Deducimos por lo tanto que la ionización del trans-resveratrol se produce mediante un proceso bifotónico de un solo color (R2PI). Se dice que el proceso es de un sólo color por que los dos fotones utilizados poseen la misma longitud de onda. Es decir, el primer fotón hace que la molécula de trans-resveratrol pase del estado electrónico fundamental a un estado electrónico excitado tal y como representa la Figura 5.5, y posteriormente un segundo fotón hace que la molécula pase de ese estado electrónico excitado al continuo de ionización de un estado electrónico excitado superior. Dada la alta eficacia de la

Discusión de los resultados

ionización REMPI, en este experimento al aumentar la irradiancia alcanzaríamos pronto la saturación del mismo, por lo que se empleó una longitud de onda (299,5 nm) alejada de la longitud de onda resonante (302,1 nm).

Desde el punto de vista experimental no debe olvidarse que se obtiene una ventaja añadida con este tipo de proceso R2PI, ya que se necesitan 2 fotones de una misma longitud de onda para producir la ionización resonante del trans-resveratrol, o dicho de otro modo, se requiere sólo de una fuente de emisión láser sintonizada en una única longitud de onda para realizar el proceso.

5.2-. VALIDACIÓN.

Como etapa previa a la aplicación analítica del método, se realizó el estudio de validación del método analítico para análisis de trans-resveratrol mediante LD + REMPI + TOFMS, posibilitándonos conocer las características de funcionamiento del método a la vez que se nos proporciona un alto grado de confianza y seguridad en los resultados obtenidos al aplicarlo.

Se han estudiado 8 parámetros desde el punto de vista de la validación: repetibilidad, reproducibilidad, linealidad, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación, y que a modo de resumen, se encuentran definidos con los valores obtenidos para el método en la tabla 5.1.

Todos los valores obtenidos en los diferentes experimentos de validación cumplen los criterios que deben poseer los sistemas analíticos destinados al análisis de trazas en muestras complejas ^{234}: Repetibilidad < 5%, Reproducibilidad < 10%, Exactitud > 90%, Linealidad con $r > 0.999$.

Discusión de los resultados

PARÁMETRO	DEFINICIÓN	VALOR
REPETIBILIDAD	Precisión del sistema bajo condiciones en las que los resultados se obtienen con el mismo método, operador, instrumento de medida y en un corto intervalo de tiempo.	RSD = 4,9 %
REPRODUCIBILIDAD	Precisión del sistema bajo condiciones en las que los resultados se obtienen con el mismo método, sobre el mismo analito, con diferentes operadores, en diferentes tiempos.	RSD = 4,4 %
SELECTIVIDAD / ESPECIFICIDAD	Grado por el que el método puede determinar un analito particular dentro de una muestra compleja, sin interferencias.	Ionización REMPI + TOFMS
LINEALIDAD	Relación entre la concentración de analito y la respuesta del método.	r = 0,9997
EXACTITUD	Grado de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado.	96 %
LÍMITE DE DETECCIÓN	Mínima concentración que produce una respuesta detectable por encima del nivel de ruido del sistema.	Triturado-piel = 5ppb Aceite-piel= 2ppb Trans-resveratrol = 2pg
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	Concentración mínima que puede determinarse para un nivel concreto de exactitud y precisión.	Triturado-piel = 16ppb Aceite-piel= 12ppb Trans-resveratrol = 7pg

Tabla 5.1-. Resumen de los valores obtenidos de los experimentos de validación del sistema para la determinación de trans-resveratrol.

Discusión de los resultados

Podemos mencionar también para el experimento de linealidad como además de poseer un factor de correlación de 0,9997 el punto (x=0, y=0) está incluido en el intervalo de confianza para un nivel de probabilidad de un 99 %.

Por último podríamos comparar el valor del límite de detección para trans-resveratrol analizado por otras técnicas con el obtenido por LD + REMPI + TOFMS, como así recoge la tabla 5.2.

Muestra	Preparación	Técnica	Detector	ppb *	Año	Ref.
Vino	SPE + BSTFA	GC	MSD	8	1997	107
Vino	SPME + BSTFA	GC	MSD	0,005	2000	106
Vino	SPE	HPLC	EC	1	1994	112
Piel de Uva	SPE	HPLC	Red de diodos	1	2000	59
Plasma	SPE	HPLC	Red de diodos	7	1999	117
Cacahuetes	SPE	HPLC	Red de diodos	10	1999	116
Vino	L-L	HPLC	Fluorimetría	20	2001	118
Zumos	Inyección Directa	HPLC	Red de diodos	30	1999	63
Vino	L-L + PTFE	HPLC	Red de diodos	50	1993	120
Vino	SPE	HPLC	MSD	900	2001	121
Vino	SPE	CE	Red de diodos	50	1998	129
Hoja	L-L	HPLC	Fluorimetría	100	1997	115
Uva	LD	REMPI	TOF	5	2000	13
Hoja	LD	REMPI	TOF	2	2001	244

Tabla 5.2-. Comparativa del límite de detección para la determinación de trans-resveratrol. (*) 1 ppb = 1 µg /L.

Discusión de los resultados

Muchos de estos valores ya fueron mostrados en la introducción y otros se muestran ahora. Puede apreciarse en la tabla que el límite de detección en uva hallado para LD+REMPI+TOF es del mismo orden (5 ppb) que los mejores alcanzados por otras técnicas que pueden considerarse convencionales como HPLC (1 ppb) o CE (50 ppb), lo cual hace que la técnica en este sentido muy competitiva. Lo mismo sucede para el caso del análisis de trans-resveratrol en hojas, donde el límite de detección obtenido es de 2 ppb.

Los esfuerzos encaminados a simplificar la preparación de la muestra por GC o HPLC conllevan un significativo empeoramiento del LoD a la vez que se complica la interpretación de los cromatogramas.

Sólo se ha encontrado hasta la fecha un trabajo que supere éste límite de detección, y es el caso de la microextracción en fase sólida SPME + BSTFA acoplada a la GC-MS para el análisis de trans-resveratrol en vinos (5 ppt). Sin embargo ésta técnica arrastra los errores asociados a la derivación con BSTFA y a la propia extracción en fase sólida ya descritos anteriormente, que sobreestiman el contenido real de trans-resveratrol.

Debe tenerse en cuenta que, además de cumplir todos los requisitos analíticos, desde el punto de vista de la validación, la técnica LD + REMPI + TOFMS posee grandes ventajas añadidas como son la posibilidad de realizar un análisis directo, incluso de moléculas térmicamente lábiles, sin necesidad de largos y tediosos procesos de separación que son los responsables de la introducción de las mayores fuentes de error en los métodos convencionales.

Debido también a esta ausencia de procesos de separación, otra ventaja reseñable es el corto tiempo de análisis requerido desde el mismo momento en que se dispone de la muestra en su estado natural (uva, tomate, etc.), en comparación con las técnicas ya mencionadas de CG o HPLC.

5.3-. APLICACIONES ANALÍTICAS.

Las principales ventajas de la aplicación de la técnica son como ya se ha mencionado anteriormente su alta selectividad gracias a la ionización REMPI y a la espectrometría de tiempo de vuelo, así como la ausencia de procesos de separación de muestra debido a la aplicación de la desorción láser, que por otra parte posibilita la vaporización de sustancias térmicamente inestables y difíciles de vaporizar mediante el empleo de técnicas convencionales. Además de estas innegables ventajas, se suman otras asociadas como el evitar los errores que provienen de los procesos de tratamiento de muestra y el ahorro de los costes que provoca el no necesitar reactivos dada la ausencia de procesos de separación así como el ahorro de tiempos de análisis.

Determinación de trans-resveratrol (MPI - REMPI).

En todos los experimentos con trans-resveratrol puro, éste fue conservado en frío y en ausencia de luz para evitar la formación de glucóxidos de trans-resveratrol por acción de la temperatura así como su isomerización por acción de la luz, procesos ya registrados en la bibliografía y demostrados experimentalmente en el laboratorio como así muestran las figuras 4.1 y 4.2.

En el espectro de la la Figura 3.14 se muestra trans-resveratrol puro ionizado a 266 nm. Este tipo de ionización es efectiva como puede verse en el espectro, pero su efectividad queda mermada cuando se trabaja con muestras complejas, ya que la ionización MPI utilizada gracias a la alta energía de los fotones empleados presenta efectos de matriz al afectar por igual a todos los compuestos presentes en una muestra compleja. Es decir, se obtiene un espectro de casi todos los compuestos presentes, en el que el analito estudiado tendría interferencias por parte de los compuestos de su misma masa. Por este motivo se pasó de la ionización MPI, no selectiva, a una ionización REMPI en la que

Discusión de los resultados

accedemos al continuo de ionización a través de niveles reales que estén en resonancia con la longitud de onda empleada en el láser de ionización y que en nuestro caso ajustamos a 302,1 nm para el trans-resveratrol. Podemos apreciar en el espectro inferior de la Figura 3.18 como no sólo mejora la selectividad del proceso de ionización al compararlo con el espectro superior medido fuera de resonancia (301,1 nm), sino que también mejora el cociente señal / ruido dada la mayor eficiencia de la ionización REMPI.

Estudio de trans-resveratrol en las distintas partes de la uva.

La Figura 4.5 y 4.6 ratifican experimentalmente la validez de la utilización de la piel de la uva y no de la pulpa a la hora de determinar el contenido de trans-resveratrol en esta fruta, teniendo de esta manera una preconcentración natural que la propia vid hace del trans-resveratrol, hecho que ha de considerarse lógico al observar que los agentes patógenos atacan a la planta desde el exterior, es decir, que contacta con la planta a través de las hojas, el tallo y la piel del fruto, por lo que la planta concentra sobre estas zonas la mayor cantidad posible de este compuesto antifúngico.

Del mismo modo se comprobó como los procesos de vinificación en los que se emplea el hollejo, el contenido de trans-resveratrol es mayor que en los que se producen sin la piel. Un ejemplo de este proceso se presenta en la Figura 4.3 en la que se muestra un espectro de vino tinto fermentado con el hollejo. El conocimiento de esta preconcentración natural hace que el hollejo de la uva se revalorice, así por ejemplo, en la Figura 4.4 se muestra el espectro de un colorante alimenticio, del que además se sus propiedades como colorante alimentario deben sumarse los beneficios para la salud humana que la presencia del trans-resveratrol le confiere.

Cuantificación de trans-resveratrol en uvas.

Las determinaciones cuantitativas de trans-resveratrol se realizaron por aplicación del método de adiciones estándar empleando la desorción MEPED y la ionización REMPI. Los parámetros experimentales se seleccionaron para obtener las mejores condiciones de medida para cada tipo de muestra, recordemos por ejemplo que la energía óptima de desorción es distinta en función de que trabajemos con el aceite esencial o con el triturado de la piel, y cuyos valores ya han sido mostrados en apartados anteriores.

En la Figura 4.8 se muestra un ejemplo de estos análisis para la uva Ideal comprada en el mercado. Para este caso se encuentra una concentración de trans-resveratrol en uva de 20 ppb, valor acorde con el largo periodo de maduración de éstas uvas antes de ser analizadas, y durante el cual se produce una disminución de la concentración de este compuesto ^{38, 39}. Para evitar este proceso de maduración se midieron uvas de la variedad Ideal suministradas directamente por viticultores; encontrándose un contenido medio de trans-reveratrol determinado por el método de adiciones estándar de 9 ppm.

En la mayoría de las ocasiones se analizaron muestras en las que la concentración de trans-resveratrol es del orden de las partes por millón, como así ocurre con la uva analizada en la Figura 4.9, o las mostradas en la Figura 4.10. La diversidad de los valores encontrados ratifica cómo el contenido de trans-resveratrol en la uva depende de múltiples factores, tales como la variedad de uva cultivada, las propiedades del terreno en el que ha crecido, la climatología, la época de la recolección, etc., Para los casos en los que las muestras han sido suministradas directamente por los viticultores (Aledo, Ideal, Garnacha 1 y 2) y por consiguiente las uvas se encuentran en su primera etapa de maduración, los valores hallados son mayores que los encontrados en aquellas uvas que han sido

Discusión de los resultados

compradas en el mercado y cuyo proceso de maduración ha sido más largo (Sudafricana, Ideal B y Chilena).

Cuantificación de trans-resveratrol en hojas de vid.

Tras los análisis realizados en uva, se analizó el contenido de trans-resveratrol en hoja por un motivo fundamental, normalmente las hojas de vid no son utilizadas, aunque dadas las propiedades beneficiosas para la salud de este compuesto, es posible utilizar las hasta ahora desaprovechadas hojas de vid para extraer de ellas el trans-resveratrol. El resultado mostrado en la Figura 4.13 refleja que el orden de magnitud del trans-resveratrol encontrado en la hoja de la vid (9 ppm) es similar al encontrado en la piel de la uva.

Este valor de trans-resveratrol hallado en las hojas es consistente con la evolución natural del trans-resveratrol en la vid. Comienza a detectarse su concentración en la primavera para defender a la planta de infecciones fúngicas, alcanzando una concentración mayor entre la 1^a y la 5^a semana tras las floración, para posteriormente ir disminuyendo a partir de la 10^a semana a medida que la fruta va madurando y las hojas son viejas. Estos experimentos fueron realizados con hojas recolectadas al final del proceso de maduración, lo que justifica el valor de unas pocas ppm de trans-resveratrol encontrado en las hojas.

La primera diferencia reseñable es que la concentración de trans-resveratrol en las Hojas Aledo es siempre mayor que la encontrada en las hojas Ideal. Este hecho es consistente con su maduración, ya que la variedad Ideal tiene un proceso de recolección que culmina a mediados de noviembre mientras que la variedad Aledo, puede llegar a recolectarse hasta cuatro meses más tarde. Es interesante fijarse en cómo el contenido del trans-resveratrol, a pesar de ser diferente en las dos variedades de hoja, sigue una misma pauta, es decir, en ambos casos el contenido de este compuesto es mayor en las hojas jóvenes que

Discusión de los resultados

comienzan a brotar que en las hojas viejas cogidas de la base del sarmiento. Esta evidencia experimental ratifica nuevamente el hecho de que a medida que la maduración progresa en la planta, la concentración de trans-resveratrol disminuye.

Es evidente que es más cómodo, en lo que a la obtención de trans-resveratrol se refiere, extraerlo de la hoja y no del fruto, ya que en primer lugar tendríamos que separar la pulpa y la semilla de la piel. Esta afirmación no debe restar valor al aprovechamiento que del hollejo puede hacerse una vez se ha extraído el vino.

Cuantificación de trans-resveratrol en cacahuete.

El interés analítico por el cacahuete no radica en su importancia actual como complemento nutricional. Según los datos publicados por el Instituto Nacional de Estadística en 1996 se cultivaron 121 Ha. con cacahuete frente a las 1.163.901 Ha. de vid, por lo que su importancia en cuanto a producción se refiere se situa muy por debajo de la de la uva.

Sin embargo, ya había sido descrita la presencia del trans-resveratrol en cacahuetes por otros autores, por lo que se introdujo el análisis de una muestra de cacahuetes como primera extensión del estudio del trans-resveratrol a otros alimentos distintos de la uva.

En la Figura 4.14 se observa una señal significativa de trans-resveratrol en este alimento. El valor obtenido de 0,1 ppm de trans-resveratrol en los cacahuetes analizados está en concordancia con los valores medios registrados por otros autores para el contenido medio de trans-resveratrol en este fruto y que varían entre 0,005 y 5,183 ppm^{32, 116}.

Evolución del contenido de trans-resveratrol en uvas infectadas por *Botrytis Cinerea*.

El siguiente estudio realizado fue buscar la relación entre el contenido de trans-resveratrol y la infección fúngica de las uvas por parte de la *Botrytis Cinerea*, hallando de ese modo al mismo tiempo una correlación entre el contenido de trans-resveratrol y el estado de salud de la fruta.

Otros investigadores ya habían puesto de manifiesto la evolución del trans-resveratrol en la vid, tras ser infectada por *Botrytis Cinerea*, a través de sus hojas en experimentos in vitro en cultivos celulares y plántulas ^{6, 9, 10}. Sin embargo, y de cara a optimizar su presencia en el fruto durante su periodo de almacenamiento se decidió realizar dicho análisis sobre el contenido de este compuesto en la piel de las uvas después de la cosecha.

Las indagaciones en esta línea experimental fueron llevadas a cabo en uvas para seguir su evolución cuando son infectadas por la *Botrytis* empleando los protocolos ya descritos para la inoculación de la fruta. Se utilizaron 3 grupos de uvas, un primer grupo en el que se infecta con *Botrytis Cinerea*, un segundo grupo en el que se inocula sólo con la solución tampón para producir una herida en la fruta similar a la del primer grupo, y un tercer grupo en el que no se produce ninguna herida a las uvas.

Se analizó el contenido de trans-resveratrol en los tres grupos de uvas antes del momento en que se produce la infección y posteriormente se siguió la evolución de dicho contenido a lo largo del tiempo como se muestra en la Figura 4.16. Mientras que en el tercer grupo, el de uvas no infectadas ni heridas parece mantenerse constante el contenido de trans-resveratrol con una ligera caída a partir del 5º día, el grupo inoculado con la solución tampón, muestra un importante descenso en la concentración de trans-resveratrol debido la herida

Discusión de los resultados

producida en la uva. En el grupo inoculado por la *Botrytis* se produce la elicitación del trans-resveratrol como respuesta a la infección fúngica, alcanzando un máximo en su concentración en torno a las 48 horas posteriores al momento de la inoculación, a partir de este momento desciende la concentración de trans-resveratrol rápidamente debido a la dimerización oxidativa producida por la *Botrytis* ^{5, 10, 44}.

En experimentos similares en los que se siguió la evolución del trans-resveratrol en las hojas de la vid *in vitro* ^{45} se obtuvo un resultado similar con el máximo en el contenido de trans-resveratrol en torno al 3^{er} día tras la inoculación y una posterior y rápida caída hasta el 5^o día.

Comparando el contenido de la concentración de trans-resveratrol en el máximo de su elicitación como respuesta a la *Botrytis* con los otros dos grupos de referencia, se encontró una señal 10 veces mayor comparada con la uvas en las que se produjo la herida pero no la infección y de un factor de 2 si lo hacemos con las uvas a las que no se les ha provocado herida ni infección. Se deduce por lo tanto que la parte del sistema defensivo de la planta responsable de crear las fitoalexinas como el trans-resveratrol, es activado exclusivamente cuando el agente patógeno (*Botrytis Cinerea*) entra en contacto con ella.

En cualquier caso, la respuesta del trans-resveratrol frente a la infección fúngica es clara, es decir, el carácter antifúngico del trans-resveratrol lo perfila como un pesticida natural presente en las plantas para defenderlas de los agentes patógenos, por lo que puede pensarse que enriqueciendo artificialmente a la planta de este compuesto, conseguiremos obtener plantas más resistentes a las infecciones a la vez que añadimos un componente alimenticio altamente saludable para el hombre.

Discusión de los resultados

En base a estos hallazgos se pensó que quizás si se rociaba con el caldo de cultivo de la *Botrytis Cinerea* muerta sobre las uvas pudiésemos producir también la elicitación del trans-resveratrol, sin embargo no se produce esta respuesta por lo que no se obtiene fruta más resistente por este método, como así se observa en la Figura 4.17. El experimento mostrado en esa figura fue realizado con las esporas autoclavadas de la *Botrytis*, por lo que queda aún abierta para experimentos futuros la posibilidad de “vacunar” las uvas pulverizando sobre ellas las hifas muertas de la *Botrytis*, así como de emplear la mezcla de hifas y esporas muertas.

Evolución del contenido de Quercitrina en uvas infectadas por *Botrytis Cinerea*.

Otro compuesto que aparece en muchas de las uvas estudiadas es la quercitrina, otro antioxidante que al igual que el trans-resveratrol posee propiedades beneficiosas para la salud humana y que combinado con el trans-resveratrol hace más sencilla su bioasimilación. Nuestra curiosidad se centró en saber si la quercitrina jugaría en estas uvas, el mismo papel que el trans-resveratrol como pesticida natural enfrentándose al ataque de la *Botrytis*.

Se infectó para ello un grupo de uvas con *Botrytis Cinerea* según los protocolos ya descritos, y a continuación se siguió la evolución de la quercitrina en función del tiempo. Como se ve en la Figura 4.18 se siguió esta evolución durante nueve días después del momento de la infección. Puede observarse como no se produce la elicitación de la quercitrina en la uva tras el ataque de la *Botrytis*, sino que a medida que va empeorando la uva por dicho ataque, la concentración de quercitrina disminuye lenta y pausadamente. A partir del noveno día no se registra señal alguna de este compuesto.

Discusión de los resultados

Esta evolución sugiere que la concentración de quercitrina presente en las uvas tiene una correlación directa con su estado de salud. No debe olvidarse un dato importante, y es que la determinación de la quercitrina se ha realizado bajo las condiciones de medida optimizadas para el análisis del trans-resveratrol, o dicho de otro modo, la quercitrina absorbe radiación a 302,1 nm, pero esa no tiene por que ser la longitud de onda óptima a la que producir su ionización resonante, por lo que la utilización de otra longitud de onda en el proceso de ionización se traduciría en una mejora del límite de detección, a la vez que se aumenta de este modo la escala de tiempos en los que seguir la evolución de este compuesto en las uvas. También debemos pensar que al infectar la fruta con la *Botrytis* estamos acelerando su proceso de putrefacción, así que midiendo la concentración de quercitrina al principio del almacenamiento y siguiendo su evolución podría determinarse cuan saludable es el estado de la fruta con respecto al momento inicial de ser conservada.

Aplicación exógena de trans-resveratrol.

La siguiente línea de experimentos comprobó si la aplicación exógena de trans-resveratrol podría aumentar no sólo la resistencia natural de frutas y verduras frente a las infecciones fúngicas, sino también retrasar la senescencia natural de la fruta. Para ello y con el fin de comparar el resultado de dicha aplicación en distintas variedades de frutas y verduras se preparó una disolución estándar de trans-resveratrol $1,6 \times 10^{-4}$ M en agua bi-destilada. Distintos tipos de frutas y verduras fueron sumergidos en esta disolución durante 5 segundos, mientras que otro grupo que nos serviría como referencia de la misma fruta o verdura era sumergido durante 5 segundos sólo en agua bi-destilada.

Los resultados de las figuras 4.19 a 4.24 confirman con claridad y de manera concluyente como en todos los casos se establecen grandes diferencias entre el estado de salud del grupo tratado con trans-resveratrol y el grupo no

Discusión de los resultados

tratado. En la siguiente tabla se recoge el periodo de tiempo en el que las diferencias entre el grupo tratado con trans-resveratrol y el no tratado eran más apreciables, no mostrando aún el grupo tratado ningún aspecto de deterioro.

FRUTA	DENOMINACIÓN DE ORIGEN	DÍAS SIN DETERIORO DEL GRUPO TRATADO
PIMIENTOS	LAMUYO	8
UVAS	ALEDO	10
AGUACATES	HASS	15
TOMATES	RAMBO	31
PIMIENTOS	CALIFORNIA	37
MANZANAS	GOLDEN	75

Tabla 5.3 -. Resumen de los experimentos de aplicación exógena de trans-resveratrol en frutas y verduras.

De todas las frutas y verduras tratadas, los pimientos California fueron en los que menos diferencias se apreciaron entre el grupo de pimientos tratado y no tratado con trans-resveratrol. Sin embargo para la otra variedad de pimientos, los pimientos Lamuyo, se muestran fotos al octavo día donde se ve claramente que mientras los pimientos no tratados presentan un color rojo, los tratados mantienen aún su color verde original, reflejando como la maduración del grupo tratado con trans-resveratrol es mucho más lenta que la del grupo no tratado.

El resto de frutas y verduras presentan a partir del día señalado en la tabla 5.3 síntomas evidentes de la aparición de especies fúngicas en el grupo no tratado, mientras que el grupo tratado conserva un aspecto saludable. Y no sólo su aspecto, también se preservan sus propiedades organolépticas y bioquímicas

Discusión de los resultados

como así ratificaron los análisis realizados. En la realización de estos experimentos se midieron dichas propiedades en el grupo de uvas no tratadas con trans-resveratrol y se compararon con las halladas 8 y 18 días después para el grupo de uvas tratadas con trans-resveratrol. La conclusión principal de dichos experimentos es que la aplicación exógena de trans-resveratrol no afecta a las propiedades organolépticas de las uvas, a la vez que retrasa su senescencia aumentando su resistencia a posibles infecciones fúngicas.

Debemos destacar también otro hecho importante, y es que considerando que todos los experimentos fueron llevados a cabo manteniendo una temperatura de aproximadamente 25 °C, si nos parece sorprendente la conservación del estado de salud de los tomates (31 días) o de las manzanas (75 días), todavía pueden ampliarse estos plazos si pensamos en la combinación de la aplicación exógena con la conservación de las frutas y verduras a menor temperatura.

Caracterización de especies transgénicas.

Otra de las posibles maneras de aumentar la resistencia de las frutas y verduras incrementando la concentración de trans-resveratrol es crear mediante modificación genética especies que manifiesten una mayor concentración de este compuesto. Para ello tratamos de determinar la concentración de trans-resveratrol y la evolución del mismo frente al ataque de la *Botrytis* en los tomates desarrollados por el grupo del profesor K. Kuhlemeier y mostrados en la Figura 4.25. En el caso del trans-resveratrol se ha conseguido por el momento transferir con éxito los genes responsables de la síntesis de este compuesto a otras plantas tales como el tabaco ^{245}, el arroz ^{246} e incluso el mismo tomate ^{247}.

Aunque se consiga transferir con éxito el gen responsable de la síntesis del trans-resveratrol, puede que éste no se manifieste como así ocurre con los

Discusión de los resultados

tomates desarrollados por el grupo del Prof. Kuhlemeier al no presentar un contenido significativo de trans-resveratrol, al menos por encima de nuestro límite de detección (ppb), tal y como se aprecia en los espectros de masas. Cuando una especie transgénica no manifiesta las características para las cuales ha sido desarrollada, es mucho más improbable que lo haga en generaciones sucesivas. Sin embargo, si que observamos un hecho destacable; pese a estar descrita la presencia de trans-resveratrol en el tomate, por excelencia el antioxidante natural más abundante en esta verdura es el licopeno. Aún no habiéndose manifestado la creación de trans-resveratrol en el tomate transgénico quizás el licopeno presentaría una elicitación semejante a la que se producía en las uvas tras la infección con la *Botrytis Cinerea*.

Este comportamiento del licopeno fue confirmado, en la Figura 4.27 se muestra como en el momento previo a la inoculación ninguna de las especies transgénicas ni el tomate silvestre no transgénico mostraban contenido alguno de ésta sustancia.

Es evidente la presencia de licopeno en los tres tipos de tomate como responsable de su pigmentación roja, aunque dado que los espectros mostrados en la Figura 4.27 fueron tomados a 302,1 nm la eficacia de la ionización de este compuesto a esta longitud de onda es tan baja que no aparece por encima del umbral del ruido. Sin embargo tras la infección por la *Botrytis* se produce la elicitación del licopeno al igual que ocurriese con el trans-resveratrol en la uvas y su concentración aumenta de tal manera que supera y se registra por encima del umbral del ruido en los espectros. El dato de interés es que como se observa en la Figura 4.29, la especie transgénica T25 es capaz de presentar una cantidad de licopeno 10 veces mayor que la especie de tomate no transgénico, por lo que pensamos que la especie T25 es la más resistente de las tres estudiadas.

Discusión de los resultados

La presencia del compuesto organometálico metil-litio registrada en los tomates no inoculados es asociada con procesos de putrefacción y ruptura de hidrocarburos del tomate, por lo que la variedad T25, es decir la más resistente, presenta una menor concentración de dicho compuesto y queda demostrada la mejora de la resistencia de las variedades transgénicas comparadas con la variedad no transgénica de partida. Estos hechos sumados a otros avances en el campo de la modificación genética sugieren un mayor estudio de la viabilidad de mercado para estas frutas y verduras.

6. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Resumen y conclusiones

Se presenta a continuación un breve resumen de los estudios más significativos del trabajo presentado en esta memoria de tesis doctoral. Dicho trabajo, ha sido realizado íntegramente en la Unidad de Láseres y Haces Moleculares del Instituto Pluridisciplinar de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Catedrático D. Angel González Ureña y del Doctor D. Jose María Orea Rocha, siendo Tutor del mismo el Catedrático D. Luis María Polo Díez.

En primer lugar se han desarrollado dos sistemas de deposición de muestras sólidas sobre placas de vidrio pyrex, de tal forma que permiten crear una película homogénea de manera rápida y directa de las muestras para que sean analizadas de forma inmediata. El primero de ellos consiste en el triturado en frío a alta velocidad de la muestra, y su rapidez y sencillez lo hace fácilmente aplicable al análisis de cualquier analito presente en una muestra sólida compleja. El segundo de ellos es más selectivo, ya que su eficacia sólo ha sido probada para el análisis de trans-resveratrol y su ventaja frente al anterior es reducir aún más el tiempo necesario en esta etapa, a la vez que posibilita una mayor homogeneidad de la deposición de muestra sobre el pyrex. Así mismo se desarrollaron sistemas capaces de cuantificar el grado de homogeneidad de las deposiciones, basados en el análisis óptico de la luz reflejada por las muestras depositadas sobre el pyrex.

Se ha desarrollado y puso a punto una técnica de análisis que permite, gracias a la Desorción Láser, la vaporización rápida y directa de matrices complejas que contengan moléculas térmicamente lábiles. El acoplamiento de la Ionización Multifotónica Resonante al proceso anterior, permite la ionización altamente selectiva y eficaz de un analito específico de la matriz compleja desorbida. La detección de las moléculas ionizadas mediante la Espectrometría de Masas de Tiempo de Vuelo dota a la técnica de una segunda etapa de selección y de una alta resolución en masas.

Resumen y conclusiones

En este sistema las etapas de desorción e ionización láser están claramente separadas, lo que permite el desarrollo y optimización individualizada de cada una de ellas. De este hecho se deriva además la posibilidad de realizar estudios cinéticos y dinámicos para ambos procesos a nivel molecular.

En cuanto a la etapa de desorción se refiere, la configuración experimental puesta a punto ha posibilitado constatar las ventajas de la desorción frontal de la muestra frente a la desorción trasera de la misma. Del mismo modo se han realizado estudios sobre la dinámica de este proceso cuando se aplica la desorción láser al trans-resveratrol, revelando una clara supremacía de la componente térmica frente a la de absorción fotónica. Se ha desarrollado un método (MEPED) para optimizar dicho proceso de desorción, basado en la adición de un polvo metálico (Zn) a la matriz a desorber. Del mismo modo se ha estudiado la influencia de la longitud de onda de la radiación láser empleada en la desorción, encontrándose que los fotones infrarrojos (1064 nm) aplicados al método MEPED mejoran 80 veces la eficacia del proceso de desorción.

Del estudio espectroscópico del trans-resveratrol se han obtenido las condiciones analíticas idóneas para realizar los análisis. Se realizó primeramente, mediante la espectrofotometría de UV-Vis en el intervalo de 190 a 1100 nm, la determinación de las bandas de absorción de este compuesto. Tras este estudio se procedió a medir el espectro REMPI del trans-resveratrol en el intervalo de 294 a 312 nm, del que se dedujo que la longitud de onda resonante óptima para ionizar selectiva y eficazmente esta molécula es 302,1 nm. Por último se caracterizó el proceso de Ionización Multifotónico Resonante del trans-resveratrol, revelando que se trata de un proceso bifotónico de un sólo color.

Una vez caracterizados los parámetros óptimos de análisis el paso siguiente fue validar la técnica según la normativa ISO aplicable al análisis de trazas en muestras compleja. Para ello se han determinado los parámetros de:

Resumen y conclusiones

reproducibilidad, repetibilidad, linealidad, selectividad / especificidad, límite de detección, y límite de cuantificación cumpliendo satisfactoriamente los requisitos analíticos para el análisis de trazas en alimentos.

La aplicación de la técnica en la determinación cuantitativa de trans-resveratrol en distintas especies vegetales (vino, colorante alimenticio, pieles de uva, hojas de vid, cacahuets) ha demostrado la versatilidad y eficacia del sistema en la determinación rápida y directa del trans-resveratrol en matrices complejas.

Se ha estudiado el fenómeno de elicitación de la quercitrina, licopeno y trans-resveratrol, en muestras vegetales infectadas por el agente patógeno *Botrytis Cinerea*. Estos estudios han sido centrados mayoritariamente en éste último polifenol, dadas las propiedades ya demostradas y altamente beneficiosas para la salud humana del trans-resveratrol. El hecho de que el trans-resveratrol fuese producido como respuesta defensiva de la planta frente al ataque de un agente patógeno no específico, revela una correlación entre su contenido y el estado de salud de frutas y verduras, mostrando mayor resistencia aquellas que contienen un mayor contenido del mismo.

Por todo ello el paso siguiente fue probar la eficacia del trans-resveratrol como pesticida natural en otras frutas y verduras distintas de las uvas donde había sido estudiada su elicitación, por lo que se procedió al estudio de los efectos que su aplicación exógena producía en pimientos, uvas, aguacates, tomates y manzanas. En primer lugar se demostró que el tratamiento con trans-resveratrol no altera las propiedades organolépticas ni bioquímicas de las frutas y verduras tratadas, dotándolas de un valor añadido desde el punto de la mejora de la salud humana por la ingestión de este compuesto.

Resumen y conclusiones

De los experimentos realizados no sólo se dedujo que las frutas y verduras sobre las que se aplica el trans-resveratrol son más resistentes al ataque de agentes patógenos, sino que además su senescencia se ve retardada aumentando notablemente el tiempo de conservación tras su recolección.

Así pues las conclusiones más importantes alcanzadas en el presente trabajo son:

- 1) Se ha desarrollado y puesto a punto una técnica analítica para compuestos no volátiles basada en la desorción e ionización resonante por láser acoplada a un espectrómetro de tiempo de vuelo. Entre las características a destacar de dicha técnica cabe citar: rapidez, alta resolución y sensibilidad.

Para la puesta a punto de esta técnica se han optimizado:

- a) Dos sistemas eficaces de preparación de muestra, mediante su fractura en frío con un mezclador de alta velocidad y la extracción del trans-resveratrol por prensado en frío.
- b) Un sistema de desorción frontal de la muestra, probándose la mayor eficiencia de la desorción frontal de la muestra frente a la desorción trasera.
- c) La desorción por láser del trans-resveratrol mediante la mezcla de la muestra con polvo de Zn (MEPED) y la utilización de radiación láser infrarroja (1064 nm), mejorando 80 veces el rendimiento de la desorción directa de la muestra.

Resumen y conclusiones

- 2) Se ha estudiado la espectroscopía REMPI del trans-resveratrol en el intervalo de 300 a 310 nm, con la consiguiente determinación de la longitud de onda resonante (302,1 nm) que permite la ionización altamente selectiva y eficaz de este compuesto en una matriz compleja.
- 3) Ha sido validada la técnica LD+REMPI+TOFMS para el análisis de trans-resveratrol acorde con la norma EN-ISO-17025 para controles analíticos en alimentos, mediante la caracterización de los siguientes parámetros analíticos: repetibilidad (4,9%), reproducibilidad (4,4%), linealidad ($r=0,9997$), selectividad /especificidad, exactitud (96%), límite de detección (2 pg) y límite de cuantificación (7 pg). Se obtiene de este modo una técnica más versátil, universal, de gran resolución y sensibilidad basada en la espectroscopía láser para el análisis de muestras sólidas y gaseosas.
- 4) Ha quedado demostrada la aplicabilidad de la técnica con la determinación cuali y/o cuantitativa del contenido de trans-resveratrol en varios tipos de muestra: vino, colorante alimentario, piel de uva (LoD = 5 ppb), hoja de vid (LoD = 2 ppb), cacahuete.
- 5) Se ha estudiado la elicitación del trans-resveratrol en uvas y del licopeno en tomates como respuesta defensiva de la planta frente al ataque de el agente patógeno no específico *Botrytis Cinerea*, así como la medida de la relación directa entre el decaimiento de la concentración de quercitrina y el empeoramiento del estado de salud de las uvas.
- 6) Se ha demostrado la eficacia del trans-resveratrol como pesticida natural mediante la aplicación exógena de este compuesto en pimientos, tomates, aguacates, uvas y manzanas, retardando su senescencia sin afectar a sus propiedades organolépticas ni bioquímicas.

Resumen y conclusiones

- 7) La desorción láser acoplada a la ionización multifotónica resonante con detección por espectrometría por tiempo de vuelo posibilita el estudio de la fisiología de las plantas profundizando en el conocimiento de sus mecanismos de defensa, convirtiéndose de ese modo en una herramienta potente y versátil que hace posible el diseño de estrategias y procedimientos para aumentar la resistencia natural de frutas y verduras.

**7. PUBLICACIONES, PATENTES,
PRESENTACIONES EN CONGRESOS Y
SYMPOSIA**

PUBLICACIONES:

C. Montero, B.Bescós, J.M.Orea, A.González Ureña. “Food chemical analysis by laser desorption and resonant ionization mass spectrometry”. *Rev. in Anal. Chem.* **19 (1)**, 29, (2000).

C. Montero, J.M.Orea, M.S. Muñoz, R.F. Lobo, A.González Ureña. “Non-volatile analysis in fruits by laser resonant ionization spectrometry: Application to Resveratrol in grapes”. *Appl. Phys. B.* **71**, 601, (2000).

B.Bescós, J.M.Orea, C. Montero, A.González. “Avance en Tecnología Láser: nueva técnica de Espectroscopía Láser acoplada a Espectrometría de Masas para análisis químico de alimentos y medioambiental”. *Investigación y Ciencia* **258**, 34, (1998).

J.M.Orea, C. Montero, J. Jiménez, A.González Ureña. “Analysis of trans-resveratrol by laser desorption coupled with resonant ionization spectrometry. Application to resveratrol content in grapes”. *Anal. Chem.* En prensa, (2001).

A.González Ureña, J.M.Orea, C. Montero, J.B. Jiménez. “Improving natural resistance in fruits by exogenous application of natural pesticides”. Enviada a publicar, (2001).

PATENTES:

A. González Ureña, J.M. Orea, C. Montero, M.S. Muñoz, A. González González. “Método para aumentar la resistencia de la uva a su maduración e infección mediante la aplicación externa de resveratrol” Patente nº de solicitud: **P9902388**, Prioridad: 29.01.99.

Publicaciones y presentaciones en congresos

A. González Ureña, J.M. Orea, C. Montero, B. Bescós. “*Método de análisis de trans-resveratrol por desorción láser acoplada a ionización multifotónica resonante*”. Patente nº de solicitud: **P9800945**, Prioridad: 05.05.98.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS Y SYMPOSIA:

J.M. Orea, C. Montero J.B. Jiménez, A. González Ureña. “*1st. Workshop of Improvement of natural resistance in fruits*”. Ponencia y comunicación. Madrid (España), febrero (1999).

J.M. Orea, C. Montero J.B. Jiménez, A. González Ureña. “*2nd. Workshop of Improvement of natural resistance in fruits*”. Ponencia y comunicación escrita. Berne (Suiza), septiembre (1999).

C. Montero, J.M. Orea, J.B. Jiménez, A. González Ureña. “*3th. Workshop of Improvement of natural resistance in fruits*”. Ponencia y comunicación escrita. Roma (Italia), (2000).

C. Montero, J.M. Orea, J.B. Jiménez, A. González Ureña. “*Spectroscopic and analytical studies using laser resonant ionization spectrometry*”. Poster y comunicación escrita. *IV Joint iberian meeting on atomic and molecular physics*. El Escorial (España), (2000).

P. Gomez Serranillos, K. Slowing, M.E. Carretero, C. Montero, J.M. Orea, J.B. Jiménez, A. González Ureña. “*Analysis of trans-resveratrol in vitis vinifera by high performance liquid chromatography and laser ionization time of flight spectrometry*”. Poster y comunicación escrita. *XXIX Scientific meeting of the group of chromatography and related*. Alcalá de Henares (España), (2000).

Publicaciones y presentaciones en congresos

C. Montero, J.M. Orea, J.B. Jiménez, A. González Ureña. “4th. *Workshop of Improvement of natural resistance in fruits*”. Ponencia y comunicación escrita Nijmegen (Holanda), noviembre (2000).

J.B. Jiménez, C. Montero, J.M. Orea, , A. González Ureña. “5th. *Workshop of Improvement of natural resistance in fruits*”. Ponencia y comunicación escrita Madrid (España), abril (2001).

8. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- 1.- G. Goetz, A. Fkyerat, N. Metais, M. Kunz, R. Tabacchi, R. Peste, V. Pont. *Phytochemistry*. **52** (5), 759, (1999).
- 2.- R.J. Cook. *Annu. Rev. Phytopathol.* **38**, 95, (2000).
- 3.- S.O. Duke. "Natural Pesticides from Plants. In Advances in new crops (J. Janick, J.E. Simon, eds) *Timber Press*, Portland. 511, (1990).
- 4.- S.W. Hutcheson. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**, 59, (1998).
- 5.- M. Adrian, H. Rajaei, P. Jeandet, J. Veneau, R. Bessis. *Phytopathology*. **88**, 472, (1998).
- 6.- P. Jeandet, R. Bessis, M. Sbaghi, P. Meunier. *J. Phytopathol.*. **143**, 135, (1995).
- 7.- P. Langcake. *Physiol. Plant Pathol.* **18**, 213, (1981).
- 8.- P. Langcake, R.J. Price *Physiol. Plant Pathol.* **9**, 77 (1976).
- 9.- M. Adrian, P. Jeandet, J. Veneau, L.A. Weston, R. Bessis. *J. Chem. Ecol.*, **23**, 1689, (1997).
- 10.- A.C. Breuil, M. Adrian, N. Pirio, P. Meunier, R. Bessis, P. Jeandet. *Tetrahedron Letters*. **39**, 537, (1998).
- 11.- U. Stein, R. Blaich. *Vitis*. **24**, 75, (1985).

Bibliografía

- 12.- M. Adrian, P. Jeandet, R. Bessis, J.M. Joubert. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1981 (1996).
- 13.- C.Montero, B. Bescós, J.M. Orea, A. González Ureña. *Rev. Anal. Chem.* **19** (1), 1, (2000).
- 14 .- J. Omens. H. Zuckermann, S. Persijn, D.H. Parker, F.J.M. Harren. *Appl. Phys. B-Laser O.* **67**, 459, (1998).
- 15.- R.J. Cook. *Plant Dis.* **69**, 95, (1995).
- 16.- B.J. Jacobsen. *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**, 373, (1997).
- 17.- R.F. Smith, R. Van den Bosch. *Biol. Phys. Selected Chem. Methods.* 295, (1967).
- 18.- V.M. Stern, R.F. Smith, R. Van den Bosch, K.S. Hagen. *Hilgardia.* **29**, 81, (1959).
- 19.- J. Overton. *Ecologically Based Pest Management.* Natl. Acad. Press. 144, (1996).
- 20.- S. W. Hutchenson. *Ann. Rev. Phytopathol.* **36**, 59, (1998).
- 21.- T. Boller. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 189, (1995).
- 22.- M.G. Hahn. *Ann. Rev. Phytopathol.* **34**, 387, (1996).

Bibliografía

- 23.- L. Sticher, B. Mauch-Mani, J.P. Métraux. *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**, 235, (1997).
- 24.- N.T. Keen. *Plant Mol. Biol.* **19**, 109, (1992).
- 25.- A.E. Osbourn. *Fungal Genet. Biol.* **26**, 3, (1999).
- 26.- J. Kuc. *Ann. Rev. Phytopathol.* **33**, 275, (1995).
- 27.- K.O. Muller, H. Borger. *Arb. Biol. Reichsanst. Land Fortwirtsch.* **23**, 189, (1940).
- 28.- J.E. Thomzik, K. Stenzel, R. Stocker, P.H. Shereier, R. Hain, D.J. Stahl. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **51** (4), 265, (1997).
- 29.- J. Sweigard, H.D. VanEtten. *Phytopathology.* **77**, 771, (1987).
- 30.- J. Gorham “*The Stilbenoids*” in “*Progress in Phytochemistry*”; L. Reinhold, J.B. Harborne, T. Swain Eds.; Pergamon Press, Oxford UK . 203 (1980).
- 31.- M. Ibern-Gomez, S. Roig-Perez, R.M. Lamuela-Raventos, MC. De la Torre Boronat. *J. Agric. Food Chem.* **48** (12), 6352, (2000).
- 32.- TH. Sanders, RW. McMichael, KW. Hendrix. *J. Agric. Food Chem.* **48** (4), 1243, (2000).
- 33.- L.L. Creasy, M. Coffe *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **113**, 230 (1988).
- 34.- J.P. Roggero, C. García Parrilla *Sci. Aliments* **15**, 411 (1995).

Bibliografía

- 35.- L. Fremont. *Life Science*. **66** (8), 663, (2000).
- 36.- A. L. Lehninger “ *Bioquímica*”. 2ª Ed. Ediciones Omega, S.A. Madrid (1990).
- 37.- AJ. Bais, PJ. Murphy, IB. Dry. *Australian J. Plant Physiol.*. **27** (5), 425, (2000).
- 38.- P. Sarig, Y. Zutkhi, A. Monjauze, N. Lisker, R. Ben-Arie. *Phys & Mol. Plant Pathol.* **50**, 337, (1997).
- 39.- Jeandet, R. Bessis, B. Gautheron. *Am. J. Enol. Viticult.* **42**, 41, (1991).
- 40.- E. Cantos, C. García, S. De Pascual, FA. Tomas. *J. Agric. Food Chem.* **48** (10), 4606, (2000).
- 41.- M. Adrian, P. Jeandet, J. Veneau, L.A. Weston, R. Bessis. *J. Chem. Ecol.* **23** (7), 1689 (1997).
- 42.- P. Jeandet, R. Bessis, M. Sbaghi, P. Meunier, P. Trollat. *Am. J. Enol. Viticult.* **46** (1), 1 (1995).
- 43.- K.-H. Fritzemeier, H. Kindl *Vitaceae Planta.* **151**, 48 (1981).
- 44.- RH. Cichewicz, SA. Kouzi, MT. Hamann. *J. Nat. Prod.* **63** (1), 29, 2000.
- 45.- P. Bernard, A. Chereythmanjivil, I. Masih, L. Chapuis, A. Benoit. *FEMS. Microbiol. Lett.* **165** (1), 65, (1998).

Bibliografía

- 46.- G.H. Dai, C. Andary, L. Mondolot-Cosson, D. Boubals. *Phys & Mol. Plant Pathol.* **46**, 177, (1995).
- 47.- G. Hoos, R. Blaich. *J. Phytopathol.* **129**, 102, (1990).
- 48 .- M. Adrian, P. Jeandet, R. Bessis, J. M. Joubert. *J. Agric. Chem.* **44** (8), 1979, (1996).
- 49 .- R. Schubert, R. Fischer, R. Hain, R. Schreier, G. Bahnweg, D. Ernst, H. Sandermann. *Plant. Mol. Biol.* **34**, 417, (1997).
- 50.- AC. Douillet, P. Jeandet, M. Adrian, N. Bessis. *J. Agric. Food Chem.* **47** (10), 4456, (1999).
- 51.- M. Adrian, P. Jeandet, AC. Douillet, L. Tesson, R. Bessis. *J. Agric. Food Chem.* **48** (12), 6103, (2000).
- 52 .- E. Cantos, C. García-Viguera, S. Pascual-Teresa, F. A. Tomás-Barberán. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 4606, (2000).
- 53 .- E. Cantós, J.C. Espín, F.A. Tomás-Barberán. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5052, (2001).
- 54.- B. Lippmann, R. Mascher, C. Balko, H. Bergmann. *J. Appl. Bot-Angew Bot.* **74** (3-4), 160, (2000).
- 55 .- S. Kobayashi, C.K. Ding, Y. Nakamura, I. Nakajima, R. Matsumoto. *Plant Cell Reports.* **19** (9), 904, (2000).

Bibliografía

- 56.- G.J. Soleas, D.M. Goldberg, E.P. Diamandis, A. Karumanchiri, J. Yan, E. Ng. *Am. J. Enol. Viticult.* **46** (3), 346, (1995).
- 57.- T. Okuda, K. Yokotsuka. *Am. J. Enol. Viticult.* **47** (1), 93, (1996).
- 58.- G.J. Soleas, J. Yan, D.M. Goldberg. *J. Chromatogr. B.* **757**, 161, (2001).
- 59.- O. Palomino, M.P. Gomez-Serranillos, K. Slowing, E. Carretero, A. Villar. *J. of Chromat. A.* **870**, 449-451 (2000).
- 60.- R. Pezet, Ph. Cuenat. *Am. J. Enol. Viticult.* **47** (3), 287, (1996).
- 61.- B.J. Ector, J.B. Magee, C.P. Hegwood, M.J. Coign. *Am. J. Enol. Viticult.* **47**, 57 (1996).
- 62.- R. Pezet, V. Pont, P. Cuenat. *J. Chromatogr. A* **663**, 191 (1994).
- 63.- A.I. Romero, M. Ibern, R.M. Lamuela-Raventós, M.C. de la Torre-Boronat. *J. Agric. Food Chem.* **47** (4), 1533, (1999).
- 64.- A.L. Waterhouse, R.M. Lamuela-Raventós. *Phytochemistry*, **37** (2), 571, (1994).
- 65.- M.C. Pascual-Martí, A. Salvador, A. Chafer, A. Berna.. *Talanta* **54**, 735 (2001).
- 66.- O. Daniel, M.S. Meier, J. Schlatter, P. Frischknecht. *Environ. Health Persp. Supp.* **107** (1), 109, (1999).

Bibliografía

- 67.- E.H. Siemann, L.L. Creasy *Am. J. Enol. Viticult.* **43**, 49, (1992).
- 68.- D.M. Goldberg, J. Yan, E. Ng, E.P. Diamandis, A. Karumanhiri, G. Soleas, A.L. Waterhouse *Am. J. Enol. Viticult.* **46**, 159, (1995).
- 69.- YX. Zhu, LA. Coury, H. Long, CT. Duda, CB. Kissinger, PT. Kissinger. *J. Liq. Chromatogr. R. T.* **23** (10), 1555, (2000).
- 70.- A.I. Romero Perez, R.M. Lamuela Raventos, A.L. Waterhouse, M.C. De la Torre Boronat. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 2124, (1996).
- 71.- MV. Martinez, MC. García, AM. Troncoso. *Nahrung food.* **44** (4), 253, (2000).
- 72.- R.M. Lamuela Raventós, A.I. Romero Pérez, A.L. Waterhouse, M.C. De la Torre Boronat *J. Agric. Food Chem.* **43** (2), 281, (1995).
- 73.- X. Gu, Q. Chub, O. Dwyer, M. Zeece. *J. Chromatogr.* **881** (1-2), 471, (2000).
- 74.- U. Vrhovsek, S. Wendwlin, R. Eder. *Am. J. Enol. Viticult.* **48**, 214 (1997).
- 75.- P. Jeandet, R. Bessis, B.F. Maume, P. Meunier, D. Peyron, P. Trollat. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 316 (1995).
- 76.- Y. Kimura, H. Ohminami, H. Okuda, K. Baba, M. Kozawa, S. Arichi *Planta Med.* **49**, 51 (1983).
- 77.- Y. Kimura, H. Okuda, S. Arichi *Biochim. Biophys. Acta* **834**, 275 (1985).

Bibliografía

- 78.- B. Paul, I. Masih, J. Dopujari, C. Charpentier. *J. Ethnopharmacol.* **68**, 71, (1999).
- 79.- M.H. Criqui *Lancet* **1719**, 8939, (1994).
- 80.- A.A.E. Bertelli, L. Giovannini, D. Giannessi, M. Migliori, W. Bernini, M. Fregoni, A.J. Bertelli *Tissue React.* **17**, 1 (1995).
- 81.- HW. Zbikowska, B. Olas. *J. Physiol. & Pharmacol.* **51** (3), 513, (2000).
- 82.- B. Tadolini, C. Juliano, L. Piu, F. Franconi, L. Cabrini. *Free Radical Research.* **33** (1), 105, (2000).
- 83.- E.N. Frankel, A.L. Waterhouse, J.E. Kinsella *Lancet* **341**, 1103 (1993).
- 84.- M. Jang, L. Cai, G.O. Udeani, K.V. Slowing, C.F. Thomas, Ch.W.W. Beecher, H.H.S. Fong, N.R. Farnsworth, A.D. Kinghorn, R.G. Mehta, R.C. Moon, J.M. Pezzuto. *Science* **275**, 218 (1997).
- 85.- MMY. Chan, JA. Mattiacci, HS. Hwang, A. Shah, D. Fong. *Biochem Pharmacol.* **60** (10), 1539, (2000).
- 86.- G.S. Jayatilake, H. Jayasuriya, E.S. Lee, N.M. Koonchanok, R.L. Geahlen, C.L. Ashendel, J.L. McLaughlin, C.J. Chang. *J. Nat. Prod.* **56**, 1805 (1993).
- 87.- C. De Santi, A. Pietrabissa, R. Spisni, F. Mosca, GM. Pacifici. *Xenobiotica.* **30** (9), 857, (2000).

Bibliografía

- 88.- P. Borissova, St. Valcheva, A. Belcheva. *Acta Physiologica et Pharmacologica Bulgarica*. **18**, (1). (1994).
- 89.- A.A. Van der Sluis, J. Matthijs, M.F. Wim. *J. Agric. Food Chem.* **48**, (9). (2000).
- 90.- M. Ollanketo, M.L. Riekkola. *J. Liq. Chromatogr. R. T.* **23** (9), 1339, (2000).
- 91.- S. Nair, R. Gupta. *J. Assoc. Physician* . **44**, (10). (1996).
- 92.- E.B. Rimm, M.B. Katan, W.C. Willet. *Ann. Intern. Med.* **125**, (5). (1996).
- 93.- M.G.L. Hertog, E.J.M. Feskens, P.C.H, Hollman. *Lancet*. **342**, (8878). (1993).
- 94 .- A. Cassidy, B. Hanley, R. M. Lamuela-Raventos. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 1044, (2000).
- 95 .- A. J. Parr, G. P. Bolwell. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 985, (2000).
- 96.- YR. Lu, LY. Foo. *Food Chem.* **65** (1), 1, (1999).
- 97.- DM. Goldberg, A. Karumanchiri, G.J. Soleas, E. Tsang. *Am. J. Enol. Viticult.* **50** (2), 185, (1999).
- 98.- I. Tedesco, M. Russo, P. Russo, G. Iacomino, G.L. Russo, A. Carraturo, C. Faruolo, L. Moio, R. Palumbro. *J. Nutr. Biochem.* **11** (2), 114, (2000).

Bibliografía

- 99.- A.A. van der Sluis, M. Dekker, W.M.F. Jongen, *Cancer Letters*. **114**, (1), 107, (1997).
- 100.- AP. De Almeida, MMFS. Miranda, IC. Simoni, MD. Wigg, MHC. Lagrota, SS. Costa. *Phytother. Res.* **12** (8), 562, (1998).
- 101.- E. Giovannucci, A. Ascherio, EB. Rimm, et al. *J. Natl. Cancer I.* **91**, (4) 317. (1999).
- 102.- H.T.Gordon, J.C. Bouernfeind, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **18**, 59. (1982).
- 103.- R. Peto, R. Doll, J.D. Buckley, M.B. Sporn, *Nature*. **290**, 201. (1981).
- 104.- D.M. Goldberg, A. Karumanchiri, E. Ng, J. Yan, E.P. Diamandis, G.J. Soleas. *J. Agric. Food Chem* **43** (2), 1245 (1995).
- 105.- D.M. Goldberg, J. Yan, E. Ng., E.P. Diamandis, A. Karumanchiri, G.J. Soleas, A.L. Waterhouse. *Anal. Chem.* **66**, 3959 (1994).
- 106.- TG. Luan, GK. Li, ZX. Zhang. *Anal. Chim. Acta* **424** (1), 19, (2000).
- 107 .- G. J. Soleas, E. P. Diamandis, A. Karamanchiri, D. M. Golldberg. *Anal. Chem.* **69** (21), 4405, (1997).
- 108 .- O. Lamikanra, C. C. Grimm, J. B. Rodin, I. D. Inyang. *J. Agric. Food Chem*, **44** (4), 1111, (1996).
- 109 .- G. J. Soleas, J. Dam, M. Carey, D. M. Goldberg. *J. Agric. Food Chem*, **45** (10), 3872, (1997).

Bibliografía

- 110.- G.J. Soleas, D.M. Goldberg, E. Ng, A. Karumanchiri, E. Tsang, E.P. Diamandis. *Am. J. Enol. Viticult.* **48** (2), 169 (1997).
- 111.- D.M. Goldberg, E. Ng, A. Karumanchiri, J. Yan, E.P. Diamandis, G.J. Soleas. *J. Chromatogr. A* **708**, 89 (1995).
- 112.- K.D. McMurtrey, J. Minn, K. Pobanz, T.P. Schultz. *J. Agric. Food Chem* **42**, 2077 (1994).
- 113.- M. Adrian, P. Jeandet, A.C. Breuil, D. Levite, S. Debort, R. Bessis. *Am. J. Enol. Viticult.* **51** (1), 37, (2000).
- 114.- S. Malovana, F.J.G. Montelongo, J.P. Perez, M.A. Rodriguez. *Anal. Chim. Acta* **428** (2), 245, (2001).
- 115.- P. Jeandet, A.C. Breuil, M. Adrian, L.A. Weston, S. Debord, P. Menuier, G. Maume, R. Bessis. *Anal. Chem.* **69**, 5172, (1997).
- 116.- V.S. Sobolev, R.J. Cole. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1435, (1999).
- 117.- M.E. Juan, R.M. Lamuela-Raventós, M.C. de la Torre Boronat, J.M. Planas. *Anal. Chem.* **71**, 747, (1999).
- 118.- M. A. Rodríguez-Delgado, S. Malová, J. P. Pérez, T. Borges, F. J. García Montelongo. *J. Chromatogr. A.* **912**, 249, (2001).
- 119.- D. M. Goldberg, E. Tsang, A. Karumanchiri, E. P. Diamandis, G. J. Soleas, J. Yan, E. Ng. *Anal. Chem.* **68**, 1688, (1996).

Bibliografía

- 120 .- R. M. Lamuela-Raventós, A. L. Waterhouse. *J. Agric. Food Chem*, **41** (4), 521, (1993).
- 121 .- C. Domínguez, D.A. Guillén, C.G. Barroso. *J. Chromatogr. A*. **918**, 303, (2001).
- 122 .- E. Revilla, J.M. Ryan. *J. Chromatogr. A*. **881**, 461, (2000).
- 123 .- M. López, F. Martínez, C. Del Valle, C. Orte, M. Miró. *J. Chromatogr. A*. **722**, 359, (2001).
- 124 .- M. C. García-Parrilla, G. A. González, F. J. Heredia, A. M. Troncoso. *J. Agric. Food Chem*. **45**, 3487, (1997).
- 125 .- M. T. Tena, A. Ríos, M. Valcárcel. *Fresenius J. Anal. Chem*. **361**, 143, (1998).
- 126 .- K. Gamoh, K. Nakashima. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. **13** (12), 1112, (1999).
- 127.- Q. Chu, M. O'Dwyer, M.G. Zeece. *J. Agric. Food. Chem*. **46** (2), 509, (1998).
- 128 .- M. A. Rodríguez-Delgado, M. L. Pérez, R. Corbella, G. González, F. J. García Montelongo. *J. Chromatogr. A*. **871**, 427, (2000).
- 129.- L. Arce, M.T. Tena, A. Ríos, M. Valcalcel. *Anal. Chim. Acta* **359**, 27, (1998).

Bibliografía

- 130.- J.J. Berzas Nevado, A.M. Contento Salcedo, G. Castañeda Penalvo. *Analyst* **124**, 61, (1999).
- 131.- S. Malovaná, F.J. García Montelongo, J.P. Pérez, M.A. Rodríguez Delgado. *Anal. Chim. Acta.* **428**, 245, (2001).
- 132.- D.M. Goldberg, E. Tsang, A. Karumanchiri, E.P. Diamantis, G.J. Soleas, E. Ng. *Anal. Chem.* **68**, 1533, (1999).
- 133.- L. Chen, Y. Han, F. Yang, T. Zhang. *J. Chromatogr.* **907** (1-2), 343, (2001).
- 134.- J. Pazourek, G. González, A.L. Revilla, J. Havel. *J. Chromatogr. A* **874**, 111, (2000).
- 135.- D.M. Goldberg, E. Tsang, M. Levesque, G.J. Soleas. *J. Liq. Chromatogr. R. T.* **22**, 1843, (1999).
- 136.- J.P. Roggero, P. Archier, S. Coen. “*Wine, Nutricional and Therapeutic Benefits*” T.R. Watkins Ed. *ACS Symposium Series. American Chemical Society, Washington DC.* **661**, 6, (1997).
- 137.- C. Montero, JM. Orea, MS. Muñoz, RFM. Lobo, A.G. Ureña. *Appl. Phys. B-Laser O.* **71** (4), 601, 2000.
- 138.- M. Tsubouchi, B.J. Whitaker, L. Wang, H. Kohguchi, T. Suzuki, *Phys. Rev. Lett.*, **86** (20), 4500, (2001).

Bibliografía

- 139.- B.F.G. Jonson, J.S. McIndoe. *Coordination Chemistry Reviews*. **200**, 901, (2001).
- 140.- A.González Ureña, “*Cinética y dinámica molecular de las reacciones químicas elementales*”, 2ª Ed. Editorial Alhambra S.A., Madrid (1991).
- 141 .- B. Bescós, J.M. Orea, C. Montero, A. González Ureña. *Investigación y Ciencia*. **258**, 34, (1998).
- 142 .- B. Bescós, J.M. Orea, C.Montero, A. González Ureña. A. Valverde, A, Aguilera. *Laser Chem*. **18**, 35, (1998).
- 143.- D. Kleine, H. Dahnke, W. Urban, P. Hering, M. Murtz. *Opt. Lett.* **25** (21), 1606, (2000).
- 144.- M. Nagele, M.W. Sigrist. *Appl. Phys. B-Laser O.* **70** (6), 895, (2000).
- 145.- T.Ogawa, M.Kise, T.Yasuda, H.Kawazumi y S.Yamada, *Anal.Chem.* **64**, 1217 (1992).
- 146.- S.T. Dai, L. Jin, W. Lu, R.T. An, L.L. Tai, D.Y. Chen. *App. Phys. A Mat. Sci. & Proc.*. **69**, S167, (1999).
- 147.- S. Mayo, T.B. Lucatorto, G.G: Luther. *Anal. Chem.* **54**, 553, (1982).
- 148.- J.Y. Zhang, D.S. Nagra, L. Li; *Anal. Chem.* **65**, 2812, (1993).
- 149.- T.W. Heise, E.S. Yeung. *Anal. Chem.* **66**, 355, (1994).
- 150.- T.W. Heise, E.S. Yeung. *Anal. Chem.* **64**, 2175, (1992).

Bibliografía

- 151.- S.M. Kimbrell, E.S. Yeung. *Appl. Spectrosc.* **45** (3), 442, (1991).
- 152.- B. Spengler, R.J. Cotter. *Anal. Chem.* **62**, 793, (1990).
- 153.- L. Li, D. Lubnam. *Rev. Sci. Instrum.* **59** (4), 557, (1988).
- 154.- V.V. Laiko, M.A. Baldwin, A.L. Burlingame. *Anal.Chem.* **72** (4), 652, (2000).
- 155.- A.C. Lazar, P.T.A. Reilly, W.B. Whitten, J.M. Ramsey. *Anal.Chem.* **72** (9), 2142, (2000).
- 156.- H.J. Kim, J.K. Lee, S.J. Park, H.W. Ro, D.Y. Yoo, D.Y. Yoon. *Anal.Chem.* **72** (22), 5673, (2000).
- 157.- Z.X. Shen, J.J. Thomas, C. Averbuj, K.M. Broo, M. Engelhard, J.E. Crowell, M.G. Finn, G. Siuzdak. *Anal.Chem.* **73** (3), 612, (2001).
- 158.- G.R. Kinsel, J. Lindner, J. Grotemeyer. *J. Phys. Chem.* **96**, 3162, (1992).
- 159.- J.Gormally, *Trends Anal. Chem.* **11**, 10, (1992).
- 160.- J.J.Jiménez, J.Atiienza, J.L.Bernal y L.Toribio. *Chromatographya.* **38**, (5-6), 395 (1994).
- 161.- J.E. Campana, R.B. Fress: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **21**, 1414 (1984).
- 162.- SH. Huh, GH. Lee. *J. Korean Phys. Soc.* **38** (2), 107, (2001).

Bibliografía

- 163.- AR. Todeschini, EX. Da Silveira, C. Jones, R. Wait, JO. Previato, L. Mendonca. *Glycobiology*. **11** (1), 47, (2001).
- 164.- G.D. Daves, Jr.: *Acc. Chem. Res.* **12**, 359 (1979).
- 165.- P. Saalfrank. *J. Chem. Phys.* **113** (9), 3780, (2000).
- 166.- DL. Scovell, TD. Pinkerton, VK. Medvedev, FM. Stuve. *Surf. Sci.* **457** (3), 365, (2000).
- 167.- BP. Cao, XH. Zhou, ZN. Gu, HZ. Xiao, JZ. Wang. *Fullerene Sci. Techn.* **8** (6), 483, (2000).
- 168.- Y. Zhang, RSS. Wu, HS. Hong, KF. Poon, MHW. Lam. *Environ. Toxicol. & Chem.* **19** (10), 2431, (2000).
- 169.- N. Kruse. *J. Mol Catal A-Chem.* **163** (1-2), 79, (2000).
- 170.- J.H. Gross, SM. Weidner. *Eur. J. Mass Spectrom.* **6** (1), 11, (2000).
- 171.- E.D. Hardin, T.P. Fan, C.R. Blakely, M.L. Vestal: *Anal. Chem.* **56**, 2 (1984).
- 172.- R.D. MacFarlane, D. Vemura, K. Veda, Y. Hirata: *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 875 (1980).
- 173.- A. Benninghoven, W. Sichtermann: *Anal. Chem.* **50**, 1180 (1978).

Bibliografía

- 174.- B. Jalevik, H. Odelius, W. Dietz, JG. Noren. *Arch. Oral Biol.* **46** (3), 239, (2001).
- 175.- Y. Oya, T. Suzuki, K. Iinuma, K. Morita, T. Horikawa, K. Abe. *App. Surf. Sci.* **169**, 246, (2001).
- 176.- DS. Wu, NH. Kuo, FC. Liao, RH. Horng, MK. Lee. *App. Surf. Sci.* **169**, 638, (2001).
- 177.- M. Karas, F. Hillenkamp: *Anal. Chem.* **50**, 1180 (1978).
- 178.- H. Orsnes, R. Zenobi. *Chem. Soc. Rev.* **30** (2), 104, (2001).
- 179.- K. Yoshimura, L. Przybilla, S.J. Ito, JD. Brand, M. Wehmeir, HJ. Rader, K. Mullen. *Macromol. Chem. Physic.* **202** (2), 215, (2001).
- 180.- JZ. Lu, R. Zenobi. *Fresen. J. Anal. Chem.* **366** (1), 3, (2000).
- 181.- A. Lapolla, D. Fedele, P. Traldi. *Mass. Spectrom. Rev.* **19** (5), 279, (2000).
- 182.- HF. Alomirah, I. Alli, Y. Konishi. *J. Chromatogr. A* **893** (1), 1, (2000).
- 183.- IS. Krull, A. Sebag, R. Stevenson. *J. Chromatogr. A* **887** (1-2), 137, (2000).
- 184.- BLM. Van Baar. *FEMS Microbiol. Rev.* **24** (2), 193, (2000).
- 185.- KH. Jarman, ST. Cebula, AJ. Saenz, CE. Petersen, NB. Valentine, MT. Kingsley, KI. Wahl. *Anal. Chem.* **72** (6), 1217, (2000).

Bibliografía

- 186.- K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2**, 151 (1988).
- 187.- VV. Golovlev, SH. Lee, SL. Allman, NI. Tarenenko, NR. Isola, CH. Chen. *Anal.Chem.* **73** (4), 809, (2001).
- 188.- M. Benazouz, B. Hakim, J.L. Debrun, D. Strivay, G. Weber. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13** (23), 2302, (1999).
- 189.- YF. Kong, YF. Zhu, JY. Zhang. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **15** (1), 57, (2001).
- 190.- L.V. Zhigilei, P.B.S. Kodali, B.J. Garrison: *J. Phys. Chem. B* **102**, 2845 (1998).
- 191.- V.N. Varakin, S.P. Kabanov, A. P. Simonov: *Opt. Spectrosc.* **83**, (4), 520 (1997).
- 192.- R.N.Zare, *Science* **226**, 298 (1984).
- 193.- W.C.Wiley y I.H.Mc.Laren, *Rev.Sci.Instrum.* **26**, 1150 (1955).
- 194.- D. Price, *Trends Anal. Chem.* **9**, 21, (1990).
- 195.- F.M. Zimmerman, W. Who. *J. Chem. Phys.* **100** (10) 7700, (1994).
- 196.- U. Boels, R. Zimmermann, C. Weickhardt, D. Lenoir, K.-W. Schramm, A. Kettrup, E.W. Slach. *Chemosphere*, **29** (7), 1429, (1994).

Bibliografía

- 197.- U. Boesl, R. Weinkauf, E.W. Schlag. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **112**, 121, (1992).
- 198.- R.J. Cotter. *Anal. Chim. Acta* **195**, 45, (1987).
- 199.- E.R. Bernstein, K. Law, M. Schauer. *J. Chem. Phys.* **80**, 207, (1984).
- 200.- R. Zimmermann, HJ. Heger, A. Kettrup. *Fresenius J. of Anal.Chem.* **363** (8), 720, (1999).
- 201.- M. Blumenstock, R. Zimmermann, K.W. Schramm, A. Kettrup. *Chemosphere.* **42** (5-7), 507, (2001).
- 202.- C.Woywod, W.C. Livingood, J.H. Frederick. *J. Chem. Phys.* **114**, 1631, (2001).
- 203.- M.S. Ford, S.R. Haincs, I. Pugliesi, C.L.H. Dessent, K. Muller-Dethlefs. *J. Electron Spectrosc.* **112**, 231, (2000).
- 204.- B.Bescós, J.M. Orea, C. Montero, A. González Ureña, C. Weickhardt, U. Boels, E. W. Schlag: *Chem. Phys. Lett.* 287, **371** (1998).
- 205.- O.P. Haefliger, R. Zenobi: *Anal. Chem.* **70**, 2660 (1998).
- 206.- R.M. Garnica, M.F. Apple, L. Eagan, J.R. McKeachie, T. Benter. *Anal. Chem.* **72**, 5639, (2000).
- 207.- H.J. Heger, R. Zimmermann, R. Dorfner, M. Beckmann, H. Griebel, A. Kettrup, U. Boesl. *Anal. Chem.* **71**, 46, (1999).

Bibliografía

- 208.- H. Oser, M.J. Coggiola, G.W. Faris, S.E. Young, B. Voldquardsen, D.R. Crosley. *App. Optics*. **40**, 859, (2001).
- 209.- B.M. Collum, S.K. Shealy, S.M. Angel. *Appl. Spectrosc.* **53**, 1646, (1999).
- 210.- L. Zhang, L. Pei, J. Dai, T. Zhang, C. Chen, S. Yu, X. Ma. *Chem. Phys. Lett.* **259**, 403, (1996).
- 211.- M.N. Al-Kahali, R.J. Donovan, T. Ridley. *Chem. Phys.* **208**, 165, (1996).
- 212.- J.B. Milan, W.J. Buma, M.N.R. Ashfold. *Chem. Phys. Lett.* **239**, 326, (1995).
- 213.- C. Weickhardt, U. Boels, E.W. Slach. *Anal. Chem.* **66**, 1062, (1994).
- 214.- Y. Numata, Y. Ishii, M. Watahiki, I. Suzuka, M. Ito. *J. Phys. Chem.* **97**, 4930, (1993).
- 215.- R.J.J.M. Steenvoorden, M.H. Vasconcelos, P.G. Kistemaker. *J. Molec. Spectr.* **161**, 17, (1993).
- 216.- L.J. Kovalenko, C.R. Maescheling, S.J. Clemett, J.M. Philipoz, R.N. Zare, C.M. Alexander. *Anal. Chem.* **64**, 682, (1992).
- 217.- R. Zimmermann, HJ. Herger, A. Kettrup, U. Nikolai. *Fresenius J. of Anal. Chem.* **366** (4), 368, (2000).
- 218.- M. Blumenstock, R. Zimmermann, KW. Schramm, A. Kaune, U. Nikolai, D. Lenoir, A. Kettrup. *J. Anal. & App. Pyrolysis.* **49** (1-2), 179, (1999).

Bibliografía

- 219.- M.N. Al-Kahali, R.J. Donovan, T. Ridley: *Chem. Phys.* **208**, 165 (1996).
- 220.- J.C. Polanyi, N.S.K. Sze, J.X. Wang: *J. Phys. Chem.* **101**, 6679 (1997).
- 221.- G.K. Nicolussi, M.J. Pellin, W.F. Calaway, R.S. Lewis, A.M. Davis, S. Amari, R.N. Clayton: *Anal. Chem.* **69**, 1140 (1997).
- 222.- C.M. Gittins, M. J. Castaldi, S. M. Senkan, E. A. Rohlfin: *Anal. Chem.* **69**, 286 (1997).
- 223.- C. Weickhardt, C. Grun, R. Heinicke, A. Meffert, J. Grotenmeyer: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11**, 745 (1997).
- 224.- Zimmerman, U. Boels, H.J. Heger, E. R. Rohwer, E.K. Ortner, E.W. Schlag, A. Kettrup: *J. High Res. Chrom.* **20**, 461 (1997).
- 225 .- EN-ISO-17025 “*General Criteria for the Operation of Testing Laboratories*”. (1999).
- 226.- M. Yang y J. P. Reilly, *J. Phys. Chem.* **94**, 6299, (1990).
- 227.- R.E. Majors, *LC-GC*, **9**, 16, (1991).
- 228.- M. Muller. “Cryotechniques in Biological Electron Microscopy”. *Enciclopedia of Human biology*. Ed. Academic Press Inc. **2**, 726, (1991).
- 229.- UNE-EN 30012-1. “*Requisitos de aseguramiento de la calidad de los equipos de medida PARTE 1: Sistema de confirmación Metrológica de los equipos de medida*”, 3.23: (1994).

Bibliografía

- 230.- ISO/IEC GUIDE 25. “*General requirements for the competence of calibration and testing laboratories*”, 3.4: (1990).
- 231.- D.M. Lubman y M.N. Kronick, *Anal. Chem.* **54**, 660, (1982).
- 232 .- B. Bescós, J.M. Orea, A. González Ureña. *Laser Chem.* **18**, 219, (2000).
- 233.- UNE-EN-ISO 8402. “*Gestión de la Calidad y Aseguramiento de la Calidad. Vocabulario*”, 2.18: (1995).
- 234.- J.M. Green. *Anal. Chem.* **68**, 305, (1996).
- 235.- ISO 5725-1. “*Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results –Part. 1: General principles and definitions*”, 3.12: (1994).
- 236.- J.M. Orea, B. Bescós, C. Montero, A. González Ureña. *Anal. Chem.* **70**, 491, (1998).
- 237.- C. Weickhardt, C. Grun, J. Grotemeyer. *Eur. Mass-Spect.* **4**, 239, (1998).
- 238.- Gary L. Long J. D. Winefordner. *Anal. Chem.*, **55**, (7), junio (1983).
- 239.- Entidad Nacional de Acreditación (ENAC). *G-CSQ-02*, Rev **0**, 4, (1996).
- 240 .- <http://www.ucm.es/info/ffresca/>
- 241.- B. Heap. *Informe Mundial “Plantas Transgénicas y la Agricultura Mundial”*. Royal Society of London & U.S. National Academy of Science. Junio (2000).

Bibliografía

- 242.- S. Skowronek, R. Pereira, A. González Ureña. *J. Phys. Chem.* **101**, 7468, (1997).
- 243.- S. Skowronek, R. Pereira, A. González Ureña. *J. Chem. Phys.* **107**, 1668, (1997).
- 244 .- J.M. Orea, C. Montero, J. Jiménez, A. González Ureña. *Anal. Chem.* **000**, 000, (2001).
- 245.- R. Hain, H.J. Reif, E. Krause, R. Langebartels, H. Kindl. *Nature.* **361**, 153, (1993).
- 246.- P. Stark-Lorenzen, B. Nelke, G. Hänssler, Mühlbach, J.E. Thomzik. *Plant. Cell Rep.* **16**, 668, (1997).
- 247.- J.E. Thomzik, K. Stenzel, R. Stöcker, P.H. Schreier, R. Hain, D.J. Stahl. *Physiology Molecular Plant Pathology.* **51**, 265, (1997).

